HAL
open science

Etude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : Application à la synthèse de pseudo-céramides

Florian Le Joubioux

To cite this version:

Florian Le Joubioux. Etude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : Application à la synthèse de pseudo-céramides. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS363 . tel-00823900

HAL Id: tel-00823900

https://theses.hal.science/tel-00823900

Submitted on 19 May 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

Science pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 7266

THÈSE

présentée par :

Florian LE JOUBIOUX

Soutenue le 20 Avril 2012
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Biochimie

Étude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : application à la synthèse de pseudo-céramides

JURY :

Mr COMBES Didier	Professeur, INSA, Toulouse, Rapporteur
Mr DUBREUCQ Eric	Professeur, SupAgro, Montpellier, Rapporteur
Mr DHULSTER Pascal	Professeur, Université de Lille 1, Examinateur
Mme GRABER Marianne	Professeur, Université de La Rochelle, Invité
Mr MAUGARD Thierry	Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Mr PIOT Jean-Marie	Professeur, Université de La Rochelle, Examinateur

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Science pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 7266

THÈSE

présentée par :

Florian LE JOUBIOUX

Soutenue le 20 Avril 2012
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Biochimie

Étude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : application à la synthèse de pseudo-céramides

JURY :

Mr COMBES Didier	Professeur, INSA, Toulouse, Rapporteur
Mr DUBREUCQ Eric	Professeur, SupAgro, Montpellier, Rapporteur
Mr DHULSTER Pascal	Professeur, Université de Lille 1, Examinateur
Mme GRABER Marianne	Professeur, Université de La Rochelle, Invité
Mr MAUGARD Thierry	Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Mr PIOT Jean-Marie	Professeur, Université de La Rochelle, Examinateur

Contributions scientifiques

Publications

Florian Le Joubioux, Oussama Achour, Nicolas Bridiau, Marianne Graber, Thierry Maugard. Kinetic study of 2-butanol O-acylation and *sec*-butylamine N-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 *(2011) 108-113*.

Florian Le Joubioux, Yesmine Ben Henda, Nicolas Bridiau, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols. *Soumis, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*

Per-Olof Syrén, **Florian Le Joubioux**, Yesmine Ben Henda, Thierry Maugard, Marianne Graber, Karl Hult. Proton transfer in amino alcohols in transition state of lipase catalyzed N-acylation. *Soumis, Journal of the American Chemical Society*.

Florian Le Joubioux, Nicolas Bridiau, Yesmine Ben Henda, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. Effect of solvent on the performance of *Candida antarctica* lipase B in chemoselective acylation of amino-alcohols. *En préparation, pour Organic & Biomolecular Chemistry*.

Communications par affiche

Florian Le Joubioux, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. Acylation sélective d'amino-alcools par la Lipase B de *Candida antarctica* en milieu organique : application à la synthèse enzymatique de pseudo-céramides. *Colloque des doctorants, le 29 avril 2010 à La Rochelle, France*.

Florian Le Joubioux, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. Kinetic study of 2-butanol O-acylation and *sec*-butylamine N-acylation catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *23ème colloque du Club Bioconversion en Synthèse Organique du 25 au 28 mai 2010 à Royat dans le Puy de Dôme, France*.

Florian Le Joubioux, Nicolas Bridiau, Yesmine Ben Henda, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. The effect of substrate structure and solvent nature on the efficiency and chemoselectivity of the acylation of amino-alcohols catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Biotrans 2011: 10ème symposium international sur la biocatalyse du 2 au 6 octobre 2011 Sicilia, Italie*.

Communications orales

Florian Le Joubioux, Oussama Achour, Marianne Graber, Thierry Maugard. Etude cinétique de O-acylation du butan-2-ol et de N-acylation de la *sec*-butylamine, catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435). *Journées de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France, les 9 et 10 décembres 2010 à La Rochelle, France*.

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au laboratoire LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs). Je tiens donc à remercier le professeur Sylvain Lamare, ancien directeur du LIENSs et Mr Pierre Richard, directeur actuel, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le professeur Thierry Maugard pour m'avoir encadré au cours de ces travaux. Nos nombreuses discussions sur le déroulement des travaux et sur les problèmes rencontrés ont été passionnantes et enrichissantes. Merci aussi pour m'avoir offert la possibilité d'assurer des travaux pratiques et dirigés, et ainsi connaitre les plaisirs de l'enseignement.

Je veux remercier également les professeurs Didier Combes de l'INSA de Toulouse et Eric Dubreucq de SupAgro Montpellier, pour avoir bien voulu juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que les professeurs Pascal Dhulster de l'université de Lille 1, Jean-Marie Piot de l'université de La Rochelle et Marianne Graber également de l'université de La Rochelle pour leur rôle en tant que membres du jury.

J'adresse également mes remerciements aux étudiants qui ont grandement contribué à ce travail et que j'ai eu la chance d'encadrer : Mr Oussama Achour, Mlle Yesmine Ben Henda et Mr Mehdi Sanekli. Je suis très heureux de vous compter aujourd'hui pour amis.

Un grand merci à Mr Guillaume Pierre et à Mr Nicolas Bridiau pour leur aide, leurs précieux conseils et les discussions stimulantes que nous avons eues ensemble.

Merci à mes collègues de bureau : Rachida, Nicolas ainsi qu'à tous les doctorants, stagiaires, techniciens et personnels statutaires, présent dans le laboratoire : Zsuzsanna, Virginie, Emmanuel, Hervé, Rana, Betty, Laetitia, Viviane... Leur éternelle bonne humeur, leur vitalité et leurs sourires font du laboratoire un endroit où l'on se sent bien.

Je remercie tout le personnel de l'équipe AMES pour sa sympathie, son aide et son soutien sur le plan scientifique et humain.

Enfin, toutes les expressions de ma reconnaissance vont à mes parents dont le soutient est une source de réconfort et d'énergie permanente, merci pour tout, je vous admire…

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES **1**
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES UNITES **5**
INTRODUCTION GENERALE **9**
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **15**
I. Les céramides et pseudo-céramides **17**
I.1. Définition des céramides et pseudo-céramides 17
I.2. Fonctions et propriétés biologiques 17
I.3. Classification 18
I.4. Applications des céramides et pseudo-céramides 21
I.5. Synthèse de céramides et pseudo-céramides 24
I.5.1. Synthèse par voie chimique 24
I.5.2. Synthèse par voie biotechnologique 26
II. Les lipases utilisées comme catalyseurs des réactions d'acylation **28**
II.1. Généralité sur les lipases 29
II.2. La synthèse de liaison ester 31
II.3. La synthèse de liaison amide 31
II.4. Mécanisme d'action et aspect cinétique des lipases 33
II.5. Sélectivité des lipases lors de réaction d'acylation 35
II.5.1. Effet de la nature du substrat donneur de groupement acyle 35
II.5.2. Enantiosélectivité 36
II.5.3. Régiosélectivité 40
II.5.4. Chimiosélectivité 42
III. Les milieux dits « non conventionnels » utilisés pour l'acylation enzymatique **46**
III.1. Introduction 46
III.2. Les principaux types de milieux dits « non-conventionnels » 46
III.3. Les solvants organiques 47
III.4. Les liquides ioniques 51
IV. Les autres paramètres affectant l'acylation enzymatique **54**
IV.1. L'eau dans le milieu réactionnel 54
IV.1.1. L'eau en tant que reactif 54
IV.1.2. L'activité thermodynamique de l'eau 56

IV.1.3. L'état d'hydratation du biocatalyseur 56
IV.2. Influence de la température 59
IV.3. Influence de l'état d'ionisation des substrats 61
V. Conclusion 64
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 67
I. Matériel 69
I.1. Matériel biologique 69
I.2. Réactifs et solvants 69
II. Méthodes analytiques 71
II.1. Méthodes générales d'analyse des milieux réactionnels par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (CLHP/MS-ESI)..... 71
II.2. Différents systèmes d'élution CLHP utilisés 72
II.3. Méthodes générales de quantification des produits par CLHP 73
II.4. Analyses par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) 74
II.5. Analyses par Spectroscopie Infrarouge (IR) 74
II.6. Calculs des activités thermodynamiques et dosage de l'eau 74
II.6.1. Calculs des activités thermodynamiques de molécules en solvant organique 74
II.6.2. Mesure de la teneur en eau 75
III. Synthèses enzymatiques 76
III.1. Méthodes générale de synthèse pour les études cinétiques 76
III.2. Méthodologies propres aux différents solvants utilisés 77
III.2.1. Synthèses réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol 77
III.2.2. Synthèses réalisées dans le *n*-hexane 77
III.2.3. Synthèses réalisées dans un liquide ionique ([Bmim] [PF_6]) 77
III.3. Méthodes de synthèse de pseudo-céramides en réacteur à « lit fixe » 77
III.4. Méthodes de prélèvements 80
IV. Méthodes de purification des produits de synthèse par CLHP/SM-préparative 82
V. Caractérisation SM, IR et RMN des produits synthétisés 83
V.1. O-myristyl butan-2-ol (3) 83
V.2. N-myristyl *sec*-butylamine (5) 83
V.3. N-myristyl 2-aminopropan-1-ol (8) 84
V.4. O,N-dimyristyl 2-aminopropan-1-ol (9) 84
V.5. N-myristyl 1-aminopropan-2-ol (14) 85
V.6. O,N-dimyristyl 1-aminopropan-2-ol(15) 85
V.7. 1-O-myristyl propane-1,2-diol(16) 86
V.8. 2-O-myristyl propane-1,2-diol (17) 86
V.9. 1-N-myristyl 1,2-diaminopropane (18) 87
V.10. N,N-dimyristyl 1,2-diaminopropane (19) 87
V.11. N-myristyl 1-méthoxy-2-propylamine (20) 88

V.12. O-myristyl 4-aminopentan-1-ol (23) 88
V.13. N-myristyl 4-aminopentan-1-ol (24) 89
V.14. O,N-dimyristyl 4-aminopentan-1-ol (25) 89
V.15. O-myristyl 6-aminohexan-1-ol (26) 90
V.16. N-myristyl 6-aminohexan-1-ol (27) 90
V.17. O,N-dimyristyl 6-aminohexan-1-ol (28) 91
V.18. 2-N-myristyl 2-aminopropane-1,3-diol (32) 91
V.19. 1-O,2-N-dimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol (34) 92
V.20. 3-N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol (38) 92
V.21. 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol (40) 93
V.22. 3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol (44) 93
V.23. 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol (55) 94

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS 95

Partie 1: Etude cinétique de l'acylation de composés monofonctionnels dans le 2-méthylbutan-2-ol : mécanismes réactionnels et énantiosélectivité 97

I. Introduction 99

II. Etude cinétique de la O-acylation du butan-2-ol 101

III. Etude cinétique de la N-acylation de la *sec*-butylamine 108

IV. Conclusion 117

Partie 2 : Etude structure-réactivité, lors de l'acylation enzymatique de différents accepteurs de groupement acyle, dans le 2-méthylbutan-2-ol 119

I. Introduction 121

II. Etude de l'acylation de l'alaninol dans le 2-méthylbutan-2-ol en présence de la lipase B de *Candida antarctica* 121

III. Etude structure-réactivité des accepteurs de groupements acyle 130

III.1. Effet des groupements fonctionnels sur les paramètres cinétiques 132

III.1.1. Effet des groupements fonctionnels sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app}) 132

III.1.2. Effet des groupements fonctionnels sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app}) 133

III.2. Effet de la longueur de la chaine carbonée entre les fonctions amine et alcool lors de l'acylation d'amino-alcools 135

III.2.1. Effet de la longueur de la chaine carbonée sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app}) 137

III.2.2. Effet de la longueur de la chaine carbonée sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app}) 137

IV. Hypothèse sur la N-acylation 138

V. Conclusion 142

Partie 3 : Influence du milieu réactionnel lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools 143

I. Introduction 145

II. Influence du solvant sur les paramètres cinétiques apparents 146

II.1. Influence du solvant sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app}) 147

II.2. Influence du solvant sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app}) 149

II.3. Bilan de l'influence du solvant sur les paramètres cinétiques apparents..... 151

III. Influence du solvant sur la production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation d'amino-alcools 152

III.1. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le 2-méthylbutan-2-ol 153

III.2. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le *n*-hexane 154

III.3. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le [Bmim] [PF_6]..... 156

III.4. Bilan de l'influence du solvant sur la production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools 158

IV. Conclusion 159

Partie 4 : Etude de l'acylation de composés de type amino-diol: Application à la synthèse de pseudo-céramides 161

I. Introduction 163

II. Réactions-modèles d'étude : acylation enzymatique d'amino-diols par l'acide myristique 163

II.1. Etude cinétique de l'acylation enzymatique d'amino-diols à partir de l'acide myristique dans le 2-méthylbutan-2-ol..... 163

II.2. Influence du solvant sur de l'acylation enzymatique d'amino-diols 169

II.3. Bilan de l'acylation enzymatique d'amino-diols à partir d'acide myristique 170

III. Production enzymatique de pseudo-céramides en réacteur continu à « lit fixe »..... 171

III.1. Production de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) 172

III.1.1. Mise en œuvre de la réaction 172

III.1.2. Optimisation de la réaction 174

III.1.3. Bilan intermédiaire sur la production de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) 184

III.2. Production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides) 185

III.2.1. Mise en œuvre de la réaction 185

III.2.2. Optimisation de la réaction 188

III.2.3. Bilan intermédiaire sur la production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides) 194

IV. Conclusion 195

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 197

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 203

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES UNITES

Abréviations :

a_i	Activité thermodynamique d'un composé
a_W	Activité thermodynamique de l'eau
[Bmim][PF_6]	1-Butyl-3-méthyl-imidazolium hexafluorophosphate
C	Chimiosélectivité
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
CLHP/SM	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
E	Rapport énantiomérique
ESG	Etat stationnaire général
ESI	« ElectroSpray Ionization »
IR	Infra-rouge
K_{eq}	Constante d'équilibre
K_{mx}^{app}	Constante apparente de Michaelis-Menten du substrat x
LIs	Liquides ioniques
Log P	Logarithme du coefficient de partage d'une molécule donnée au sein d'un système biphasique octanol/eau 50/50 (v/v)
m	Masse
M	Masse molaire
m/m	Masse/masse

nd	Non déterminé
PER	Pré-équilibre rapide
r	Rapport molaire [acide gras] / [accepteur d'acyle]
RMN ^{1}H	Résonnance magnétique nucléaire du proton
SM^{+}	Spectrométrie de masse en mode positif
tr	Temps de rétention
UNIFAC	« Universal functional activity coefficient »
UV	Ultra-violet
v/v	Volume/volume
v_i	Vitesse initiale
V_{max}^{app}	Vitesse initiale maximale apparente d'une réaction enzymatique.

Unités :

%	Pourcentages
bar	Unités de pression
°C	Degrés Celsius
cm^{-1}	Centimètres $^{-1}$(unités du nombre d'onde)
g	Unité de la force relative de centrifugation (1 g = l'accélération de la pesanteur)
h	Heures
Hz	Hertzs
l	Litres
M	Moles par litre
m/z	Rapports de la masse atomique (en unité de masse atomique) sur la charge d'une molécule.
min	Minutes
$mmol.h^{-1}.g^{-1}$	Millimoles par heures par g d'enzyme
mol	Moles
ppm	Parties par million
rpm	Rotations par minutes

INTRODUCTION GENERALE

Les céramides sont des lipides de la classe des sphingolipides issus de la N-acylation d'une base sphingoide par un acide gras. Ils possèdent deux chaines carbonées hydrophobes et un ou plusieurs pôles hydrophiles. Cette structure leur confère des propriétés biologiques uniques. En effet, ce sont les constituants majeurs du *stratum corneum*, la couche externe de la peau et des intermédiaires clefs dans la biosynthèse de tous les sphingolipides. En raison de leur rôle dans le maintien des propriétés de rétention d'eau de l'épiderme (Coderch *et al.,* 2003) les céramides ont un grand potentiel commercial dans l'industrie cosmétique pour des utilisations en temps que principes actifs inclus dans les produits de soins cutanés et capillaires. Ils sont également utilisés en pharmacologie principalement pour leurs propriétés anti-cancéreuses et dermatologiques (Imokawa *et al.,* 1991; Yoshinori *et al.,* 1999 ; Morita *et al.,* 2000 ; Modrak *et al.,* 2004). En effet, la combinaison entre des céramides et des agents chimio-thérapeutiques a permis d'augmenter la mort de cellules tumorales avec une meilleure efficacité que l'utilisation du traitement seul (Wanebo *et al.,* 2006) et de nombreux produits contenant des céramides ou leurs analogues synthétiques ont déjà été introduits en dermatologie. Par exemple, l'application d'un onguent hydrophile contenant 0,1% de céramide a un effet positif sur la cicatrisation des patients atteints de dermatite atopique (Hara *et al.,* 1999). Cette maladie est causée par une faible teneur en céramides dans le *stratum corneum* qui entraîne une plus grande perméabilité de la peau pour les allergènes, les substances toxiques et irritantes ou les microbes (Imokawa *et al.,* 1991; Yoshinori *et al.,* 1999).

Dans ce contexte, l'étude de la synthèse des céramides reçoit une attention accrue depuis quelques années. Traditionnellement, ils sont obtenus en faible quantité à partir de différentes sources naturelles. Mais la demande élevée de ces produits naturels à disponibilité limitée rend ces procédés coûteux.

Une alternative à l'extraction des céramides naturels est la synthèse de céramides et d'analogues de céramides par voies chimique et / ou enzymatique. La voie chimique se heurte encore à des problèmes de spécificité de réaction et nécessite généralement plusieurs étapes d'activation, de protection et de déprotection. Par ailleurs, les conditions de synthèse chimique sont relativement drastiques ne permettant pas l'utilisation de molécules fragiles. Afin de palier aux inconvénients de la voie chimique, l'étude de la synthèse des céramides à l'aide d'enzyme s'est développée depuis ces vingt dernières années. Généralement les enzymes employées pour ce type de synthèse sont des lipases. En effet, elles semblent être les enzymes les plus adaptées pour catalyser la O-acylation et la N-acylation, nécessaires à la production

de cette catégorie de lipides à partir d'amino-polyols (base sphingoide, amino-diol, etc…) et d'acides gras (Montet *et al.,* 1989a ; Montet *et al.,* 1989b ; Graille *et al.,* 1989).

Les lipases constituent l'une des catégories d'enzymes les plus utilisées pour catalyser l'acylation enzymatique. Le principe de ces biocatalyses repose sur l'utilisation des lipases en milieux dits « non conventionnels » (les solvants organiques, les liquides ioniques, les milieux fondus, etc…) présentant une faible teneur en eau. Dans ces conditions, au lieu de catalyser l'hydrolyse de liaison ester, l'enzyme peut catalyser le greffage covalent de groupements acyles sur des substrats présentant des fonctions nucléophiles de type alcool (-OH), amine (-NH_2) ou thiol (-SH). Du fait de l'utilisation d'un biocatalyseur, ces synthèses se déroulent dans des conditions plus douces que les synthèses par voies chimiques et évitent la formation de sous produits indésirables. Par ailleurs les lipases présentent souvent une grande spécificité vis-à-vis des substrats, si bien qu'elles permettent l'acylation énantiosélective, régiosélective et/ou chimiosélective de substrats multifonctionnels. Ces particularités des lipases les rendent particulièrement intéressantes du point de vue industriel.

Actuellement, les céramides ne sont pas faciles à produire pour des applications industrielles. Le prix d'un céramide synthétique varie de 1500 à 2000 euros/kg et les coûts de productions de céramides possédant une composition en acide gras similaire aux céramides naturels de la peau, peuvent atteindre plusieurs centaines de milliers d'euros/kg. Par conséquent, il est nécessaire de développer différentes méthodes de production plus simples et peu couteuses.

Dans ce cadre, la mise au point de nouveaux procédés de synthèse enzymatique et l'amélioration de procédés existant pour la production de « pseudo-céramides », se révèlent d'un grand intérêt. L'emploi de la lipase B de *Candida antarctica* comme biocatalyseur en milieux liquides dits « non conventionnels » constitue une approche que nous avons envisagée pour la synthèse sélective sans protection préalable de pseudo-céramides à partir d'un composé de type amino-diol et d'acides gras. Deux amino-diols, le sérinol (2-aminopropane-1,2-diol) et le 3-aminopropane-1,2-diol ont été choisis dans ce but, notre objectif à terme étant de réaliser une di-O-N-acylation sélective de l'amino-diol à partir de différents acides gras, afin de produire des pseudo-céramides possédant une structure la plus proche possible des céramides naturels.

Lors de ce travail, nous nous sommes efforcés de trouver des conditions opératoires qui permettent de synthétiser avec une sélectivité élevée des composés de type « pseudo-

céramide » par catalyse enzymatique. L'emploi d'un biocatalyseur de type lipase (la lipase B de *Candida antarctica*) pour simplifier et améliorer les voies de synthèse existantes de molécules d'intérêt est en effet un des axes de recherche du laboratoire, entrant dans le cadre d'un programme ANR chimie pour le développement durable (CP2D) : l'ANR EXPENANTIO qui est intitulé « vers une voie durable pour la synthèse de molécules chirales : approches expérimentales et théoriques innovantes pour la compréhension des bases moléculaires de l'énantiosélectivité des lipases et des estérases ».

Ce travail a été réalisé en gardant à l'esprit une approche fondamentale, cherchant à comprendre l'effet de la structure du substrat accepteur de groupement acyle et l'effet du microenvironnement de la lipase sur son activité catalytique et sa sélectivité en milieux dits « non-conventionnels » faiblement hydratés.

La présentation de ce travail s'articulera de la façon suivante :

Dans une étude bibliographique, nous ferons d'abord le point sur :

- Des généralités concernant la structure, les propriétés, les applications et la synthèse de céramides et pseudo-céramides.
- L'état des connaissances sur les lipases et leur utilisation comme catalyseur des réactions d'acylation.
- Les propriétés des milieux dits « non conventionnels » permettant de réaliser l'acylation enzymatique, en particulier les milieux liquides (solvants organiques et liquides ioniques).
- Les autres paramètres susceptibles d'influencer l'acylation enzymatique.

La synthèse bibliographique sera suivie d'une partie décrivant le matériel et les méthodes utilisés durant cette étude, au sein de laquelle nous présenterons également les analyses structurales des différents produits analysés et purifiés.

A la suite de cela, nous présenterons les principaux résultats et discussions concernant ce travail, déclinés en quatre parties.

Dans une première partie nous procéderons à une étude des mécanismes réactionnels mis en jeu lors de réactions de O-acylations et de N-acylations catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* dans un solvant organique : le 2-méthylbutan-2-ol. Pour cela des réactions simples seront testées, la O-acylation enzymatique du butan-2-ol par l'acide myristique et la

N-acylation enzymatique de la *sec*-butylamine par l'acide myristique. Cette partie permettra également de déterminer des informations sur l'énantiosélectivité et la chimiosélectivité de nos réactions.

Dans une seconde partie, nous passerons à une étude structure réactivité vis-à-vis de l'accepteur de groupement acyle avec l'acylation de différentes molécules : un alcool, une amine, un diol, une di-amine, une méthoxy-amine et quatre amino-alcools difonctionnels. Les amino-alcools testés posséderont une chaîne carbonée de deux à six carbones entre les fonctions alcools et amines. Cette partie permettra de fournir des informations sur la sélectivité (régiosélectivité et chimiosélectivité) et la réactivité de l'enzyme.

Dans une troisième partie, nous nous intéresserons à l'influence des milieux réactionnels sur les paramètres cinétiques apparents et les rendements à l'équilibre thermodynamique obtenus lors de l'acylation de différents amino-alcools. Nous réaliserons l'acylation de trois amino-alcools (alaninol, 4-aminopentan-1-ol et 6-aminohexan-1-ol) dans des solvants de type liquide monophasique : deux solvants organiques (2-méthylbutan-2-ol et *n*-hexane) et un liquide ionique ([Bmim] [PF_6]).

Finalement, dans une quatrième et dernière partie, nous réaliserons une étude portant sur l'acylation d'amino-diols à partir de différents acides gras, afin de produire des molécules de type « pseudo-céramide». Cette partie de notre travail sera tout d'abords réalisée au niveau fondamental grâce à l'étude de réactions-modèles, afin de déterminer les conditions nécessaires à la production sélective d'amido-esters de type pseudo-céramide. Puis, dans un second temps, nous effectuerons la mise au point et l'optimisation d'un procédé de synthèse en continu de pseudo-céramides, à l'aide d'un réacteur dit « à lit fixe ».

Étude bibliographique

CHAPITRE I

I. Les céramides et pseudo-céramides

I.1. Définition des céramides et pseudo-céramides

Les céramides sont des sphingolipides découverts par un médecin allemand, le biochimiste Johann Thudichum en 1884. Les céramides consistent en une base sphingoide liée à un acide gras par une liaison amide comme décrit figure 1 (Zheng *et al.*, 2006).

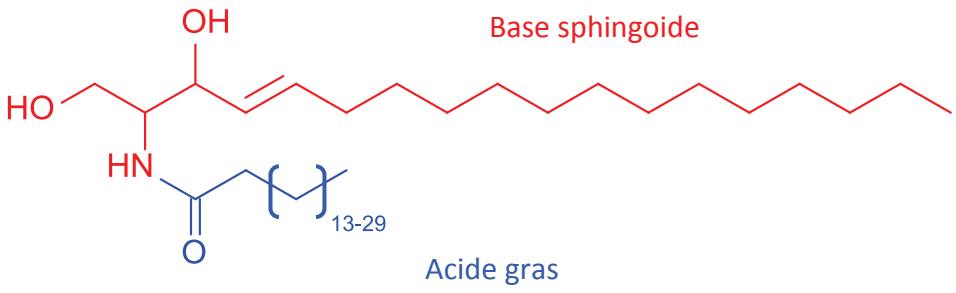


Figure 1 : *Structure représentative de la famille des céramides.*

Les céramides possèdent deux chaines carbonées hydrophobes et ont donc une faible solubilité dans l'eau. Cependant, la présence de groupements alcools et de la liaison amide leur confèrent un caractère amphiphile (Sot *et al.*, 2005). La structure de base des céramides peut être modifiée par des changements au niveau des chaînes carbonées (longueur des chaines, méthylation, hydroxylation et / ou modification du degré d'insaturation) (Figure 1) (Pata *et al.*, 2010).

Dans la nature, les céramides n'existent que dans des quantités extrêmement faibles. Il est très difficile de les extraire avec une grande pureté et dans des échelles de production importantes, ce qui entrave leur utilisation au niveau industriel (Imokawa *et al.*, 1994; Iwai *et al.*, 1998; Chamlin *et al.*, 2002). Une alternative aux céramides naturels est la synthèse d'analogues de céramides (pseudo-céramides). Des analogues de céramides ont été élaborés par voies chimiques et enzymatiques, afin de palier à la faible disponibilité des céramides naturels. Ces molécules synthétiques nommées pseudo-céramides ou composés de type céramide possèdent une structure et des propriétés proches des céramides naturels.

I.2. Fonctions et propriétés biologiques

Au niveau biologique, les céramides sont omniprésents dans le monde vivant et ont une action biologique importante. Ils se retrouvent généralement dans tous les tissus d'un organisme humain. Tout comme leurs précurseurs sphingoides (figure 2), les céramides sont principalement localisés dans les membranes où ils participent à la formation de microdomaines très ordonnés enrichis en céramides, qui facilitent la transduction des signaux

initiés par de nombreux stimulus (Bollinger *et al.*, 2005). Les céramides ont également un rôle important dans la signalisation cellulaire, et surtout dans la régulation de l'apoptose (mort cellulaire programmée), la différenciation, la transformation et la prolifération cellulaire (Chatterjee, 1999 ; Lahiri et Futerman, 2007). Ce sont des éléments clefs dans les voies intracellulaires de réponse au stress (Hannun et Obeid, 2002).

Les céramides jouent également un rôle majeur dans la structuration et le maintien des propriétés de rétention d'eau au niveau de l'épiderme (Coderch *et al.*, 2003). Les couches de lipides présentes dans les espaces intercellulaires du *stratum corneum* (la couche externe de la peau) empêchent la perte d'eau par la peau en formant une barrière (Coderch *et al.*, 2003). Les céramides constituent la majorité des lipides (40%) présents dans le *stratum corneum* (Lambers *et al.*, 2009). Les différents céramides identifiés dans le *stratum corneum* humain, forment un motif unique, qui joue un rôle important dans l'organisation et la cohésion de la structure de la peau (Coderch *et al.*, 2003). La teneur élevée en céramides de la peau et la forme compacte des lamelles lipidiques sont la base de la résistance exceptionnelle de la peau contre les produits chimiques ainsi que les dommages mécaniques. Ils sont aussi à la base de la faible perméabilité de la peau, à la fois vers l'extérieur et vers l'intérieur, pour des substances intrinsèques du corps, par exemple l'eau, mais également pour des xénobiotiques provenant de l'extérieur (Din Nardo *et al.,* 1998 ; Raith *et al.,* 2004; Dayan *et al.,* 2006).

I.3 Classification

Le terme de céramide regroupe en réalité une famille de molécules lipidiques très proches les unes des autres avec au moins 50 molécules distinctes se différenciant par leurs chaînes d'acides gras et par la présence de fonctions hydroxyles ou d'insaturations sur ces chaines.

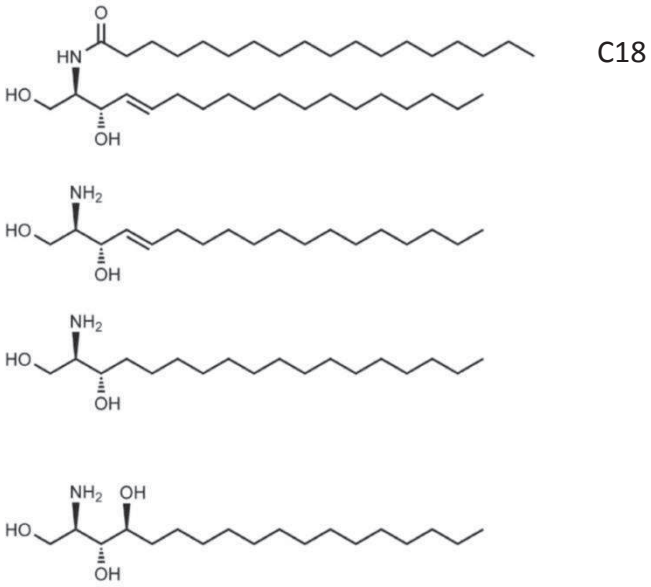


Figure 2 : *Structure d'un céramide (N-acyl-sphingosine) et de trois bases sphingoides (De haut en bas : sphingosine, sphinganine, and phytosphingosine).*

Les bases sphingoides peuvent être de trois types, selon leurs structures chimiques : sphingosine, sphinganine et phytosphingosine (figure 2). La forme C-18 de la sphingosine (C18:1) est la base sphingoide la plus commune retrouvée dans les céramides de mammifères. Sa stéréochimie (2S, 3R) est importante pour sa fonction biologique (Schnaar *et al.*, 2009).

La partie acide gras incorporée au sein des céramides varie largement. Bien que le C16:0 et le C18:0 soient les plus communs (Schnaar *et al.*, 2009), les acides gras varient de C14 à C30 voir même plus que C30 au niveau de la barrière hydrophobe de la peau (Fahy *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2006). Ils peuvent être insaturés et contenir des groupements hydroxyles.

Le terme de « céramide » est normalement utilisé pour les N-acyl-sphingosines (figure 2). Cependant les chercheurs qui ont catalogué ces molécules ont utilisé dans un premier temps des méthodes qui ne faisaient pas la distinction entre les différentes bases sphingoides et les différents acides gras utilisés (Zheng *et al.*, 2006 ; Kitatani et Luberto, 2010). Le terme « céramide » inclus donc de manière plus générale tous les N-acyl de bases sphingoïdes et est couramment utilisé pour désigner une sous classe de sphingolipide comprenant 3 catégories (Zheng *et al.*, 2006) :

- N-acyl-sphingosines (céramides)
- N-acyl-sphinganines (dihydro-céramides)
- N-acyl-4-hydroxysphinganines (phyto-céramides)

La première classification des céramides naturels du *stratum corneum* fut réalisée par Wertz *et al.* en 1985. Dans cette classification les céramides sont classés dans un ordre de polarité croissante. En 1994, Robson *et al.* découvrent un nouveau céramide, ils proposent alors de nommer et classer les céramides selon une nomenclature introduite par Motta *et al.* qui prend en compte cette fois-ci, leurs structures moléculaires (figure 3) (Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994).

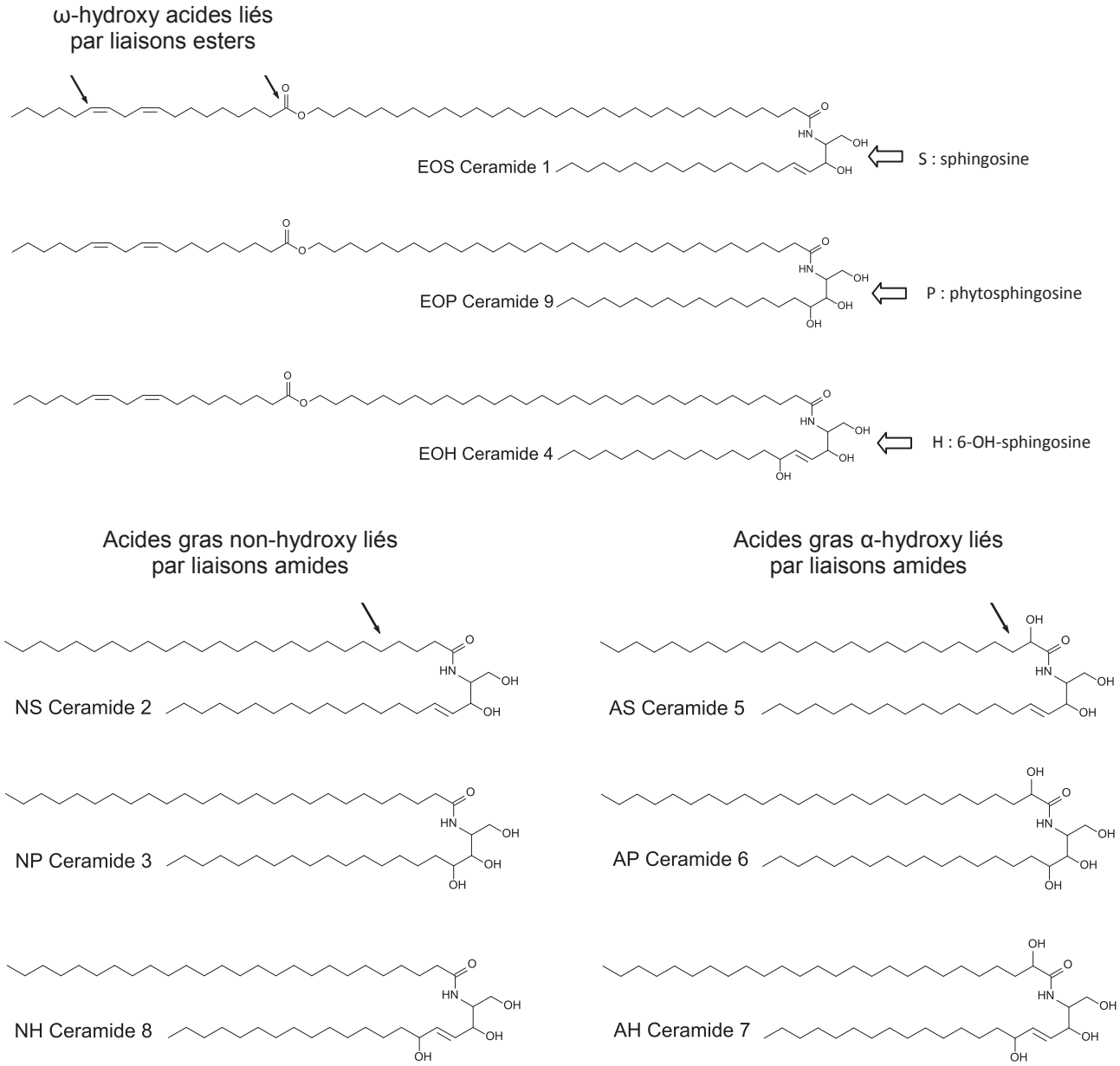


Figure 3 : *Structure chimique de céramides naturels provenant de l'épiderme humain (Bijani, 2010).*

Les céramides naturels servent de précurseurs pour la synthèse de sphingolipides plus complexes, résultant de l'addition de groupements hydrophiles en position hydroxyle-1. Ainsi, l'attachement de phosphocholine, de glucose, de galactose ou de phosphate sur le

céramide permet la formation respective de sphingomyéline, de glucosylcéramide, de galactosylcéramide et de céramide-1-phosphate (figure 4), ces dérivés de céramides possèdent des propriétés et des fonctions biologiques différentes des céramides de départ (Brodesser *et al.,* 2003 ; Kolter *et al.,* 2011).

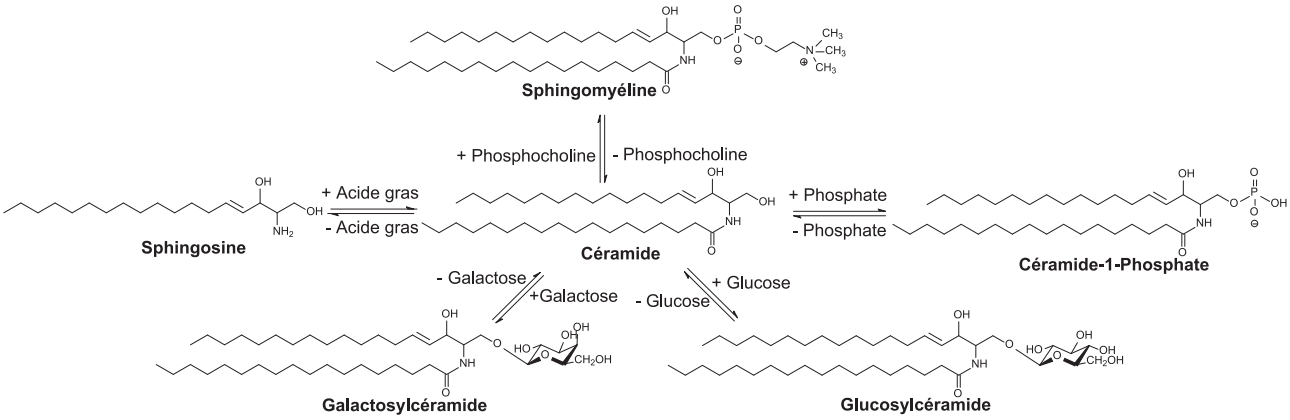


Figure 4 : *Les voies synthétiques majeures des céramides et de leurs dérivés.*

I.4. Applications des céramides et pseudo-céramides

L'intérêt croissant porté aux céramides dans différents domaines de la recherche scientifique est lié à leur structure moléculaire particulière qui leur attribue des propriétés uniques exploitables pour des applications industrielles. Les céramides présentent un intérêt certain dans le domaine de la cosmétologie. Par exemples :

- ils permettent de compenser l'élimination et la dégradation des céramides naturellement présents dans le *stratum corneum* de la peau et empêche déshydratation de la peau (Hong *et al.*, 2000 ; Vávrová *et al.,* 2004 ; Dayan, 2005).

- ils sont incorporés dans des compositions cosmétiques destinées aux soins capillaires à cause de leurs effets protecteurs et réparateurs des fibres capillaires contre les agressions provoquées par les traitements mécaniques et chimiques (Bergmann *et al.*, 2000 ; Cauwet-Martin et Dubief, 2000).

- ils sont utilisés pour le traitement des ongles afin d'améliorer la surface des ongles leurs offrant un aspect uniforme, plus lisse et brillant, en pénétrant et diffusant dans les espaces intercellulaires (Ramin, 2000).

- ils permettent la stabilisation des Omega 6 et des Omega 3, qui sont les ingrédients de base des programmes de beauté cutanée et de la nutri-cosmétique,

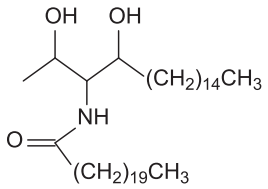
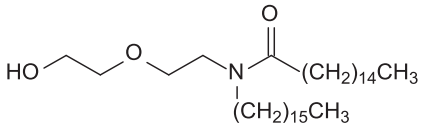
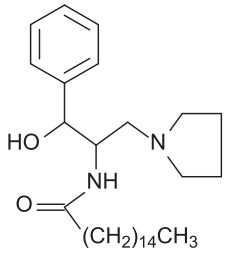
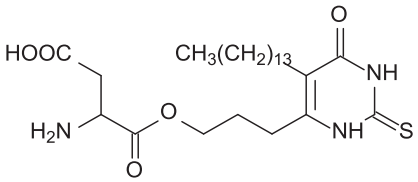
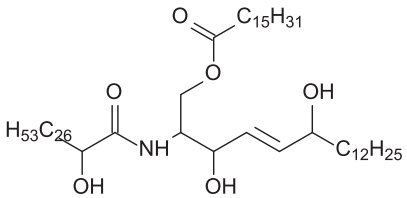
par la formation d'Omega-céramides. Ils offrent ainsi une alternative à l'ajout d'antioxydant qui reste une solution à court terme (Molina, 2008).

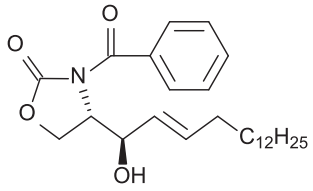
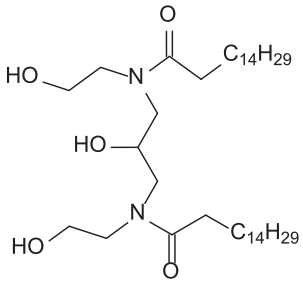
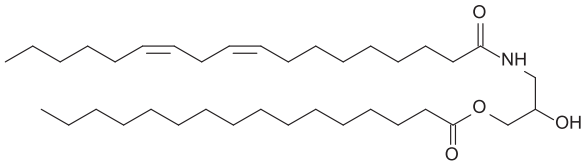
Les céramides et leurs analogues présentent également un intérêt certain dans le domaine de la pharmacologie. Par exemples :

- leur administration par voie topique, permet de traiter la dermatite atopique, causée par une plus faible teneur en céramides dans le *stratum corneum* qui entraîne une plus grande perméabilité de la peau pour les allergènes, les substances toxiques et irritantes ou les microbes (Imokawa *et al.,* 1991; Yoshinori *et al.,* 1999 ; Elias et Wakefield, 2011).
- les céramides à chaines carbonées courtes peuvent être utilisés sous forme de liposome afin d'inhiber l'inflammation de la cornée. En effet, ils inhibent les signaux intracellulaires pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, et inhibent également la production de cytokines par les cellules, empêchant ainsi l'attaque des cellules par le système immunitaire (Sun *et al.,* 2008).
- leur association avec des agents chimio-thérapeutiques permet d'augmenter la mort (apoptose) des cellules tumorales avec une meilleure efficacité que l'utilisation d'un traitement chimio-thérapeutique seul. En effet, il a été observé que les céramides naturels sont impliqués dans les voies d'actions de plusieurs agents chimio-thérapeutiques. Ces agents requièrent l'expression de la sphingomyélinase acide et la production de céramide par celle-ci. Cette production de céramide induit une cascade de réactions intramoléculaires pro-apoptotiques favorisant la mort des cellules tumorales (Morita *et al.,* 2000; Lacour *et al.,* 2004 ; Reynolds *et al.,* 2004 ; Wanebo *et al.*, 2006 ; Barth *et al.,* 2011 ; Dimanche-Boitrel *et al.,* 2011).

Le tableau 1 présente plusieurs exemples de pseudo-céramides et d'analogues de céramides, synthétisés par voie chimique ou enzymatique, ainsi que leurs applications cosmétiques et/ou pharmaceutiques.

Tableau 1 : *Exemples d'applications de différents pseudo-céramides et analogues de céramides.*

Structure	Nom	Applications	Références
	N-[2-hydroxy-1-hydroxyethyl) heptadecyl] henicosanamide	Applications cosmétiques : empêche déshydratation de la peau	Davey *et al.,* 1996
	N-hexadecyl-N-[2-(2-hydroxyethoxy) ethyl] hexadecanamide	Applications cosmétiques : empêche déshydratation de la peau	Hong *et al.,* 2000
	1-phényl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol	Applications pharmaceutiques : inhibiteur potentiel de Glucosyl Céramide Synthase, ce type d'inhibiteur est utilisé dans le traitement de maladies associées à un désordre du niveau de glyco-sphingolipides.	Shayman *et al.,* 2000
	3-amino-4-oxo-4-[3-(3-oxo-2-tetradecyl-5-thioxo-cyclohexen-1-yl)propoxy]butanoic acid	Applications pharmaceutiques : activité potentielle anti-tumorale et pro-apoptotique	Macchia *et al.*, 2005
	[(E)-3,6-dihydroxy-2-(2-hydroxyoctacosanoylamino) octadec-4-enyl] hexadecanoate	Applications cosmétiques et pharmaceutiques : renforce l'épiderme et améliore protection contre les microbes et les virus	Gaetani *et al.,* 2005

	3-benzoyl-4-(1-hydroxyhexadec-2-enyl)-oxazolidin-2-ones	Applications pharmaceutiques : activité potentielle anti-leucémique	Ha *et al.,* 2006
	(1,3-bis-(*N*-(2-hydroxyethyl)-palmitoylamino)-2-hydroxypropane	Applications cosmétiques et pharmaceutiques : fabrication de membrane liposomale	Kim *et al.,* 2009
	Ω6Céramide	Applications cosmétiques : activité restructurante et anti-inflammatoire, permettant de préserver l'intégrité cutanée	Couturier *et al.,* 2009

I.5. Synthèse de céramides et pseudo-céramides

Constituants naturels de presque tous les êtres vivants, les céramides peuvent être obtenus par extraction à partir d'animaux (Smeets et Weber, 1997; Smeets *et al.*, 1997; Semeria *et al.*, 1997a ; Semeria *et al.*, 1997b ; Hara *et al.*, 1999), de plantes (Sperling et Heinz, 2003 ; Tasaka *et al.*, 2006) ou de levures (Kwun *et al.*, 2007). Ces procédés d'extraction sont souvent longs et limités par la disponibilité des sources naturelles. Une extraction au CO_2 supercritique de céramides à partir de fibres de laine donne des rendements de 0,25% (Ramirez *et al.*, 2008). Ces rendements ne permettent pas une exploitation industrielle de ces procédés. En outre, l'extraction à partir d'animaux est potentiellement risquée en raison de la possibilité de contamination par l'agent responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (Smeets *et al.,* 1997;. Semeria *et al.,* 1997b ; Lupi, 2003).

I.5.1. Synthèse par voie chimique

Afin de surmonter les problèmes des méthodes d'extractions, plusieurs méthodes chimiques pour la synthèse de céramides et pseudo-céramides ont été proposées (Cho *et al.*,

1995; Smeets et Weber, 1997; Semeria *et al.*, 1997a ; Semeria *et al.*, 1997b ; Rochlin, 2002 ; Ha, *et al.,* 2006). Ces céramides synthétiques sont normalement obtenus par des réactions d'acylation (Cho *et al.*, 1995; Smeets et Weber, 1997; Semeria *et al.*, 1997b). Ce type de synthèse est déjà très utilisé dans les industries et met en jeu des mécanismes qui sont connus depuis de nombreuses années et nécessitent des étapes de N-acylation (amidification) et/ou de O-acylation (estérification). Une réaction d'acylation correspond à l'établissement d'une liaison covalente entre un groupement acyle et une fonction de type nucléophile comme une fonction amine $-NH_2$ (N-acylation), une fonction thiol -SH (S-acylation) ou une fonction alcool –OH (O-acylation).

Les amides N-substitués peuvent être synthétisés par voie chimique, selon la réaction de Schotten-Baumann entre une amine ou son sel et un chlorure d'acide, en utilisant un catalyseur basique (Zappia et Derosa, 1988) :

$$RCOCl + R'NH_2 + NaOH \longrightarrow RCO\text{-}NHR' + NaCl + H_2O$$

Les dérivés esters peuvent être synthétisés par voie chimique, selon la réaction de Fischer entre un alcool et un acide carboxylique, en utilisant comme catalyseur un acide de Lewis (Fischer et Speier, 1895 ; Naik *et al.*, 2006):

$$RCOOH + R'OH + H^+ \longrightarrow RCOOR' + H^+ + H_2O$$

La synthèse chimique a ses limites et ses inconvénients. En effet, ce mode de production fait intervenir des dérivés chlorés dont l'élimination est soumise à une règlementation sévère du fait de leur caractère polluant. De plus, la co-production de sels augmente le coût de la purification. Dans certains cas, l'utilisation de catalyseur chimique toxique est indispensable, citons en exemple la benzotriazole, ou le cyanure de sodium. De plus, les synthèses nécessitent généralement plusieurs étapes d'activation, de protection et de déprotection. Les réactions sont peu spécifiques, elles réclament des températures élevées ne permettant pas l'utilisation de molécules fragiles, et elles sont le plus souvent réalisées dans des solvants toxiques difficilement éliminables en totalité, comme la pyridine, le DMSO (Diméthylsulfoxyde) ou le DMF (Diméthylformamide).

Une alternative intéressante aux méthodes chimiques est l'emploi de biocatalyseurs. En effet, la combinaison de la chimie et de la biocatalyse constitue une approche ouvrant de nouvelles perspectives pour la synthèse dans des milieux dits « non conventionnels » de

céramides et pseudo-céramides « propres », répondant aux futures exigences de l'environnement (Anastas *et al.*, 2001).

I.5.2. Synthèse par voie biotechnologique

L'utilisation de biocatalyseurs (enzymes, levures, etc…) pour catalyser des réactions de synthèse organique suscite aujourd'hui un intérêt grandissant pour les industriels. Ces biocatalyseurs sont utilisés comme alternative aux catalyseurs chimiques généralement toxiques et polluants. La sélectivité des biocatalyseurs, envers les substrats mais aussi envers les produits est également une propriété très avantageuse pour l'obtention de produit pur.

Pour améliorer la sélectivité des procédés chimiques précédemment décrits tout en limitant le nombre d'étapes de synthèse, certains auteurs ont opté pour une stratégie combinant des protocoles de la chimie classique et l'emploie de biocatalyseurs. Ainsi, des céramides contenant des phytosphingosines ont été produits par la combinaison d'une méthode microbienne de fermentation et de méthodes chimiques (Casey *et al.*, 1998). Cette synthèse se compose de trois étapes :

1. Un tétra-acetylphytosphingosine (TAPS) est produit par fermentation grâce à une souche de type F-60-10 de la levure *Hansenula ciferrii*.

2. Une phytosphingosine est obtenue par la désacétylation chimique des TAPS.

3. Le céramide contenant la phytosphingosine est formé par l'acylation chimique du groupement amine de la phytosphingosine par un acide gras.

Les phytosphingosines peuvent être produites en grandes quantités en utilisant cette méthode. Toutefois, dans un milieu de fermentation, les micro-organismes sont souvent inactivés par le produit lorsque celui-ci atteint une certaine concentration critique. Le produit est alors obtenu sous une forme diluée et il est nécessaire de prévoir des mesures supplémentaires pour la concentration et la purification du produit. Ces mesures sont souvent difficiles et coûteuses.

La production par voie enzymatique de céramides et pseudo-céramides a également été rapportée plusieurs fois dans la littérature. Les enzymes les plus utilisées pour ce type de synthèse sont les acylases et les lipases. Ces enzymes appartenant à la famille des hydrolases (EC 3), sont capables par réaction d'hydrolyse inverse et de transacylation de réaliser des synthèses de molécules type céramide.

Ainsi, Mitsutake *et al.* (1997) ont étudié la synthèse de céramides semblables aux céramides naturels à partir de sphingosine et d'acides gras C14 en présence de la sphingolipide céramide N-désacylase ou « céramidase » de *Pseudomonas sp*. TK4. Smeets *et al.* (1997) ont eux aussi travaillé sur la production de céramides à partir de bases sphingoides. Ils ont réalisé la synthèse d'un analogue de céramide (figure 5) par transamidification à partir de phytosphingosine et de stéarate de méthyle en présence de la lipase de *Pseudomonas alcaligenes*.

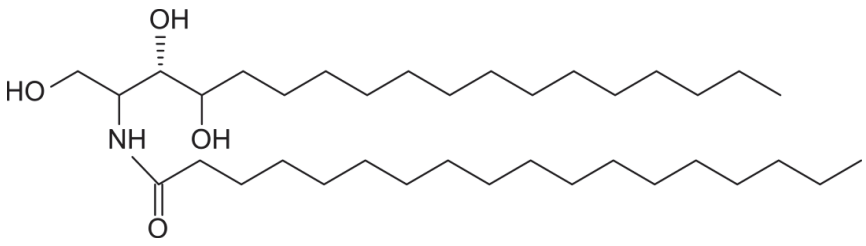


Figure 5 : *Analogue de céramides synthétisé par la lipase de Pseudomonas alcaligenes (Smeets et al., 1997).*

Les produits des réactions enzymatiques ont une stéréochimie correcte et ressemblent plus aux composés naturels par rapport à ceux synthétisés par des méthodes chimiques. Toutefois, les matières premières employées dans ces différentes méthodes sont des bases sphingoides, qui sont difficiles à synthétiser à grande échelle.

L'utilisation de lipases pour l'acylation de substrats possédant plusieurs groupements fonctionnels tels que les amino-alcools précurseurs de la synthèse de pseudo-céramides, a également été rapportée dans la littérature. Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation des produits notamment le type de lipase, le type de substrat mais également le type de solvant utilisé. Montet *et al.,* (1989a) ont été parmi les premiers à décrire ces propriétés des lipases et ont montré que la lipase de *Rhizomucor miehei* est capable de réaliser sélectivement la N-acylation ou la O-acylation de différents amino-alcools dans différents solvants, bien que ces travaux n'aient engendré qu'un intérêt industriel limité. Cela étant du aux faibles rendements de synthèses obtenues : 20 à 30 % de conversion pour la N-acylation sélective. Depuis, plusieurs travaux ont été menés pour explorer le potentiel de différentes lipases au niveau de l'acylation sélective d'amino-alcools dans de nombreux solvants (Ebert *et al.,* 1996 ; Furutani *et al.,* 1996 ; Maugard *et al.,* 1997 ; Furutani *et al.,* 1997 ; Fernández-Pérez et Otero, 2000).

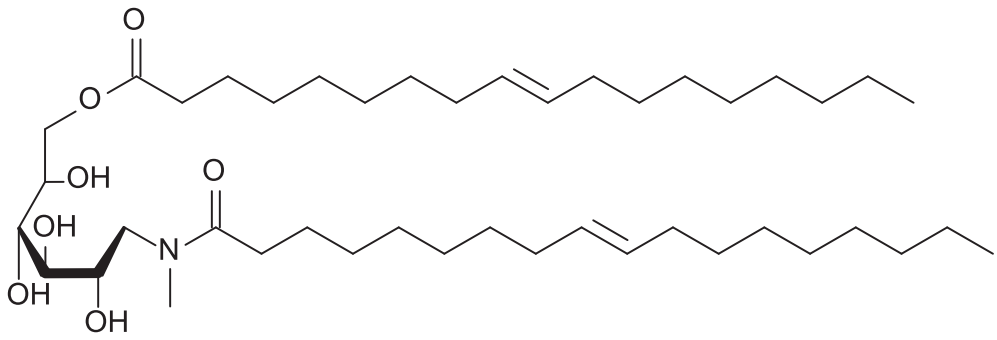


Figure 6 : *Structure du O,N-dioleoyl N-méthyl-glucamide (Maugard et al., 1997a).*

Selon les travaux de Maugard *et al.,* (1997a) la lipase B de *Candida antarctica* semble être adaptée pour la synthèse de composés de type « pseudo-céramide » à partir d'amino-alcools. En effet, grâce à cette lipase, les auteurs ont réalisé la N-acylation et/ou la O-acylation sélective d'un amino-alditol, la N-méthyl-glucamine. Ils ont ainsi démontré que la chimiosélectivité de cette enzyme peut être contrôlée par différents paramètre tel que le type de milieu réactionnel, le rapport molaire des substrats et l'état d'ionisation des substrats. Le O,N-dioleoyl N-méthyl-glucamide synthétisé lors de cette étude est décrit figure 6. Ce composé possède une structure proche de celle des céramides.

II. Les lipases utilisées comme catalyseurs des réactions d'acylation

Les procédés d'acylation impliquant des enzymes ont largement fait leurs preuves en termes d'efficacité et de sélectivité. Ces procédés permettent de produire des dérivés acylés de manière spécifique en fonction de l'enzyme employée tout en allégeant les étapes de purification. Par ailleurs, ils sont généralement plus respectueux de l'environnement que les procédés chimiques traditionnels, en raison de l'innocuité des catalyseurs employés et de la nature des solvants utilisés. Ceci explique le nombre croissant de travaux publiés décrivant des réactions d'acylation enzymatiques (Danieli et Riva, 1994 ; Hari Krishna et Karanth, 2002 ; Liljeblad et Kanerva, 2006 ; Sharma *et al.*, 2011).

Plusieurs types d'enzymes peuvent être utilisés pour catalyser les réactions d'acylation, se sont généralement des hydrolases bien connues pour leurs propriétés d'énantiosélectivités, de régiosélectivités et de chimiosélectivités particulièrement intéressantes dans le cadre de l'acylation de composés multifonctionnels. Klibanov *et al.,* (1990) ont été parmi les premiers à exploiter ces propriétés des hydrolases et ont montré que certaines lipases et protéases constituent d'excellents catalyseurs pour l'acylation et la transacylation en milieux dits « non conventionnels » ou la disponibilité en eau est faible. Dans le cas d'un nucléophile de type

hydroxyle ou amine, la réaction sera respectivement considérée comme une O-acylation ou une N-acylation si le donneur de groupement acyle est un acide gras libre (hydrolyse inverse) et comme une transestérification ou transamidification si c'est un ester d'acide gras (Furutani *et al.*, 1995).

Les enzymes de la classe des hydrolases, sont des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'ester, de liaison peptidique, de liaison phosphodiester et de liaison osidique. Elles sont classées EC 3 dans la nomenclature EC. Les protéases, les nucléases, les glycosidases, les estérases, les acylases et les lipases sont des hydrolases. Parmi ces enzymes, les lipases, qui naturellement hydrolysent les triglycérides en acides gras et glycérol, sont les hydrolases les plus utilisées pour l'acylation d'alcools, d'amines, d'acides aminés, de polyols, d'amino-alcools… Nous leur avons dédié ce chapitre.

II.1. Généralités sur les lipases

Les lipases sont des α/β-hydrolases d'esters du glycérol (EC 3.1.1.3). De même que les estérases, elles appartiennent à la famille des hydrolases agissant sur les liaisons esters carboxyliques (Jaeger *et al.*, 1994).

Les lipases se distinguent des estérases par leur action sur les substrats insolubles dans l'eau, les estérases agissant uniquement sur les substrats solubles. Sarda et desnuelle (1958) ont démontré que la différence entre les estérases et les lipases est due à la capacité de ces dernières à être activées par une interface eau / lipides. La formation de cette interface a pour conséquence une augmentation brutale de la vitesse de lipolyse (Verger *et al.*, 1973). De ces observations a émergé la notion de phénomène d' « activation interfaciale ». Ce phénomène a longtemps servi de critère de discrimination entre les lipases et les estérases. Malheureusement, il s'est montré par la suite insuffisant pour bon nombre d'enzymes lipolytiques en raison des profils de vitesses initiales très variables et difficiles à interpréter (Egloff *et al.*, 1995b). Dès lors, les lipases ont été redéfinies comme étant des carboxylestérases catalysant l'hydrolyse d'acylglycérides à longues chaînes d'acides gras. Le fait que les lipases montrent une activité particulièrement élevée sur des lipides riches en triglycérides (huile d'olive, beurre, graisses animales et végétales, etc…) a conduit au choix du terme triacylglycérol acyl-hydrolase comme dénomination officielle.

Les lipases font partie des catalyseurs enzymatiques les plus utilisés dans l'industrie (Yamane, 1987 ; Björkling *et al.*, 1991 ; Nestl *et al.,* 2011). La lipase B de *Candida antarctica* en particulier est très utilisée pour la synthèse ou la résolution de composés multifonctionnels. Cette lipase hydrolyse spécifiquement les positions 1 et 3 des triglycérides d'acides gras, mais

elle possède également, contrairement aux autres lipases, une faible activité vis-à-vis des grands triglycérides. Elle est également capable d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et synthétiques. Lorsque la lipase B de *Candida antarctica* est en présence des substrats appropriés dans des conditions adaptées, elle est capable de catalyser une grande variété de réactions de synthèse : la O-acylation (estérification), la transestérification, la S-acylation (thioestérification), la N-acylation (amidification), etc…. Lors de ces réactions, elle présente souvent une très grande chimio-, régio- et énantiosélectivité. Grâce à cette grande spécificité et au fait qu'elle peut supporter de très grandes variations de conditions expérimentales sous une forme immobilisée, elle est l'une des lipases les plus utilisée au niveau industriel (Anderson *et al.*, 1998; Gotor-Fernández *et al.*, 2006).

La lipase B de *Candida antarctica* permet par exemple de synthétiser : des dérivés de vitamines, de sucres, d'acides aminés ou de polyphénols (figure 7).

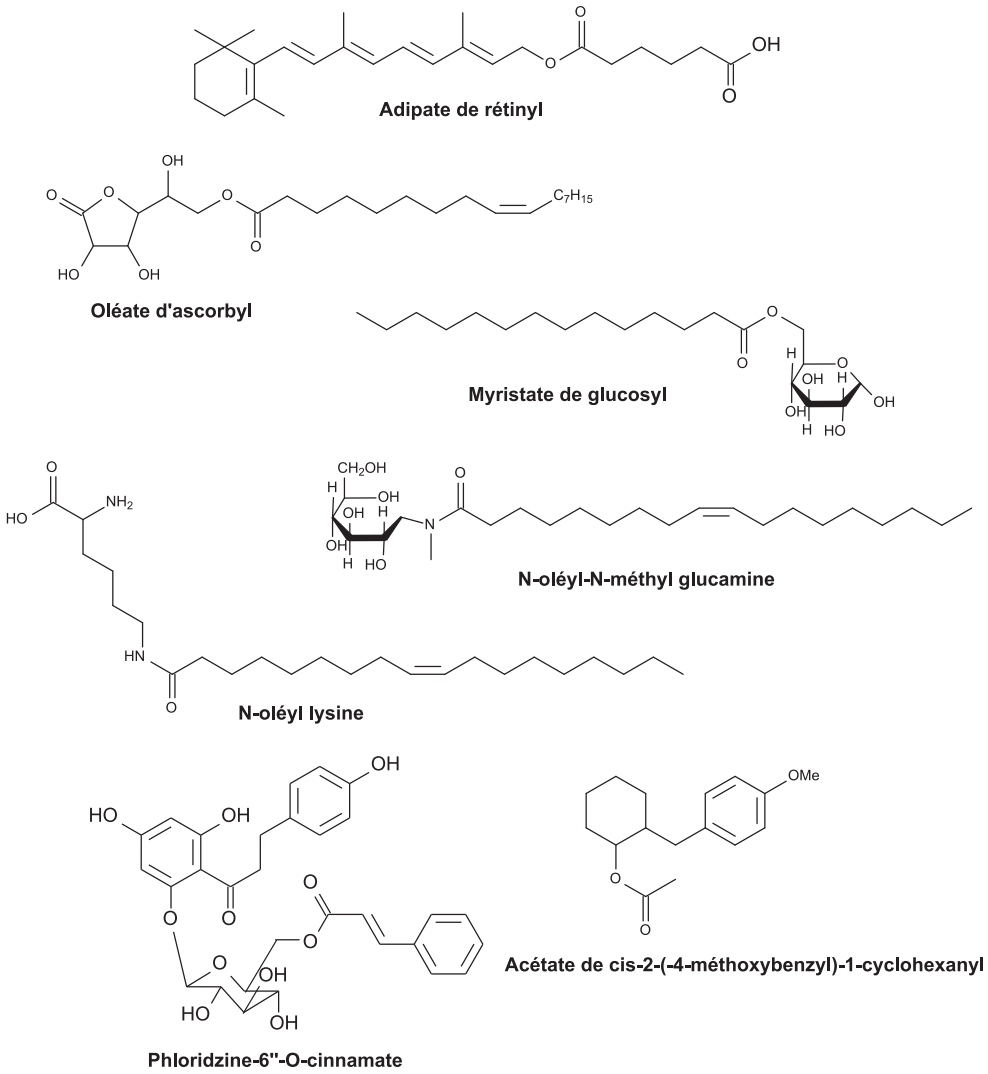


Figure 7 : *Exemples de produits pouvant être synthétisés par la lipase B de Candida antarctica (Maugard et al., 1998b; Brunet et al., 2002; Lin Soo et al., 2003 ; Rejasse et al., 2003; Enaud et al., 2004; Adamczak et al., 2005; Ganske et Bornscheuer, 2005).*

II.2. La synthèse de liaison ester

Dans des milieux dits « non conventionnels » présentant une faible disponibilité en eau les lipases sont capables de catalyser une grande variété de réaction de synthèse. La synthèse d'une liaison ester par la lipase se fait selon trois schémas réactionnels :

- *La réaction de O-acylation (estérification par hydrolyse inverse)*

$$RCOOH + R'OH \rightleftharpoons RCOOR' + H_2O$$

Dans les réactions de O-acylation, l'eau est un produit de la réaction. À partir d'une certaine teneur, elle affecte l'équilibre de la réaction entraînant la réaction d'hydrolyse. Par conséquent, l'eau générée au cours de la O-acylation enzymatique doit parfois être éliminée afin de poursuivre la réaction (Chamouleau *et al.*, 2001).

- *La réaction de transestérification*

La transestérification regroupe la réaction d'alcoolyse et d'acidolyse:

Alcoolyse : $R_1COOR'_1 + R_2OH \rightleftharpoons R_1COOR_2 + R'_1OH$

Acidolyse : $R_1COOR'_1 + R_2COOH \rightleftharpoons R_2COOR'_1 + R_1COOH$

- *L'interestérification*

Lors de la réaction d'interestérification, un groupement acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras.

$$R_1COOR'_1 + R_2COOR'_2 \rightleftharpoons R_1COOR'_2 + R_2COOR'_1$$

Les produits issus de la synthèse d'ester par les lipases incluent : des lipides structurés, des arômes, des parfums, des substituants de beurre, des additifs pour les cosmétiques, du biodiésel, des médicaments, des polymères optiquement actifs, des monomères pour hydrogels, des émulsifiants, des surfactants, etc… (Linko *et al.*, 1995 ; Lortie *et al.*, 1998 ; Yahya *et al.*, 1998 ; Maugard *et al.,* 2000 ; Bradić *et al.,* 2010).

II.3. La synthèse de liaison amide

Comme précédemment pour la synthèse de liaison ester, la synthèse d'une liaison amide par la lipase se fait selon différents schémas réactionnels :

- *La réaction de N-acylation (amidification par hydrolyse inverse)*

$$RCOOH + R'NH_2 \rightleftharpoons RCONHR' + H_2O$$

- *La réaction de transamidification*

La transamidification est aussi appelée aminolyse:

$$R_1COOR'_1 + R_2NH_2 \rightleftharpoons R_1CONHR_2 + R'_1OH$$

La synthèse enzymatique de liaisons amides par les lipases a été, jusqu'à présent, nettement moins étudiée que la synthèse enzymatique de liaisons esters, à cause probablement de la faible proportion d'enzyme capable de catalyser spécifiquement la synthèse de liaisons amides.

A partir de 1984, deux équipes de recherche, l'une japonaise, l'autre américaine, ont émise l'hypothèse que les lipases étaient capables de réaliser des réactions de synthèse dans des solvants organiques présentant une faible teneur en eau (milieux dits « non conventionnels ») et qu'elles pouvaient catalyser par réversion d'hydrolyse ou par transamidification, des synthèses d'amides.

L'équipe japonaise a utilisé la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (solubilisée en solvant organique par modification au 2,4-bis (O-méthoxy-polyéthyléne glycol)-6-chloro-S-triazine (PEG_2)). Cette lipase avait une faible activité aminolyse. En effet, dans du benzène, elle était capable de condenser la laurylamine sur le lauryl stéarate, afin de produire l'alcool laurique et la N-lauryl-stéaramides. La condensation de l'aniline sur le stéarate de méthyle a également été réalisée et produit la stéaranilides (Inada *et al.*, 1984 ; Yoshimoto *et al.*, 1984 ; Takahashi *et al.*, 1985).

L'équipe américaine a utilisé les lipases de *Candida cylindracea, Rhizomucor miehei* et pancréatique de porc. Ces lipases pouvaient catalyser dans divers solvants organiques comme le *n*-hexane, l'acétone ou le tétrahydrofurane, la condensation d'une amine aliphatique (la butylamine) sur un ester d'acide carboxylique (le butyrate de méthyle) produisant le N-butyl butyramide (Zaks et Klibanov, 1985).

Depuis ces premiers travaux, plusieurs équipes se sont intéressées à l'utilisation de lipases en solvant organique, Matos *et al.* (1987) ont utilisé la lipase de *Candida cylindracea* pour catalyser la synthèse de peptides pharmaceutiques en solvants organiques. Grâce à cette lipase, les synthèses sont énantiosélectives, les peptides synthétisés sont chiraux et les rendements peuvent atteindre jusqu' à 60% dans la pyridine.

Godtfredsen et Bjorkling (1990) ont utilisé la lipase B de *Candida antarctica* pour produire des N-acyl-aminoacides et des N-acyl-aminoamides dans de l'éthylméthyl-cétone (Figure 8). Les rendements de N-acylation obtenus varient entre 25 et 50% en fonction des substrats initiaux et des conditions opératoires.

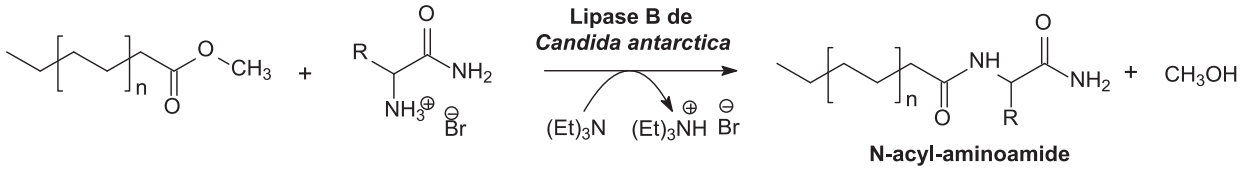


Figure 8 : *Synthèse enzymatique de N-acyl-aminoamide (Godtfredsen et Bjorkling, 1990).*

Maugard *et al.* (1997a) ont également utilisé la lipase B de *Candida antarctica.* Cette lipase a permis de réaliser avec succès la liaison amide entre une amine secondaire hydroxylée (N-méthyl-glucamine) et un acide gras ou un ester d'acide gras. Les rendements de synthèse de l'amide peuvent atteindre jusqu'à 97%.

