

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année / 2013

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Thème:

**Nouveaux procédés de synthèse
énantiosélective d'alcools biologiquement
actifs par catalyse enzymatique.**

Option:

Chimie Organique Fine (Chimie du chiral)

Présenté par : M^{lle} HOUÏENE Zahia

M^{me} ARIBI-ZOUIOUCHE Louiza Pr. Directrice de thèse U. Annaba

Devant le jury suivant :

M ^r LEGSEIR Belgacem	Pr.	Président	U. Annaba
M ^r van de Weghe Pierre	Pr.	Examineur	U. Rennes 1
M ^r HACINI Salih	Pr.	Examineur	U. Oran
M ^r GOUASMIA Abdelkrim	Pr.	Examineur	U. Tebessa
M ^{me} MERABET-KHELASSI Mounia	M.C.B	Invitée	U. Annaba

ملخص

الموضوع : طرق جديدة لتخليق المماكبات الكحولية انتقائيا و الفعالة بيولوجيا بالتحفيز الأنزيمي.

استعمال الجزئيات النقية ضوئيا أصبح ذو أهمية قصوى في عدة مجالات مثل الصناعة الغذائية (نكهات , مواد مضافة), الزراعة (المبيدات) وخاصة في ميدان الصيدلة (الأدوية).
في عمل هذه الأطروحة , اهتمنا بعملية الفصل الحركي الأنزيمي للأسترات والكحولات الراسمية ذات الأهمية الضمنية , وهذا من اجل الحصول على جزيئات نقية أو ذات نقاوة عالية , من اجل ذلك استعملنا تفاعلين متكاملين , للعلم هما الترانس-أسترة و الحلمهة الأنزيمية.

المواد هدف هذا العمل , هم عبارة من جهة عن سلسلة من الأسيتات من الشكل أريل ألكيل كاربينول و من جهة أخرى عبارة عن كحول ثانوي أليلي , 3- ميثيل -2- حلقي الهكسين -1- أول وهو بدوره عبارة عن فيرومون تفرزه الحشرات.
درسنا الفصل الحركي عن طريق الحلمهة الأنزيمية في الوسط العادي (وسط ثنائي:محلول مائي/مذيب عضوي) وفي الوسط الغير عادي مذيب (عضوي/أساس) ولقد وضعنا طريقة جديدة للحلمهة في الوسط العضوي بوجود Na_2CO_3

حددنا عوامل تفاعل الحلمهة للأسيتات الأنزيمية **1a - 9a** في النظامين الاثنين (كمية وطبقة الليبار, درجة الحرارة, المذيب.....) وبيننا فعالية الطريقة الغير عادية ($E > 500$, $C = 50\%$). تفاعل الحلمهة, استعمل بعدها في تفاعل ضد – الراسمية بواسطة تفاعل كيميائي لعكس البنية الفراغية والمتمثل في تفاعل ميتسونوبي (Mitsunobu). النتائج تبين أن الأسيتات البنزينية (S) المتحصل عليها ذات نقاوة ليننتويوميرية عالية ($57\% \leq ee \leq 99\%$) ومردود كيميائي مرضي ($70\% \leq rdt \leq 89\%$). الترانس- أسترة الأنزيمية ل 3- ميثيل -2- حلقي الهكسين-1- أول حددت بوجود ليباز الكانديدا انثراكتيكا من نوع "ب" (CAL-B) ومختلف عوامل الأسيلة في مذيبات عضوية متنوعة و بإضافة أيثير حلقي , 18 حلقي 6 . النقاوة المتحصل عليها تساوي (E=316) من اجل تقدم في التفاعل قدرة % 32 .

الكلمات الدالة :

الفصل الحركي الأنزيمي, الليبارات, أريل ألكيل كاربينول, الكحولات الأليلية, ضد – الراسمية, عكس البنية الفراغية .

Abstract

Title: New methods for enantioselective synthesis of biologically active alcohols by enzymatic catalysis.

The use of molecules in their optically pure form has become an extremely important need in all areas such as food (flavors, additives), agronomy (pesticides) and particularly the pharmaceutical (drugs).

In this work, we studied the enzymatic kinetic resolution of racemic esters and alcohols of potential interest to achieve the optically pure or enriched molecules. To do this, we used two complementary reactions, namely, enzymatic transesterification and hydrolysis. The substrates concerned in this work represent series of chiral benzylic acetates arylalkylcarbinols kind, and also, a secondary allyl alcohol, 3-methyl-2-cyclohexen-1-ol, a pheromone insect.

We studied the kinetic resolution by enzymatic hydrolysis in conventional medium (biphasic: buffer solution / organic solvent) and non-conventional one (organic solvent / base) and we have developed a new method of hydrolysis in an organic medium with Na_2CO_3 .

We optimized the parameters of the enzymatic hydrolysis reaction of acetates **1a-9a** in both conventional and non-conventional systems (quantity and nature of the lipase, temperature, solvent, ...) and showed the effectiveness of the unconventional method with ($C = 50\%$, $E > 500$). The hydrolysis reaction was then used in a process involving stereoinversion deracemization via a Mitsunobu reaction. The results show that the benzyl acetates (*S*) are obtained with enantiomeric excesses ($57\% < ee < 99\%$) and chemical yields ($70\% < \text{yield} < 89\%$). The enzymatic acylation of 3-methyl-2-cyclohexen-1-ol has been optimized with the *Candida antarctica* lipase (*CAL B*) and different acyl donors in various organic solvents and in the presence of additives. The selectivity ($E = 316$) is obtained at a conversion ($C = 32\%$).

Keywords: kinetic enzymatic resolution, lipases, arylalkylethanol, allylic alcohol, deracemization, stereoinversion.

Résumé

Titre : Nouveaux procédés de synthèse énantiosélective d'alcools biologiquement actifs par catalyse enzymatique

L'utilisation des molécules sous forme optiquement pures est devenue une nécessité d'extrême importance dans tous les domaines tels que l'agroalimentaire (aromes, additifs), l'agronomie (pesticides) et particulièrement le domaine pharmaceutique (médicaments).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la résolution cinétique enzymatique d'esters et alcools racémiques, d'intérêt potentiel, afin de parvenir aux molécules optiquement pures ou enrichies. Pour ce faire, nous avons utilisés deux réactions complémentaires, à savoir, la réaction de transestérification et d'hydrolyse enzymatique. Les substrats objet de ce travail sont d'une part, une série d'acétates benzyliques chiraux de type arylalkylcarbinols, et d'autre part, un alcool allylique secondaire, le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol, une phéromone d'insecte.

Nous avons étudié le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique dans le milieu conventionnel (bi-phasique: solution tampon/solvant organique) et non-conventionnel (solvant organique/base) et nous avons mis au point une nouvelle méthode d'hydrolyse en milieu organique avec Na_2CO_3 .

Nous avons optimisé les paramètres de la réaction d'hydrolyse enzymatique des acétates **1a-9a** dans les deux systèmes conventionnel et non-conventionnel (quantité et la nature de la lipase, la température, le solvant,...) et montré l'efficacité de la méthode non-conventionnelle avec ($C=49\%$, $E>200$). La réaction d'hydrolyse a été utilisée ensuite dans un processus de déracémisation via une stéréoinversion impliquant la réaction de Mitsunobu. Les résultats montrent que les acétates benzyliques (*S*) sont obtenus avec des excès énantiomérique ($57\% < ee < 99\%$) et des rendements chimiques ($70\% < rdt < 89\%$). L'acylation enzymatique du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol a été optimisée avec la lipase de *Candida antarctica* (*CAL-B*) et différents donneurs d'acyle dans divers solvant organiques et en présence d'additif. La sélectivité obtenue est de ($E=316$) à une conversion ($C=32\%$).

Mots clés : Dédoublement cinétique enzymatique, lipases, arylalkyléthanol, alcool allylique, déracémisation, stéréoinversion,

*Je dédie le fruit de ce travail à toute ma
famille*

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au Laboratoire de Catalyse Asymétrique et Eco-compatible à l'université Badji-Mokhtar de Annaba, dirigé par le professeur *Louisa ARJBI-ZOUIOUECHE*.

Je désire, en tout premier lieu, remercier ma directrice de thèse le Professeur *Louisa ARJBI-ZOUIOUECHE*, pour m'avoir encadrée pendant ces années de thèse. Je vous exprime mes sentiments les plus sincères pour avoir non seulement dirigé ces recherches, mais aussi pour votre enthousiasme, votre pédagogie, vos qualités humaines et votre grande disponibilité malgré un emploi du temps chargé.

Mes remerciements vont également au Docteur *Mounia Merabet-Khelassi*, Maître de conférences à l'université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour m'avoir co-encadrée, et m'avoir fait bénéficier de toute son aide et d'être présente parmi les membres de jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur *LEGSEIR Belgacem* pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Très sensible à l'honneur que me fait Monsieur *WAN DE WEGUE Pierre*, Professeur à l'université de Rennes 1, de bien vouloir accepter de critiquer ce travail, je l'en remercie infiniment.

Je remercie également Monsieur le Professeur *HACINI Salih* de l'université d'Oran, de bien vouloir participer à ce jury et juger ce travail.

Je tiens encore à remercier Monsieur le Professeur *GOUASMIA Abdelkrim* de l'université de Tébessa, de bien vouloir participer à ce jury et argumenter ce travail.

Je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur *Jean.-Claude. Fiaud*, directeur de L'ICMO à l'université de Paris-Sud et à Monsieur le professeur

Olivier Riant de l'unité de Chimie Organique et Médicinale (CHOM), de l'université catholique de Louvain pour l'aide précieuse concernant toutes les analyses spectroscopiques (I.R, RMN¹H, RMN¹³C...) et surtout l'analyse chirale par HPLC chirale, je les prie d'accepter mes remerciements les plus sincères.

Pour terminer, j'ai le plaisir de remercier tous les membres du laboratoire qui, par leur gentillesse et leur disponibilité, ont rendu le quotidien de ces années de thèse agréable et chaleureux.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Afin de faciliter la lecture de cette thèse, nous avons utilisé les abréviations suivantes:

Symbole / Abréviation	Signification
$\mathcal{AI}$	Acétate d'isopropényle
$\mathcal{AV}$	Acétate de vinyle
$\mathcal{AS}$	Anhydride succinique
C	Conversion
$\mathcal{CAL-B}$	Lipase de <i>Candida Antarctica -B</i>
$\mathcal{CCL}$	Lipase de <i>Candida Cylandracia</i>
$\mathcal{CCM}$	Chromatographie sur Couche Mince
$\mathcal{CPG}$	Chromatographie chirale en phase gazeuse
$\mathcal{DCE}$	Dédoublment cinétique enzymatique
$\mathcal{E}$	Facteur de sélectivité
$\mathcal{E.C}$	Ether couronne
$\mathcal{Enz}$	Enzyme
ee_s	Excès énantiomérique du substrat
ee_p	Excès énantiomérique du produit
$\mathcal{HPLC}$	Chromatographie Liquide à Haute Performance
$\mathcal{LGL}$	Lipase <i>Gastrique de lapin</i>
$\mathcal{P}$	Produit
$\mathcal{R}_f$	Rapport frontal
$\mathcal{R}, \mathcal{S}$	Nomenclature selon les règles de Cahn, Ingold et Prelog des énantiomères Rectus et Sinister
$\mathcal{RMN}^1\mathcal{H}$	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
$\mathcal{RMN}^{13}\mathcal{C}$	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
$\mathcal{S}$	Substrat

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau	Titre	Page
1	Transestérification enzymatique des 1-aryléthanol avec la <i>LGL</i>	95
2	Transestérification enzymatique des 1-aryléthanol par différentes lipases	96
3	Rendements chimiques des acétates racémiques 1a-9a	99
4	Hydrolyse des acétates racémiques 1a-9a en présence de 150 mg de <i>CAL-B</i>	101
5	Hydrolyse des acétates racémiques 1a-6a en présence de différentes quantités de <i>CAL-B</i>	105
6	Influence de la quantité et la nature de la lipase sur l'hydrolyse de l'acétate 7a	114
7	Hydrolyse enzymatique des acétates racémique 1a-9a dans le toluène	117
8	Influence du carbonate de sodium sur l'hydrolyse enzymatique de l'acétate du 1-phényléthanol 7a	118
9	Hydrolyse enzymatique des acétates racémique 1a-9a dans le toluène	121
10	Déracémisation des substrats 1a-9a par hydrolyse enzymatique / protocole de Mitsunobu	129
11	Déracémisation des substrats 4a-7a par acylation avec la <i>CAL-B</i> combiné au protocole de Mitsunobu	133
12	Déracémisation des substrats 1a-4a par hydrolyse avec la <i>CAL-B</i> / protocole de Mitsunobu	134
13	Etude du D.C.E en fonction de la nature de l'enzyme	147
14	Etude du D.C.E: influence de l'agent acylant	148
15	Etude du D.C.E: influence du solvant	149
16	Etude du D.C.E: influence de la température	150
17	Etude du D.C.E en fonction de l'addition de l'éther couronne	151

LISTE DES FIGURES:

Figure	Titre	Page
1	Représentation de la distribution des médicaments en fonction de leurs propriétés chirales entre 1983-2006	4
2	Structure des enzymes	11
3	Fréquence de l'utilisation des enzymes hydrolytiques dans les biotransformations	12
4	Modèle de complémentarité stérique	14
5	Modèle de l'ajustement induit	15
6	Mécanisme catalytique et libération du produit.	15
7	Procédure de dédoublement par diastéréoisomères	19
5	Procédure de dédoublement	15
8	Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E < 10$.	22
9	Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E \geq 100$.	23
10	Règle de Kazlauskas	24
11	La corrélation entre l'excès énantiomérique (<i>R</i>)-1a, (<i>S</i>)-2 et le pH (5-8)-3-pentanone dans la résolution via la lipase <i>LIP</i>	31
12	Rendements chimiques théoriques lors d'une racémisation par oxydoréduction cyclique	51
13	Rendement chimique théorique d'un dédoublement répété	54
14	Comparaison de la conversion entre les deux méthodes	122
15	Comparaison de la sélectivité entre les deux méthodes	123
16	Image 3D de la <i>CAL-B</i>	145

LISTE DES SCHEMAS

Schéma	Titre	Page
1	Molécules possédant des propriétés biologiques différentes en fonction de leur stéréochimie	2
2	Structure des énantiomères de la thalidomide.	3
3	Modèles de Chiral switch.	4
4	Intérêt de la catalyse enzymatique	8
5	Mécanisme réactionnel de la triade catalytique	16
6	Principe d'un dédoublement cinétique.	19
7	Réaction enzymatique.	20
8	Influence de l'enzyme sur l'hydrolyse enzymatique du hydroxyacétal dans une solution à pH neutre	25
9	Influence de la lipase sur la réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu tampon	25
10	Influence de la lipase dans une réaction d'acylation	26
11	Influence de la nature substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique	26
12	Influence de substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique	27
13	Influence de substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique	27
14	Influence de la température sur la réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu bi-phasique (Solution tampon-Toluène)	28
15	Influence de la température sur la réaction d'acylation enzymatique	29
16	Influence de la température sur la transestérification enzymatique	29
17	Effet du pH sur la réaction d'hydrolyse enzymatique dans un milieu bi-phasique (Solution tampon-Dioxane)	30
18	Influence du pH sur la réaction d'hydrolyse enzymatique dans un milieu bi-phasique (Solution tampon-3-pentanone)	31
19	l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un acétate primaire	32
20	l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un ester secondaire	33
21	l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un	34

	ester secondaire	
22	Réaction de transestérification avec les esters d'enol	35
23	Réaction de transestérification avec les anhydrides d'acide	35
24	Influence de la partie acyle en présence de la lipase de <i>Pseudomonas sp</i>	36
25	Influence de la partie acyle sur l'acylation du 2-phenyl-1-propanol	37
26	Acylation enzymatique avec les esters d'énol	37
27	Acylation enzymatique avec l'anhydride succinique	38
28	Réaction hydrolyse enzymatique	38
29	Enantiocomplémentarité des énantiomères issus de la réaction acylation et d'hydrolyse enzymatique	39
30	<i>Hydrolyse enzymatique du β-acétoxybutyronitrile</i>	40
31	<i>Hydrolyse enzymatique du N-Boc-protégé</i>	40
32	<i>Hydrolyse enzymatique du (R, S)- 1-phénoxy-2-propanol acétate en solution tampon</i>	41
33	<i>Hydrolyse enzymatique dans une solution tampon Tris-HCl</i>	41
34	<i>Hydrolyse enzymatique du 2-substitué glycerol dans la solution tampon</i>	41
35	Hydrolyse enzymatique de l'ester 4-acetoxytetralone	42
36	Dédoublment cinétique enzymatique dans son cas idéal	43
37	Comparaison entre le principe de dédoublment cinétique classique et celui de la déracémisation	44
38	Réaction de racémisation	45
39	<i>Mécanisme d'une racémisation catalysée par une base</i>	45
40	Racémisation du centre stéréogénique sulfure des sulphoxydes à – 78°C catalysée par une base	46
41	Mécanisme d'une racémisation catalysée par un acide	46
42	Racémisation du (S) méthyl N-(2,6-diméthylphényl)alaninate catalysée par un acide	47
43	Racémisation du (R) 2-chlorophényl glycine catalysée par la chaleur	48
44	Mécanisme d'une racémisation par une séquence d'oxydoréduction.	48