Le tableau 2 illustre d'autres exemples issus de la littérature pour des réactions de N-acylation catalysées par cette lipase.

Tableau 2 : *Exemples de N-acylation réalisées par la lipase B de Candida antarctica avec différents substrats.*

Substrat A	Substrat B	Solvant	Conversion	Références
Succinate de diméthyle	Butylamine	Dioxane	96%	Puertas *et al.,* 1995
Acide oléique	Ammoniac	Méthyl isobutyl ketone	94%	Litjens *et al.,* 1999
Phenylacétate d'éthyle	2-amino-2-phenylacetonitrile	I-propyl ether	47%	Lopez-Serrano *et al.,* 2001
Acide oléique	Vanillylamine	2-méthylbutan-2-ol	65%	Reyes-Duarte *et al.*, 2002
Acide érucique	Urée	*Tert*-butanol	89%	Awasthi et Singh 2007
Acétate de benzyle Acétate de butyle Acétate de vinyle	Benzyl amine Phenyl méthanamine Dodecane-1-amine	[Bmim] [PF_6]	95% 97% 95%	Dhake *et al.*, 2009
Méthoxyacetate d'isopropyle	1-méthylbenzylamine	Toluène	98%	Kim *et al.,* 2010

II.4. Mécanisme d'action et aspect cinétique des lipases

Les premières structures des lipases décrites en 1990 ont été celles de la lipase du champignon *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) et de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990). Dans les deux cas, la structure révèle l'existence d'une hélice-α amphiphile située à la surface de la protéine et recouvrant la cavité du site actif. En présence

d'une interface, l'hélice est déstabilisée par des interactions hydrophobes et se déplace en pivotant autour d'une région « charnière », exposant ainsi le site catalytique, initialement masqué, aux lipides de l'interface. Ceci explique le phénomène dit « d'activation interfaciale ». Le site catalytique des lipases est caractérisé par la présence d'une triade catalytique Ser-His-Asp/Glu dans la région du repliement α/β, et de différents résidus amino-acides formant un trou oxyanionique (Ema *et al.*, 1998). La lipase B de *Candida antarctica* possède une triade catalytique Ser(105), His(224) et Asp(187) et n'est pas soumise au phénomène d'activation interfaciale. Elle peut donc être considérée comme une enzyme intermédiaire entre une lipase et une estérase (Uppenberg *et al.*, 1994).

Le mécanisme catalytique des lipases est semblable à celui observé chez les protéases à sérine. Ce mécanisme est basé sur un réseau de relais de charges au niveau de la triade catalytique Ser-His-Asp/Glu (Norin *et al.*, 1993; Egloff *et al.*, 1995a; Yagnik *et al.*, 1997).

Les réactions enzymatiques d'acylation sont toujours des réactions à deux substrats comme décrites figure 9. A et B correspondent respectivement au donneur et à l'accepteur de groupement acyle. P correspond à une molécule d'eau si le donneur d'acyle est un acide gras libre ou un alcool dans le cas d'un ester et Q correspond au dérivé acylé synthétisé.

$$A + B \rightleftharpoons P + Q$$

Figure 9 : *Représentation simplifiée d'une réaction à deux substrats.*

Typiquement, les lipases sont considérées comme fonctionnant selon un mécanisme ping pong bi-bi avec parfois une inhibition par excès du substrat B (Chulalaksananukul *et al.*, 1990 ; PIlarek *et al.*, 2007) ou une double inhibition par les deux substrats (Yadav et Devi, 2004). Dans ce mécanisme, le premier substrat A se fixe sur l'enzyme et entraîne la libération du premier produit P en formant un intermédiaire acyl-enzyme caractérisé par la formation d'une liaison covalente entre le donneur d'acyle et la sérine de la triade catalytique. Le deuxième substrat B se fixe après le départ de P et entraîne la libération du deuxième produit Q.

Dans certains cas, il a également été observé des mécanismes de types ordonnés bi-bi dans des solvants de types organiques liquides (Garcia *et al.,* 1999 ; Maugard *et al.*, 2000). Dans ce mécanisme, les substrats s'associent à l'enzyme selon un ordre défini (A puis B) pour former un complexe ternaire et les produits sont libérés selon un ordre séquentiel (P puis Q).

Dans la littérature nous retrouvons ainsi de nombreux modèles décrivant les mécanismes des lipases, lorsqu'elles catalysent des réactions d'acylation. Dans tous les cas se

sont des modèles séquencés caractérisés par la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme avant l'attaque par le second substrat nucléophile avec parfois des phénomènes d'inhibition par les substrats ou les produits. Le tableau 3 présente une synthèse des résultats de quelques travaux de modélisation de cinétique d'acylation réalisés pour la lipase B de *Candida antarctica*.

Tableau 3 : *Exemples d'études des mécanismes réactionnels enzymatiques d'acylation obtenus pour la lipase B de Candida antarctica.*

Type de réaction	Solvant	Modèles	Références
O-acylation	Sans solvant	Ordonné bi-bi avec inhibition compétitive	Garcia *et al.*, 1999
O-acylation	Sans solvant	Ordonné bi-bi avec inhibition par les deux substrats	Garcia *et al.*, 2000
Transestérification	2-méthylbutan-2-ol	Hybride ping pong ordonné	Maugard *et al.*, 2000
Transestérification	Système solide/gaz	Ping pong bi-bi avec inhibition par l'alcool	Graber *et al.*, 2003
N-acylation	2-méthylbutan-2-ol	Ping pong bi-bi avec inhibition par l'amine	Slotema *et al.*, 2003
Transestérification	Heptane	Ping pong bi-bi avec inhibition par le n-butanol	Yadav et Lathi, 2003
Transestérification	Heptane	Ordonné bi-bi avec inhibition par le n-octanol	Yadav et Trivedi, 2003
Transestérification	Heptane	Ping pong bi-bi avec inhibition par les substrats et les produits	Yadav et Devi, 2004
O-acylation	Milieu Fondu	Ping pong bi-bi	PIlarek *et al.*, 2007
Transestérification	Hexane	Ping pong bi-bi	Romero *et al.*, 2007
O-acylation	Milieu fondu, système hétérogène	Ping pong bi-bi	Foresti *et al.*, 2008
O-acylation	Toluène	Ordonné bi-bi avec inhibition par le donneur d'acyle	Yadav et Dhoot, 2009

II.5. Sélectivité des lipases lors de réaction d'acylation

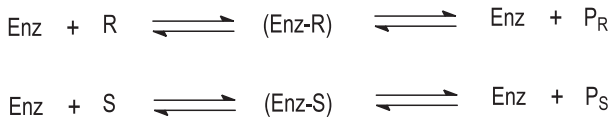
II.5.1. Effet de la nature du substrat donneur de groupement acyle

Les lipases montrent une certaine sélectivité vis-à-vis du substrat, de la nature des acides, alcools, esters et lipides (Miller *et al.,* 1988). La sélectivité des lipases pour les acides gras est dépendante principalement de la gêne stérique. Cette gêne, qui est caractérisée par la longueur de la chaine, l'existence d'instaurations et la présence de substituants sur la chaine de l'acide, influe sur la vitesse de la réaction catalysée par les lipases. Par exemple Hadj Salem *et al*., (2010) qui ont étudié l'acylation de l'isoquercitine par la lipase B de *Candida antarctica* en utilisant des esters d'éthyle d'acides gras dont la longueur de la chaine carbonée varie entre 4 et 18, ont trouvé que pour les esters d'acides gras dont la longueur de la chaine carbonée

varie entre 4 et 12, la vitesse de réaction est stable, par contre pour des chaines supérieures à 12 carbones la vitesse de la réaction diminue.

II.5.2. Enantiosélectivité

Lors d'une réaction catalysée par une enzyme, l'énantiosélectivité est décrite comme la transformation préférentielle d'un énantiomère par rapport à l'autre. En chimie, un composé chimique est chiral s'il n'est pas superposable à son image dans un miroir. Les deux formes, la molécule et son image, sont dites énantiomères et sont nommées R et S. L'énantiosélectivité peut être caractérisée par la détermination des excès énantiomériques du substrat (ee_s) ou du produit (ee_p) définis dans la figure 10. La variation des paramètres (ee_s) et (ee_p) est fonction du taux de conversion (figure 11). Á de faibles taux de conversion, seul l'énantiomère le mieux reconnu est transformé conduisant ainsi à un ee_p très élevé. Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, la quantité de l'énantiomère le mieux reconnu diminue dans le mélange racémique, au profit de l'autre énantiomère. Ce dernier sera alors à son tour transformé par l'enzyme, entraînant une diminution de ee_p et une augmentation de ee_s (Chen *et al.*, 1982 ; Chen *et al.*, 1987).



$$\%\, ee_s = \frac{R - S}{R + S} X\, 100 \qquad \%\, ee_p = \frac{P_R - P_S}{P_R + P_S} X\, 100 \qquad \%\, c = 1 - \frac{R + S}{R_0 + S_0}$$

Figure 10 : *Dédoublement enzymatique. R et S représentent les concentrations des énantiomères substrats, P_R et P_S les concentrations des énantiomères produits de la réaction. Enz= enzyme. (ee_s) excès énantiomérique du substrat, (ee_p) excès énantiomérique du produit,(c) taux de conversion.*

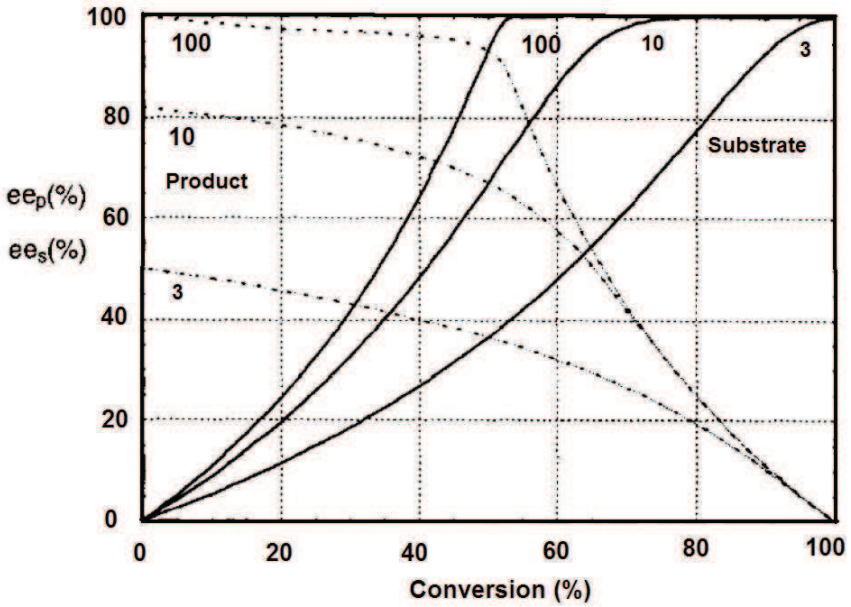


Figure 11 : *Variation des excès énantiomériques en fonction du taux de conversion de la réaction dans le cas d'une réaction irréversible. Les chiffres 3, 10 et 100 représentent l'énantiosélectivité E de la réaction enzymatique (Anthonsen et Jongejan, 1997).*

Afin de disposer d'un paramètre permettant de décrire le degré d'énantiosélectivité d'une enzyme, Chen *et al.,* (1982) ont introduit la notion de rapport énantiomérique (*E*) : définit comme étant le rapport des efficacités catalytiques, V_{max}^{app} / K_m^{app} (V_{max}^{app} : vitesse maximale apparente et K_m^{app} : constante de Michaelis apparente), mesurées pour chaque énantiomère (Chen *et al.*, 1982 ; Chen *et al.*, 1987 ; Straathof et Jongejan, 1997).

$$E = \frac{Vmax_R^{app}/Km_R^{app}}{Vmax_S^{app}/Km_S^{app}}$$

Le rapport E peut également être obtenu par rapport aux excès énantiomériques de S et P et au taux de conversion (c):

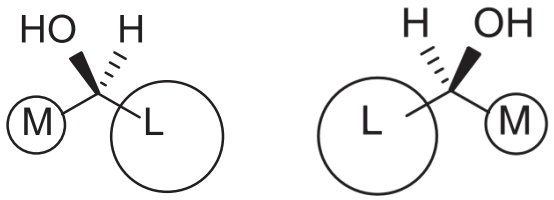
$$E = \frac{[ln((1-c)(1-ee_s))]}{[ln((1-c)(1+ee_s))]} \qquad E = \frac{[ln((1-c)(1+ee_p))]}{[ln((1-c)(1-ee_p))]}$$

Ces équations ont été définies par Chen *et al.* (1982), selon un mécanisme catalytique précis : réaction enzymatique irréversible de type michaelien (pseudo uni-uni). Le système considéré est homogène, le volume est constant et il y a absence d'inhibition ou de racémisation.

L'énantiosélectivité (*E*) définit donc la capacité d'une enzyme à différencier les énantiomères (*R*) et (*S*) dans des conditions de réaction données. C'est une propriété

intrinsèque de l'enzyme qui décrit quantitativement sa sélectivité. Une enzyme non énantiosélective a une valeur de $E = 1$.

Les lipases sont capables de faire la différence entre deux molécules énantiomères comme par exemple des alcools secondaires. Selon le modèle de Kazlauskas *et al.* (1991) (figure 12), dans le cas d'un énantiomère R le substituant L (correspondant au substituant le plus gros) est sur la droite et le substituant M (correspondant au substituant de taille moyenne) est sur la gauche, lorsque l'hydroxyle est orienté vers l'avant du plan.



Enantiomère R **Enantiomère S**

Figure 12*: Représentation schématique des énantiomères R et S des alcools secondaires selon Kazlauskas et al. M pour le substituant de taille moyenne et L pour le substituant le plus gros (Kazlauskas et al., 1991).*

Chez les lipases, la reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et les énantiomères a été dès les années 90 identifiée comme un paramètre clé responsable de l'énantiosélectivité. En effet, il a été suggéré que les variations de E observées avec le substrat étaient liées à l'existence d'une poche stéréosélective, qui correspond à une petite poche délimitée par la chaîne du feuillet β3 et d'un résidu tryptophane dans le cas de la lipase B de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1995 ; Haeffner *et al.*, 1998; Orrenius *et al.*, 1998; Rotticci *et al.,* 1998). En accord avec les travaux d'Orrenius et de ses collaborateurs, deux modes de fixations possibles ont été envisagés pour chaque énantiomère : le mode I (substituant L dirigé vers la surface) et le mode II (substituant L dirigé vers la poche stéréosélective) (Uppenberg *et al.*, 1995 ; Haeffner *et al.*, 1998 ; Orrenius *et al.*, 1998 ; Rotticci *et al.,* 1998). Pour l'énantiomère R, le mode II est considéré comme non productif à cause de l'absence de liaison hydrogène entre l'histidine 224 et l'oxygène de l'alcool (substrat). Cette liaison étant nécessaire à la mise en œuvre de la réaction enzymatique. À l'inverse, pour l'énantiomère S, c'est le mode I qui est considéré comme non productif car la liaison hydrogène catalytique entre l'histidine 224 et l'oxygène de l'alcool est absente. Ainsi, l'énantiomère R se fixe selon le mode I et doit donc positionner son substituant M dans la poche stéréosélective, alors que l'énantiomère S se fixe selon le mode II et doit positionner son substituant L dans la poche stéréosélective, comme décrit figure 13. Par rapport au mode de fixation I et II décrit ci-dessus, l'énantiomère R présente donc une analogie structurale avec l'enzyme et sera transformé rapidement, en

revanche l'énantiomère S aura plus de difficulté pour se lier à l'enzyme et nécessitera un apport d'énergie initial plus important pour pouvoir réagir, par conséquent il sera transformé plus lentement. Ainsi, l'énantiosélectivité peut être reliée à la différence d'énergie libre en états de transition formés avec les deux énantiomères (Faber, 2000).

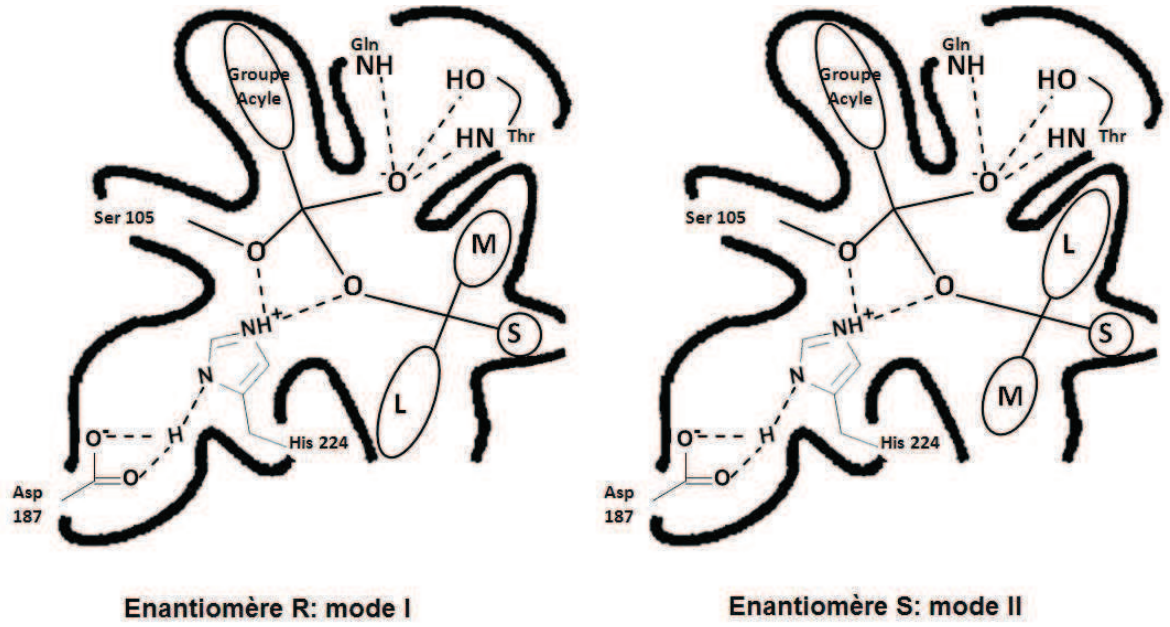


Figure 13 : *Représentation de l'orientation des énantiomères d'un alcool secondaire en mode I et mode II dans le site actif de la lipase B de Candida antarctica (Haeffner et al., 1998).*

Les lipases sont largement employées pour la résolution des mélanges racémiques, d'alcools, d'esters ou d'amines chiraux. Le tableau 4 illustre quelques exemples de catalyses énantiosélectives réalisées par la lipase B de *Candida antarctica*. Nous remarquons clairement que l'enzyme catalyse préférentiellement la conversion des énantiomères R des alcools ou des amines.

Tableau 4 *: Exemples de catalyses enantiosélectivites réalisées par la lipase B de Candida antarctica avec différents substrats.*

Substrats	Produits	Enantiopréférence (Rapport énantiomérique)	Excès enantiomérique (%)	Références
2-Octanol	Octanoyl ester	R	>97	Frykman,*et al.*, 1993
1,3-Butanediol	Acetyl diester	R	98	Eguchi et Mochida, 1993
Carbonate de 2-butylvinyle + benzylamine	2-Butyl N-benzyl carbamate	S	99	Pozo et Gotor, 1993
3-Méthyl-2-cyclohexen-1-ol	Acetyl diester	R	>85	Orrenius *et al.*, 1995

Substrats	Produits	Enantiopréférence (Rapport énantiomérique)	Excès enantiomérique (%)	Références
Octanoate d'éthyle + 1-Phenylethanethiol	Thiooctanoate de 1-phenyl-ethanethiol	R	95	Ohrner *et al.*, 1996
1-Chloropropan-2-ol 1-Bromopropan-2-ol 1-Bromobutan-2-ol	Esters	R, (E=160), R, (E=370), R, (E=81),	97 98 96	Rotticci *et al.*, 1997
β-aminobutyrate d'éthyle + benzylamine	Amidoester	R	95	Sanchez *et al.*, 1997
Hexan-3-ol, Pentan-2-ol, Butan-2-ol, 3-Méthylbutan-2-ol 2,2-Diméthylbutan-3-ol Butène-3-ol	Esters	R, (E=97), R, (E=390), R, (E=9,1), R, (E>100) R, (E>100) R, (E=6,7)	94, 98, 79, >93 98 53	Orrenius *et al.*, 1998
Butanoate de vinyle + 1-Phenoxy-2-butanol, 1-Phenoxy-2-pentanol, 1-Phenoxy-2-hexanol, 3-Bromo-1-phenoxy-2-propanol	Esters de butanoates	R R R R	96 99,3 >99 96	Jacobsen *et al.*, 2005
1-phenyl- et 1-(furan-2-yl)ethanol	1-phényléthyl acétate, 1-(furan-2-yl) éthyl acétate	R R	>97	Mavrynsky *et al.*, 2009
R/SPropanolol	Vinyl acetate	R	73	Barbosa *et al.,* 2010
Propanoate de méthyle + pentan-2-ol	Monoester	R, (E=101)	-	Marton *et al.*, 2010
Ethyl methoxyacetate + 1-Napthalenyl-allylamine	Amide	R	>99,9	Knežević et *al.,* 2011

II.5.3. Régiosélectivité

La sélectivité des enzymes peut également se manifester en terme de régiosélectivité, qui qualifie la préférence d'une enzyme à interagir avec un groupement fonctionnel parmi plusieurs identiques, se trouvant à différentes positions sur une molécule de substrat. Ainsi les lipases sont capables de catalyser sélectivement et avec des rendements élevés la O-acylation de nombreux substrats poly-hydroxylés, tels que du glycérol, des sucres, des polyols ou des flavonoïdes (Chebil *et al.*, 2006 ; Alloue *et al.*, 2008 ; Altenbach *et al.*, 2010 ; Sharma *et al.*, 2011 ; Shi *et al.,* 2011).

En outre, la lipase B de *Candida antarctica* a démontré une plus grande affinité pour les alcools primaires que les alcools secondaires. Ljunger *et al.* (1994) ont étudié la production sélective de sucroester par cette lipase à partir de glucose et d'acide octanoique. Cette enzyme

a catalysé l'acylation régiosélective de la fonction alcool primaire en position 6 sur le glucose, en donnant un rendement de 90% (figure 14).

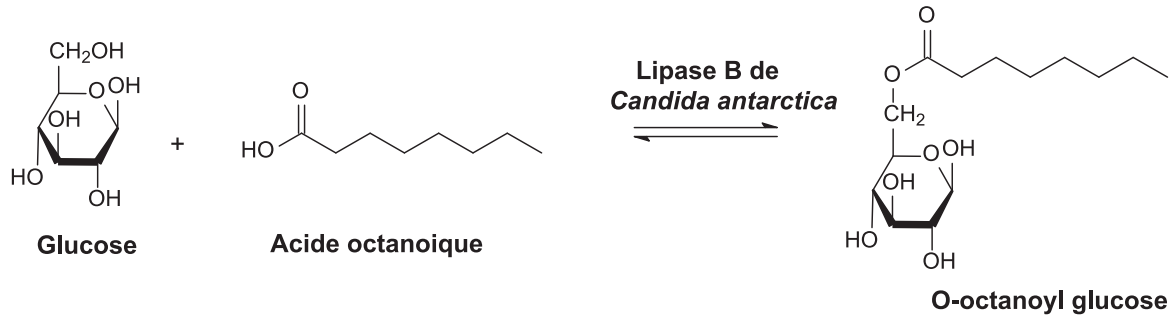


Figure 14 : *Acylation régiosélective du glucose avec l'acide octanoique catalysée par la lipase B de Candida antarctica dans l'acétonitrile (Ljunger et al. 1994).*

Maugard *et al.* (2000) ont démontré que la lipase B de *Candida antarctica* peut également être utilisée pour acyler sélectivement l'acide ascorbique sur une fonction alcool primaire à partir de lactate de méthyle (figure 15).

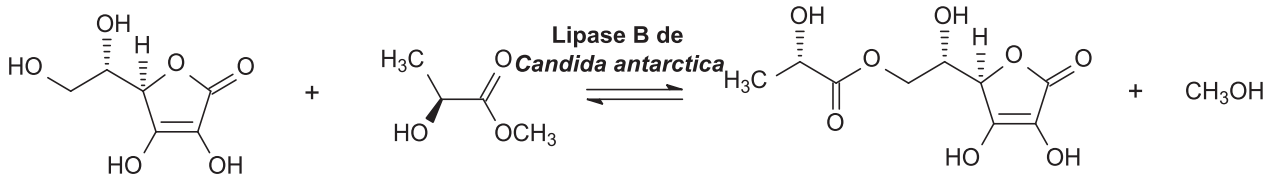


Figure 15 : *Acylation régiosélective de l'acide ascorbique avec le lactate de méthyle catalysée par la lipase B de Candida antarctica (Maugard et al., 2000).*

Par ailleurs, Enaud *et al.* (2004) ont démontré que la lipase B de *Candida antarctica* permet de faire la différence entre plusieurs alcools secondaires. Ainsi, cette lipase catalyse à partir de l'acide cinnamique l'acylation du groupement hydroxyle 6''-OH exclusivement avec un rendement de 100%, lors de l'acylation de la phloridzine (phloretine-2'-O-beta-glucoside phlorizoside), un flavonoïde glycosylé, présentant sept groupements de type alcool secondaire (figure 16).

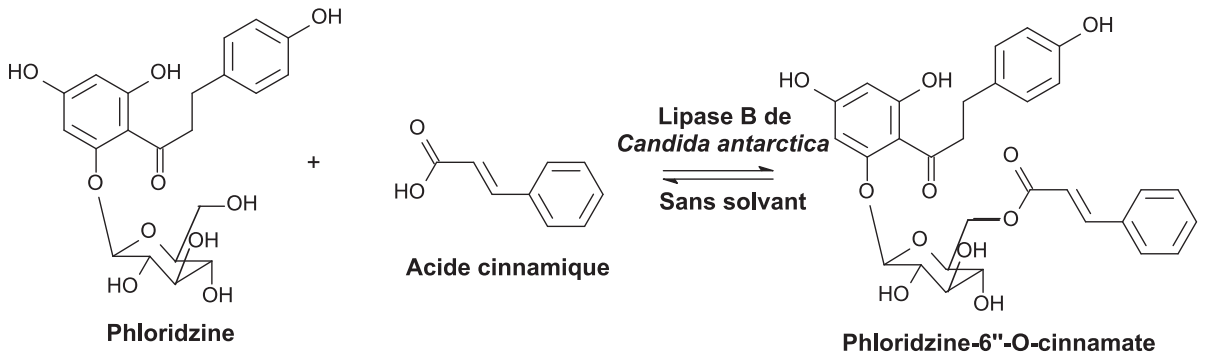


Figure 16 : *Acylation régiosélective de la phloridzine avec l'acide cinnamique catalysée par la lipase B de Candida antarctica (Enaud et al., 2004).*

De même, Oger *et al.,* (2010) ont démontré que la lipase B de *Candida antarctica* peut également différencier deux alcools primaires très réactifs présents sur la même molécule par rapport à leurs environnements respectifs. Lors de l'acylation des isoprostanes 1,5-diols protégés en position 2, seul l'alcool primaire du groupement en 5 (OHa) est acylé avec des rendements pouvant atteindre 100% (figure 17).

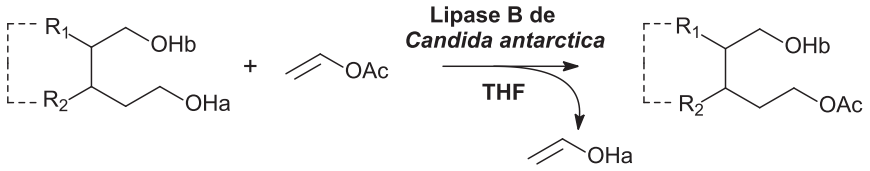


Figure 17 : *Acylation régiosélective des isoprostanes 1,5-diols avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase B de Candida antarctica en solvants organiques (Oger et al., 2010).*

Le tableau 5 illustre d'autres exemples issus de la littérature de catalyses régiosélectives réalisées par la lipase B de *Candida antarctica*. Nous remarquons clairement que l'enzyme est fortement régiosélective pour les fonctions alcools primaires.

Tableau 5 : *Exemples de catalyses régiosélectives réalisées par la lipase B de Candida antarctica avec différents substrats.*

Substrats A	Substrats B	Fonctions acylés	Conversion	Références
Acide oléique	Sorbitol	-OH position 6/ -OH position 1	35%/35%	Ducret *et al.,* 1995
Butanoate de vinyle	Propane-1,2-diol	-OH position 1	100%	Ciuffreda *et al*. 2003
Butanoate de butanoyle	Glycérol	-OH position 1	80%	Batovska *et al.,* 2004
Laurate de vinyle	Naringine	-OH position 6''	70%	Mellou *et al., 2005*
Anhydride succinique	Rapamycine	-OH position 42	91%	Gu *et al.,* 2005
Caprylate de vinyle	D-allose	-OH position 6	90%	Afach *et al.,* 2005
Acide laurique	Propane-1,2-diol	-OH position 1	54%	Yadav et Lathi, 2006
Acétate de vinyle	Pyridoxine	-OH position 5	95%	Zhang *et al.,* 2007
Acétate de vinyle	Andrographolide	-OH position 14	96%	Chen *et al.,* 2011

II.5.4. Chimiosélectivité

Quand plusieurs fonctions de nature différente (NH, OH, SH…), présentes sur un substrat, peuvent agir d'une façon compétitive avec un réactif, on dira qu'un catalyseur exerce une chimiosélectivité, si l'une des fonctions est transformée plus rapidement que les autres.

Les lipases en général sont également capable d'induire ce type de sélectivité (Montet *et al.*, 1990 ; Dominguez de Maria *et al.,* 2005).

Dans de nombreux travaux, la chimiosélectivité est quantifiée par le rapport des constantes spécifiques, V_{max}^{app} et K_m^{app}, de chaque fonction (ici O-acylation / N-acylation) (Fersht, 1985 ; Hedfors *et al.*, 2010):

$$C = \frac{Vmax_{O}^{app}/Km_{O}^{app}}{Vmax_{N}^{app}/Km_{N}^{app}}$$

L'acylation sélective de composés type « amino-alcool » ou « amino-polyol » par des lipases a été décrite lors de plusieurs travaux.

Lorsque Montet *et al.,* (1989a) ont comparé plusieurs enzymes ayant des propriétés acyltransférases (acylases, alcalases, amidases, lipases) pour l'acylation de différents amino-alcools par l'acide oléique dans un mélange *n*-hexane/chloroforme, la lipase de *Rhizomucor miehei* est retenue comme étant l'enzyme la plus efficace parmi celles testées. Les auteurs montrent que le solvant joue un rôle dans la chimiosélectivité de l'acylation. Dans le chloroforme pur, seule la N-acylation du 2-aminopropan-1-ol est réalisée avec un rendement de 30% en 24 heures (figure 18). Dans le *n*-hexane pur, les auteurs obtiennent 88% d'acylation dont 60 % de di-O-N-acylation, 15% de O-acylation et 25% de N-acylation.

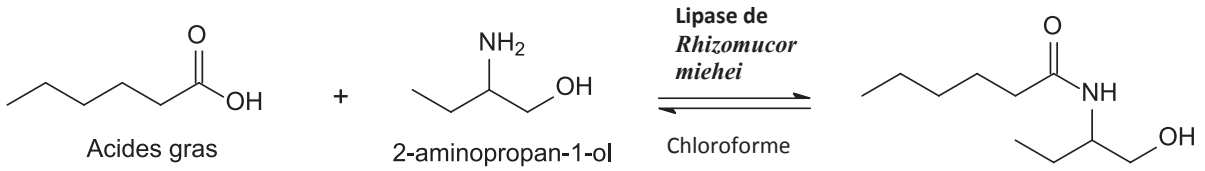


Figure 18 : *Acylation chimiosélective de l'aminopropanol avec un acide gras catalysée par la lipase de Rhizomucor miehei (Montet et al., 1989a).*

Quelques années plus tard, Maugard *et al.* (1998a) ont montré que la lipase B de *Candida antarctica* est également chimiosélective lors de la synthèse de N-oléyl N-méthyl-glucamine, un tensioactif biodégradable avec des rendements pouvant atteindre 96% (Maugard *et al.*, 1998a). L'état ionique du substrat et le microenvironnement de l'enzyme joue un rôle important dans l'activité et la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* (Maugard *et al.*, 1998b). En effet, l'étude de la cinétique de la synthèse du N-oléoyl N-méthyl-glucamide et du 6-O-oleoyl N-méthyl-glucamine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans du 2-méthylbutan-2-ol à partir de l'acide oléique et de la N-méthyl-

glucamine (figure 19) montre que le rapport acide/N-méthyl-glucamine influence les vitesses initiales des réactions d'O-acylation et d'N-acylation (figure 20).

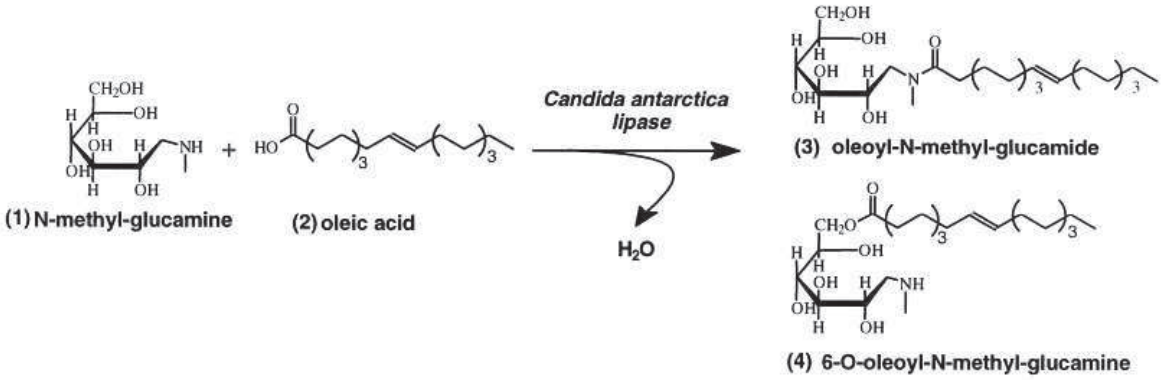


Figure 19 : *Acylation du N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique catalysée par la lipase B de Candida antarctica (Maugard et al., 1998a).*

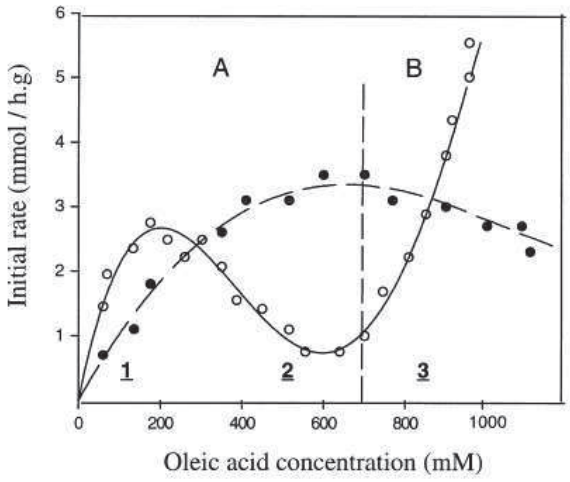


Figure 20 : *Effet de la concentration de l'acide oléique sur les vitesses initiales d'O-acylation (○) et d'N-acylation (●) : réaction entre l'acide oléique et 700 mM de N-méthyl-glucamine dans le 2-méthylbutan-2-ol à 90°C en présence de 10 g/l de lipase B de Candida antarctica (Maugard et al., 1998a).*

Ce rapport détermine l'état de protonation du substrat et des groupements ionisables au niveau du site catalytique de l'enzyme. En effet, avec un rapport inférieur à 1 la vitesse initiale de N-acylation augmente avec la concentration en acide jusqu'à une vitesse optimale de N-acylation obtenue pour un rapport égal à 1. Par contre, lorsque ce rapport est supérieur à 1 la vitesse de N-acylation diminue et la vitesse de O-acylation augmente et devient prépondérante.

L'importance du milieu réactionnel a également été démontrée dans différents travaux impliquant la lipase B de *Candida antarctica*. Ainsi, Husson *et al.* (2008) ont montré, lors d'une étude portant sur l'acylation du 6-aminohexan-1-ol, que le milieu réactionnel joue un rôle dans la chimiosélectivité de l'acylation. Dans le cas de réactions réalisées sans solvant (le

donneur d'acyle joue le rôle du solvant), la lipase B de *Candida antarctica* catalyse la O-acylation majoritairement (figure 21) suite à une modification de l'état d'ionisation du groupement amine avec un rendement de 91%. Dans des solvants organiques et des liquides ioniques, le produit issu de la di-O-N-acylation a été obtenu (avec une O-acylation suivie d'une N-acylation) avec des rendements atteignant au maximum 94% dans un milieu de type liquide ionique : le [Bmim][PF_6].

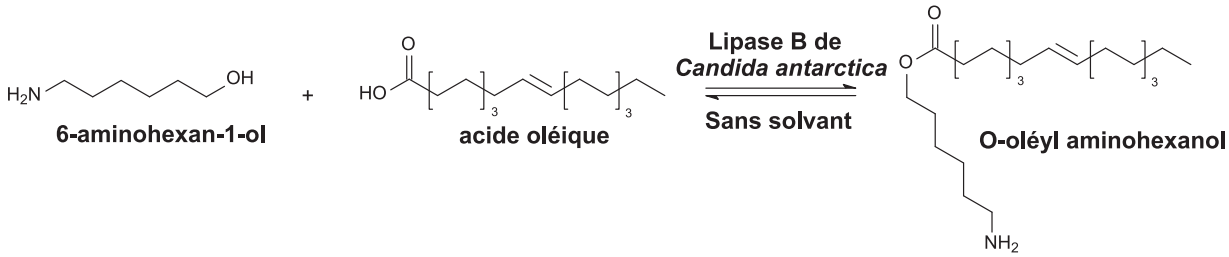


Figure 21 : *Acylation chimiosélective du 6-aminohexan-1-ol avec l'acide oléique catalysée par la lipase B de Candida antarctica sans solvant (Husson et al., 2008).*

Ces caractéristiques révèlent donc de nombreux paramètres qui sont primordiaux à étudier, particulièrement lorsque ce sont des substrats polyfonctionnels comme des amino-polyols qui sont à acyler. Le tableau 6 illustre d'autres exemples issus de la littérature, de catalyses chimiosélectives réalisées par la lipase B de *Candida antarctica*. Nous remarquons clairement que l'enzyme est fortement chimiosélective pour de nombreuses réactions.

Tableau 6 : *Exemples de catalyses chimiosélectives réalisées par la lipase B de Candida antarctica avec différents substrats.*

Substrats A	Substrats B	Fonctions acylées	Conversion	Références
Oléate de méthyle	N-méthyl-glucamine	$-NH_2$	96%	Maugard *et al.,* 1998a
Acide palmitique	Ethanolamine	$-NH_2$	90%	Fernàndez-Pérez et Otero, 2001
Acide hexanoique, Acide laurique Acide oléique	Diéthanolamine	$-NH_2$ $-NH_2$ $-NH_2$	77% 50% 12%	Kuan *et al.*, 2001
Laurate méthyle	N-méthyléthanol amine	$-NH_2$	97%	Sharma *et al.*, 2005
Acide Laurique	L-sérinamide	-OH	93%	Zhang *et al.*, 2005
Prop-2-enoate d'éthyl	Propanolamine	$-NH_2$	89%	Rustoy et Baldessari, 2006
Acide Laurique	Ethanolamine	$-NH_2$	95%	Tufvesson *et al.,* 2007
Linoleate d'éthyle	2-amino-1-butanol, 1,3-diamino-2-propanol	$-NH_2$ $-NH_2$	96% 89%	Couturier *et al.*, 2009
Acide oléique	Lys-Ser, Ser-Leu	$-NH_2$ -OH	57% 45%	Husson *et al.*, 2009

III. Les milieux dits « non conventionnels » utilisés pour l'acylation enzymatique

III.1. Introduction

Au début les enzymologistes utilisaient l'eau comme solvant. Car l'eau est le solvant par excellence pour les réactions biochimiques dans le monde vivant. Ainsi, les applications de la catalyse enzymatique concernaient essentiellement des réactions d'hydrolyse. Cependant, de nombreuses enzymes fonctionnent dans un environnement hydrophobe, par exemple les lipases et les déshydrogénases. Ces enzymes, se retrouvent essentiellement au niveau des membranes cellulaires, et sont actives dans la cellule pour une concentration en eau inférieure à 55,55 M. Le fait que naturellement, elles fonctionnent dans un milieu hydrophobe, permet de mieux expliquer qu'elles conservent leurs activités dans un milieu organique contenant une faible quantité d'eau (Dordick *et al.*, 1989).

Il faudra attendre la fin des années 1970 pour voir se développer l'étude des enzymes en milieux dit « non conventionnels ». Dans ce type de milieu la disponibilité en eau est faible, afin de modifier l'équilibre thermodynamique de la réaction et de favoriser la réaction de synthèse (Klibanov *et al.*, 1977 ; Butler 1979).

La plupart des travaux concernant l'acylation par voie enzymatique en milieux dits « non conventionnels » sont consacrés à divers substrats monofonctionnels de type alcool ou amine, et multifonctionnels tels que, des sucres, des flavonoïdes, des amino-alcools, des acides aminés, des glucamines ou des peptides (Gardossi *et al.*, 1991; Maugard *et al.*, 1997a ; Maugard *et al.*, 1997b ; Maugard *et al.*, 1997c ; Fernandez-Perez et Otero, 2001 ; Kontogianni *et al.,* 2001 ; Fernandez-Perez et Otero, 2003 ; Somashekar *et al.*, 2007).

III.2. Les principaux types de milieux dits « non-conventionnels »

Il existe de nombreux milieux réactionnels dits « non-conventionnels » pour les enzymes, ces milieux peuvent se trouver sous différents états physiques : liquide, gazeux ou solide.

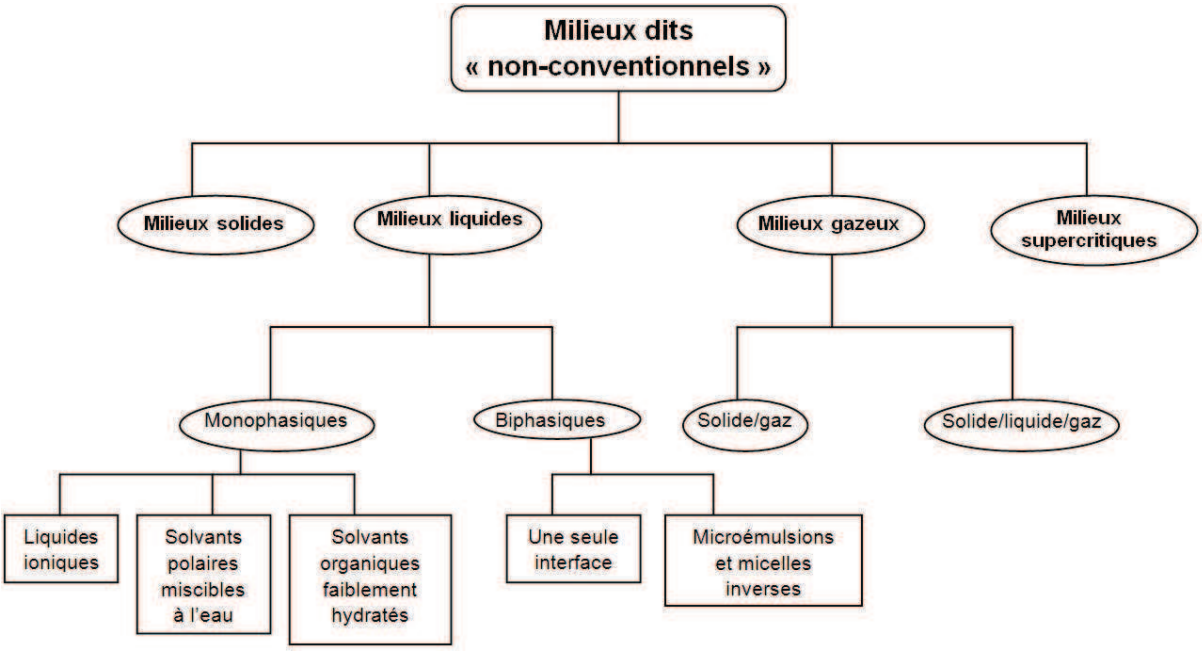


Schéma 1 : *Classification des milieux dits « non-conventionnels ».*

En général, les systèmes réactionnels « non-conventionnels » peuvent être regroupés en 4 grandes classes, largement décrites dans la littérature (Straathof et Adlecreutz, 2000) : les systèmes liquides (monophasiques et biphasiques), les milieux solides, les systèmes en phases gazeuses et les fluides supercritiques (Schéma 1).

Les hydrolases sont ainsi utilisées dans différents milieux dits « non conventionnels » classiques et innovants, tels que les solvants organiques, les liquides ioniques, les milieux fondus, le milieu CO_2 supercritique, etc… (Metzger, 1998 ; Hudson *et al.*, 2005 ; Matsuda *et al.*, 2005 ; Ghanem, 2007 ; Doukyu et Ogino, 2010 ; Hernández-Fernández *et al.,* 2010). Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons aux systèmes liquides monophasiques (les solvants organiques et les liquides ioniques).

III.3. Les solvants organiques

Les solvants organiques sont des composés organiques contenant des atomes de carbones et présentant habituellement des températures de fusion inférieures à 100°C. Dans ce type de système, l'enzyme se trouve en suspension dans un solvant organique anhydre ou faiblement hydraté (le pourcentage d'eau est inférieur au seuil de saturation pour les solvants non miscibles avec l'eau afin d'éviter la formation d'un système biphasique) (Butler, 1979; Klibanov, 1986 ; Dordick, 1989). Il est admis que ces milieux influencent considérablement l'activité, la sélectivité et la spécificité des biocatalyseurs. Les solvants organiques ont ouvert

de larges potentialités à la synthèse enzymatique de produits valorisables à l'échelle industrielle (Sheldon, 1996 ; Klibanov, 2001).

Trois types de solvants organiques sont clairement distincts:

- **Les solvants aprotiques non polaires ou apolaires** qui ne sont pas miscibles à l'eau et qui présentent de très faibles moments dipolaires, tels que les hydrocarbures saturés (*n*-hexane).
- **Les solvants aprotiques polaires** qui présentent des moments dipolaires et qui sont très peu miscibles dans l'eau car ils ne peuvent pas établir de liaisons hydrogènes (chloroforme).
- **Les solvants protiques polaires** qui sont des solvants miscibles à l'eau et qui peuvent établir des liaisons hydrogènes, tels que les alcools (méthanol, éthanol, 2-méthylbutan-2-ol).

Il est généralement admis qu'une enzyme placée en milieu organique exprime de nouvelles propriétés : augmentation de la thermostabilité, modification de la spécificité et surtout capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux telles que l'acylation et la transacylation catalysées par des hydrolases (Klibanov 2001).

De nombreuses raisons justifient l'utilisation des solvants organiques (Dordick, 1989 ; Sheldon 1996 ; Ghanem, 2007 ; Doukyu et Ogino, 2010) :

- une meilleure solubilisation des substrats apolaires,
- la faible teneur en eau favorise le déplacement de l'équilibre réactionnel dans le sens de la synthèse,
- la récupération des produits de réaction est facilitée, il suffit d'évaporer le solvant organique,
- la récupération des enzymes par simple filtration dans le cas où elles sont insolubles (enzymes immobilisées),
- une diminution des réactions secondaires causées par la présence de molécules d'eau en excès,
- l'élimination des contaminations microbiennes, gênantes en milieu aqueux dilué,

- la stabilité thermique de certaines enzymes est accrue,
- réactions dans des conditions plus douces : température inférieure à 100°C, pression atmosphérique et pH proche de la neutralité,
- la spécificité de certaines enzymes peut être mieux contrôlée,
- la chimio-, la régio- et l'énantio-sélectivité des biocatalyseurs peuvent être modifiées par le solvant,
- les enzymes peuvent être directement utilisées dans un processus chimique.

Toutefois, ils subsistent des désavantages liés à l'utilisation de solvants organiques. Citons, par exemple, des incidents de dénaturation ou d'inhibition des enzymes, engendrés par l'utilisation de solvants organiques. En effet, les solvants organiques peuvent affecter l'activité enzymatique en interagissant avec les produits et les substrats solubles dans le milieu. Il est aussi probable qu'ils aient une influence sur l'activité de l'enzyme en modifiant la teneur en eau autour de celle-ci (Zaks et Klibanov, 1985). Des problèmes d'inflammabilité et de toxicité du solvant peuvent également subsister. Par ailleurs, pour des systèmes hétérogènes ou des solvants visqueux des limitations de transfert de masse ont été observées (Hun *et al.*, 2003).

Ainsi, la toxicité et les propriétés physico-chimiques des solvants (densité, constante diélectrique, Log P, point d'ébullition, activité protonique en présence de tampons, formation de liaisons hydrogènes, etc…), constituent des paramètres déterminants lors du choix du solvant à utiliser, pour réaliser une réaction enzymatique.

L'hydrophobicité d'un solvant est quantifiée par le logarithme du coefficient de partage du solvant concerné entre l'octanol et l'eau (Log P). Le Log P peut être déterminé de manière empirique, mais également par le calcul selon la méthode des constantes fragmentables d'hydrophobie développée par Nys en 1973. Cependant cette méthode a été améliorée au cours de ces 10 dernières années et permet une prédiction et une estimation plus rigoureuse (Mannhold *et al.*, 1995 ; Mannhold *et al.*, 2000). Dans le tableau 7 présenté ci-dessous, observe les Log P de quelques solvants organiques typiquement utilisés dans le cadre de réactions enzymatiques.

Tableau 7 : *Valeurs de Log P de certains solvants organiques (Nys, 1973; Mannhold, 2000, ChemSpider 2011)*

Solvants organiques	Log P
Dioxane	-1,12
Diméthylformamide	-1,00
Diacétone alcool	-0,34
Acétonitrile	-0,33
Tert-butanol	0,37
Pyridine	0,71
Ether diéthylique	0,85
2-méthylbutan-2-ol	0,89
Dichlorométhane	1,25
Chloroforme	1,97
Benzène	2,00
Toluène	2,50
Pentane	3,39
Hexane	3,90
Heptane	4,00

Plusieurs travaux ont étudié l'influence du solvant en fonction du Log P et ont rapporté que ceux présentant une valeur de Log P inférieure à 2 (solvants polaires) peuvent produire une déshydratation de l'enzyme et par conséquent un changement de conformation de la protéine qui se traduit par une perte du pouvoir catalytique qui entraine une diminution du taux de conversion et de la vitesse initiale de la réaction (Yahya *et al.*, 1998 ; Hari Krishna *et al.*, 2001). D'autre part, Valivety *et al.* (1991) ont montré que l'activité de certaines lipases, mesurée en termes de vitesse initiale de la réaction, est favorisée dans des solvants possédant un Log P > 3,5 (solvants apolaires). Ce type de phénomène a été observé sur de nombreuses études portant sur l'acylation enzymatique en solvant organique. Comme par exemple Hazarika *et al.* (2002) qui ont observé que plus le Log P du solvant augmente plus les vitesses initiales de O-acylation catalysées par la lipase pancréatique de porc augmentent, les résultats obtenus sont décrits figure 22.

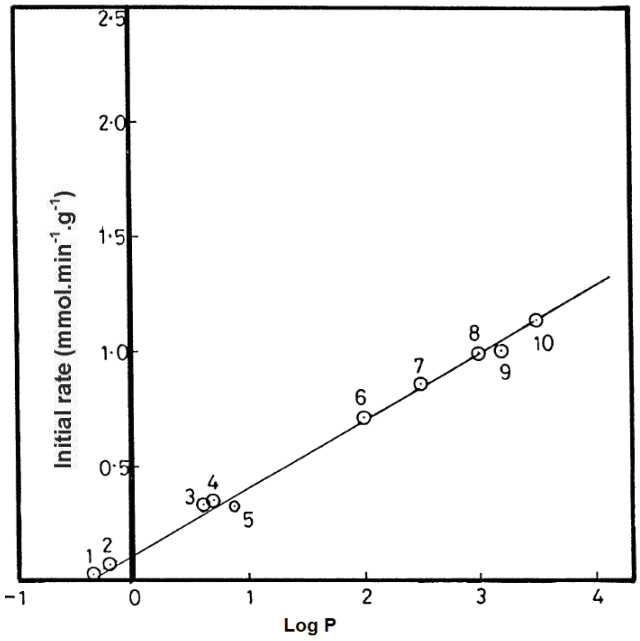


Figure 22 : *Influence du Log P du solvant sur la vitesse initiale de synthèse d'oléate d'éthyle par la lipase pancréatique porcine dans différents solvants organiques (1 : acétonitrile, 2 : acétone, 3 : dichlorométhane, 4 : acétate d'éthyle, 5 : éther d'éthyle, 6 : chloroforme, 7 : toluène, 8 : tetrachlorométhane, 9 : cyclohexane, 10 : n-hexane). Les réactions sont réalisées à 30°C avec 10 mg/ml de lipase, 2,5 mM d'éthanol et 2,5 mM d'acide oléique (Hazarika et al., 2002).*

III.4. Les liquides ioniques

Plusieurs nomenclatures ont été utilisées dans la littérature pour désigner les liquides ioniques (nommés ici LIs), telles que les appellations "sels fondus", "sels liquides organiques" ou "liquides ioniques à température ambiante", entre autres. Ces différentes définitions font appel à des propriétés différentiant les LIs des sels fondus classiques comme le NaCl, telles que leurs capacités à jouer un rôle de solvant à température ambiante ou leurs fortes interactions intermoléculaires [ion-ion] inexistantes pour les autres sels fondus à hautes températures. Ces liquides ioniques possèdent des points de fusions inférieurs à la température ambiante et une température d'ébullition souvent comprise entre 300 et 400°C (Koo *et al.*, 2008 ; Hernández-Fernández *et al.*, 2010). Les LIs sont employés de plus en plus souvent comme solvants dans le domaine de la biocatalyse.

L'utilisation de liquides ioniques présente de nombreux avantages (Sheldon *et al.*, 2002 ; Van Rantwijk *et al.*, 2003 ; De Diego *et al.*, 2009):

- une pression de vapeur négligeable et les LIs ne sont pas volatiles,
- non inflammabilité des LIs,
- une grande stabilité thermique, chimique et électrochimique,
- un état liquide dans un large domaine de température,

- bonnes propriétés de dissolution pour la plupart des composés organiques et inorganiques,
- miscibilité variable avec l'eau et d'autres solvants facilitant l'extraction,
- pour la plupart, les LIs sont facilement recyclables,
- des propriétés facilement modulables.

Leur intérêt en tant que solvants verts réside principalement dans leur excellente stabilité thermique, leur nature non-inflammable et leur pression de vapeur négligeable dues aux fortes interactions ioniques dans ces liquides, qui permettent d'utiliser les LIs sans problème d'émission de solvant dans l'atmosphère (Gordon 2001 ; Sheldon *et al.*, 2002 ; Jain *et al.*, 2005 ; De Diego *et al.*, 2009). Les propriétés physicochimiques des LIs sont modulables en fonction du choix du cation et de l'anion constitutifs du LIs. Le cation est généralement à l'origine de la stabilité et des propriétés physiques du liquide ionique alors que l'anion définit plutôt ses propriétés chimiques et sa fonctionnalité. La figure 23 regroupe les anions et les cations les plus couramment utilisés en biocatalyse.

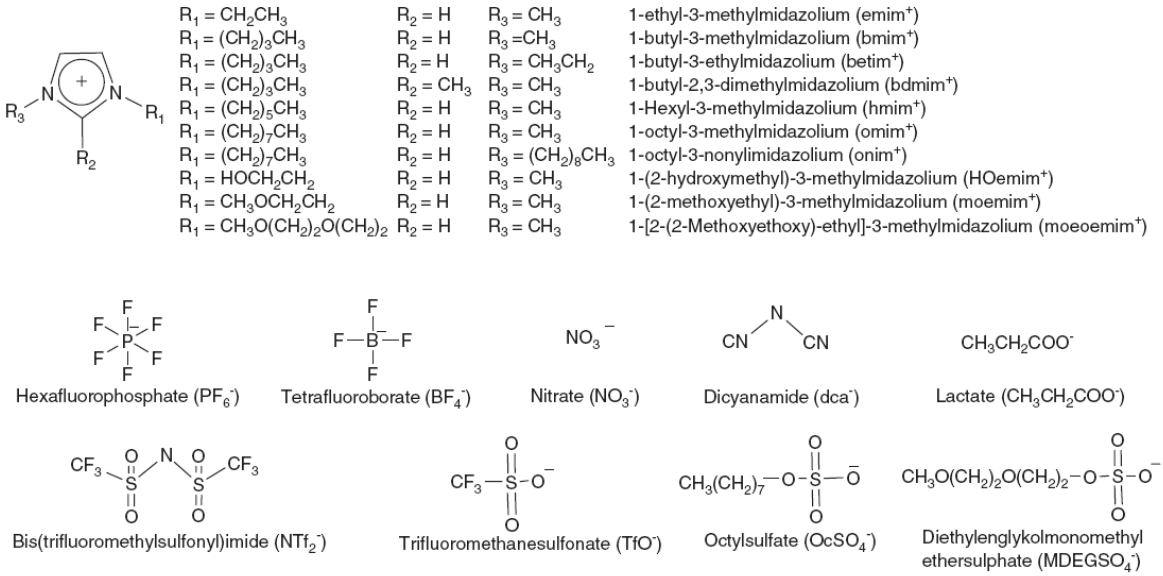


Figure 23 : *Structures et abréviations des cations et des anions de liquides ioniques couramment utilisés en biocatalyse (Hernández-Fernández et al., 2010).*

La polarité des liquides ioniques est très variable. Elle est principalement dépendante de la nature du groupe substituant du cation (longueur de la chaîne alkyle) et de la taille de l'anion. Un liquide ionique dont le cation et l'anion sont de petite taille, présentera un caractère polaire bien marqué (Yang *et al.*, 2005). Les cations de type phosphonium et les anions fluorés augmentent l'hydrophobicité du liquide ionique. Au contraire les cations de type imidazolium confèrent au liquide ionique un caractère hydrophile. Notons que les

liquides ioniques à caractères hydrophiles maintiennent une activité synthétique importante des lipases contrairement aux solvants organiques de même polarité (Yang *et al.*, 2005). La constante diélectrique de nombreux liquides ioniques est déterminée grâce à des mesures de spectroscopie diélectrique sous micro-ondes. Il a été observé que les LIs les plus utilisés tels que le [Bmim][PF_6] (figure 23) (Roosen *et al.*, 2008 ; Dhake *et al.*, 2009) ont une polarité de l'ordre de celle des alcools à chaine moyenne tels que le hexan-1-ol et le octan-1-ol, grâce aux contributions apportées par les anions aussi bien que par les cations.

Au niveau de la viscosité des liquides ioniques, l'anion est déterminant : les anions peu volumineux tels que les dicyanimides donnent des liquides ioniques beaucoup moins visqueux que les anions de type fluorés (Park *et al.*, 2003). La viscosité de ces milieux peut être considérée comme une limite à leur utilisation en biocatalyse (Ha et Koo, 2011). En effet cette propriété peut engendrer différents problèmes :

- de filtration,
- de dispersion des enzymes immobilisées sur un support dans le milieu réactionnel,
- de prélèvements au cours du temps,
- de limitation de transfert de masse.

Par contre, la viscosité des liquides ioniques peut être modulée en modifiant la température de réaction (Bonhote *et al.*, 1996 ; Kelkar et Maginn, 2007). Cette viscosité a un effet négatif sur les vitesses des réactions catalysées par les enzymes à cause d'un problème de limitation diffusionnelle. Cependant, elle peut aussi avoir un impact positif sur la stabilité et la durée de vie du biocatalyseur (Zhao *et al.*, 2009).

L'influence des liquides ioniques sur la structure de différentes enzymes a été étudiée dans plusieurs travaux (Madeira Lau *et al.*, 2000 ; Kragl *et al.*, 2002 ; Ulbert *et al.*, 2004 ; Lou *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2006). Il a été observé qu'aucun LI n'est totalement toléré par toutes les enzymes. Au final, la compatibilité enzyme-liquide ionique dépend de nombreux paramètres du LI tels que sa polarité, son Log P, sa capacité à former des liaisons hydrogènes et sa viscosité (Rantwijk et Sheldon, 2007 ; Zhao, 2010). L'une des théories, permettant de prévoir la compatibilité entre les LIs et les enzymes, est basée sur la capacité des protéines à perdre leur stabilité en présence d'ions dans ce cas le solvant interagit plus fortement avec l'enzyme dénaturée qu'avec l'enzyme native (Baldwin, 1996). Ces interactions déstabilisantes résulteraient d'un effet de « salting in » des ions amphiphiles au niveau des groupements hydrophobes enfouis dans l'enzyme ou de fortes interactions (liaisons hydrogènes) aux

niveaux des liaisons peptidiques (Kaar *et al.*, 2003 ; Madeira Lau *et al.*, 2004 ; Lou *et al.*, 2006). En effet, les LIs et plus particulièrement leurs anions, peuvent former des liaisons hydrogènes fortes pouvant dissocier les liaisons hydrogènes qui maintiennent l'intégrité structurale des hélices α et des feuillets β, provoquant ainsi une dénaturation entière ou partielle de la protéine (Madeira Lau *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2006 ; Rantwijk et Sheldon, 2007). Par ailleurs, la taille des ions semble avoir également une importance car les ions stériquement encombrants exigeraient de rompre de nombreuses liaisons hydrogènes et d'en créer de nouvelles, ce qui pourrait contribuer au maintien de la stabilité de la protéine. Ainsi, plusieurs travaux ont également montré que certains liquides ioniques améliorent considérablement la stabilité de l'enzyme en établissant avec elle des interactions maintenant sa conformation tridimensionnelle optimale. Ceci a été démontré par dichroïsme circulaire ou par des études de fluorescence des résidus fluorophores Trp, Tyr ou Phe (Lozano *et al.*, 2001 ; Lou *et al.*, 2006 ; Lozano *et al.,* 2005).

Au niveau de l'activité enzymatique en présence de liquides ioniques, de nombreuses réactions biocatalysées par des hydrolases et en particulier des lipases ont été étudiées (Roosen *et al.*, 2008). Les LIs qui possèdent des anions de type BF_4 et PF_6 sont ceux qui permettent d'obtenir les taux d'acylation enzymatiques les plus élevés. Par ailleurs, il a été démontré que dans le [Bmim][PF_6] et le [Bmim][BF_4] des taux de conversion élevés sont obtenus, grâce au groupement 2-méthyle de l'anneau de l'imidazolium du cation qui joue un rôle important dans le maintient de l'activité enzymatique (Itoh *et al.*, 2003). Le [Bmim] favorise la réaction en formant des liaisons hydrogènes avec le substrat et le cation ce qui améliore la vitesse initiale de formation des produits de synthèse.

IV. Les autres paramètres affectant l'acylation enzymatique

IV.1. L'eau dans le milieu réactionnel

IV.1.1. L'eau en tant que reactif

La quantité d'eau disponible pour l'enzyme dans des milieux dits « non conventionnels », joue un rôle important dans les réactions de synthèse catalysées par les hydrolases. En effet, c'est un facteur déterminant qui influence le déplacement de l'équilibre de la réaction (Zaks et Klibanov, 1984 ; Halling, 1994 ; Humeau *et al.,* 1998 ; Bridiau *et al.*, 2010). La teneur en eau permet de quantifier la quantité d'eau dans un milieu donné. En, biocatalyse, cette teneur en eau est exprimée en rapport de volume (v/v) ou plus généralement de poids (m/m). Il a été établi qu'une activité de synthèse importante correspond à une très faible teneur en eau. Les milieux apolaires sont d'ailleurs des milieux au sein desquels la

fraction aqueuse représente un pourcentage en masse minime (de l'ordre de 1 % m/m). Zaks et Klibanov (1984) décrivent dans leurs premiers travaux, en milieu organique quasi-anhydre, une activité d'alcoolyse élevée pour la lipase pancréatique de porc dans un milieu tributyrine/heptanol, où l'eau n'est présente qu'à hauteur de 0,015 % (m/m).

Les hydrolases en tant que catalyseurs utilisent l'eau comme réactif au cours de la réaction. Considérons la réaction d'hydrolyse suivante :

$$H_2O + A \longrightarrow B + C$$

Une solution aqueuse ayant une concentration en eau de 55,55 M, l'équilibre est alors déplacé de gauche à droite dans le sens de l'hydrolyse.

La constante d'équilibre K_{eq} est équivalente à:

$$K_{eq} = [B] \times [C] / [A] \text{ (Halling, 1984)}$$

Les réactions d'hydrolyse reverse, où l'eau est l'un des produits de la réaction, peuvent être réalisées dans des systèmes dits hydro-organiques comme c'est le cas lors de la synthèse de liaisons esters, glycosidiques, amides, etc... Ces synthèses sont rendues possibles dans des conditions de faibles teneurs en eau car l'équilibre de la réaction se déplace ainsi dans le sens de la synthèse et non plus de l'hydrolyse, ce qui est caractérisé par l'équilibre suivant:

$$H_2O + A \rightleftharpoons B + C$$

L'activité de chacun des composants du système intervient alors dans la constante d'équilibre de la réaction qui est dans ce cas équivalente à : $K_{eq} = a_B \times a_C / a_A \times a_w$; ou bien en faisant intervenir les concentrations respectives :

$$K_{eq} = ([B] \times [C]) / ([A] \times [H_2O])$$

Il est ainsi possible de déplacer la position d'équilibre en jouant sur l'activité thermodynamique de l'eau (a_w), qui présente donc une importance capitale dans la catalyse en milieu faiblement hydraté puisqu'elle y intervient au même niveau de concentration que les autres composants du système.

IV.1.2. L'activité thermodynamique de l'eau

L'a_w est le paramètre thermodynamique d'équilibre permettant de définir l'état de l'eau dans des systèmes. En mesurant un seul paramètre (a_w), il est ainsi possible de définir l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système (Halling, 1994) :

- Quantité d'eau dissoute dans le solvant.
- Etat d'hydratation du biocatalyseur.
- Pression partielle de vapeur d'eau au dessus du système.
- Etat d'hydratation des autres composants du système.

Un moyen pour définir l'activité de l'eau consiste à utiliser la pression de vapeur d'eau de la phase gazeuse en équilibre avec le système considéré (Halling, 1994):

$$a_w = \mathbf{P}_{H_2O} / \mathbf{P}^{0}_{H_2O}$$

P représente la pression partielle de l'eau au-dessus du système et Po la pression partielle dite de référence, mesurée à même température au-dessus d'eau pure. L'a_w d'un système est donc dépendante de grandeurs physiques caractérisant un système, telles que la pression absolue et la température. Par définition, l'activité de l'eau pure est fixée à 1. Dans un système eau / solvant organique, l'activité de l'eau sera donc toujours comprise entre 0 et 1.

IV.1.3. L'état d'hydratation du biocatalyseur

Dans les réactions mettant en jeu des catalyseurs biologiques, l'eau a de nombreux effets. L'eau intervient comme solvant pour faciliter la dissolution et la diffusion des substrats miscibles. Elle influence l'équilibre réactionnel au cours d'une réaction de synthèse en intervenant comme substrat de la réaction inverse. Elle intervient même au niveau du processus d'inactivation enzymatique (Zaks et Klibanov., 1984).

L'eau est indispensable à l'initiation d'une réaction, car elle contribue aux liaisons non-covalentes qui stabilisent la structure de l'enzyme et permet le maintien de la mobilité protéique, souvent associé à la quantité d'eau adsorbée sur le biocatalyseur. L'eau liée aux protéines est essentielle pour la catalyse et sert de lubrifiant pour l'enzyme (Zaks et Klibanov, 1988). En effet, l'eau, en fonction de sa disponibilité pour l'enzyme, semble influencer la flexibilité de cette dernière (Simon *et al.,* 1998, Bridiau *et al.*, 2010). Elle permet donc une certaine mobilité intra-moléculaire. De ce fait en absence totale d'eau, l'enzyme est comme

figée et ne peut effectuer la catalyse. Par contre, il a également été observé que les enzymes dans des solvants organiques à forte teneur en eau présentent une dénaturation (Griebenow et Klibanov, 1996). La relation entre l'activité catalytique et l'état d'hydratation du catalyseur a été mise en évidence par les travaux de Robert *et al.,* (1992).

Pour caractériser l'état d'hydratation d'une phase solide, dans notre cas un biocatalyseur, une façon traditionnelle consiste à déterminer l'isotherme de sorption. Une certaine masse d'échantillon est placée dans une enceinte où l'a_w est contrôlée et une fois l'équilibre atteint entre une phase gazeuse (eau sous forme de vapeur d'eau) et une phase solide (eau adsorbée par le solide), la teneur en eau est déterminée par différentes méthodes de dosage : gravimétrique, iodométrique ou coulométrique Karl fischer (Macleod, 1991 ; Bernetti *et al.,* 1984).

Ces isothermes de sorption (figure 24) permettent de distinguer les différents états de l'eau d'une préparation (Drapon, 1985 ; Hahn-Hagerdäl, 1986). La courbe présente 2 point d'inflexion caractéristiques (A et B) correspondant à 2 états de l'eau.

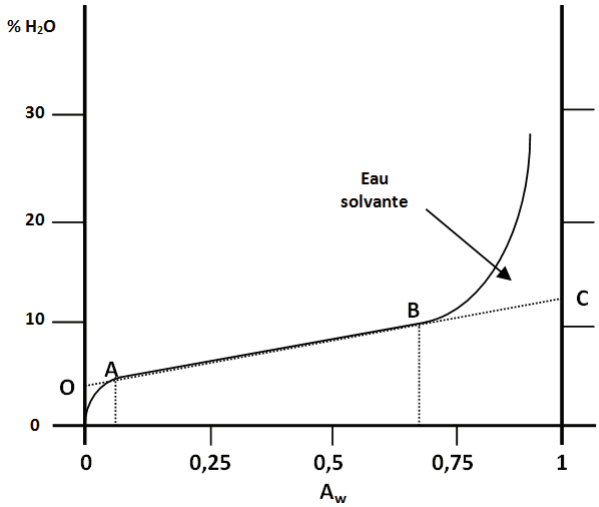


Figure 24 : *Représentation schématique d'un isotherme de sorption (Drapon, 1985).*

Les molécules d'eau fixées sur l'échantillon correspondant à la partie située avant le point A sur la courbe, sont les molécules très fortement liées. Elles sont positionnées majoritairement sur les sites polaires et les résidus ionisés. Ces molécules constituent la première « couche » d'hydratation. Par extrapolation, le point O correspond à la quantité d'eau très fortement liée à l'échantillon.

Entre les points A et B, la teneur en eau varie de façon linéaire avec a_w. C'est la formation d'une nouvelle couche d'hydratation, au niveau de la protéine. Les molécules d'eau

sont alors liées à la protéine par des liaisons de plus faible énergie et la teneur en eau du milieu réactionnel est donc proportionnelle à la couche d'hydratation du biocatalyseur.

Le deuxième point d'inflexion B correspond alors à l'apparition d'eau solvante (non liée au biocatalyseur) et une fois dépassée la valeur d'a_w lui correspondant, une phase aqueuse, distincte de la couche d'hydratation, prend naissance. Par extrapolation de la partie AB linéaire, nous pouvons déterminer le point C correspondant à la quantité totale d'eau non solvante, structurée par l'échantillon (quantité totale d'eau fixée sur la biocatalyseur).

La courbe de sorption montre que l'eau solvant apparaît au-delà de B. C'est pour cette valeur qu'est observée la plus forte activité catalytique. Cependant, la stabilité est fortement affectée pour des a_w supérieures. La présence d'eau solvante est responsable d'une importante dénaturation des protéines. Le bon compromis entre une bonne stabilité et une bonne activité catalytique se situe généralement lorsque le catalyseur est entouré d'une première couche d'hydratation, juste avant l'apparition d'eau solvante (B).

Valivety *et al.,* (1992a et b) ont étudié dans différents milieux l'effet de l'eau sur la réaction de O-acylation entre l'acide décanoique et le dodécanol par la lipase de *Rhizomucor miehei* immobilisée. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont clairement démontré la différence entre l'impact de la teneur en eau et de l'a_w. En effet, dans les différents milieux testés (*n*-hexane, trichloroéthylène, éther isopropylique, 3-pentanone et sans solvant) des optima différents ont été mis en évidence, si les résultats sont exprimés en fonction de la teneur en eau, et à l'inverse le même optimum à savoir $a_w = 0,5$, a été mis en évidence si les résultats sont exprimés en fonction de l'a_w du système.

Chamouleau *et al.,* (2001) ont démontré que pour une faible a_w, la lipase B de *Candida antarctica* conserve une activité élevée lors d'une étude portant sur l'acylation du fructose par l'acide palmitique dans le 2-méthylbutan-2-ol. Lors de cette étude, les vitesses initiales et les rendements diminuent avec l'augmentation de l'a_w, les meilleurs taux de synthèse sont obtenus pour une $a_w = 0,1$ qui correspond à une hydratation du biocatalyseur inférieure à 10%. Une étude menée par Lamare *et al.,* (2001) en réacteur solide/gaz a confirmé les résultats de l'étude précédente, en obtenant également une activité catalytique optimale de la lipase B de *Candida antarctica* pour une $a_w = 0,1$, lors de la O-acylation d'alcools à partir d'acides dits « naturels ».

L'effet de l'activité de l'eau a aussi fait l'objet d'études avec des cellules entières en phase gazeuse (Van Ginkel et De Bont, 1987 ; Hamstra *et al.,* 1987). Contrairement aux

enzymes libres, les cellules entières déshydratées nécessitent une hydratation relativement élevée pour être actives. En effet, Maugard *et al.,* (2001) ont montré que l'activité de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* est nulle pour une a_w inférieure à 0,4. Lorsque l'a_w augmente, l'activité de la levure augmente jusqu'à une a_w égale à 0,7 qui correspond à l'apparition de l'eau solvante (figure 25).

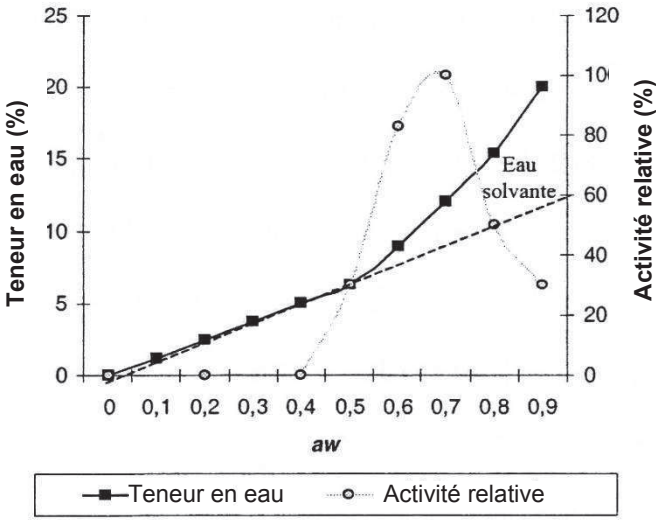


Figure 25 : *Effet de l'activité thermodynamique de l'eau sur l'activité alcool déshydrogénase de la levure de Saccharomyces cerevisiae déshydratée en phase gaz et sur la teneur en eau (Maugard et al., 2001).*

IV.2. Influence de la température

La température est un facteur important dans l'acylation enzymatique. Elle affecte la viscosité du milieu, l'activation ou la dénaturation de l'enzyme et la solubilité des substrats et des produits. L'activation de la catalyse par la température selon la loi d'Arrhénius est un effet connu depuis longtemps. A cette activation se superposent les phénomènes de dénaturation thermique de l'enzyme (Guillardeau *et al.*, 1992 ; Khaled. *et al.,* 1992 ; Mutua et Akoh, 1993), si bien que globalement le profil décrit dans la figure 26 est obtenu.

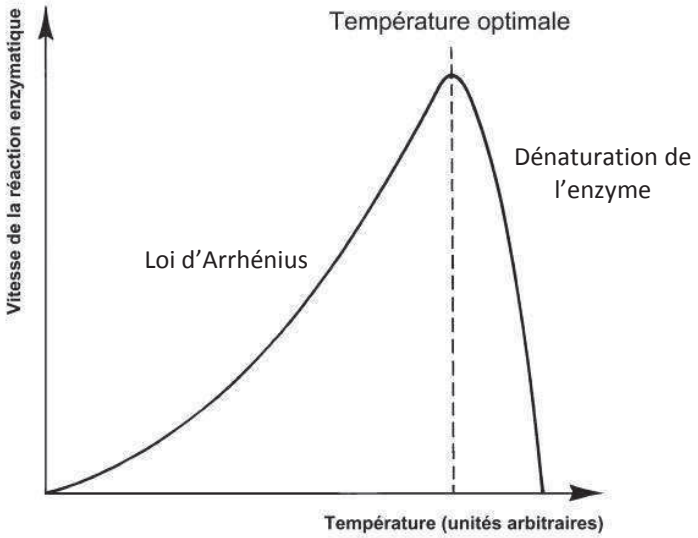


Figure 26 : *Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la température.*

Ces phénomènes de dénaturation thermique mettent en jeu des molécules d'eau. Aussi l'utilisation d'enzymes en milieu organique pauvre en eau confère souvent à ces dernières une thermostabilité plus importante qu'en milieu aqueux (Turner *et al.,* 1995). La thermostabilité enzymatique est accrue dans les solvants organiques à faible a_w. En effet, l'augmentation de la rigidité de la protéine réduit la vitesse d'inactivation (Zaks et Klibanov, 1984 ; Bell *et al.*, 1995).

Katsoura *et al.* (2007) ont étudié l'influence de la température sur la réaction d'acylation de la naringine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* à partir de butyrate de vinyle en solvant organique. Ils ont montré que l'augmentation de la température de 35 à 60°C améliore la vitesse initiale et le taux de conversion de la réaction.

D'autres auteurs ont indiqué que l'activité optimale de cette lipase est obtenue à 60°C (Coulon, 1997 ; Hugon 2000). Turner et Vulson (2000) ont également observé que la lipase B de *Candida antarctica* reste active jusqu'à 130°C sans changement significatif de conformation.

Réjasse *et al.,* (2006) ont étudié l'influence de la température sur la lipase B de *Candida antarctica* en utilisant un système de chauffage de type micro-onde, lors de la transestérification du butyrate d'éthyle par le butanol sans solvant. Comme décrit précédemment lors des études utilisant un système de chauffage « conventionnel», cette lipase possède également une activité catalytique optimale à 60°C (figure 27) sous chauffage micro-onde.

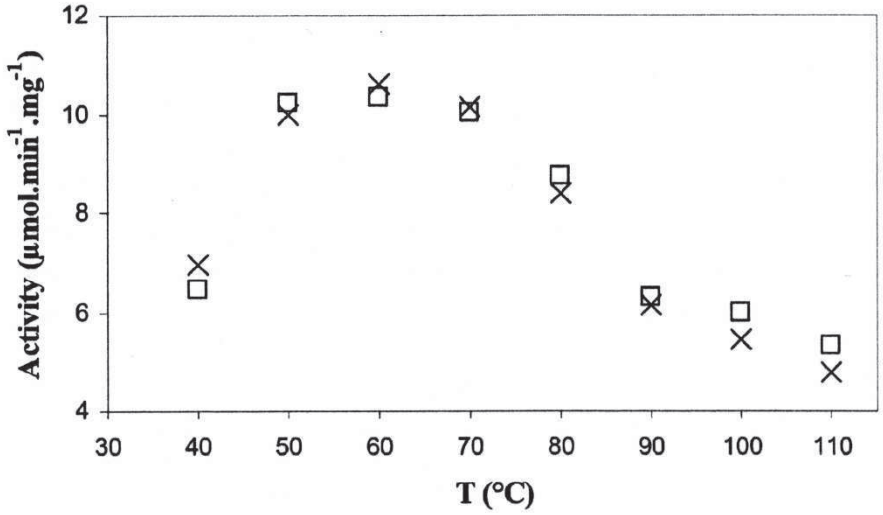


Figure 27 : *Influence de la température sur l'activité catalytique de la lipase B de Candida antarctica, lors de la transestérification du butyrate d'éthyle par le butanol (□, par chauffage conventionnel ; X, par chauffage micro-onde) (Réjasse et al., 2006).*

IV.3. Influence de l'état d'ionisation des substrats

La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. Ceci peut être attribué à la stabilité de l'enzyme dans une certaine zone de pH. Le pH optimal est fonction du site actif et de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'effet du pH sur l'activité enzymatique est souvent lié à l'état d'ionisation, soit du substrat (dont une forme seulement est catalysée), soit d'un certain nombre de groupements dissociables de l'enzyme nécessaires pour maintenir la conformation du site actif et participant à l'élaboration du complexe ES (Enzyme-Substrat). Les différents groupements dissociables pouvant être présents au niveau du site actif sont -COOH, -NH2, -NH- (imidazole de l'histidine ou guanidine de l'arginine), -SH (sulfydryl de la cystéine) et -OH (phénole de la tyrosine).

L'état d'ionisation des groupements ionisables de l'enzyme peut être modifié en présence d'une espèce acide ou basique présente dans le milieu réactionnel (Halling, 1994). Les groupements ionisables de l'enzyme s'adaptent à leur environnement. Valivety *et al.* (1990) montrent que l'hydrolyse enzymatique du dodecyl acétate acidifie le milieu réactionnel et modifie ainsi le pH de la phase aqueuse du site catalytique. Les auteurs déterminent l'état de protonation des groupements ionisables de l'enzyme durant la réaction d'hydrolyse. Ils utilisent des esters de fluorescéine, hydrophobes, qui sont ionisés en fonction de l'état de protonation de l'enzyme.

Plusieurs auteurs ont étudié l'influence du pH sur l'activité et la stabilité de la lipase B de *Candida antarctica,* lors de réactions d'hydrolyses en milieux tamponnés (Martinelle *et al.,* 1995 ; Yang et *al.* 2010). Ils ont démontré que l'activité et la stabilité optimale de cette lipase étaient obtenues pour un pH proche de 7,5 (figure 28).

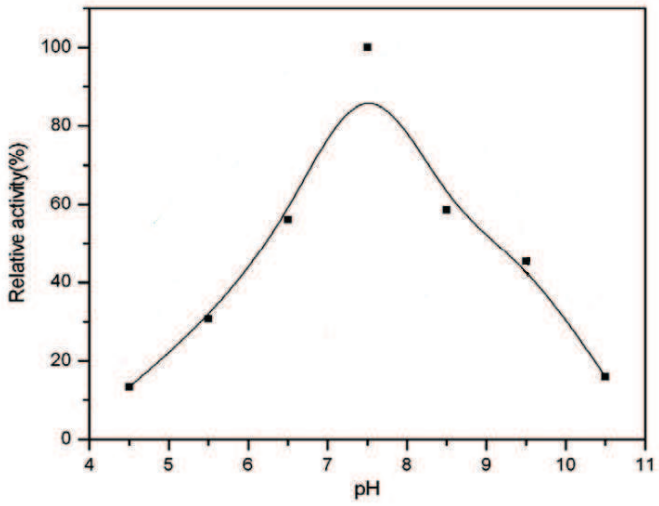


Figure 28 : *Influence du pH sur l'activité catalytique de la lipase B de Candida antarctica, lors de l'hydrolyse d'huile d'olive en tampon phosphate (Yang et al., 2010).*

Par ailleurs, lors de réaction de N-acylation en solvant organique, il y a souvent formation d'un complexe ionique entre le substrat aminé et le donneur d'acyle lorsque celui-ci est sous forme d'acide gras libre. Ainsi, la fonction amine du substrat, sous forme protonée (NH_3^+), interagit alors avec la fonction carboxyle déprotonée (COO^-) de l'acide gras par des interactions électrostatiques. Ce type d'interaction entre une amine et un acide gras en solvant organique a été pour la première fois démontré par Maugard *et al.* (1997b) dans une étude consacrée à l'acylation enzymatique catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* de la N-méthyl glucamine par différents acides gras dans un solvant organique hydrophobe, le *n*-hexane. La mise en évidence de ce complexe a été réalisée par spectroscopie infrarouge (figure 29). L'apparition de bandes caractéristiques des fonctions carboxylates (1562 cm^{-1}) a permis d'observer qu'une partie des molécules d'acide gras peuvent interagir par interactions électrostatiques, avec les molécules de substrats aminés.

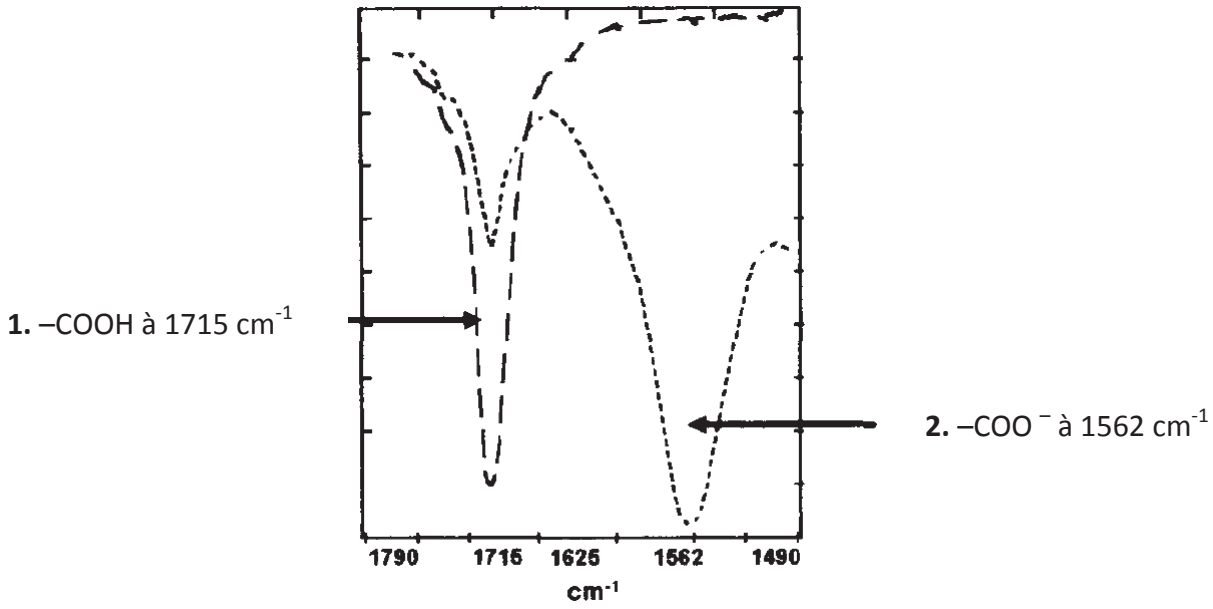


Figure 29 : *Analyse Infra-rouge des groupements carbonyles présents au début des réactions : 1) Acide oléique dans le n-hexane (60 mM) et 2). Acide oléique (60 mM) et N-méthyl glucamine (60 mM) dans l'hexane (Maugard et al., 1997b).*

Dans ce milieu réactionnel, il est observé que la formation du complexe ionique est influencée par le rapport molaire accepteur / donneur d'acyle. Lorsque le rapport molaire est supérieur à 1, le substrat aminé est en excès et dans ces conditions le groupement carboxylique de l'acide gras est préférentiellement déprotoné. À l'inverse, pour un rapport inférieur à 1, l'acide est en excès et dans ces conditions le groupement amine de la N-méthyl glucamine est préférentiellement protoné (Maugard *et al.*, 1998a ; Maugard *et al.*, 1998b).

Lorsqu'un substrat n'est pas soluble dans le milieu réactionnel, la formation du complexe ionique entre les deux substrats peut améliorer la solubilité des substrats et ainsi amorcer la réaction (Maugard *et al.*, 1997b ; Maugard *et al.*, 1998b). Le sel formé joue alors le rôle d'agent de transfert de phase.

Cependant, il existe d'autres exemples en solvant organique où le complexe ionique affecte la solubilité des substrats. Cela a été observé dans le cas de la formation d'un complexe entre l'éthanolamine ou la diéthanolamine et des acides gras libres, qui forment un sel non-soluble en solvant organique (dioxane et *n*-hexane) (Fernandez-Perez et Otero, 2001; Fernandez-Perez et Otero, 2003). La formation de ce complexe affecte la disponibilité des substrats et donc au final le rendement de la réaction. En fonction du pouvoir dissociant du solvant, le complexe ionique peut limiter la disponibilité des substrats et/ou de leurs groupements fonctionnels et influencer considérablement le taux de conversion des substrats et la sélectivité de la réaction.

Plusieurs auteurs ont également démontré lors de réaction de N-acylation, que l'ajout d'une base organique tertiaire inerte vis-à-vis de l'enzyme dans le milieu réactionnel permet de modifier l'état d'ionisation des substrats et entraine une augmentation de la vitesse de N-acylation. Par exemple l'utilisation de DMAP (diméthyl-amino-4-pyridine) par Maugard *et al.,* (1998a) a permis d'augmenter les vitesses de N-acylation quelque soient les concentrations en substrats, lors de l'acylation de N-méthyl glucamine par la lipase de B de *Candida antarctica* à partir d'acide oléique dans le 2-méthylbutan-2-ol.

Dans une autre étude traitant de la synthèse de vanillyloléamide (olvanil) catalysée par la lipase de B de *Candida antarctica* en solvant organique (2-méthylbutan-2-ol et *n*-hexane), la N-acylation n'est pas réalisable car le substrat est sous forme hydrochlorate (hydrochlorate de vanillylamine). Cependant, l'ajout d'une base tertiaire, la DIPEA (N,Ndiisopropylethylamine) a permis de réaliser la N-acylation du substrat (Reyes-Duarte *et al.*, 2002).

V. Conclusion

Un grand nombre d'analogues de céramides ont été élaborés ces deux dernières décennies, soulignant l'importance de la synthèse chimique et enzymatique de ces sphingolipides dans les domaines de la cosmétologie et de la pharmacologie. L'extraction de ces molécules à partir d'une source naturelle est difficile et les coûts de productions sont élevés. Il y a donc une nécessité majeure à mettre au point des analogues synthétiques de céramides. Parmi les biocatalyseurs capables de réaliser ce type de synthèse, les lipases et en particulier la lipase B de *Candida antarctica* semble être l'enzyme la plus adaptée à la production de molécules de type « pseudo-céramide » à partir d'amino-alcools.

La lipase B de *Candida antarctica* est en effet capable de catalyser une grande variété de réactions de synthèse et en particulier des synthèses d'esters et d'amides. Le potentiel énantio-, régio-, et chimio-sélectif élevé de cette lipase en fait un catalyseur de choix pour l'acylation sélective de composés multifonctionnels. Néanmoins la compréhension des mécanismes réactionnels intervenant dans ces sélectivités est actuellement limitée. La chimiosélectivité en particulier a très peu été étudiée et peut êtres influencée par différents paramètres, tels que l'état d'ionisation des substrats et/ou le type de milieu réactionnel.

La plupart des synthèses enzymatiques sont des réactions d'hydrolyse réverse, où l'eau est un produit de la réaction. La quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel joue donc un rôle important dans les réactions de synthèses catalysées par des enzymes de type

hydrolase et en particulier les lipases. C'est pourquoi ces réactions sont généralement réalisées dans des milieux dits « non-conventionnels » faiblement hydratés comme par exemple les solvants organiques et les liquides ioniques.

Actuellement, les céramides et leurs analogues ne sont pas faciles à produire pour des applications industrielles, principalement à cause des coûts de production élevés. Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes et/ou d'optimiser les méthodes déjà existantes permettant la production de ces lipides à fort potentiel.

Dans ce contexte, nous avons abordé l'étude de l'acylation de composés de type «amino-alcool» par la lipase B de *Candida antarctica*, afin de pallier au manque de connaissances fondamentales sur les mécanismes enzymatiques mis en jeu, en particulier au niveau de la chimiosélectivité des réactions. Puis à partir des connaissances que nous avons acquises lors de notre étude fondamentale, nous avons développé et optimisé un procédé de synthèse enzymatique de composés de type « pseudo-céramide » (O,N-diacyl amino-diols).

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

La lipase de *Candida antarctica* type B (Novozym® SP 435) a été utilisée lors de ce travail afin de réaliser l'acylation en solvant organique et en liquide ionique. Cette lipase, immobilisée sur des billes de résine acrylique macroporeuse de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm, a été fournie par la société Novo Nordisk (Danemark).

I.2. Réactifs et solvants

Nous avons utilisé des acides gras comme agents acylants et des alcools, des amines, des amino-alcools, etc… comme nucléophiles. Nous avons également utilisé différents solvants pour les réactions enzymatiques et pour les analyses. Tous les solvants utilisés comme milieux réactionnels ont été séchés sur du tamis moléculaire (3Å ; diamètre de grain de 1,6 mm) provenant de Sigma-Aldrich Co. (USA). L'eau ultrapure utilisée lors des analyses a été obtenue au moyen d'un système Milli-Q provenant de Millipore (France). Le Tableau 8 répertorie les caractéristiques des différents réactifs et solvants commerciaux utilisés.

Tableau 8 : *Propriétés des réactifs et solvants utilisés lors de cette étude.*

Nom (Numéro dans l'étude)	N° CAS	Formule brute	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Pureté	Origine
Les agents acylants :					
acide myristique (**2**)	544-63-8	$C_{14}H_{28}O_2$	228,37	≥98%	Fluka
acide stéarique (**43**)	57-11-4	$C_{18}H_{36}O_2$	284,48	95%	Sigma-aldrich
acide laurique (**46**)	143-07-7	$C_{12}H_{24}O_2$	200,32	≥99%	Sigma-aldrich
acide oléique (**47**)	112-80-1	$C_{18}H_{34}O_2$	282,46	97%	Fluka
acide linoléique (**48**)	60-33-3	$C_{18}H_{32}O_2$	280,44	≥99%	Sigma-aldrich

Les composés monofonctionnels :					
(S)-(+)-butan-2-ol (**(S)-1**)	4221-99-2	$C_4H_{10}O$	74,12	99%	Sigma-Aldrich
(R)-(-)-butan-2-ol (**(R)-1**)	14898-79-4	$C_4H_{10}O$	74,12	99%	Sigma-Aldrich
(S)-(+)-*sec*-butylamine (**(S)-4**)	513-49-5	$C_4H_{11}N$	73,14	99%	Sigma-Aldrich
(R)-(-)-*sec*-butylamine (**(R)-4**)	13250-12-9	$C_4H_{11}N$	73,14	99%	Sigma-Aldrich
Les composés difonctionnels :					
(±)-DL-alaninol (**6**)	6168-72-5	C_3H_9NO	75,11	98%	Sigma-Aldrich
(±)-isopropanolamine (**10**)	78-96-6	C_3H_9NO	75,11	93%	Sigma-Aldrich
(±)-propane-1,2-diol (**11**)	57-55-6	$C_3H_8O_2$	76,10	≥ 99,5%	Fluka
(±)-1,2-diaminopropane (**12**)	78-90-0	$C_3H_{10}N_2$	74,13	≥ 98%	Fluka
(±)-1-méthoxy-2-propylamine (**13**)	37143-54-7	$C_4H_{11}NO$	89,14	95%	Sigma-Aldrich
(±)-4-aminopentan-1-ol (**21**)	927-55-9	$C_5H_{13}NO$	103,16	-	Santa Cruz Biotechnology
6-aminohexan-1-ol (**22**)	4048-33-3	$C_6H_{15}NO$	117,19	>97%	Fluka
Les composés trifonctionnels :					
sérinol (**29**)	534-03-2	$C_3H_9NO_2$	91,11	98%	Sigma-Aldrich
(±)-3-aminopropane-1,2-diol (**30**)	616-30-8	$C_3H_9NO_2$	91,11	97%	Sigma-Aldrich
Les solvants organiques :					
2-méthylbutan-2-ol	75-85-4	$C_5H_{12}O$	88,15	99%	Sigma-Aldrich
n-hexane	110-54-3	C_6H_{14}	86,18	99,5%	Carlo ERBA

méthanol	67-56-1	CH_3OH	32,042	99,9%	Carlo ERBA
acétonitrile	75-05-8	C_2H_3N	41,053	99,9%	Carlo ERBA
acide acétique	64-19-7	$C_2H_4O_2$	60,05	99,5%	Fluka
butan-1-ol	71-36-3	$C_4H_{10}O$	74,12	99,5%	Carlo ERBA
chloroforme	67-66-3	$CHCl_3$	119,38	99%	Carlo ERBA
Les liquides ioniques :					
1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim] [PF_6])	174501-64-5	$C_8H_{15}F_6N_2P$	284,18	≥97%	Sigma-Aldrich

Tous les liquides utilisés comme solvants ont été conservés soit sous argon avec du tamis moléculaire (solvants organiques), soit sous argon après passage au dessiccateur ([Bmim] [PF_6]). L'enzyme et les substrats ont également été conservés sous argon.

II. Méthodes analytiques

II.1. Méthodes générales d'analyse des milieux réactionnels par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (CLHP/SM-ESI)

Les analyses structurales et quantitatives des réactifs et produits des différentes réactions ont été conduites via un système CLHP/SM-ESI (« ElectroSpray Ionization ») provenant d'Agilent (1100 LC/MSD Trap mass spectrometer VL), associé à un détecteur par spectrophotométrie UV/Visible (Agilent 1100) et un détecteur par réfractométrie différentielle (Waters, modèle 410).

Nous avons utilisé deux colonnes en phase inverse :

- Colonne C18 Silice Uptisphere 300 5 ODB (UP5WOD-25QK) (250×4 mm, 5 µm ; Interchim, France) pour l'analyse des réactions d'acylation du butan-2-ol.
- Colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm ; Bischoff Chromatography, Allemagne) pour l'analyse des autres réactions.

Toutes les séparations ont été effectuées à température ambiante et les analyses ont été réalisées en utilisant une triple détection : réfractométrie, $UV_{210\ nm}$ et spectrométrie de masse (SM).

Les analyses SM basse résolution (LR pour « Low resolution ») ont été obtenues en mode de détection positif en utilisant l'azote comme gaz vecteur, avec un débit de 15 $l.min^{-1}$, une température de 350°C et une pression de nébulisation de 60 psi. L'intervalle d'analyse a été fixé à 30-1000 m/z. Le rapport m/z cible a été modulé selon le produit à caractériser.

II.2. Différents systèmes d'élution CLHP utilisés

Les systèmes d'élution et les conditions analytiques diffèrent en fonction de la polarité des produits analysés (car les produits de synthèse obtenus possèdent des polarités très différentes selon le type de molécule acylée et le degré d'acylation de ces molécules). Ainsi, les différents systèmes correspondent à :

- Système d'élution N°1 : acétonitrile/eau/acide acétique 90/10/0,1 (v/v/v), à 1 $ml.min^{-1}$ (acylation à partir de l'acide myristique **2** du butan-2-ol **1** et de la *sec*-butylamine **4**).
- Système d'élution N°2 : méthanol/eau/acide acétique 93/7/0,1 (v/v/v), à 1 $ml.min^{-1}$ (acylation à partir de l'acide myristique **2** du 1,2-diaminopropane **12**).
- Système d'élution N°3 : méthanol/eau/acide acétique 95/5/0,1 (v/v/v), à 1 $ml.min^{-1}$ (acylation à partir de l'acide myristique **2** de la 1-méthoxy-2-propylamine **13**).
- Système d'élution N°4 : différents gradients en fonction du temps, utilisant deux types de phases mobiles (acylation à partir de l'acide myristique **2** de : propane-1,2-diol **11** voir tableau 9 ; alaninol **6**, 4-aminopentan-1-ol **21**, 6-aminohexan-1-ol **22**, sérinol **29** et 3-aminopropane-1,2-diol **30** voir tableau 10 ; produits issus de la synthèse de pseudo-céramides voir tableau 11) :
    - Solvant A : acétonitrile/eau/acide acétique 77/23/0,1 (v/v/v)
    - Solvant B : méthanol/acide acétique 100/0,1 (v/v)

Nous avons utilisé les trois types de gradients suivant (tableaux 9, 10 et 11) :

Tableau 9 : *Gradient N°1 d'analyse CLHP (acylation du propane-1,2-diol **11** par l'acide myristique **2**).*

Temps en minutes	Solvant A (acétonitrile/eau/acide acétique 77/23/0,1 (v/v/v))	Solvant B (méthanol/acide acétique 100/0,1 (v/v))	Débit ($ml.min^{-1}$)
0	100	0	1
30	100	0	1
32	0	100	1
57	0	100	1
59	100	0	1
82	100	0	1

Tableau 10 : *Gradient N°2 d'analyse CLHP (acylation amino-alcools **6**, **21**, **22** et amino-diols **29**, **30** par l'acide myristique **2**).*

Temps en minutes	Solvant A (acétonitrile/eau/acide acétique 77/23/0,1 (v/v/v))	Solvant B (méthanol/acide acétique 100/0,1 (v/v))	Débit ($ml.min^{-1}$)
0	100	0	1
20	100	0	1
23	0	100	1
80	0	100	1
82	100	0	1
90	100	0	1

Tableau 11: *Gradient N°3 d'analyse CLHP (production de pseudo-céramides).*

Temps en minutes	Solvant A (acétonitrile/eau/acide acétique 77/23/0,1 (v/v/v))	Solvant B (méthanol/acide acétique 100/0,1 (v/v))	Débit ($ml.min^{-1}$)
0	100	0	1
90	100	0	1
93	0	100	1
143	0	100	1
147	100	0	1
153	100	0	1

II.3. Méthodes générales de quantification des produits par CLHP

Les acides gras (donneurs d'acyle) restant dans les différents milieux réactionnels ont été quantifiés par réfractométrie, par l'intermédiaire d'un étalonnage externe qui a été réalisé à partir de solutions pures de concentrations massiques connues en acide gras.

Les produits mono-acylés à partir des différents acides gras ont été quantifiés par réfractométrie et par spectroscopie $UV_{210\ nm}$. La quantification par réfractométrie a été effectuée par l'intermédiaire d'un étalonnage externe qui a été réalisé à partir de solutions pures de concentrations massiques connues en acide gras. Cette méthode a pu être utilisée car

les indices de réfraction obtenus pour les monoesters et monoamides dérivés d'un acide gras sont très proches de l'indice de réfraction de cet acide gras. Par exemple, nous observons des indices de réfraction de 1,451 pour l'acide myristique, 1,461 pour le N-myristyl 1-aminopropan-2-ol et 1,467 pour le O-myristyl 1,2,3-propanetriol d'après la base de données Chemspider (2011). En revanche, la quantification par spectroscopie $UV_{210\ nm}$ a été effectuée par l'intermédiaire d'un étalonnage externe qui a été réalisé à partir de solutions de concentrations molaires connues des produits mono-acylés.

Les produits di-acylés et tri-acylés ont été quantifiés uniquement par spectroscopie $UV_{210\ nm}$, par l'intermédiaire d'un étalonnage externe qui a été réalisé à partir de solutions de concentrations molaires connues de ces produits multi-acylés.

La méthode de quantification par double détection (réfractométrie et $UV_{210\ nm}$) a été validée après comparaison des résultats obtenus : les écart-types entre les 2 types de quantification n'ont jamais dépassé 5%.

II.4. Analyses par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les analyses par RMN du proton (^1H) ont été effectuées au moyen d'un spectromètre JOEL-JNM LA400 (400 MHz). Tous les échantillons ont été étudiés en solution dans du chloroforme deutéré ($CDCl_3$) en utilisant le tétraméthylsilane comme référence interne.

II.5. Analyses par Spectroscopie Infrarouge (IR)

Les spectres infrarouges ont été mesurés sur un appareil Perkin-Elmer Spectrum 100 ATR. Les produits qui pouvaient être sous forme solide ou liquide ont été directement déposés sur le cristal après avoir effectué un « blanc » de référence. Les nombres d'onde d'absorption (ν) sont donnés en cm^{-1}.

II.6. Calculs des activités thermodynamiques et dosage de l'eau

II.6.1. Calculs des activités thermodynamiques de molécules en solvant organique

L'activité thermodynamique des différentes molécules utilisées a été estimée au moyen de la méthode de contribution de groupes « UNIversal Functional Actvity Coefficient » (UNIFAC) (Hansen *et al.,* 1991). Lors de ce travail, la méthode UNIFAC a été mise en œuvre grâce à un programme en langage BASIC qui permet de donner la correspondance entre la fraction molaire (x_i) d'un composé et son coefficient d'activité thermodynamique (γ_i) à une température donnée. Le coefficient d'activité thermodynamique obtenu (γ_i) multiplié par la

fraction molaire correspondante (x_i) donne la valeur de l'activité thermodynamique (a_i) du composé dans le milieu selon l'équation 1.

Équation 1 : $a_i = \gamma_i * x_i$

En pratique, il a suffit d'entrer dans le programme la composition par groupe d'atomes de chaque composant du système, sa fraction molaire et la température de réaction, pour obtenir son coefficient d'activité thermodynamique (γ_i).

Exemple : Si dans 2 ml de 2-méthylbutan-2-ol à 55°C, nous avons 175 mM (26 mg) de butan-2-ol, l'activité thermodynamique du butan-2-ol dans ce solvant est de : $a_{butan\text{-}2\text{-}ol} = 0{,}0189$.

II.6.2. Mesure de la teneur en eau

Le dosage de la teneur en eau a été effectué selon la méthode de Karl Fischer grâce à un appareil Metrohm 831 KF coulometer. Nous avons utilisé une solution d'HYDRANAL Coulomat E, comme titrant et solvant, à 25°C. 100µl d'échantillon ont été introduits dans la cellule de mesure (les échantillons solides ont été solubilisés dans un solvant dont la teneur en eau a été préalablement dosée). Les résultats obtenus représentent la moyenne de 3 répétitions.

La teneur en eau des différents solvants, de l'enzyme et de plusieurs substrats a été déterminée :

Les solvants :

- le 2-méthylbutan-2-ol : 26 mM d'eau (0,05% m/m)
- le *n*-hexane : 0,67 mM d'eau (0,002% m/m)
- le [Bmim][PF_6] : 17 mM d'eau (0,02% m/m)

Les substrats :

- l'acide myristique **2** : ≈ 0% m/m
- l'alaninol **6** : 0,7% m/m
- le 4-aminopentan-1-ol **21** : 2,8% m/m
- le 6-aminohexan-1-ol **22** : 4,1% m/m

La lipase B de *Candida antarctica* (Novozym® SP 435) : 1,9% m/m.

La teneur en eau étant négligeable au sein des trois solvants utilisés, nous avons donc travaillé en milieu quasi-anhydre, ce type de milieu étant idéal pour favoriser les réactions d'hydrolyse inverse et déplacer l'équilibre thermodynamique des réactions en faveur de la synthèse.

Exemple : Si dans 2 ml de 2-méthylbutan-2-ol, nous avons 175 mM (26,3 mg) d'alaninol, 175 mM (40 mg) d'acide myristique et 5 g/l (10 mg) de lipase, la quantité d'eau présente dans le milieu en début de réaction est de 0,55% m/m, ce qui est négligeable et correspond à une a_w *de 0,12.*

III. Synthèses enzymatiques

III.1. Méthodes générales de synthèse pour les études cinétiques

Les synthèses enzymatiques ont été effectuées dans des tubes en verre de 16 ml bouchés hermétiquement par des bouchons en téflon et placés sous agitation magnétique (1000 rpm en solvants organiques et 350 rpm en liquide ionique) dans un réacteur Radleys (Figure 30) réglé à une température de 55°C.

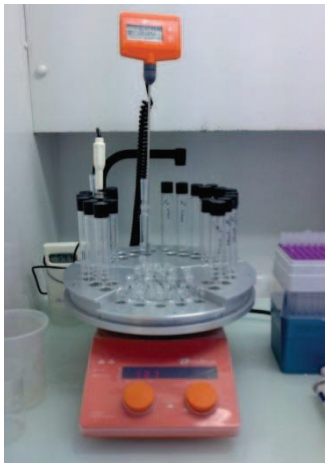


Figure 30 : *Réacteur Radleys avec système starfish utilisé pour les réactions de synthèse enzymatique.*

Chaque cinétique a été réalisée en utilisant 25 à 350 mM d'un acide gras (acide myristique **2**) et 25 à 350 mM d'un accepteur de groupement acyle (un nucléophile : alcool, amine, méthoxy-amine, amino-alcool ou amino-diol) en présence de 5 à 50 g/l de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym® SP 435), dans 2 ml de différents solvants (2-méthylbutan-2-ol, *n*-hexane ou [Bmim][PF_6]). Pour toutes les réactions, un témoin négatif a été réalisé en absence d'enzyme et chaque réaction enzymatique est effectuée en duplicata (ou bien en triplicata, si cela s'avère nécessaire).

Exemple : dans 2 ml de 2-méthylbutan-2-ol, nous ajoutons 175 mM (26,3 mg) d'alaninol, 175 mM (40 mg) d'acide myristique et 5 g/l (10 mg) de lipase, puis la réaction est portée à 55°C durant 96 heures.

III.2. Méthodologies propres aux différents solvants utilisés

III.2.1. Synthèses réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol

La procédure générale décrite ci-dessus a été suivie avec quelques précisions : utilisation de 5 à 50 g/l de lipase, de 25 à 350 mM d'acide myristique **2** et de 25 à 350 mM d'un accepteur de groupement acyle. Le suivi des réactions a été effectué par des prélèvements directs au cours du temps.

III.2.2. Synthèses réalisées dans le *n*-hexane

Comme pour le 2-méthylbutan-2-ol, la procédure générale décrite ci-dessus a été suivie avec quelques précisions : utilisation de 5 g/l de lipase, de 175 mM d'acide myristique **2** et de 25 à 350 mM d'un accepteur de groupement acyle. Le suivi des réactions a été effectué par la mise en œuvre de réactions parallèles stoppées à différents temps réactionnels.

III.2.3. Synthèses réalisées dans le [Bmim] [PF_6]

Comme précédemment, la procédure générale décrite ci-dessus a été suivie avec quelques précisions : utilisation de 5 g/l de lipase, de 175 mM d'acide myristique **2** et de 25 à 350 mM d'un accepteur de groupement acyle. Le suivi des réactions a été effectué par la mise en œuvre de réactions parallèles stoppées à différents temps réactionnels.

III.3. Méthodes de synthèse de pseudo-céramides en réacteur à « lit fixe »

La procédure générale de synthèse utilisée en réacteur à « lit fixe », a été la suivante (figure 31) : dans un premier temps les substrats (donneur et accepteur d'acyle) ont été introduits dans un flacon en verre avant ajout du solvant (mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane). Puis le récipient contenant le milieu réactionnel a été placé sous agitation magnétique à 55°C pendant 10 minutes afin de solubiliser les substrats. Le milieu réactionnel a ensuite été pompé grâce à un système de pompe péristaltique (pompe Gilson modèle minipuls evolution, USA) à travers une colonne (appelée également « lit fixe ») contenant la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée. L'ensemble du système a été placé dans une enceinte thermostatée maintenue à une température de 55°C. En sortie de colonne, le milieu

réactionnel contenant les produits de la réaction et éventuellement les substrats n'ayant pas réagi a été récupéré dans un second flacon.

Nous avons utilisé lors de notre étude trois types de colonnes (« lits fixes ») différents:

- Colonne N°1 : Ø de 0,5 cm et longueur de 9,5 cm,
- Colonne N°2 : Ø de 1 cm et longueur variable selon la quantité d'enzyme,
- Colonne N°3 : Ø de 0,5 cm et longueur de 14,5 cm.

Le type de colonne utilisé sera précisé au cas par cas dans le texte.

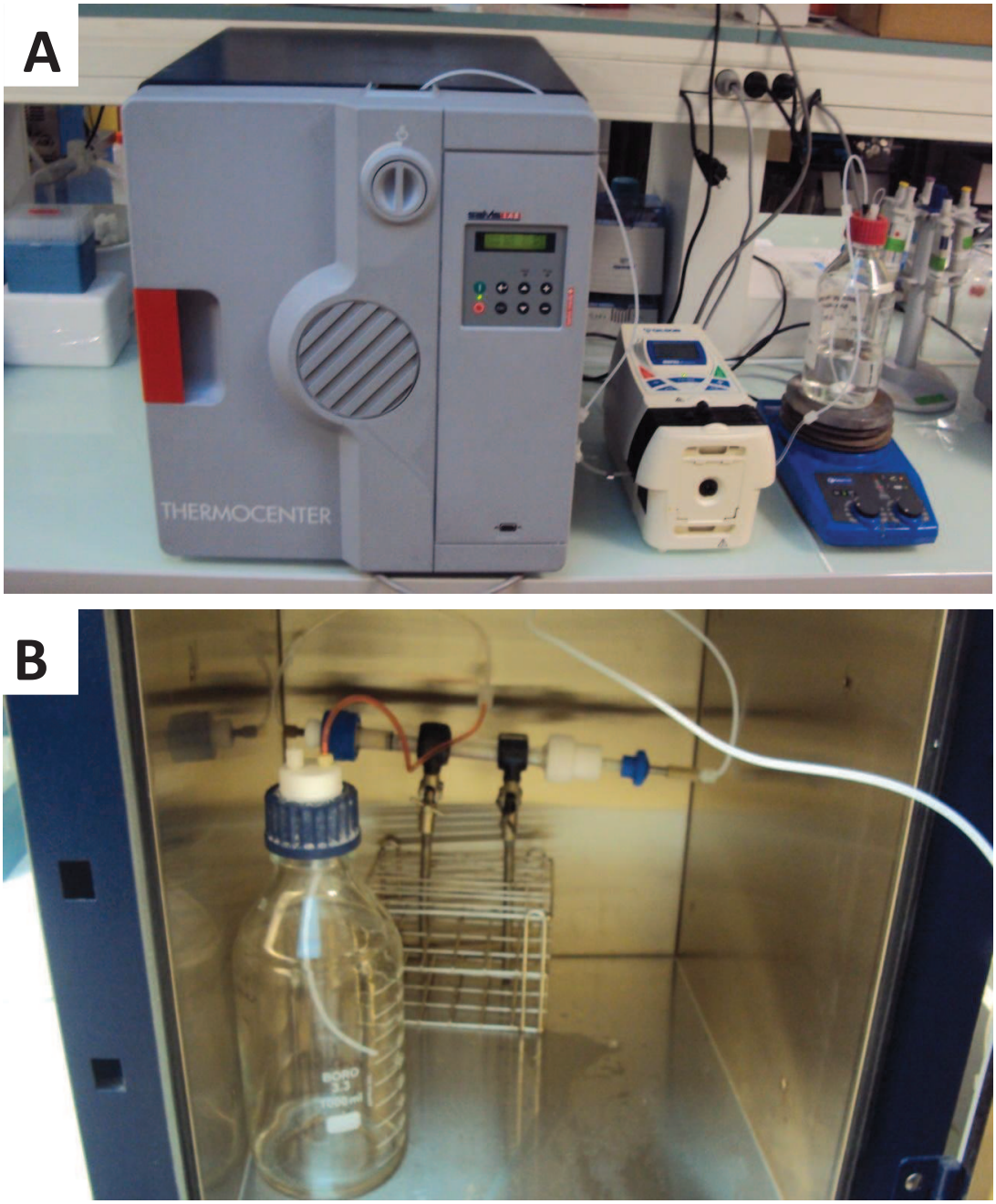


Figure 31 : *Réacteur à lit fixe utilisé pour la production enzymatique des pseudo-céramides. A (de droite à gauche) : le réservoir à substrats, la pompe péristaltique et l'enceinte thermostatée. B (de droite à gauche) : intérieur de l'enceinte thermostatée avec la colonne contenant l'enzyme et le récipient de récupération des produits.*

La synthèse de molécules de type pseudo-céramide en réacteur à « lit fixe » a été réalisée à partir de différents donneurs de groupements acyles (acide laurique **46**, acide myristique **2**, acide stéarique **43**, acide oléique **47** ou acide linoléique **48**) et d'un amino-diol comme accepteur de groupement acyle. Le procédé de production de pseudo-céramides a été divisé en deux étapes décrites ci-dessous en utilisant dans les deux cas la lipase B de *Candida antarctica* comme catalyseur de réactions d'acylation placé dans le réacteur à lit fixe :

- Étape N°1 (synthèse de N-acyl amino-diols = amides) : N-acylation d'un amino-diol par un acide gras A. Cette étape a été réalisée selon la méthode générale décrite précédemment, en mode continu (c'est-à-dire que tout le milieu réactionnel est passé une fois à travers la colonne contenant l'enzyme) comme décrit figure 32. Les produits de réaction ont été récupérés après le passage du milieu réactionnel dans le réacteur. Après récupération des produits de cette étape, nous avons évaporé le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40-55°C sous pression réduite (40-100 mbar) et nous avons obtenu les produits de réactions sous forme de poudre. Si le rendement de synthèse du N-acyl amino-diol, obtenu lors de cette étape, est suffisamment élevé (≥ 80%), la poudre récupérée est directement utilisée comme substrat pour l'étape N°2, en tenant compte de la proportion de N-acyl amino-diol dans la poudre pour définir sa concentration. Par contre, si le rendement de synthèse est faible, une étape de purification par HPLC-préparative est nécessaire (IV) avant l'étape N°2.

- Étape N°2 (synthèse de O,N-diacyl amino-diols = pseudo-céramides) : O-acylation d'un N-acyl amino-diol (produit lors de l'étape N°1) par un acide gras B. Cette étape a été réalisée selon la méthode générale décrite précédemment : un premier cycle a été effectué en mode continu puis, si le rendement de synthèse obtenu n'était pas suffisant, nous avons également effectué plusieurs autres cycles de production sans changer de milieu réactionnel en utilisant le réacteur à lit fixe en circuit fermé (recirculation) pendant un temps donné comme décrit figure 32. Les produits de réaction ont été récupérés en fin de cycle. Après récupération des produits de cette étape, nous avons évaporé le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40-55°C sous pression réduite (40-100 mbar) et nous avons obtenu les produits de réaction sous forme de poudre.

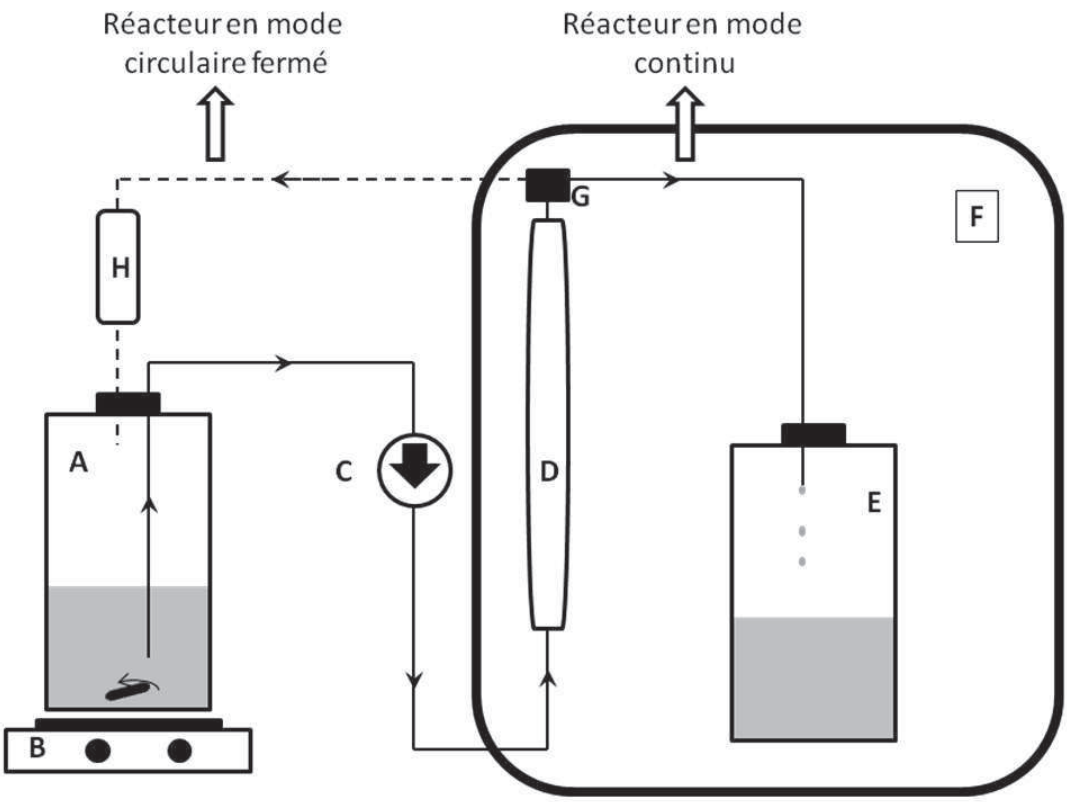


Figure 32 : *Schéma représentant le réacteur à lit fixe utilisé en continu ou en circuit fermé.* ***A*** *: réservoir à substrats ;* ***B*** *: plaque d'agitation chauffante (55°C) ;* ***C :*** *pompe péristaltique ;* ***D*** *: réacteur à lit fixe (colonne) contenant l'enzyme immobilisée ;* ***E*** *: Réservoir contenant les produits de réaction ;* ***F*** *: enceinte thermostatée à 55°C ;* ***G*** *: « switch » permettant d'utiliser le réacteur en mode continu ou en circuit fermé ;* ***H*** *: colonne contenant potentiellement du tamis moléculaire.*

III.4. Méthodes de prélèvements

Les méthodes diffèrent selon le milieu dans lequel s'est déroulée la réaction :

Pour les réactions réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol, des prélèvements de 100 µl ont été effectués à des intervalles de temps déterminés. Après centrifugation à 18000 g pendant une minute (afin de séparer l'enzyme immobilisée et le milieu réactionnel), les surnageants sans enzyme ont ensuite été récupérés puis analysés en CLHP/SM.

Pour les réactions réalisées dans le *n*-hexane ou dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane, du fait d'une faible solubilité de certains substrats et produits dans le *n*-hexane, le milieu réactionnel a été homogénéisé par l'ajout de 3 volumes d'un mélange chloroforme/méthanol 50/50 (v/v). Après homogénéisation, 1 ml du milieu a été récupéré et centrifugé à 18000 g pendant une minute. Puis 500 µl de surnageant ont été récupérés et le solvant a été évaporé. Une fois sec, l'échantillon a été repris par 200 µl de solvant CLHP puis a été analysé en CLHP/SM.

Pour les réactions réalisées dans le [Bmim][PF_6], il a fallu mettre en œuvre une méthode d'extraction pour la récupération des produits, des substrats et l'analyse des milieux réactionnels par CLHP. Une extraction par 3 volumes de butan-1-ol (non-miscible avec le [Bmim][PF_6]) a été réalisée pendant 2 minutes sous agitation : 1 ml de la phase solvant organique a été récupéré et centrifugé à 18000 g pendant une minute. Puis 500 µl de surnageant ont été récupérés et le solvant a été évaporé. Une fois sec, l'échantillon a été repris par 200 µl de solvant CLHP puis a été analysé en CLHP/SM.

Afin de quantifier correctement les composés présents dans le [Bmim][PF_6], les rendements d'extractions des substrats et produits, dans des milieux biphasiques [Bmim][PF_6]/butan-1-ol ont été déterminés. Un mélange de substrats et de produits en quantités connues a ainsi été solubilisé dans le [Bmim][PF_6], puis une extraction par le butan-1-ol a été réalisée. Nous avons comparé les résultats obtenus après extraction avec les quantités de produits dans l'échantillon original afin d'obtenir les coefficients de partition qui sont décrits dans le tableau 12. Ces coefficients ont été utilisés pour corriger les valeurs des concentrations obtenues après extraction à partir d'un milieu réactionnel.

Tableau 12 : *Coefficients de partition de l'acide myristique **2** et des produits d'acylation au sein de la phase butan-1-ol d'un système biphasique [Bmim][PF_6]/butan-1-ol.*

Nom de la molécule	Coefficients de partition dans le butan-1-ol
Acide myristique (**2**)	0,84
O-myristyl 2-aminopropan-1-ol (**7**)	0,88
N-myristyl 2-aminopropan-1-ol (**8**)	0,84
O,N-dimyristyl 2-aminopropan-1-ol (**9**)	0,99
O-myristyl 4-aminopentan-1-ol (**23**)	0,90
N-myristyl 4-aminopentan-1-ol (**24**)	0,82
O,N-dimyristyl 4-aminopentan-1-ol (**25**)	0,99
O-myristyl 6-aminohexan-1-ol (**26**)	0,87
N-myristyl 6-aminohexan-1-ol (**27**)	0,83
O,N-dimyristyl 6-aminohexan-1-ol (**28**)	0,99
2-N-myristyl 2-aminopropane-1,3-diol (**32**)	0,84
1-O,2-N-dimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol (**34**)	0,99
O,N,O-trimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol (**35**)	0,98
3-N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol (**38**)	0,99
1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol (**40**)	0,92
O,O,N-trimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol (**42**)	0,97

IV. Méthodes de purification des produits de synthèse par CLHP/SM-préparative

Les synthèses enzymatiques des différentes molécules ont été effectuées à une échelle préparative dans un réacteur Radleys avec carousel 12 possédant des tubes de 50 ml. Les réactions ont été réalisées de la même manière que pour les études cinétiques (III.1) dans 15 ml de 2-méthylbutan-2-ol avec des concentrations fixes de l'acide gras (175 mM), de l'accepteur d'acyle (50 mM) et de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisé (20 g/l). Nous nous sommes placés en excès d'acide afin de favoriser la production des différents types de produits (mono-, di-, ou triacylés). Les réactions ont été stoppées à des temps donnés selon le type de molécule que nous souhaitions produire (par exemple t= 3h pour des produits cinétiques ou t= 48h pour des produits thermodynamiques d'une réaction donnée). Une fois la réaction stoppée, le milieu réactionnel a été placé dans des tubes coniques de 50 ml et a été centrifugé 5 minutes à 3750 g. Le surnageant sans enzyme a ensuite été récupéré et une partie du solvant a été évaporée à l'évaporateur rotatif afin de concentrer l'échantillon avant l'étape de purification.

Les séparations et purifications des produits des différentes réactions ont été conduites via un système CLHP préparatif provenant d'Agilent (1200 series) associé à un triple détecteur (réfractométrie, $UV_{210\ nm}$ et spectrométrie de masse SM-Quadripole), ainsi qu'à un collecteur automatique de fractions. Nous avons utilisé pour la séparation une colonne préparative en phase inverse : colonne C18 ProntoPrep (250×20 mm, 10 µm ; Bischoff Chromatography, Allemagne) équipée d'une colonne de garde PREP2005 (50×20 mm, 10 µm ; Bischoff Chromatography, Allemagne) et mise en œuvre à température ambiante.

Pour séparer les produits de synthèse obtenus lors des différentes réactions d'acylation, nous avons utilisé comme phase mobile (débit à 5 $ml.min^{-1}$) un système d'élution avec différents gradients en fonction du temps, utilisant deux types de solvant:

- Solvant A : acétonitrile/eau/acide acétique 77/23/0,1 (v/v/v)
- Solvant B : méthanol/acide acétique 100/0,1 (v/v)

Le gradient utilisé dépendait du type de molécule à purifier, comme précédemment pour le suivi des différentes réactions sur colonne analytique (II.2.).

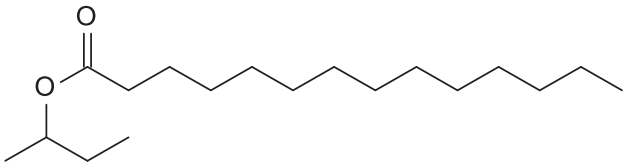
Les différentes fractions collectées par le collecteur automatique ont ensuite été réunies par type de molécules et le solvant de CLHP a été évaporé à l'évaporateur rotatif à 50°C, sous

pression réduite à 50 mbar. Les produits ont été récupérés et pesés avant d'être analysés et caractérisés par SM, IR et RMN.

V. Caractérisation SM, IR et RMN des produits synthétisés

Les caractéristiques SM, IR et RMN données dans ce chapitre concerne les produits de synthèse qui ont été purifiés :

V.1. O-myristyl butan-2-ol (3)

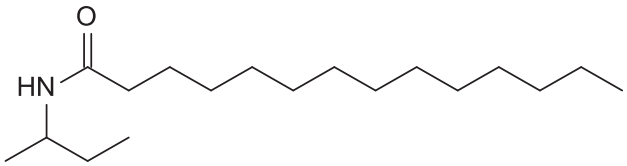


Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{18}H_{36}O_2$:

M + Na^+, obtenu : 307,4, calculé pour : 307,48.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,89 (m, 6H, 2x -CH_3 de -CH_2-CH_3), 1,19 (d, 3H, *J*= 5,5Hz, -CH_3 de –CH-CH_3), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,53 (m, 2H, -CH_2 de –CH-CH_2-CH_3), 1,6 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 2,27 (t, 2H, *J*= 6,9Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 4,85 (st, 1H, *J*= 6,5Hz, -CH-).

V.2. N-myristyl *sec*-butylamine (5)



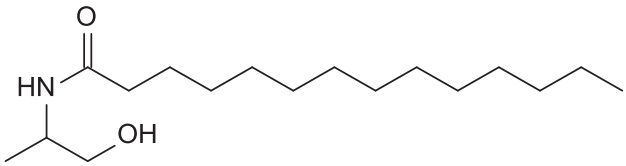
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{18}H_{37}NO$:

M + H^+, obtenu : 284,2, calculé pour : 284,50.

M + Na^+, obtenu : 306,2, calculé pour : 306,50.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,89 (m, 6H, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,1 (d, 3H, *J*= 7Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,43 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-CH_3), 1,6 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,12 (st, 2H, *J*= 7Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,9 (st, 1H, *J*= 6,8Hz, -CH-), 5,17 (s, 1H, -NH-).

V.3. N-myristyl 2-aminopropan-1-ol (8)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{35}NO_2$:

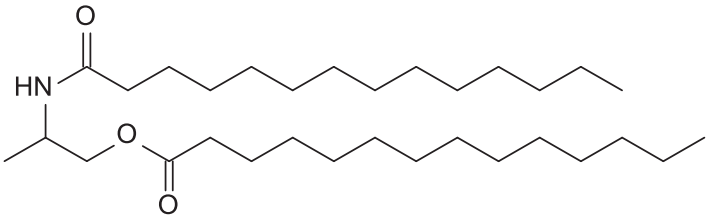
M + H$^+$, obtenu : 286,4, calculé pour : 286,47.

M + Na$^+$, obtenu : 308,4, calculé pour : 308,47.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3100-3500 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de chaine myristyle), 1638 (C=O, amide), 1543 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,06Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,17 (d, 3H, *J*= 6,06Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,19 (t, 2H, *J*= 6,06Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,04 (s, 1H, -OH), 3,27 (dd, 1H, *J*= 5Hz, *J*= 10Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,46 (dd, 1H, *J*= 3,7Hz, *J*= 11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 4,07 (m, 1H, -CH-), 5,7 (s, 1H, -NH-).

V.4. O,N-dimyristyl 2-aminopropan-1-ol (9)



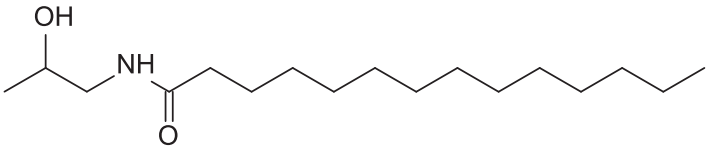
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{31}H_{62}NO_3$:

M + Na$^+$, obtenu : 518,6, calculé pour : 518,83.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3301 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1737 (C=O, ester), 1643 (C=O, amide), 1542 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 7,6Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,16 (d, 3H, *J*= 7,6Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 40H, -CH_2- des chaines myristyles), 1,6 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 2,14 (t, 2H, *J*= 7,2Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,32 (t, 2H, *J*= 7,2Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 4 (dd, 1H, *J*= 4,4Hz, *J*= 10,7Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4,13 (dd, 1H, *J*= 4,9Hz, *J*= 10Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4,29 (m, 1H, -CH-), 5,54 (d, 1H, *J*= 7,3Hz, C-$\underline{NH}$-CH_2-).

V.5. N-myristyl 1-aminopropan-2-ol (14)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{35}NO_2$:

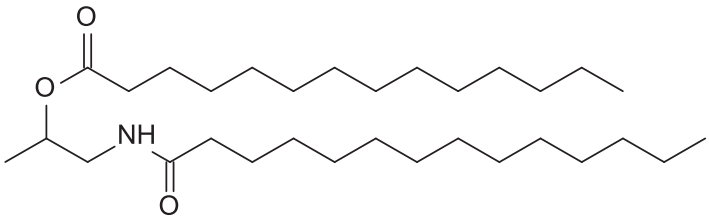
M + H$^+$, obtenu : 286,4, calculé pour : 286,47.

M + Na$^+$, obtenu : 308,4, calculé pour : 308,47.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3100-3500 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de chaine myristyle), 1619 (C=O, amide), 1571 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,55Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,19 (d, 3H, *J*= 5,61Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,64 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,21 (t, 2H, *J*= 7,49Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,72 (d, 1H, , *J*= 3,74Hz, -OH), 3,13 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,44 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,92 (m, 1H, -CH-), 5,95 (s, 1H, -NH-).

V.6. O,N-dimyristyl 1-aminopropan-2-ol (15)



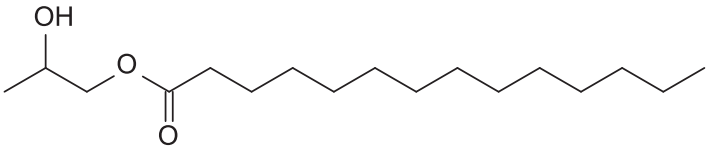
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{31}H_{62}NO_3$:

M + Na$^+$, obtenu : 518,6, calculé pour : 518,83.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3291 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1725 (C=O, ester), 1641 (C=O, amide), 1557 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 6,55Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,22 (d, 3H, *J*= 6,39Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 40H, -CH_2- des chaines myristyles), 1,61 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 2,16 (t, 2H, *J*= 6,62Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,30 (t, 2H, *J*= 6,62Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,37 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,45 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 4,99 (m, 1H, -CH-), 5,69 (s, 1H, C-$\underline{NH}$-CH_2-).

V.7. 1-O-myristyl propane-1,2-diol (16)



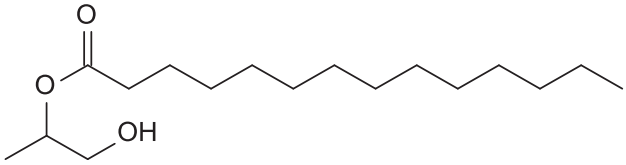
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{34}O_3$:

M + H$^+$, obtenu : 287,2, calculé pour : 287,46.

M + Na$^+$, obtenu : 309,2, calculé pour : 309,46.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,65Hz,-CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,22 (d, 3H, *J*= 3,3Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,24 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 2,2 (s, 1H, -OH-), 2,35 (t, 2H, *J*= 7,3Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 3,93 (dd, 1H, *J*= 6,3Hz, *J*= 11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4 (m, 1H, -CH-),), 4,11 (dd, 1H, *J*= 3,1Hz, *J*= 11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-).

V.8. 2-O-myristyl propane-1,2-diol (17)



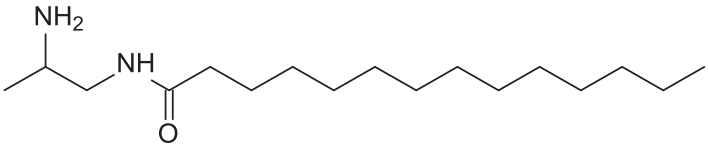
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{34}O_3$:

M + H$^+$, obtenu : 287,2, calculé pour : 287,46.

M + Na$^+$, obtenu : 309,2, calculé pour : 309,46.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,65Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,22 (d, 3H, *J*= 3,3Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,24 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 1,93 (s, 1H, -OH), 2,32 (t, 2H, *J*= 7,3Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 3,65 (dd, 1H, *J*= 6,3Hz, *J*= 11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 3,68 (dd, 1H, *J*= 3,1Hz, *J*= 11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4,99 (m, 1H, -CH-).

V.9. 1-N-myristyl 1,2-diaminopropane (18)



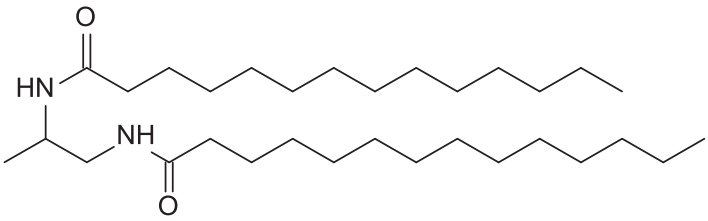
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{36}N_2O$:

M + H$^+$, obtenu : 285,4, calculé pour : 285,48.

M + Na$^+$, obtenu : 307,4, calculé pour : 307,48.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,67Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,22 (d, 3H, *J*= 6,67Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,61 (q, 2H, *J*= 6,67Hz, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 1,96 (s, 2H, -NH_2), 2,19 (t, 2H, *J*= 7,3Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,21(st, 1H, *J*= 5,9Hz, -CH-), 3,27 (qd, 1H, *J*= 2,6Hz, *J*= 11,8Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,46 (qd, 1H, *J*= 3,24Hz, *J*= 13,6Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 7,22 (t, 1H, *J*= 4,42Hz, -NH-).

V.10. N,N-dimyristyl 1,2-diaminopropane (19)

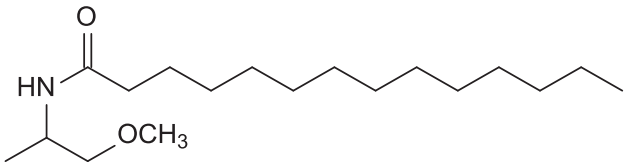


Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{31}H_{63}N_2O_2$:

M + Na$^+$, obtenu : 517,1, calculé pour : 517,84.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 6,36Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,16 (d, 3H, *J*= 6,36Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 40H, -CH_2- des chaines myristyles), 1,6 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- des chaines myristyles), 2,14 (st, 4H, *J*= 7,97Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- des chaines myristyles), 3,18 (td, 1H, *J*= 3,2Hz, *J*= 13Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,38 (qd, 1H, *J*= 2,4Hz, *J*= 11,1Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 4,08 (m, 1H, -CH-), 6 (d, 1H, *J*= 6,15Hz, C-$\underline{NH}$-CH_2-), 6,2 (s, 1H, C-$\underline{NH}$-CH-).

V.11. N-myristyl 1-méthoxy-2-propylamine (20)



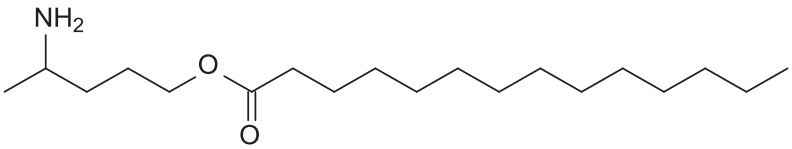
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{18}H_{37}NO_2$:

M + H$^+$, obtenu : 300,3, calculé pour : 300,50.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3304 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1634 (C=O, amide), 1544 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,79Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,17 (d, 3H, *J*= 6,17Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,26 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,62 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,15 (t, 2H, *J*= 6,8Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,19 (t, 1H, *J*= 6,8Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OCH_3), 3,36 (m, 3H, -O$\underline{CH_3}$), 4,06 (t, 1H, *J*= 6,45Hz, –CH-$\underline{CH_2}$- OCH_3), 4,16 (m, 1H, -CH-), 5,62 (d, 1H, *J*= 5,84Hz, -NH-).

V.12. O-myristyl 4-aminopentan-1-ol (23)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{19}H_{39}NO_2$:

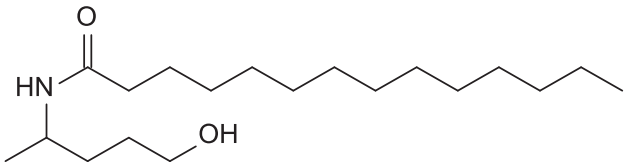
M + H$^+$, obtenu : 314,2, calculé pour : 314,52.

M + Na$^+$, obtenu : 336,4, calculé pour : 336,52.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3291 (N-H, amine), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1736 (C=O, ester), 1557 (N-H, amine).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,99Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,14 (d, 3H, *J*= 8Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,52 (m, 4H, –CH-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-O-), 1,62 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 2,22 (t, 1H, *J*= 7,16Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,29 (t, 1H, *J*= 7,5Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 3,43 (m, 1H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-O-), 3,69 (m, 1H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-O-), 4,1 (m, 1H, -CH-).