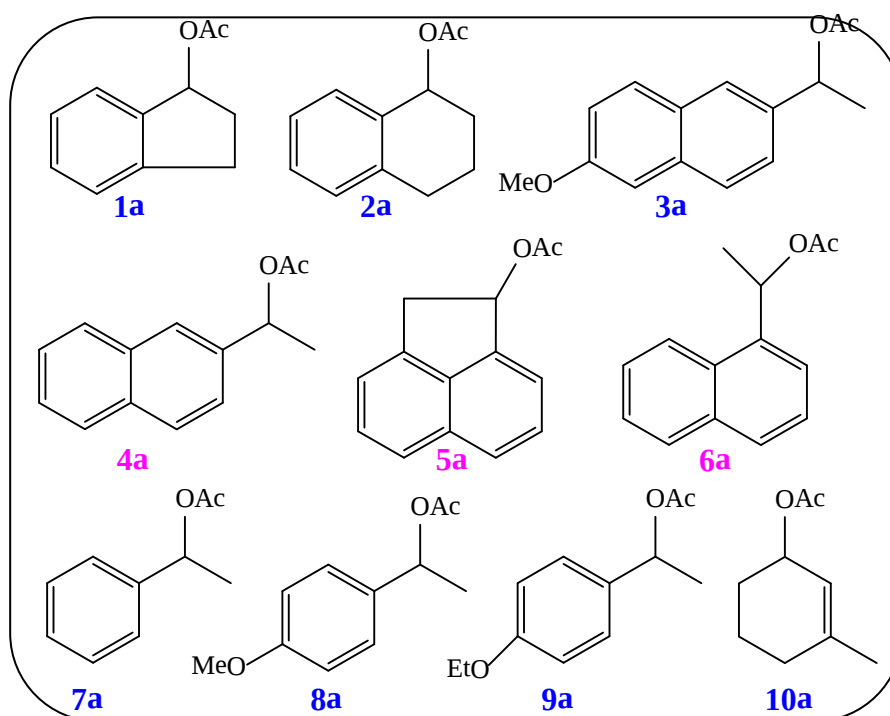
45	<i>Racémisation biocatalytique α-hydroxyacides alyphatique</i>	49
46	<i>Racémisation du (S)- phényléthan-1-ol catalysée par le métal</i>	49
47	Principe de déracémisation des alcools secondaires et des amines par oxydoréduction cyclique	51
48	Déracémisation microbienne du N-(1-hydroxy-1-phényléthyl)benzamide par oxydoréduction cyclique	52
49	oxydation-réduction cyclique via une combinaison d'un catalyseur biologique et une méthode chimique	53
50	Dédoublément répétés via re-racémisation	53
51	Dédoublément cinétique classique et dynamique	54
52	DCD enzymatique de ($\pm$)-cis-N-(Alkoxy-carbonyl) cyclopentane-1,2-diamines basé sur une racémisation spontanée	56
53	Déracémisation de l'acide mandélique ($\pm$) via deux systèmes enzymatiques lipase-mandélate racémase	57
54	Méthodes générales de racémisation catalysée par le métal dans un dédoublement cinétique dynamique	57
55	DCD du 1-phényléthanol par le couple Rhodium / enzyme	58
56	DCD de l'acétate allylique cyclique via le couple Palladium / enzyme	59
57	DCD de l'acétate allylique linéaire via le couple Palladium /enzyme	59
58	Dissociation du catalyseur de racémisation 1	60
59	DCD du 1-phényléthanol via complexe de Shvo / <i>CAL-B</i>	61
60	<i>DCD du 1-phényléthanol</i>	62
61	DCD du 1-cyclohexyléthanol	62
62	DCD d'alcool benzylique par le système Aluminium / enzyme	63
63	<i>racémisation via la lumière fluorescente</i>	64
64	DCD catalysée par la lumière fluorescente	64
65	DCD catalysée par une onde ultra-courte	65
66	DCD catalysée par l'acide (CD8604)	66
67	DCD catalysée par une base, la Dipropylamine	66
68	Principe de la transformation énantioconvergence.	67
69	Enantioconvergence via deux biocatalyseurs	68
70	Enantioconvergence par deux catalyseurs différents	68

71	Enantioconvergence via un seul biocatalyseur	69
72	1 ^{ère} stratégie de déracémisation par stéréoinversion via la réaction d'oxydo-réduction	71
73	Déracémisation via le processus de stéréoinversion de l'énantiomère (R)-1-phényl-1,2-éthanediol	72
74	Déracémisation des alcools secondaire aryl via une réaction d'oxydoréduction tandem	72
75	Déracémisation 1-phénylethanol par stéréoinversion.	73
76	Deux principales méthodes pour l'inversion des alcools chiraux	73
77	Inversion du sulfonate via le couple acide-base	74
78	Inversion des mésylates et tosylates par la substitution-CsF	74
79	Inversion des alcools secondaires avec l'acétate de césium	75
80	Déracémisation par une combinaison d'une hydrolyse enzymatique et une stéréoinversion « in situ »	76
81	Déracémisation de l'éthyl-3-hydroxybutanoate par acylation enzymatique combiné à une stéréoinversion « in situ »	77
82	Principe de déracémisation par stéréoinversion de Mitsunobu	77
83	Estérification d'un alcool secondaire via le protocole de Mitsunobu.	78
84	Mécanisme de la réaction de Mitsunobu	79
85	Quelques applications de la réaction de Mitsunobu en synthèse organique	80, 81-82-83
86	Influence du substrat sur la réaction de Mitsunobu	84
87	L'estérification de l'acide 4-Nitrobenzoïque via le protocole de Mitsunobu	84
88	Estérification avec les nouveaux azodicarboxylate sous les conditions de Mitsunobu	85
89	Estérification avec le DMEAD	86
90	Déracémisation de 1-indanol racémique	87
91	Synthèse du (S)-dictyoprolène via résolution/stéréoinversion enzymatique.	87
92	Déracémisation du 2-acetoxybutyl tosylate racémique	88

93	Déracémisation d'une cyanohydrine aromatique racémique	88
94	L'énantiocomplémentarité combiné au processus de Mitsunobu	89
95	Modèles étudiés	94
96	Transestérification des alcools benzyliques secondaires catalysé par la <i>LGL</i>	95
97	Acylation des alcools benzyliques secondaires catalysé par différentes lipases	96
98	Hydrolyse catalysée par la lipase de <i>Pseudomonas fluorescences</i> (<i>PFL</i>)	97
99	Hydrolyse enzymatique des acétates secondaires	97
100	Synthèse des alcools 2 , 3 , 6 , 8 et 9 par réduction des cétones correspondantes	98
101	Synthèse des acétates racémiques 1a-9a par acylation chimique	98
102	Dédoublement cinétique des acétates racémiques 1a-9a par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de <i>CAL-B</i>	100
103	Hydrolyse enzymatique du cis-(3-benzyloxyméthyl)oxiran-2-méthyl acétate	109
104	Hydrolyse enzymatique du (<i>R, S</i>)-1-phényléthyl acétate en présence de l'ammonique	110
105	Hydrolyse enzymatique du (<i>R, S</i>)-1-phényléthyl acétate en présence de l'ammonique	110
106	Dédoublement cinétique dynamique du phényléthanol	111
107	Dédoublement cinétique d'acétates racémiques par hydrolyse avec la <i>CAL-B</i> et Na_2CO_3	113
108	Dédoublement cinétique des acétates racémiques 1a-9a par hydrolyse enzymatique dans le toluène avec Na_2CO_3	116
109	Dédoublement cinétique des acétates racémiques 1a-9a par hydrolyse enzymatique dans les deux milieux	122
110	Comparaison entre les deux méthodes en pratique.	123
111	Déracémisation du dichloroacétate racémique	125
112	Déracémisation du monotosylate 1,2-diol	126
113	Acétates racémiques 1a-9a modèles	127

114	Déracémisation par un système hydrolyse enzymatique / protocole de Mitsunobu dans un milieu non-conventionnel	128
115	Déracémisation par transésterification enzymatique / protocole de Mitsunobu	133
116	L'énantiocomplimentarité des réactions d'acylation et d'hydrolyse combiné au protocole de Mitsunobu	135
117	L'hydrogénation asymétrique du seudénol.	139
118	Dédoublement chimique en présence du complexe de Sharpless.	140
119	Dédoublement cinétique enzymatique du seudénol.	141
120	Transestérification du seudénol	141
121	Hydrolyse enzymatique des esters du seudénol	142
122	Transestérification de butyrate du seudénol	143
123	Acylation enzymatique du seudénol	143
124	Le modèle choisi (seudénol)	144
125	Acylation chimique du seudénol	146
126	Acylation enzymatique	146

Les acétates de 1a-10a



Les alcools de 1-10

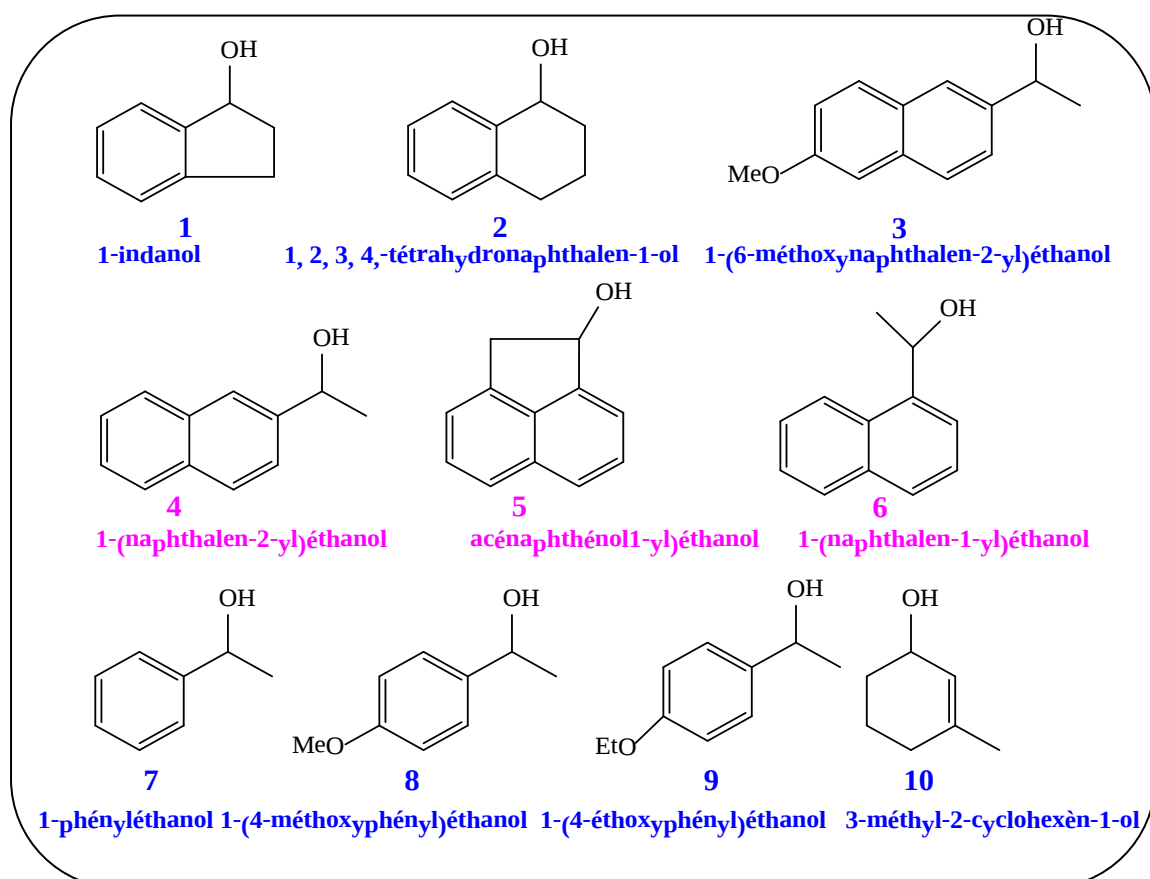


Table des matières

	Page
INTRODUCTION GENERALE	1
<i>Première partie : Revue bibliographique sur la catalyse enzymatique et les méthodes de déracémisation</i>	
Introduction de la première partie	8
<i>Chapitre I - Généralités sur les enzymes et la catalyse enzymatique</i>	
I-1: Introduction	10
I-2: Généralité sur des enzymes	10
I-3: Structure des enzymes	10
I-4: Classification des enzymes	11
I-5: Les hydrolases	12
I-6: Application des hydrolases en milieux organique	13
I-7: Phénomène du cycle catalytique enzymatique	14
I-8 : Le site actif	16
I-9: Conclusion	17
<i>Chapitre II - Le dédoublement cinétique enzymatique</i>	
II-1: Introduction	18
II-2: Définition du dédoublement	18
II-2-1: Le dédoublement spontané	18
II-2-2 : Le dédoublement par formation de diastéréo-isomères	18
II-2-3: Le dédoublement chromatographique	19
II-2-4: Le dédoublement cinétique	19
II-2-4-1: Le dédoublement cinétique enzymatique	20
II-3 : Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique	21
II-4: Les modèles empiriques de prédiction	23
II-5 : Paramètres influant sur la réaction enzymatique	24
II-5-1 : Influence de la nature d'enzyme	24
II-5-2 : Influence de la structure du substrat	26

II-5-3 : Influence de la température	28
II-5-4 : Influence pH	30
II-5-5 : Influence du solvant	32
II-6: Réaction de transestérification enzymatique	34
II-7: Réaction hydrolyse enzymatique	38
II-8: Conclusion	42
<i>Chapitre III - Généralités sur les méthodes de déracémisation</i>	
III-1: Introduction	43
III-2: Principe de déracémisation	44
III-3: La réaction de racémisation	44
III-4 : Les différentes méthodes de déracémisation	50
III-4-1: Déracémisation par oxydoréduction cyclique	50
III-4-2: Déracémisation par les dédoublements répétées	53
III-4-3: Déracémisation par le dédoublement cinétique dynamique	54
III-4-4 : Processus d'énantioconvergence	67
III-4-5: Déracémisation par le processus de stéréo inversion	69
III-5 : Conclusion	69
<i>Chapitre IV - le processus de stéréo inversion</i>	
IV-1: Introduction	71
IV-2: Déracémisation par DCE combinée à la réaction de Mitsunobu	86
IV-2-1: Combinaison de la réaction de Mitsunobu avec l'acylation enzymatique	86
IV-2-2: Combinaison de la réaction de Mitsunobu avec les réactions d'hydrolyses enzymatique	87
IV-2-3: Cas de complémentarité énantiosélective des réactions d'acylation et d'hydrolyse enzymatique	89
IV-3 : Conclusion	90
Conclusion de la première partie	91