V.13. N-myristyl 4-aminopentan-1-ol (24)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{19}H_{39}NO_2$:

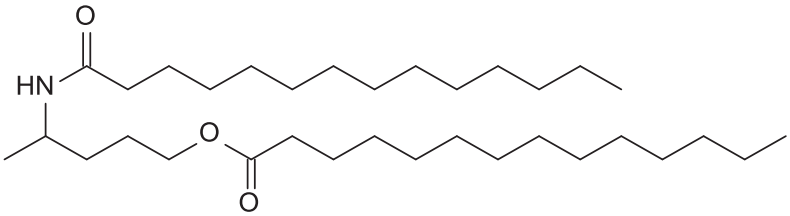
M + H$^+$, obtenu : 314,2, calculé pour : 314,52.

M + Na$^+$, obtenu : 336,4, calculé pour : 336,52.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3200-3500 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1639 (C=O, amide), 1545 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,58Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,14 (d, 3H, *J*= 6,23Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,53 (m, 4H, –CH-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-OH), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,14 (t, 2H, *J*= 7,27Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,94 (s, 1H, -OH), 3,67 (m, 2H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-OH), 4,06 (m, 1H, -CH-), 5,28 (s, 1H, -NH-).

V.14. O,N-dimyristyl 4-aminopentan-1-ol (25)



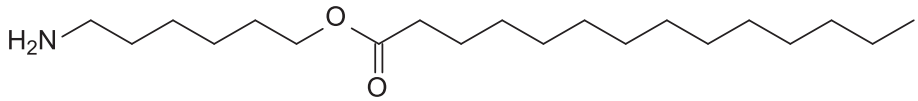
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{33}H_{66}NO_3$:

M + Na$^+$, obtenu : 546,2, calculé pour : 546,88.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3304 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1732 (C=O, ester), 1640 (C=O, amide), 1546 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 7,43Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,14 (d, 3H, *J*= 6,83Hz, –CH-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 40H, -CH_2- des chaines myristyles), 1,53 (m, 4H, –CH-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-O-C), 1,6 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 2,14 (t, 4H, *J*= 7,08Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO- des chaines myristyles), 3,68 (m, 2H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-O-C), 4,07 (m, 1H, -CH-), 5,27 (d, 1H, *J*= 6,86Hz, -NH-).

V.15. O-myristyl 6-aminohexan-1-ol (26)



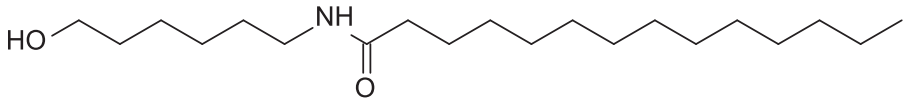
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{20}H_{41}NO_2$:

M + H$^+$, obtenu : 328,4, calculé pour : 328,55.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3400 (N-H, amine), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1736 (C=O, ester), 1544 (N-H, amine).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 7,28Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,55 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 1,62 (m, 4H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-NH_2), 2,28 (t, 2H, *J*= 7,65Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,81 (s, 2H, -NH_2), 3,64 (t, 2H, *J*= 6,47Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-NH_2), 4,04 (t, 2H, *J*= 6,47Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CO-CH_2).

V.16. N-myristyl 6-aminohexan-1-ol (27)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{20}H_{41}NO_2$:

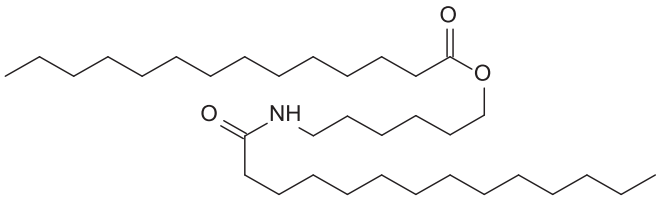
M + H$^+$, obtenu : 329,5, calculé pour : 328,55.

M + Na$^+$, obtenu :350,2, calculé pour : 350,55.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3385 (O-H, alcool), 3314 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1634 (C=O, amide), 1534 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 7,5Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,51 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-O- de la chaine myristyle), 1,59 (m, 4H, –CH_2-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-OH), 2,26 (t, 2H, *J*= 7,65Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-OH de la chaine myristyle), 2,72 (s, 1H, -OH), 3,25 (t, 2H, *J*= 7,07Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-OH), 3,63 (t, 2H, *J*= 7,29Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-NH-CO-CH_2), 5,41 (s, 1H, -NH-).

V.17. O,N-dimyristyl 6-aminohexan-1-ol (28)



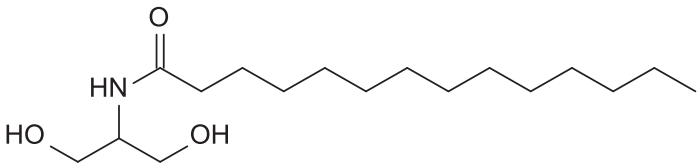
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{34}H_{67}NO_3$:

M + Na^+, obtenu : 560,7, calculé pour : 560,91.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3298 (N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1726 (C=O, ester), 1635 (C=O, amide), 1547 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 6,48Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 40H, -CH_2- des chaine myristyle), 1,5 (m, 4H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 1,6 (m, 4H, –CH-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-CH_2-O-C), 2,15 (t, 2H, *J*= 7,8Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH-), 2,29 (t, 2H, *J*= 7,8Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH-), 3,24 (q, 2H, *J*= 6,5Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-NH-), 4,06 (t, 2H, *J*= 5,9Hz, –CH_2-$\underline{CH_2}$-O-CO-CH_2), 5,4 (s, 1H, -NH-).

V.18. 2-N-myristyl 2-aminopropane-1,3-diol (32)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{35}NO_3$:

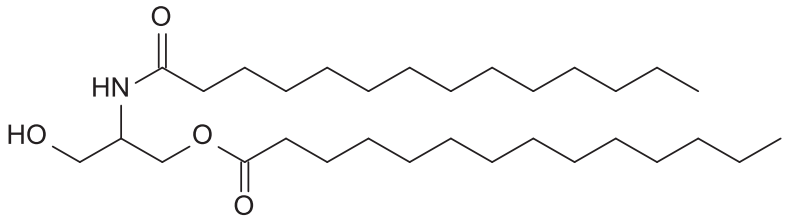
M + H^+, obtenu : 302,1, calculé pour : 302,48.

M + Na^+, obtenu : 324,2, calculé pour : 324,47.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3296 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1638 (C=O, amide), 1544 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,54Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,22 (t, 2H, *J*= 7,23Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,76 (dd, 2H, *J*= 4,68Hz, *J*= 10,92Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,83 (dd, 2H, *J*= 4,68Hz, *J*= 10,92Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,76 (m, 1H, -CH-), 6,36 (d, 1H, *J*= 6,77Hz, -NH-).

V.19. 1-O,2-N-dimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol (34)

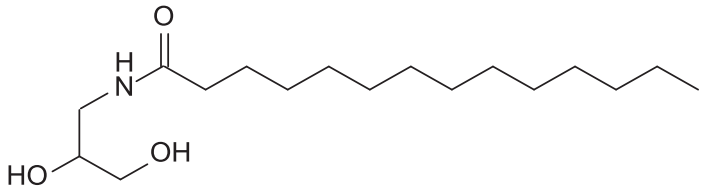


Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{31}H_{62}NO_4$:

M + Na$^+$, obtenu : 534,3, calculé pour : 534,83.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 5H, *J*= 6,53Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 0,93 (t, 1H, *J*= 6,53Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,26 (m, 40H, -CH_2- des chaines myristyles), 1,61 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 2,19 (t, 2H, *J*= 7,36Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-COO- de la chaine myristyle), 2,34 (t, 2H, *J*= 7,36HZ, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,77 (s, 1H, -OH), 3,62 (dd, 1H, *J*= 3,33Hz, *J*= 11,11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,68 (dd, 1H, *J*= 3,33Hz, *J*= 11,11Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 4,07 (m, 1H, -CH-), 4,22 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 5,96 (d, 1H, *J*= 7,3Hz, -NH-).

V.20. 3-N-myristyl 3- aminopropane-1,2-diol (38)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{17}H_{35}NO_3$:

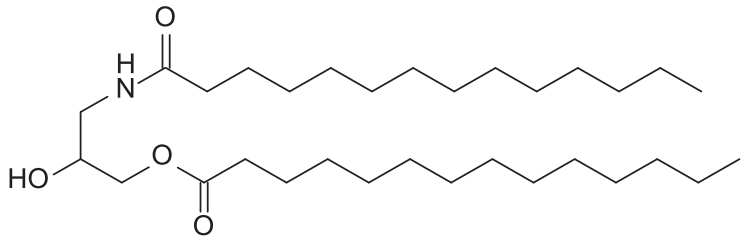
M + H$^+$, obtenu : 302,1, calculé pour : 302,47.

M + Na$^+$, obtenu : 324,1, calculé pour : 324,47.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3298 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1634 (C=O, amide), 1546 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,55Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 20H, -CH_2- de la chaine myristyle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine myristyle), 2,21 (t, 2H, *J*= 8Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,42 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,56 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,76 (m, 1H, -CH-), 5,88 (s, 1H, -NH-).

V.21. 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol (40)



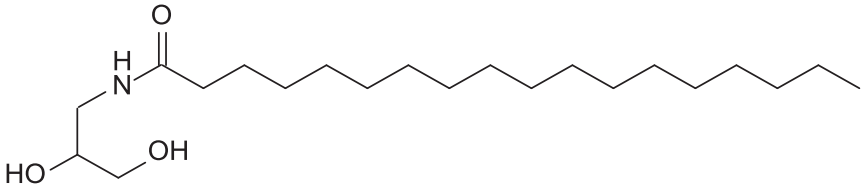
Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{31}H_{62}NO_4$:

M + Na^+, obtenu : 534,3, calculé pour : 534,83.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3661(O-H, alcool), 3200-3400 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine myristyle), 1720 (C=O, ester), 1650 (C=O, amide), 1546 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 6,35Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,26 (m, 40H, -CH_2- des deux chaines myristyles), 1,62 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- des chaines myristyles), 2,19 (t, 2H, *J*= 7,36Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,34 (t, 2H, *J*= 7,36HZ, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine myristyle), 3,62 (dd, 1H, *J*= 3,52Hz, *J*= 7,35Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,68 (dd, 1H, *J*= 3,52Hz, *J*= 7,35Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 4,06 (m, 1H, -CH-), 4,18 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4,22 (m, 1H, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 5,96 (d, 1H, *J*= 7,3Hz, -NH-).

V.22. 3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol (44)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{21}H_{43}NO_3$:

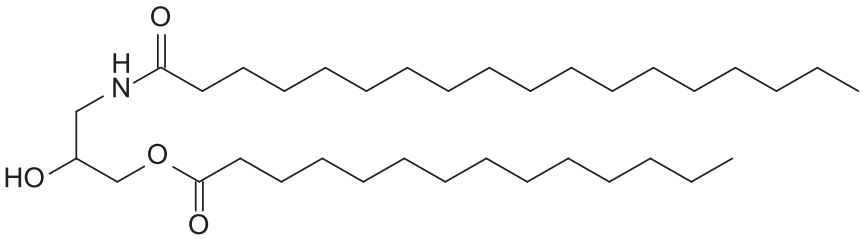
M + H^+, obtenu : 358,2, calculé pour : 358,58.

M + Na^+, obtenu : 380,2, calculé pour : 380,58.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3312 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de la chaine stéaryle), 1633 (C=O, amide), 1544 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 3H, *J*= 6,03Hz, -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 28H, -CH_2- de la chaine stéaryle), 1,63 (m, 2H, -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO-NH- de la chaine stéaryle), 2,21 (t, 2H, *J*=7,57, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine stéaryle), 3,42 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-OH), 3,54 (m, 2H, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,75 (m, 1H, -CH-), 5,84 (s, 1H, -NH-).

V.23. 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol (55)



Spectrométrie de masse basse résolution m/Z (LR-ESI$^+$) $C_{35}H_{70}NO_4$:

M + Na^+, obtenu : 590,2, calculé pour : 590,94.

IR ν_{max} (cm^{-1}) : 3651 (O-H, alcool), 3200-3400 (O-H, alcool et N-H, amide), 2800-3000 (CH de chaines alkyles), 1720 (C=O, ester), 1650 (C=O, amide), 1546 (N-H, amide).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm) : δ 0,88 (t, 6H, *J*= 6,3Hz, 2x -CH_2-$\underline{CH_3}$), 1,25 (m, 48H, -CH_2- des chaines myristyles et stéaryles), 1,62 (m, 4H, 2x -$\underline{CH_2}$-CH_2-CO- et des chaines myristyles et stéaryles), 2,21 (t, 2H, *J*= 7,11Hz, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-O- de la chaine myristyle), 2,34 (t, 2H, *J*= 7,78HZ, -CH_2-$\underline{CH_2}$-CO-NH- de la chaine stéaryle), 3,53 (dd, 1H, *J*= 4,88Hz, *J*= 14,15Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,56 (dd, 1H, *J*= 4,88Hz, *J*= 14,15Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-NH-), 3,94 (m, 1H, -CH-), 4,05 (dd, 1H, *J*= 5,49Hz, *J*= 10,98Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 4,15 (dd, 1H, *J*= 5,12Hz, *J*= 11,46Hz, –CH-$\underline{CH_2}$-O-), 5,95 (t, 1H, *J*= 5,2Hz, -NH-).

Résultats et discussions

CHAPITRE III

Résultats et discussions

CHAPITRE III – PARTIE 1

<u>Partie 1 :</u> Étude cinétique de l'acylation de composés monofonctionnels dans le 2-méthylbutan-2-ol : mécanismes réactionnels et énantiosélectivité

Partie 1 : Étude cinétique de l'acylation de composés monofonctionnels dans le 2-méthylbutan-2-ol : mécanismes réactionnels et énantiosélectivité

I. Introduction

Dans notre étude nous avons utilisé comme biocatalyseur la lipase B de *Candida antarctica* qui est bien connue pour son habilité à convertir les alcools et les amines en esters et amides (Tawaki *et al.*, 1993 ; Maugard *et al.*, 1997a). Les alcools et les amines sont des fonctions nucléophiles qui peuvent jouer le rôle d'accepteur de groupement acyle. Cependant il y a beaucoup de différences entre ces deux fonctions chimiques qui peuvent affecter le comportement de la lipase envers la O-acylation et la N-acylation. Nous notons par exemple que les amines sont plus nucléophiles que les alcools, causent une plus grand gène stérique qui peut interférer avec leur positionnement dans le site actif et peuvent également former plus de liaisons hydrogènes, etc… Ainsi, la compréhension du mode de fonctionnement de la lipase B de *Candida antarctica* pour la O-acylation ou la N-acylation des alcools ou des amines monofonctionnels est nécessaire avant d'étendre ces processus enzymatiques à des molécules multifonctionnelles possédant ces deux types de fonctions tels que les amino-alcools.

Dans le but de mieux appréhender ces deux types de réactions, la O-acylation et la N-acylation seront étudiées séparément. Cette étude effectuée sur des substrats monofonctionnels s'intéresse aux mécanismes réactionnels mis en jeux lors des réactions de O-acylation et de N-acylation, ainsi qu'à la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* en milieu organique faiblement hydraté. De plus, l'énantiosélectivité E entre les conformations R et S de substrats monofonctionnels et la chimiosélectivité C entre la N-acylation et la O-acylation seront également étudiées.

La valeur du rapport énantiomérique E nous informe sur l'énantiosélectivité de la réaction. Cette valeur peut être quantifiée lorsque les acylations des deux énantiomères sont effectuées séparément, par rapport aux paramètres cinétiques apparents et plus précisément aux efficacités catalytiques apparentes correspondant aux rapports de la vitesse maximale apparente et de la constante de Michaelis apparente pour l'acylation de chaque énantiomère. Dans cette étude, l'énantiosélectivité sera donc évaluée par rapport à E selon l'équation 2 (Straathof et Jongejan, 1997).

Équation 2 :

$$E = \frac{Vmax_R^{app}/Km_R^{app}}{Vmax_S^{app}/Km_S^{app}}$$

V_{max}^{app} = Vitesse maximale apparente de conversion de l'énantiomère R ou de l'énantiomère S.
K_m^{app} = La constante de Michaelis ou constante de dissociation apparente de l'énantiomère R ou de l'énantiomère S.

De même la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* a été évaluée selon le même principe que l'énantiosélectivité, c'est-à-dire par le rapport des efficacités catalytiques apparentes de O-acylation et de N-acylation comme décrit dans l'équation 3 (Fersht, 1985 ; Hedfors *et al.*, 2010).

Équation 3 :

$$C = \frac{Vmax_O^{app}/Km_O^{app}}{Vmax_N^{app}/Km_N^{app}}$$

V_{max}^{app} = Vitesse maximale apparente de la O-acylation ou de la N-acylation.
K_m^{app} = La constante de Michaelis ou constante de dissociation apparente de l'alcool et de l'amine.

Cette étude a été menée par rapport aux vitesses initiales, mais également par rapport aux rendements réactionnels obtenus à l'équilibre thermodynamique afin de mieux appréhender l'ensemble de nos résultats en particulier au niveau de l'avancement des réactions. Les constantes d'équilibres (K_{eq}) des différentes réactions ont ainsi pu être calculées selon l'équation 4.

Équation 4 :

$$K_{eq} = \frac{a_W \cdot a_P}{a_{acide\ myristique} \cdot a_B}$$

a_w et $a_{acide\ myristique}$ sont respectivement les activités thermodynamiques de l'eau et de l'acide myristique.
a_P et a_B sont respectivement les activités thermodynamiques de l'ester ou l'amide et de l'alcool ou l'amine.

Les activités thermodynamiques utilisées ont été estimées en utilisant la méthode de contribution de groupes « UNIversal Functional Actvity Coefficient » (UNIFAC) (Hansen *et al.*, 1991) (Chapitre II : Matériel et méthodes, II.6.1).

Lors de cette partie de notre travail, les énantiomères purs du butan-2-ol et de la *sec*-butylamine ont été utilisés comme substrats modèles (accepteurs de groupement acyle) pour l'acylation de composés monofonctionnels. Ils présentent soit une fonction amine (NH_2) soit

une fonction alcool (OH). L'acide myristique ($C_{14}H_{28}O_2$) a été utilisé comme donneur de groupement acyle.

II. Étude cinétique de la O-acylation du butan-2-ol

La réaction choisie comme modèle pour l'étude de la O-acylation est l'acylation du butan-2-ol **1** par l'acide myristique **2** qui permet la synthèse du O-myristyl butan-2-ol **3**. Les énantiomères purs du substrat **1** sont utilisés séparément pour réagir avec l'acide myristique **2** en présence de la lipase B de *Candida antarctica* dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C. La réaction est ainsi réalisée avec le (R)-butan-2-ol (R)-**1** et le (S)-butan-2-ol (S)-**1**. Cette réaction aboutit à la formation de l'ester **3** avec la libération d'une molécule d'eau comme décrit schéma 2.

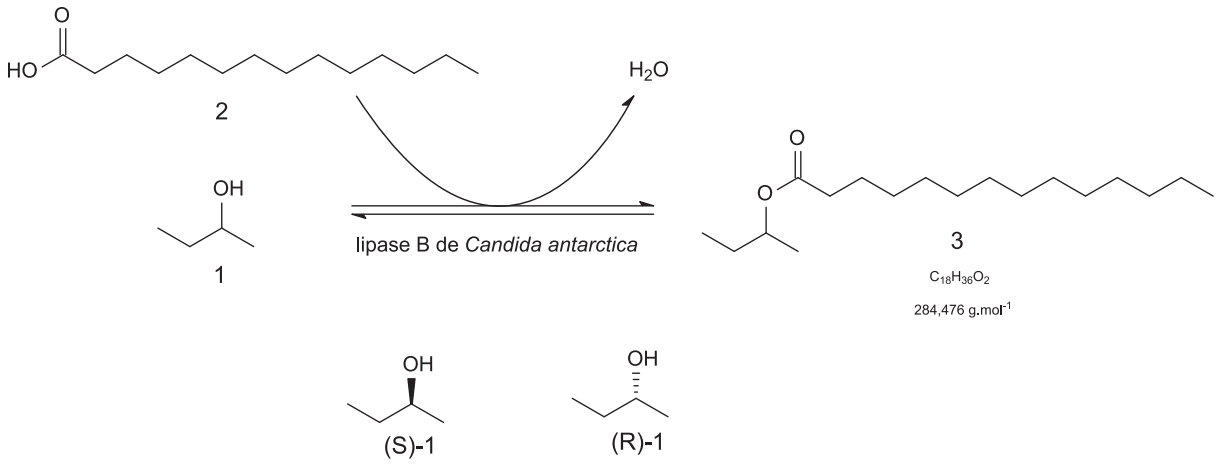


Schéma 2 : *Réaction entre le butan-2-ol **1** et l'acide myristique **2** en présence de lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Nous avons fait varier les concentrations des deux substrats de 25 mM à 350 mM (25, 50, 100, 175 et 350 mM) dans le but de déterminer l'effet de la concentration des substrats sur les rendements de synthèse à l'équilibre thermodynamique et sur les vitesses initiales de synthèse afin de définir le mécanisme réactionnel de la lipase B de *Candida antarctica*.

La figure 33 montre les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons prélevés à différents temps de réaction.

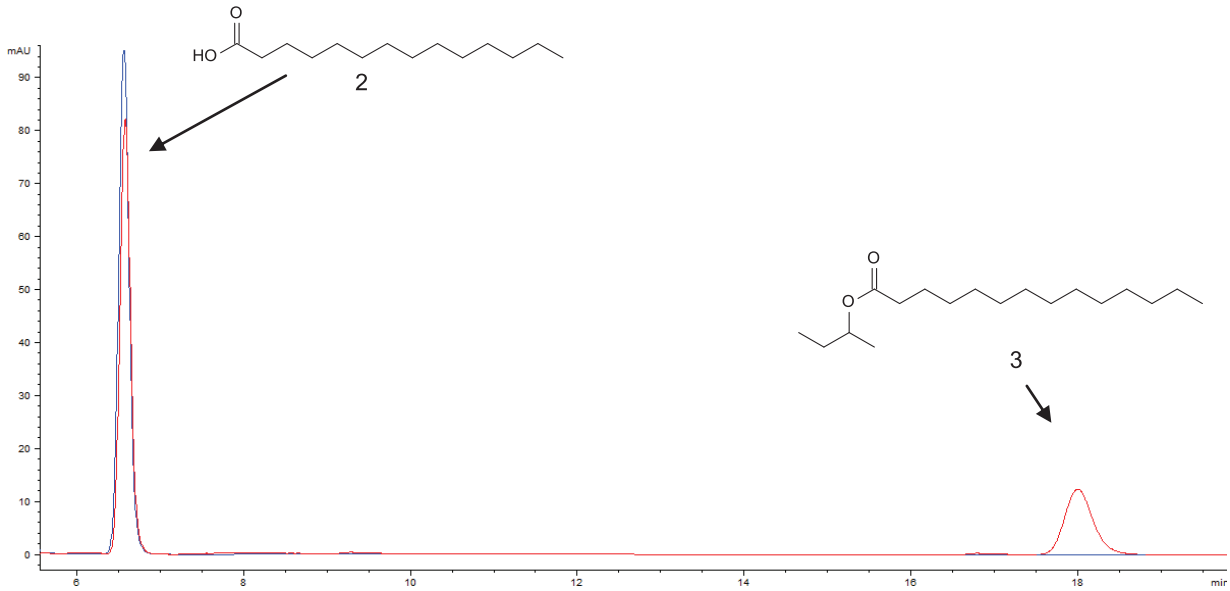


Figure 33 : *Chromatogrammes CLHP de l'acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** (25 mM) par l'acide myristique **2** (175 mM). Détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant à la réaction à l'instant t = 0 et chromatogramme rouge correspondant à la réaction à l'instant t = 25h. Conditions d'analyses : colonne C18 Silice Uptisphere 300 5 ODB (250×4 mm, 5 µm), acétonitrile/eau milliQ/acide acétique 90/10/0,1 (v/v/v) 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°1 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Dans ces conditions de séparation, seul l'acide myristique **2** (tr = 6,3 minutes) et le O-myristyl butan-2-ol **3** (tr = 18 minutes) sont détectés. La disparition au cours du temps de l'acide myristique **2** est concomitante avec l'apparition de l'ester **3**. Le produit **3** a été caractérisé par SM et par RMN après purification. En absence d'enzyme, aucune apparition du produit n'est observée après 48 heures.

Les rendements de synthèse sont mesurés à t = 48 heures (équilibre thermodynamique). La figure 34 montre l'effet de r : le rapport molaire des substrats ([acide myristique **2**] / [butan-2-ol **1**]), sur les rendements de synthèse de l'ester **3** à l'équilibre par rapport à la concentration initiale du substrat limitant, pour l'acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** et du (S)-butan-2-ol (S)-**1**. Nous remarquons que les rendements de synthèse augmentent quand l'un des substrats est utilisé en excès, à partir de 15% de synthèse de l'ester **3** dans les conditions stœchiométriques (r = 25 mM/25 mM) et allant jusqu'à plus de 60% quand nous utilisons 350 mM d'acide myristique **2** ou de butan-2-ol **1** (r = 350 mM/25 mM ou r = 25 mM/350 mM). Les meilleures conditions de synthèse de l'ester **3** sont observées pour 25 mM de l'acide myristique **2** et 350 mM de (S)-butan-2-ol (S)-**1**, dans ce cas nous obtenons 69% (17,2 mM) de conversion, ce qui donne une constante d'équilibre K_{eq} de 1,87 en faveur de la synthèse. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les rendements de synthèse des esters (R)-**3** et (S)-**3** quel que soit le rapport molaire r. Nous pouvons en conclure que la

synthèse de l'ester **3** par la lipase B de *Candida antarctica* dans nos conditions expérimentales n'est pas sélective d'un énantiomère à l'équilibre thermodynamique.

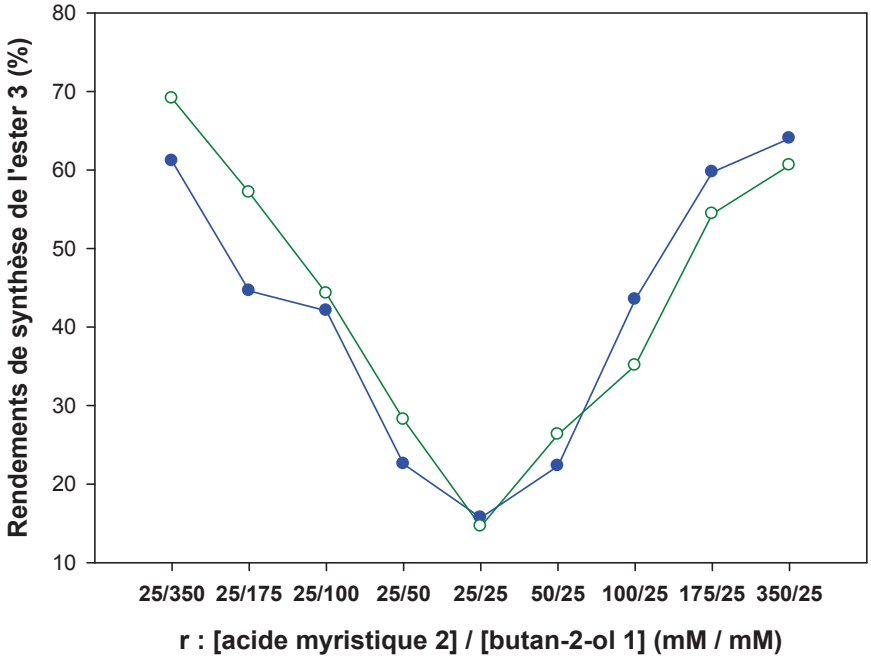


Figure 34 : *Effet du rapport r = [acide myristique **2**] / [butan-2-ol **1**], sur les rendements de synthèse des esters (R)-**3** (●) et (S)-**3** (○) après 48h de réaction.*

Par la suite nous avons réalisé une étude cinétique en vitesse initiale (v_i) afin de déterminer le mécanisme réactionnel de la lipase B de *Candida antarctica* lors de son utilisation comme catalyseur de l'acylation du butan-2-ol **1** par l'acide myristique **2**. En comparant les profils des suivis cinétiques, au cours du temps, pour les différentes concentrations en (R)-butan-2-ol **1** ou en (S)-butan-2-ol **1**, il a ainsi été observé que dans tous les cas les v_i sont obtenues sur les 2 premières heures de réaction.

La figure 35 montre l'effet des concentrations en acide myristique **2** (A) et en (R)-butan-2-ol (R)-**1** (B) sur les v_i de O-acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1**. Ces représentations graphiques primaires présentent des profils cinétiques de type Michaelis-Menten (Segel, 1993) et permettent d'observer que plus la concentration en butan-2-ol **1** ou en acide gras **2** est importante plus les v_i de O-acylation sont élevées. Aucune inhibition par excès de substrat n'est observée dans la gamme de concentration testée.

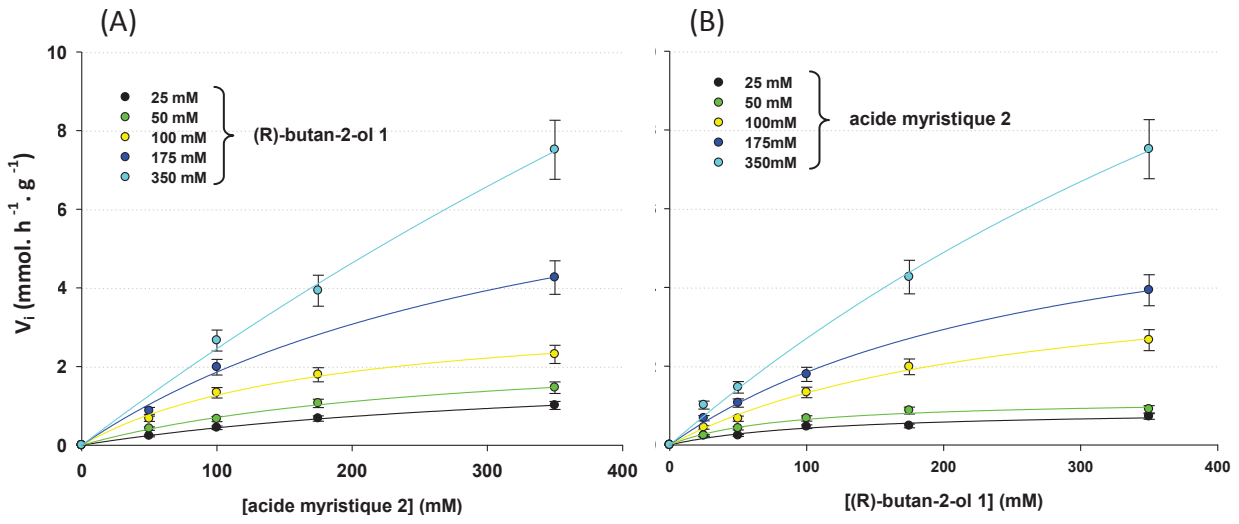


Figure 35 : *Evolution de la vitesse initiale (v_i) de la réaction entre le (R)-butan-2-ol **1** et l'acide myristique **2** en présence de 10 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C. En (A), l'acide myristique **2** est utilisé comme substrat paramétrique et en (B), le (R)-butan-2-ol **1** est utilisé comme substrat paramétrique.*

Toutes les données de v_i ont été corrélées aux différents modèles cinétiques proposés par le module « Enzyme Kinetics » du logiciel sigmaplot, « Enzyme Kinetics 2004 1.3 » (Systat Software Inc., San Jose, USA), utilisant une analyse de régression non linéaire par la méthode des moindres carrés. De plus, pour améliorer la visualisation des résultats, les données expérimentales sont représentées en points et les courbes théoriques obtenues par le logiciel « Enzyme Kinetics » sont représentées en traits pleins.

Les deux représentations réciproques de Lineweaver-Burk sont ainsi réalisées selon que soit l'acide myristique **2**, soit le (R)-butan-2-ol (R)-**1** est utilisé comme substrat paramétrique (figure 36).

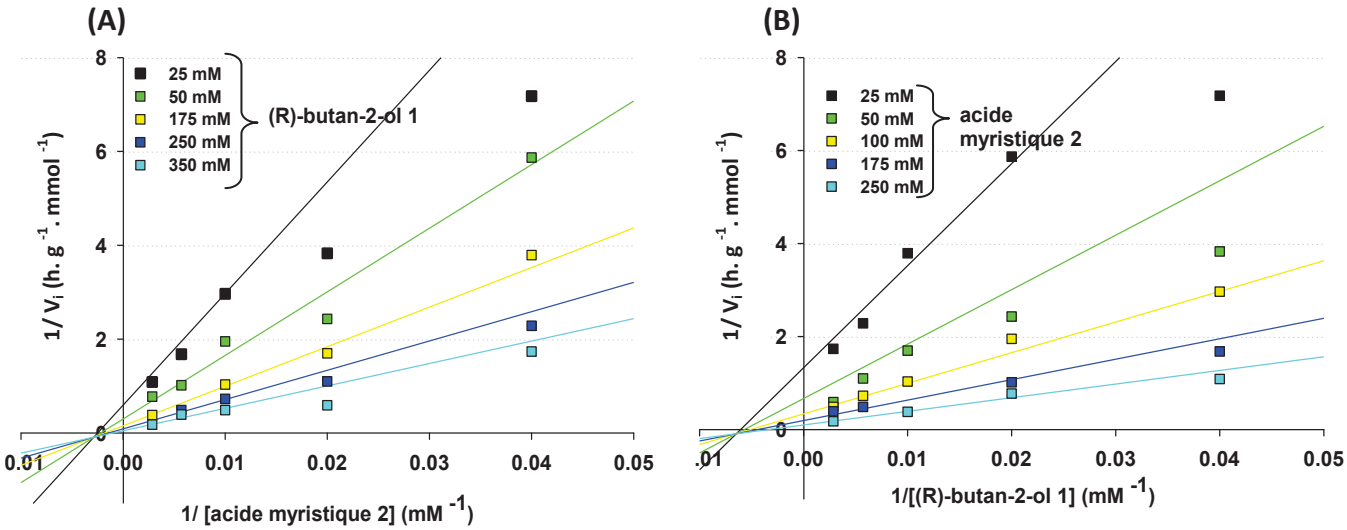


Figure 36 : *Linéarisations de Lineweaver-Burk de la réaction entre le (R)-butan-2-ol **1** et l'acide myristique **2** en présence de 10 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C. En (A), l'acide myristique **2** est utilisé comme substrat paramétrique et en (B), le (R)-butan-2-ol **1** est utilisé comme substrat paramétrique.*

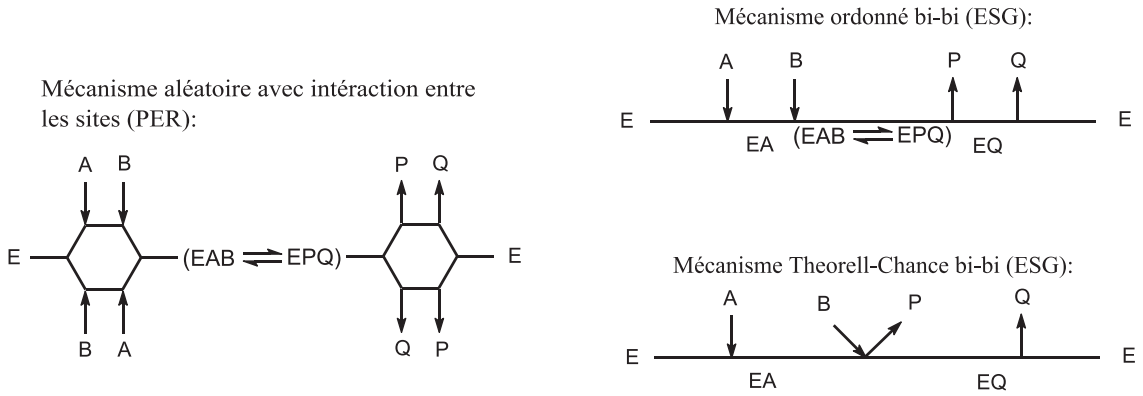
Les données de v_i correspondant à la O-acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** ont obtenu la meilleure corrélation avec les linéarisations de Lineweaver-Burk décrites figures 36A et 36B montrant dans les deux cas des droites se croisant dans le plan formé par les axes (-x; 0) et (-y; 0), et correspondant à l'équation 5 :

Équation 5 : $$v_i = \frac{V_{max}\cdot[A]\cdot[B]}{K_{ia}\cdot K_{mB}+K_{mB}\cdot[A]+K_{mA}\cdot[B]+[A]\cdot[B]}$$

*A et B représentent respectivement les substrats **2** et **1**.*
K_{mA} et K_{mB} : constantes de Michaelis de A et B.
V_{max} : vitesse maximale de conversion.
K_{ia} : constante de dissociation de A à partir du complexe EA.

Cette équation 5 et les linéarisations de Lineweaver-Burk correspondantes sont potentiellement révélatrices de trois types de mécanismes, impliquant tous une fixation séquentielle des deux substrats (schéma 3) (Segel, 1993) :

- Mécanisme aléatoire avec interaction entre les sites à l'état dit de « pré-équilibre rapide » (PER).
- Mécanisme ordonné bi-bi et mécanisme Theorell-Chance bi-bi, à l'état dit « stationnaire général » (ESG).



A et B représentent les 2 substrats.
P et Q représentent les 2 produits.
E représente l'enzyme.

Schéma 3 : *Représentation de Cleland (1963a ; 1963b ; 1963c) des trois mécanismes enzymatiques séquencés pouvant potentiellement aboutir aux représentations de Lineweaver-Burk de la figure 36.*

Le mécanisme Théorell-Chance bi-bi est en fait un cas particulier du mécanisme ordonné bi-bi pour lequel les concentrations des complexes centraux EAB et EPQ sont essentiellement égales à 0. Il est néanmoins peu probable selon Segel (1993) qu'un système Théorell-Chance réel existe. Nous considèrerons donc ici que la probabilité d'un mécanisme de ce type est quasi-nulle.

De même, le mécanisme de base des lipases étant bien connu et consistant en une fixation séquencée du donneur de groupement acyle (substrat A), puis de l'accepteur de ce même groupement (substrat B) (Norin *et al.*, 1993; Egloff *et al.*, 1995a; Yagnik *et al.*, 1997), un mécanisme de type aléatoire tel que le PER ne peut donc pas s'appliquer à ces enzymes. De plus, le produit de réaction ayant été isolé à partir du milieu réactionnel, le système ne peut donc pas être corrélé à un état dit « de pré-équilibre rapide » nécessaire au mécanisme aléatoire.

Ces informations nous permettent d'exclure des trois hypothèses de départ le mécanisme Théorell-Chance bi-bi (ESG) et le mécanisme aléatoire (PER). L'acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** semble donc se produire selon un mécanisme séquencé de type ordonné bi-bi intervenant à l'état stationnaire général. Un état dit « stationnaire général » implique que la dissociation du substrat B (accepteur de groupement acyle) est extrêmement lente en comparaison de l'interconversion EAB en E+P+Q. En conditions de v_i, la variation de concentration du complexe EAB est nulle en raison de la transformation de EAB en E+P+Q. Il y a donc, comme nous l'avons observé expérimentalement, formation de produits dans le milieu réactionnel qui peuvent être quantifiés au cours du temps.

Ce mécanisme est confirmé par l'analyse des données cinétiques issues de l'acylation du (S)-butan-2-ol (S)-**1** (données non décrites ici) qui sont également corrélées à l'équation du mécanisme ordonné bi-bi à l'état stationnaire général avec formation d'un complexe ternaire.

Dans la littérature, les synthèses d'ester peuvent se faire par réaction de transestérification ou par hydrolyse inverse. La plupart des modèles concernant les réactions de transestérifications catalysées par des lipases sont basés sur un mécanisme ping pong bi-bi. Ce modèle est notamment utilisé pour décrire les réactions de transestérification catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* en solvant organique (Martinelle et Hult, 1995 ; Yadav et Devi, 2004 ; Romero *et al.*, 2007), en milieu supercritique (Chulalaksananukul *et al.*, 1993) et en réacteurs solide-gaz (Létisse *et al.*, 2003). En revanche, un mécanisme ordonné bi-bi a également été reporté dans plusieurs études traitant des réactions d'hydrolyse inverse catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* dans des systèmes sans solvant (Garcia *et al.*, 1999 ; PIlarek *et al.*, 2007) ou en solvant organique (Yadav et Dhoot, 2009).

En fait, le mécanisme catalytique des lipases est considéré comme analogue à celui proposé pour les protéases à sérine, impliquant une triade de résidus du site actif : sérine, histidine et acide aspartique. Il a été suggéré qu'un complexe de Michaelis-Menten formé

entre le donneur d'acyle et l'enzyme produit un premier intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire se dissocie ensuite pour donner un intermédiaire acyl-enzyme et libérer le premier produit (l'eau). Puis le second substrat se lie au site actif, permettant la formation d'un deuxième intermédiaire tétraédrique. Enfin, ce dernier se dissocie pour donner le second produit (l'ester) (Chulalaksananukul *et al.*, 1990 ; Smith *et al.,* 1992 ; Yagnik *et al.*, 1997). Cela correspond à un mécanisme ping pong bi-bi, avec dans le cas présent, l'eau comme premier produit libéré. Cependant, l'eau est une petite molécule qui peut être présente dans le site catalytique et ne peut donc pas être une cause d'encombrement stérique. Ainsi, il est possible que le second substrat puisse accéder au site actif avant même la sortie du premier produit, conduisant à un mécanisme ordonné bi-bi et à la formation d'un complexe ternaire.

Afin de réaliser ultérieurement une étude comparative avec les travaux qui vont suivre, nous ne représenterons sur le tableau 13 que les valeurs des paramètres cinétiques apparents V_{max}^{app} et K_{mB}^{app} calculées pour 175 mM d'acide myristique **2** qui ont été obtenues par rapport aux régressions linéaires des représentations de Lineweaver-Burk.

Tableau 13 : *Paramètres cinétiques apparents de l'acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** et du (S)-butan-2-ol (S)-**1** à partir de 175 mM d'acide myristique **2** comme donneur d'acyle et de 25 – 350 mM de l'alcool **1** comme accepteur d'acyle dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Substrat B	K_{mB}^{app} (mM)	V_{max}^{app} ($mmol.h^{-1}.g^{-1}$)	Efficacité catalytique apparente ($V_{max}^{app}/K_{mB}^{app}$) ($l.h^{-1}.g^{-1}$)
(R)-butan-2-ol (R)-**1**	**150**	**4,62**	**0,031**
(S)-butan-2-ol (S)-**1**	**207**	**2,5**	**0,012**

K_{mB}^{app}*: constante de Michaelis apparente du substrat B (accepteur d'acyle)*
V_{max}^{app} *: vitesse maximale apparente*

Ces résultats fournissent des informations sur l'énantiosélectivité de la lipase de B *Candida antarctica* envers la O-acylation du butan-2-ol **1** par hydrolyse inverse. Tout d'abord, la V_{max}^{app} de la production d'ester à partir du (R)-butan-2-ol (R)-**1** (4,62 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) est environ 2 fois plus élevée que la V_{max}^{app} obtenue à partir du (S)-butan-2-ol (S)-**1** (2,5 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$). D'autre part, le K_{mB}^{app} de la conformation R du butan-2-ol **1** (150 mM) est légèrement inférieur à celui de la conformation S (207 mM), ce qui indique une affinité de la lipase favorisant légèrement l'énantiomère R. Logiquement, l'efficacité catalytique résultant de ces paramètres est donc plus élevée pour l'acylation de l'énantiomère R (0,031 $l.h^{-1}.g^{-1}$) que pour l'acylation de l'énantiomère S (0,012 $l.h^{-1}.g^{-1}$). Grâce à ces valeurs, un rapport

énantiomérique E d'environ 3 (équation 2) a été obtenu en utilisant 175 mM d'acide myristique **2**, ce qui signifie que la lipase B de *Candida antarctica* a une énantiosélectivité préférentielle envers l'énantiomère R lors de la O-acylation du butan-2-ol **1** dans le 2-méthylbutan-2-ol.

Ce résultat est cohérent avec plusieurs travaux, qui ont montré que la lipase B de *Candida antarctica* catalyse préférentiellement l'acylation de l'énantiomère R lors de l'acylation d'alcools secondaires (Leonard *et al.*, 2004). Un alcool secondaire possède des substituants de tailles différentes autour de son centre chiral (carbone asymétrique). L'orientation de ces substituants par rapport au centre de chiralité diffère entre les énantiomères R et S. Le positionnement des deux énantiomères dans un site actif est donc différent. Certaines données issues d'études de modélisation moléculaire ont révélé que cette énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* en faveur de l'énantiomère R peut être liée, du moins en partie, à la conformation de l'enzyme. En effet cette conformation permettrait à l'énantiomère R de se lier à l'enzyme plus facilement et nécessiterait un apport d'énergie initial plus faible pour pouvoir réagir. Par conséquent l'énantiomère R sera transformé plus rapidement (Uppenberg *et al.*, 1995 ; Haeffner *et al.*, 1998 ; Orrenius *et al.*, 1998).

III. Étude cinétique de la N-acylation de la *sec*-butylamine

La réaction choisie comme modèle pour l'étude de la N-acylation est l'acylation de la *sec*-butylamine **4** par l'acide myristique **2** qui permet la synthèse du N-myristyl *sec*-butylamine **5**. Comme précédemment, les énantiomères purs du substrat **4** sont utilisés séparément pour réagir avec l'acide myristique **2** en présence de la lipase B de *Candida antarctica* dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.

La réaction est réalisée avec la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** et la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4**. Cette réaction aboutit à la formation d'un amide **5** avec la libération d'une molécule d'eau comme décrit schéma 4.

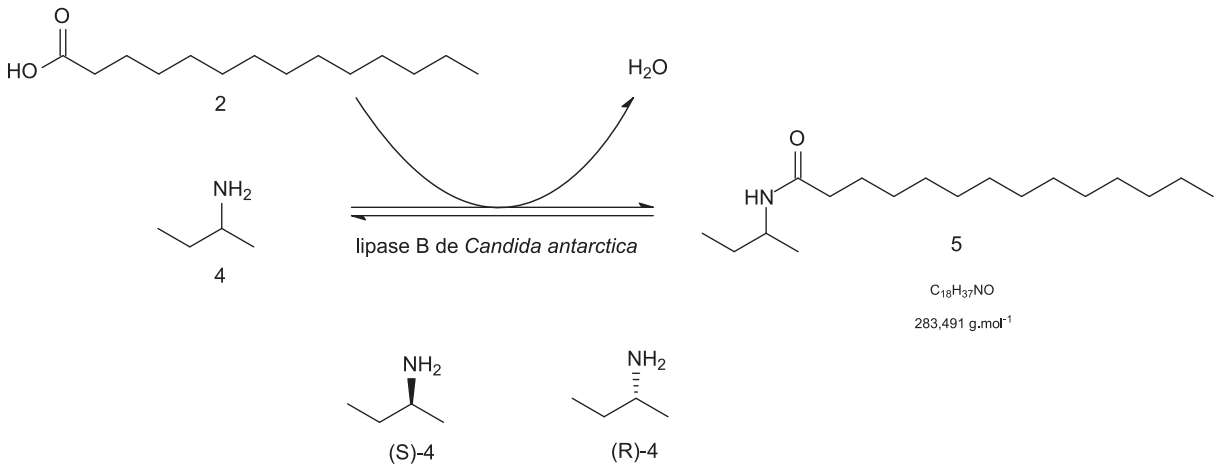


Schéma 4 : *Réaction entre la (R)-sec-butylamine **4** et l'acide myristique **2** en présence de lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Nous avons fait varier les concentrations des deux substrats de 25 mM à 350 mM (25, 35, 50, 100, 175, 250 et 350 mM) dans le but de déterminer l'effet de la concentration des substrats sur les rendements de synthèse à l'équilibre thermodynamique et sur les v_i de synthèse afin de définir le mécanisme réactionnel de la lipase B de *Candida antarctica*.

La figure 37 montre les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons prélevés à différents temps de réaction.

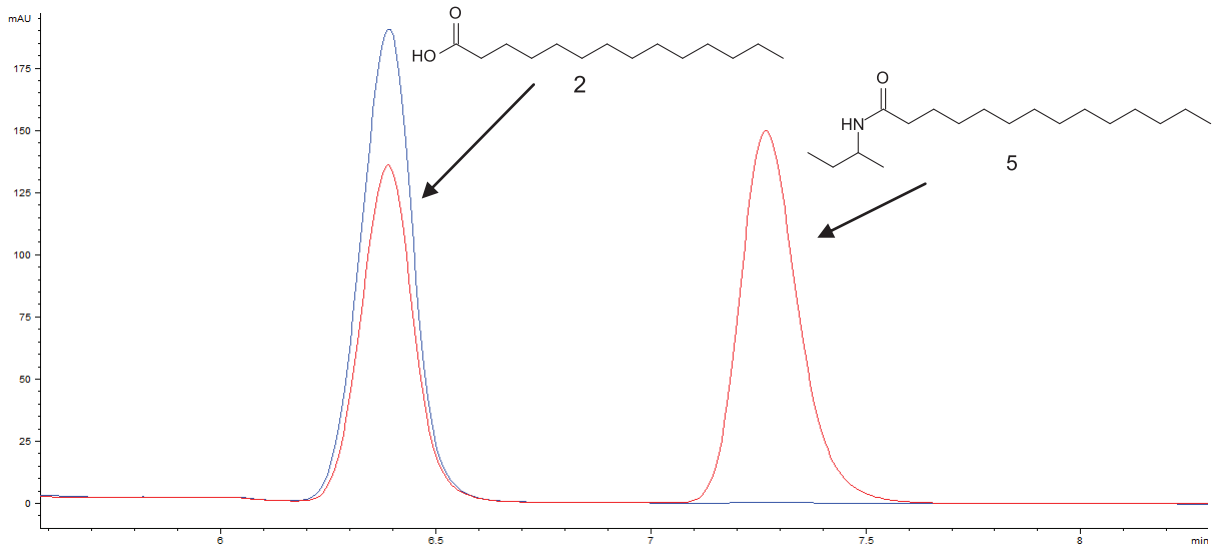


Figure 37 : *Chromatogrammes CLHP de l'acylation de la (R)-sec-butylamine (R)-**4** (25 mM) par l'acide myristique **2** (175 mM). Détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant à la réaction à l'instant t = 0 et chromatogramme rouge correspondant à la réaction à l'instant t = 25h. Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), acétonitrile/eau/acide acétique 90/10/0,1 (v/v/v) 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°1 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Dans ces conditions de séparations seul l'acide myristique **2** (tr = 6,3 minutes) et le N-myristyl *sec*-butylamine **5** (tr = 7,3 minutes) sont détectés. La disparition au cours du temps de l'acide myristique **2** est concomitante avec l'apparition de l'amide **5**. Le produit **5** a été

caractérisé par SM et par RMN après purification. En absence d'enzyme, aucune apparition du produit n'est observée après 48 heures.

Les rendements de synthèse sont déterminés à t = 48 heures. La figure 38 montre l'effet de r : le rapport molaire [acide myristique **2**] / [*sec*-butylamine **4**] sur les rendements de synthèse de l'amide **5** à l'équilibre par rapport à la concentration initiale du substrat limitant, pour l'acylation de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** ou de la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4**. Dans les meilleures conditions, correspondant à r = 25 mM / 100 mM, une synthèse de l'amide **5** de 84% (21 mM) est atteinte pour l'acylation de l'énantiomère R, donnant une constante d'équilibre K_{eq} de 14,37 fortement favorable à la synthèse, tandis que le rendement de synthèse de l'amide **5** n'a jamais dépassé 25% (6,2 mM) pour l'acylation de l'énantiomère S, quel que soit le rapport molaire r.

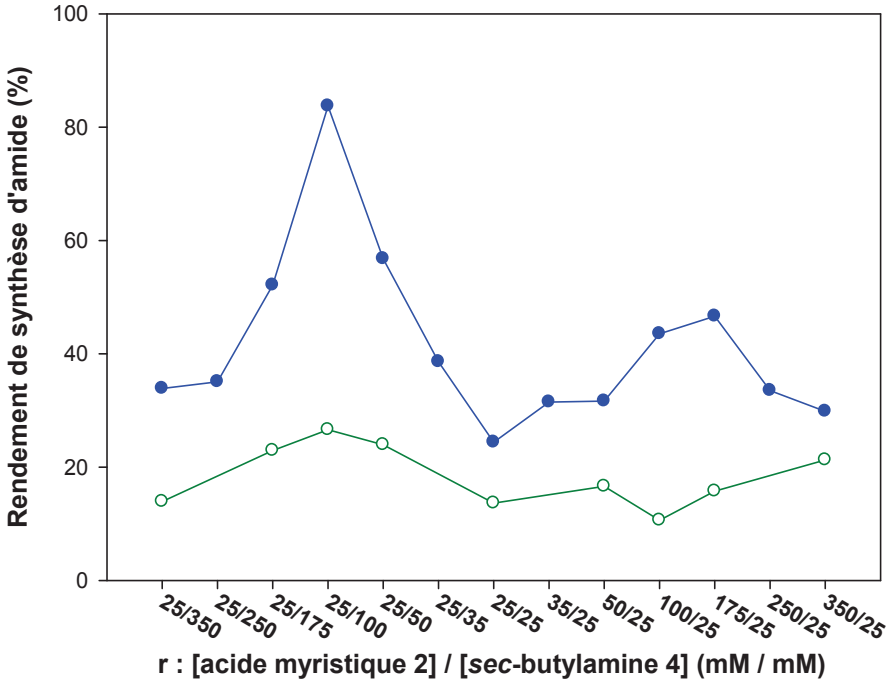


Figure 38 : *Effet du rapport r = [acide myristique **2**] / [sec-butylamine **4**], sur les rendements de synthèse des amides (R)-**5** (●) et (S)-**5** (○) après 48h de réaction.*

Contrairement aux résultats observés pour la O-acylation du butan-2-ol **1**, les rendements de synthèse obtenus pour la N-acylation des deux énantiomères de la *sec*-butylamine **4** sont différents, avec une préférence pour la synthèse de l'énantiomère R, après 48 heures de réaction, quel que soit le rapport molaire r.

Par la suite, nous avons réalisé une étude cinétique en vitesse initiale (v_i) afin de déterminer le mécanisme réactionnel de la lipase B de *Candida antarctica* lors de son

utilisation comme catalyseur de l'acylation de la *sec*-butylamine **4** par l'acide myristique **2**. En comparant les profils des suivis cinétiques, au cours du temps, pour les différentes concentrations en (R)-*sec*-butylamine **4** ou en (S)-*sec*-butylamine **4**, il a ainsi été observé que dans tous les cas les v_i sont obtenues sur les 3 premières heures de réaction.

La figure 39 montre l'effet des concentrations en acide myristique **2** (A) et en (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** (B) sur les v_i de N-acylation de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4**. Ces représentations graphiques primaires présentent des profils cinétiques de types Michaelis-Menten (Segel, 1993) avec pour de fortes concentrations en substrats une diminution des v_i similaires à une inhibition par excès de substrats.

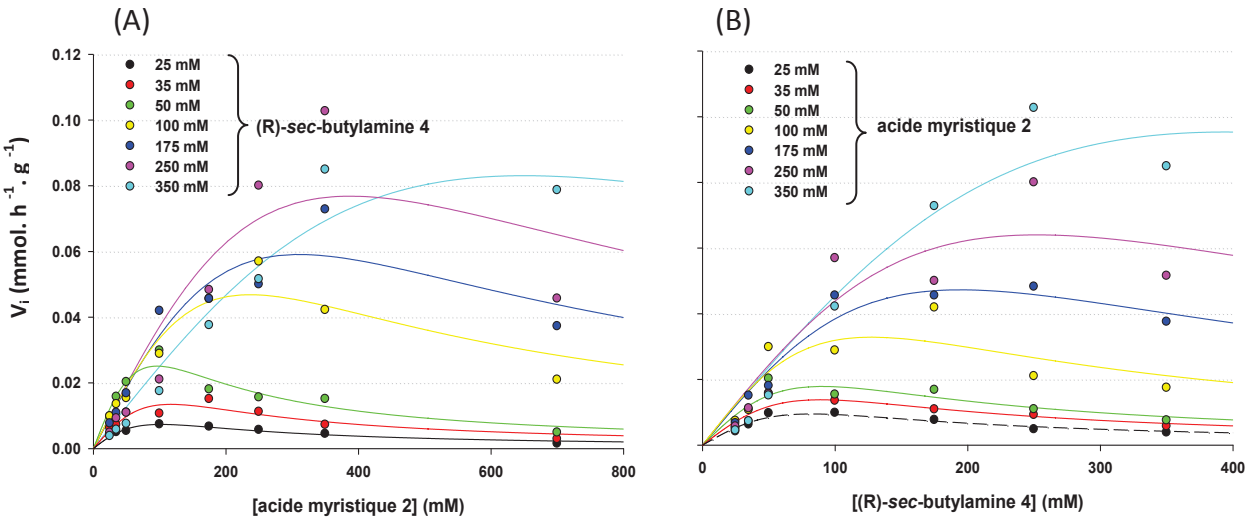


Figure 39 : *Evolution de la vitesse initiale (v_i) de la réaction entre la (R)-sec-butylamine **4** et l'acide myristique **2** en présence de 50 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol, à 55°C. En (A), l'acide myristique **2** est utilisé comme substrat paramétrique et en (B), la (R)-sec-butylamine **4** est utilisée comme substrat paramétrique.*

Toutes les données de v_i ont été corrélées aux différents modèles cinétiques proposés par le module « Enzyme Kinetics » du logiciel sigmaplot, utilisant une analyse de régression non linéaire par la méthode des moindres carrés. De plus, pour améliorer la visualisation des résultats, les données expérimentales sont représentées en points et les courbes théoriques obtenues par le logiciel « Enzyme Kinetics » sont représentées en traits pleins et en pointillés.

Les deux représentations réciproques de Lineweaver-Burk sont ainsi réalisées selon que soit l'acide myristique **2**, soit la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** est utilisé comme substrat paramétrique (figure 40).

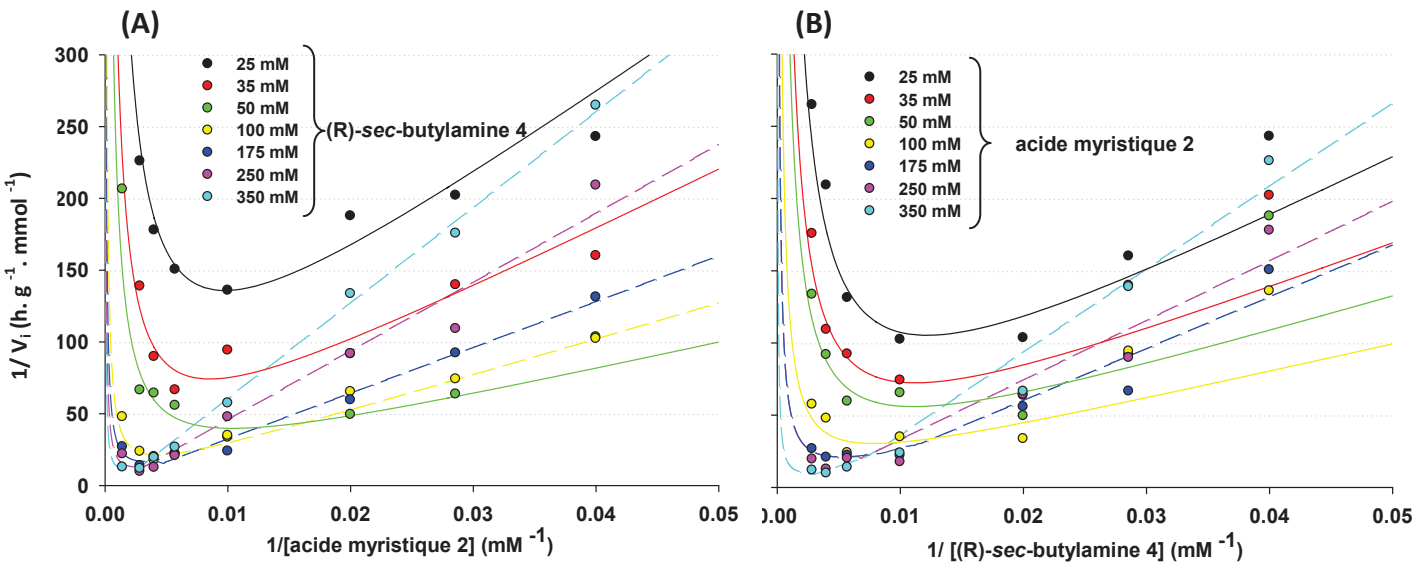


Figure 40 : *Linéarisation de Lineweaver-Burk de la réaction entre la (R)-sec-butylamine **4** et l'acide myristique **2** en présence de 50 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol, à 55°C. En (A), l'acide myristique **2** est utilisé comme substrat paramétrique et en (B), la (R)-sec-butylamine **4** est utilisée comme substrat paramétrique.*

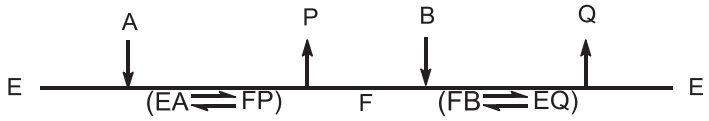
Les données de v_i correspondant à la N-acylation de la *sec*-butylamine **4** ont obtenu la meilleure corrélation avec les linéarisations de Lineweaver-Burk décrites figures 40A et 40B, montrant dans les deux cas des droites qui tendent à êtres parallèles pour les plus faibles concentrations en substrats.

Les données de v_i correspondant à la N-acylation pour les faibles concentrations en *sec*-butylamine **4** (< 100 mM) et en acide myristique **2** (< 175 mM) peuvent être corrélées avec l'équation 6 décrivant un mécanisme ping pong bi-bi à l'état stationnaire (Segel, 1993).

Équation 6 : $$v_i = \frac{V_{max}\cdot[A]\cdot[B]}{K_{mB}\cdot[A]+K_{mA}\cdot[B]+[A]\cdot[B]}$$

*A et B représentent respectivement les substrats **2** et **4**.*
K_{mA} et K_{mB} : constantes de Michaelis de A et B.
V_{max} : vitesse maximale de conversion.

Lors d'un mécanisme ping pong bi-bi décrit schéma 5 aucun complexe ternaire n'est formé. Un premier substrat A se fixe sur l'enzyme E et entraîne la libération du premier produit P en formant un intermédiaire acyl-enzyme F. Un deuxième substrat B se fixe ensuite et entraîne la libération du deuxième produit Q.



A et B représentent les 2 substrats.
P et Q représentent les 2 produits.
E représente l'enzyme.
F représente l'intermédiaire acyl-enzyme

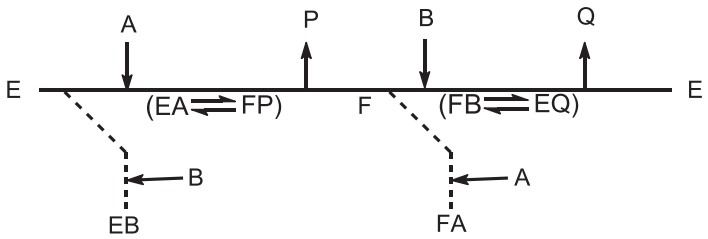
Schéma 5 : *Représentation de Cleland (1963a ; 1963b ; 1963c) du mécanisme enzymatique ping pong bi-bi à l'état stationnaire général.*

Par ailleurs, pour des concentrations élevées de substrats (supérieures à 175 mM d'acide myristique **2** ou à 100 mM de (R)-*sec*-butylamine (R)-**4**), une baisse des v_i est observée (figure 39) : ceci est caractérisé sur les deux représentations de Lineweaver-Burk par une augmentation de $1/v_i$ causant une perte de parallélisme des régressions correspondantes qui sont représentées sur la figure 40 par un ensemble de lignes pointillées qui tendent à se croiser à proximité de l'axe des ordonnées.

Les données de v_i correspondant à la N-acylation pour toutes les concentrations en substrats décrites figures 40A et 40B concordent avec l'équation 7 décrivant un mécanisme ping pong bi-bi à l'état stationnaire avec cette fois une double inhibition compétitive par les substrats (Segel, 1993), décrit schéma 6. Ce modèle est obtenu par le module « Enzyme Kinetics » du logiciel sigmaplot.

Équation 7 : $$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{mB}[A]\left(1+\frac{[A]}{K_{iA}}\right)+K_{mA}[B]\left(1+\frac{[B]}{K_{iB}}\right)+[A][B]}$$

*A et B représentent respectivement les substrats **2** et **4**.*
K_{mA} et K_{mB} : constantes de Michaelis de A et B respectivement.
V_{max} : vitesse maximale de conversion.



A et B représentent les 2 substrats.
P et Q représentent les 2 produits.
E représente l'enzyme.
F représente l'intermédiaire acyl-enzyme.

Schéma 6 : *Représentation de Cleland (1963a ; 1963b ; 1963c) du mécanisme enzymatique ping pong bi-bi à l'état stationnaire général avec double inhibition compétitive.*

Ce mécanisme est confirmé par l'analyse des données cinétiques issues de l'acylation de la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4** (données non décrites ici) qui sont également corrélées à l'équation du mécanisme ping pong bi-bi à l'état stationnaire avec une double inhibition compétitive par les substrats.

Néanmoins, cette inhibition compétitive par les deux substrats peut être écartée étant donnée l'absence d'inhibition par l'acide myristique **2** lors de la O-acylation du butan-2-ol **1** (figures 35 et 36). Une hypothèse permettant d'expliquer nos résultats serait la formation d'un complexe salin entre la *sec*-butylamine **4** et l'acide myristique **2** qui conduirait à la diminution de la disponibilité des substrats dans le milieu réactionnel. Ce complexe salin (figure 41) aboutirait à une forme protonée de l'amine et une forme déprotonée de l'acide, toutes les deux pouvant être non réactives vis-à-vis de l'enzyme. Ceci a déjà été observé lors de précédentes études impliquant des acides et des amines comme substrats de la lipase pour des réactions de N-acylation en solvant organique (Maugard *et al.*, 1997b ; Fernandez-Perez et Otero, 2001 ; Husson *et al.*, 2008).

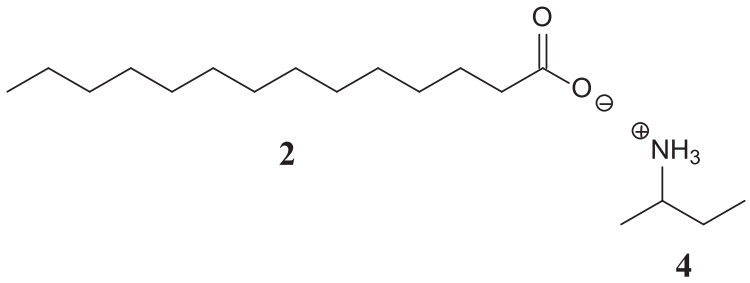


Figure 41 : *Formation du complexe salin entre l'acide myristique **2** et la sec-butylamine **4**.*

L'équilibre de formation de ce complexe salin est fonction des conditions acido-basiques du milieu. Une augmentation de la concentration en amine ou en acide tend à accroître la formation du complexe salin. Dans ce cas, il ne s'agirait pas d'une inhibition par excès de substrat, mais d'une diminution de la quantité de substrat disponible pour la réaction enzymatique (Maugard, 1996).

Afin de confirmer cette hypothèse sur la formation d'un complexe salin dans le milieu réactionnel en fonction de la concentration en amine, nous avons réalisé des analyses par spectroscopie infrarouge des milieux réactionnels.

1) Une solution d'acide myristique **2** (175 mM) dans le 2-méthylbutan-2-ol est analysée. Nous observons une bande à 1710 cm^{-1} correspondant au carboxyle acide (COOH).

2) L'addition dans le milieu de différentes concentrations de *sec*-butylamine **4** (50, 100, 175 et 250 mM) conduit à la formation du complexe salin, qui est visualisé par la diminution de la bande caractéristique du carboxyle acide et par l'apparition d'une bande caractéristique des carboxylates à 1562 cm^{-1}.

La figure 42 présente les spectres infrarouges obtenus en présence et en absence d'amine :

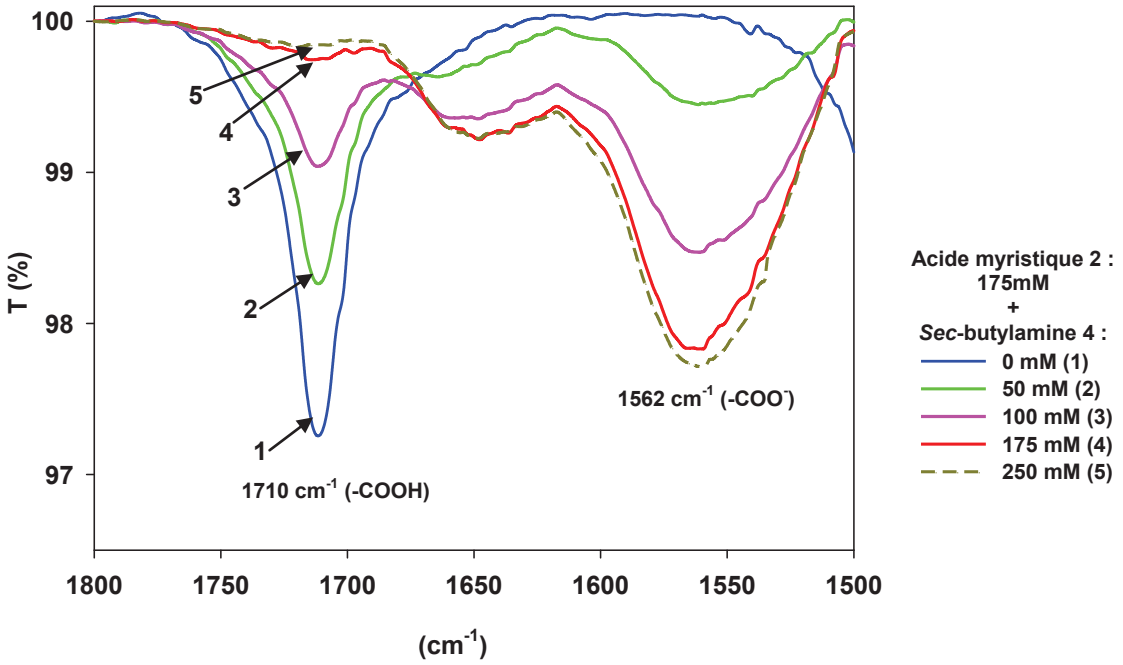
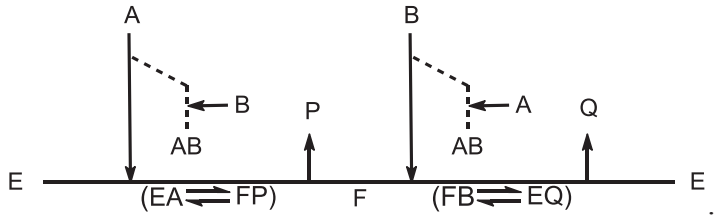


Figure 42 : *Spectres infrarouges obtenus lors de l'analyse de plusieurs échantillons contenant 175 mM d'acide myristique **2** et différentes concentrations de sec-butylamine **4** dans le 2-méthylbutan-2-ol.*

Nous remarquons, que pour 175 mM d'acide myristique **2** et des concentrations en *sec*-butylamine **4** de 50 à 250 mM, plus la concentration en amine augmente et plus la bande caractéristique du carboxyle acide diminue. L'acide myristique **2** qui se trouve alors sous forme carboxylate, n'est plus substrat de la lipase B de *Candida antarctica*. Ceci explique en partie une diminution des v_i de synthèses observées précédemment.