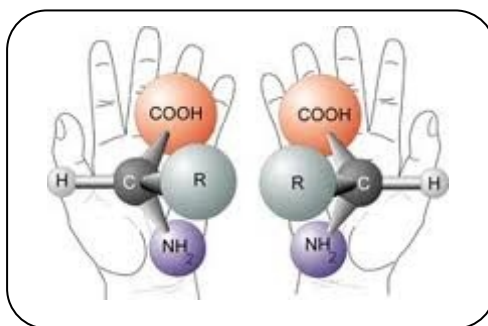
*Deuxième partie : Synthèse d'alcools optiquement purs par catalyse
enzymatique*

Introduction de la deuxième partie	92
<i>Chapitre I - Hydrolyse enzymatique dans un milieu conventionnel</i>	
I-1 : Introduction	94
I-2 : Importance des modèles étudiés	94
I-3 : Synthèse des alcools racémiques	98
I-4 : Dédoublément cinétique par hydrolyse des acétates 1a-9a catalysée par la <i>CAL-B</i>	99
I-5 : Influence de la quantité d'enzyme <i>CAL-B</i> sur la sélectivité de la réaction d'hydrolyse	104
I-6: Conclusion	108
<i>Chapitre II – Hydrolyse enzymatique en milieu non-conventionnel</i>	
II-I : Introduction	109
II-2 : Dédoublément cinétique par hydrolyse des acétates 1a-9a catalysé par la <i>CAL-B</i> en milieu non-conventionnel	113
II-3 : Etude de l'hydrolyse en milieu non-conventionnel : Optimisation des paramètres de la réaction	113
II-4: Conclusion	124
<i>Chapitre III - Déracémisation d'acétates benzyliques via le processus de stéréoinversion</i>	
III-I : Introduction	125
III-2 : Déracémisation par hydrolyse enzymatique en solvant organique avec Na_2CO_3 combiné à la réaction de Mitsunobu	126
III-3: Comparaison entre déracémisation par hydrolyse en milieu non-conventionnel et par transestérification enzymatique combiné à la réaction de Mitsunobu	133
III-4 : Conclusion	135
<i>Chapitre IV – Acylation du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol</i>	
IV-1: Introduction	137
IV-2: Etude bibliographique	139
	XIX

IV-3 : Dédoublage cinétique enzymatique du 3-méthyl-2-cyclohexen-1-ol	145
IV-3-1: Synthèse de l'acétate correspondant	145
IV-3-2: Transestérification enzymatique du seudenol	146
IV-3-2-1 : Effet de la nature et de la quantité d'enzyme	147
IV-3-2-2: Effet de la nature et la concentration de l'agent acylant	148
IV-3-2-3: Effet de solvant	149
IV-3-2-4: Etude sur la variation de la température	150
IV-3-2-5: Influence de l'additif	151
IV-4: Conclusion	152
Conclusion générale	154
Partie expérimentale	156
Références bibliographiques	193
Annexe	206

Introduction générale

La chiralité moléculaire est une propriété intrinsèque du monde vivant. Les molécules naturelles chirales comme les acides α -aminés ou les sucres existent à l'état naturel sous la forme d'un unique énantiomère. Nos mains fournissent le meilleur exemple, ou la main droite est l'image de la main gauche dans un miroir, ces deux molécules dites énantiomères ne sont pas superposables.



Les fonctions biologiques reposent sur la reconnaissance moléculaire générée par la chiralité, c'est ainsi que les deux énantiomères d'un composé chiral peuvent interagir différemment.

Ainsi, au sein d'une même molécule chirale, différents cas peuvent se présenter : les deux énantiomères possèdent la même activité biologique¹, l'un des énantiomères possède toute l'activité biologique de la molécule par contre l'autre étant inactif², les deux énantiomères ont la même activité biologique mais à des proportions différents³, l'activité biologique des deux énantiomères est totalement différente⁴, à l'exemple de la Thalidomide ou un énantiomère est sédatif tandis que l'autre est tératogène.

¹ H. Kagan ; Molécules et matériaux d'intérêt médical. L'actualité chimique-novembre-décembre **2003**. pp. 10-14.

² W. J. Hegeman, R. W. Laane; Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment, Rev. Environ Contam. Toxicol, **2002**, 173, 85-116.

³ R. P. Hof, U. Quast, N.S. Cook, S; Blarer, Circ. RES, **1888**, 62, 679.

⁴ (a) V. G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentsher, F. Köhler; Arzheim-Forsch. **1979**, 29, 1640-1646, (b) M. Strong, FDA Policy and Regulation of Stereoisomers: Paradigm Shift and the Future of Safer, More Effective Drugs, Food and Drug Law Journal, **1999**, 54, 463-487.

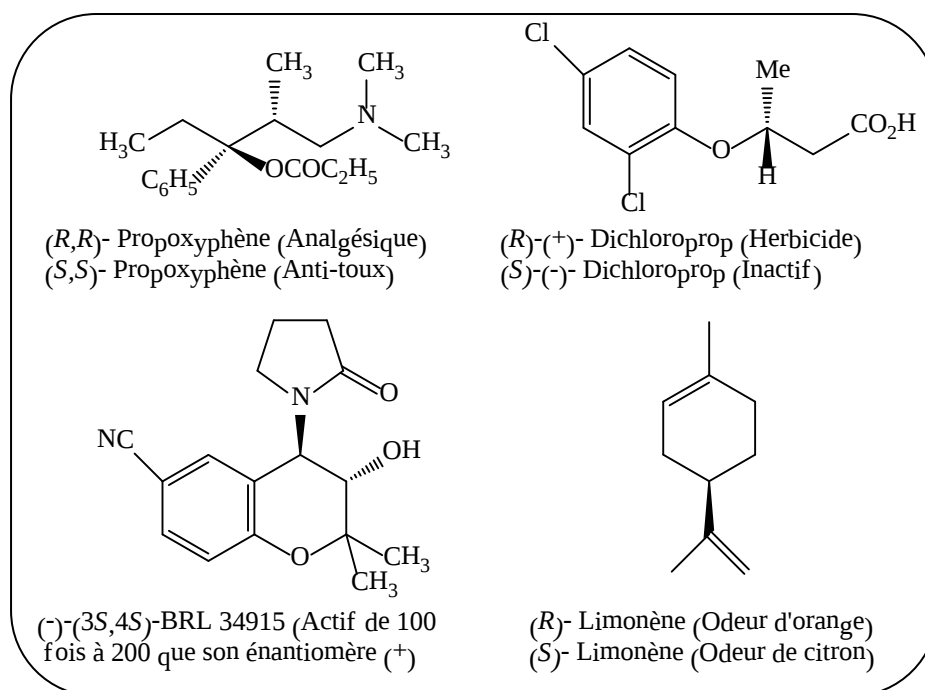


Schéma 1 : Molécules possédant des propriétés biologiques différentes en fonction de leur stéréochimie

La tragédie de la thalidomide⁵ a soulevé le problème de la chiralité à la fin des années 1950, ce médicament utilisé par les femmes enceintes comme sédatif des nausées matinales, était commercialisé en Europe sous forme racémique (Contergan[®]). Après quelques années de commercialisation, de nombreuses malformations chez les nouveau-nés ont été attribuées à l'usage de la Thalidomide (schéma 2). Une étude pharmacologique sur les animaux a montré que l'activité tératogène néfaste était due à l'énantiomère (*S*). Des études plus récentes indiquent toutefois que la Thalidomide se racémise aisément dans le sang, ce qui montre que même l'emploi thérapeutique de la (*R*)-Thalidomide était voué à l'échec. D'une manière inattendue, la thalidomide est de nouveau sur le marché, elle est utilisée dans le traitement de la lèpre pour lequel elle a reçu l'autorisation de la Food and Drug Administration (FDA), de la polyarthrite rhumatoïde (PR)⁶, de la spondylarthrite ankylosante (SPA)⁷ et dans le traitement des myélomes réfractaires⁸.

⁵ (a) J. Seyden-Penne, Synthèse et Catalyse Asymétriques, **1994**, Inter Edition / CNRS. (b) réf 1.

⁶ a) Huizinga TW et al. An open study of pentoxifylline as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis **1996**, 55: 833. b) Stamble C et al. TNF α and response of treatment-resistant adult-onset Still's disease to thalidomide. Lancet **1998**, 352: 544.

⁷ Breban M et al. Efficacy of thalidomide in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum **1999**, 42: 580.

⁸ S. Singhal et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. N Engl J Med **1999**; 341: 1565.

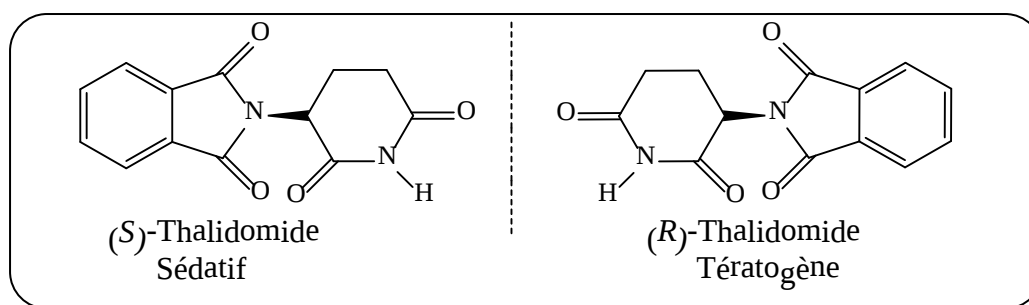


Schéma 2 : Structure des énantiomères de la thalidomide.

Ainsi, et en raison des restrictions de la FDA (Food and Drug Administration), la mise sur le marché de molécules racémiques à visées thérapeutiques est devenue difficile, voire impossible. Depuis 1992, en effet, toute société pharmaceutique qui souhaiterait mettre sur le marché un nouveau composé racémique, se devait de mettre en évidence, séparément, les caractéristiques de chaque énantiomère de ce composé racémique et ce, par des études⁹ biologique, pharmacologique et toxicologiques afin de démontrer que l'énantiomère indésirable n'a pas d'effets secondaires ou ne présente pas de toxicité ; ceci, avant de pouvoir l'écouler sur le marché sous sa forme racémique.

Depuis 1997, la F.D.A impose aux entreprises pharmaceutiques dont les médicaments sont disponibles sous forme racémique à concevoir ces médicaments sous la forme d'un seul énantiomère. D'ailleurs, une nouvelle tendance appelée le « chiral switch »¹⁰ est actuellement adoptée par les industriels afin de prolonger un médicament racémique efficace arrivant en fin de brevet par un nouveau médicament énantiopur. L'existence des médicaments énantiomériquement purs permet en effet de réduire les doses prescrites aux patients, et à priori d'avoir une meilleure efficacité. A ce titre, citons l'exemple de l'oméprazole (Antra®), un anti-ulcéreux, qui s'est longtemps placé en tête des ventes mondiales des médicaments, ainsi que de l'isoméprazole (Nexium®), l'énantiomère possédant l'essentiel de l'activité biologique de l'oméprazole racémique, que la société Astra-Zeneca a lancé en 2001.

⁹Réf 1 : H. Kagan ; Molécules et matériaux d'intérêt médical. L'actualité chimique-novembre-décembre 2003. pp. 10-14.

¹⁰(a) S.C.Stinson, Chem. Engineering new 2001, 79, 79. (b) R. N. Patel; Biocatalysis in the pharmaceutical and Biotechnology Industry. CRC Press, 2007.

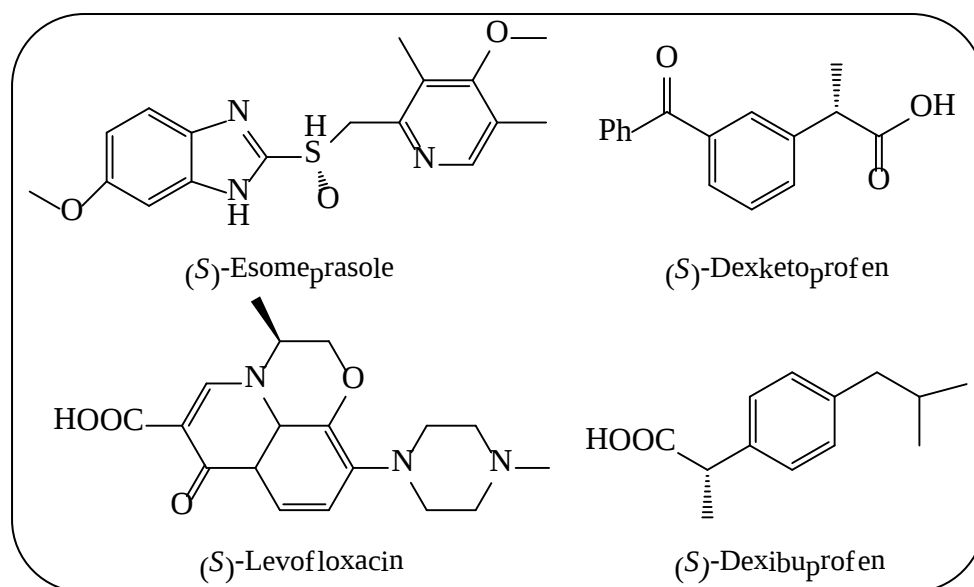


Schéma 3 : Modèles de Chiral switch.

Le remplacement des médicaments racémiques par ceux sous forme énantiomériquement purs a suivi une avancée économique notable entre les années 1983 et 2006 (figure 1).

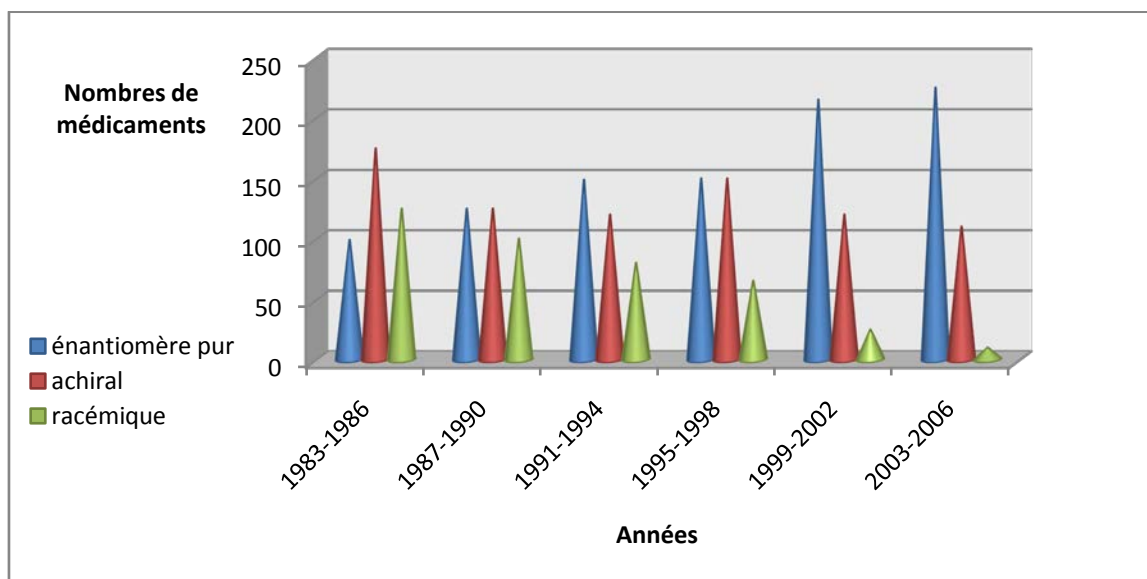


Figure 1 : Représentation de la distribution des médicaments en fonction de leurs propriétés chirales entre 1983-2006¹¹.

Parmi les dix médicaments les plus vendus dans le monde actuellement, neuf contiennent un principe actif chiral, et un seul des deux énantiomères est actif¹² pour les quarts premiers d'entre eux. Le marché des molécules commercialisées sous la forme d'un unique

¹¹ A. Berthod; "Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations: A General View, in Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications", (A. Berthod, ed), **2010**, Springer, pp. 1-32

¹² A.M. Thayer, Chem. Engineering new **2005**, 83, 40.

énantiomère représentait près de 9 milliards \$ en 2004 et devrait attendre 15 milliards \$ en 2009, ce qui représente une croissance de plus de 11% par an¹³.