L'inhibition par formation de ce complexe salin serait donc due à l'effet d'un substrat sur l'autre substrat comme décrit schéma 7 plutôt qu'à un effet inhibiteur des substrats sur l'enzyme comme décrit couramment par les mécanismes d'inhibition compétitive (schéma 6).



*A et B représentent respectivement les substrats **2** et **4**.*
*P et Q représentent respectivement l'eau et le produit **5**.*
E représente l'enzyme.
F représente l'intermédiaire acyl-enzyme.
*AB représente le complexe salin entre l'acide myristique **2** et la sec-butylamine **4**.*

Schéma 7 : *Représentation du mécanisme enzymatique ping pong bi-bi à l'état stationnaire général avec double inhibition par formation d'un complexe salin entre les substrats.*

Les valeurs des paramètres cinétiques apparents V_{max}^{app} et K_{mB}^{app} calculées pour 175 mM d'acide myristique **2** ont été obtenues par rapport aux régressions linéaires des représentations de Lineweaver-Burk et sont décrites tableau 14.

Tableau 14 : *Paramètres cinétiques apparents de l'acylation de la (R)-sec-butylamine (R)-**4** et de la (S)-sec-butylamine (S)-**4** à partir de 175 mM d'acide myristique **2** comme donneur d'acyle et de 25 – 350 mM de l'amine **4** comme accepteur d'acyle dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Substrat B	K_{mB}^{app} (mM)	V_{max}^{app} ($mmol.h^{-1}.g^{-1}$)	Efficacité catalytique apparente (V_{max}^{app} / K_{mB}^{app}) ($l.h^{-1}.g^{-1}$)
(R)-*sec*-butylamine (R)-**4**	**619**	**0,21**	**3,36 . 10^{-4}**
(S)-*sec*-butylamine (S)-**4**	**120**	**0,03**	**2,5 . 10^{-4}**

Ces résultats fournissent des informations sur l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* envers la N-acylation de la *sec*-butylamine **4** par hydrolyse inverse. Tout d'abord, la V_{max}^{app} de la production de l'amide **5** à partir de la conformation R (0,21 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) est environ 7 fois plus élevée que la V_{max}^{app} obtenue à partir de la conformation S (0,03 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$). D'autre part, le K_{mB}^{app} de l'énantiomère R (619 mM) est environ 5 fois plus élevé que celui de l'énantiomère S (120 mM) ce qui révèle une affinité préférentielle de la lipase en faveur de l'énantiomère S. Néanmoins, l'efficacité catalytique résultant de l'acylation de l'énantiomère R (3,36 . 10^{-4} $l.h^{-1}.g^{-1}$) est plus élevée que l'efficacité catalytique obtenue pour l'acylation de l'énantiomère S (2,5 . 10^{-4} $l.h^{-1}.g^{-1}$), ce qui signifie que la lipase B de *Candida antarctica* possède une énantiosélectivité préférentielle envers la N-acylation de

l'énantiomère R principalement due à une meilleure vitesse de catalyse de cet énantiomère R. Ceci est confirmé par le calcul de la valeur du rapport E de 1,3 (équation 2) en faveur de l'énantiomère R, pour 175 mM d'acide myristique **2** au départ.

IV. Conclusion

Lors de cette partie de notre travail, nous avons étudié la O-acylation des énantiomères purs du butan-2-ol **1** et la N-acylation des énantiomères purs de la *sec*-butylamine **4** catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* à partir de l'acide myristique **2** dans le 2-méthylbutan-2-ol. Les rendements à l'équilibre thermodynamique et les vitesses initiales des réactions ont été mesurés afin de mettre en évidence le comportement cinétique et la sélectivité de la lipase.

Dans les meilleures conditions de O-acylation testées, des rendements de synthèses similaires (près de 65%, 16 mM) ont été observés après 48 heures pour la conversion du (R)-butan-2-ol (R)-**1** ou du (S)-butan-2-ol (S)-**1** en ester **3** (R et S). D'autre part, pour les conditions optimales de N-acylation, nous observons une préférence marquée pour la conversion de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** en amide **5** qui atteint un rendement élevé de 84% (21 mM) lorsque la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** est utilisée en faible excès, alors que seulement 25% de la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4** est convertie dans les conditions optimales. Ces résultats présentent un intérêt dans l'utilisation potentielle de la lipase B de *Candida antarctica* pour l'acylation biotechnologique sélective des amino-alcools avec des rendements élevés.

En ce qui concerne les études cinétiques des réactions, les données expérimentales correspondant à la O-acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** et du (S)-butan-2-ol (S)-**1** peuvent être corrélées au modèle du mécanisme ordonné bi-bi à l'état stationnaire général, avec formation d'un complexe ternaire. De plus, aucune forme d'inhibition n'est observée.

Le mécanisme réactionnel obtenu lors de la N-acylation de l'amine est complètement différent de celui décrit précédemment pour la O-acylation de l'alcool par la lipase. Les données cinétiques de la N-acylation de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** et de la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4** peuvent être corrélées à un mécanisme ping pong bi-bi à l'état stationnaire général pour les plus faibles concentrations testées pour les deux substrats. Lors de ces réactions de N-acylation la formation d'un complexe salin entre la *sec*-butylamine **4** et l'acide myristique **2** a été mise en évidence. Ce complexe serait la cause la plus probable d'un phénomène d'inhibition observé pour les plus fortes concentrations en substrats.

Concernant les études portant sur l'énantiosélectivité, la lipase B de *Candida antarctica* catalyse ici préférentiellement la O-acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** tant en termes d'activité

catalytique que d'affinité, la valeur calculée pour E proche de 3 a confirmé l'énantiosélectivité préférentielle pour la O-acylation de l'énantiomère R. La N-acylation de la *sec*-butylamine **4** a également montré une faible énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* en faveur de l'énantiomère R, donnant une valeur pour E de 1,34. Néanmoins, la N-acylation de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** a démontré des vitesses initiales et des rendements plus élevés que ceux de la N-acylation de la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4**, alors que l'affinité de la lipase est plus faible pour la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4** que pour la (S)-*sec*-butylamine (S)-**4**. L'énantiosélectivité préférentielle en faveur de l'énantiomère R, de la lipase B de *Candida antarctica* lors de la N-acylation de la *sec*-butylamine **4** trouve en fait son origine principalement dans une différence des vitesses de catalyse et donc dans l'activité catalytique plutôt que dans une différence d'affinité envers les énantiomères R et S.

Enfin, en comparant les résultats obtenus séparément lors de l'acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** et de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4**, la chimiosélectivité (C) est évaluée par rapport aux efficacités catalytiques apparentes (équation 3). La valeur calculée pour C de 92 démontre la chimiosélectivité préférentielle de la lipase en faveur de la O-acylation. In vivo, les lipases sont des acyl-hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des esters (Plou *et al.*, 1996 ; Fickers *et al.*, 2008). Il semble donc cohérent que la lipase B de *Candida antarctica* soit chimiosélective pour la O-acylation du (R)-butan-2-ol (R)-**1** plutôt que pour la N-acylation de la (R)-*sec*-butylamine (R)-**4**.

Résultats et discussions

CHAPITRE III – PARTIE 2

<u>Partie 2 :</u> Étude structure-réactivité, lors de l'acylation enzymatique de différents accepteurs de groupement acyle dans le 2-méthylbutan-2-ol

Partie 2 : Étude structure-réactivité, lors de l'acylation enzymatique de différents accepteurs de groupement acyle dans le 2-méthylbutan-2-ol

I. Introduction

Actuellement, seules quelques études concernent l'acylation enzymatique en solvants organiques de molécules difonctionnelles présentant à la fois des groupements amines et alcools, comme l'éthanolamine, le 6-aminohexan-1-ol, la sérine et d'autres amino-alcools avec une longueur de chaîne carbonée variable (Kanerva *et al.,* 1992 ; Furutani *et al.,* 1996 ; Fernandez-Perez et Otero, 2001 ; Fernandez-Perez et Otero, 2003 ; Torre *et al.,* 2006). Dans de telles réactions, la O-acylation ou la N-acylation sont souvent catalysées sélectivement par des lipases.

Lors de cette partie, nous étudierons l'influence de la structure du nucléophile sur la réactivité de la lipase B de *Candida antarctica*. Pour réaliser cette étude des réactions d'acylation seront menées avec plusieurs accepteurs de groupement acyle qui diffèrent par leur structure (longueur de la chaîne carbonée), la nature de leurs groupements fonctionnels (CH_3, OH, OCH_3, NH_2) et leur polarité : alcool, amine, diol, di-amine, méthoxy-amine et quatre amino-alcools.

Par l'intermédiaire d'une étude cinétique des réactions d'acylation, nous cherchons également à identifier les paramètres cinétiques apparents : les V_{max}^{app} de conversion de l'acide gras, de O-acylation et de N-acylation, ainsi que les K_{mB}^{app} des accepteurs d'acyle.

II. Étude de l'acylation de l'alaninol dans le 2-méthylbutan-2-ol en présence de la lipase B de *Candida antarctica*

L'acylation de l'alaninol **6** (2-aminopropan-1-ol) à partir de l'acide myristique **2** comme donneur d'acyle est choisie ici comme réaction modèle pour la détermination des paramètres cinétiques, lors de l'acylation d'un amino-alcool. Cet amino-alcool possède une chaine carbonée composée de 2 carbones entre sa fonction alcool et sa fonction amine (fonction alcool en position β de la fonction amine). L'alaninol **6** est utilisé pour réagir avec l'acide myristique **2** en présence de 5 g/l de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C. Cet amino-alcool peut théoriquement produire trois dérivés issus de son acylation : le O-myristyl 2-aminopropan-1-ol **7**, le N-myristyl 2-aminopropan-1-ol **8** et le O,N-dimyristyl 2-aminopropan-1-ol **9** (schéma 8).

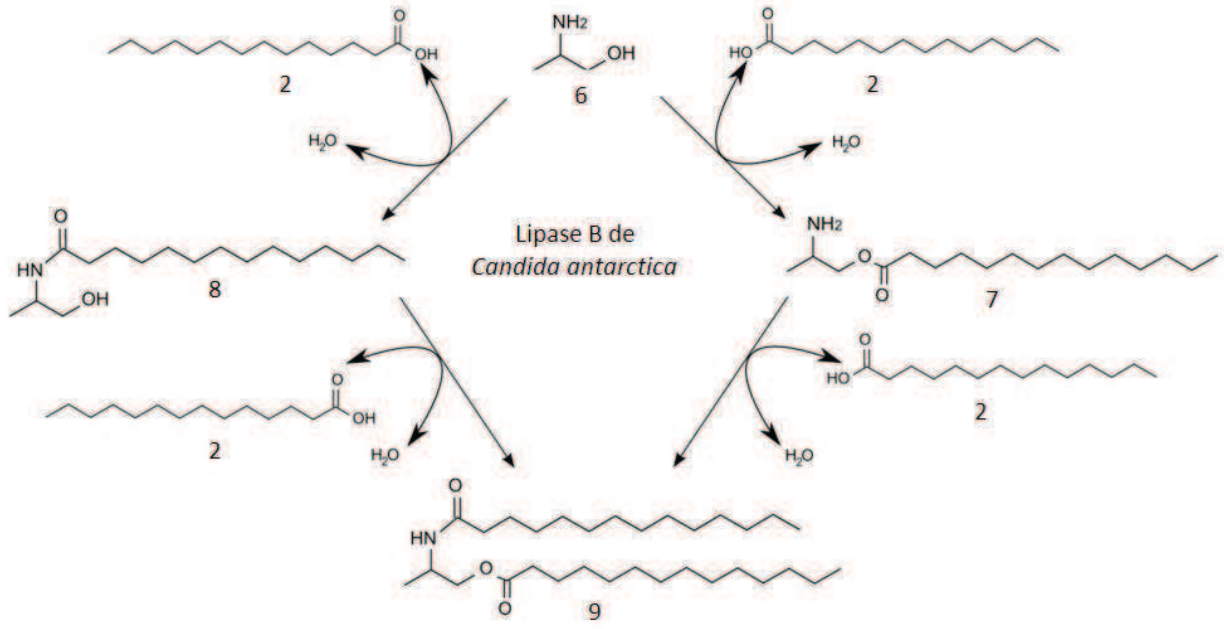


Schéma 8 : *Réactions potentielles entre l'alaninol* ***6*** *et l'acide myristique* ***2*** *en présence de la lipase B de Candida antarctica.*

Nous avons fait varier les concentrations en alaninol **6** de 25 mM à 350 mM (25, 35, 50, 100, 130, 175, 250 et 350 mM) et la concentration en acide myristique **2** a été fixée à 175mM, dans le but de déterminer l'effet de la concentration en amino-alcool sur la réactivité et la sélectivité de la lipase.

La figure 43 montre les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons prélevés à différents temps de réaction.

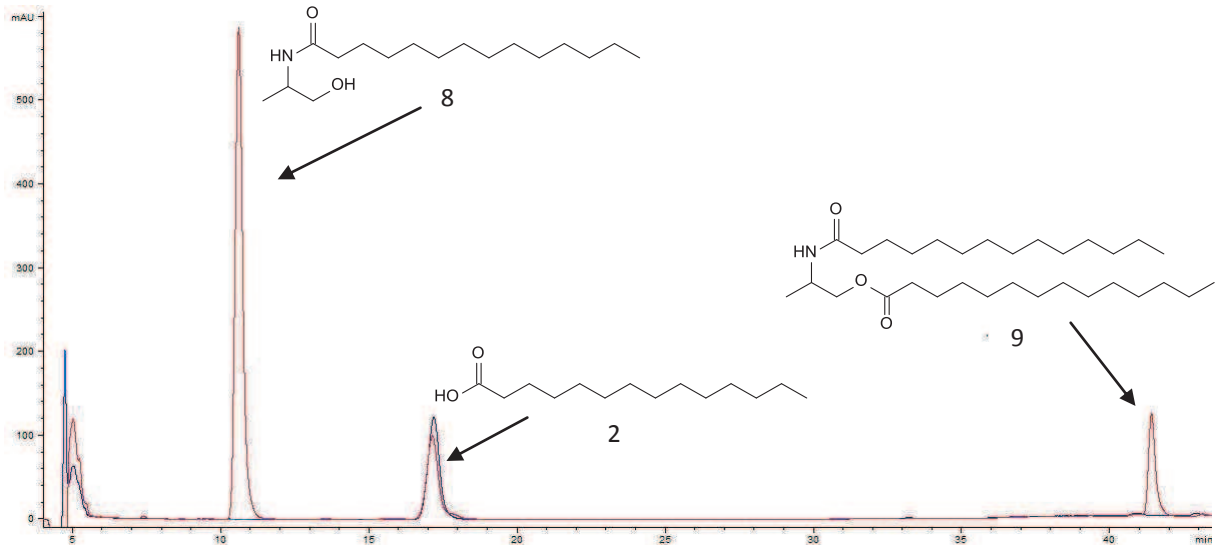


Figure 43 : *Chromatogrammes CLHP de l'acylation de l'alaninol* ***6*** *(25 mM) par l'acide myristique* ***2*** *(175 mM). Détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant à la réaction à l'instant t = 0 et chromatogramme rouge correspondant à la réaction à l'instant t = 48h. Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°4, gradient de solvants N°2 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Dans ces conditions de séparations seul l'acide myristique **2** (tr = 17 minutes), le N-myristyl 2-aminopropan-1-ol **8** (tr = 10,5 minutes) et le O,N-dimyristyl 2-aminopropan-1-ol **9** (tr = 41,5 minutes) sont détectés. La disparition au cours du temps de l'acide myristique **2** est concomitante avec l'apparition de l'amide **8** et de l'amido-ester **9**. Les produits **8** et **9** ont été caractérisés par SM, IR et RMN après purification. L'analyse des données montre une sélectivité élevée de la lipase en faveur de la N-acylation. En effet, aucun produit de mono-O-acylation **7** n'est détecté. En absence d'enzyme, aucune apparition de produit n'est observée après 96 heures.

L'étude par spectrométrie de masse a été réalisée par « ElectroSpray Ionization » en mode positif. Le produit mono-acylé possède théoriquement une masse moléculaire de 285,47 $g.mol^{-1}$. Il correspond au couplage d'une molécule d'acide myristique **2** (228,37 $g.mol^{-1}$) sur l'alaninol **6** (75,11 $g.mol^{-1}$) avec perte d'une molécule d'eau (18,01 $g.mol^{-1}$). Le produit di-acylé **9** possède quand à lui une masse moléculaire théorique de 495,83 $g.mol^{-1}$. Il correspond au couplage de deux molécules d'acide myristique **2** (2 X 228,37 $g.mol^{-1}$) sur l'alaninol **6** (75,11 $g.mol^{-1}$) avec perte de deux molécules d'eau (2 X 18,01 $g.mol^{-1}$). Les figures 44 et 45 illustrent les spectres SM^+ obtenus pour ces deux produits.

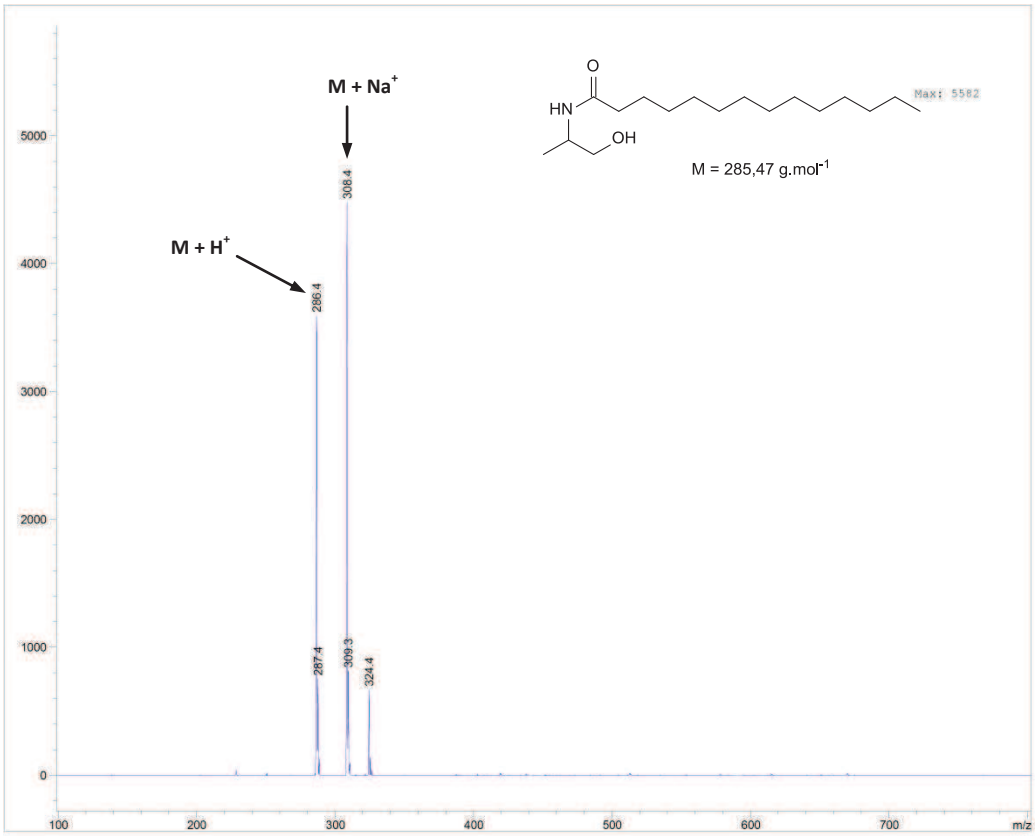


Figure 44 : *Spectre de masse obtenu en « ElectroSpray Ionization » en mode positif de l'amide **8** (286,4 m/z. [M+H+] ; 308,4 m/z [M+Na+]).*

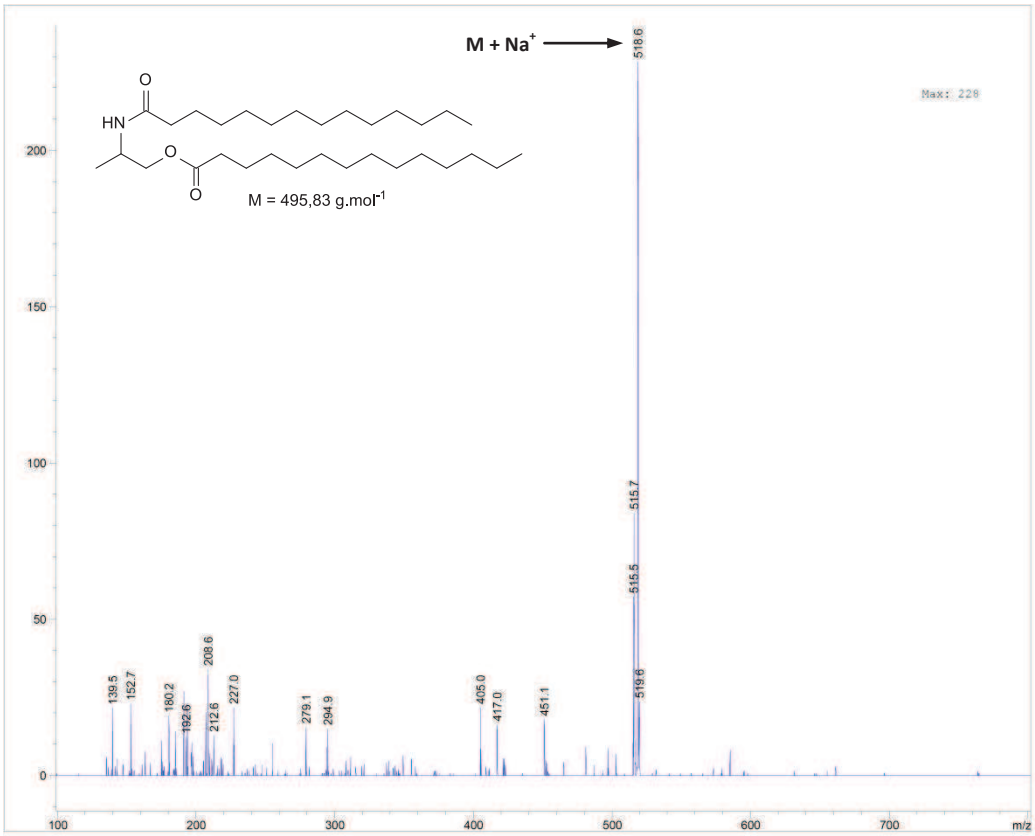


Figure 45 : *Spectre de masse obtenu en « ElectroSpray Ionization » en mode positif de l'amido-ester* ***9*** *(518,6 m/z [M+Na$^+$]).*

La figure 46 présente le spectre infrarouge de l'amide **8**. Au niveau des bandes d'élongation, nous observons une bande à 3300 cm^{-1} caractéristique des liaisons N-H des amides, plusieurs bandes de 2851-2956 cm^{-1} correspondant aux C-H de la molécule et en particulier de la chaine aliphatique et une bande à 1638 cm^{-1} qui est caractéristique d'un carbonyle d'une liaison amide. Au niveau des bandes de déformation, la bande à 1543 cm^{-1} est caractéristique des liaisons N-H des amides primaires.

Cette analyse combinée à l'analyse précédente par spectrométrie de masse, nous indique que le produit testé est bien un amide possédant une masse molaire correspondant à celle de l'amide **8**.

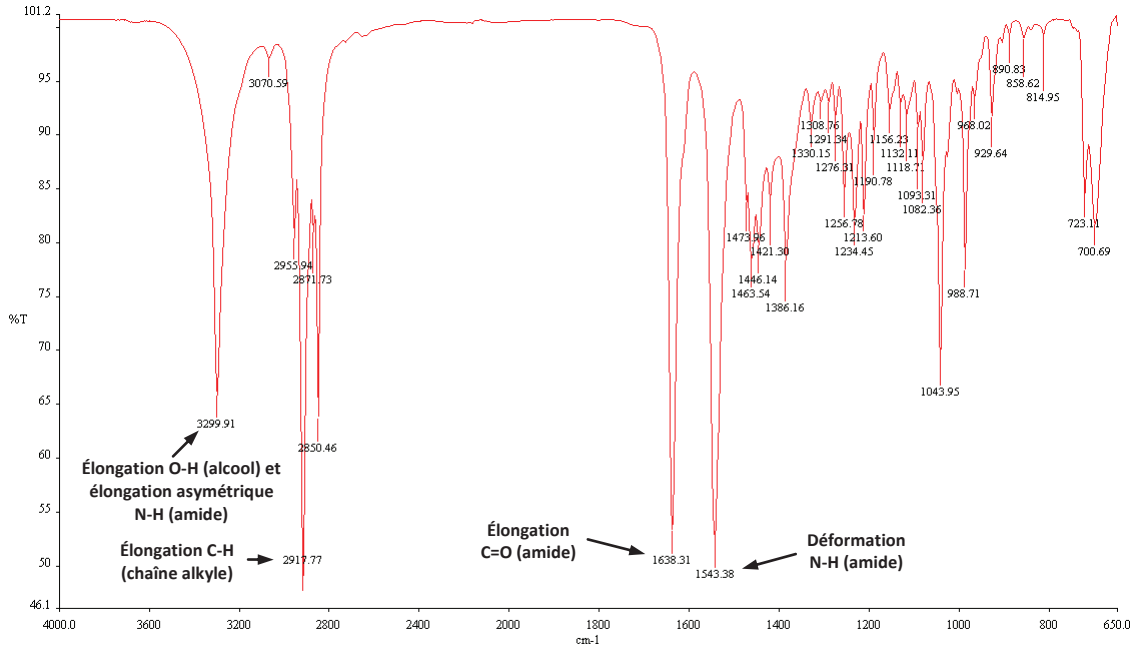


Figure 46 : *Analyse infrarouge de l'amide **8**.*

Nous avons également analysé l'amido-ester **9**. La figure 47 présente le spectre infrarouge de l'amido-ester **9**. Au niveau des bandes d'élongation, nous observons une bande à 3301 cm^{-1} caractéristique des liaisons N-H des amides, plusieurs bandes de 2849-2956 cm^{-1} correspondant aux C-H de la molécule et en particulier de la chaine aliphatique, une bande à 1737 cm^{-1} qui est caractéristique d'un carbonyle d'une liaison ester et une bande à 1643 cm^{-1} qui est caractéristique d'un carbonyle d'une liaison amide. Au niveau des bandes de déformation, la bande à 1541 cm^{-1} est caractéristique des liaisons N-H des amides primaires.

Cette analyse combinée à l'analyse précédente par spectrométrie de masse, nous indique que le produit testé est bien un amido-ester ayant une masse molaire correspondant à celle de l'amido-ester **9**.

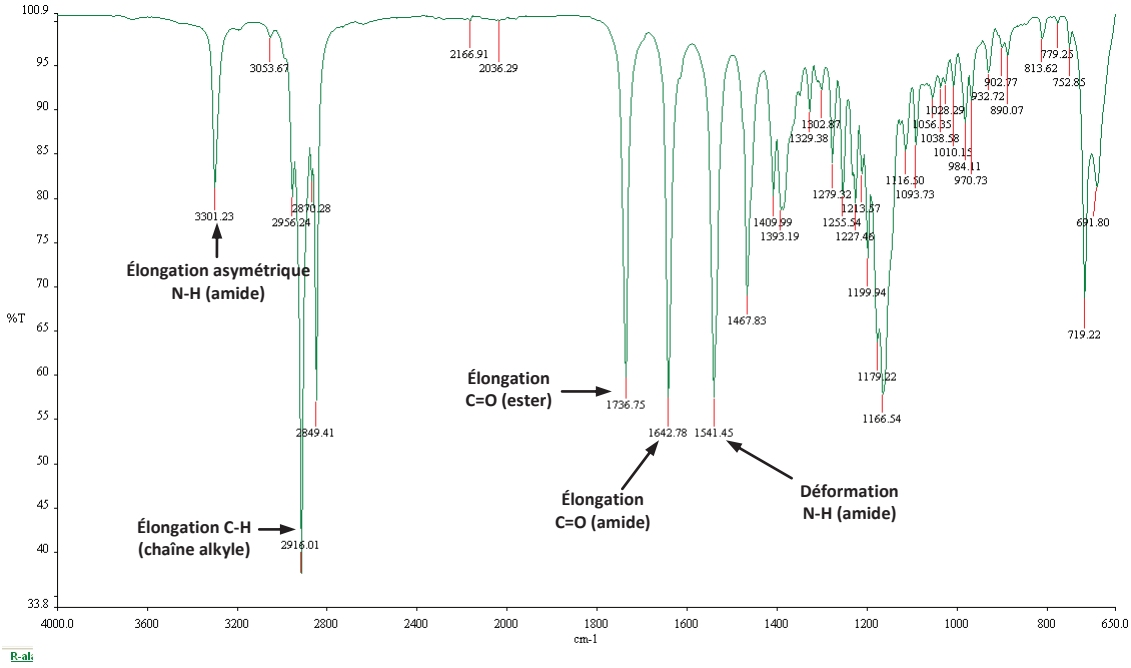


Figure 47 : *Analyse infrarouge de l'amido-ester* ***9****.*

Les analyses RMN figures 48 et 49 ont confirmé la structure des produits caractérisés précédemment par spectroscopie infrarouge et spectrométrie de masse.

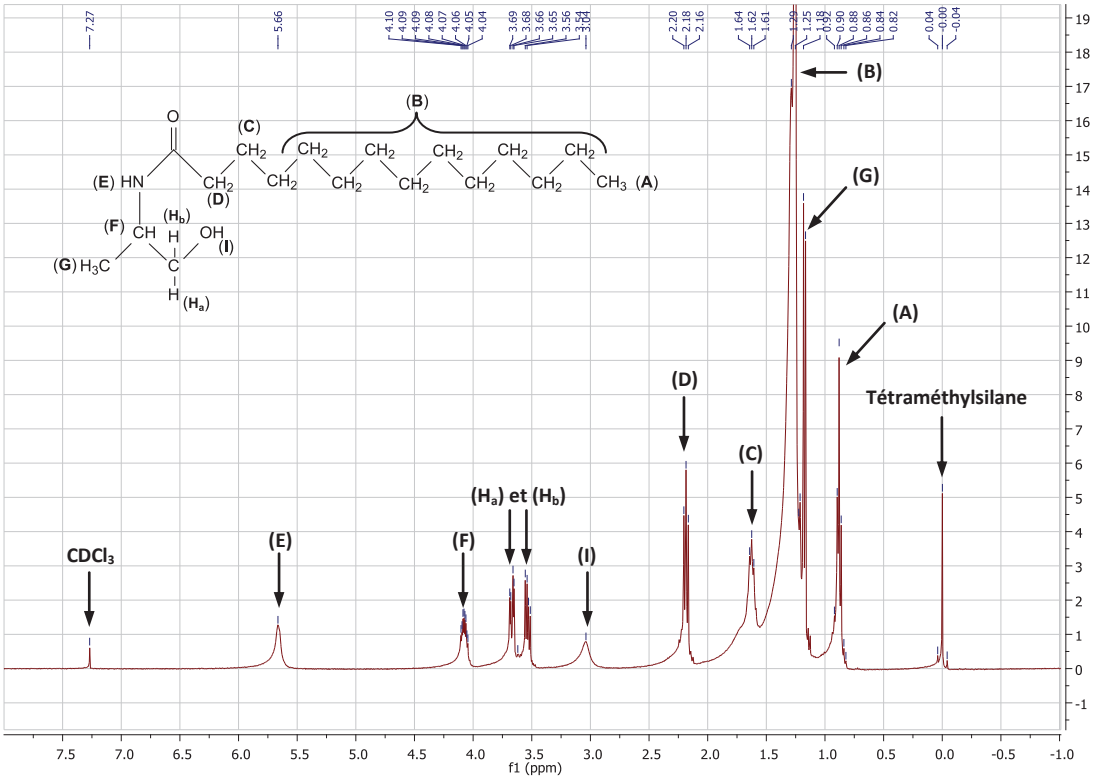


Figure 48 : *Analyse RMN* ^{1}H *de l'amide* ***8****.*

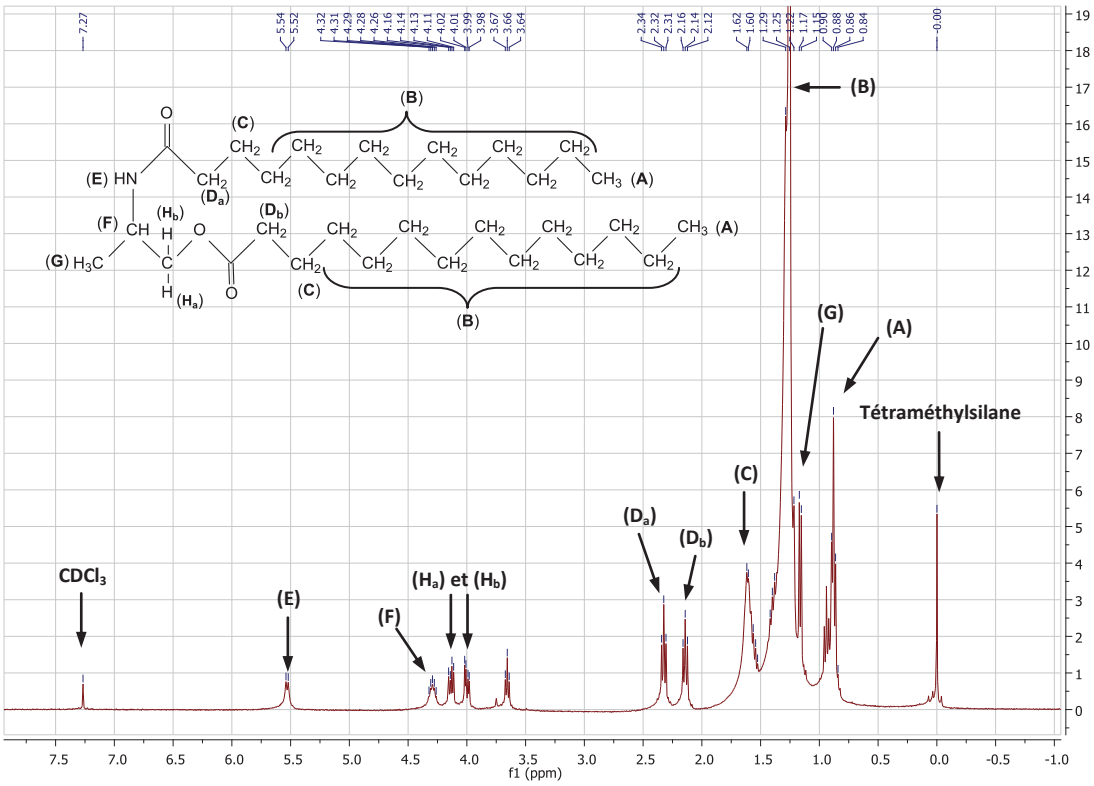


Figure 49 : *Analyse RMN ^1H de l'amido-ester **9**.*

Le descriptif exhaustif des résultats obtenus en RMN pour les deux produits est présenté dans le Chapitre II : Matériel et méthodes (V.3. et V.4.). L'analyse RMN ^1H de l'amide **8** laisse apparaitre un multiplet possédant un déplacement chimique de 1,25 ppm qui est caractéristique des protons CH_2 d'une chaine alkyle et dont l'intégration permet d'obtenir 20 protons, ce qui confirme la présence d'une chaine alkyle provenant de l'acide myristique. Ce composé **8** présente également un singulet possédant un déplacement chimique de 3,04 ppm caractéristique d'un proton d'une fonction –OH et un singulet à 5,7 ppm caractéristique d'un proton d'une fonction -NH- d'une liaison amide. Afin de confirmer la caractérisation de ces deux protons, du D_2O a été ajouté à l'échantillon avant de réaliser une seconde analyse RMN ^1H. Après comparaison des deux spectres, nous avons observé la disparition des singulets possédant des déplacements chimiques de 3,04 et 5,7 ppm en présence de D_2O. Ces résultats démontrent que ces deux singulets correspondent aux protons labiles de –OH et –NH- car il est reconnu que le D_2O peut réaliser des échanges Deurérieum/Proton avec les protons labiles d'une molécule. Ce type de phénomène étant nommé « échange au D_2O ».

L'analyse RMN ^{1}H de l'amido-ester **9** laisse apparaitre un multiplet possédant un déplacement chimique de 1,25 ppm qui est caractéristique des protons CH_2 d'une chaine alkyle et dont l'intégration permet d'obtenir 40 protons, ce qui confirme la présence de deux chaines alkyles provenant de l'acide myristique (2 x 20 protons). Ce composé **9**, contrairement au composé **8,** ne présente pas de singulet pouvant correspondre au proton d'une fonction -OH, par contre le singulet caractéristique du proton d'une fonction -NH- est observé et présente un déplacement chimique de 5,5 ppm.

Après avoir caractérisé les différents produits, nous avons pu concrétiser l'étude cinétique pour les différentes concentrations en alaninol **6**. Pour chaque concentration en alaninol **6** testée, nous avons suivi l'évolution des concentrations des substrats et des produits présents dans le milieu réactionnel au cours du temps (figure 50).

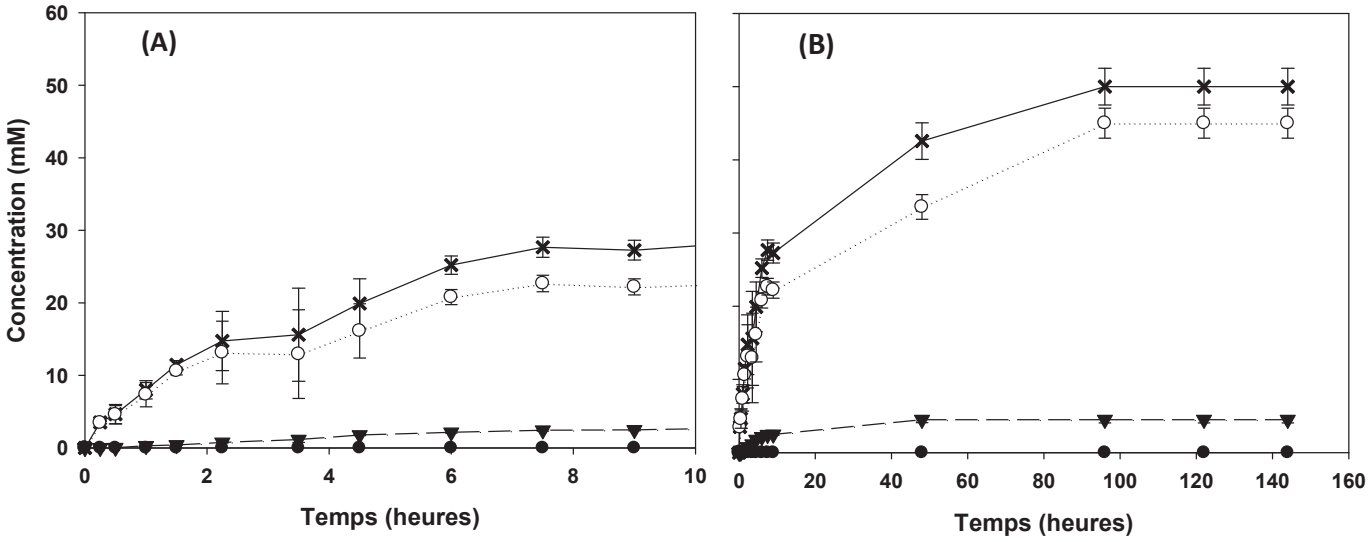


Figure 50 : *Suivis cinétiques des concentrations en acide myristique converti (**x**), en ester (●), en amide (○) et en amido-ester (▼) lors de l'acylation de 50 mM d'alaninol **6** par 175 mM d'acide myristique **2** sur 10h (A) et 144h (B). Conditions initiales : les réactions ont été réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol, pendant 144h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica immobilisée.*

En comparant les profils des suivis cinétiques, pour les différentes concentrations en alaninol **6**, il a ainsi été observé que dans tous les cas : les vitesses initiales (v_i) sont obtenues sur les 2 premières heures de réaction (figure 50(A)) et que l'équilibre thermodynamique de la réaction est atteint à partir de 96 heures de réaction (figure 50(B)).

À partir des v_i de conversion de l'acide myristique **2** et des v_i de N-acylation de l'alaninol **6**, nous avons réalisé les représentations de Lineweaver-Burk (figure 51), nous permettant ainsi de déterminer les paramètres cinétiques apparents de la réaction d'acylation de l'alaninol **6** par 175 mM d'acide myristique **2** catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*.

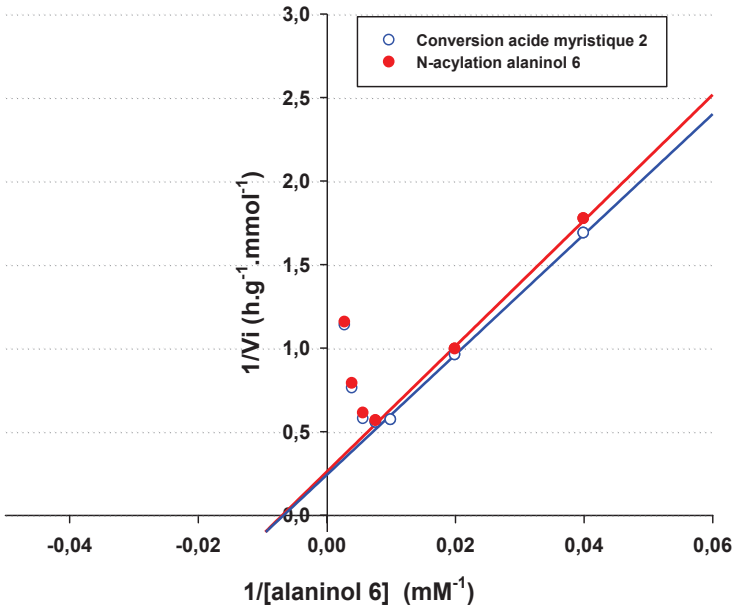


Figure 51 : *Linéarisation de Lineweaver-Burk de la réaction entre l'alaninol **6** et 175 mM d'acide myristique **2** en présence de 5 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol, à 55°C, basée sur les vitesses initiales (v_i) de conversion de l'acide myristique **2** (○) et les v_i de N-acylation de l'alaninol **6** (●).*

Les intersections des droites de régression obtenues avec l'axe des ordonnés permettent de déterminer les V_{max}^{app} obtenues pour l'acylation de l'alaninol **6** à partir de l'acide myristique **2**. Ces droites de régression en traits pleins sur la figure 51 sont réalisées à partir des concentrations en alaninol **6** les plus faibles (< 100 mM). Ainsi, pour les V_{max}^{app} de conversion de l'acide myristique **2** et de N-acylation de l'alaninol **6**, des valeurs de respectivement 4,9 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ et 4,3 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$sont observées. La différence entre ces deux vitesses correspond à la vitesse de synthèse du produit di-acylé (0,3 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$). De plus, l'intersection de la droite de régression obtenue pour la conversion de l'acide myristique **2** (figure 51, rouge) avec l'axe des abscisses permet de déterminer un K_{m6}^{app} de 183 mM correspondant au K_{mB}^{app} de l'alaninol **6**.

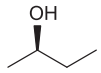
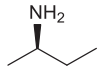
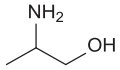
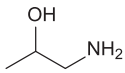
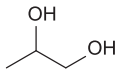
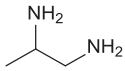
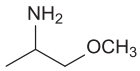
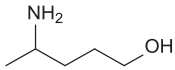
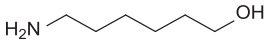
Par ailleurs, une augmentation des $1/v_i$ a été observée pour les plus faibles valeurs de 1/[alaninol **6**], donc les v_i diminuent pour les concentrations les plus élevées en amino-alcool (supérieures à 100 mM de l'alaninol **6**). Plus la concentration en alaninol **6** est en excès par rapport à l'acide myristique **2** (175 mM) plus les v_i diminuent. Ce phénomène est probablement due à la formation d'un complexe salin entre les substrats qui aboutit à une forme protonée de la fonction amine de l'alaninol **6** et une forme déprotonée de l'acide myristique **2**, toutes les deux pouvant être non réactives vis-à-vis de l'enzyme. Ce complexe salin a déjà été décrit et étudié précédemment dans notre travail, lors de l'acylation de l'amine **4** par l'acide myristique **2** (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 1, III).

III. Étude structure-réactivité des accepteurs de groupements acyle

Une étude cinétique similaire à celle réalisée sur l'acylation de l'alaninol **6** a été menée avec plusieurs accepteurs de groupement acyle à 55°C dans le 2-méthylbutan-2-ol en présence de la lipase B de *Candida antarctica.* L'acide myristique **2** (175 mM) est utilisé comme donneur d'acyle pour réaliser l'acylation de tous les accepteurs d'acyle testés : alcool, amine, diol, di-amine, méthoxy-amine et amino-alcools. Le tableau 15 illustre les différents nucléophiles utilisés.

Les paramètres cinétiques apparents (V_{max}^{app} et K_{mB}^{app}) ont été déterminés de la même façon que pour l'alaninol **6**. Les produits obtenus lors des différentes réactions ont été purifiés et caractérisés par SM, IR et RMN.

Tableau 15 : *Structure des nucléophiles utilisés comme accepteurs de groupement acyle.*

Structure	Nom de l'accepteur d'acyle
	(R)-butan-2-ol **1**
	(R)-*sec*-butylamine **4**
	Alaninol **6** (2-aminopropan-1-ol)
	Isopropanolamine **10** (1-aminopropan-2-ol)
	Propane-1,2-diol **11**
	1,2-diaminopropane **12**
	1-méthoxy-2-propylamine **13**
	4-aminopentan-1-ol **21**
	6-aminohexan-1-ol **22**

III.1. Effet des groupements fonctionnels sur les paramètres cinétiques

Les valeurs des paramètres cinétiques apparents V_{max}^{app} et K_{mB}^{app} calculées pour 175 mM d'acide myristique **2** ont été obtenues pour différents nucléophiles liés structurellement, après linéarisations de Lineweaver-Burk (figure 52).

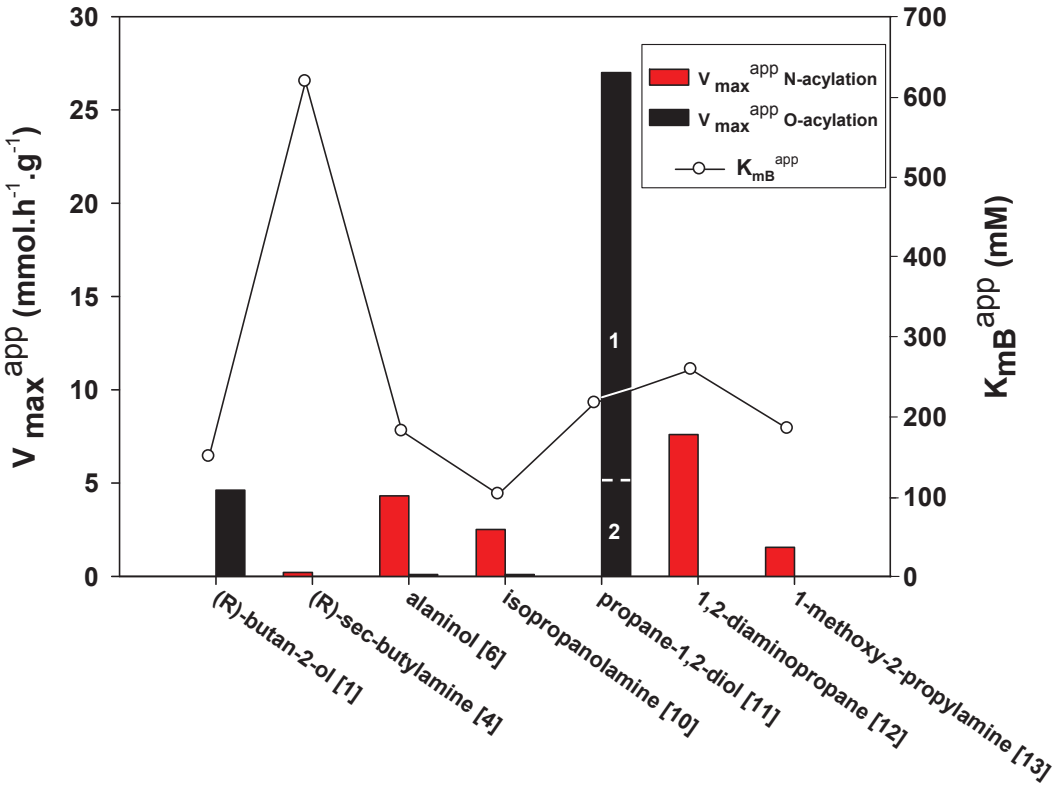


Figure 52 : *Représentation graphique des paramètres cinétiques apparents obtenus lors de l'acylation de plusieurs accepteurs de groupement acyle (**1**, **4**, **6**, **10**, **11**, **12** et **13**) par 175 mM d'acide myristique **2**. Les réactions sont catalysées par la lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Afin de faciliter la comparaison des paramètres cinétiques apparents obtenus pour les différents accepteurs d'acyle, les effets de la structure de l'accepteur d'acyle sur le K_{mB}^{app} et sur les V_{max}^{app} sont traités séparément.

III.1.1. Effet des groupements fonctionnels sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app})

Au niveau des K_{mB}^{app} (figure 52), concernant l'acylation des composés monofonctionnels, le K_{m4}^{app} (619 mM) de l'amine (R)-**4** est quatre fois plus élevé que K_{m1}^{app} (150 mM) de l'alcool (R)-**1**, démontrant ainsi une meilleure affinité de la lipase B de *Candida antarctica* envers l'alcool **1** comme décrit dans la partie 1 de nos travaux. En revanche, lors de l'acylation des composés difonctionnels possédant deux carbones entre les deux groupements fonctionnels et des structures proches (**6**, **10**, **11**, **12** et **13**), tous les K_{mB}^{app}

obtenus sont du même ordre de grandeur (K_{m6}^{app}= 182 mM, K_{m10}^{app}= 103 mM, K_{m11}^{app}= 217 mM, K_{m12}^{app}= 252 mM et K_{m13}^{app}= 185 mM). La lipase possède donc une affinité du même ordre pour ces différents substrats difonctionnels.

III.1.2. Effet des groupements fonctionnels sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app})

En observant les résultats obtenus lors de l'acylation de l'amino-alcool **6**, nous remarquons que la chimiosélectivité est très nettement en faveur de la V_{max}^{app} de N-acylation car aucun produit de mono-O-acylation n'a été détecté. Ces résultats sont en opposition avec ceux obtenus en comparant l'acylation du mono-alcool **1** et de la mono-amine **4**, lors de la partie 1 de nos travaux portant sur l'étude cinétique de l'acylation de composés monofonctionnels, qui démontrait une sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* envers la O-acylation en termes de V_{max}^{app}. Afin de mieux comprendre cette modification de la sélectivité, nous avons comparé les résultats obtenus pour différents accepteurs d'acyle possédant des structures proches de **1**, **4** et **6** avec des groupements fonctionnels différents :

i. Tout d'abord, les résultats issus de l'acylation de l'amino-alcool **6** qui possède une fonction alcool en β de la fonction amine sont comparés avec ceux issus de l'acylation de la mono-amine (R)-**4** qui possède uniquement une fonction amine et une structure proche de celle de l'amino-alcool **6** (figure 53).

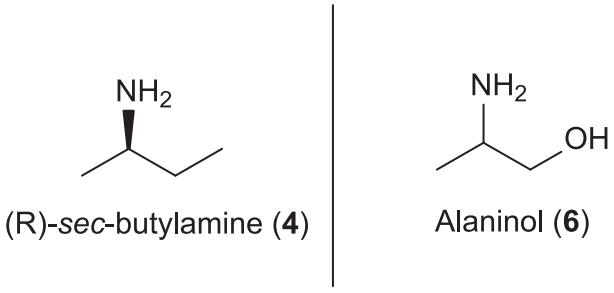


Figure 53 : *Structures de l'amine (R)-4 et de l'amino-alcool 6.*

Nous observons sur la figure 52 que la V_{max}^{app} de N-acylation de l'amine (R)-**4** (0,21 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) est 20 fois plus faible que la V_{max}^{app} de N-acylation de l'amino-alcool **6** (4,31 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$). D'après ces résultats, nous constatons qu'une fonction alcool présente en β de la fonction amine semble avoir un effet positif sur la V_{max}^{app} de N-acylation.

Nous avons également remarqué que lorsque nous comparons les vitesses de N-acylation de l'alaninol **6** (2-aminopropan-1-ol), avec celle d'un autre amino-alcool, l'isopropanolamine **10** (1-aminopropan-2-ol) pour lesquels les positions des fonctions sont interverties, des V_{max}^{app} de N-acylation du même ordre sont obtenues (4,30 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour **6** et 2,5 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour **10**) et dans les deux cas aucun produit de mono-O-acylation n'est

détecté (les produits obtenus à partir de **10** sont le N-myristyl 1-aminopropan-2-ol **14** et le O,N-dimyristyl 1-aminopropan-2-ol **15**). Ainsi, pour les deux amino-alcools (**6** et **10**) testés, les positions (1 ou 2) des fonctions alcools et amines, lorsque ces deux fonctions sont espacées de 2 carbones, ne semblent pas avoir d'influence sur la chimiosélectivité de la lipase en faveur de la V_{max}^{app} de N-acylation.

ii. Afin de déterminer si une fonction alcool en position β d'une autre fonction alcool a un effet sur la V_{max}^{app} de O-acylation, l'acylation d'un diol, le propane-1,2-diol **11**, a été effectuée. Des valeurs de V_{max}^{app} de O-acylation de 21,8 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ et de 5,1 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ ont été obtenues respectivement pour les groupements alcools en position 1 (synthèse de 1-O-myristyl propane-1,2-diol **16**) et 2 (synthèse de 2-O-myristyl propane-1,2-diol **17**). La lipase favorise donc l'acylation du diol **11** en position 1.

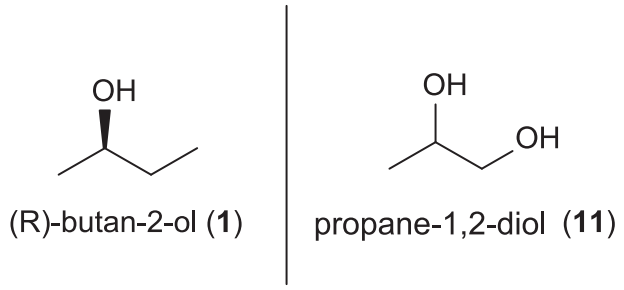
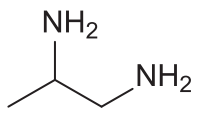


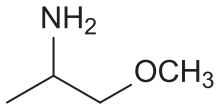
Figure 54 : *Structures de l'alcool (R)-**1** et du diol **11**.*

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus lors de l'acylation du mono-alcool (R)-**1** (figure 54), nous observons que les V_{max}^{app} de O-acylation des groupements alcools en position 2 du mono-alcool (R)-**1** (4,62 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) et du diol **11** (5,1 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) sont du même ordre de grandeur. Nous pouvons donc en déduire que dans le cas du diol **11** un groupement alcool en position β d'un autre groupement alcool n'a pas d'impact significatif sur la vitesse de O-acylation.

iii. Par la suite, afin de confirmer que la différence de vitesse de N-acylation entre l'amino-alcool **6** et l'amine (R)-**4** décrite dans le paragraphe i, provient bien de l'influence de la fonction positionnée en β de la fonction amine, nous comparons les vitesses de N-acylation de l'amine (R)-**4** et des amino-alcools **6** et **10** avec les résultats obtenus pour d'autres amines difonctionnelles. Ces amines possèdent des structures proches de l'amino-alcool **6** avec en position β soit un second groupement amine (**12**), soit un groupement méthoxy (**13**) (figure 55).



1,2-diaminopropane (**12**)



1-méthoxy-2-propylamine (**13**)

Figure 55 : *Structures de la di-amine **12** et de la méthoxy-amine **13**.*

Notons que dans le cas de la di-amine **12**, deux produits issus de N-acylation sont synthétisés : le 1-N-myristyl 1,2-diaminopropane **18** (mono-N-acylation) et le N,N-dimyristyl 1,2-diaminopropane **19** (di-N-acylation). La V_{max}^{app} de mono-N-acylation obtenue pour la di-amine **12** ne correspond donc qu'à l'acylation de la fonction amine en position 1.

Dans le cas de la méthoxy-amine **13**, un seul produit de N-acylation est obtenu (2-N-myristyl 1-méthoxy-2-propylamine **20**) car la fonction méthoxy n'est pas acylable.

A partir des V_{max}^{app} de N-acylation obtenues pour les différents nucléophiles qui sont décrites figure 52, nous pouvons classer ces substrats selon l'ordre suivant : di-amine **12** (7,6 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) > amino-alcools **6** et **10** (4,3 et 2,5 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) > méthoxy-amine **13** (1,6 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) >> amine (R)-**4** (0,2 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$).

L'ensemble de nos résultats nous permet de dire que la réaction de N-acylation catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans le 2-méthylbutan-2-ol est favorisée par la présence d'un second groupement nucléophile en position β de la fonction amine. L'effet positif sur la V_{max}^{app} de N-acylation est d'autant plus important que la fonction qui se trouve en β de la fonction amine est nucléophile ($-NH_2$ > -OH > $-OCH_3$). Ceci pourrait s'expliquer par une interaction entre la fonction amine et le groupement nucléophile situé en position β, qui serait à l'origine d'une augmentation de la réactivité de la fonction amine.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de la distance entre les fonctions amines et alcools, sur les paramètres cinétiques obtenus lors de l'acylation de trois amino-alcools par la lipase B de *Candida antarctica*.

III.2. Effet de la longueur de la chaine carbonée entre les fonctions amine et alcool lors de l'acylation d'amino-alcools

L'efficacité catalytique apparente de la O-acylation rapportée à celle de la N-acylation permet de calculer la chimiosélectivité de l'enzyme pour les réactions d'acylation, comme le décrit l'équation 3 (Chapitre III : Résultats et discussion – Partie 1, I). Dans notre cas, comme

le K_{mB}^{app} correspond à l'affinité de l'enzyme pour une molécule, il est identique lorsque les deux fonctions se trouvent sur la même molécule, nous pouvons donc ramener la chimiosélectivité à l'équation 8.

Équation 8 :

$$C = \frac{V\max_{O}^{app}}{V\max_{N}^{app}}$$

V_{max}^{app}: vitesse maximale apparente de la O-acylation ou de la N-acylation.

Pour étudier l'effet de la longueur de la chaine carbonée entre les fonctions amine et alcool sur la chimiosélectivité lors de l'acylation d'amino-alcools, nous avons mis en œuvre des réactions d'acylation avec des amino-alcools possédant des chaînes carbonées plus longues que l'alaninol **6** : le 4-aminopentan-1-ol **21** et le 6-aminohexan-1-ol **22** (figure 56). Dans le cas de l'amino-alcool **21**, trois produits sont détectés : le O-myristyl 4-aminopentan-1-ol **23**, le N-myristyl 4-aminopentan-1-ol **24** et le O,N-dimyristyl 4-aminopentan-1-ol **25**. Dans le cas de l'amino-alcool **22**, trois produits sont également détectés : le O-myristyl 6-aminohexan-1-ol **26**, le N-myristyl 6-aminohexan-1-ol **27** et le O,N-dimyristyl 6-aminohexan-1ol **28**.

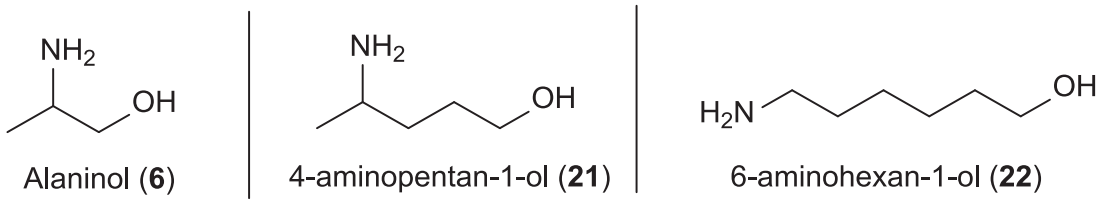


Figure 56 : *Structures des amino-alcools **6, 21** et **22**.*

Les valeurs des paramètres cinétiques apparents V_{max}^{app} et K_{mB}^{app} calculées pour 175 mM d'acide myristique **2** ont été obtenues après linéarisation de Linerweaver-Burk pour les différents amino-alcools et sont présentées sur la figure 57.

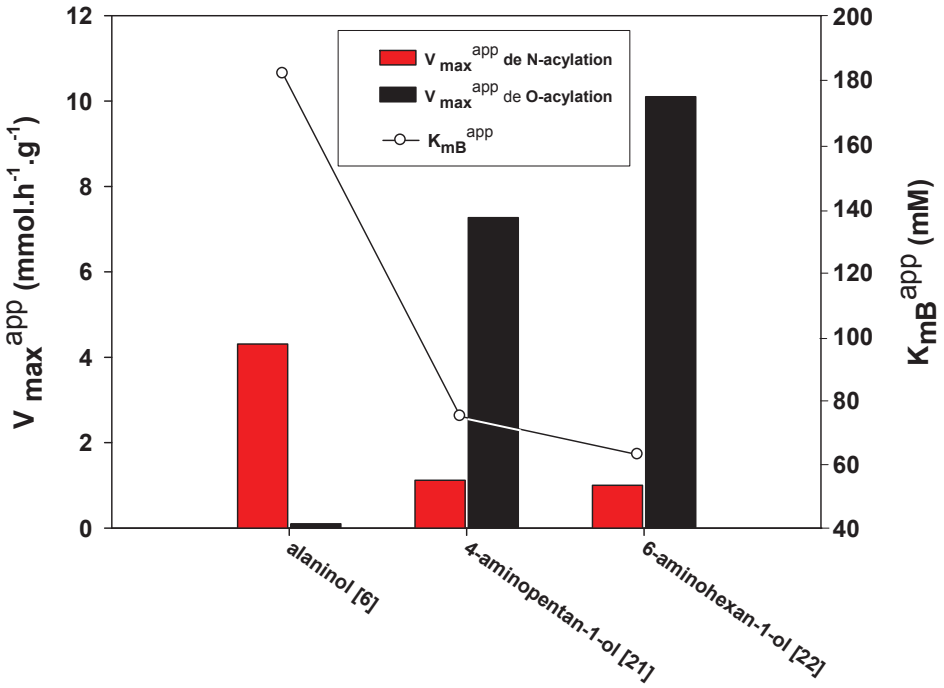


Figure 57 : *Représentation graphique des paramètres cinétiques apparents obtenus lors de l'acylation de plusieurs amino-alcools (**6**, **21** et **22**) par 175 mM d'acide myristique **2**. Les réactions sont catalysées par la lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Afin de faciliter la comparaison des paramètres cinétiques apparents obtenus pour les différents accepteurs d'acyle, les effets de la structure de l'accepteur d'acyle sur le K_{mB}^{app} et sur les V_{max}^{app} sont traités séparément.

III.2.1. Effet de la longueur de la chaine carbonée sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app})

Nous remarquons que les K_{mB}^{app} des amino-alcools à longues chaines carbonées sont du même ordre de grandeur : K_{m21}^{app}= 75 mM et K_{m22}^{app}= 63 mM (figure 57). Par ailleurs ces résultats témoignent d'une meilleure affinité de la lipase pour les amino-alcools **21** et **22** que pour l'amino-alcool à chaine courte **6** : K_{m6}^{app}= 182 mM. Cette différence d'affinité de la lipase pour les substrats selon la structure de l'amino-alcool, lors de réactions réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol, sera plus amplement détaillée dans la partie 3 de ce Chapitre III portant sur l'influence des solvants lors de l'acylation d'amino-alcools par la lipase B de *Candida antarctica*.

III.2.2. Effet de la longueur de la chaine carbonée sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app})

Pour les amino-alcools **6**, **21** et **22**, nous remarquons sur la figure 57 que les V_{max}^{app} de O-acylation augmentent avec la longueur de la chaine carbonée : aucune mono-O-acylation

pour l'amino-alcool **6** (2 carbones), une V_{max}^{app} de O-acylation de 7,3 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour l'amino-alcool **21** (4 carbones) et une V_{max}^{app} de O-acylation de 10,1 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour l'amino-alcool **22** (6 carbones). En parallèle, les V_{max}^{app} de N-acylation diminuent avec la longueur de la chaine carbonée : une V_{max}^{app} de N-acylation de 4,30 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour l'amino-alcool **6**, une V_{max}^{app} de N-acylation de 1,1 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour l'amino-alcool **21** et une V_{max}^{app} de N-acylation de 1 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ pour l'amino-alcool **22**. Ainsi, lors de l'acylation des amino-alcools **21** et **22** nous observons une inversion de la chimiosélectivité, par rapport à celle observée avec l'amino-alcool **6**. En effet, la chimiosélectivité est en faveur de la V_{max}^{app} de N-acylation pour l'amino-alcool **6** et aucun produit de mono-O-acylation n'a été détecté, alors que des valeurs de C de 6,6 et 10,1 en faveur de la O-acylation sont obtenues respectivement pour les amino-alcools **21** et **22**.

Á partir de ces résultats, nous pouvons dire que la lipase B de *Candida antarctica*, lors de l'acylation des amino-alcools à longues chaines **21** et **22**, montre une chimiosélectivité en faveur de la V_{max}^{app} de O-acylation qui devient plus prononcée quand la distance entre la fonction alcool et la fonction amine de ces substrats augmente. Ces résultats confirment ce qui a été observé précédemment et qui suggère que des interactions entre les fonctions alcool et amine favorisent la V_{max}^{app} de N-acylation de la fonction amine, lorsque la fonction alcool est en position β de la fonction amine (amino-alcool **6** à chaine courte). Ainsi, en augmentant la distance entre la fonction amine et la fonction alcool, les interactions possibles entre ces deux groupements diminuent, défavorisant ainsi la V_{max}^{app} de N-acylation et favorisant en parallèle la V_{max}^{app} de O-acylation (amino-alcools **21** et **22** à longues chaines).

IV. Hypothèse sur la N-acylation

Pour interpréter l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude structure-réactivité portant sur l'acylation de différentes amines (**4**, **12** et **13**) et de différents amino-alcools (**6**, **10**, **21** et **22**), nous avons formulé le postulat suivant : la présence d'un groupement nucléophile (-OCH_3, -OH ou –NH_2) en position β d'un groupement amine au niveau du substrat accepteur d'acyle, permet de favoriser la V_{max}^{app} de N-acylation de ce groupement amine. Ceci est probablement du à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le groupement amine et le groupement nucléophile situé en position β. De plus, la probabilité de former cette liaison est d'autant plus faible que la distance entre les deux groupements augmente (amino-alcools **21** et **22**).

A partir de ce postulat, nous proposons une hypothèse sur le mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la réaction de N-acylation des amino-alcools. Nous nous basons sur le mécanisme réactionnel général des lipases lors de la catalyse de réactions d'acylation (réaction d'hydrolyse inverse) et sur le site catalytique de la lipase B de *Candida antarctica* (Norin *et al.,* 1993 ; Uppenberg *et al.,* 1994 ; Egloff *et al.,* 1995a ; Yagnik *et al.,* 1997) comme décrit figure 58.