Actuellement, l'obtention de molécules chirales énantio-pures est d'un intérêt capital pour la synthèse de composés biologiquement actifs, particulièrement dans les domaines de la pharmacie, de l'agrochimie, des cosmétiques et de la parfumerie¹⁴. Il est donc indispensable de disposer de diverses méthodes pour accéder à ces molécules énantio-mériquement pures, il existe trois grandes voies¹⁵:

- ❖ La transformation hautement stéréosélective de synthons chiraux, en général des molécules naturelles (terpène, sucre, alcaloïdes,...) qui subissent une succession de réactions qui mènent à l'énantiomère désiré.
- ❖ La synthèse asymétrique qui consiste en l'introduction d'un élément d'asymétrie au sein d'une espèce prochirale à l'aide d'un réactif chiral ou un catalyseur chiral.
- ❖ Le dédoublement d'un mélange racémique qui peut être, soit spontané¹⁶, soit cinétique avec un réactif chiral (stœchiométrique) ou un catalyseur chiral (enzyme), soit par séparation de diastéréoisomères formés grâce à un auxiliaire chiral optiquement pur, soit par chromatographie sur support chiral.

En termes d'économie d'atome, L'inconvénient majeur de cette dernière méthode est la limitation du rendement théorique à 50% si l'énantiomère indésirable ne peut être recyclé. Pour vaincre cette limitation intrinsèque, la recherche s'oriente vers les méthodes de déracémisations¹⁷ qui complètent les dédoublements cinétiques enzymatiques.

¹³ A. Maureen Rouhi; Chem. Eng. News, **2004**, June 14, 47-62.

¹⁴ Revues générale sur la synthèse asymétrique : a) J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers ; Chimie Organique, Ed. De Boeck, **2002**, Chap 45 : Synthèse asymétrique, pp. 1219-1243. b) Kagan, H.B. L'actualité chimique, **2003**, 11-12, 10-14.

¹⁵ (a) C. Rabiller, « stéréochimie et chiralité en chimie organique », De Boeck & Larcier, s.a, **1999**. (b) R. A. Sheldon, in chirotechnology, Marcel Dekker, New York, **1993**.

¹⁶ L. Pasteur ; Ann, Chim et Phys, **1848**, 24, 442.

¹⁷ K. Faber; Chem. Eur. J, **2001**, 7, 5004-5010.

Dans des travaux antérieurs de notre laboratoire, des processus de déracémisation ont été utilisés sur une série d'arylalkylcarbinols par réaction de transesterification enzymatique suivi d'un processus de stéréoinversion¹⁸ pour accéder aux *R*-acétates énantiomériquement purs avec un rendement chimique théorique optimal.

Cette thèse a pour objectif d'étudier de nouvelles voies d'accès aux molécules énantiopures dans le cadre des principes de la chimie verte. Nous avons mis en œuvre une nouvelle méthode d'hydrolyse enzymatique en milieu organique avec des carbonates. Cette réaction d'hydrolyse enzymatique est réalisée sur une série d'arylalkylcarbinols et comparée à la méthode d'hydrolyse conventionnelle. Les deux protocoles d'hydrolyses sont étudiés et les sélectivités obtenues sont comparées en fonction des conditions de la réaction. Après optimisation, la réaction d'hydrolyse optimisée est suivie d'un processus de déracémisation par stéréoinversion dans le but d'obtenir ces molécules optiquement pures et avec de bons rendements chimiques. Nous avons étudié l'énantiocomplimentarité des réactions de transesterification et l'hydrolyse enzymatique en comparant nos résultats avec ceux obtenus antérieurement.

Nous nous sommes intéressés également à la réaction d'acylation enzymatique sur un alcool secondaire allylique chiral, le 3-méthyl-2-cyclohexen-1-ol qui est une phéromone d'insecte¹⁹. Nous avons étudié divers paramètres réactionnels pour améliorer la sélectivité de cette réaction pour cet alcool biologiquement actif.

Les résultats de ce travail sont subdivisés en deux parties composée chacune de 4 chapitres.

La première partie de la thèse sera consacrée à une revue bibliographique. Nous introduirons tout d'abord les généralités sur les enzymes et la catalyse enzymatique dans un **premier chapitre**. Puis, une présentation concernant la réaction d'hydrolyse et d'acylation enzymatique, mettant l'accent sur l'influence de certains paramètres sur la réactivité et la sélectivité enzymatique dans un **deuxième chapitre**. Les processus de déracémisation dans un

¹⁸ N. Bouzemi, L.Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud, Tetrahedron : Asymmetry, **2006**, 17, 797-800.

¹⁹ Z. Houiene, Magister, soutenu le 28 Février **2007**. Université Badji Mokhtar- Annaba ; Synthèse énaniosélective d'une phéromone d'insecte le 3-méthyl-2-cyclohexenol. Effet de quelques paramètres sur l'acylation avec la lipase de *Candida Antarctica B*.

troisième chapitre et enfin, dans un **quatrième chapitre** le processus de stéréoinversion, avec la réaction d'estérification de Mitsunobu.

La deuxième partie de la thèse est consacrée aux résultats du travail expérimental, elle est présentée comme suit : **le premier chapitre** concerne l'hydrolyse enzymatique des acétates étudiés en milieu conventionnel (milieu bi-phasique : solution tampon/solvant organique) avec l'étude de l'optimisation de la quantité d'enzyme). La nouvelle méthode d'hydrolyse enzymatique est une réaction réalisée en milieu non-conventionnel (solvant organique/carbonates) dans un **deuxième chapitre**. **Le troisième chapitre** est consacré à l'application de la réaction de Mitsunobu consécutif aux réactions d'hydrolyses dans les deux systèmes. **Le quatrième chapitre** étudie la réaction de transestérification enzymatique de l'alcool allylique et les différents paramètres qui peuvent l'influencer.

Les protocoles expérimentaux et les résultats d'analyses spectroscopiques et chromatographiques sont réunis dans la partie expérimentale qui suit une conclusion générale résume les résultats de ce travail. Les travaux publiés de cette thèse sont jointes en annexe.

Première partie

*Revue bibliographique sur la catalyse
enzymatique et les méthodes de
déracémisations*

Introduction de la première partie

La catalyse fait partie des douze principes de la chimie verte²⁰, c'est le 9^{ème} principe qui est considéré comme pilier, puisqu'elle utilise des substances catalytiques sélectives visées pour la fabrication des produits ciblés. Le terme de catalyse fut introduit par Berzelius en 1836. Les catalyseurs sont des composés, ajoutés en faible quantité, qui accélèrent une réaction en abaissant les barrières énergétiques entre les réactifs et les produits et qui sont régénérés en fin de réaction. La vitesse et le rendement de celle-ci sont augmentés ce qui constitue une économie d'atomes et d'énergie.

En synthèse organique, l'accès aux molécules optiquement pures peut être réalisé, par la **catalyse homogène** si le catalyseur fait partie de la même phase que le système réactionnel, dans le cas contraire on parle de la **catalyse hétérogène** qui présente 80% des procédés industriels ou par la **catalyse enzymatique** « biocatalyse » qui utilise des catalyseurs naturels qui sont les enzymes, ce dernier type de catalyse est le plus utilisé ces deux dernières décennies.

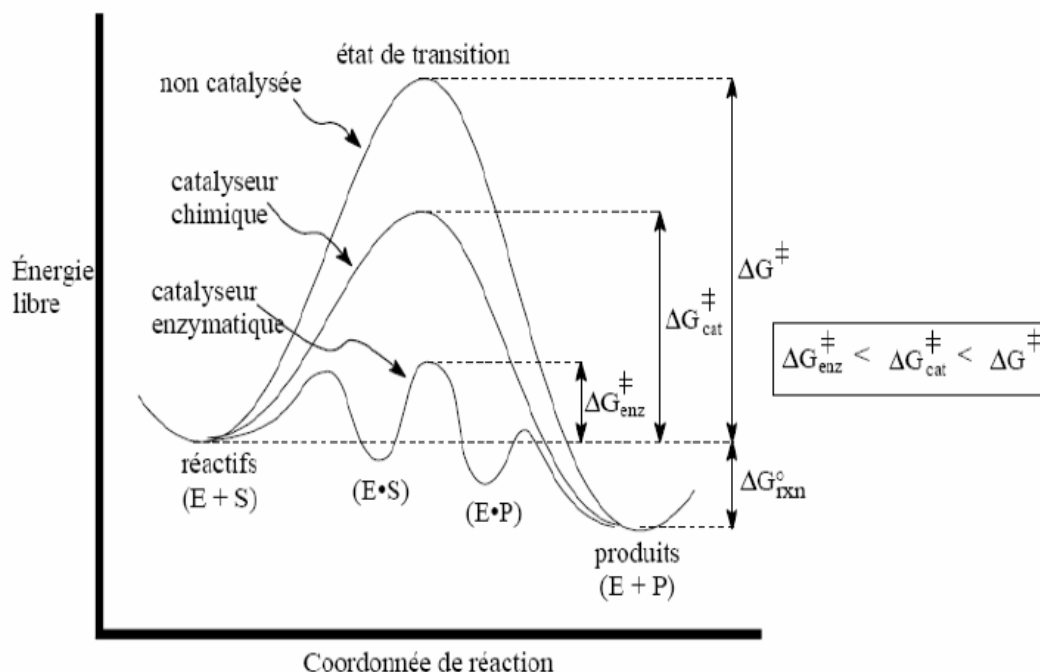


Schéma 4: Intérêt de la catalyse enzymatique

²⁰ (a) P. T. Anastas, T. C. Williamson, **1996**, Green chemistry: An overview. In Green chemistry: Designing chemistry for the environment, pp. 1-17, American Chemical Society, Washington D.C. (b) P. T. Anastas, J.-C. Warner; *Green Chemistry : Theory & Practice*, Oxford University Press, New York, **1998**.

Actuellement, le nombre de procédés industriels faisant appel à la biocatalyse pour la synthèse dans de nombreux secteurs : pharmaceutique, alimentaire, agrochimique, ou des parfums ne cesse d'augmenter et ce sur la demande incroyable de composés optiquement purs et actifs biologiquement aussi bien que leurs précurseurs. L'utilisation des biocatalyseurs peut s'effectuer par synthèse asymétrique de composés prochiraux ou par dédoublement cinétique de racémiques. Nous nous sommes intéressés au dédoublement cinétique enzymatique des mélanges racémiques par hydrolyse et transestérification enzymatique, qui représente une méthode de choix pour la synthèse de nombreux médicaments. En effet, les molécules racémiques d'intérêt potentiel à séparer constituent un réservoir important.

L'inconvénient majeur, sur le plan économique, des réactions d'hydrolyse et de transestérification choisis dans nos travaux réside dans le rendement chimique de molécules issues du dédoublement cinétique. Dans le cas idéal, d'une réaction de dédoublement cinétique ne dépasse pas les 50% même si elle est sélective. De ce fait, des méthodes pour convaincre ce problème se sont développées, elles permettent ainsi d'avoir un énantiomère désiré d'un mélange racémique avec des meilleurs excès énantiomérique et des rendements chimiques élevés, ce sont les méthodes de déracémisation. L'une de ces méthodes, qui a été utilisée dans ce travail, met en œuvre, un dédoublement cinétique enzymatique (DCE) suivi d'une stéréoinversion chimique.

La première partie de cette thèse intitulée « *Revue bibliographique sur la catalyse enzymatique* » est consacrée à une étude bibliographique subdivisée en 4 chapitres.

Le premier concerne des généralités sur les enzymes, **le second** montre les diverses méthodes d'obtention des molécules optiquement pures. Les méthodes de déracémisation sont ensuite rapportées avec des exemples dans un **troisième chapitre** et enfin, une étude du processus de stéréoinversion constitue **le quatrième chapitre** et clôture cette première partie.

Première partie

Premier chapitre

*Généralités sur les enzymes et la
catalyse enzymatique*

I-1: Introduction

Au cours de ces dernières années, le recours aux biocatalyseurs en synthèse organique a augmenté de façon considérable pour effectuer des réactions chimiques très sélectives. Parmi les avantages de l'utilisation de la méthode biocatalytique citons :

- 1- Une mise en œuvre facile.
- 2- Des conditions réactionnelles douces : intéressantes dans le cas de la synthèse de molécules fragiles.
- 3- Grande spécificité catalytique : chimio-, régio-, diastéréo-, et énantio sélectivités élevées.
- 4- Réactions non réalisables chimiquement.
- 5- Protection de l'environnement.

Les enzymes sont des outils clés des biotechnologies. Par conséquent, la connaissance des enzymes, de leur nature et de leurs propriétés est fondamentale.

I-2: Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs naturels qui émergent du monde vivant, elles sont des macromolécules biologiques de nature protéique²¹ qui possèdent des propriétés catalytiques remarquables. Nettement plus efficaces que les catalyseurs chimiques, elles sont capable de multiplier la vitesse d'une réaction par des facteurs très élevés²² ($10^7 - 10^{19}$) par rapport à la réaction non catalysée et ce dans des conditions douces. Aussi, elles ne déplacent pas le point d'équilibre d'une réaction équilibrée.

I-3: Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires qui sont elles- mêmes des enchaînements d'acides aminés. L'enchaînement linéaire des acides aminés définit la structure primaire²³ et par conséquent sa fonction. Cette séquence de ces acides aminés, en se pliant et en s'enroulant sur elle-même adopte une structure secondaire.

²¹ O.H. Housse, B.M. Trost; *J. Org. Chem*, **1964**, 30, 2502.

²² R. Wolfenden, M.J. Snider; **2001** The Depth of chemical Time and Power of Enzymes as catalysts. *Acc.Chem. Res.* 34:938-945.

²³ R. M. C. Dawson, W.H. Elliott, K. M. Jones; *Data for Biochemical research*, 2 nd Ed. Oxford university Press, **1969**.

Les poly peptides n'adoptent pas tous uniquement ces structures un peu idéalisées, mais d'autres arrangements plus désordonnés peuvent apparaître tels que des plissements, l'enroulement et d'autres agrégations permettent d'obtenir une structure spatiale tertiaire et d'aménager une poche appelée « site actif » pour l'acte catalytique.

Enfin, la structure quaternaire²⁴, dans laquelle deux chaînes ou plus, ayant chacune leur propre structure tertiaire, se combinent entre elles pour former un assemblage plus volumineux. (Figure 2).

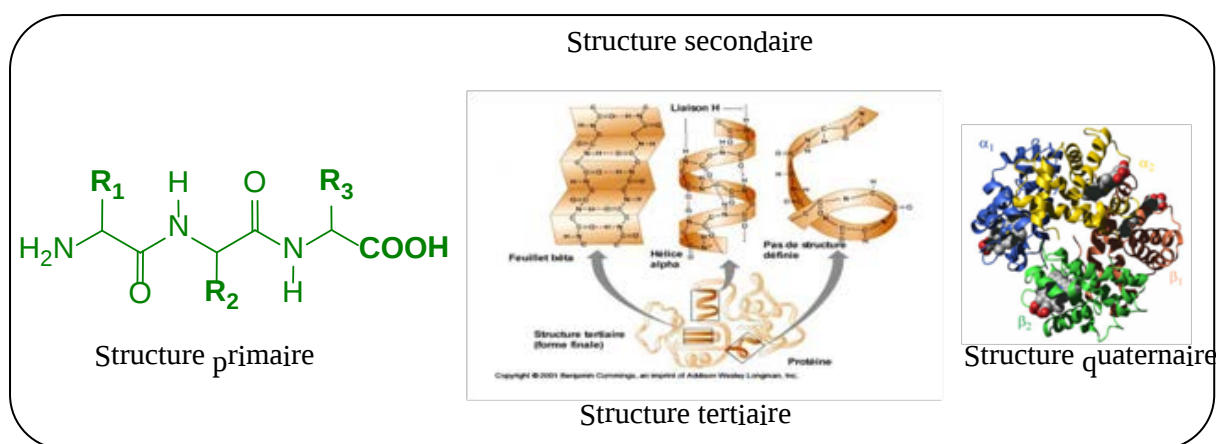


Figure 2 : Structures des enzymes

Par conséquent l'enzyme se présente comme un objet de configuration tridimensionnelle.