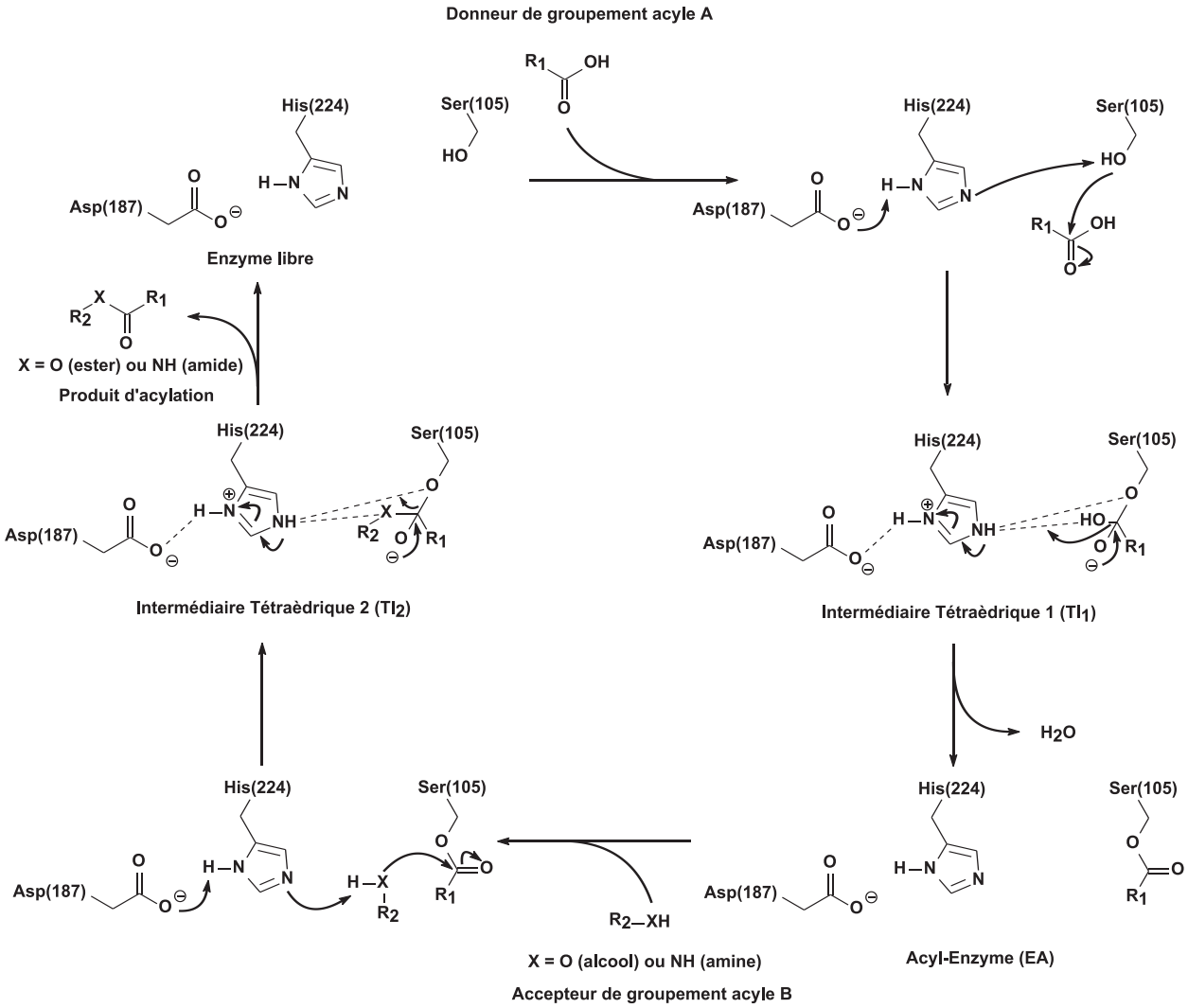


Figure 58 : *Mécanisme général de l'acylation d'alcools ou d'amines par la lipase B de Candida antarctica. La triade catalytique Ser(105), His(224) et Asp(187) de la lipase B de Candida antarctica est schématiquement représentée.*

Les lipases font partie de la famille des « hydrolases à sérine » dont le site actif est composé d'une triade catalytique comportant une sérine, une histidine et un acide aspartique/glutamique : Ser(105), His(224) et Asp(187) dans le cas de la lipase B de *Candida antarctica*. Dans l'étape initiale, le substrat donneur d'acyle **A** (dans le cas d'une acylation directe par hydrolyse inverse, **A** est un acide carboxylique) réagit avec l'enzyme **E** afin de former le complexe **EA** (acyl-enzyme). La réaction est initiée par l'attaque nucléophile de

l'hydroxyle de la Ser(105) sur le carbonyle de **A** pour former un premier intermédiaire tétraédrique covalent $\mathbf{TI_1}$. L'hydroxyle de **A** capte ensuite un proton provenant de la paire de résidus Asp(187)-His(224) : la liaison acide est alors rompue et une molécule d'eau est libérée (réaction d'hydrolyse inverse), permettant la formation du complexe **EA**. Dans un second temps, le substrat accepteur d'acyle **B** (alcool ou amine) attaque le complexe **EA**. La réaction est initiée par le noyau imidazole de l'His(224) qui capte un proton de la fonction alcool (ou amine) du substrat **B** ce qui augmente le caractère nucléophile de cette fonction et lui permet d'attaquer l'acyl-enzyme **EA** au niveau de la liaison Ser(105)O-**CO**-Acyle formant ainsi un second intermédiaire tétraédrique $\mathbf{TI_2}$ qui se dissocie facilement pour donner l'ester (ou l'amide) ainsi que l'enzyme libre.

La très faible V_{max}^{app} de N-acylation observée précédemment lors de l'acylation de l'amine (R)-**4** indique que l'attaque nucléophile de l'intermédiaire acyl-enzyme **EA** par la fonction amine concertée avec l'attaque d'un proton de la fonction amine par le noyau imidazole de l'His(224), n'est pas cinétiquement favorisée quand un groupement méthyle se trouve en position β de la fonction amine, en comparaison des vitesses de N-acylation plus élevées observées avec un groupement nucléophile en position β (di-amine **12**, méthoxy-amine **13**, amino-alcools **6** et **10**). Notre hypothèse pour expliquer cette différence de réactivité de la fonction amine est de considérer lors de la N-acylation des amino-alcools **6** et **10** à chaines courtes un mécanisme légèrement différent du mécanisme général de l'acylation décrit précédemment (figure 58). Nous considérons que le réseau de liaisons hydrogènes impliqué dans l'état de transition qui précède la formation du second intermédiaire tétraédrique $\mathbf{TI_2}$ joue un rôle essentiel dans la chimiosélectivité de la réaction. Le mécanisme que nous proposons implique une attaque nucléophile de Ser(105)O-**CO**-Acyle par l'azote de la fonction amine de l'amino-alcool, concertée avec un transfert intramoléculaire de proton du groupement amine au groupement alcool de l'amino-alcool concomitant avec un transfert de proton du groupement alcool de l'amino-alcool à l'His(224) de la triade catalytique comme décrit figure 59. Ce mécanisme aurait pour conséquence de favoriser l'attaque nucléophile de Ser(105)O-**CO**-Acyle par l'azote de la fonction amine de l'amino-alcool, rendu plus nucléophile, et d'augmenter ainsi la vitesse de N-acylation.

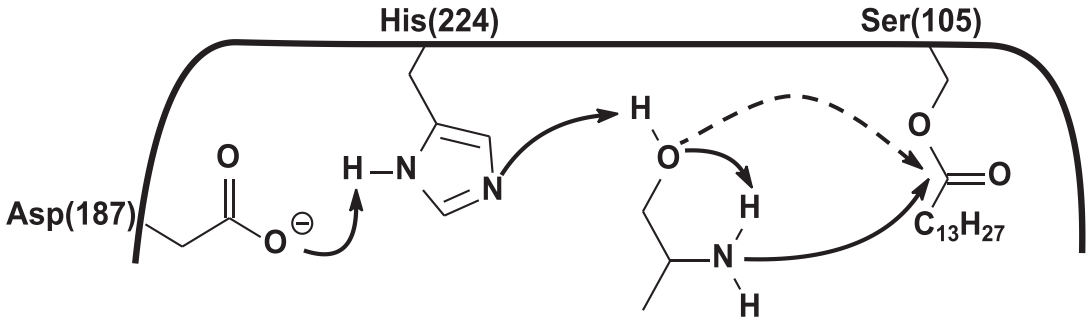


Figure 59 : *Mécanisme réactionnel proposé lors de l'acylation de l'alaninol **6** par la lipase B de Candida antarctica. La triade catalytique Ser(105), His(224) et Asp(187) de la lipase B de Candida antarctica est schématiquement représentée. Les flèches en gras et en traits pleins indiquent les attaques nucléophiles les plus probables. Les flèches en gras et en traits hachurés indiquent les attaques nucléophiles les moins probables. Le donneur d'acyle représenté est l'acide myristique **2**.*

L'hypothèse que nous proposons ici est également en accord avec les faibles V_{max}^{app} de N-acylation observées précédemment lors de l'acylation des amino-alcools **21** et **22** à longues chaines. En effet, dans le cas de ces amino-alcools, la longueur de la chaine carbonée entre les groupements alcool et amine est plus importante et donc la probabilité d'un transfert intramoléculaire de proton est défavorisée. Dans ces conditions, l'oxygène de la fonction alcool est donc libre et peut attaquer l'intermédiaire acyl-enzyme **EA** (figure 60) formant alors un second complexe tétraédrique $\mathbf{TI_2}$ qui se dissocie facilement pour donner l'ester comme décrit dans le mécanisme général figure 58. Ceci expliquerait l'augmentation des vitesses de O-acylation observée pour les amino-alcools **21** et **22** à longues chaines.

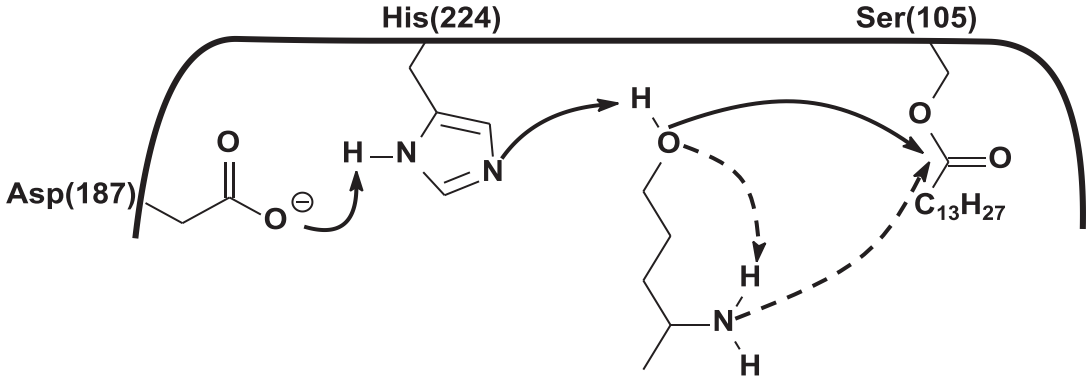


Figure 60 : *Mécanisme réactionnel proposé lors de l'acylation du 4-aminopentan-1-ol **21** par la lipase B de Candida antarctica. La triade catalytique Ser(105), His(224) et Asp(187) de la lipase B de Candida antarctica est schématiquement représentée. Les flèches en gras et en traits pleins indiquent les attaques nucléophiles les plus probables. Les flèches en gras et en traits hachurés indiquent les attaques nucléophiles les moins probables. Le donneur d'acyle représenté est l'acide myristique **2**.*

Des études récentes de modélisation moléculaire et des simulations de dynamique moléculaire de l'acylation des amino-alcools **6** et **21** par la lipase B de *Candida antarctica* semblent confirmer notre hypothèse (Syrén, 2011). Ces travaux ont été réalisés par l'équipe

du professeur Karl Hult, au sein du département de biochimie de l'Institut Royal de Technologie de Stockholm, dans le cadre d'une collaboration entre nos deux laboratoires.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une étude structure-réactivité en utilisant divers substrats (alcool, amine, diol, di-amine, méthoxy-amine et amino-alcools) comme accepteurs de groupement acyle lors de réactions d'acylation catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* à partir de l'acide myristique **2** comme donneur d'acyle dans le 2-méthylbutan-2-ol.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons dire que les réactions catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* dans un solvant protique polaire tel que le 2-méthylbutan-2-ol sont grandement influencées par la structure des accepteurs de groupement acyle, en particulier lors des réactions de N-acylation.

Nous avons ainsi observé l'importance de la présence d'un second groupement nucléophile en position β d'une fonction amine au sein de la structure du substrat accepteur de groupement acyle. Ce groupement en β influence nettement la chimiosélectivité des réactions en ayant un effet positif sur la V_{max}^{app} de N-acylation de la fonction amine qui se révèle d'autant plus important que la fonction qui se trouve en position β est nucléophile. Par ailleurs, au niveau de la chimiosélectivité des réactions, le rôle crucial de la longueur de la chaîne carbonée située entre les groupements alcool et amine a également été confirmé. La V_{max}^{app} de N-acylation est favorisée lorsque la chaîne carbonée comprend deux carbones (amino-alcools **6** et **10**), alors que la V_{max}^{app} de O-acylation est favorisée lorsque la chaîne carbonée comprend quatre carbones ou plus (amino-alcools **21** et **22**).

Les connaissances acquises lors de cette étude structure-réactivité nous ont permis de mieux comprendre les paramètres réactionnels et structuraux intervenant dans la chimiosélectivité de la lipase lors de l'acylation de substrats type amino-alcool. Ces connaissances seront utiles pour améliorer la compréhension des réactions d'acylation de substrats multifonctionnels possédant plusieurs groupements amines et/ou alcools, tels que par exemples : les amino-diols utilisés au cours de notre travail lors de la synthèse de pseudo-céramides (Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 4), mais également lors de l'acylation d'autres substrats tels que des sucres aminés (glucamines) ou des acides aminés (peptides).

Résultats et discussions

CHAPITRE III – PARTIE 3

Partie 3 : Influence du milieu réactionnel lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools

Partie 3 : Influence du milieu réactionnel lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools

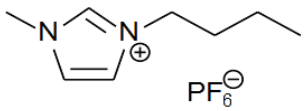
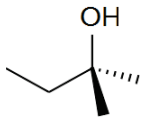
I. Introduction

Les réactions catalysées par des lipases sont nettement influencées par le milieu réactionnel. Au cours des dix dernières années, différentes études ont montré que l'activité, la stabilité et la sélectivité des enzymes peuvent être considérablement renforcées par un changement de milieu réactionnel (Kim *et al.*, 2001 ; Lozano *et al.*, 2001 ; Van Rantwijk *et al.*, 2003). Les solvants influencent ainsi les enzymes d'une manière complexe impliquant de nombreuses interactions entre le solvant, les substrats et l'enzyme.

La partie précédente de notre travail (Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 2) portait sur une étude structure-réactivité des accepteurs de groupements acyle, lors de réactions d'acylation catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* dans un seul solvant, le 2-méthylbutan-2-ol.

Dans cette nouvelle partie, nous étudierons l'effet du solvant sur l'activité et la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par rapport aux paramètres cinétiques, ainsi que sur les rendements de synthèse à l'équilibre thermodynamique. Afin de réaliser cette étude, l'acylation de trois amino-alcools (**6**, **21** et **22**) sera mise en œuvre dans trois solvants (tableau 16): deux solvants organiques aux polarités bien distinctes, le *n*-hexane (solvant aprotique apolaire) et le 2-méthylbutan-2-ol (solvant protique polaire) ; et un milieu de type liquide ionique, le 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate [Bmim] [PF_6].

Tableau 16 : *Solvants utilisés pour l'étude de l'influence du milieu réactionnel sur l'acylation d'amino-alcools catalysée par la lipase B de Candida antarctica.*

Solvant	**[Bmim] [PF_6]** [a]	**2-méthylbutan-2-ol**	***n*-hexane**
Type de solvant	Liquide ionique polaire	Solvant organique polaire protique	Solvant organique apolaire aprotique
Formule			
Log P [b]	-2,39	0,89	3,90

[a] *1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate.*
[b] *Logarithme du coefficient de partage du solvant au sein d'un système biphasique octanol/eau 50/50 (v/v) : il permet d'évaluer ses propriétés hydrophobes.*

Le choix du [Bmim] [PF_6] comme milieu de type liquide ionique s'est basé sur de nombreuses études antérieures qui ont démontré l'efficacité de ce liquide ionique comme solvant pour différentes réactions d'acylation catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* (Madeira lau *et al.,* 2000 ; Katsoura *et al.,* 2007 ; Dhake *et al.,* 2009 ; Husson *et al.,* 2009).

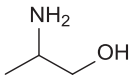
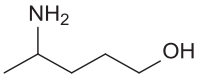
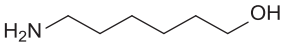
L'hydrophobicité des différents solvants a été estimée par rapport à leur valeur de Log P définie comme le logarithme de leur coefficient de partage au sein d'un mélange octanol-eau (Carrea *et al.*, 1995). Plus le Log P du solvant augmente, plus son hydrophobicité augmente. Les valeurs de Log P des différents solvants sont également décrites dans le tableau 16.

II. Influence du solvant sur les paramètres cinétiques apparents

Les études cinétiques portant sur l'acylation de l'alaninol **6** (ou 2-aminopropan-1-ol), du 4-aminopentan-1-ol **21** et du 6-aminohexan-1-ol **22** à partir de l'acide myristique **2**, dans les différents solvants, sont réalisées selon les mêmes conditions que dans la partie précédente (Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 2). Les concentrations en amino-alcools varient de 25 mM à 350 mM (25, 35, 50, 100, 130, 175, 250 et 350 mM) et la concentration en acide myristique **2** est fixée à 175 mM, dans le but de déterminer puis de comparer les paramètres cinétiques apparents (V_{max}^{app} et K_{mB}^{app}) relatifs aux réactions d'acylation pour les trois amino-alcools. Ces paramètres sont nécessaires pour évaluer l'effet de la nature du solvant sur l'activité et la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*.

Les paramètres cinétiques apparents obtenus pour les différentes réactions après linéarisation de Lineweaver-Burk, ainsi que les valeurs de Log P des trois amino-alcools sont décrits dans le tableau 17.

Tableau 17 : *Paramètres cinétiques apparents mesurés et chimiosélectivités calculées lors des réactions d'acylation des trois amino-alcools* ***6, 21*** *et* ***22*** *par 175 mM d'acide myristique* ***2*** *catalysées par la lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol, le n-hexane et le [Bmim][PF$_6$].*

Substrat B (accepteur d'acyle)	**Solvant**	V_{max}^{app} de conversion de l'acide myristique **2** (mmol. h^{-1}.g^{-1})	V_{max}^{app} de O-acylation (mmol. h^{-1}.g^{-1})	V_{max}^{app} de N-acylation (mmol. h^{-1}.g^{-1})	K_{mB}^{app} (mM)	C
Alaninol **6**	***n*-hexane**	30,3	1.2	9,7	18,7	0,1
	**2-méthylbutan-2-ol**	4,9	-	4,3	182	-
(Log P= -0,96)*	**[Bmim][PF$_6$]**	2,8	0,2	2,3	69,7	0,1
4-aminopentan-1-ol **21**	***n*-hexane**	20,4	19,6	-	35,3	-
	**2-méthylbutan-2-ol**	7,8	7,3	1,1	75	6,5
(Log P= -0,43)*	**[Bmim][PF$_6$]**	3,2	2,3	0	72,2	nd
6-aminohexan-1-ol **22**	***n*-hexane**	46,7	45,7	0,1	53	457
	**2-méthylbutan-2-ol**	11,5	10,1	1	63	10,7
(Log P= -0,01)*	**[Bmim][PF$_6$]**	3,7	3,5	0	45	nd

estimé par ACD/ChemSketch 2010 Version 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada).

Afin de faciliter la comparaison et l'interprétation des paramètres cinétiques apparents obtenus pour les différents amino-alcools, les effets du solvant sur le K_{mB}^{app} et sur les V_{max}^{app} sont traités séparément.

II.1. Influence du solvant sur les constantes apparentes de Michaelis-Menten (K_{mB}^{app})

Lorsque nous comparons les K_{mB}^{app} obtenus dans les trois milieux testés (tableau 17), nous observons dans le 2-méthylbutan-2-ol que l'amino-alcool à chaine courte **6** (Log P= -

0,96), qui est le substrat le plus hydrophile parmi ceux testés, présente un K_{m6}^{app} de 182 mM qui est environ 2,5 fois supérieur au K_{m21}^{app} (75 mM) et 3 fois supérieur au K_{m22}^{app} (63 mM) des amino-alcools à longues chaines **21** (Log P= -0,43) et **22** (Log P= -0,01). Ceci témoigne d'une meilleure affinité de l'enzyme pour les deux amino-alcools les moins hydrophiles (**21** et **22**) dans le 2-méthylbutan-2-ol, un solvant polaire hydrophile. Les mêmes tendances sont également observées dans le [Bmim] [PF_6]. Les valeurs du K_{m6}^{app} (69,7 mM) et du K_{m21}^{app} (72,2 mM) sont proches et sont environ 1,5 fois supérieures au K_{m22}^{app} (45 mM) obtenu avec l'amino-alcool **22** qui est le moins hydrophile des trois. Ceci témoigne d'une meilleure affinité de l'enzyme pour cet amino-alcool **22** dans le [Bmim] [PF_6], un liquide ionique polaire.

En revanche, dans le *n*-hexane, le K_{m22}^{app} (53mM) est 1,5 fois plus élevé que le K_{m21}^{app} (35,3 mM) et 3 fois plus élevé que le K_{m6}^{app} (18,7 mM) obtenu avec l'amino-alcool **6** qui est le plus hydrophile des trois (Log P= -0,96). Ceci témoigne d'une meilleure affinité de l'enzyme pour l'amino-alcool **6** dans le *n*-hexane, un solvant aprotique apolaire hydrophobe.

L'effet du solvant sur l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné est probablement lié à la solvatation de l'amino-alcool. Ainsi, plus l'amino-alcool aura d'affinité pour le solvant, moins il sera disponible pour l'enzyme (Reimann *et al.*, 1994 ; Schmitke *et al.*, 1996). Dans notre étude, la modification de l'affinité des substrats selon le milieu utilisé peut être corrélée avec le Log P qui correspond à l'hydrophobicité du solvant et des substrats utilisés.

Dans un milieu polaire hydrophile (2-méthylbutan-2-ol : Log P= 0,89 et [Bmim] [PF_6] : Log P= -2,39) (Kaar *et al.,* 2003) la solvatation des amino-alcools est d'autant plus importante que leur hydrophilicité augmente (Log P ↓). Ceci expliquerait la forte affinité de la lipase B de *Candida antarctica* pour l'amino-alcool **22** dans ce type de solvant car il est l'amino-alcool le plus hydrophobe parmi ceux testés et donc le moins solvaté.

A l'inverse, dans un milieu apolaire aprotique hydrophobe (*n*-hexane ; Log P= 3,90), la solvatation des amino-alcools est d'autant plus importante que leur hydrophobicité augmente (Log P ↑). Ceci expliquerait la forte affinité de la lipase B de *Candida antarctica* pour l'amino-alcool **6** dans ce type de solvant car il est l'amino-alcool le moins hydrophobe parmi ceux testés et donc le moins solvaté.

II.2. Influence du solvant sur les vitesses maximales apparentes (V_{max}^{app})

Comparons les réactions réalisées dans les deux solvants organiques, le 2-méthylbutan-2-ol et le *n*-hexane, au niveau des V_{max}^{app} de O-acylation et de N-acylation (tableau 17). La chimiosélectivité C calculée sur la base du rapport V_{max}^{app} de O-acylation / V_{max}^{app} de N-acylation (équation 8) est évaluée à 0,1 dans le cas de l'acylation de l'amino-alcool **6** dans le *n*-hexane, alors qu'elle est de 457 pour l'acylation de l'amino-alcool **22** dans le même solvant. Les mêmes tendances ont été observées lors de l'étude de la chimiosélectivité des réactions réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol. Dans ce solvant, nous avons observé une chimiosélectivité de la lipase en faveur de la V_{max}^{app} de N-acylation pour l'amino-alcool **6** (absence de mono-O-acylation) et des valeurs de C de 6,6 et 10,1 en faveur de la O-acylation pour les amino-alcools **21** et **22** (figure 57 et données tableau 17).

Au niveau de la chimiosélectivité de l'enzyme dans le liquide ionique [Bmim] [PF_6], nous remarquons que les tendances obtenues dans les solvants organiques sont maintenues. En effet, lors de l'acylation de l'amino-alcool **6**, la V_{max}^{app} de N-acylation (2,3 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) est bien supérieure à la V_{max}^{app} de O-acylation (0,2 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$) avec une valeur de C de 0,08. Pour les deux autres amino-alcools **21** et **22**, une chimiosélectivité en faveur de la O-acylation est quant à elle obtenue (absence de mono-N-acylation).

À partir de ces résultats, nous pouvons dire que dans les trois milieux testés, la lipase B de *Candida antarctica* possède une nette chimiosélectivité en faveur de la V_{max}^{app} de N-acylation dans le cas de l'amino-alcool **6** à chaine carbonée courte (2 carbones) et en faveur de la V_{max}^{app} de O-acylation dans le cas des amino-alcools **21** et **22** à longues chaînes (4 carbones ou plus). Cependant, si la chimiosélectivité de la lipase est peu influencée par le type de solvant utilisé, elle est en revanche influencée par la structure de l'amino-alcool, comme décrit lors de la précédente partie de notre travail (Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 2, III.2).

En ce qui concerne la conversion de l'acide myristique **2**, qui reflète l'activité catalytique totale de l'enzyme, nous remarquons que quel que soit l'amino-alcool testé, l'utilisation du *n*-hexane (Log P= 3,90) améliore la V_{max}^{app} de conversion de l'acide myristique **2** dans nos conditions expérimentales. En effet, lors de l'acylation de l'amino-alcool **6**, la V_{max}^{app} de conversion de l'acide myristique **2** dans le *n*-hexane (30,3 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$), est 6 fois plus importante que la V_{max}^{app} obtenue pour la même réaction dans le 2-

méthylbutan-2-ol (4,9 mmol.h^{-1}.g^{-1}) et elle est également 10 fois plus importante que la V_{max}^{app} de conversion obtenue dans le [Bmim] [PF_6] (2,8 mmol.h^{-1}.g^{-1}).

Il est reconnu que la polarité des milieux dits « non conventionnels » de types liquides (solvants organiques ou liquides ioniques) affecte l'activité catalytique des enzymes, les solvants polaires pouvant favoriser l'inactivation de l'enzyme. Ce type de comportement est probablement dû à un changement conformationnel au niveau de la structure globale de la protéine et/ou de son site catalytique. La mise en évidence de ces changements conformationnels en milieux organiques a été étudiée ces deux dernières décennies et constitue encore aujourd'hui un sujet d'étude important pour les enzymologistes (Soares *et al.,* 2003). De manière générale, la perte d'activité catalytique d'une enzyme en milieu organique faiblement hydraté peut être principalement attribuée à un phénomène de déshydratation de la protéine qui a déjà été observé dans plusieurs travaux concernant des lipases et utilisant des solvants possédant une valeur de Log P inférieure à 2 (solvants polaires) (Yahya *et al.*, 1998 ; Hari Krishna *et al.*, 2001 ; Iyer et Ananthanarayan, 2008). Cette déshydratation diminue lorsque le Log P du solvant augmente car plus le solvant est hydrophobe moins il est capable de solvater les molécules d'eau provenant de la couche d'hydratation de l'enzyme (Burke *et al.,* 1992 ; Akoh et Yee, 1998). La déshydratation de l'enzyme peut avoir deux conséquences :

- Un changement de conformation et de flexibilité de l'enzyme, du à l'agitation des molécules d'eau et à l'apport d'énergie sous forme d'échauffement qu'elle procure.
- Un effet négatif sur la stabilisation de l'état de transition et donc de l'activité catalytique, qui est indépendant d'un changement de conformation globale du site actif.

Les vitesses de conversion de l'acide myristique **2** les plus élevées obtenues dans le *n*-hexane peuvent donc être expliquées par le fait que le *n*-hexane est un solvant plus hydrophobe que les autres (Log P= 3,90), pour lequel la déshydratation de la lipase est limitée. De plus, le 2-méthylbutan-2-ol et le [Bmim] [PF_6] étant des solvants polaires (Log P < 1), ils sont susceptibles à la fois de favoriser la déshydratation de l'enzyme et d'interagir directement avec sa structure, ce qui peut mener à des changements conformationnels induisant une diminution d'activité.

Par ailleurs, l'étude comparative des V_{max}^{app} obtenues dans le [Bmim] [PF_6] avec celles obtenues dans les solvants organiques suggère que l'emploi du liquide ionique n'améliore pas

l'activité catalytique et a peu d'influence sur la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* lors de l'acylation de nos trois amino-alcools. Une explication aux vitesses moindres observées dans le [Bmim] [PF_6] est l'impact de la viscosité de ce liquide ionique qui peut être à l'origine d'un phénomène de limitation diffusionnelle des substrats dans le système réactionnel (Ha et Koo, 2011). En effet selon Park *et al.* (2003) les liquides ioniques possédant des anions fluorés font partie des liquides ioniques les plus visqueux et d'après Yang *et al*. (2005) l'activité enzymatique dépend plutôt de la viscosité que de la polarité du liquide ionique. La baisse des vitesses dans ce milieu peut également être expliquée par le fait que le [Bmim] [PF_6] est un sel. Il peut donc interagir avec le complexe salin formé entre l'acide gras et la fonction amine de l'amino-alcool (décrit précédemment Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 1, III). Ceci pourrait alors entraîner une modification de la réactivité des substrats au sein du site catalytique de l'enzyme.

D'autres études ont déjà démontré que certains liquides ioniques peuvent modifier l'état de charge des acides aminés du site catalytique de l'enzyme et ainsi influer directement sur la réactivité de l'enzyme et sa structure tridimensionnelle (Chiappe *et al.,* 2004 ; Pilissão et Nascimento, 2006 ; Dabirmanesh *et al.,* 2011). Il a également été observé que l'activité enzymatique en liquide ionique dépendait de certains anions tel que [PF_6], pouvant se lier à des sites chargés positivement au sein de la structure de la lipase et provoquer des changements de conformation dans cette structure (Sheldon *et al.*, 2002 ; Kaar *et al.*, 2003).

II.3. Bilan de l'influence du solvant sur les paramètres cinétiques apparents

Pour conclure cette partie, nous avons tout d'abord observé que les K_{mB}^{app} des trois amino-alcools testés, qui reflètent les affinités de ces substrats pour la lipase, sont nettement influencés par le solvant utilisé. Ceci est probablement causé par une modification de la solvatation des amino-alcools en fonction de l'hydrophobicité du solvant.

En revanche, à partir des V_{max}^{app} de N-acylation et de O-acylation reflètant la chimiosélectivité obtenue pour les trois amino-alcools, nous avons démontré que la nature du solvant n'a pas d'impact significatif sur la chimiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*. Cette chimiosélectivité est principalement affectée par la structure des amino-alcools plutôt que par la nature du solvant. En effet, quel que soit le solvant, la lipase favorise la V_{max}^{app} de N-acylation pour l'amino-alcool **6** à chaine courte alors qu'elle favorise plutôt la V_{max}^{app} de O-acylation avec les amino-alcools **21** et **22** à longues chaines.

Nous avons également pu observer à partir des V_{max}^{app} de conversion de l'acide myristique **2** que l'activité catalytique de la lipase B de *Candida antarctica* est influencée par la nature du solvant mis en œuvre. En effet, lors de l'acylation des trois amino-alcools testés (**6**, **21** et **22**), la réactivité de cette lipase augmente avec l'hydrophobicité du solvant et les meilleurs résultats sont ainsi obtenus dans le *n*-hexane (le solvant le plus hydrophobe parmi ceux utilisés). Par ailleurs, en ce qui concerne le [Bmim] [PF_6] (liquide ionique), sa viscosité et sa nature ionique semblent avoir un impact négatif sur l'activité catalytique de l'enzyme.

III. Influence du solvant sur la production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation d'amino-alcools

Des études antérieures ont démontré que la sélectivité des enzymes peut être contrôlée par un milieu réactionnel approprié, lors de la synthèse à l'équilibre thermodynamique de produits mono-acylés et di-acylés à partir de polyols (Rendon *et al.,* 2001 ; Liao *et al.,* 2003). Dans notre étude, la même approche a été étendue à l'acylation des amino-alcools par la lipase B de *Candida antarctica*. Afin de déterminer les conditions optimales pour la production par voie enzymatique de manière efficace et hautement sélective de composés mono-acylés (esters ou amides), l'effet de différents solvants sur la production à l'équilibre thermodynamique d'esters, d'amides ou d'amido-esters a été étudié.

Comme dans la partie précédente, les réactions ont été réalisées en utilisant différentes concentrations d'amino-alcools (25-350 mM) comme substrats accepteurs d'acyle et 175 mM d'acide myristique **2** comme donneur d'acyle. Les réactions sont effectuées dans trois solvants différents : le *n*-hexane, le 2-méthylbutan-2-ol et le [Bmim] [PF_6], et les concentrations en substrats et en produits, dans les milieux réactionnels, sont déterminées après que chaque réaction est atteint son équilibre thermodynamique. Les figures 61, 62 et 63 montrent l'effet des concentrations en amino-alcools **6**, **21** et **22** et l'effet de r : le rapport molaire [acide myristique **2**] / [amino-alcool] sur la distribution des produits après 96 heures d'acylation dans différents solvants. En effet, en comparant les profils des suivis cinétiques, au cours du temps, pour les différentes concentrations en amino-alcool dans les différents solvants, il a été observé que dans tous les cas l'équilibre thermodynamique de la réaction est atteint pour 96 heures de réaction.

III.1. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le 2-méthylbutan-2-ol

Pour commencer, nous avons examiné l'effet des concentrations en amino-alcools sur l'acylation enzymatique des amino-alcools **6**, **21** et **22** (structure : cf tableau 15 page 131) dans le 2-méthylbutan-2-ol, un solvant protique polaire. Les résultats sont illustrés sur la figure 61.

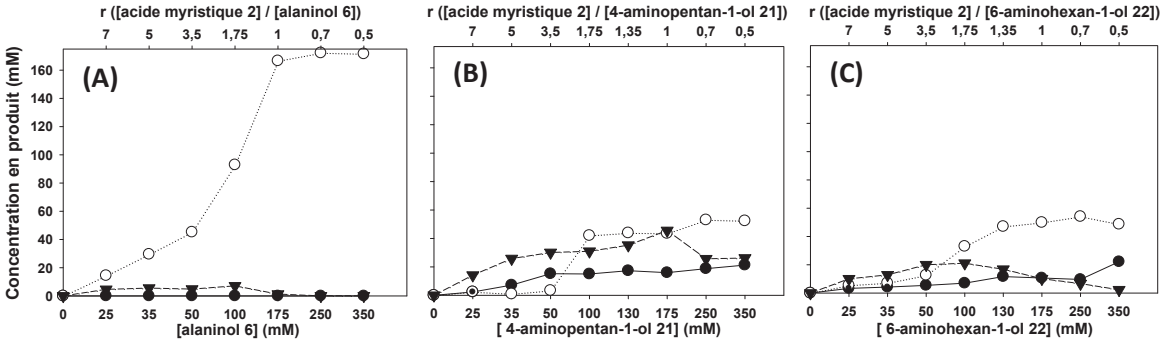


Figure 61 : *Influence de la concentration en amino-alcool et du rapport r =[acide myristique **2**]/[amino-alcool] sur la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique, ester (●), amide (○) et amido-ester (▼), lors de l'acylation de trois amino-alcools : alaninol **6** (A), 4-aminopentan-1-ol **21** (B) et 6-aminohexan-1-ol **22** (C) dans le 2-méthylbutan-2-ol. Conditions initiales : les réactions ont été réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de différentes concentrations d'amino-alcool et de 175 mM d'acide myristique **2**. Productions après 96h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica.*

Les données de la figure 61(A) représentant l'acylation de l'amino-alcool **6** suggèrent que l'augmentation de la concentration en amino-alcool **6** favorise la production de l'amide **8**, qui est prédominante dans ce cas et augmente jusqu'à une valeur maximale de 172 mM (98% de conversion de l'acide myristique **2**) pour une concentration initiale en amino-alcool **6** de 250 mM. Par ailleurs, bien que nous observions une production d'amido-ester **9** lorsque l'acide myristique **2** est utilisé en excès (r > 1), cette production reste extrêmement faible. Dans ce solvant, aucun produit de mono-O-acylation (ester **7**) n'est détecté.

Des profils plus complexes sont obtenus pour l'acylation des amino-alcools **21** et **22** (figures 61(B) et (C)), par rapport à celui obtenu précédemment pour l'acylation de l'amino-alcool **6**. Les produits de mono-O-acylation (esters **23** et **26**) sont détectés et quantifiés, contrairement au cas précédent de l'amino-alcool **6**. Ce changement de sélectivité est en accord avec la réactivité des amino-alcools **21** et **22** décrite précédemment Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 2, III.

Pour des concentrations en amino-alcools **21** et **22** inférieures à 50 mM (r > 3,5), la production des amido-esters est prédominante jusqu'à des productions maximales de 26 mM d'amido-ester **25** et de 20 mM d'amido-ester **28** (30% et 23% de conversion de l'acide

myristique **2**) pour respectivement 35 mM d'amino-alcool **21** et 50 mM d'amino-alcool **22**, au départ. Pour des concentrations en amino-alcools comprises entre 100 mM et 175 mM ($1 < r < 1,75$), les produits de mono-acylation (esters et amides) et les amido-esters atteignent des quantités significatives sans production spécifique de l'un des trois. Par contre, dans les conditions stœchiométriques et en excès d'amino-alcool ($r \leq 1$), comme précédemment pour l'amino-alcool **6**, la production des amides est favorisée jusqu'à des valeurs maximales de respectivement 53 mM en amide **24** et 54 mM en amide **27** (30% et 31% de conversion de l'acide myristique **2**) pour des concentrations initiales en amino-alcools **21** et **22** de 250 mM. Ces résultats obtenus à l'équilibre thermodynamique sont à l'opposé de ceux obtenus en vitesse initiale (v_i). En effet, la lipase B de *Candida antarctica* présentait des V_{max}^{app} de O-acylation nettement supérieures aux V_{max}^{app} de N-acylation pour les amino-alcools à longues chaines **21** et **22** dans le 2-méthylbutan-2-ol (Chapitre III : Résultats et discussions – Partie 3, II). Nous observons ainsi que le profil de la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique peut être complètement différent du profil observé en v_i. Ces résultats suggèrent que dans le 2-méthylbutan-2-ol, lors de l'utilisation d'une concentration élevée en amino-alcool à longue chaine (**21** ou **22**), la lipase B de *Candida antarctica* favorise à l'équilibre la synthèse de l'amide qui est un produit thermodynamique plutôt que la synthèse de l'ester qui est un produit cinétique de la réaction. Nous noterons également qu'une partie des esters produits en début de réaction a été convertie en amido-esters à t = 96 heures.

III.2. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le *n*-hexane

La même étude que précédemment a également été réalisée dans un solvant aprotique apolaire : le *n*-hexane. Les résultats sont illustrés sur la figure 62. Nous observons que deux principaux produits sont obtenus pour chaque amino-alcool selon le rapport molaire des substrats r.

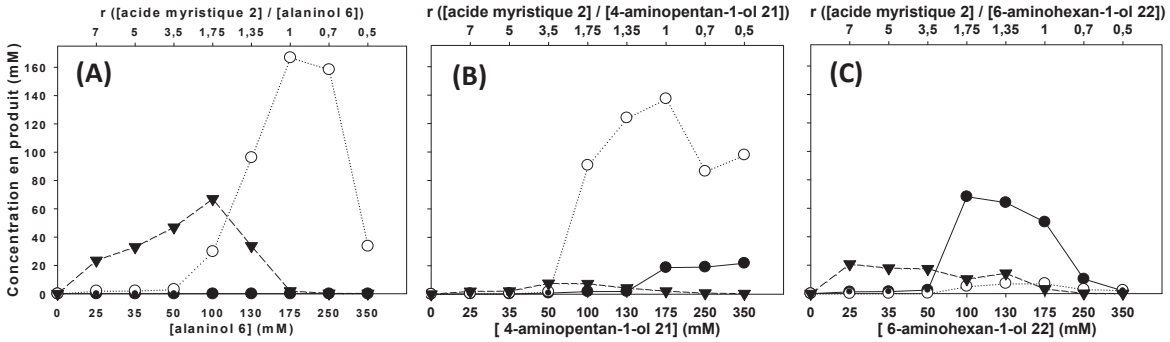


Figure 62 : *Influence de la concentration en amino-alcool et du rapport r =[acide myristique **2**] / [amino-alcool] sur la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique, ester (●), amide (○) et amido-ester (▼), lors de l'acylation de trois amino-alcools : alaninol **6** (A), 4-aminopentan-1-ol **21** (B) et 6-aminohexan-1-ol **22** (C) dans le n-hexane. Conditions initiales : les réactions ont été réalisées dans le n-hexane, en présence de différentes concentrations d'amino-alcool et de 175 mM d'acide myristique **2**. Productions après 96h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica.*

Les résultats obtenus pour l'amino-alcool **6** (figure 62(A)) montrent que des concentrations en amino-alcool **6** de 25 à 100 mM (r ≥ 1,75) permettent d'améliorer la production de l'amido-ester **9** qui peut atteindre des valeurs significatives allant jusqu'à 67 mM (76% de conversion de l'acide myristique **2**) pour 100 mM d'amino-alcool **6** au départ. De même, les résultats décrits dans les figures 62(B) et (C) montrent que des concentrations en amino-alcools **21** et **22** comprises entre 25 et 50 mM (r ≥ 3,5), permettent également d'améliorer les productions des amido-esters **25** et **28** qui peuvent atteindre jusqu'à respectivement 7,6 mM et 20 mM (9% et 23% de conversion de l'acide myristique **2**) pour 50 mM d'amino-alcool **21** et 25 mM d'amino-alcool **22**, au départ.

L'utilisation de concentrations en amino-alcools **6** et **21** supérieures à 100 mM (r < 1,75) permet d'améliorer la production des amides qui peut atteindre des valeurs élevées allant jusqu'à 167 mM (95% de conversion de l'acide myristique **2**) d'amide **8** et 137 mM (78% de conversion de l'acide myristique **2**) d'amide **24** dans les conditions stœchiométriques (r = 1). Dans le *n*-hexane, un rapport r ([acide] / [amino-alcool]) égal à 1 représente le meilleur compromis entre un fort rendement et une forte chimiosélectivité envers la mono-N-acylation. Ce type de résultat a déjà été observé dans d'autres études (Maugard *et al.*, 1997a ; Soo *et al.*, 2003).

Cependant, l'utilisation de concentrations en amino-alcool **22** supérieures ou égales à 100 mM (r ≤ 1,75) permet d'améliorer la production en ester **26** qui peut atteindre 68 mM (39% de conversion de l'acide myristique **2**) pour 100 mM d'amino-alcool **22** au départ. Cette modification de la sélectivité par rapport aux autres amino-alcools est probablement induite à la fois par l'hydrophobicité du *n*-hexane utilisé comme solvant et par la structure de l'amino-

alcool **22**, qui possède six carbones entre les fonctions alcool et amine. Contrairement aux résultats obtenus précédemment dans le 2-méthylbutan-2-ol où l'amide **27** était le principal produit de la réaction à l'équilibre, nous observons donc la production spécifique en concentration significative de l'ester **26** à l'équilibre thermodynamique dans le *n*-hexane.

Par ailleurs, pour les trois amino-alcools, l'utilisation de concentrations élevées en amino-alcool (350 mM), en excès par rapport à l'acide myristique **2** (r = 0,5), cause une diminution du taux de synthèse. Cette diminution est vraisemblablement due au fait que ces conditions favorisent la formation de complexes salins entre l'acide myristique **2** et les différents amino-alcools. Ce type de complexe est non réactif vis-à-vis de l'enzyme et peut affecter la disponibilité du substrat. Sa formation dépend des conditions acido-basiques du milieu comme décrit dans les parties précédentes de notre travail (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 1, III). Cette chute des rendements n'apparaissait pas lors des réactions réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol (figure 61). Cette différence entre les résultats obtenus dans les deux solvants organiques peut cependant s'expliquer par le fait que le complexe salin entre un acide gras et un amino-alcool est beaucoup plus stable dans les hydrocarbures. Les amino-alcools qui sont des molécules polaires sont peu solubles dans un solvant apolaire tel que le *n*-hexane. En revanche le complexe salin formé avec l'acide gras est soluble dans le *n*-hexane. Dans ce cas, l'acide gras joue alors le rôle d'agent de transfert de phase pour l'amino-alcool (Maugard, 1996). Les amino-alcools étant solubles dans le *n*-hexane uniquement sous forme de complexe, la dissociation de ce complexe est donc plus difficile. La formation de ce complexe a donc un impact plus important dans un solvant apolaire comme le *n*-hexane que dans un solvant polaire comme le 2-méthylbutan-2-ol où les amino-alcools sont solubles sous forme complexée ou non complexée.

III.3. Production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools dans le [Bmim] [PF_6]

La même étude que précédemment a également été réalisée dans le [Bmim] [PF_6], un liquide ionique. Les résultats sont illustrés sur la figure 63.

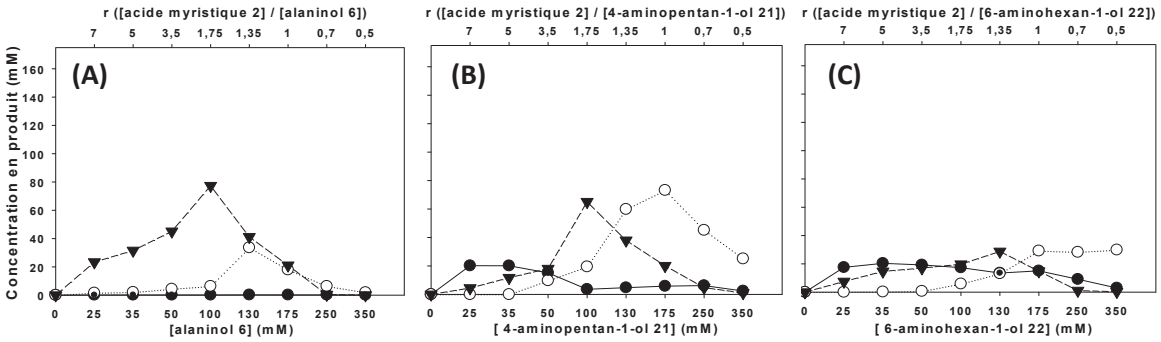


Figure 63 : *Influence de la concentration en amino-alcool et du rapport r =[acide myristique **2**] / [amino-alcool] sur la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique, ester (●), amide (○) et amido-ester (▼), lors de l'acylation de trois amino-alcools : alaninol **6** (A), 4-aminopentan-1-ol **21** (B) et 6-aminohexan-1-ol **22** (C) dans le [Bmim][PF$_6$]. Conditions initiales : les réactions ont été réalisées dans le [Bmim][PF$_6$], en présence de différentes concentrations d'amino-alcool et de 175 mM d'acide myristique **2**. Productions après 96h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica.*

Nous observons que ce solvant est moins sélectif que les deux autres envers la mono-acylation des amino-alcools. En fait, l'utilisation de [Bmim] [PF$_6$] et de concentrations en amino-alcools **6**, **21** ou **22** comprises entre 50 et 130 mM (1,35 ≤ r ≤ 3,5) favorise la production des amido-esters qui peut atteindre jusqu'à 77 mM d'amido-ester **9**, 65 mM d'amido-ester **25** et 29 mM d'amido-ester **28** (88%, 74% et 33% de conversion de l'acide myristique **2**) pour respectivement 100 mM des amino-alcools **6** et **21**, et 130 mM d'amino-alcool **22**, au départ. Ces taux de synthèse très satisfaisant en amido-ester sont les plus élevés parmi ceux obtenus dans les trois solvants testés.

Cependant, dans le [Bmim] [PF$_6$], comme précédemment dans le *n*-hexane, nous observons que différents produits sont obtenus selon le rapport molaire des substrats. Ainsi, pour des concentrations inférieures ou égales à 50 mM (r ≥ 3,5) des amino-alcools **21** et **22** à longues chaines, une production prédominante des esters est observée avec des valeurs maximales de 20 mM d'ester **23** et de 17,5 mM d'ester **26** pour respectivement 35 mM d'amino-alcool **21** et 25 mM d'amino-alcool **22**, au départ. Ces productions d'esters diminuent avec l'augmentation des concentrations en amino-alcools **21** et **22**. À l'inverse, pour des concentrations supérieures ou égales à 130 mM des amino-alcools **6**, **21** et **22** (r ≤ 1,35), une augmentation de la production des amides intervient avec des valeurs maximales de 33,5 mM d'amide **8**, 73 mM d'amide **24** et 30 mM d'amide **27** (19%, 42% et 17% de conversion de l'acide myristique **2**) pour respectivement 130 mM d'amino-alcool **6**, 175 mM d'amino-alcool **21** et 350 mM d'amino-alcool **22**. Les valeurs de productions des amides obtenues à partir des amino-alcools **6** et **21** dans le [Bmim] [PF$_6$] sont les plus faibles parmi les trois solvants testés.

Par ailleurs, nous remarquons également que pour des concentrations en amino-alcools **6**, **21** et **22** supérieures à 175 mM (r < 1), la production totale diminue drastiquement dans le [Bmim] [PF_6] : les productions en ester, amide et amido-ester diminuent. Dans ces conditions lors de l'acylation de l'amino-alcool **6**, les productions ne dépassent pas 0,09 mM d'ester, 1,89 mM d'amide et 0,04 mM d'amido-ester (0,05%, 1,08% et 0,02% de conversion de l'acide myristique **2**).

III.4. Bilan de l'influence du solvant sur la production à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation enzymatique d'amino-alcools

À partir de l'ensemble des résultats obtenus à l'équilibre thermodynamique lors de l'acylation de différents amino-alcools dans trois solvants, le 2-méthylbutan-2-ol, le *n*-hexane et le [Bmim] [PF_6], nous avons observé des résultats très différents selon le type de solvant utilisé :

- Le 2-méthylbutan-2-ol semble être le solvant idéal pour la production d'amides à partir des différents amino-alcools. En effet, ce solvant permet la production d'amides avec un rendement significatif et une sélectivité élevée à partir des trois amino-alcools testés dans les conditions stœchiométriques.

- Dans le *n*-hexane, deux produits majoritaires sont obtenus en fonction du rapport molaire (r) [acide myristique **2**] / [amino-alcool]. Pour $r \leq 1$ un produit de mono-acylation (ester ou amide, selon le type d'amino-alcool) est majoritaire et pour r > 1 la production d'amido-esters est majoritaire.

- Dans le [Bmim] [PF_6], nous observons que les plus faibles productions en composés mono-acylés (esters ou amides) sont obtenues. Cependant, ce solvant reste intéressant puisqu'il permet également d'obtenir les meilleures productions d'amido-esters lorsque nous nous plaçons en faible excès d'acide myristique **2** (175 mM d'acide myristique **2** et 50 à 100 mM d'amino-alcool ; 1,75 < r < 3,5).

Nous observons également ici que le contrôle du rapport molaire [acide myristique **2**] / [amino-alcool] est absolument essentiel pour la catalyse enzymatique.

IV. Conclusion

Pour conclure cette étude, nous remarquons lors de l'acylation de différents amino-alcools par la lipase B de *Candida antarctica*, que l'activité catalytique de la lipase et la sélectivité des productions à l'équilibre thermodynamique peuvent être contrôlées à la fois par le type de solvant utilisé et par le rapport molaire r [acide gras] / [amino-alcool]. Cette capacité de contrôler la chimiosélectivité des réactions enzymatiques (en dehors de son intérêt pour la synthèse spécifique d'un produit à partir d'amino-alcool) pourrait être étendue aux réactions d'acylation réalisées avec d'autres substrats multifonctionnels comme par exemple les différents substrats précurseurs à la synthèse de pseudo-céramides. En effet, ce type de synthèse nécessite des étapes de N-acylation et de O-acylation de substrats de type amino-polyol (ex : des bases sphingoides ou des aminopropanediols). Ces étapes peuvent donc être influencées par le type de solvant utilisé et le rapport molaire des substrats.

Résultats et discussions

CHAPITRE III – PARTIE 4

Partie 4 : Étude de l'acylation de composés type amino-diol: Application à la synthèse de pseudo-céramides

Partie 4 : Étude de l'acylation de composés de type amino-diol : Application à la synthèse de pseudo-céramides

I. Introduction

L'enjeu de cette partie de notre travail était de synthétiser par catalyse enzymatique des molécules de type pseudo-céramide possédant une structure proche des céramides naturels en s'aidant des connaissances acquises lors des parties précédentes de cette thèse.

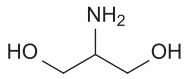
Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'acylation de composés de type amino-diol qui sont des précurseurs possibles à la synthèse de pseudo-céramides. L'objectif de cette partie sera de produire sélectivement des amido-esters de type « pseudo-céramide » à partir d'un aminopropanediol et de différents acides gras. Elle sera divisée en deux sous parties :

- Tout d'abord, une étude de l'acylation de deux amino-diols (le sérinol et le 3-aminopropane-1,2-diol) par la lipase B de *Candida antarctica*, en utilisant l'acide myristique comme donneur de groupement acyle. L'objectif sera d'évaluer la faisabilité de la synthèse sélective d'amides et d'amido-esters de type « pseudo-céramide » à partir de ces amino-diols.
- Dans un second temps, les connaissances acquises lors de la première sous partie et des parties précédentes seront utilisées pour la mise au point et l'optimisation d'un procédé de synthèse sélectif en réacteur continu à « lit fixe » de O,N-diacyl aminopropanediols, des composés de type « pseudo-céramide ».

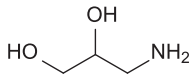
II. Réactions-modèles d'étude : acylation enzymatique d'amino-diols par l'acide myristique

II.1. Étude cinétique de l'acylation enzymatique d'amino-diols à partir de l'acide myristique dans le 2-méthylbutan-2-ol

L'acylation du sérinol **29** (2-aminopropane-1,3-diol) et celle du 3-aminopropane-1,2-diol **30** sont toutes deux réalisées à partir de l'acide myristique **2**, comme donneur de groupement acyle (figure 64). Ces réactions sont choisies comme réactions modèles pour l'étude de l'acylation d'amino-diols et sont réalisées en présence de 5 g/l de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.



Sérinol **29**
(2-aminopropane-1,3-diol)



3-aminopropane-1,2-diol **30**

Figure 64 : *Structures des amino-diols utilisés (**29** et **30**).*

Nous pouvons théoriquement synthétiser cinq produits d'acylation différents à partir du sérinol **29** comme décrit schéma 9 (le 1-O-myristyl 2-aminopropane-1,3-diol **31**, le 2-N-myristyl 2-aminopropane-1,3-diol **32**, le O,O-dimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol **33**, le O,N-dimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol **34** et le O,N,O-trimyristyl 2-aminopropane-1,3-diol **35**).

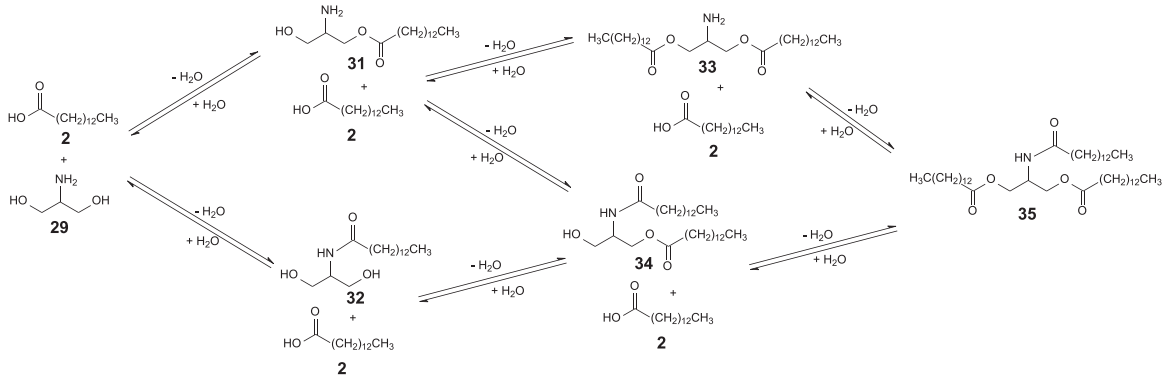


Schéma 9 : *Réactions potentielles entre le sérinol **29** et l'acide myristique **2**.*

De même nous pouvons théoriquement synthétiser sept produits d'acylation différents à partir du 3-aminopropane-1,2-diol **30** comme décrit schéma 10 (le 1-O-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **36**, le 2-O-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **37**, le 3-N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **38**, le O,O-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **39**, le 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **40**, le 2-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **41** et le O,O,N-trimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **42**).

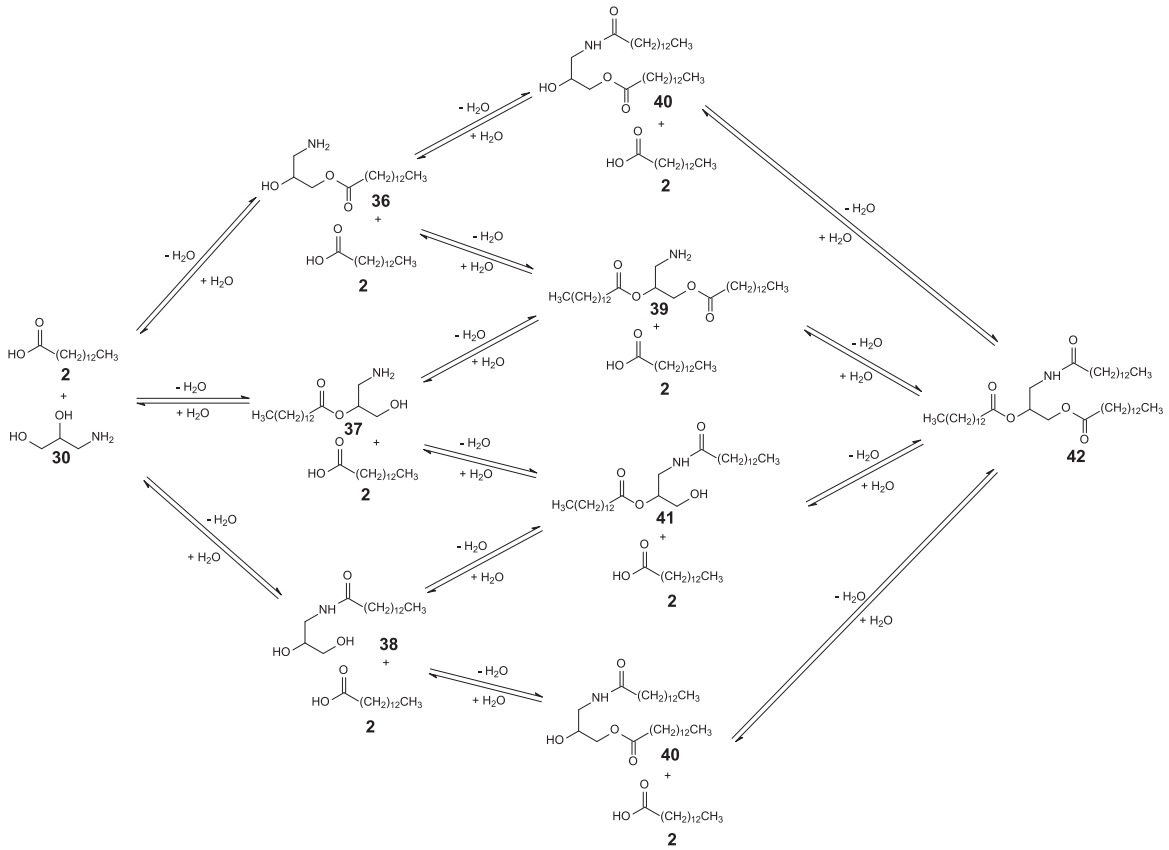


Schéma 10 : *Réactions potentielles entre le 3-aminopropane-1,2-diol **30** et l'acide myristique **2**.*

Nous avons fait varier les concentrations en amino-diol de 25 mM à 350 mM (25, 35, 50, 100, 130, 175, 250 et 350 mM) et la concentration en acide myristique **2** est fixée à 175 mM, dans le but de déterminer l'effet de la concentration en amino-diol sur la réactivité et la sélectivité de la lipase au cours des réactions.

La figure 65 montre un chromatogramme CLHP obtenu en UV à 210 nm, pour un échantillon prélevé à t = 48 heures et provenant de l'acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30**.

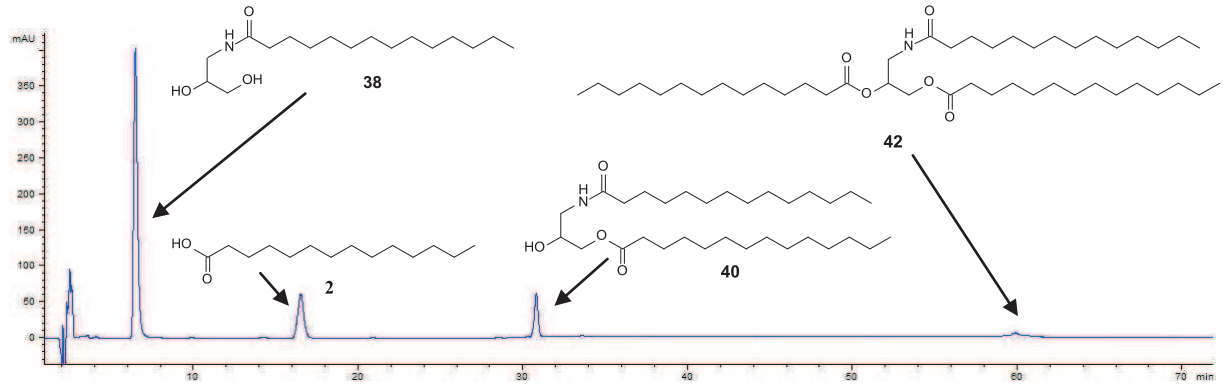


Figure 65 : *Chromatogramme CLHP de l'acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** (25 mM) par l'acide myristique **2** (175 mM). Détection UV à 210 nm correspondant à la réaction à l'instant t = 48h. Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°4, gradient de solvants N°2 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Dans ces conditions de séparation, seul l'acide myristique **2** (tr = 17 minutes), le 3-N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **38** (tr = 6,5 minutes), le 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **40** (tr = 31 minutes) et le O,O,N-trimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **42** (tr = 60 minutes) sont détectés. La disparition au cours du temps de l'acide myristique **2** est concomitante avec l'apparition de l'amide **38**, l'amido-ester **40** et l'amido-diester **42**. L'analyse des données montre une sélectivité élevée de la lipase en faveur de la N-acylation. En effet, aucun produit de mono-O-acylation (**36** ou **37**) ou de di-O-acylation **39** n'est détecté. De même aucun produit de di-O-N-acylation **41**, issu de l'acylation de l'amide **38** en position 2, n'est détecté. Un profil similaire est observé pour les chromatogrammes obtenus lors de l'acylation du sérinol **29** (uniquement amide **32**, acide myristique **2**, amido-ester **34** et amido-diester **35**). Les produits **32**, **34**, **38** et **40** ont été caractérisés par SM, IR et RMN après purification. En absence d'enzyme, aucun produit n'est détecté après 96 heures.

Ces résultats sont satisfaisants car les amido-esters **34** et **40** produits ici sont des molécules de type « pseudo-céramide ».

Après avoir caractérisé les différents produits, nous avons pu concrétiser l'étude cinétique pour les différentes concentrations en amino-diol. Pour chaque concentration en amino-diol testée, nous avons suivi l'évolution des concentrations des substrats et des produits présents dans le milieu réactionnel au cours du temps (figure 66).

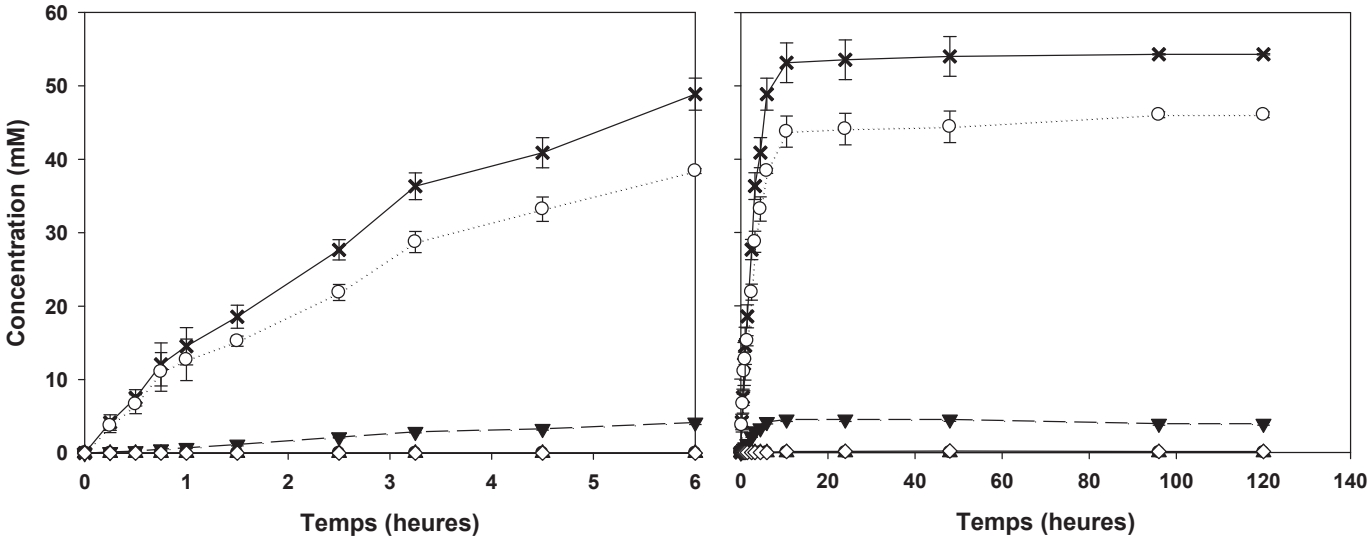


Figure 66 : *Suivis cinétiques des concentrations en acide myristique converti (✖), en ester (●), en amide (○), en amido-ester (▼), en diester (▲) et en amido-diester (◊) lors de l'acylation de 50 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** par 175 mM d'acide myristique **2** sur 6h (A) et 120h (B). Conditions initiales : les réactions ont été réalisées dans le 2-méthylbutan-2-ol, pendant 120h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica immobilisée.*

En comparant les profils des suivis cinétiques, pour les différentes concentrations en amino-diol, il a ainsi été observé que dans tous les cas : les vitesses initiales (v_i) sont obtenues sur la première heure de réaction (figure 66(A)) et que l'équilibre thermodynamique de la réaction est atteint à partir de 48 heures de réaction (figure 66(B)).

À partir des v_i de conversion de l'acide myristique **2** et des v_i de N-acylation des amino-diols, nous avons réalisé les représentations de Lineweaver-Burk (figure 67 pour le 3-aminopropane-1,2-diol **30**), nous permettant ainsi de déterminer les paramètres cinétiques apparents des réactions d'acylation des amino-diols **29** et **30** par 175 mM d'acide myristique **2** catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*.

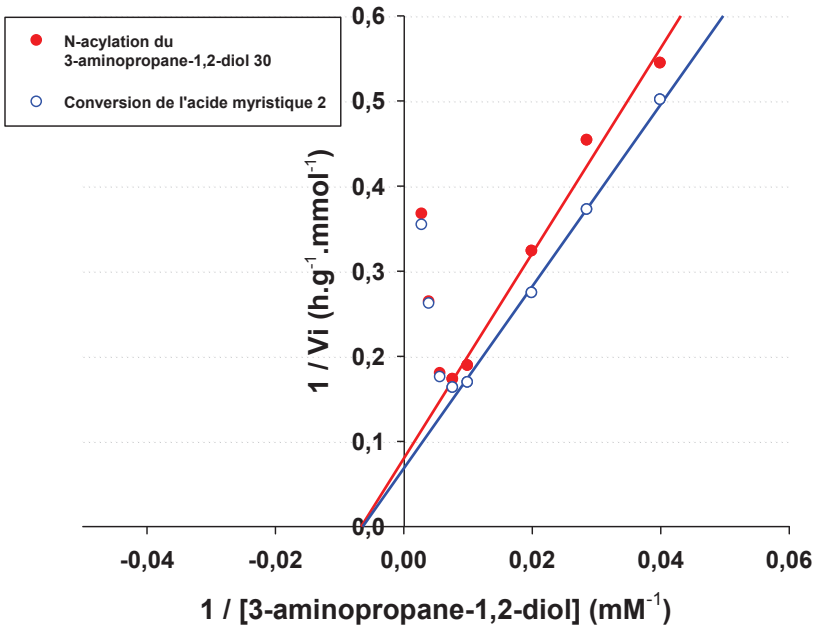


Figure 67 : *Linéarisation de Lineweaver-Burk de la réaction entre le 3-aminopropane-1,2-diol **30** et 175 mM d'acide myristique **2** en présence de 5 g/l de la lipase B de Candida antarctica immobilisée dans le 2-méthylbutan-2-ol, à 55°C, basée sur les v_i de conversion de l'acide myristique **2** (○) et les v_i de N-acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** (●).*

Nous observons sur la figure 67 une augmentation des $1/v_i$ pour les plus faibles valeurs de 1/ [3-aminopropane-1,2-diol **30**], donc les v_i diminuent pour les concentrations les plus élevées en amino-diol (supérieures à 100 mM du 3-aminopropane-1,2-diol **30**). Plus la concentration en 3-aminopropane-1,2-diol **30** est en excès par rapport à l'acide myristique **2** (175 mM) plus les v_i diminuent. Comme précédemment pour l'alaninol **6** (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 2, II), cette diminution est probablement due à la formation d'un complexe salin entre l'amino-diol et l'acide gras qui aboutit à une forme protonée de la fonction amine du 3-aminopropane-1,2-diol **30** et une forme déprotonée de l'acide myristique **2**, toutes les deux pouvant être non réactives vis-à-vis de l'enzyme. Un graphique présentant un profil similaire est obtenu lors de l'acylation du sérinol **29**.

Les paramètres cinétiques apparents (V_{max}^{app} et K_{mB}^{app}) ont été déterminés de la même façon que précédemment pour l'alaninol **6** (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 2, II).

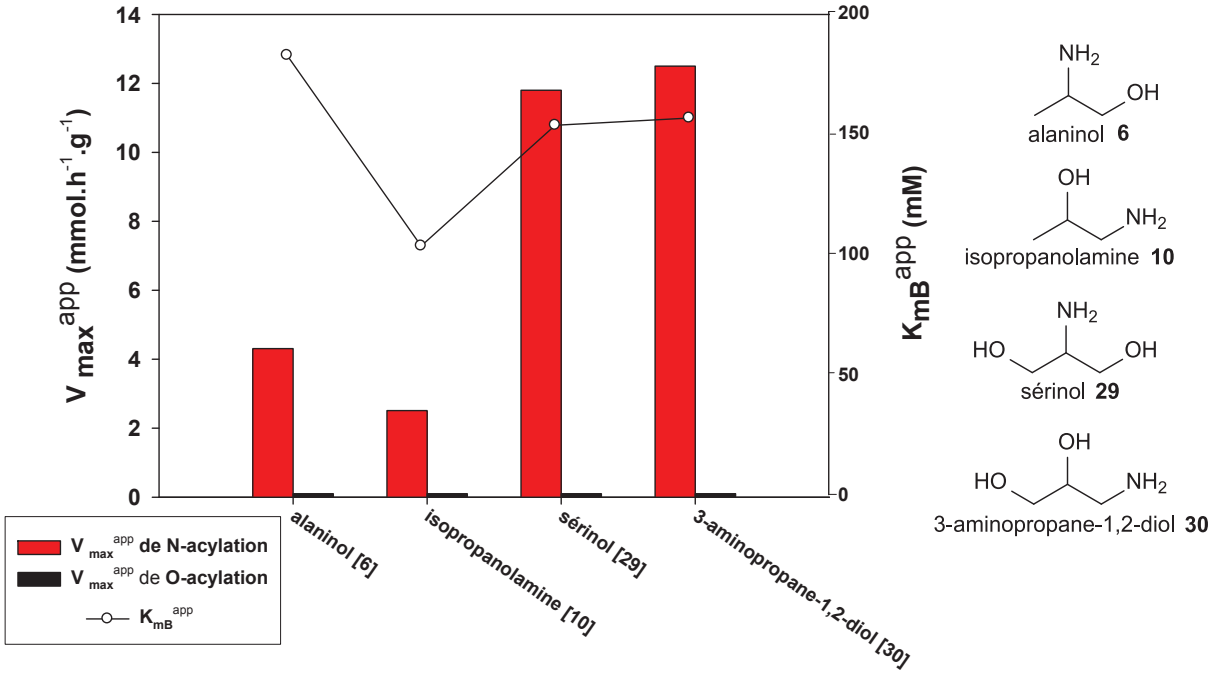


Figure 68 : *Représentation graphique des paramètres cinétiques apparents obtenus lors de l'acylation de plusieurs accepteurs de groupement acyle (**6**, **10**, **29** et **30**) par 175 mM d'acide myristique **2**, catalysée par la lipase B de Candida antarctica dans le 2-méthylbutan-2-ol à 55°C.*

Précédemment, lors de l'étude portant sur l'influence de la structure de l'accepteur de groupement acyle (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 2), nous avions établi que la présence d'une fonction alcool en β d'une fonction amine a un effet positif sur la V_{max}^{app} de N-acylation (amino-alcools **6** et **10**).

Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous comparons sur la figure 68 les paramètres cinétiques apparents obtenus pour l'acylation des amino-alcools **6** et **10** à chaines carbonées courtes (2 carbones) avec ceux obtenus pour les amino-diols **29** et **30**. Ces deux amino-diols possèdent une fonction amine et deux fonctions alcools, une première en β de la fonction amine et une seconde en β (**29**) ou en γ (**30**) de cette fonction amine. Comme pour les amino-alcools **6** et **10**, lors de l'acylation des amino-diols **29** et **30** aucun produit de mono-O-acylation n'a été détecté.

Les valeurs de K_{mB}^{app} obtenues pour les amino-diols **29** et **30** sont respectivement de 153 mM et 156 mM et sont du même ordre de grandeur que les K_{mB}^{app} obtenus pour les amino-alcools **6** (182 mM) et **10** (103 mM). En revanche, les valeurs de V_{max}^{app} de N-acylation qui sont très proches pour les deux amino-diols (**29** : 11,8 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$ et **30** : 12,5 $mmol.h^{-1}.g^{-1}$), sont 3 fois plus élevées que la V_{max}^{app} de N-acylation de l'amino-alcool **6** (4,31

mmol.h^{-1}.g^{-1}) et 5 fois plus élevées que la V_{max}^{app} de N-acylation de l'amino-alcool **10** (2,5 mmol.h^{-1}.g^{-1}).

À partir de ces résultats, nous concluons que pour les amino-diols **29** et **30**, la présence d'une seconde fonction alcool a un effet positif favorisant encore plus la V_{max}^{app} de N-acylation que dans le cas des amino-alcools difonctionnels à chaines courtes **6** et **10**.

II.2. Influence du solvant sur l'acylation enzymatique d'amino-diols

L'effet de différents solvants sur la production d'amido-esters (« pseudo-céramides ») à l'équilibre thermodynamique a été étudié. Dans le but de favoriser la synthèse de composés multi-acylés, les réactions ont été réalisées en excès d'acide myristique **2**, c'est-à-dire en utilisant 50 mM d'un amino-diol (**29** ou **30**) comme substrat accepteur d'acyle et 175 mM de l'acide myristique **2** comme donneur d'acyle, à 55°C et en présence de 5 g/l de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée dans trois solvants différents : le *n*-hexane, le 2-méthylbutan-2-ol et le [Bmim] [PF_6]. Les différents milieux réactionnels ont été analysés par CLHP/SM-ESI et les produits de réaction ont été quantifiés après 96 heures de réaction (équilibre thermodynamique).

La figure 69 présente l'effet du solvant sur la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique, après 96 heures d'acylation pour les deux amino-diols.

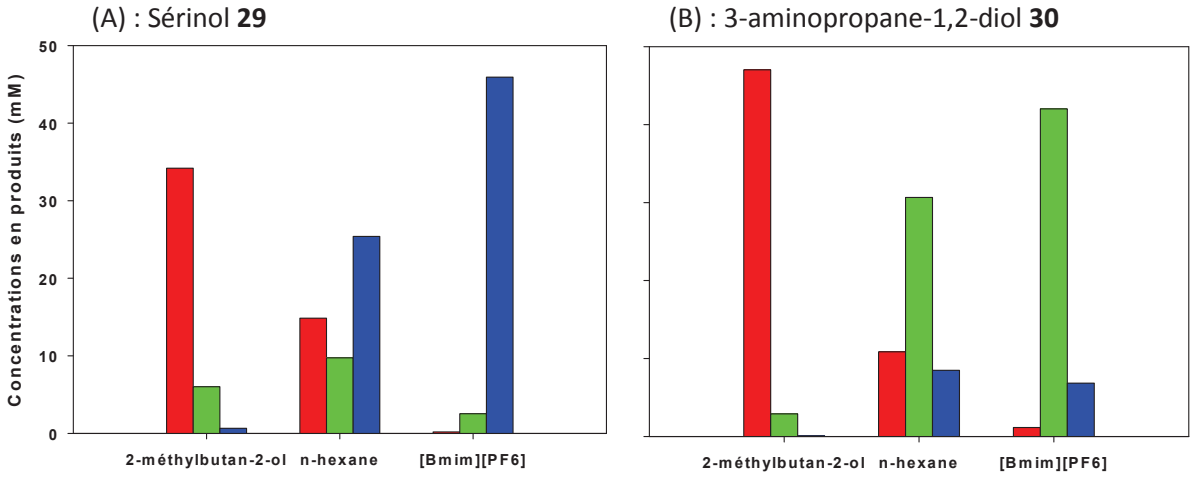


Figure 69 : *Influence du solvant sur la distribution des produits à l'équilibre thermodynamique, amide (■), amido-ester (■) et amido-diester (■), lors de l'acylation de deux amino-diols, le sérinol **29** (A) et le 3-aminopropane-1,2-diol **30** (B) dans trois solvants : le 2-méthylbutan-2-ol, le n-hexane ou le [Bmim] [PF_6]. Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM d'amino-diol et de 175 mM d'acide myristique **2**. Productions après 96h à 55°C, en présence de 5 g/l de lipase B de Candida antarctica.*

Les données de la figure 69(A) représentent l'acylation du sérinol **29** dans les trois solvants. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du 2-méthylbutan-2-ol favorise la production du mono-amide **32** qui est prédominante dans ce cas avec une valeur significative de 34 mM (68% de conversion du sérinol **29**). De plus, la production d'amido-ester dans ce solvant est très faible (≤ 10 %) et la production d'amido-diester y est négligeable. En revanche, la synthèse de l'amido-diester **35** est majoritaire dans le *n*-hexane et le [Bmim] [PF_6] avec une production significative de 25 mM (50% de conversion du sérinol **29**) dans le *n*-hexane et une production excellente et hautement sélective de 46 mM (92% de conversion du sérinol **29**) dans le [Bmim] [PF_6].

Les résultats obtenus lors de l'acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** dans les trois solvants sont illustrés sur la figure 69(B). Comme précédemment pour le sérinol **29**, nous observons sur cette figure que l'utilisation du 2-méthylbutan-2-ol favorise également la production hautement sélective du mono-amide **38** qui atteint 47 mM (94% de conversion du 3-aminopropane-1,2-diol **30**). En revanche, contrairement au sérinol **29**, c'est la synthèse de l'amido-ester **40** qui est majoritaire dans le *n*-hexane et le [Bmim] [PF_6] avec une production significative de 31 mM (62% de conversion du 3-aminopropane-1,2-diol **30**) dans le *n*-hexane et une production excellente et hautement sélective de 45 mM (90% de conversion du 3-aminopropane-1,2-diol **30**) dans le [Bmim] [PF_6]. Ces derniers résultats sont cohérents car la lipase B de *Candida antarctica* est connue pour catalyser préférentiellement l'acylation des fonctions alcools primaires (Ljunger *et al.,* 1994 ; Maugard *et al.,* 2000 ; Yadav et Lathi, 2006). Le 3-aminopropane-1,2-diol **30** possèdant à la fois une fonction alcool primaire et une fonction alcool secondaire, la production du 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **40**, acylé sur la fonction alcool primaire, est favorisée au détriment de la production du 2-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **41** ou du O,O,N-trimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **42**.

II.3. Bilan de l'acylation enzymatique d'amino-diols à partir de l'acide myristique

L'étude cinétique de l'acylation des amino-diols **29** et **30** catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* à partir de l'acide myristique **2** a démontré que la réactivité de ces deux amino-diols est comparable à celle décrite précédemment dans le cas des amino-alcools **6** et **10** à chaines carbonées courtes (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 2). En effet, la présence au sein de la structure des amino-diols de deux fonctions alcools proches de la fonction amine (positions β et/ou γ) favorise la V_{max}^{app} de N-acylation et aucun produit issu théoriquement de la mono-O-acylation ou de la di-O-acylation n'est détecté.

Par ailleurs, l'étude de l'influence du solvant sur la production à l'équilibre thermodynamique a permis de démontrer la capacité du solvant à contrôler la sélectivité de la production. Ainsi en excès d'acide myristique **2**, l'utilisation du 2-méthylbutan-2-ol favorise la production sélective de mono-amides et l'utilisation du *n*-hexane ou du [Bmim] [PF_6] favorise la production sélective de produits multi-acylés (amido-ester et amido-diester).

Pour la suite de notre travail, portant sur la production sélective d'amido-esters de type « pseudo-céramide », nous utiliserons le 3-aminopropane-1,2-diol **30** qui a donné les meilleurs rendements et la meilleure sélectivité pour la synthèse de l'amido-ester. De plus, les deux étapes de N-acylation puis de O-acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** nécessaires à la production de pseudo-céramides pourraient alors être conduites en utilisant des mélanges 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane (ces deux solvants organiques étant miscibles), ceci afin de contrôler la sélectivité de la production. Le choix du second solvant est basé sur le fait que le [Bmim] [PF_6] est un solvant de type liquide ionique et, bien que la production d'amido-ester soit moins élevée dans le *n*-hexane que dans le [Bmim] [PF_6], ce dernier de par sa nature possède une viscosité importante et nécessiterait une étape d'extraction des substrats et produits avant leur récupération. L'utilisation de solvants organiques permettra, en outre, la mise au point de conditions expérimentales utilisables dans un réacteur de type continu et facilitera la récupération des produits.

III. Production enzymatique de pseudo-céramides en réacteur continu à « lit fixe »

Lors de cette étude, l'expérience accumulée dans les parties précédentes de notre travail a été mise à profit afin de développer un procédé de production en continu de composés de type « pseudo-céramide » dans un réacteur dit à « lit fixe » contenant la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée. Ces réactions de synthèse ont été réalisées en utilisant comme accepteur d'acyle le 3-aminopropane-1,2-diol **30** et comme donneurs d'acyles différents acides gras (acide laurique C12, acide myristique C14, acide stéarique C18, acide oléique C18:1 et acide linoléique C18:2).

Un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane est utilisé comme solvant dans le réacteur afin d'améliorer la solubilité des différentes molécules et la sélectivité des réactions.

Notre procédé de synthèse se déroule en deux étapes :

- Une première étape de synthèse de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) par N-acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** à partir d'un premier donneur d'acyle.
- Une seconde étape de synthèse de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (amido-esters de type « pseudo-céramide ») par O-acylation d'un N-acyl 3-aminopropane-1,2-diol (synthétisé lors de la première étape) à partir d'un second donneur d'acyle.

III.1. Production de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides)

III.1.1. Mise en œuvre de la réaction

La production d'un amide de type N-acyl 3-aminopropane-1,2-diol, le N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol est choisie ici comme réaction modèle afin de réaliser par la suite la production de pseudo-céramides les plus proches possibles des céramides naturels.

Nous avons amorcé cette partie de notre travail en nous basant sur une étude menée en réacteur « batch » au sein du laboratoire (données non décrites ici). Cette étude a démontré que l'utilisation d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant et de concentrations en substrats inférieures ou égales à 100 mM, était un bon compromis entre une bonne sélectivité de la lipase et une bonne solubilité des substrats et des produits de réaction qui est nécessaire à une production en réacteur continu.

La lipase B de *Candida antarctica* est utilisée pour catalyser la N-acylation chimiosélective du 3-aminopropane-1,2-diol **30** à partir de l'acide stéarique **43** dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) à 55°C (schéma 11).

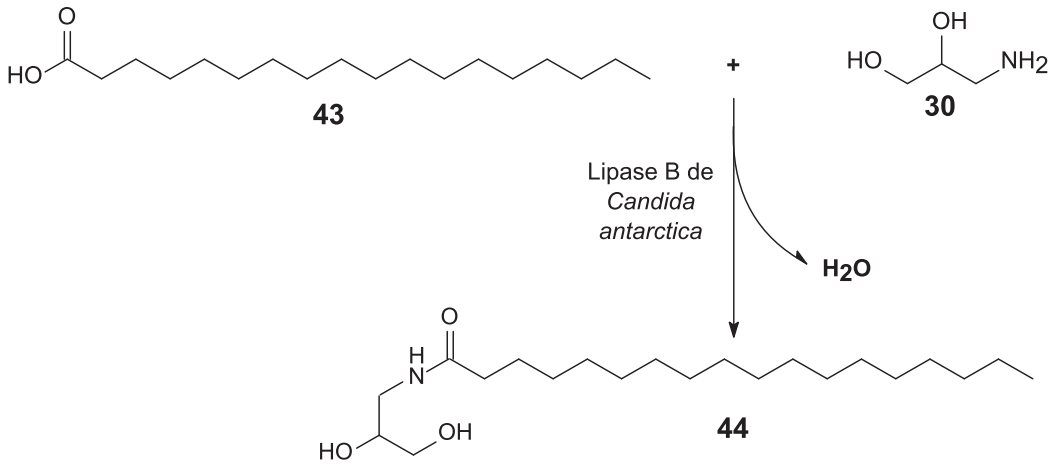


Schéma 11 : *Production du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (amide) catalysée par la lipase B de Candida antarctica à partir du 3-aminopropane-1,2-diol **30** et d'acide stéarique **43** en solvants organiques à 55°C.*

Afin de réaliser la N-acylation sélective du 3-aminopropane-1,2-diol **30** en réacteur à « lit fixe » dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane, nous avons utilisé un rapport molaire r : [acide stéarique **43**] / [3-aminopropane-1,2-diol **30**] de 1. En effet, dans une partie précédente de notre travail (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 3, III) nous avions observé que la lipase B de *Candida antarctica* permettait la production sélective du mono-amide **8** à partir de l'alaninol **6**, un amino-alcool difonctionnel à chaine courte, pour un rapport molaire des substrats r = 1 dans le 2-méthylbutan-2-ol ou dans le *n*-hexane.

Au départ, nous avons donc fixé les conditions suivantes : 100 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et 100 mM d'acide stéarique **43** dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel est pompé à un débit de 250 $\mu l.min^{-1}$ à travers un réacteur continu à « lit fixe » contenant 430 mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée. Nous avons utilisé comme « lit fixe » la colonne N°1 (Chapitre II : Matériel et méthodes, III.4 ; Ø de 0,5 cm x longueur de 9,5 cm), le temps de séjour au niveau du réacteur, déterminé selon l'équation 9 décrite ci-dessous, est donc de 7,5 minutes. Ce temps dit « de séjour » ou « de résidence » est un paramètre essentiel qui correspond au temps que les substrats passent dans le bioréacteur contenant la lipase.

Équation 9 :

$$\text{Temps de séjour (min)} = \frac{\text{volume de la colonne } (\mu l)}{\text{débit du réacteur } (\mu l.min^{-1})}$$

La figure 70 montre les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons.

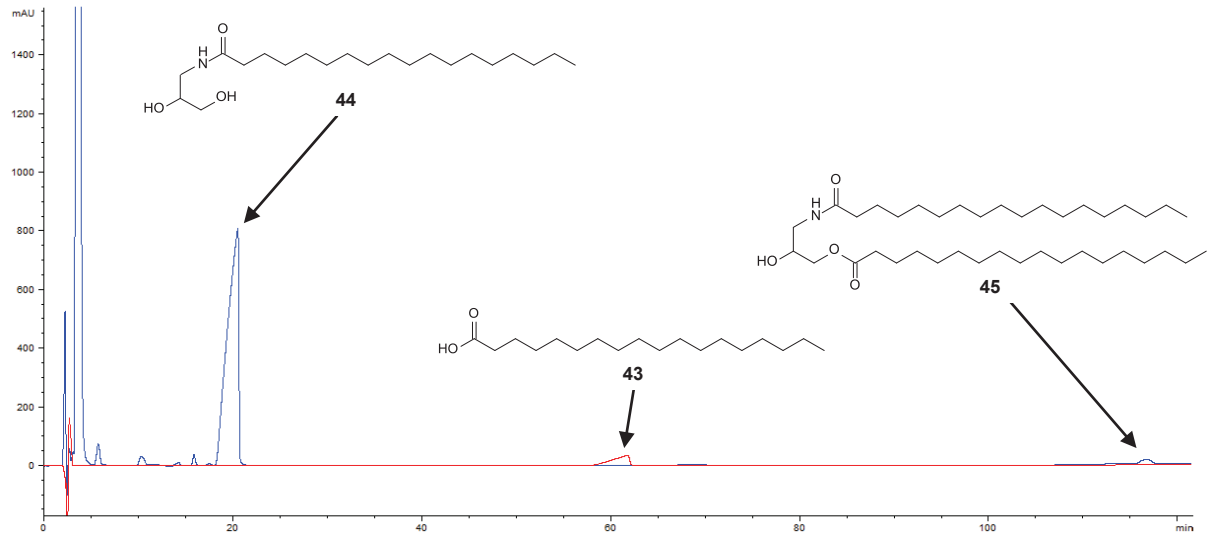


Figure 70 : *Chromatogrammes CLHP obtenus par détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant au milieu réactionnel après la synthèse du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** et chromatogramme rouge correspondant à un échantillon contenant 100 mM d'acide stéarique **43**. Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°4, gradient de solvants N°3 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Dans ces conditions de séparation seul l'acide stéarique **43** (tr = 60 minutes), le N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (tr = 20 minutes) et une trace de 1-O,3-N-distéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **45** (tr = 116 minutes) sont détectés. La disparition au cours du temps de l'acide stéarique **43** est concomitante avec l'apparition du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** et du 1-O,3-N-distéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **45**. Le produit **44** a été caractérisé par SM, IR et RMN après purification et le produit **45** a été caractérisé par SM. L'analyse des données montre une sélectivité élevée de la lipase en faveur de la N-acylation. En effet, aucun produit de mono-O-acylation ou de di-O-acylation n'est détecté.

Les quantifications des espèces en présence dans le milieu réactionnel après passage dans le réacteur en continu (t = 2 heures) ont permis d'obtenir un rendement de synthèse de l'amide **44** de 76% qui correspond à une production en continu de 2,65 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (950 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

Suite à la caractérisation des différents produits et à la vérification de la faisabilité du procédé de synthèse, nous avons cherché à identifier des conditions permettant d'optimiser le rendement et la production en continu de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides).

III.1.2. Optimisation de la réaction

III.1.2.1. Influences du débit de milieu réactionnel dans le réacteur et du type de colonne (« lit fixe »)

Le débit du flux de milieu réactionnel passant à travers le réacteur est un paramètre essentiel lors d'un procédé de synthèse en réacteur continu. En effet, le débit influence directement le temps de séjour.

Pour cette expérience, les réactions ont été menées dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées au départ (III.1.1), en testant quatre débits différents (125, 250, 500 et 1000 $\mu l.min^{-1}$) et deux types de colonnes comme « lits fixes » du réacteur (colonne N°1 : Ø de 0,5 cm x longeur de 9,5 cm et colonne N°2 : Ø de 1 cm x longueur de 1,5 cm). Les résultats sont donnés figure 71 :

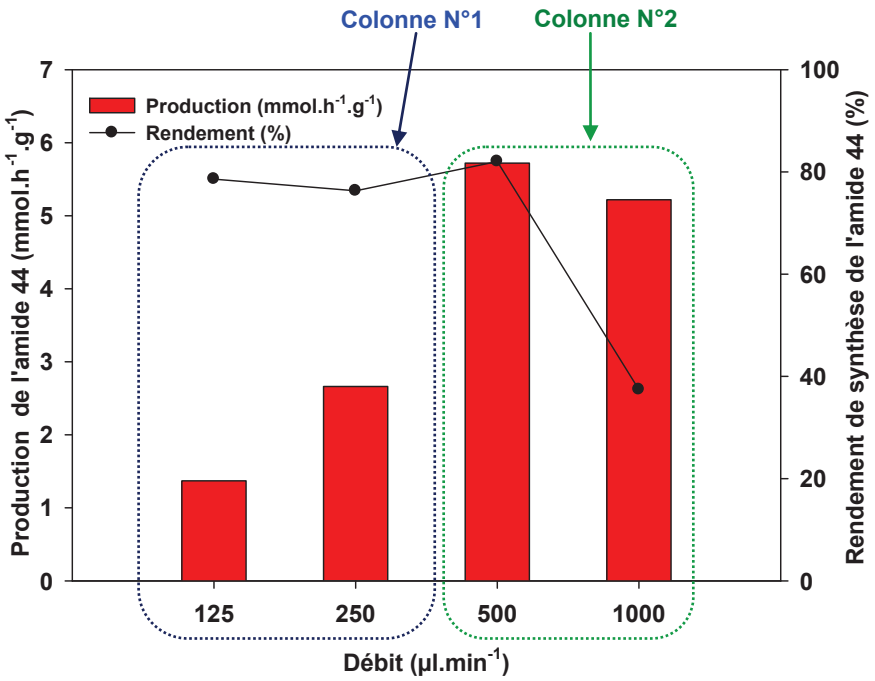


Figure 71 : *Influence du débit de milieu réactionnel et du type de colonne (lit fixe) sur la production et le rendement de synthèse du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (amide) obtenus dans un réacteur continu à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 100 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et de 100 mM d'acide stéarique **43** à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule à travers une colonne (N°1 ou N°2) contenant 430 mg de lipase B de Candida antarctica.*

Pour les trois débits les plus faibles (125, 250 et 500 µl.min^{-1}) et les deux colonnes testés les rendements de synthèse de l'amide **44** sont relativement similaires. La figure 71 montre des rendements allant de 77% pour un débit de 125 µl.min^{-1} avec la colonne N°1 (temps de séjour = 14,9 minutes d'après l'équation 9), jusqu'à 82% pour un débit de 500 µl.min^{-1} avec la colonne N°2 (temps de séjour = 2,4 minutes d'après l'équation 9). Dans les conditions de synthèse testées, le fait d'avoir un temps de séjour qui passe de 14,9 à 2,4 minutes, n'a donc pas d'impact significatif sur le rendement. En revanche, pour le débit le plus élevé de 1000 µl.min^{-1} (temps de séjour = 1,2 minutes d'après l'équation 9) le rendement de synthèse ne dépasse pas 37%, ceci indique qu'un temps de séjour des substrats dans le réacteur, inférieur ou égale à 1,2 minutes, n'est pas suffisant pour atteindre l'équilibre thermodynamique de la réaction.

La quantité d'amide **44** produite en continu semble proportionnelle au débit, pour des débits allant de 125 à 500 µl.min^{-1}. En effet, en doublant le débit de 125 à 250 µl.min^{-1}, nous avons quasiment doublé la production de l'amide **44** qui passe respectivement de 1,40 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1} à 2,65 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}. De même, pour un débit de 500 µl.min^{-1}, nous obtenons la production de l'amide **44** la plus élevée de 5,72 mmol.h^{-1}.g

d'enzyme^{-1} (2050 mg.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}). Ces résultats sont cohérents car la production dépend des concentrations initiales en substrats et de la quantité d'enzyme qui ici étaient identiques, des rendements de synthèse de l'amide **44** qui comme décrits précédemment sont similaires et du débit de milieu réactionnel qui est le paramètre que nous avons fait varier. Ceci explique que pour des débits allant de 125 à 500 µl.min^{-1}, la production de l'amide **44** est proportionnelle au débit utilisé. Cependant, pour le débit le plus élevé de 1000 µl.min^{-1}, nous observons que la production n'est plus proportionnelle au débit, ceci étant du à un faible rendement de synthèse (37%). La production obtenue pour ce débit, de 5,2 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}, est inférieure à celle obtenue pour un débit deux fois plus faible de 500 µl.min^{-1} (5,72 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}).

III.1.2.2. Influence de la quantité d'enzyme dans le « lit fixe »

Le coût du biocatalyseur (1100 €/kg dans le cas de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée - Novozym® SP 435 ; Séverac *et al.,* 2011) étant un des facteurs limitant le développement des procédés de synthèse enzymatique, il est donc important de déterminer la quantité d'enzyme aboutissant aux meilleurs résultats.

Pour cette étude, les différentes réactions ont été menées dans des conditions expérimentales identiques (un débit de 125 µl.min^{-1}, la colonne N°2 comme réacteur, 100 mM des deux substrats et un mélange de 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant), en testant quatre quantités de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (215, 430, 875 et 1800 mg) dans le réacteur à « lit fixe ». Les résultats sont donnés figure 72 :

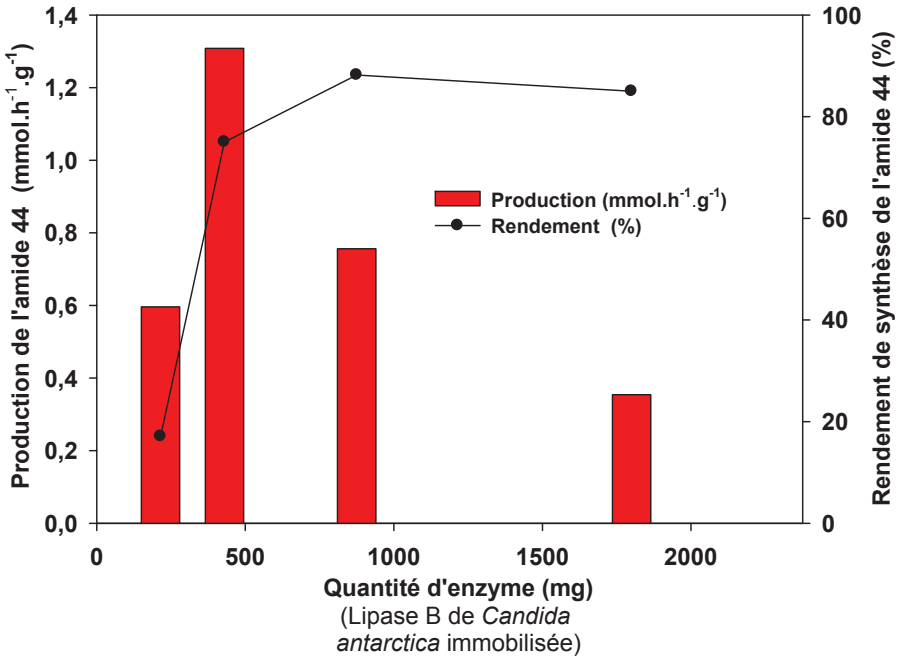


Figure 72 : *Influence de la quantité d'enzyme sur la production et le rendement de synthèse du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (amide) obtenus dans un réacteur continu à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 100 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et de 100 mM d'acide stéarique **43** à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°2 contenant la lipase B de Candida antarctica.*

L'évolution du rendement de synthèse de l'amide **44** par rapport à la quantité d'enzyme (lipase B de *Candida antarctica*) montre que de 215 à 875 mg de lipase, le rendement augmente avec la quantité de lipase de 17% à 88% en présence de 875 mg de lipase dans le réacteur. L'augmentation de la quantité de lipase au-delà de cette valeur demeure sans effet sur le rendement. Plusieurs explications peuvent justifier une stabilité du rendement de synthèse à partir d'une certaine quantité de lipase. Tout d'abord, le lit fixe contenant la lipase étant placé horizontalement, il est envisageable qu'une partie de la lipase présente au niveau du lit fixe ne soit pas en contacte avec le milieu réactionnel contenant les substrats, à cause d'un problème de limitation diffusionnelle des substrats au sein du lit fixe. D'autre part, nous pouvons également envisager que l'équilibre thermodynamique de la réaction ait été atteint à partir de 875 mg de lipase dans le réacteur et donc pour une quantité de lipase plus importante, il est normal d'obtenir dans rendements similaires. Au final, nous n'avons observé aucun problème de répartition du milieu réactionnel au niveau du lit fixe lors de cette étude (colonne N°2 en verre translucide). Et en nous basant sur les résultats obtenus lors d'une étude menée en réacteur « batch » au sein du laboratoire (données non décrites ici), nous avons confirmé que les rendements obtenus pour des quantités de lipase supérieures ou égales

à 875 mg de lipase dans le réacteur à « lit fixe », correspondent bien aux rendements obtenus à l'équilibre thermodynamique de la réaction en reacteur « batch ».

En outre, pour une quantité de lipase supérieure à 875 mg, nous observons une diminution significative de la production de l'amide **44** par rapport à la quantité de lipase utilisée. Cette production qui est de 0,76 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1} pour 875 mg de lipase passe à 0,35 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1} pour une quantité de lipase deux fois supérieure (1800 mg). L'utilisation de 875 mg de lipase dans le réacteur semble donc être le meilleur compromis entre un rendement de synthèse de l'amide excellent (≈90%) et une production significative de l'amide par rapport au coût en biocatalyseur (lipase B de *Candida antarctica*).

III.1.2.3. Effet de la concentration des substrats

L'effet de la concentration des substrats (3-aminopropane-1,2-diol **30** et acide stéarique **43**) a été étudié en faisant varier simultanément les concentrations des deux substrats pour un rapport molaire des substrats de 1. Les conditions opératoires utilisées précédemment ont été reprises (un débit de 125 µl.min^{-1}, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 en tant que réacteur et un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant), nous permettant d'obtenir les résultats présentés sur la figure 73 :

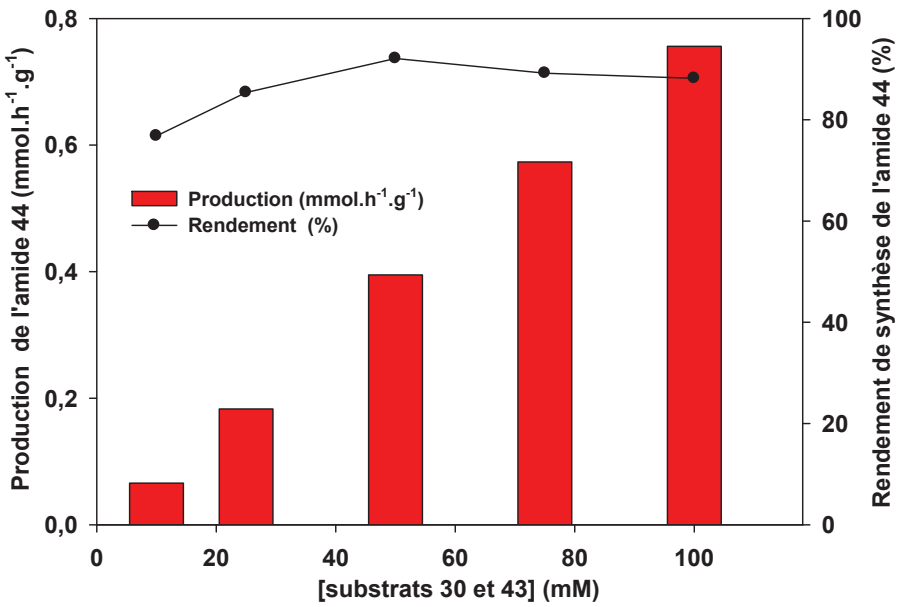


Figure 73 : *Effet de la concentration des deux substrats (**30** et **43**) sur la production et le rendement de synthèse du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (amide) obtenus dans un réacteur continu à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de différentes concentrations de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et d'acide stéarique **43** à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°3 contenant 875 mg de lipase B de Candida antarctica.*

Nous observons que le rendement de synthèse de l'amide **44** le plus faible de 77% est obtenu pour la concentration initiale la plus faible des substrats de 10 mM, ceci étant probablement dû à un effet de dilution des substrats dans le milieu qui diminue leur disponibilité pour la lipase. Pour les autres concentrations en substrat testées (≥ 25 mM), les rendements sont relativement similaires, en effet, la figure 73 montre des rendements proches avec une valeur moyenne de 89±3%. En revanche, la quantité d'amide **44** produite en continu est proportionnelle à la concentration des substrats. Nous observons que la production augmente progressivement allant de 0,07 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ pour une concentration initiale des substrats de 10 mM, jusqu'à une production maximale de 0,76 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ pour une concentration des substrats de 100 mM.

Ces résultats sont à nouveau cohérents car, comme décrit dans une partie précédente de cette étude (III.1.2.1), la production dépend du débit du réacteur et de la quantité d'enzyme qui ici sont fixes (125 $\mu l.min^{-1}$ et 875 mg de lipase), des rendements de synthèse de l'amide **44** qui comme décrit précédemment sont essentiellement similaires et de la concentration des substrats qui est le paramètre que nous avons fait varier. Ceci explique que dans nos conditions (de 10 à 100 mM de substrats au départ), la production de l'amide **44** est proportionnelle à la concentration des substrats au départ.

Pour la suite de notre travail, afin de favoriser la synthèse sélective de l'amide, nous utiliserons une concentration des deux substrats (**30** et **43**) de 50 mM qui correspond au rendement le plus élevé de 92% observé au cours de cette étude, ainsi qu'à une production significative de l'amide (0,39 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ ou 140 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

III.1.2.4. Influence du donneur d'acyle

Au début de cette étude, nous avons émis le souhait de produire des pseudo-céramides les plus proches possibles des céramides naturels. Dans cette optique, l'acide stéarique **43** (C18) avait été choisi comme donneur d'acyle modèle pour la première étape de la synthèse. Cependant, les propriétés et les applications des céramides étant fortement dépendantes de la structure de leurs chaines carbonées (Pinto *et al.,* 2011 ; Grösch *et al.,* 2012), il nous a semblé intéressant d'élargir notre procédé à la synthèse d'amides de chaîne carbonée variable issus de la N-acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** à partir d'autres donneurs d'acyle. Ces différents amides pourront servir par la suite à la synthèse d'une gamme de pseudo-céramides possédant potentiellement des applications différentes.

En plus de l'acide stéarique **43** C18, quatre autres donneurs d'acyle (acide laurique **46** C12, acide myristique **2** C14, acide oléique **47** C18:1 et acide linoléique **48** C18:2) ont été testés vis-à-vis de l'acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en réacteur à « lit fixe » dans les conditions optimales où nous avons obtenu le meilleur rendement (un débit de 125 µl.min^{-1}, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 en tant que réacteur, 50 mM des deux substrats et un mélange de 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant).

La figure 74 présente les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons contenant différents acides gras (**43**, **46**, **47** et **48**) utilisés comme donneurs d'acyle et les différents produits d'acylation obtenus correspondant à ces acides.

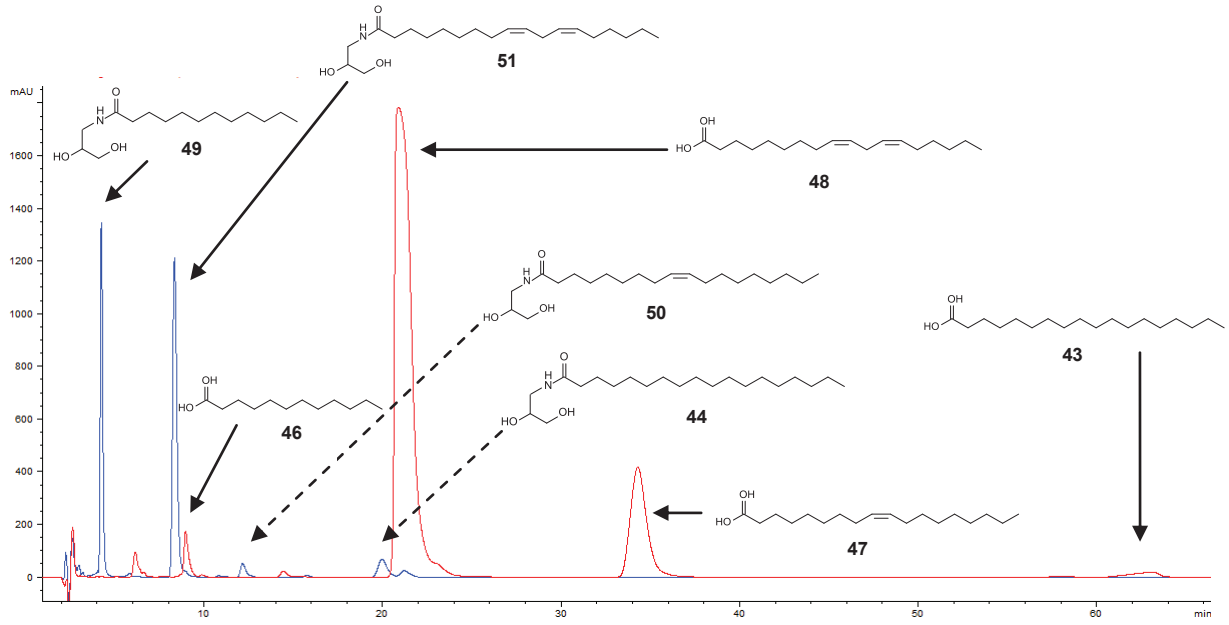


Figure 74 : *Chromatogrammes CLHP obtenus par détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant à un mélange des différents produits de synthèse et chromatogramme rouge correspondant à un mélange de différents acides gras utilisés (**43**, **46**, **47** et **48**). Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°4, gradient de solvants N°3 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Nous observons 8 pics :

- tr = 4,2 minutes : N-lauryl 3-aminopropane-1,2-diol **49**;
- tr = 8 minutes : N-linoléyl 3-aminopropane-1,2-diol **51**;
- tr = 9 minutes : acide laurique **46**;
- tr = 12 minutes : N-oléyl 3-aminopropane-1,2-diol **50**;
- tr = 20 minutes : N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44**;
- tr = 21 minutes : acide linoléique **48**;
- tr = 34 minutes : acide oléique **47**;
- tr = 60 minutes : acide stéarique **43**.

Le 1-O,3-N-dilauryl 3-aminopropane-1,2-diol **52** a également été détecté par spectrométrie de masse, mais cette molécule est présente en quantité trop faible pour être observée par détection UV à 210 nm. En revanche, 3 pics correspondant aux autres composés di-O-N-acylés ont été détectés en UV à 210 nm en très faibles quantités (non montrés sur les chromatogrammes figure 74) :

- tr = 104 minutes : 1-O,3-N-dilinoléyl 3-aminopropane-1,2-diol **54**;
- tr = 108 minutes : 1-O,3-N-dioléyl 3-aminopropane-1,2-diol **53**;
- tr = 116 minutes : 1-O,3-N-distéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **45**.

Lors de l'acylation du 3-aminopropane-1,2-diol **30** par l'acide myristique **2**, nous observons également 3 pics sur les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm selon la même méthode que précédemment (pics non montrés sur les chromatogrammes figure 74) :

- tr = 6,5 minutes : N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **38**;
- tr = 17 minutes : acide myristique **2**;
- tr = 100 minutes : 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **40**;

Les rendements obtenus pour les différentes expériences réalisées avec chaque acide gras et les valeurs de Log P de chaque acide sont décrits figure 75.

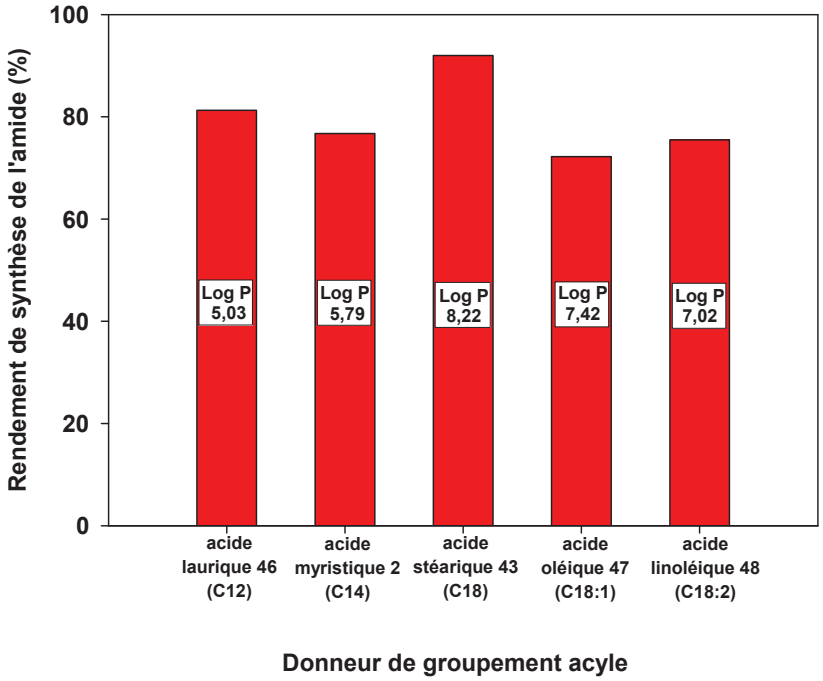


Figure 75 : *Influence du donneur d'acyle sur le rendement de synthèse de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols obtenu dans un réacteur continu à « lit fixe ». Conditions initiales: les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et de 50 mM d'acide stéarique **43** (Log P= 8,22), d'acide myristique **2** (Log P= 5,79), d'acide laurique **46** (Log P= 5,03), d'acide oléique **47** (Log P= 7,42) ou d'acide linoléique **48** (Log P= 7,02) à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°3 contenant 875 mg de lipase B de Candida antarctica.*

Tout d'abord, nous observons que les rendements de synthèse des amides obtenus à partir de l'acide laurique **46**, de l'acide myristique **2**, de l'acide oléique **47** et de l'acide linoléique **48**, sont relativement similaires et avec des valeurs comprises entre 72 et 80%. Puis, nous remarquons également que l'acide stéarique **43**, qui est l'acide le plus hydrophobe parmi ceux testés (Log P 8,22), permet d'obtenir un rendement de synthèse de l'amide de 92%, qui est plus élevé que pour les autres acides.

Au final, nous constatons que les rendements de synthèse des amides obtenus à partir des cinq acides gras testés sont significatifs (>70%) et que dans tous les cas, la sélectivité de la réaction est élevée (aucun produit de mono-O-acylation ou de di-O-acylation n'est détecté et le produit de di-O-N-acylation n'est présent qu'en très faibles quantités). Notre procédé de synthèse est donc applicable à la production d'autres N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols que l'amide **44**, qui peuvent servir par la suite à la synthèse de pseudo-céramides possédant des chaines carbonées différentes.

III.1.2.5. Étude de la stabilité de la lipase B de *Candida antarctica* en réacteur continu

Le but de l'expérience ci-après est de connaître la stabilité de la lipase B de *Candida antarctica* dans nos conditions expérimentales. En effet, pour développer un procédé de synthèse en réacteur continu, il est nécessaire que l'enzyme stockée dans le réacteur maintienne son activité catalytique optimale pendant toute la durée de la production. La stabilité de la lipase B de *Candida antarctica* a donc été évaluée à partir de la synthèse en continu de N-lauryl 3-aminopropane-1,2-diol **49** dans les conditions optimales où nous avons obtenu le meilleur rendement (un débit de 125 $\mu l.min^{-1}$, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 en tant que réacteur et 50 mM des deux substrats). Afin de réaliser cette étude, nous avons préparé plusieurs litres de milieu réactionnel constitué d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) contenant les deux substrats. Le milieu réactionnel circule à travers le réacteur en continu et des prélèvements en sortie de colonne (lit fixe) sont effectués pendant 3 semaines afin de suivre le rendement de synthèse de l'amide **49** qui est représentatif de l'activité de la lipase au cours du temps. Les résultats sont données figure 76 :

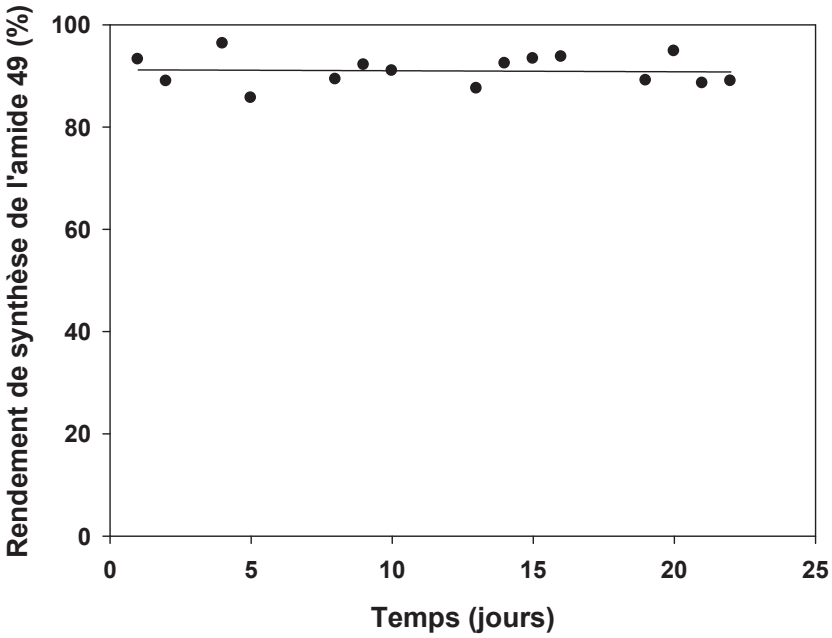


Figure 76 : *Rendement de synthèse du N-lauryl 3-aminopropane-1,2-diol **49** (amide) produit en réacteur continu à « lit fixe » durant 22 jours. Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM de 3-aminopropane-1,2-diol **30** et de 50 mM d'acide laurique **46** à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 $\mu l.min^{-1}$ à travers la colonne N°3 contenant 875 mg de lipase B de Candida antarctica.*

La figure 76 montre que la lipase B de *Candida antarctica* présente une bonne stabilité dans nos conditions expérimentales. En effet, après 22 jours de synthèse en continu, nous n'observons aucune diminution significative du rendement de synthèse de l'amide **49**, avec un

rendement moyen de 91% (±3%). Cette stabilité du biocatalyseur peut être en partie expliquée par une adaptation de l'enzyme au milieu réactionnel. En effet, plusieurs autres études ont montré que lors de la mise en œuvre de réactions d'hydrolyse inverse, les molécules d'eau produites au cours des réactions peuvent modifier l'état d'hydratation de l'enzyme en particulier dans un réacteur continu de type « lit fixe » où le volume du réacteur est faible par rapport à la quantité d'enzyme utilisée (Colombié *et al.,* 1998 ; Frings *et al.,* 1999 ; Slotema *et al.,* 2003). Ces molécules d'eau peuvent entrainer la formation d'une couche d'hydratation supplémentaire au niveau de l'enzyme ou de son support d'immobilisation, qui limiterait l'accessibilité de l'enzyme pour des substrats de nature plus hydrophobe comme par exemple des acides gras. Or, au cours de ces mêmes études, les auteurs ont démontré que l'utilisation d'un solvant organique polaire tel que le 2-méthylbutan-2-ol en réacteur continu, permet d'éliminer une partie de l'eau qui se trouve au niveau de l'enzyme en solubilisant les molécules d'eau. Ainsi, la présence d'une couche d'hydratation supplémentaire au niveau de l'enzyme ou de son support d'immobilisation est limitée et l'eau produite lors de la réaction d'hydrolyse inverse, est éliminée. Ceci tend à stabiliser l'enzyme et permet d'obtenir des rendements de synthèse similaires sur de longues périodes.

III.1.3. Bilan intermédiaire sur la production de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides)

Dans cette partie de notre travail, nous avons tout d'abord confirmé la faisabilité de la synthèse sélective de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en réacteur continu à « lit fixe ». Puis, nous avons étudié l'influence de différents paramètres expérimentaux (débit du milieu réactionnel, quantité d'enzyme, concentration des substrats et choix du donneur d'acyle) afin d'optimiser la synthèse de ce type de composé.

Dans les conditions expérimentales optimales en terme de rendement (un débit de 125 $\mu l.min^{-1}$, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 comme réacteur, 50 mM des deux substrats et un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant), 92% de synthèse de l'amide **44** à partir de l'acide stéarique **43** ont été atteints. Cependant, la production de l'amide **44** dans ces conditions n'a pas dépassé 0,41 $mmol.h^{-1}.g$ d'enzyme^{-1} (150 $mg.h^{-1}.g$ d'enzyme^{-1}). Les conditions expérimentales optimales en terme de production (un débit de 500 $\mu l.min^{-1}$, 430 mg de lipase dans la colonne N°1 comme réacteur et 100 mM des deux substrats et un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant) ont permis

d'atteindre une production de l'amide **44** allant jusqu'à 5,72 mmol.h^{-1}.g d'enzyme^{-1} (2050 mg.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}) pour un rendement ne dépassant pas 82%.

Par la suite, en combinant les conditions permettant d'obtenir le meilleur rendement et la meilleure production, nous avons déterminé des conditions expérimentales permettant d'obtenir à la fois un bon rendement de synthèse de l'amide **44** de 89% et une production élevée de 3,05 mmol. h^{-1}.g d'enzyme^{-1} (1091 mg.h^{-1}.g d'enzyme^{-1}) : un débit de 500 µl.min^{-1}, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 comme réacteur, 100 mM des deux substrats et un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant.

Nous avons également réalisé la réaction avec l'acide laurique **46**, l'acide myristique **2**, l'acide oléique **47** et l'acide linoléique **48** comme donneurs d'acyle. Les résultats obtenus ont confirmé que notre procédé est applicable à la synthèse de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) de structures variées avec des rendements significatifs, supérieurs à 70%, et une sélectivité élevée.

Au final, il a également été démontré que la lipase B de *Candida antarctica* est stable dans nos conditions expérimentales et garde son activité optimale pendant au moins 22 jours de production en continu.

III.2. Production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides)

III.2.1. Mise en œuvre de la réaction

La production d'un amido-ester de type « pseudo-céramide », le 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** est choisie ici comme réaction modèle afin de réaliser la production de pseudo-céramides les plus proches possibles des céramides naturels.

La lipase B de *Candida antarctica* est utilisée pour catalyser la O-acylation régiosélective (en position 1) du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** à partir de l'acide myristique **2** dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane à 55°C (schéma 12).

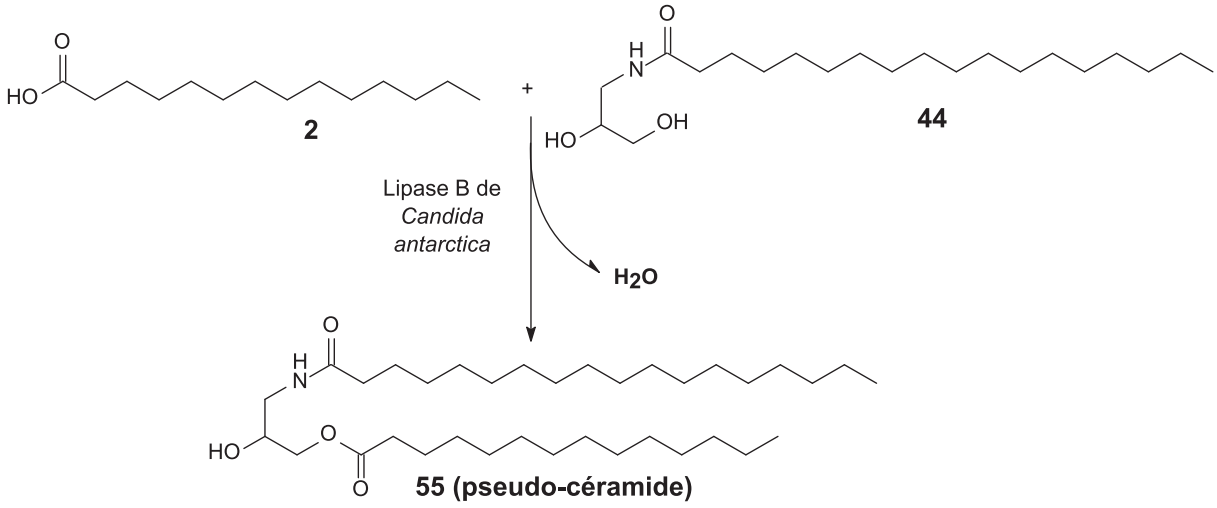


Schéma 12 : *Production du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol* ***55*** *(pseudo-céramide) catalysée par la lipase B de Candida antarctica à partir du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol (amide)* ***44*** *et d'acide myristique* ***2*** *en solvants organiques à 55°C.*

Afin de réaliser la O-acylation sélective de l'amide **44** en réacteur à « lit fixe » dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane, nous nous somme basés sur les conditions optimales permettant d'obtenir le meilleur rendement de synthèse de l'amide **44**, lors de la partie précédente de notre travail (un débit de 125 µl.min^{-1}, 875 mg de lipase dans la colonne N°3 « lit fixe » et 50 mM des deux substrats) et sur des conditions de synthèse obtenues précédemment lors d'une étude menée en réacteur « batch » au sein du laboratoire (données non décrites ici). En effet, cette dernière étude a démontré qu'à l'instar de l'étape de N-acylation, l'utilisation d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant et de concentrations en substrats inférieures ou égales à 100 mM lors de la O-acylation sélective de l'amide **44** étaient un bon compromis entre une bonne sélectivité de la lipase et une bonne solubilité des substrats et des produits de réactions qui est nécessaire à une production en réacteur continu. Par ailleurs, étant donné qu'un rendement de synthèse excellent de l'amide **44** a été obtenu avec une valeur proche de 90%, dans la partie précédente de notre travail (III.1), il est donc possible de réaliser la synthèse de pseudo-ceramide par O-acylation de l'amide **44** en utilisant directement le milieu réactionnel obtenu lors de la production de cet amide et en tenant compte de la proportion d'amide **44** dans le milieu réactionnel pour définir sa concentration.

Au départ, nous avons donc fixé les conditions suivantes : 50 mM du N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (obtenu à partir du milieu réactionnel de l'étape précédente) et 50 mM d'acide myristique **2** dans un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel est pompé à un débit de 125 µl.min^{-1} à travers un réacteur continu à « lit fixe » contenant 875 mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée. Nous

avons utilisé comme « lit fixe » la colonne N°3 (Chapitre II : Matériel et méthodes, III.4 ; Ø de 0,5 cm x longueur de 14,5 cm) le temps de séjour au niveau du réacteur déterminé selon l'équation 9, est donc de 22,5 minutes.

La figure 77 montre les chromatogrammes CLHP obtenus en UV à 210 nm, pour deux échantillons, l'un prélevé après la synthèse de 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** et le second correspondant à un échantillon contenant uniquement l'acide stéarique **43** (témoin du substrat de la première étape).

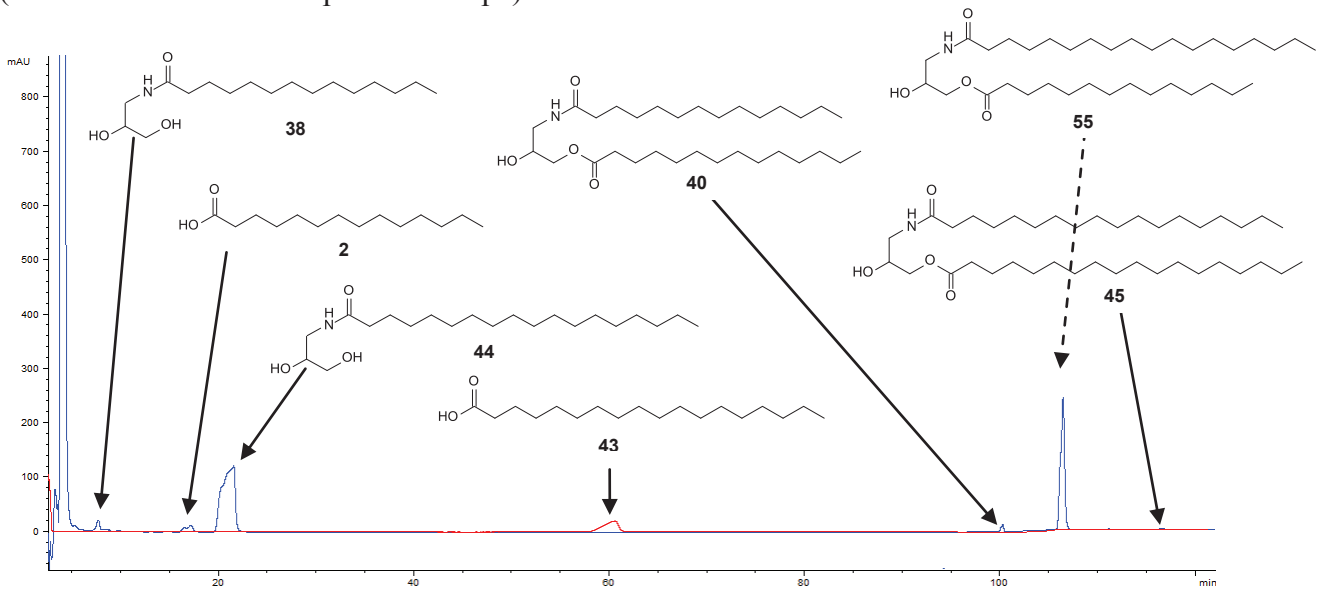


Figure 77 : *Chromatogrammes CLHP obtenus par détection UV à 210 nm avec : chromatogramme bleu correspondant au milieu réactionnel après la synthèse du pseudo-céramide **55** et chromatogramme rouge correspondant à un échantillon contenant 50 mM d'acide stéarique **43**. Conditions d'analyses : colonne C18 Prontosil 120-5-C18-AQ (250×4 mm, 5 µm), 1 ml.min^{-1}, système d'élution N°4, gradient de solvants N°3 (CHAPITRE II : Matériel et méthodes).*

Nous observons sept pics :

- tr = 6,5 minutes : N-myristyl 3-aminopropane-1,2-diol **38** (trace);
- tr = 17 minutes : acide myristique **2** ;
- tr = 20 minutes : N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** ;
- tr = 60 minutes : acide stéarique **43** ;
- tr = 100 minutes : 1-O,3-N-dimyristyl 3-aminopropane-1,2-diol **40** (trace);
- tr = 106 minutes : 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** ;
- tr = 116 minutes : 1-O,3-N-distéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **45** (trace).

L'analyse des données montre une sélectivité élevée de la lipase en faveur de la O-acylation en position 1. En effet, aucun produit issu d'une O-acylation en position 2 n'est détecté. Les produits ont été caractérisés par SM, IR et RMN après purification. Les quantifications des espèces en présence dans le milieu réactionnel après passage dans le

réacteur en continu (t = 2 heures) ont permis d'obtenir un rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** de 24% qui correspond à une production en continu de cet amide de 0,1 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (60 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

À la suite de la production en continu, le réacteur a été utilisé en mode circulaire fermé, c'est-à-dire que le milieu réactionnel passe plusieurs fois en recirculation dans le réacteur comme décrit précédemment dans le Chapitre II Matériel et méthodes, III.3 (figure 32). Nous effectuons 12 cycles de production sur 24 heures (environ 2 heures par cycle). Contrairement aux résultats attendus, l'utilisation du réacteur en circuit fermé n'améliore pas le rendement de synthèse du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55**. Au contraire, nous obtenons un rendement de 19% qui est plus faible de 5% que le rendement obtenu en production continue.

Nous avons émis une hypothèse sur cette diminution des rendements observée en circuit fermé : nous réalisons nos réactions de synthèse par hydrolyse inverse et nos réactions s'accompagnent donc de la production de molécules d'eau qui s'accumulent progressivement dans le milieu réactionnel. Par conséquent, les substrats, le produit de synthèse (pseudo-céramide) et les molécules d'eau recirculent à travers la colonne contenant la lipase. Les réactions de synthèse et d'hydrolyse du pseudo-céramide entrent alors en compétition et une diminution du rendement de pseudo-céramide en circuit fermé indique probablement que l'hydrolyse devient majoritaire à partir d'un certain nombre de cycles.

Suite à la caractérisation des différents produits et à la vérification de la faisabilité du procédé de synthèse, nous avons cherché à identifier des conditions permettant d'optimiser le rendement et la production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides) en mode continu et/ou en circuit fermé.

III.2.2. Optimisation de la réaction

III.2.2.1. Effet de la composition du solvant

Lors de cette partie, nous nous intéressons à l'influence de la composition du solvant sur les rendements de synthèse de pseudo-céramides. En effet dans une partie précédente de notre travail (Chapitre III : Résultats et discussions - Partie 4, II), portant sur l'influence du solvant, nous avions observé que la lipase B de *Candida antarctica* permettait la production sélective de mono-amide ou d'amido-ester (pseudo-céramide) respectivement dans le 2-méthylbutan-2-ol ou le *n*-hexane. Lors de cette expérience, nous avons donc voulu observer l'impact sur la synthèse du pseudo-céramide **55** d'une augmentation de la proportion de *n*-hexane dans le

mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane utilisé comme solvant. Cependant, nous n'avons pas pu tester des proportions de *n*-hexane supérieur à 80%, car au-dela le milieu réactionnel devient hétérogène à cause de la faible solubilité de l'amide **44** dans le *n*-hexane (≈ 80 mg.l^{-1}). Les réactions ont été menées dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées au départ (III.2.1), en testant trois mélanges 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane (50/50, 70/30 et 80/20, v/v) comme solvant. Une production en continu a été réalisée pendant 2 heures à la suite de quoi le réacteur a été utilisé en mode circulaire fermé pendant 24 heures (12 cycles). Les résultats sont donnés figure 78 :

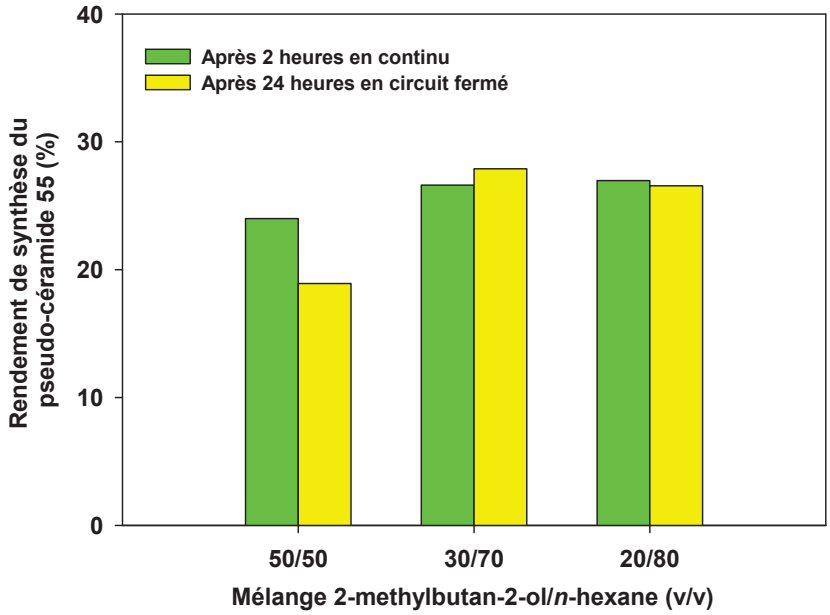


Figure 78 : *Effet de la composition du mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane utilisé comme solvant sur le rendement de synthèse du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol* ***55*** *(pseudo-céramide) obtenu dans un réacteur à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM de N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol* ***44*** *et de 50 mM d'acide myristique* ***2*** *à 55°C. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°3 contenant 875 mg de lipase B de Candida antarctica.*

Après avoir réalisé la production en continu pendant 2 heures, nous remarquons que des rendements de synthèse très similaires du pseudo-céramide **55** (24-27%) sont obtenus dans les différents mélanges de solvants testés, composés de 50 à 80% de *n*-hexane. L'augmentation de la proportion de *n*-hexane jusqu'à 80% n'a donc pas d'impact sur le rendement de synthèse du pseudo-céramide **55**.

Après avoir laissé tourner le réacteur en circuit fermé pendant 24 heures, le rendement en pseudo-céramide **55** diminue, dans le mélange composé à 50% de *n*-hexane, passant de 24% en continu à 19% en circuit fermé, tandis que les rendements sont stables (± 1%) pour les solvants composés à 70% et 80% de *n*-hexane. Afin de comprendre cette stabilité des

rendements, nous avons évalué les activités thermodynamiques de l'eau produite au cours de la réaction et de l'amide **44** substrat de la réaction dans les différents mélanges de solvants testés, après 2 heures de synthèse en continu et avant d'utiliser le réacteur en circuit fermé (figure 79).

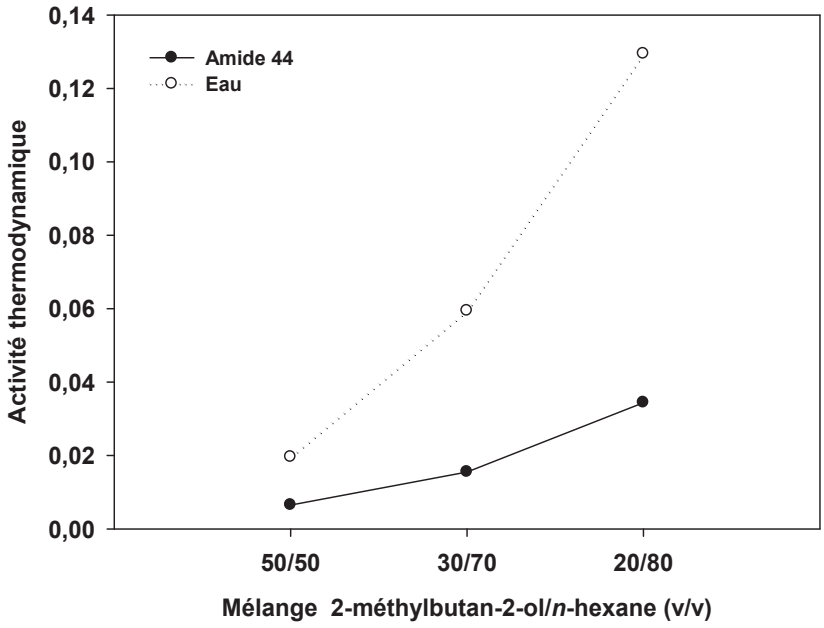


Figure 79 : *Représentation des activités thermodynamiques de l'amide **44** (substrat accepteur d'acyle) et de l'eau (produite lors de la réaction de synthèse) en fonction du mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane utilisé comme solvant et après 2 heures de production en continu. Les activités thermodynamiques représentées ici ont été estimées en utilisant la méthode de contribution des groupes ''UNIversal Functional Activity Coeficient'' (UNIFAC) (voir CHAPITRE II : Matériel et méthodes, II.6.1).*

Dans les trois mélanges de solvant testés, l'activité de l'eau et celle de l'amide **44** augmentent avec l'augmentation de la proportion de *n*-hexane dans le milieu. L'augmentation de l'activité de l'eau reste pourtant plus importante que celle de l'activité du *n*-hexane et l'écart entre ces 2 activités thermodynamiques s'accroit avec la quantité de *n*-hexane présente dans le milieu. Ceci pourrait avoir pour conséquence de rendre l'eau plus disponible que l'amide **44** pour la lipase, favorisant de ce fait la réaction d'hydrolyse en circuit fermé et la chute des rendements de synthèse du pseudo-céramide **55**. Or, les résultats présentés figure 78 démontrent que les rendements restent au contraire stables en circuit fermé pour des mélanges de solvants composés à 70% ou 80% de *n*-hexane. Il semble donc qu'une faible augmentation de l'activité thermodynamique de l'amide **44** a un impact plus important sur l'activité catalytique de la lipase qu'une augmentation élevée de l'activité thermodynamique de l'eau.

III.2.2.2. Influence de la quantité d'enzyme et de la présence ou non d'un tamis moléculaire

Pour cette étude, les réactions ont été menées dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées au départ (III.2.1), en testant quatre quantités différentes de lipase dans la colonne (lit fixe) du réacteur (430, 875, 1800 et 2700 mg) et en présence ou non de 700 mg de tamis moléculaires (porosité de 3Å ; Ø de 1,6 mm) dans une seconde colonne lors de l'utilisation du réacteur en circuit fermé. Une production en continu est réalisée pendant 2 heures à la suite de quoi le réacteur a été utilisé en mode circulaire fermé pendant 24 heures (12 cycles). Les résultats sont donnés figure 80 :

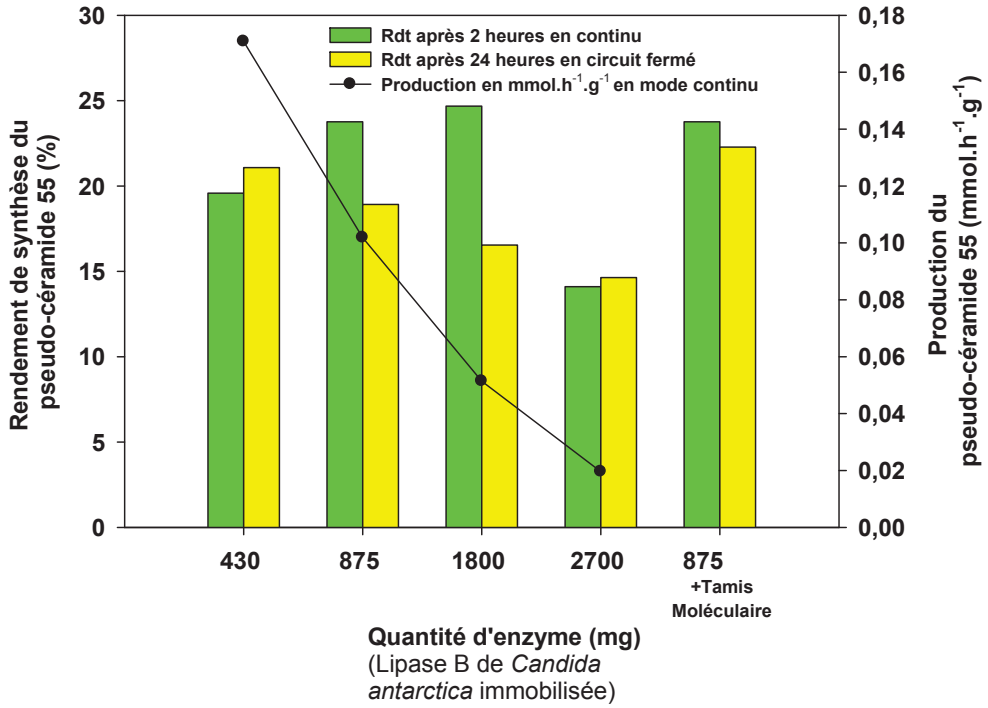


Figure 80 : *Influence de la quantité d'enzyme et de la présence ou non d'un tamis moléculaire sur la production et le rendement de synthèse du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol* ***55*** *(pseudo-céramide) obtenus dans un réacteur à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM de N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol* ***44*** *et de 50 mM d'acide myristique* ***2*** *à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°2 contenant la lipase B de Candida antarctica.*

Après avoir réalisé la production en continu pendant 2 heures, le rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** atteint seulement 19% pour 430 mg de lipase. Par contre, il augmente en doublant et en quadruplant la quantité de lipase (875 mg et 1800 mg) d'environ 5-6% et atteint des valeurs proches de 24-25%. Lorsque la quantité de lipase augmente, le temps de séjour dans le bioréacteur augmente également car le volume du réacteur (colonne N°2) est proportionnel à la quantité de lipase. L'augmentation du temps de séjour favorise donc l'avancement de la réaction. Cependant, pour la quantité la plus élevée de lipase de 2700 mg

qui correspond donc au temps de séjour le plus long qui est de 53 minutes, une diminution du rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** est observée, ce rendement ne dépassant pas 11%. Ces résultats sont probablement dus à une réaction d'hydrolyse similaire au phénomène décrit précédemment lors de l'utilisation du réacteur en circuit fermé (III.2.1).