I-4: Classification des enzymes

En 1961²⁵, l'Union Internationale de la Biochimie (U.I.B) donne la classification suivante des enzymes, qui sont divisées en six groupes selon leurs activités catalytiques, ceci étant le caractère essentiel de toute enzyme sachant, qu'en général, qu'une enzyme ne peut catalyser qu'un seul type de réaction.

- 1- **Les oxydo-réductases** : les enzymes de ce groupe catalysent les réactions d'oxydoréduction et englobent les réactions d'oxygénation, comme par exemple le passage de C-H à C-OH, ainsi que l'addition ou l'élimination d'atomes d'hydrogène, comme par exemple CH(OH) à C=O et CH-CH à C=C.
- 2- **Les transférases** : ces enzymes transfèrent des radicaux (méthyle, éthyle,...) ou des groupements d'atomes (l'hydroxyméthyl, carbonyle et les groupements carbonés

²⁴ R. E. DcKerson, T. Takano, D. Eisenberg, O.B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, E. Margoliash; Journal of Biological chemistry, **1971**, 146, 1551-1553.

²⁵ International Union of Biochemistry Enzyme Nomenclature Academic Press: Orlando, **1984**.

comportant des fonctions aldéhydes ou cétones,...) d'une molécule (substrat donneur) à une autre (substrat accepteur).

- 3- **Les hydrolases** : c'est de loin le groupe le plus important, car il ne nécessite pas de co-enzyme. Cette classe permet l'hydrolyse d'esters, d'anhydrides, de glycosides, d'amides et permet aussi la transestérification des alcools. **Cette classe d'enzyme est la plus utilisée.**
- 4- **Les lyases** : ce type de catalyseurs favorise les additions de HX sur les doubles liaisons comme C=C, C=N, C=O et leur processus inverse.
- 5- **Les isomérases** : elles catalysent aussi bien les migrations intramoléculaires des doubles liaisons C=C que l'isomérisation *cis* – *trans* et peuvent effectuer les racémisations désirées.
- 6- **Les ligases (synthétases)** : elles permettent la formation de divers types de liaisons telles que C-O, C-C, C-S, C-N.

I-5: Les hydrolases

Les hydrolases²⁶ (lipases, estérases, protéases, acylases,...) sont des enzymes très utilisées (figure 3) en chimie organique à cause de leur stabilité, disponibilité et facilité de manipulation. Elles sont peu chères et ne nécessitent pas de cofacteurs pour leur fonctionnement et leurs coût est modéré.

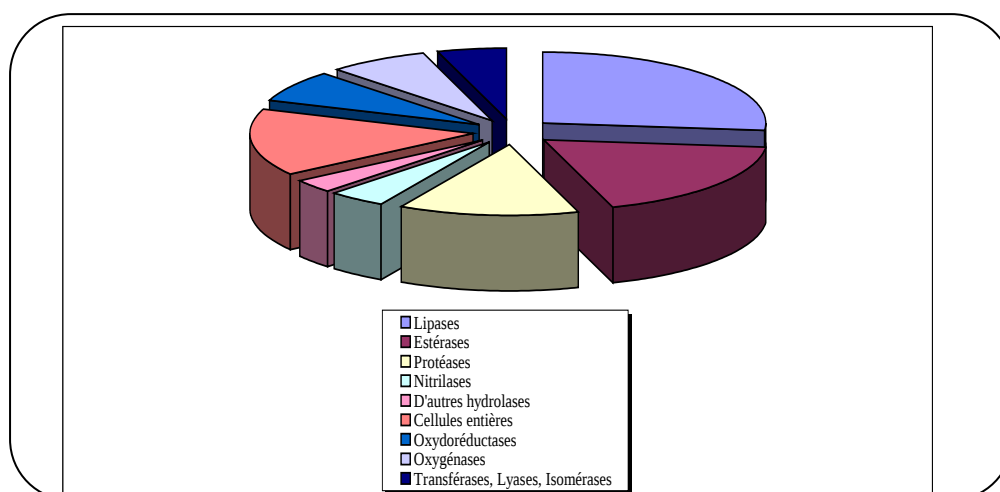


Figure 3: Fréquence de l'utilisation des enzymes hydrolytiques dans les biotransformations²⁷

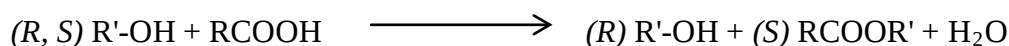
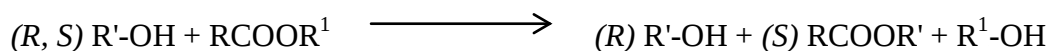
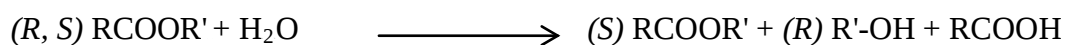
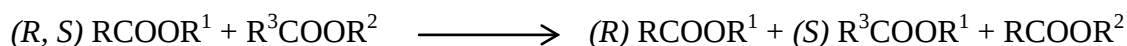
²⁶ (a) B. Danieli, S. Riva; Pure & Appl. Chem, **1994**, Vd. 66, Nos 10/11, pp. 2215-2218. (b) A.A. Assamoi, J. Destain, P. Thonart; Biotechnol. Agron. Soc. Environ., **2009**, 13, 281-294.

²⁷ K. Faber; Pure & Appl. Chem, **1997**, Vol.69, No.8, pp.1613-1632.

I-6 : L'application des hydrolases en synthèse organique

Les hydrolases permettent des réactions d'hydrolyse en milieu aqueux, mais aussi des réactions d'estérification, d'interestérification ou de transestérification dans les solvants organiques. Les travaux de Klibanov²⁸ ont montré, en 1986, que les enzymes peuvent être réactives dans les milieux organiques, puis, en 1988, les travaux de Zaks et Klibanov ont établi que les enzymes ont besoin d'une quantité minimale d'eau pour conserver la conformation nécessaire à leur activité catalytique²⁹. Ces différentes réactions se font plus souvent en présence d'hydrolases et plus particulièrement les lipases qui sont actuellement largement employées, tant à l'échelle du laboratoire qu'à celle de l'industrie.

Les différents types de réactions catalysées par les enzymes :

Estérification d'un acide par un alcool :**Transestérification de l'alcool par un agent acylant :****Hydrolyse d'un ester :****Interestérification de deux esters :**

²⁸ (a) A.M. Klibanov; Chltech., **1986**, 16, 354-359; (b) A.M. Klibanov; J. Am. Chem. Soc., **1986**, 108, 2767-2768

²⁹ A. Zaks, A.M. Klibanov; J. Biol. Chem. **1988**, 263-3194

I-7 : Phénomène du cycle catalytique enzymatique

La catalyse enzymatique³⁰ peut se réaliser dans le milieu aqueux (hydrolyse) comme dans les milieux organiques (transestérification).

Le cycle catalytique enzymatique d'une réaction catalysée se déroule en quatre étapes successives :

- 1- Diffusion : en général, les réactions sont réalisées dans des conditions telles que ces phénomènes ne constituent pas une étape limitante de la vitesse de la réaction.
- 2- Reconnaissance enzyme-substrat : la formation du complexe E-S peut s'expliquer soit par le modèle de simple complémentarité stérique (figure 4), soit par celui de l'ajustement induit (figure 5).

Complémentarité stérique : elle représente le haut degré de spécificité de la reconnaissance d'un substrat par le site actif d'une enzyme. Pour l'expliquer, Emil Fischer suggéra en 1894 que cette reconnaissance résulte d'une très forte complémentarité des structures (mais aussi de la nature chimique des groupements fonctionnels) du substrat et de l'enzyme qui se fixe à lui, comme le sont la clé et la serrure.

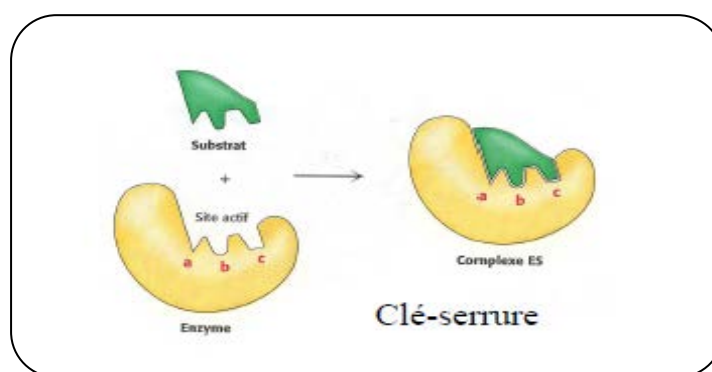


Figure 4 : Modèle de complémentarité stérique.

Ajustement induit : en 1958, Daniel Kosland a proposé ce modèle ; le substrat induit un changement conformationnel du site actif de l'enzyme. Les orbitales des groupements catalytiques et des groupements réactionnels du substrat sont alignées de manière optimale pour permettre l'acte catalytique. A l'inverse, des molécules qui ont une structure analogue à celle du substrat peuvent se fixer mais l'orientation spatiale des groupements ne permet pas l'acte catalytique.

³⁰ L. Juhász, J. Visy, M. Simonyi, K. Krohn, S. Antus; Tetrahedron: Asymmetry, **2002**, 13, 1219-1222.

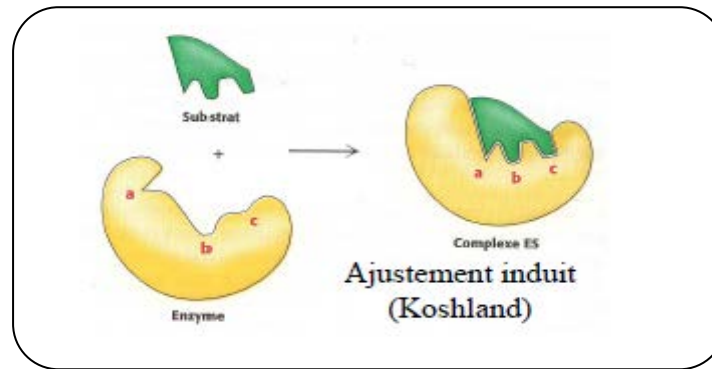


Figure 5 : Modèle de l'ajustement induit

Récemment, une nouvelle suggestion sur la relation du substrat envers le site actif de l'enzyme a été faite par Hames qui suggéra que les enzymes partagent des caractéristiques de ces deux modèles : une dose de complémentarité et une autre de changement conformationnel induit.

- 3- Mécanisme catalytique : l'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction. Ils constituent alors un ou plusieurs interactions réactionnelles instables qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation du produit. C'est la reconnaissance Enzyme-Substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels de l'enzyme et du substrat et facilite la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat.
- 4- Expulsion des produits : une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est ensuite libéré avec une vitesse variable selon la réaction. La figure 6 illustre ces deux étapes.

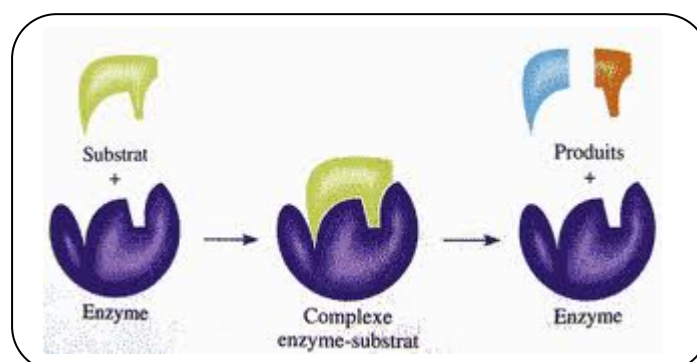


Figure 6 : Mécanisme catalytique et libération du produit.

I-8 : Le site actif

Le mécanisme d'action des lipases fait intervenir une triade catalytique située à l'intérieur du site actif³¹. La catalyse se fait via cette triade qui est constituée de trois groupements fonctionnels qui proviennent de l'acide aspartique (ou l'acide glutamique), de l'histidine et de la sérine.

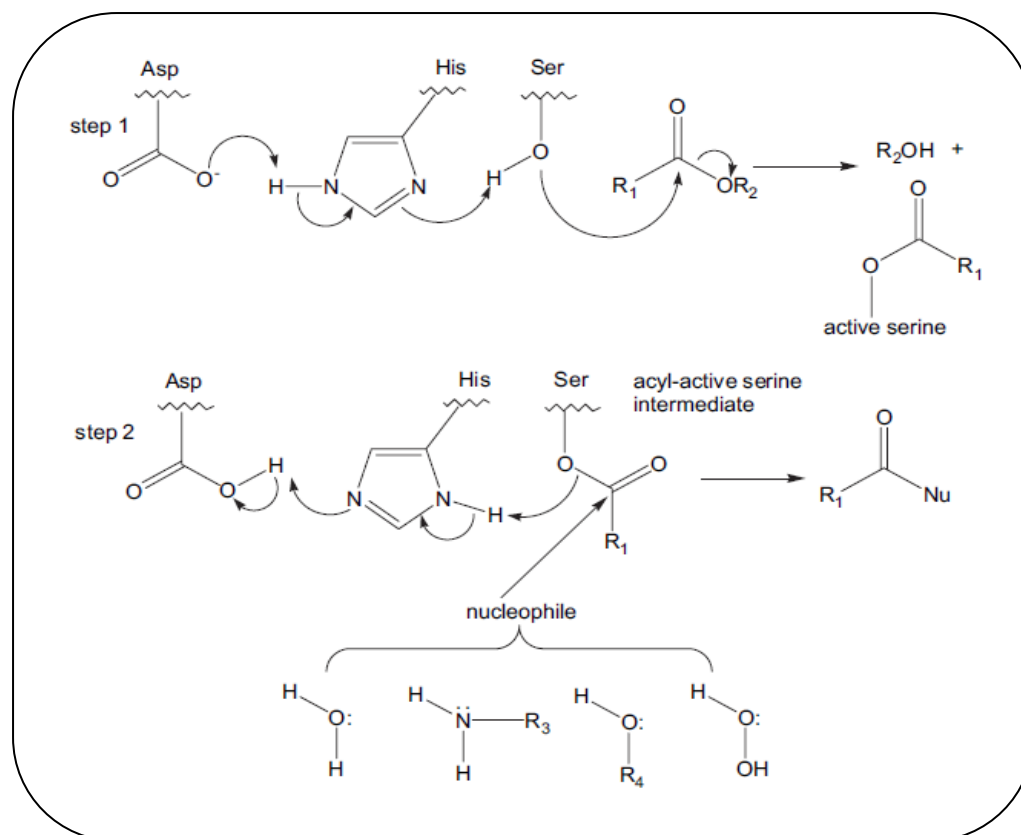


Schéma 5: Mécanisme réactionnel de la triade catalytique

L'arrangement de ces trois groupes cause une diminution de la valeur du pK du groupement hydroxyle de la sérine ce qui mène à une attaque nucléophile du groupement carbonyle du substrat R_1COOR_2 dans une première étape. Ainsi, la moitié acyle du substrat est liée d'une manière covalente dans l'enzyme en formant le complexe acyl-enzyme avec libération de l'alcool R_2OH . Dans une deuxième étape, si par exemple le nucléophile est l'eau, ce dernier attaque le complexe intermédiaire acyl-enzyme générant ainsi l'enzyme et l'acide carboxylique R_1COOR_2 .

Selon le milieu utilisé (aqueux ou organique), d'autres nucléophiles peuvent intervenir, ce qui conduit à plusieurs transformations possibles.

³¹ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas; Hydrolyse in Organic Synthesis, Wiley-VCH, 1999.

I-9 : Conclusion

L'application des enzymes en synthèse organique, particulièrement, la synthèse des composés optiquement purs s'est largement étendue ces deux dernières décennies³². Les enzymes hydrolytiques telles que les lipases sont fréquemment utilisées à raison de leur compatibilité avec une large gamme de substrats et présentent souvent une grande sélectivité³³ et plusieurs avantages, ce qui leur permet d'être utilisées dans différents domaines.

Les hydrolases catalysent les réactions d'hydrolyse ainsi que les réactions d'estérification, de transestérification et d'interestérification dans les solvants organiques, ce sont les enzymes les plus faciles à utiliser et constituent de nouveaux outils pour la synthèse et la catalyse organique.

³² (a)J.B. Jones;Tetrahedron , **1986**, 42, 3351-3403, (b)K. Faber; Biotransformations in Organique Chemistry, edn 4. Berlin: Springer; **2000**.

³³ U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas: Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotranformations. Weinhein/ Wiley-VCH; **1999**.

Première partie

Deuxième chapitre

Dédoublement cinétique enzymatique

II-1 : Introduction

La chimie organique connaît depuis quelques années une avancée remarquable dans le domaine de la synthèse de molécules chirales optiquement pures et ce qu'il s'agisse de la synthèse asymétrique, de la transformation hautement stéréosélective de synthons chiraux ou du dédoublement cinétique en présence de catalyseurs chiraux. L'une des préoccupations des chimistes consiste à préparer des molécules de façon la plus stéréosélective possible vu leur intérêt croissant dans tous les domaines.

Depuis quelques années, le dédoublement (résolution) cinétique enzymatique est la méthode de choix pour la séparation des molécules racémiques.

II-2 : Définition du dédoublement

Le dédoublement est la séparation des deux énantiomères d'un racémique qui à l'exception du dédoublement spontané, se fait par l'intervention d'un auxiliaire chiral qui peut être un catalyseur chiral. Il en existe quatre types :

II-2-1 : Le dédoublement spontané

Les cristaux racémiques qui existent sous forme de conglomerats présentent des structures macroscopiques d'énantiomères objets-images que l'on peut séparer mécaniquement à l'aide d'un microscope.

Cette séparation manuelle des cristaux du conglomerat se nomme "tri", et c'est ainsi que Pasteur a dédoublé le tartrate d'ammonium³⁴.

II-2-2 : Le dédoublement par formation de diastéréoisomères

La réaction d'un racémique (dl) donné avec une substance énantiopure (D) permet de créer les conditions de dédoublement énantiomérique. Les diastéréoisomères se forment et ils sont séparables par leurs différences de propriétés physiques. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. (figure 7).

Ce type de dédoublement se fait en trois étapes :

- 1- la formation de diastéréoisomères par formation des sels, complexes cristallins, complexes de coordination et les composés covalents.

³⁴ Réf 16 : L. Pasteur; Ann, Chim et Phys., **1848**, 24, 442

- 2- La séparation des distéréoisomères par cristallisation, distillation ou chromatographie.
- 3- Le clivage et la récupération de la substance énantiopure par voie chimique, traitement acide ou basique ou par échange de ligands.

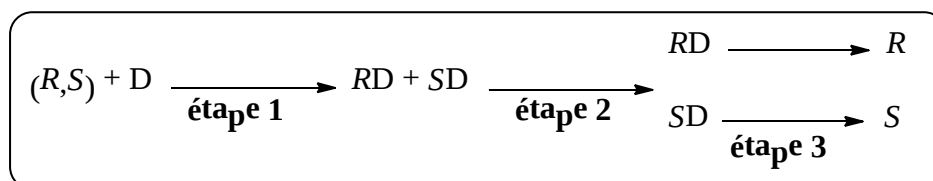


Figure 7: Procédure de dédoublément par diastéréoisomères

II-2-3 : Le dédoublément chromatographique

La séparation des énantiomères par les techniques chromatographiques est basée sur la transformation du mélange racémique d'énantiomères en diastéréo-isomères à l'aide d'une copule chirale énantiomériquement pure. Les différences de polarité, de point d'ébullition et de solubilité de ces diastéréo-isomères vont, en général, permettre leur séparation par voie chromatographique. L'élimination de la copule à l'aide de réactions chimiques simples et réversibles (hydrolyse d'esters ou d'amides par exemple) conduit au dédoublément des énantiomères. Une autre stratégie consiste à utiliser une colonne chromatographique contenant une phase chirale énantiomériquement pure. Les interactions diastéréo-isomériques entre les énantiomères à séparer et la phase de la colonne induisent des vitesses d'élution différentes. Cette approche est surtout utilisée à des fins analytiques.

II-2-4 : Le dédoublément cinétique

Ce dédoublément cinétique est une réaction chimique d'un racémique dans laquelle un énantiomère réagit plus vite que l'autre. La différence de vitesse vis-à-vis des énantiomères découle d'une différence entre les énergies d'activation requises pour atteindre les états de transitions respectifs des énantiomères du substrat de la réaction.

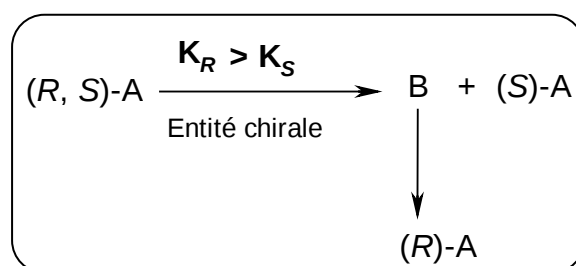


Schéma 6 : Principe d'un dédoublément cinétique.

K_R et K_S étant les constantes de vitesse respectives des énantiomères R et S , dont l'énantiomère R réagit plus vite que l'énantiomère S , ce qui implique qu'il se transforme en produit de la réaction alors que l'énantiomère S reste sous forme de substrat.

II-2-4-1 : Le dédoublément cinétique enzymatique

En 1902, Henri et A. Brown suggérèrent indépendamment que la formation d'un complexe enzyme – substrat est un intermédiaire obligatoire de la réaction enzymatique, le catalyseur dans ce cas étant une enzyme. En se basant sur cette suggestion, L. Michaelis et M. Menten redécouvrirent en 1913, et établirent la relation suivante que l'on connaît actuellement sous le nom de l'équation de Michaelis-Menten :

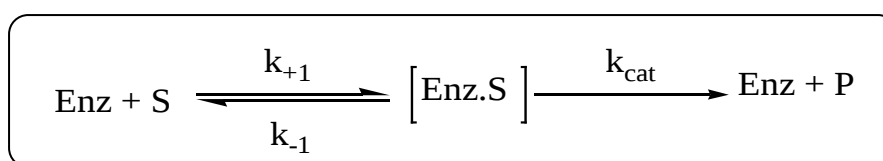


Schéma 7 : Réaction enzymatique.

Où Enz : Enzyme, S : Substrat, P : Produit, [Enz.S]: Complexe Enzyme- Substrat.

K_{+1} , K_{-1} , K_{cat} : Constantes des vitesses des différentes étapes de la réaction.

➤ Paramètres de Michaelis-Menten

K_{cat} : la constante de vitesse de l'étape la plus lente de la réaction enzymatique pour la transformation chimique du complexe E-S en E-P. Cette constante est aussi appelée « turnover » parce qu'elle représente le nombre de molécules du substrat qui sont converties en produit par le site actif de l'enzyme par unité de temps.

K_{+1} : la constante d'association en complexe Enz-S.

K_{-1} : la constante de dissociation du complexe Enz-S en Enz et S.

K_M : est la constante Michaelis-Menten.

$$K_M = (k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_{+1}$$

K_{cat} / K_M : cette valeur varie selon le substrat et son affinité pour l'enzyme, le ratio est aussi appelé la constante de spécificité et peut être considéré comme un indice de l'efficacité de la réaction de l'enzyme libre avec un substrat donné.

Le facteur de sélectivité (E) est exprimé par la relation ci-dessous:

$$E = K_{\text{catR}} K_{\text{MS}} / K_{\text{MR}} K_{\text{catS}}$$

II-3 : Paramètres d'évaluation de la sélectivité dans une réaction de dédoublément cinétique enzymatique irréversible

Pour évaluer l'efficacité d'un dédoublément cinétique enzymatique, interprétée par le terme de « sélectivité », H. B Kagan et J. C. Fiaud³⁵ ainsi que Sih³⁶ et Coll ont décrit les relations mathématiques suivantes :

L'excès énantiomérique (ee) : détermine la pureté optique ou l'enrichissement d'une substance donnée en un énantiomère.

$$ee = \frac{|R - S|}{|R + S|}$$

La conversion (C) : représente le taux d'avancement de la réaction.

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad 0 < C < 1$$

Le facteur de sélectivité (E) : montre l'affinité de l'enzyme envers l'un des énantiomères d'où sa pureté énantiomérique.

Pour le produit :

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

³⁵ H.B. Kagan, J.C. Fiaud. Kinetic Resolution, Topics in Stereochemistry. E.L.Eliel, S.H. Wiley & Sons, Inc. New-York. **1988**, 18, 249-330.

³⁶ C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih. J. Am. Chem. Soc. **1982**, 104, 7294.

Pour le substrat :

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

Lors d'un dédoubllement cinétique enzymatique, le cas idéal est d'avoir une pureté optique optimale des deux énantiomères à une conversion de 50%, et on peut ainsi dire que la réaction est sélective. Dans le cas contraire, où la sélectivité est médiocre une amélioration du système réactionnel est nécessaire.

Pour qu'un système réactionnel présente les caractéristiques requises pour une résolution cinétique, il est utile d'étudier, au préalable, la variation des excès énantiomériques en fonction de la conversion dans le cas d'une réaction irréversible. Deux cas se présentent :

Facteur de sélectivité faible ($E < 10$) : l'énantiomère qui ne réagit pas peut être obtenu avec un enrichissement énantiomérique élevé à une conversion élevée. Tandis que l'autre énantiomère est obtenu avec un excès énantiomérique faible (figure 8).

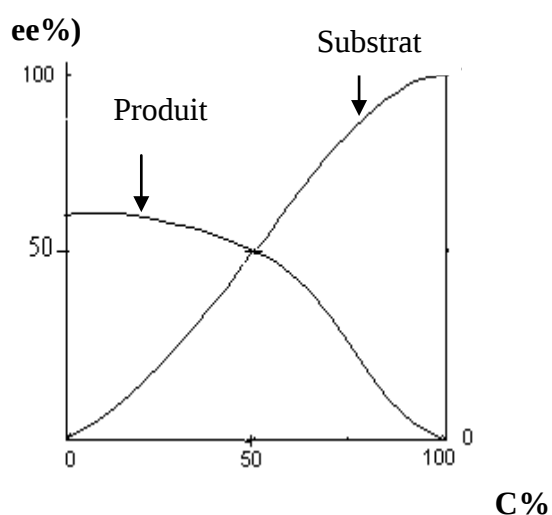


Figure 8 : Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E < 10$.

Facteur de sélectivité élevé ($E \geq 100$) : dans ce cas, les deux énantiomères sont obtenus avec une grande pureté optique en un seul dédoubllement (figure 9).

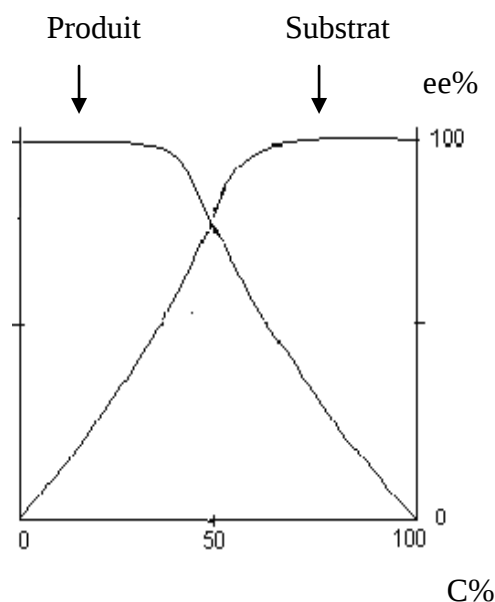


Figure 9 : Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E \geq 100$.

II-4 : Les modèles empiriques de prédiction

Depuis une vingtaine d'années, les réactions de dédoublements cinétiques enzymatiques ont été beaucoup étudiées. Il est maintenant possible de prédire la sélectivité des enzymes face à certains types de substrats, mais pas leurs degrés d'affinité.

Le premier modèle décrit est celui de Prélog³⁷, qui, prédit l'énantiosélectivité de l'alcool déhydrogénase de levure lors de la réduction des cétones. Ce modèle est basé sur la taille des substituants situés de chaque côté du groupement carbonyle. Les autres modèles sont basés sur les poches, qui donnent la taille et la forme des molécules tolérantes le site actif. Tels que, le modèle de Jones de l'estérase de foie de porc (PLE)³⁸, de la subtilisine³⁹ et plusieurs d'autres lipases⁴⁰. Ensuite, Kazlauskas a décrit sa règle empirique concernant la reconnaissance chirale entre les lipases et les alcools secondaires⁴¹. Basée sur les différentes tailles des deux poches qui constituent le site actif de la lipase, cette règle prédit l'énantiopréférence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* envers certains substrats.

³⁷V. Prelog. Pure Appl. Chem. **1964**, 9, 119.

³⁸(a) T. Lee, R. Sakowicz, V. Martichonoc, J.K. Hogan, M. Gold, J.B. Jones. Acta Chem. Scand. **1996**, 50, 697–706. (b) Ghanem ;Tetrahedron, **2007**, 63,1721-1754.

³⁹P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov. J. Am. Chem. Soc. **1991**, 113, 3166

⁴⁰(a) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, J. Org. Chem. **1997**, 62, 6268. (b) K. Naemura, R. Fukuda, M. Konishi, K. Hirose, Y. Tobe. J. Chem. Soc., Perkin Trans.1 **1994**, 1253. (c) J.M. Moreno, A. Samozá, C. del Campo, E.F. Liama, J.V. Sinisterra. J. Mol. Catal. A: Chem. **1995**, 95,179–192.

⁴¹R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, J.Org. Chem. **1991**, 56, (2656–2665

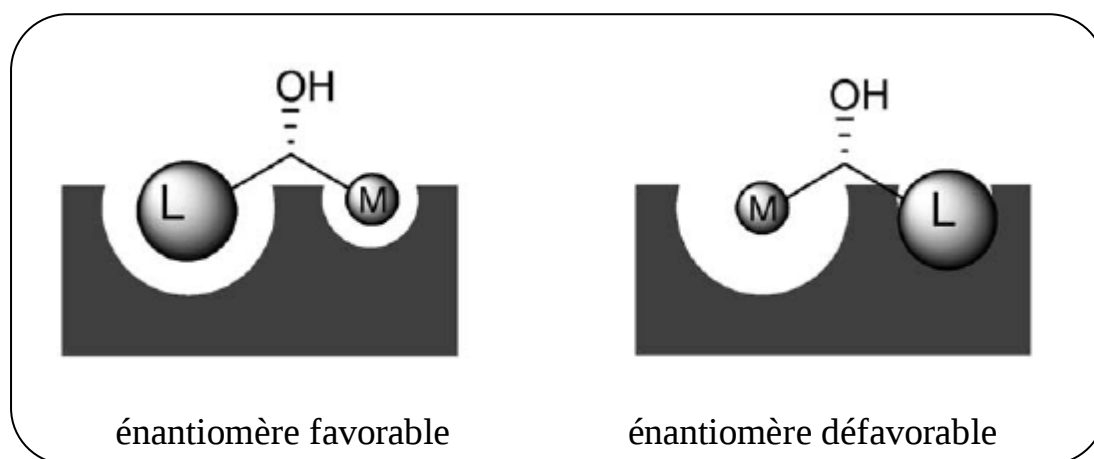


Figure10 : Règle de Kazlauskas

Ainsi, si le groupe de grande taille (L) a une priorité par rapport au groupe d'une taille moyenne (M), le (R)-alcool réagit pour donner l'ester correspondant. La même stéréopréférence a été observée pour les réactions d'hydrolyse des esters, où dans ce cas, le produit (R)-alcool est obtenu. Cette règle est applicable aux alcools primaires, à condition qu'ils n'aient pas un atome d'hydrogène sur le centre chiral.

II-5 : Paramètres influant sur la sélectivité de la réaction du dédoublement cinétique enzymatique

De nombreux paramètres peuvent influencer sur la réactivité et la sélectivité de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique (hydrolyse, acylation) notamment, la nature de l'enzyme, la structure du substrat, la température, le solvant et le co-solvant organique ainsi que le pH.