Nous observons également que la production du pseudo-céramide **55** diminue significativement par rapport à l'augmentation de la quantité de lipase utilisée. L'utilisation de 875 mg de lipase dans le réacteur semble être le meilleur compromis entre un rendement de synthèse significatif du pseudo-céramide de 24% et une production significative du pseudo-céramide par rapport au coût en biocatalyseur (lipase B de *Candida antarctica*) de 0,1 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (60 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

Après avoir laissé tourner le réacteur en circuit fermé pendant 24 heures, nous observons comme dans les expériences précédentes une nette diminution des rendements à 17% et 16% lors de l'utilisation de respectivement 875 et 1800 mg de lipase qui permettaient d'obtenir les meilleurs rendements en continu (≈ 25%). Dans le même temps, il est également intéressant d'observer que plus la quantité de lipase dans le réacteur augmente plus le rendement diminue en circuit fermé. Ces derniers résultats sont en accord avec l'hypothèse décrite lors de la mise en œuvre de la réaction (III.2.1) qui suppose que les réactions de synthèse et d'hydrolyse du pseudo-céramide entrent en compétition en circuit fermé. Nos résultats laissent entendre que l'hydrolyse du pseudo-céramide est sous contrôle thermodynamique alors que sa synthèse est sous contrôle cinétique. Une augmentation de la quantité de lipase augmenterait donc la vitesse d'hydrolyse et aurait peu d'influence sur la vitesse de synthèse. Cela se traduit par un rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** qui diminue proportionnellement à la quantité de lipase utilisée, après 12 cycles en circuits fermés.

De plus, pour 875 mg de lipase dans le réacteur, la diminution de 7% du rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** observée après passage en circuit fermé, passe à une diminution de seulement 1% lorsque nous utilisons une seconde colonne contenant du tamis moléculaire afin de capter les molécules d'eau présentent dans le milieu. Ces résultats confirment donc que la diminution des rendements en circuit fermé est bien due à la présence d'eau qui s'accumule dans le milieu après la synthèse et qui permet l'hydrolyse du pseudo-céramide.

Pour conclure cette expérience, l'utilisation du réacteur en circuit fermé n'améliore en aucun cas le rendement en pseudo-céramide. Même en présence de tamis moléculaire pour limiter la réaction d'hydrolyse, les rendements sont similaires à ceux obtenus en production continue. Ce mode de fonctionnement du réacteur en circuit fermé ne semble donc pas approprié à ce type de synthèse.

III.2.2.3. Effet de la concentration du donneur d'acyle

Nous avons étudié l'influence de la concentration en acide myristique **2**, qui est utilisé ici comme donneur d'acyle, sur le rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** par rapport à la concentration d'amino-diol au départ. Les réactions ont été menées dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées au départ (III.2.1), en testant trois concentrations différentes d'acide myristique **2** (50, 100 et 150 mM) pour une concentration fixe de 50 mM en amide **44** utilisé comme accepteur d'acyle. Une production en continu a été réalisée pendant 2 heures et les résultats obtenus sont donnés figure 81 :

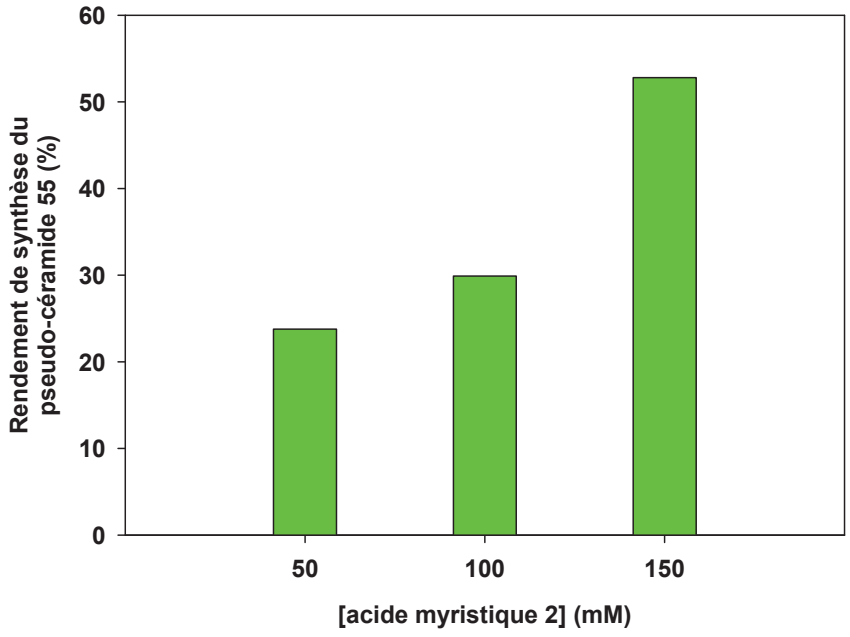


Figure 81 : *Influence de la concentration en acide mysistique **2** utilisé comme donneur d'acyle sur le rendement de synthèse du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** (pseudo-céramide) obtenu dans un réacteur à « lit fixe ». Conditions initiales : les réactions ont été réalisées en présence de 50 mM de N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** et de trois concentrations différentes d'acide myristique **2** à 55°C au sein d'un mélange 2-méthylbutan-2-ol/n-hexane 50/50 (v/v) comme solvant. Le milieu réactionnel circule avec un débit de 125 µl.min^{-1} à travers la colonne N°3 contenant 875 mg de lipase B de Candida antarctica.*

Après avoir réalisé la production en continu pendant 2 heures, nous remarquons que plus la concentration initiale en acide myristique **2** est élevée plus le rendement de synthèse du pseudo-céramide **55** augmente, allant d'un rendement de 24% pour une concentration

initiale de 50 mM en acide myristique **2** (conditions stœchiométriques) jusqu'à un rendement de 53% pour une concentration initiale de 150 mM en acide myristique **2** (3 équivalent d'acide myristique **2**). Ainsi, un rapport molaire r : [acide myristique **2**] / [amide **44**] de 3/1 permet d'obtenir le rendement en pseudo-céramide **55** le plus élevé observé au cours de cette étude. Ce rendement correspond à une production en pseudo-céramide **55** de 0,22 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (127 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

Cette augmentation des rendements en fonction du rapport molaire r, peut être expliquée logiquement par le fait que l'utilisation d'un des deux substrats en excès, ici l'acide myristique **2**, déplace l'équilibre de la réaction en faveur de la synthèse du pseudo-céramide **55**.

III.2.3. Bilan intermédiaire sur la production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides)

Dans cette partie de notre travail, nous avons tout d'abord confirmé la faisabilité de la synthèse sélective de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (pseudo-céramides) catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en réacteur à « lit fixe » en mode continu ou en circuit fermé (recirculation en boucle). Puis, nous avons étudié l'influence de différents paramètres expérimentaux (composition du mélange de solvant, quantité d'enzyme, utilisation d'un tamis moléculaire et concentration du donneur d'acyle) afin d'optimiser la synthèse de ce type de composés.

Après optimisation des conditions expérimentales (un débit de 125 $\mu l.min^{-1}$, 875 mg de lipase dans le réacteur, 150 mM d'acide myristique **2** comme donneur d'acyle, 50 mM d'amide **44** comme accepteur d'acyle et un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) comme solvant) la synthèse du pseudo-céramide **55** à partir de l'acide myristique **2** et de l'amide **44**, a atteint un rendement significatif de 53% ce qui correspond à une production du pseudo-céramide **55** en mode continu de 0,22 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (127 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

Pour conclure sur cette étude, l'utilisation du réacteur à « lit fixe » en circuit fermé (recirculation en boucle) ne permet pas d'améliorer le rendement en pseudo-céramide. Au contraire les rendements diminuent à cause de l'accumulation dans le milieu réactionnel des molécules produites au cours de la synthèse (pseudo-céramide et eau), qui déplacent après un certains nombre de cycles, l'équilibre de la réaction en faveur de l'hydrolyse. Au final, même en présence de tamis moléculaire pour éliminer l'eau produite, le rendement est seulement

similaire à celui obtenu en mode continu. Ce type de système par recirculation ne semble donc pas approprié à notre procédé de synthèse.

IV. Conclusion

Nous avons amorcé cette dernière partie de notre travail en réalisant l'étude de réactions modèles correspondant à l'acylation des amino-diols **29** et **30** par la lipase B de *Candida antarctica* à partir de l'acide myristique **2**, ceci afin d'obtenir des informations sur la réactivité de ces amino-diols et de déterminer des conditions permettant la production d'amido-esters de type « pseudo-céramide ». Les principales conclusions concernant cette étude ont déjà été développées dans le bilan du II (II.3), aussi nous n'y reviendrons pas. Suite à cette étude, nous avons mis au point et optimisé un procédé de synthèse enzymatique de pseudo-céramides en réacteur continu à « lit fixe ». Ce procédé est divisé en deux étapes : Une production de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diols (amides) par N-acylation dans un premier temps, puis une production de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diols (amido-esters de type « pseudo-céramide ») par O-acylation dans un second temps. Nous avons obtenu lors de la première étape une conversion quasi-totale (85-95%) des substrats (acide stéarique **43** et 3-aminopropane-1,2-diol **30**) en N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **44** (amide), ainsi qu'une production maximale en amide **44** pouvant atteindre jusqu'à 5,72 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (2050 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$). Lors de la seconde étape, qui est l'étape limitante de notre procédé, le rendement de synthèse du 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** (pseudo-céramide) peut atteindre jusqu'à 27% dans les conditions stœchiométriques pour une production en continu de 0,11 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (67 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$). Nous avons également observé que l'utilisation d'un excès (3 éq) d'acide myristique **2** comme donneur d'acyle permet d'améliorer le rendement en pseudo-céramide **55** qui peut atteindre jusqu'à 53%, ce qui correspond à une production en continu de 0,22 $mmol.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$ (127 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$).

De notre étude, il ressort donc que l'utilisation d'un réacteur continu à « lit fixe » permet de réaliser efficacement et en seulement deux étapes, la synthèse sélective de pseudo-céramides à partir de différents donneurs de groupement acyle en utilisant comme catalyseur la lipase B de *Candida antarctica*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les céramides constituent une source importante de molécules à forts potentiels. Ces lipides et leurs analogues synthétiques présentent un intérêt industriel en raison de leurs multiples applications en cosmétologie et en pharmaceutique. La synthèse de céramides et de pseudo-céramides par voie enzymatique s'est développée depuis ces vingt dernières années. Généralement les enzymes employées pour ce type de synthèse sont des lipases. Les céramides issus des réactions enzymatiques ressemblent plus aux composés naturels par rapport à ceux synthétisés par des méthodes chimiques. Toutefois, les matières premières généralement employées dans ces différentes méthodes sont des bases sphingoides qui sont difficiles à synthétiser à grande échelle. Dans ce cadre, la mise au point de nouveaux procédés de synthèse enzymatique utilisant d'autres précurseurs que les bases sphingoides et l'amélioration des procédés de synthèse existants pour la production de « pseudo-céramides », se révèlent d'un grand intérêt.

Dans ce travail, notre objectif principal était de réaliser la synthèse de « pseudo-céramides » catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en associant un amino-polyol de type aminopropanediol à différents acides gras. Ce travail a été réalisé en gardant à l'esprit une approche fondamentale, cherchant à comprendre l'effet de la structure du substrat accepteur de groupement acyle et l'effet du microenvironnement de la lipase sur son activité catalytique et sa sélectivité en milieux dits « non-conventionnels » faiblement hydratés. Pour atteindre cet objectif, les travaux de cette thèse se sont articulés autour de quatre axes d'investigation :

Dans la première partie de cette thèse, nous avons réalisé une étude des mécanismes réactionnels de la lipase B de *Candida antarctica* lors de l'acylation de composés monofonctionnels. Cette étude a démontré que la O-acylation du butan-2-ol **1** et la N-acylation de la *sec*-butylamine **4** peuvent être corrélées à deux mécanismes réactionnels complètements différents :

- Les données issues de la O-acylation du butan-2-ol **1** correspondent au modèle du mécanisme ordonné bi-bi à l'état stationnaire général, avec formation d'un complexe ternaire sans aucune forme d'inhibition.
- Les données issues de la N-acylation de la *sec*-butylamine **4** correspondent au modèle du mécanisme ping pong bi-bi à l'état stationnaire général avec un phénomène d'inhibition observé pour les plus fortes concentrations en substrats due à la formation d'un complexe salin entre les substrats (amine et acide).

Cette première partie de notre travail a également permis de confirmer que la lipase B de *Candida antarctica* est une enzyme à la fois énantiosélective en faveur de l'énantiomère R (butan-2-ol **1** : E = 3 et *sec*-butylamine **4** : E = 1,34) et chimiosélective en faveur de la O-acylation ((R)-butan-2-ol **1** et (R)-*sec*-butylamine **4** : C = 92).

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons réalisé une étude structure-réactivité en utilisant différents types d'accepteurs d'acyle (alcool, amine, diol, di-amine, méthoxy-amine et amino-alcools). Les connaissances acquises lors de cette partie nous ont permis de mieux comprendre les paramètres réactionnels et structuraux intervenant dans la chimiosélectivité de la lipase, en particulier lors de l'acylation de substrats de type amino-alcool, et ainsi de développer une hypothèse sur les mécanismes impliqués lors de l'acylation chimiosélective des amino-alcools catalysée par la lipase B de *Candida antarctica.* Il a ainsi été démontré un rôle crucial de la structure de l'amino-alcool et en particulier de la longueur de la chaîne carbonée entre les fonctions amine et alcool, sur la chimiosélectivité des réactions d'acylation en conditions de vitesse initiale : la V_{max}^{app} de N-acylation est favorisée lorsque la chaîne comprend deux carbones et la V_{max}^{app} de O-acylation est favorisée lorsque la chaîne comprend quatre carbones ou plus. Cette modification de la chimiosélectivité des réactions est probablement causée par des interactions entre les deux groupements fonctionnels des amino-alcools.

La troisième partie de cette thèse a consisté en l'étude de l'influence du solvant sur l'acylation de trois amino-alcools (alaninol **6**, 4-aminopentan-1-ol **21** et 6-aminohexan-1-ol **22**) catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*. Cette étude a été réalisée dans trois solvants de natures différentes : un solvant organique polaire protique (2-méthylbutan-2-ol), un solvant organique apolaire aprotique (*n*-hexane) et un liquide ionique ([Bmim] [PF_6]). D'un point de vue général, les résultats obtenus lors de cette partie démontrent la capacité de moduler l'activité catalytique de la lipase et la sélectivité de la réaction à l'équilibre thermodynamique en fonction du solvant utilisé et/ou du rapport molaire des substrats. Par exemple, lors de l'acylation de l'alaninol **6**, un amino-alcool à chaîne courte, l'utilisation de 2-méthylbutan-2-ol comme solvant associée aux conditions stœchiométriques favorise la production d'amide (> 95%) alors que l'utilisation de [Bmim][PF_6] ou de *n*-hexane associée à des conditions d'excès de donneur d'acyle (acide myristique **2**) favorise la production d'amido-ester. Ces résultats ont permis d'envisager l'optimisation de la synthèse sélective de pseudo-céramides à partir d'amino-polyols, par ce type de stratégie.

Finalement, la quatrième et dernière partie de notre travail a consisté dans un premier temps en l'étude fondamentale de l'acylation enzymatique de composés de type amino-diol, puis dans un second temps à développer et optimiser un procédé de synthèse sélectif de pseudo-céramides en réacteur continu, en tirant partie des connaissances acquises lors des études précédentes de cette thèse. Ainsi, le 3-aminopropane-1,2-diol **30** a été choisi comme précurseur de la synthèse de pseudo-céramides en raison de sa réactivité favorisant des rendements élevés et une meilleure sélectivité pour la production d'amido-esters de type « pseudo-céramide ». De même, un mélange 2-méthylbutan-2-ol/*n*-hexane 50/50 (v/v) a été choisi comme solvant afin de diminuer les risques de limitation diffusionnelle des substrats au sein du réacteur à « lit fixe » et de favoriser la sélectivité des réactions lors des deux étapes nécessaires à notre procédé de synthèse. La production sélective de pseudo-céramide nécessite en effet une première étape de synthèse de N-acyl 3-aminopropane-1,2-diol (amide) par N-acylation à partir d'un premier donneur d'acyle. Après optimisation des conditions expérimentales de cette étape, d'excellents rendements de synthèse ont été obtenus : par exemple pour l'amide **44**, des taux de synthèse supérieures à 90% ont été observés pour une production pouvant atteindre jusqu'à 2050 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$. Cette première étape n'est donc pas limitante. En revanche, lors de la seconde étape de synthèse de 1-O,3-N-diacyl 3-aminopropane-1,2-diol (« pseudo-céramide ») par O-acylation à partir d'un second donneur d'acyle, les rendements obtenus se sont révélés inférieurs à ceux de la première étape, pouvant tout de même atteindre des valeurs satisfaisantes après optimisation des conditions expérimentales. Ainsi, le rendement de synthèse de 1-O-myristyl-3-N-stéaryl 3-aminopropane-1,2-diol **55** (pseudo-céramide) a pu atteindre jusqu'à 53% pour une production en continu de 127 $mg.h^{-1}.g$ d'$enzyme^{-1}$. Au final, notre procédé de synthèse enzymatique en réacteur continu a donc démontré son efficacité pour la production hautement sélective et en quantité significative d'un composé de type « pseudo-céramide », avec un rendement de synthèse global sur les deux étapes de synthèse pouvant atteindre jusqu'à 49%.

Pour conclure, nous avons mis au point au cours de cette thèse un procédé de synthèse de pseudo-céramides en continu pouvant être utilisé dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Le procédé de synthèse enzymatique décrit dans notre travail a en effet été réalisé dans des conditions douces ne nécessitant aucune protection-déprotection des substrats et permettant d'obtenir les produits désirés avec des rendements significatifs. De plus, les différentes études fondamentales menées au cours de ce travail trouvent des applications dans

la synthèse de nombreuses autres molécules telles que les sucroamides ou les dérivés de peptides.

L'étude fondamentale de l'acylation enzymatique de composés multifonctionnels de type amino-alcool est achevée et son application à la synthèse de pseudo-céramides est aujourd'hui résolue à l'échelle du laboratoire. La suite à donner à ces travaux doit donc être axée sur le passage de la production à une échelle pilote de toute une gamme de pseudo-céramides à partir de différents donneurs de groupement acyle. Cette transition de la synthèse à une plus grande échelle va engendrer de nombreuses difficultés qui relèveront du génie chimique ainsi que des contraintes économiques.

Liste de références

Adamczak, M., Bornscheuer, U.T. & Bednarski, W. (2005) Synthesis of ascorbyloleate by immobilized Candida antarctica lipases. *Process Biochemistry* **40** (10), 3177-3180.

Afach, G., Kawanami, Y. & Izumori, K. (2005) Synthesis of D-allose fatty acid esters via lipase-catalyzed regioselective transesterification. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69** (4), 833-835.

Akoh, C.C. & L.N. Yee (1998) Lipase-catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **4**, 149–153.

Alloue, W.A.M., Aguedo, M., Destain, J., Ghalfi, H., Blecker, C., Wathelet, J.P. & Thonart, P. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment***. 12** (1), 57-68.

Altenbach, H-J., Berger, M., Jakob, B., Ihizane, R., Laumen, K., Lange, K., Machmüller, G., Müller, S. & Schneider, M.P. (2010) Lipid modification of amino acids, carbohydrates and polyols. *Lipid Technology* **22** (7), 155-158.

Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M. & Williamson, T.C. (2001) Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Applied Catalysis A: General*. **221**, 3–13.

Anderson, E.M., Larsson, K.M. & Kirk, O. (1998) One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* **16** (3), 181-204.

Anthonsen, T. & Jongejan, J.A. (1997) Solvent effect in lipase-catalyzed racemate resolution. *Methods in Enzymology* **286,** 473-495.

Awasthi, N.P. & Singh, R.P. (2007) Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid amide (erucamide) using fatty acid and urea. *Journal of oleo science* **56** (10), 507-509.

Baldwin, R.L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* **71** (4), 2056-2063.

Barbosa, O., Ariza, C., Ortiz, C. & Torres, R. (2010) Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of Candida antarctica lipase B (CAL-B). *New Biotechnology* **27** (6), 844-850.

Barth, B.M., Cabot, M.C. & Kester, M. (2011) Ceramide-based therapeutics for the treatment of cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **11**(9), 911-9.

Batovska, D.I., Tsubota, S., Kato, Y., Asano, Y. & Ubukata, M. (2004) Lipase-mediated desymmetrization of glycerol with aromatic and aliphatic anhydrides. *Tetrahedron Asymmetry* **15** (22), 3551-3559.

Bell, G., Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J. & Rees, G. (1995) Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends in Biotechnology* **13**, 468-473.

Bergmann, R.W. & Grove, L. (2000) Hair care compositions comprising ceramide. *US, Brevet 6,110,450*.

Bernetti, R., Kochan, S.J., Pienkowski, J.J., Hendrikse, P.W., Holme, R.A., Kielbaskiski, R., Lin, S.W., Manning R.G., Olah, I., Pike, M., Pocklington, W.D., Prins, W.F., Priss, A., Somkaite, R., Steele, W.M., Trautschold, E.W., Wijsman, J.A. & Wolff, P. (1984) Karl Fischer determination of water in oils and fats : international collaborative study. *Journal - Association of official analytical chemists* **67** (2), 299-301.

Bezombes, C., Grazide, S., Garret, C., Fabre, C., Quillet-Mary, A., Muller, S., Jaffrezou, J.P. & Laurent, G. (2004) Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood.* **104**, 1166–1173.

Bijani, C. (2010) Les lipoamino acides: des vecteurs d'absorption pour l'administration transmembranaire de biomolécules. Thèse de doctorat. p. 36. Université de Bordeaux 1. France.

Björkling, F., Godtfredsen, S.E. & Kirk, O. (1991) The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnology* **9** (1), 360-363.

Bollinger, C.R., Teichgraber, V. & Gulbins, E. (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica and Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1746** (3), 284-294.

Bonhôte, P., Dias, A-P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K. & Grätzel, M. (1996) Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. *Inorganic Chemistry* **35** (5), 1168–1178.

Bradić, M.R., Ognjanović, N.D., Bezbradica, D.I., Grbavčić, S.Ž., Avramović, N., Mijin, D.Ž. & Knezevic-Jugovic, Z.D. (2010) Synthesis of monoacylglycerols by enzymatic methods. *Hemijska Industrija* **64** (5), 375-388.

Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. & Menge, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343** (6260), 767-770.

Bridiau, N., Issaoui, N. & Maugard, T. (2010) The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the β-galactosidase from Bacillus circulans in hydro-organic media. *Biotechnology progress* **26** (5), 1278-1289.

Brodesser, S., Sawatzki, P. & Kolter, T. (2003) Bioorganic chemistry of ceramide. *European Journal of Organic Chemistry* **11**, 2021-2034.

Brunet, C., Zarevucka, M., Wimmer, Z. & Legoy, M-D. (2002) Total enzymatic resolution of racemic 2-(4-methoxybenzyl)-1-cyclohexanols and 2-(4-methoxybenzyl)-1-cyclopentanols. *Enzyme and Microbial Technology* **31** (5), 609-614.

Burke, P.A., Griffin, R.G. & Klibanov, A.M. (1992) Solid-state NMR assessment of enzyme active center structure under non aqueous conditions. *Journal of Biological Chemistry* **267** (28), 20057-20064.

Butler, L.G. (1979) Enzymes in non-aqueous solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **1** (4), 253-259.

Carrea, G., Ottolina, G. & Riva, S. (1995) Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology* **13**, 63-70.

Casey, J., Cheetham, P.S.J., Harries, P.C., Hyliands, D., Mitchell, J.T. & Rawlings, A.V. (1998) Method of synthesising phytosphingosine-containing ceramides and cosmetic compositions comprising them. *Brevet Européen, EP0667853 B1.*

Cauwet-Martin, D. & Dubief, C. (2000) Cosmetic compositions containing a lipid ceramide compound and a peptide having a fatty chain, and their uses. *US, Brevet 6,039,962*.

Chamlin, S.L., Kao, J., Frieden, I.J., Sheu, M.Y., Fowler, A.J., Fluhr, J.W., Williams, M.L. & Elias, P.M. (2002) Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology* **47**(2), 198-208.

Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. & Ghoul, M. (2001) Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11** (4-6), 949-954.

Chatterjee, S. (1999) Neutral sphingomyelinase: Past, present and future. *Chemistry and Physics of Lipids* **102**, 79-96.

Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J-M. & Ghoul, M. (2006) Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry* **41** (11), 2237-2251.

ChemSpider (2011) ACD/Log P/Index of refraction DB: http://www.chemspider.com/.

Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. & Sih, C.J. (1982) Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 7294–7299.

Chen, C.S., Wu, S. H., Girdaukas, G. & Sih, C. J. (1987) Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers 2. Enzyme-catalysed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *Journal of the American Chemical Society* **109**, 2812-2817.

Chen, Z.-G., Zhu, Q., Zong, M.-H., Gu, Z.-X. & Han, Y.-B. (2011) Enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide derivatives. *Process Biochemistry* **46** (8), 1649-1653.

Chiappe, C., Leandri, E., Lucchesi, S., Pieraccini, D., Hammock, B.D. & Morisseau, C. (2004) Biocatalysis in ionic liquids: The stereoconvergent hydrolysis of trans-β-methylstyrene oxide catalyzed by soluble epoxide hydrolase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **27** (4-6), 243-248.

Cho, S.H., Frew, L.J., Chandar, P. & Madison, S.A. (1995) Synthetic ceramides and their use in cosmetic compostions. *US, Brevet 005476671A*.

Chulalaksananukul, W., Condoret, J-S. & Combes, D. (1993) Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology* **15** (8), 691-698.

Chulalaksananukul, W., Condoret, J-S., Delorme, P. & Willemot, R.M. (1990) Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *Federation of the European Biochemical Societies Letters* **276** 181-184.

Ciuffreda, P., Alessandrini, L., Terraneo, G. & Santaniello, E. (2003) Lipase-catalyzed selective benzoylation of 1,2-diols with vinyl benzoate in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* **14** (20), 3197-3201.

Cleland, W.W. (1963a) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta* **67**, 104-137.

Cleland, W.W. (1963b) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochimica et Biophysica Acta* **67**, 173-187.

Cleland, W.W. (1963c) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochimica et Biophysica Acta* **67**, 188-196.

Coderch, L., López, O., De la Maza, A. & Parra, J.L. (2003) Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology* **4** (2), 107-129.

Colombié, S., Tweddell, R.J., Condoret, J-S. & Marty, A. (1998) Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnology and Bioengineering* **60** (3), 362-368.

Coulon, D., Girardin, M., Engasser, J-M. & Ghoul, M. (1997) Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Industrial Crops and Products* **6**, 375-381.

Couturier, L., Taupin, D. & Yvergnaux, F. (2009) Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **56** (1), 29-33.

Dabirmanesh, B., Daneshjou, S., Sepahi, A.A., Ranjbar, B., Khavari-Nejad, R.A., Gill, P., Heydari, A. & Khajeh, K. (2011) Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related α-amylases. *International Journal of Biological Macromolecules* **48** (1), 93-97.

Danieli, B. & Riva, S. (1994) Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. *Pure and Applied Chemistry* **66**, 2215-2218.

Davey, P.N., Hardinge, B.J., Newman, C.P. & Richardson, C.D. (1996) Process for the preparation of ceramides. *US, Brevet 5525709 A.*

Dayan, N. (2005) Pathways for Skin Penetration. *Cosmetics and Toiletries Magazine* **120**(6).

Dayan, N. (2006) *Stratum corneum*: the role of lipids and ceramides. *Cosmetics and Toiletries* 121 (1), 37–44.

De Diego, T., Lozano, P., Abad, M.A., Steffensky, K., Vaultier, M. & Iborra J.L. (2009) On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *Journal of Biotechnology* **140** (3-4), 234-241.

Dhake, K.P., Qureshi, Z.S., Singhal, R.S. & Bhanage, B.M. (2009) *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of acetamides using [BMIm(PF6)] as a reaction medium. *Tetrahedron Letters* **50** (23), 2811-2814.

Dimanche-Boitrel, M-T., Rebillard, A. & Gulbins, E. (2011) Ceramide in Chemotherapy of Tumors. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **6** (3), 284-293.

Din Nardo, A., Wertz, P., Gianetti, A. & Seidenari, S. (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with *atopic dermatitis*. *Acta dermato-venereologica* **78**, 27–30.

Domínguez De María, P., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., Van Der Meer, A. & Van Gemert, R. (2005) Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **37** (1-6), 36-46.

Dordick, J.S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **11** (4), 194-211.

Doukyu, N. & Ogino, H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal* **48** (3), 270-282.

Drapon, R. (1985) *Enzyme activity as a function of water activity. in: Simatos, D. & Multon, J.L. (Eds) Properties of Water in Foods*. Nyhoff, Dordrecht, The Netherlands.

Ducret, A., Giroux, A., Trani, M. & Lortie, R. (1995) Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnology and Bioengineering* **48** (3), 214-221.

Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P. & Vesnaver R. (1996) Influence of organique solvents on enzyme chemoselectivity and their role in enzyme-substrate interaction. *Tetrahedron* **52** (13), 4867-4876.

Egloff, M.P., Ransac, S., Marguet, E, Rogalska, E., van Tilheurgh, H., Buono, G., Cambillau, C. & Verger, R. (1995a) Les lipases: cinetiques, specificite et aspects structuraux. *Enzymes lipolytiques et lipolyse. Oléagineux, corps gras, lipides* **2**, 52-67.

Egloff, M.P., Sarda, L., Verger, R., Cambillau, C. & Van Tilbeurgh, H. (1995b) Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Science* **4**, 44-57.

Eguchi, T. & Mochida, K. (1993) Lipase-catalyzed diacylation of 1,3-butanediol. *Biotechnology Letters* **15** (9), 955-960.

Elias, P.M. & Wakefield, J.S. (2011) Therapeutic implications of a barrier-based pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **41** (3), 282-295.

Ema, T., Kobayashi, J., Maeno, S., Sakai, T. & Utaka, M. (1998) Origin of the Enantioselectivity of Lipases Explained by a Stereo-Sensing Mechanism Operative at the Transition State. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **71** (2), 443-453.

Enaud, E., Humeau, C., Piffaut, B. & Girardin, M. (2004) Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **27** (1), 1-6.

Faber K. (2000) *Biotransformation in organic chemistry*. Germany: Berlin and Heidelberg, Springer-Verlag.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill Jr., A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L. & Dennis, E.A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **46** (5), 839-861.

Fernández-Pérez, M. & Otero, C. (2000) Selective enzymatic production of amide emulsifiers from ethanolamine and fatty acids. *Studies in Surface Science and Catalysis* **130**, 3399-3404.

Fernández-Pérez, M. & Otero, C. (2001) Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology* **28** (6), 527-536.

Fernández-Pérez, M. & Otero, C. (2003) Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology* **33** (5), 650-660.

Fersht, A. (1985). *In Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., Freeman, New York.

Fickers, P., Destain, J. & Thonart, P. (2008) Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **12**, 119–130.

Fischer, E. & Speier, A. (1895) Darstellung der Ester. *Chemische Berichte* **28**, 3252–3258.

Foresti, M.L., Pedernera, M., Ferreira, M.L. & Bucalá, V. (2008) Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. *Applied Catalysis A: General* **334** (1-2), 65-72.

Frings, K., Koch, M. & Hartmeier, W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **25** (3-5), 303-309.

Frykman, H., Ohrner, N., Norin, T. & Hult, K. (1993) S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Letters* **34** (8), 1367-1370.

Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H. & Kato, J. (1996) N-Acylation of β-amino alcohol by acyl migration following enzyme-catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology* 19 (8), 578-584.

Furutani, T., Ooshima, H. & Kato, J. (1997) Preparation of N,O -diacyl ethanolamine from -acyl ethanolamine using lipase preparations. *Enzyme and Microbial Technology* **20**(3) 214-220.

Furutani, T., Su, R., Ooshima, H. & Kato, J. (1995) Simple screening method for lipase for transesterfification in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. **12**, 1067-1072.

Gaetani, Q., Guey, C., Arbey, E. & Castiel, I. (2005) Ceramides, compositions thereof and methods of use thereof. *US, Brevet 6846940 B2.*

Ganske, F. & Bornscheuer, U.T. (2005) Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **36** (1-6), 40-42.

Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M. & Aracil, J. (2000) Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. *Chemical Engineering Science* **55**, 1411-1423.

Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M. & Aracil, J. (1999) Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. *Enzyme and Microbial Technology* **25** (7), 584-590.

Gardossi, L., Bianchi, D. & Klibanov, A.M. (1991) Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* **113** (16), 6328-6329.

Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63** (8), 1721-1754.

Gill, I.I., Das, J. & Patel, R.N. (2007) Enantioselective enzymatic acylation of 1-(3′-bromophenyl)ethylamine. *Tetrahedron Asymmetry* **18** (11), 1330-1337.

Godtfredsen, S. & Björkling, F. (1990) An enzyme catalyzed process for preparing N-acyl amino acids and N-acyl amino acid amides. *Brevet international WO 90/ 14429*.

Gordon, C. M. (2001) New developments in catalysis using ionic liquids. *Applied Catalysis A: General* **222** (1-2), 101-117.

Gotor, V., Brieva, R. & Rebolledo, F. (1988) Enantioselective acylation of amino alcohols by porcine pancreatic lipase. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **14**, 957-958.

Gotor-Fernández, V., Busto, E. & Gotor, V. (2006) *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis* **348** (7-8), 797-812.

Graber, M., Bousquet-Dubouch, M-P., Lamare, S. & Legoy, M-D. (2003) Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: Effects of water on kinetic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1648** (1-2), 24-32.

Graille, J., Montet, D., Servat, F., Grimeaud, J., Renard, G., Galzy, P., Arnaud, A. & Marcou, L. (1989) Synthèse d'amide gras N-substitués par catalyse enzymatique. *Brevet Européen, EP 0298796 A1*.

Griebenow, K. & Klibanov, A.M. (1996) On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* **118** (47), 11695-11700.

Grösch, S., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. (2012) Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research* **51** (1), 50-62.

Gu, J., Ruppen, M.E. & Cai, P. 2005 Lipase-catalyzed regioselective esterification of rapamycin: Synthesis of temsirolimus (CCI-779). *Organic Letters* **7** (18), 3945-3948.

Guillardeau, I., Montet, D., Khaled, N., Pina, M. & Graille, J. (1992) Fructose caprylate biosynthesis in a solvent-free medium. *Tenside, Surfactants, Detergents* **29** (5), 342-344.

Ha, H-J, Hong, M.C., Ko, S.W., Kim, Y.W., Lee, W.K. & Park, J. (2006) Synthesis of constrained ceramide analogs and their potent antileukemic activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**, 1880-1883.

Ha, S.H.& Koo, Y-M. (2011) Enzyme performance in ionic liquids. *Korean Journal of Chemical Engineering* **28** (11), 2095-2101.

Hadj Salem, J., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F. & Fick, M. (2010) Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry* **45**, 382–389.

Haeffner, F., Norin, T. & Hult, K. (1998) Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophysical Journal* **74**, 1251–1262.

Hahn-Hagerdal, B. (1986) Water activity: a possible external regulator of biotechnological process. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 322-327.

Halling, P. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 178-205.

Hamstra, R.S., Murris, M.R. & Tramper, J. (1987) The influence of immobilization and reduced water activity on gaseous alkene oxidation by *Mycobacterium* PY1 and *Xanthobacter* PY2 in a solid-gas bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* **29**, 884-891.

Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. (2002) The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *Journal of Biological Chemistry* **277**(29), 25847-25850

Hansen, H.K., Rasmussen, P., Fredenslund, A., Schiller, M. & Gmehling, J. (1991) Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. Revision and extension 5. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **30**, 2355-2358.

Hara, S., Takahashi, H. & Tomiya, Y. (1999) Process for preparing sphingomyelin and ceramide from erythrocyte as a starting material and a curing agent or cosmetic formulated with ceramide. *US, Brevet 5,912,152.*

Hari Krishna, S., Divakar, S., Prapulla, S.G. & Karanth, N.G. (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from Rhizomucor miehei. *Journal of Biotechnology* **87** (3), 193-201.

Hari Krishna, S. & Karanth, N.G. (2002) Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews: Science and Engineering* **44** (4), 499-591.

Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, N.N. & Hazarika, A.K. (2002) Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. *Chemical Engineering Journal* **85** (1), 61-68.

Hedfors, C., Hult, K. & Martinelle, M. (2010) Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **66** (1-2), 120-123.

Hernández-Fernández, F.J., De Los Ríos, A.P., Lozano-Blanco, L.J. & Godínez, C. (2010) Biocatalytic ester synthesis in ionic liquid media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **85** (11), 1423-1435.

Hong, J.E., Su Ku, M., Lee, B.S., Byon, Y.H., Kim, D.H., Lee, S.R., Lee, O.S., Lee, H.K., Park, J.H., Lee, K.W., Nam, K.T., Kim, J.I., Kim, H.J. & Jung, H.J. (2000) Ceramide-like compounds and a method for preparation thereof, and a cosmetic composition containing the same. *US, Brevet 6060612 A.*

Hudson, E.P., Eppler, R.K. & Clark, D.S. (2005) Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Current Opinion in Biotechnology* **16** (6), 637-643.

Hugon, D. (2000) Production biotechnologique d'une nouvelle gamme de tensioactifs: des esters de tréhalose et d'acide gras. Thèse de doctorat. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine. France.

Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B. & Miclo, A. (1998) Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5** (1-4), 19-23.

Hun, C.J., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B. & Basri, M. (2003) A newly isolated organic solvent tolerant Bacillus sphaericus 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* **15**, 147–151.

Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I. & Chevalot, I. (2008) Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **55** (3-4), 110-117.

Husson, E., Humeau, C., Paris, C., Vanderesse, R., Framboisier, X., Marc, I. & Chevalot, I. (2009) Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. *Process Biochemistry* **44** (4), 428-434.

Hutcheon, G.A., Parker, M.C. & Moore, B.D. (2000) Measuring enzyme motility in organic media using novel H-D exchange methodology. *Biotechnology and Bioengineering* **70** (3), 262-269.

Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. & Hidano, A. (1991) Recharacterization of the non lesional dry skin in atopic dermatitis through disrupted barrier function. *Journal of Investigative Dermatology* **96**, 523– 526.

Imokawa, G., Yada, Y., Higuchi, K., Okuda, M., Ohashi, Y. & Kawamata, A. (1994) Pseudoacylceramide with linoleic acid produces selective recovery of diminished cutaneous barrier function in essential fatty acid-deficient rats and has an inhibitory effect on epidermal hyperplasia. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 89-96.

Inada, Y., Nishimura, H., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Ranjan Saha, A. & Saito, Y. (1984) Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **122** (2), 845-850.

Itoh, T., Nishimura, Y., Ouchi, N. & Hayase, S. (2003) 1-Butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate: The most desirable ionic liquid solvent for recycling use of enzyme in lipase-catalyzed transesterification using vinyl acetate as acyl donor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **26** (1-2), 41-45.

Iwai, H., Fukasawa, J. & Suzuki, T. (1998) A liquid crystal application in skin care cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* **20** (2), 87-102.

Iyer, P.V. & Ananthanarayan, L. (2008) Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* **43** (10), 1019-1032.

Jacobsen, E.E., Andresen, L.S. & Anthonsen, T. (2005) Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Asymmetry* **16** (4), 847-850.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B., Colson, C., Van Heuvel, M. & Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **15**, 29-63.

Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S. & Chauhan, S.M.S. (2005) Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* **61** (5), 1015-1060.

Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R. & Russell, A.J. (2003) Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society* **125** (14), 4125-4131.

Kanerva, L.T., Kosonen, M., Vanttinen, E., Huuhtanen, T.T. & Dahlqvist, M. (1992) Studies on the Chemo- and Enantio-selectivity of the Enzymatic Monoacylations of Amino Alcohols. *Acta Chemica Scandinavica* **46**, 1101-1105.

Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Katapodis, P., Kolisis, F.N. & Stamatis H. (2007) Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochemistry* **42**, 1326-1334.

Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T. & Cuccia, L.A. (1991) A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Organic Chemistry* **56** (8), 2656-2665.

Kelkar, M.S. & Maginn, E.J. (2007) Effect of temperature and water content on the shear viscosity of the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide as studied by atomistic simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **111** (18), 4867-4876.

Khaled, N., Montet, D., Farines, M.P. & Graille, J. (1992) Synthèse de mono-esters de sucre par biocatalyse. *Oléagineux* **47**, 181–190.

Kim, D-H., An, E.J., Kim, J., Han, S-H., Kim, J-W., Oh, S-G., Suh, K-D. & Cho, E.C. (2009) Fabrication and characterization of pseudo-ceramide-based liposomal membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **73**, 207-211.

Kim, K-W., Song, B., Choi, M-Y. & Kim, M-J. (2001) Biocatalysis in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase. *Organic Letters* **3** (10), 1507-1509.

Kim, Y., Park, J. & Kim, M-J. (2010) Fast racemization and dynamic kinetic resolution of primary benzyl amines. *Tetrahedron Letters* **51** (42), 5581-5584.

Kitatani, K. & Luberto, C. (2010) Introduction to tools and Techniques for Ceramide-Centered Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **688**, 276-285.

Klibanov, A.M. (1986) Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech* **16**, 354-359.

Klibanov, A.M. (1990) Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research* **23** (4), 114-120.

Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409** (6817), 241-246.

Klibanov, A.M., Samokhin, G.P., Martinek, K. & Berezin, I.V. (1977) A new approach to preparative enzymatic synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* **19**, 1351-1361.

Knežević, A., Landek, G., Dokli, I. & Vinković, V. (2011) An efficient enzymatic approach to (S)-1-aryl-allylamines.*Tetrahedron Asymmetry* **22** (9), 936-941.

Kolter, T. (2011) A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids* **164** (6), 590-606.

Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. & Kolisis, F.N. (2001) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103** (10), 655-660.

Koo, Y. & Ho Ha, S. (2008) Application of ionic liquid in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **136** (1), S6-S7.

Kragl, U., Eckstein, M. & Kaftzik, N. (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* **13** (6), 565-571.

Kuan, J.L., Nag, A. & Shaw, J-F. (2001) Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid diethanolamides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (12), 5761-5764.

Kwun, K.H., Lee, J.H., Rho, H. & Yun, H.S. (2007) Production of Ceramide with Saccharomyces cerevisiae. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **133** (8), 203-210.

Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gambert, P., Solary, E. & Dimanche-Boitrel, M.-T. (2004) Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research* **64** (10), 3593-3598.

Lahiri, S. & Futerman, A.H. (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64** (17), 2270-2284.

Lamare, S., Caillaud, B., Roule, K., Goubet, I. & Legoy, M.D. (2001) Production of natural esters at the pre-industrial scale by solid/gas biocatalysis. *Biocatalysis and Biotransformation* **19** (5-6), 361-377.

Lambers, J. & Wilhelmus, J. (2009) Compositions comprising a combination of a free sphingoid base and ceramide and uses thereof. *US, Brevet 7,597,899*.

Lassalle, L. & Yvergnaux, F. (2008) Method for synthesizing ceramide-type compounds. *Brevet Européen, EP 1644318 B1.*

Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M-D. & Graber, M. (2004) Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctic*a. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **32** (1-2), 53-59.

Létisse, F., Lamare, S., Legoy, M-D. & Graber, M. (2003) Solid/gas biocatalysis: An appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1652** (1), 27-34.

Liao, H-F., Tsai, W-C., Chang, S-W. & Shieh, C-J. (2003) Application of solvent engineering to optimize lipase-catalyzed 1,3-diglyacylcerols by mixture response surface methodology. *Biotechnology Letters* **25** (21), 1857-1861.

Liljeblad, A. & Kanerva, L. T. (2006) Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure B-amino acids. *Tetrahedron* **62**, 5831-5854.

Linko, Y-Y., Lamsa, M., Huhtala, A. & Rantanen, O. (1995) Lipase biocatalysis in the production of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**, 1293–1299.

Litjens, M.J.J., Straathof, A.J.J., Jongejan, J.A. & Heijnen, J.J. (1999) Exploration of lipase-catalyzed direct amidation of free carboxylic acids with ammonia in organic solvents. *Tetrahedron* **55** (42), 12411-12418.

Ljunger, G., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B. (1994) Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnology Letters* **16** (11), 1167-1172.

López-Serrano, P., Jongejan, J.A., Van Rantwijk, F. & Sheldon, R.A. (2001) Enantioselective acylation of α-aminonitriles catalysed by *Candida antarctica* lipase. An unexpected turnover-related racemisation. *Tetrahedron Asymmetry* **12** (2), 219-228.

Lortie R. (1998) Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnology advances* **15** (1), 1-15.

Lou, W-Y., Zong, M-H., Smith, T.J., Wu, H. & Wang, J-F. (2006) Impact of ionic liquids on papain: An investigation of structure-function relationships. *Green Chemistry* **8** (6), 509-512.

Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. & Iborra, J.L. (2001) Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters* **23** (18), 1529-1533.

Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. & Iborra, J.L. (2005) Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation* **23**, 3-4.

Lupi, O. (2003) Doenças priônicas: avaliação dos riscos envolvidos nautilização de produtos de origem bovina. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **78** (1), 7-18.

Macchia, B., Balsamo, L., Macchia, M., Del Tacca, M. & Romano, D. (2005) Ceramide analogs, process for their preparation and their use as antitumor agents. *US, Brevet 20050020533 A1*.

MacLeod, S.K. (1991) Moisture determination using Karl Fischer titrations. *Analytical Chemistry*, **63** (10), 557A–566A.

Madeira Lau, R., Sorgedrager, M.J., Carrea, G., van Rantwijk, F., Secundo F. & Sheldon, R.A. (2004) Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chemistry* **6**, 483-487.

Madeira Lau, R., Van Rantwijk, F., Seddon, K.R. & Sheldon, R.A. (2000) Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* **2** (26), 4189-4191.

Mannhold, R. & Rekker, R.F. (2000) The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol/water and aliphatic hydrocarbon/water systems. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **18**, 1-18.

Mannhold, R., Rekker, R.F., Sonntag, C., Ter Laak, A.M., Dross, K. & Polymeropoulos, E.E. (1995) Comparative evaluation of the predictive power of calculation procedures for molecular lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **84** (12), 1410-1419.

Martinelle, M., Holmquist, M. & Hult, K. (1995) On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1258** (3), 272-276.

Martinelle, M. & Hult, K. (1995) Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1251** (2), 191-197.

Marton, Z., Léonard-Nevers, V., Syrén, P.-O., Bauer, C., Lamare, S., Hult, K., Tranc, V. & Graber, M. (2010) 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* **65** (1-4), 11-17.

Matos, J.R., West, J.B. & Wong, C-H. (1987) Lipase catalysed synthesis of peptides: Preparation of a penicillin G precursor and other peptides. *Biotechnology Letters* **9** (4), 233-236.

Matsuda, T., Harada, T. & Nakamura, K. (2005) Biocatalysis in supercritical CO2. *Current Organic Chemistry* **9** (3), 299-315.

Maugard, T. (1996) Synthèse par amidification enzymatique d'amines hydroxylées N-acylées. Thèse de Doctorat. Toulouse : Institut National des Sciences Appliquées. France.

Maugard, T., Lamare, S. & Legoy, M.D. (2001) Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering* **73** (2), 164-168.

Maugard, T., Remaud-Simeon, M. & Monsan, P. (1998a) Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic solvent: Effect of substrate

ionization. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1** 387(1-2), 177-183.

Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. (1997a) Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction. *Tetrahedron* **53** (14), 5185-5194.

Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. (1997b) Lipase-catalyzed chemoselective N-acylation of amino-sugar derivatives in hydrophobic solvent: Acid-amine ion-pair effects. *Tetrahedron* **53** (22): 7587-7594.

Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. (1997c) Lipase-catalysed synthesis of biosurfactants by transacylation of N-methyl-glucamine and fatty-acid methyl esters. *Tetrahedron* **53** (22), 7629-7634.

Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. (1998b) Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: Synthesis of N-acylated hydroxylated amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5** (1-4), 13-17.

Maugard, T., Tudella, J. & Legoy, M.D. (2000) Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnology Progress* **16** (3), 358-362.

Mavrynsky, D., Päiviö, M., Lundell, K., Sillanpää, R., Kanerva, L.T. & Leino, R. (2009) Dicarbonylchloro(pentabenzylcyclopentadienyl)rutheniuni as racemization catalyst in the dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *European Journal of Organic Chemistry* **9**, 1317-1320.

Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A.D., Kolisis, F.N. & Stamatis, H. (2005) Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* **116** (3), 295-304.

Metzger, J.O. (1998) Solvent-free organic syntheses. *Angewandte Chemie - International Edition* **37** (21), 2975-2978.

Miller, C., Austin, H., Posorske, L. & Gonzalez J. (1988) Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **65**, 927-931.

Mitsutake, S., Kita, K., Okino, N. & Ito, M. (1997) [14C]Ceramide synthesis by sphingolipid ceramide N-deacylase: New assay for ceramidase activity detection. *Analytical Biochemistry* **247**, 52-57.

Modrak, D.E., Cardillo, T.M., Newsome, G.A., Goldenberg, D.M. & Gold, D.V. (2004) Synergistic interaction between sphingomyelin and gemcitabine potentiates ceramide-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Research* **64**, 8405–8410.

Molina, J.F., Novel, A., Yvergnaux, F. & Couturier, L. (2008) Omega ceramide technology: An active molecule stabilisation and transportation system to preserve and strenghten the integrity of the skin. *Household and Personal Care todays* **2**, 12-15.

Montet, D., Graille, J., Servat, F., Marcou, L. & Renard, G. (1989a) Étude de l'acylation des aminopropanols catalysée par les acyltransférases. *Revue française des corps gras* **36**, 79-83.

Montet, D., Pina, M., Graille, J., Renard, G. & Grimaud, J. (1989b) Synthèse de N lauryloléylamide par la lipase de *Mucor miehei* en milieu organique. *Fett Wissenchaft Technologie* **91**, 14-18.

Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Ledon, M. & Marcou, L. (1990) Synthèse de N-acyllysine par voie enzymatique. *Journal of the American Oil Chemists Society.* **67**, 771-4.

Morita, Y., Perez, G.I., Paris, F., Miranda, S.R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N. & Tilly, J.L. (2000) Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature Medicine* **6**, 1109– 1114.

Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. & Ghidoni, R. (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta* **1182**, 147-151.

Mutua L.N. & Akoh C.C. (1993) Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp*. Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**, 43-46.

Naik, S., Kavala, V., Gopinath, R. & Patel, B. K. (2006) Tetrabutylammonium tribromide Mediated Condensation of Carboxylic Aids with Acohols. *ARKIVOC* (1), 119-127.

Nestl, B.M., Nebel, B.A. & Hauer, B. (2011) Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **15** (2), 187-193.

Norin, M., Hult, K., Mattson, A. & Norin, T. (1993) Molecular modelling of chymotripsin-substrate interactions: calculation of enantioselectivity. *Biocatalysis* **7**, 131-147.

Nys, G.G. & Rekker, R.F. (1973) Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules. The introduction of hydrophobic fragmental constants (f values). *Chimie Thérapeutique* **5**, 521-535.

Oger, C., Marton, Z., Brinkmann, Y., Burtel-Poncé, V., Durand, T., Graber, M. & Galano, J.M. (2010) Lipase-catalyzed regioselective monoacetylation of unsymmetrical 1,5-primary diols. *Journal of Organic Chemistry* **75** (6), 1892-1897.

Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T. & Hult, K. (1996) Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology* **19** (5), 328-331.

Orrenius, C., Hæffner, F., Rotticci, D., Öhrner, N., Norin, T. & Hult, K. (1998) Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation* **16** (1), 1-15.

Orrenius, C., Norin, T., Hult, K. & Carrea, G. (1995) The *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity. *Tetrahedron Asymmetry* **6** (12), 3023-3030.

Park, O-J., Jeon, G-J. & Yang, J-W. (1999) Protease-catalyzed synthesis of disaccharide amino acid esters in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **25** (3-5), 455-462.

Park, S. & Kazlauskas, R.J. (2003) Biocatalysis in ionic liquids–advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* **14** (4), 432-437.

Pata, M.O., Hannun, Y.A. & Ng, C. K-Y. (2010) Plant sphingolipids: Decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytologist* **185** (3), 611-630.

Pilarek, M. & Szewczyk, K.W. (2007) Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *Journal of Biotechnology* **127** (4), 736-744.

Pilissão, C. & Nascimento, M.D.G. (2006) Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. *Tetrahedron Asymmetry* **17** (3), 428-433.

Pinto, S.N., Silva, L.C., Futerman, A.H. & Prieto, M. (2011) Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: The role of acyl chain length and unsaturation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1808** (11), 2753-2760.

Plou, F.J., Barandiarán, M., Calvo, M.V., Ballesteros, A. & Pastor, E. (1996) High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. *Enzyme and Microbial Technology* **18** (1), 66-71.

Pozo, M. & Gotor, V. (1993) Chiral carbamates through an enzymatic alkoxycarbonylation reaction. *Tetrahedron* **49** (20), 4321-4326.

Puertas, S., Rebolledo, F. & Gotor, V. (1995) Selective ammonolysis and aminolysis of dimethyl succinate. Synthesis of optically active N-alkylsuccinimides. *Tetrahedron* **51** (5), 1495-1502.

Raith, K., Farwanah, H., Wartewig, S. & Neubert, R.H.H. (2004) Progress in the analysis of *stratum corneum* ceramides. *European Journal of Lipid Science and Technology* **106**, 561–571.

Ramin, R. (2000) Use of ceramide for the treatment of nails. United States Patent 6,099,826.

Ramirez, R., Garay, I., Alvarez, J., Marti, M., Parra, J.L. & Coderch, L. (2008) Supercritical fluid extraction to obtain ceramides from wool fibers. *Separation and Purification Technology* **3**, 552-557.

Rantwijk, V. & Sheldon, R.A. (2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews* **107** (6), 2757-2785.

Reimann, A., Robb, D.A. & Halling, P.J. (1994) Solvation of CBZ-amino acid nitrophenyl esters in organic media and the kinetics of their transesterification by subtilisin. *Biotechnology and Bioengineering* **43** (11), 1081-1086.

Rejasse, B., Maugard, T. & Legoy, M.D. (2003) Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **32** (2), 312-320.

Rendón, X., López-Munguía, A. & Castillo, E. (2001) Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78** (10), 1061-1066.

Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martínez, R. & López-Munguía, A. (2002) Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters* **24** (24), 2057-2061.

Reynolds, C.P., Maurer, B.J. & Kolesnick, R.N. (2004) Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Letters* **206** (2), 169-180.

Robert, H., Lamare, S., Parvaresh, F. & Legoy M.D. (1992) The role of water in gaseous biocatalysis. *Progress in Biotechnology* **8**, 23-29.

Robson, K.J., Stewart, M.E., Michelsen, S., Lazo, N.D. & Downing, D.T. (1994) 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *Journal of Lipid Research* **35**, *2060-2068.*

Rochlin, E. (2002) Process for large scale preparation of sphingosines and ceramides. *US, Brevet 6469148B1.*

Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C. & Daneshfar, A. (2007) A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *Journal of Biotechnology* **127** (2), 269-277.

Roosen, C., Müller, P. & Greiner, L. (2008) Ionic liquids in biotechnology: Applications and perspectives for biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81** (4), 607-614.

Rotticci, D., Hæffner, F., Orrenius, C., Norin, T. & Hult K. (1998) Molecular recognition of *sec*-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5** (1-4), 267-272.

Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K. & Norin, T. (1997) Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron Asymmetry* **8** (3), 359-362.

Rustoy, E.M. & Baldessari, A. (2006) Chemoselective enzymatic preparation of N-hydroxyalkylacrylamides, monomers for hydrophilic polymer matrices. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **39** (1-4), 50-54.

Sánchez, V.M., Rebolledo, F. & Gotor, V. (1997) *Candida antarctica* lipase catalyzed resolution of ethyl (±)-3-aminobutyrate. *Tetrahedron Asymmetry* **8** (1), 37-40.

Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta* **30**, 513-521.

Schmitke, J.L., Wescott, C.R. & Klibanov, A.M. (1996) The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *Journal of the American Chemical Society* **118** (14), 3360-3365.

Schnaar, R., Suzuki, A. & Stanley, P. (2009) *Glycosphingolipids. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.w. & Etzler, M.E. (Eds.), Essentials of Glycobiology.* United States, New York: Cold Spring Harbor.

Segel, I.H. (1993) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* United States, New York: John Wiley and Sons, Inc.

Semeria, D. & Philipe, M. (1997a) Procédé de préparation de composés de type céramides. *Fr, Brevet 2 764 603.*

Semeria, D., Philippe, M. & Mahieu, C. (1997b) Ceramides, process for their preparation and their applications in cosmetics and in dermopharmacy. *US, Brevet 5665778.*

Séverac, E., Galy, O., Turon, F., Azzaro Pantel,C., Condoret, J-S., Monsan, P. & Marty, A. (2011) Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology* **48**(1), 61-70.

Sharma, D., Sharma, B. & Shukla, A.K. (2011) Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology* **10** (1), 23-40.

Sharma, J., Batovska, D., Kuwamori, Y. & Asano, Y. (2005) Enzymatic chemoselective synthesis of secondary-amide surfactant from N-methylethanol amine. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100** (6), 662-666.

Shayman, J.A. & Radin, N.S. (2000) Amino ceramide-like compounds and therapeutic methods of use. *US, Brevet 6051598 A.*

Sheldon R. (1996) Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. *In: Koskinen, A.M.P. & Klibanov, A.M. (Eds.), Enzymatic reactions in organic media.* United Kinddom, London: Blackie Academic & Professional 266-307.

Sheldon, R.A., Madeira Lau, R., Sorgedrager, M.J., Van Rantwijk, F. & Seddon, K.R. (2002) Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry* **4** (2), 147-151.

Shi, Y-G., Li, J-R. & Chu, Y-H. (2011) Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sucrose-based esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **86** (12), 1457-1468.

Simon, L.M., László, K., Vértesi, A., Bagi, K. & Szajáni, B. (1998) Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **4** (1-2), 41-45.

Slotema, W.F., Sandoval, G., Guieysse, D., Straathof, A.J.J. & Marty, A. (2003) Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. *Biotechnology and Bioengineering* **82** (6), 664-669.

Smeets, J.W.H., De Pater, R.M. & Lambers, J.W.J. (1997) Enzymatic synthesis of ceramides and hybrid ceramides. *US, Brevet 005610040 A.*

Smeets, J.W.H. & Weber, P.G. (1997) Selective N-acylation of amino alcohols. *US, Brevet 005631356 A.*

Smith, L.C., Faustinella, F. & Chan, L. (1992) Lipases: Three-dimensional structure and mechanism of action. *Current Opinion in Structural Biology* **2** (4), 490-496.

Soares, C.M., Teixeira, V.H. & Baptista, A.M. (2003) Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies. *Biophysical Journal* **84** (3), 1628-1641.

Somashekar, B.R. & Divakar, S. (2007) Lipase catalyzed synthesis of l-alanyl esters of carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology* **40** (2), 299-309.

Soo, E.L., Salleh, A.B., Basri, M., Abdul Rahman, R.N.Z.R. & Kamaruddin, K. (2003) Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95** (4), 361-367.

Sot, J., Goni, F.M. & Alonso, A. (2005) Molecular associations and surface-active properties of short- and long-N-acyl chain ceramides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1711**, 12–19.

Sperling, P. & Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1632**, 1–15.

Straathof, A.J.J., & Adelecreutz, P. (2000) Biocatalysis in non conventional media. *In Applied Biocatalysis Second Edition Amsterdam:* Harwood academic publishers.

Straathof, A.J.J. & Jongejan, J.A. (1997) The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme and Microbial Technology* **21** (8), 559-571.

Sun, Y., Fox, T., Adhikary, G., Kester, M & Pearlman, E. (2008) Inhibition of corneal inflammation by liposomal delivery of short-chain, C-6 ceramide. *Journal of Leukocyte Biology* **83** (6), 1512-1521.

Swatloski, R.P., Holbrey, J.D. & Rogers, R.D. (2003) Ionic liquids are not always green: Hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chemistry* **5** (4), 361-363.

Syrén, P-O. (2011) On electrostatic effects, minimal motion and other catalytic strategies used by enzymes. Thèse de Doctorat. Stockholm: School of Biotechnology, Royal Institute of Technology. Suède.

Takahashi, K., Yoshimoto, T., Tamaura, Y., Saito, Y. & Inada, Y. (1985) Ester synthesis at extraordinarily low temperature of -3°C by modified lipase in benzene. *Biochemistry International* **10** (4), 627-631.

Tasaka, Y., Matsumura, T. & Matsuo, K. (2006) Plante génétiquement modifiée produisant du lactosyl céramide, et utilisation de cette plante. *Brevet internationnal, WO 2006 025443*.

Tawaki, S. & Klibanov.A.M. (1993) Chemoselectivity of Enzymes in Anhydrous Media is Strongly Solvent Dependent. *Biocatalysis and Biotransformation* **8,** 3–19.

Torre, O., Gotor-Fernández, V. & Gotor, V. (2006) Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron Asymmetry* **17** (5), 860-866.

Tufvesson, P., Annerling, A., Hatti-Kaul, R. & Adlercreutz, D. (2007) Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides. *Biotechnology and Bioengineering* **97** (3), 447-453.

Turner, N.A., Duchateau, D.B. & Vulfson, E.N. (1995) Effect of hydration on thermostability of serine esterases. *Biotechnology Letters* **17** (4), 371-376.

Turner, N.A. & Vulfson, E.N. (2000) At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme and Microbial Technology* **27** (1-2), 108-113.

Ulbert, O., Fráter, T., Bélafi-Bakó, K. & Gubicza, L. (2004) Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **31** (1-3), 39-45.

Uppenberg, J., Hansen, **M.T**. **Patkar**, **S. & Jones, T.A.** (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**, 293-308.

Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. & Jones, T.A. (1995) Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols *Biochemistry* **34** (51), 16838-16851.

Valivety, R.H., Rakels, J.L., Blanco, R., Johnston, G., Brown, L., Suckling, C. & Halling, P. (1990) Measurement of pH changes in an inaccessible aqueous phase during biocatalysis in organic media. *Biotechnology Letters* **12**, 475-480.

Valivety, R.H., Halling, P.J. & Macrae, A.R. (1992a) Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1118** (3), 218-222.

Valivety, R.H., Halling, P.J. & Macrae, A.R. (1992b) Rhizomucor miehei lipase remains highly active at water activity below 0.0001. *Federation of the European Biochemical Societies Letters* **301** (3), 258-260.

Valivety, R.H., Johnston, G.A., Suckling, C.J. & Halling, P.J. (1991) Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnology and Bioengineering* **38** (10), 1137-1143.

Van Ginkel, C.G. & De Bont J.A.M. (1987) A description of microbial growth on gaseous alkenes in a chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering* **30**, 799-804.

Van Rantwijk, F., Lau, R.M. & Sheldon, R.A. (2003) Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology* **21** (3), 131-138.

Wanebo, H.J. & Mehta, S. (2006) Combinations of ceramide and chemotherapeutic agents for inducing tumor cell death. *US, Brevet 7,015,251*.

Vávrová, K., Zbytovská, J., Palát, K., Holas, T., Klimentová, J., Hrabálek, A. & Doležal, P. (2004) Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21** (5), 581-587.

Verger, R., Mieras, M. & De Haas, G.A. (1973) Action of Phospholipase A at Interfaces. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4023-4034.

Wertz, P.W., Miethke, M.C., Long, S.A. Strauss, J. S. & Downing, D. T. (1985) The Composition of the Ceramides from Human Stratum-Corneum and from Comedones. *Journal of Investigative Dermatology* **84** (5), 410-412.

Winkler, F.K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343** (6260), 771-774.

Xiao, Y-M., Wu, Q., Cai, Y. & Lin, X-f. (2005) Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research* **340** (13), 2097-2103.

Yadav, G.D. & Devi, K.M. (2004) Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: Comparison and kinetic modeling. *Chemical Engineering Science* **59** (2), 373-383.

Yadav, G.D. & Dhoot, S.B. (2009) Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57** (1-4), 34-39.

Yadav, G.D. & Lathi, P.S. (2003) Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochemical Engineering Journal* **16** (3), 245-252.

Yadav, G.D. & Lathi, P.S. (2006) Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. *Enzyme and Microbial Technology* **38** (6), 814-820.

Yadav, G.D. & Trivedi, A.H. (2003) Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enzyme and Microbial Technology* **32** (7), 783-789.

Yagnik, A.T., Littlechild, J.A. & Turner, N.J. (1997) Molecular modelling studies of substrate binding to the lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **11**, 256-264.

Yahya, A.R.M., Anderson, W.A. & Moo-Young, M. (1998) Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology* **23** (7-8), 438-450.

Yamane, T. (1987) Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **64** (12), 1657-1662.

Yang, J., Ma, X., Zhang, Z., Chen, B., Li, S. & Wang, G. (2010) Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption-cross-linking methods: A comparative study. *Biotechnology Advances* **28** (5), 644-650.

Yang, Z. & Pan, W. (2005) Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* **37** (1), 19-28.

Yoshimoto, T., Takahashi, K. & Nishimura, H. (1984) Modified lipase having high stability and various enzymic activities in benzene, and its re-use by recovering from benzene solution. *Biotechnology Letters* **6** (6), 337-340.

Yoshinori, O., Nozomu, O., Makoto, I. & Shuhei, I. (1999) Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis - Part I. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **6**, 101–104.

Yuan, Y., Bai, S. & Sun, Y. (2006) Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (±)-menthol in ionic liquids and organic solvents. *Food Chemistry* **97** (2), 324-330.

Zaks, A. & Klibanov, A.M. (1984) Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* **224**, 1249-1257.

Zaks, A. & Klibanov, A.M. (1985) Enzyme catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3192-3196.

Zaks, A. & Klibanov, A.M. (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry* **263** (17), 8017-8021.

Zappia, V. & Derosa, M. (1988) Hydrosolubele ubidecarenones derives and their preparation. *Brevet International, WO 88 03019.*

Zhang, D-H., Bai, S. & Sun, Y. (2007) Lipase-catalyzed regioselective synthesis of monoester of pyridoxine (vitamin B6) in acetonitrile. *Food Chemistry* **102** (4), 1012-1019.

Zhang, L. (2008) Enzymatic Production of Ceramide. Thèse de Doctorat. Lyngby: Center for Biological Sequence Analysis Department of Systems Biology Technical University of Denmark.

Zhang, X., Adachi, S., Watanabe, Y. & Matsuno, R. (2005) Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl L-serinamide and O-lauroyl L-threoninamide. *Food Research International* **38** (3), 297-300.

Zhao, H. (2010) Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **85** (7), 891–907.

Zhao, H., Baker, G.A., Song, Z., Olubajo, O., Zanders, L. & Campbell, S.M. (2009) Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57** (1-4), 149-157.

Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M. C., Cabot, M. & Merrill, A.H., Jr. (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* **12**, 1864-1884.

Étude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : application à la synthèse de pseudo-céramides

Résumé :

Les céramides sont des lipides de la classe des sphingolipides issus de la N-acylation d'une base sphingoide par un acide gras. Ces lipides et leurs analogues suscitent un grand intérêt comme composants actifs dans les industries pharmaceutique et cosmétique. Parmi les biocatalyseurs capables de réaliser la synthèse de ce type de lipide, la lipase B de *Candida antarctica* semble être l'enzyme la plus adaptée à la production de « pseudo-céramides » à partir d'amino-polyols. Dans ce contexte, nous avons abordé l'étude de l'acylation de composés de type « amino-alcool » catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*, en gardant à l'esprit une approche fondamentale afin d'élargir les connaissances actuelles sur ce sujet. La première partie de notre travail a ainsi traité de l'étude cinétique de l'acylation de composés monofonctionnels afin de déterminer les mécanismes réactionnels et l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour les réactions de N-acylation et de O-acylation. Les parties suivantes de notre travail ont porté sur une étude structure-réactivité du substrat accepteur d'acyle et sur l'étude de l'influence du solvant utilisé (solvant organique ou liquide ionique) afin de déterminer les facteurs clés influençant la chimiosélectivité et la régiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* lors de l'acylation de composés multifonctionnels de type « amino-alcool ». Finalement, à partir des connaissances acquises dans les différentes parties, nous avons développé et optimisé un procédé de synthèse enzymatique de « pseudo-céramides » (O,N-diacyl aminopropanediols) mis en œuvre en réacteur continu à « lit fixe ».

Mots clés : biocatalyse, céramide, N-acylation, O-acylation, amino-alcool, lipase B de *Candida antarctica*, solvant organique, liquide ionique, sélectivité.

Study of the selective enzymatic acylation of multifunctional compounds: application to pseudo-ceramide synthesis

Abstract:

Ceramides are lipids from the sphingolipide class derived from the N-acylation of a sphingoid base from a fatty acid. These lipids and their analogs are compounds of interest used as active components in pharmaceutical and cosmetic industries. Among biocatalysts able to synthesize this type of lipids, *Candida antarctica* lipase B appears to be the most appropriate enzyme for the production of "pseudo-ceramides" derived from amino-polyols. In this context, we have studied the acylation of amino-alcohol-like compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B, keeping in mind a fundamental approach to expand the current knowledge on this subject. The first part of our work aimed to determine the reaction mechanisms and the enantioselectivity exhibited by *Candida antarctica* lipase B during O-acylation and N-acylation reactions, by conducting a kinetic study of monofunctional compound acylation. In the following parts of our work, we performed a structure-reactivity study of the acyl acceptor substrate and evaluated the effect of the solvent used (organic solvent or ionic liquid) to determine the key factors influencing the chemoselectivity and the regioselectivity of the *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of polyfunctional amino-alcohol compounds. Finally, starting from the knowledge acquired in the previous parts, we have developed and optimized an enzymatic process of "pseudo-ceramide" (O,N-diacyl aminopropanediol) synthesis performed in a continuous packed-bed reactor.

Key words: biocatalysis, ceramide, N-acylation, O-acylation, amino-alcohol, *Candida antarctica* lipase B, organic solvent, ionic liquid, selectivity.

LIttoral ENvironnement SociétéS (LIENSs), équipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé (AMES), UMR 7266, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 LA ROCHELLE