II-5-1 : Influence de la nature de l'enzyme

La sélectivité est liée directement à la nature de l'enzyme qui a comme propriété la stéréosélectivité, bien que cette propriété ne permette pas de prédire que telle enzyme est adéquate pour tel substrat. Pour cela, plusieurs travaux ont été consacrés. Dans ce contexte, nous citons l'exemple suivant qui montre l'influence de la nature de l'enzyme sur la réaction d'hydrolyse enzymatique du hydroxyacétal⁴² selon le schéma 8.

⁴² R. Chênevert, S. Gravil, J. Bolte; Tetrahedron: Asymmetry, **2005**, 16, 2081-2086

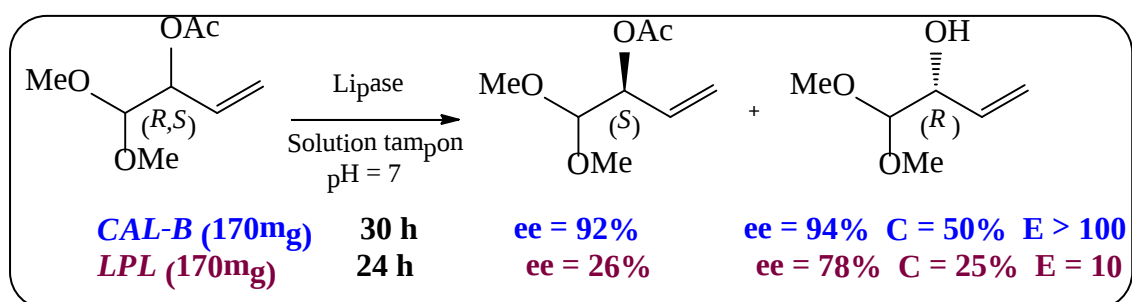


Schéma 8: Influence de l'enzyme sur l'hydrolyse enzymatique du hydroxyacétal dans une solution a pH neutre

La lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) est la meilleure lipase utilisée pour la résolution du 1,1-diméthoxybut-3-en-2-ester en terme de pureté optique obtenue pour le produit (E>100%) ou en terme de taux d'avancement de la réaction d'hydrolyse enzymatique (C=50%).

Koul⁴³ et coll ont montré l'influence de la nature de l'enzyme sur la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'acétate racémique secondaire, 1-(6-méthoxy-2-naphthyl) éthanol, utilisé comme auxiliaire chiral dans la synthèse des composés optiquement purs⁴⁴, ainsi que dans l'industrie chimique fine⁴⁵, dans la solution tampon d'après le schéma 9.

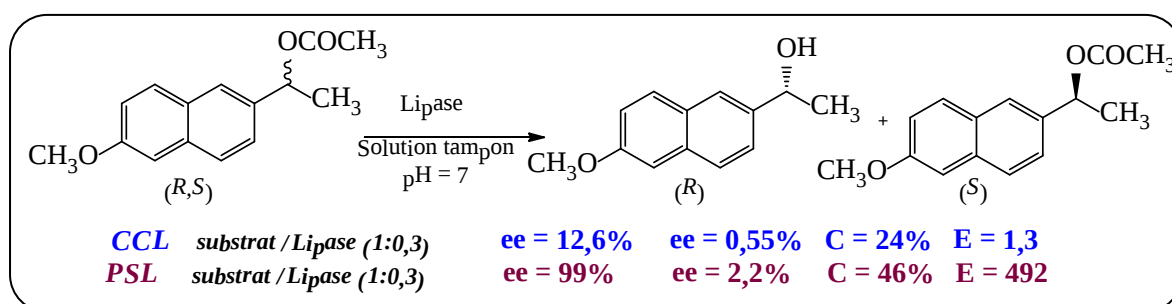


Schéma 9: Influence de la lipase sur la réaction d'hydrolyse enzymatique dans un milieu tampon

La meilleure résolution de cet acétate se fait avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL) (E=492) et qui donne le produit énantiomériquement pur (ee >99%) à une conversion égale (C=46%) par rapport à la lipase de *Candida cylindracea* (CCL), ceci est dû à la différence remarquable des vitesses des deux énantiomères.

⁴³ S. Koul, J. L. Koul, B. Singh, M. Kapoor, R. Parshad, K. S. Manhas, S. C. Taneja, G. N. Qazi; Tetrahedron: Asymmetry, **2005**, 16, 2575-2591.

⁴⁴ M. C. Millis ; J. Chem. Soc. PTI, **1999**, 1765.

⁴⁵ S. C. Strinson; Chem. Eng. News, **1992**, 46.

Par ailleurs, Ghanem⁴⁶ et coll ont montré l'influence de la nature de l'enzyme sur la réaction de transestérification enzymatique de l'alcool allylique secondaire, trans-4-phényl-3-butène-2-ol dans le toluène avec l'acétate d'isopropényle comme donneur d'acyle à 40°C d'après le schéma 10:

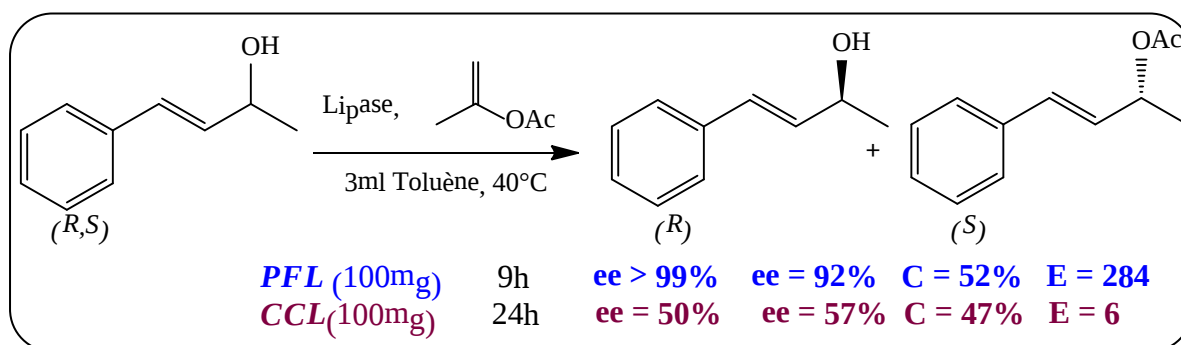


Schéma 10: Influence de la lipase dans une réaction d'acylation

La meilleure résolution du trans-4-phényl-3-butène-2-ol est obtenue avec la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (E=284) qui a donné d'excellents excès énantiomériques (ee>92%) pour une conversion égale à (C=52%).

II-5-2 : Influence de la nature du substrat

La structure du substrat peut influencer d'une façon remarquable sur la sélectivité de l'enzyme. Bora⁴⁷ et coll ont étudié l'effet du substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique des acrylates des alcools secondaires via la lipase d'*Amano AK* dans une solution tampon comme le montre le schéma 11.

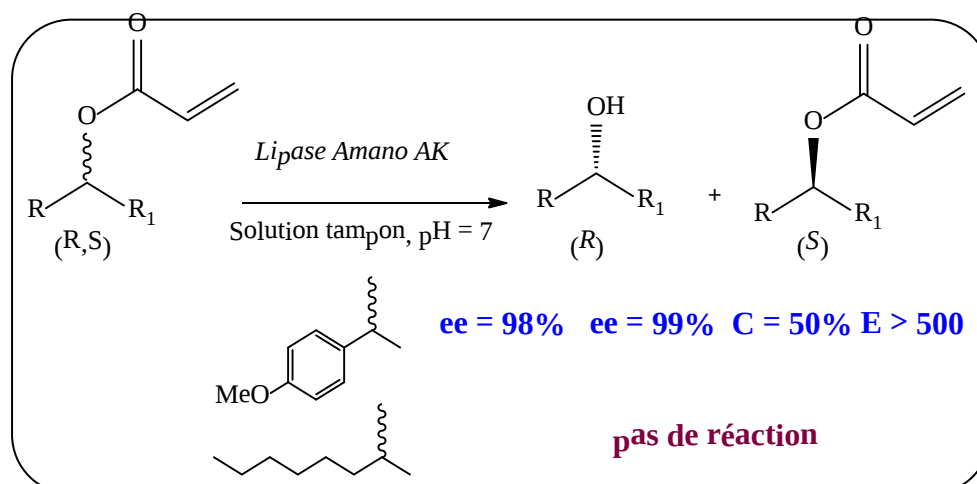


Schéma 11 : Influence de la nature du substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique

⁴⁶A. Ghanem, V. Schurig; Tetrahedron: Asymmetry, **2003**, 14, 57-62.

⁴⁷P. P. Bora, G. Bez, J. M. H. Anal; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2011**, 72, 270-275.

L'exemple montre que la lipase utilisée a une grande affinité pour les substrats cycliques ($E > 500$) contrairement aux substrats aliphatiques. L'hydrolyse des acrylates dure beaucoup comparativement aux alcools secondaires, ce qui pourrait être dû à la grande hydrophobicité de leurs esters qui les rend peu réactifs.

L'exemple donné par Kometani⁴⁸ et coll a permis de montrer l'effet positif de l'aromaticité du cycle. Le noyau benzylique possède des interactions électroniques π - π ou π -CH entre les acides aminés du site actif. Ces interactions électroniques exercent un grand effet stérique sur l'obtention de la conformation favorable du site actif de la lipase *Pancreatic du porc* (PPL), schéma 12.

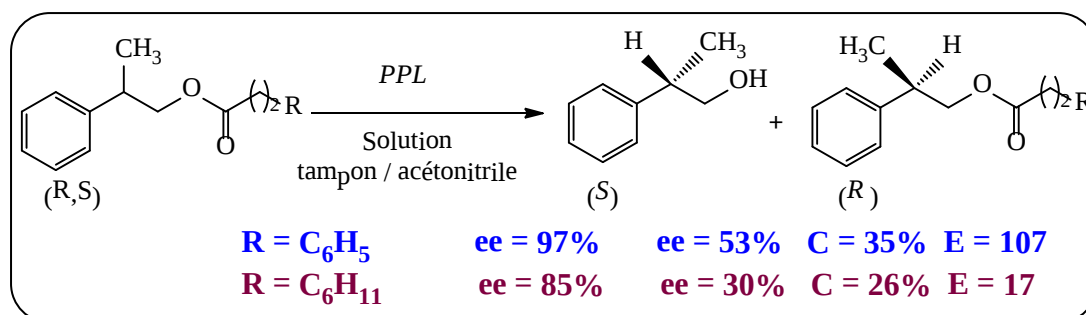


Schéma 12: Influence du substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique

Un autre exemple⁴⁹ illustre l'influence du substrat sur la réaction d'acylation enzymatique. Ils ont montré que la position du cycle aromatique par rapport au centre asymétrique est importante et ce lors d'une transestérification du 2-méthyl-3-phényl-1-propanol, alcool primaire, en présence de la lipase de *Burkholderia cepacea* (BCL) et l'acétate de vinyle utilisé en tant qu'agent acylant, le schéma-13 - illustre cet exemple.

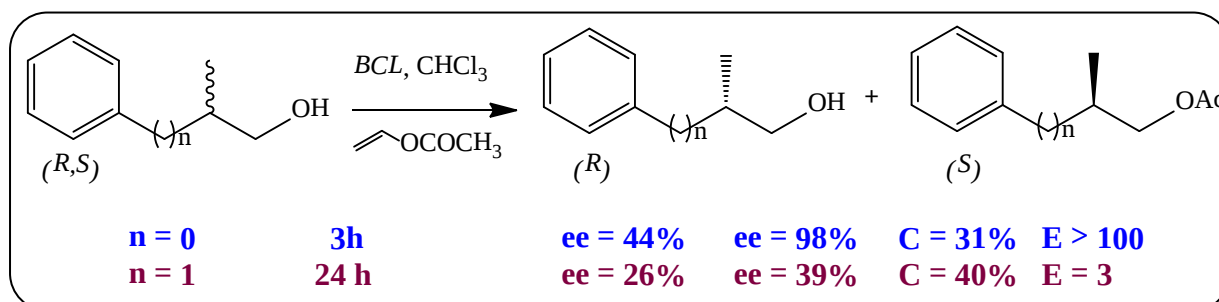


Schéma 13: Influence de substrat sur la réaction d'hydrolyse enzymatique

⁴⁸ M. Goto, M. Kawasaki, T. Kometani; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2000**, 9, 245-2250.

⁴⁹ E. Santaniello, S. Casati, P. Ciuffreda, G. Meroni, A. Pedretti, G. Vistoli; Tetrahedron: Asymmetry, **2009**, .20, 1833-1836.

Les résultats montrent l'influence de la structure spécifique des deux substrats ($n=0$ et $n=1$) où le noyau phényle est en position fermée par rapport au carbone stéréogène ($n=1$) et/ ou il fait partie de ce dernier ($n=0$). Les interactions π - π du substrat ($n=0$) sont clairement prononcées dans le site actif de la lipase interprété par une sélectivité élevée ($E>100$) après 3heures de réaction.

II-5-3 : Influence de la température

Les réactions catalysées par les enzymes sont sensibles à des modifications de température. L'étude de l'influence de la température sur l'énantioselectivité de la réaction d'hydrolyse enzymatique a été faite sur l'ester (*R,S*)-1,2-isopropylidene dans un milieu bi-phasique en présence de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) par Machado⁵⁰ et coll suivant le schéma 14.

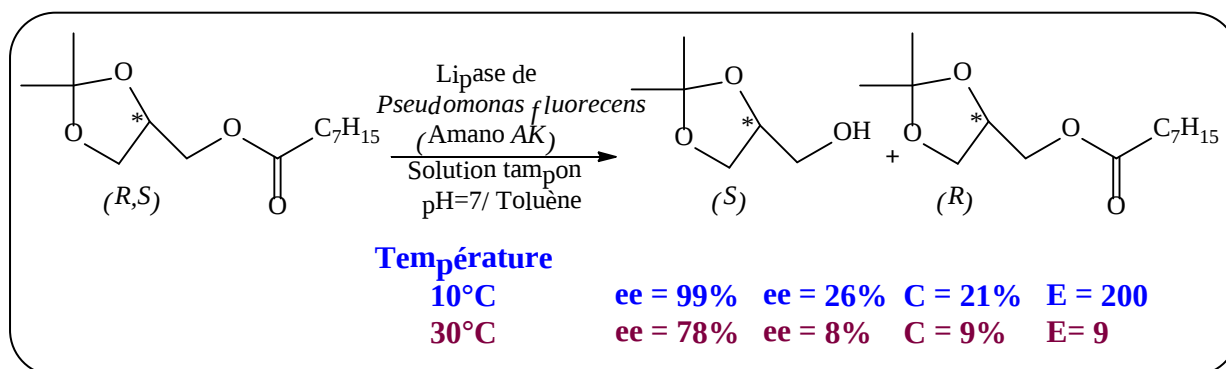


Schéma 14: Influence de la température sur la réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu bi-phasique (Solution tampon-Toluène)

Le résultat de cette étude montre que le produit alcool de configuration (S) est obtenu optiquement pur (ee = 99%) à une température égale à 10°C, la sélectivité ($E=200$) étant meilleure, qu'à 30°C où elle chute à ($E=9$). Il apparaît que la stabilité de l'enzyme est augmentée à basse température.

De leur part, Aoyagi⁵¹ et coll ont fait l'hydrolyse enzymatique de l'ester 2-butyroxy-2'-hydroxy-1-1'-binaphthyl dans un solvant organique le cyclopentyl méthyl ether (CPME) catalysé par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) et en présence du n-butanol afin de tester l'influence de la température sur cette hydrolyse enzymatique (schéma 15).

⁵⁰ A.C. O. Machado, A. A. T. da Silva, C. P. Borges, A. B. C. Simas, D. M. G. Freire; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2011**, 69, 42-46.

⁵¹ N. Aoyagi, N. Ogawa, T. Izumi; Tetrahedron Letters, **2006**, 47, 4797-4801.

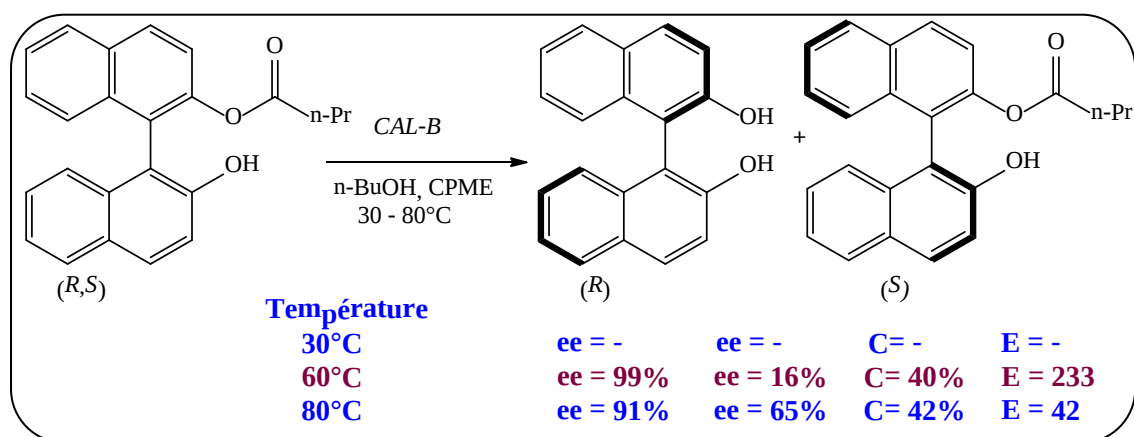


Schéma 15 : Influence de la température sur la réaction d'acylation enzymatique

Les résultats montrent clairement l'influence de la température sur la réaction de l'hydrolyse enzymatique. La meilleure sélectivité ($E > 200$) est obtenue à 60%, pas de réaction à 30°C et une faible sélectivité à 80°C.

Un autre exemple⁵² montre que les lipases peuvent exprimer une grande sélectivité à une haute température (90°C), ceci est illustré pour l'acylation du 1,1-diphényl-2-propanol (schéma 16).

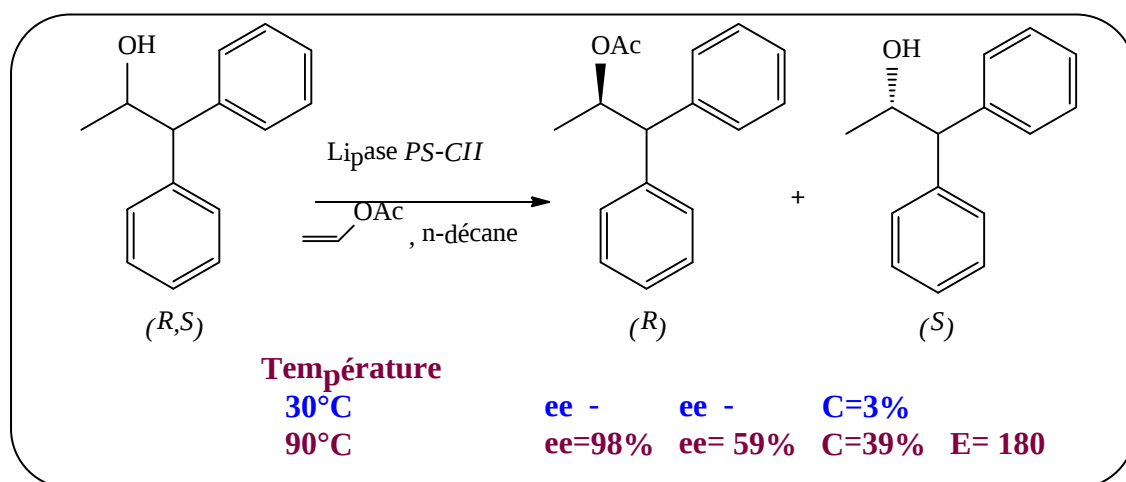


Schéma 16: Influence de la température sur la réaction de transestérification enzymatique

⁵² E. Tadashi, K. Masafumi, K. Toshinobu, S. Takashi ; Tetrahedron: Asymmetry, **2003**, 14, 3943-3947.

La conversion à 30°C est égale à 3% après une heure de temps, et elle augmente avec l'augmentation de la température où elle atteint (C=39%) à 90°C. La meilleure sélectivité est obtenue à cette haute température (E>180).

II-5-4 : Influence du pH

Paomo⁵³ et coll ont étudié l'effet du pH sur la réaction d'hydrolyse enzymatique du glycidyl butyrate racémique dans un milieu bi-phasique catalysée par la lipase *Pancreatique de porc* immobilisée (PPL) (schéma 17).

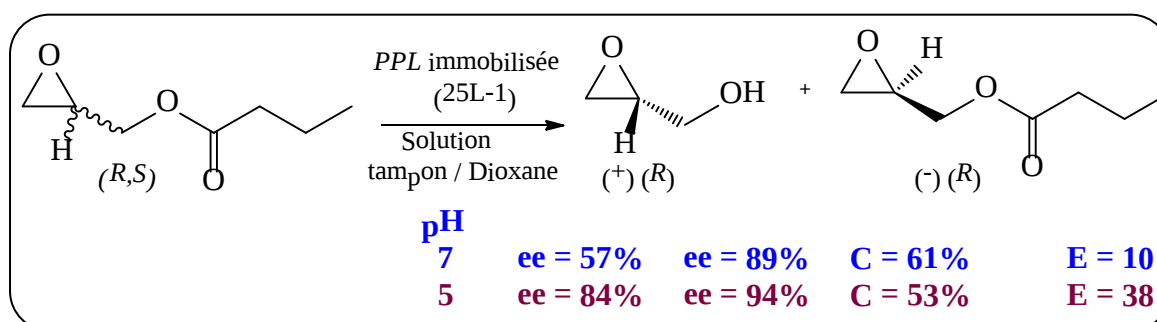


Schéma 17: Effet du pH sur la réaction d'hydrolyse enzymatique dans un milieu bi-phasique (Solution tampon-Dioxane)

A pH=5, les deux énantiomères sont obtenus avec des excès énantiomériques élevés (ee>84%), la sélectivité obtenue (E=38) est modérée/et est meilleure que celle obtenue à pH=7. L'hydrolyse enzymatique du (R) (-) glycidyl butyrate donne l'énantiomère (S)-glycidol avec la même pureté optique.

L'influence de ce même paramètre a été observée par l'équipe d'Utaka⁵⁴ (Schéma 18). La résolution enzymatique de l'ester 2-acyloxy-2-(pentafluorophényl)acétonitrile via la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisée (LIP) dans un système solution tampon / solvant organique (3-pentanone) montre que l'énantioselectivité de cette résolution dépend du pH (Figure 11).

⁵³ J. M. Palomo, R. L. Segura, C. Mateo, M. Terreni, J. M. Guisan, R. F-Lafuente; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 869-874.

⁵⁴ T. Sakai, Y. Miki, M. Nakatani, T. Ema, K. Uneyama, M. Utaka ; *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 5233-5236.

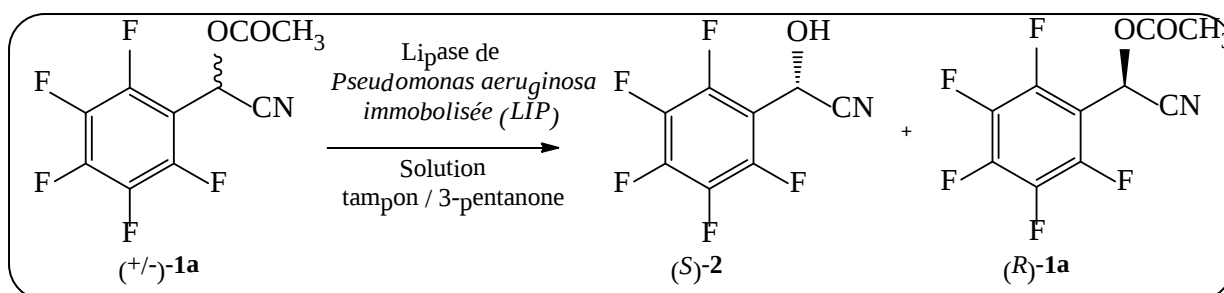


Schéma 18: Influence du pH sur la réaction de l'hydrolyse enzymatique dans un milieu bi-phasique (Solution tampon-3-pentanone)

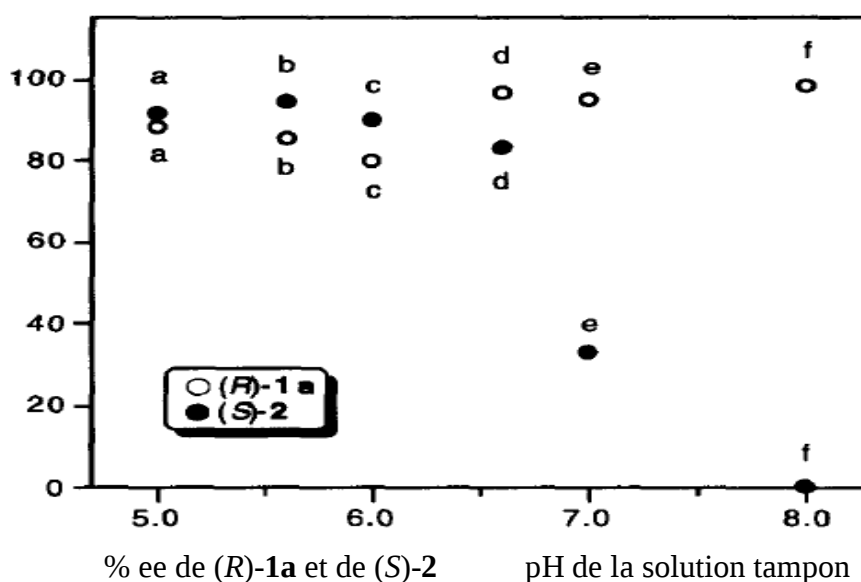


Figure 11: la corrélation entre l'excès énantiomérique $(R)\text{-1a}$, $(S)\text{-2}$ et le pH (pH 5,0 – 8,0)-3-pentanone dans la résolution via la lipase LIP.

La figure -11- montre que l'excès énantiomérique de l'énantiomère produit $(S)\text{-2}$ diminue d'une façon remarquable par le changement du pH de 5 à 8, tandis que l'énantiomère $(R)\text{-1a}$ préserve sa pureté optique. Dans les conditions de la réaction et à pH entre 6,5 et 8,0 des traces d'aldéhydes sont détectées par RMN du proton. Les bons excès énantiomériques des deux énantiomères sont obtenus à pH de 5,6. Le produit alcool de la réaction est obtenu énantiomériquement pur (ee > 99%) après sa recristallisation dans l'éther de pétrole.

II-5-5 : Influence du solvant et le co-solvant organique

Mené par le fait que la réaction d'hydrolyse enzymatique peut se faire dans différents milieux aqueux, Kazlauskas⁵⁵ et coll ont étudié l'influence de ce paramètre sur l'hydrolyse d'un ester racémique concernant un alcool primaire le 2-méthyl-3-phényl-1-propanol, catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* (*PCL*) de Genzyme Diagnostics (GPCL), les auteurs ont utilisé trois solvants, à savoir, le n-propanol / solution tampon, le t-butyl méthyl ether / solution tampon et Solution tampon. Le schéma 19 illustre cette étude.

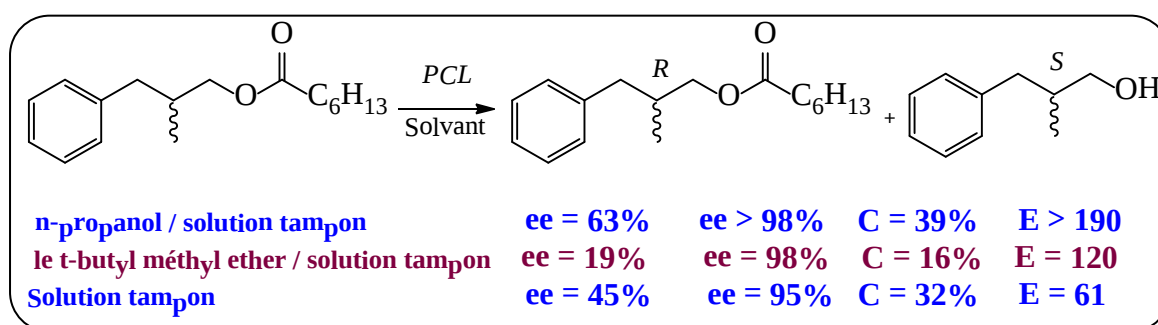


Schéma 19: l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un acétate primaire

L'influence du solvant sur l'énantiosélectivité implique un phénomène d'activation interfaciale d'après Kazlauskas. La sélectivité de la *PCL* vers le substrat est modérée dans la solution tampon ($E = 61$). Lorsque le t-butyl méthyl éther et le n-propanol sont ajoutés séparément comme une phase organique. La sélectivité augmente de ($E = 120$) avec le t-butyl méthyl éther (TBME) à ($E > 190$) avec le n-propanol respectivement.

Depuis la découverte de la réactivité des enzymes dans les milieux organiques, leur potentiel d'utilisation en synthèse organique s'est étendu et particulièrement, lorsqu'il a été prouvé que la nature du solvant peut influencer la sélectivité de l'enzyme⁵⁶ en améliorant les interactions. La résolution du (+/-)-trans-sobrerol est réalisée par une transestérification avec l'acétate de vinyle en présence de la lipase immobilisée de *Pseudomonas sp* selon le schéma 20:

⁵⁵ A. Mezzetti, C. Keith, R J. Kazlauskas; Tetrahedron: Asymmetry, **2003**, 14, 3917-3924.

⁵⁶ R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva; Tetrahedron: Asymmetry, **1991**, 2, 931-938.

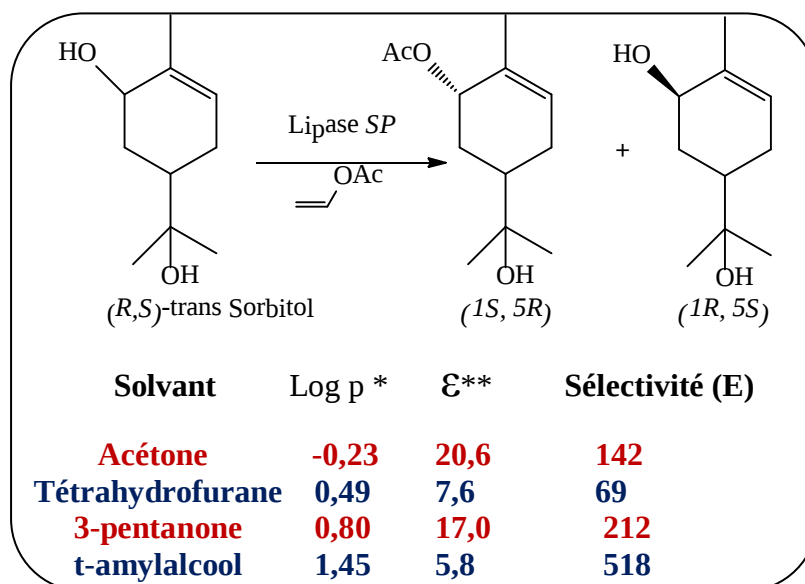


Schéma 20: l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un ester secondaire

*log p = L'hydrophobicité.

** ϵ = constante diélectrique.

Les résultats montrent que le t-amylalcool est le solvant préféré avec une sélectivité extrêmement grande ($E=518$) pour une conversion de 50% et les excès énantiomériques du produit et du substrat résiduel sont égaux à 100%.

Plusieurs tentatives pour trouver une corrélation entre le changement de la sélectivité de la lipase de *Pseudomonas sp* et les propriétés physico-chimiques telles que l'hydrophobicité et la constante diélectrique concernant ce substrat n'ont pas été concluantes.

Un autre exemple⁵⁷ illustre l'influence du solvant et du co-solvant organique dans la réaction d'hydrolyse du phénylglycidate via la lipase d'*Aspergillus niger* (Lipase AS, Amano). La grandeur et l'inflexibilité du groupement iodure le rend inaccessible dans le site actif (Schéma 21).

⁵⁷ N. Anand, M. Kapoor, S. Koul, S C. Taneja, R L. Sharma, G N. Qazi; Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 3131-3138.

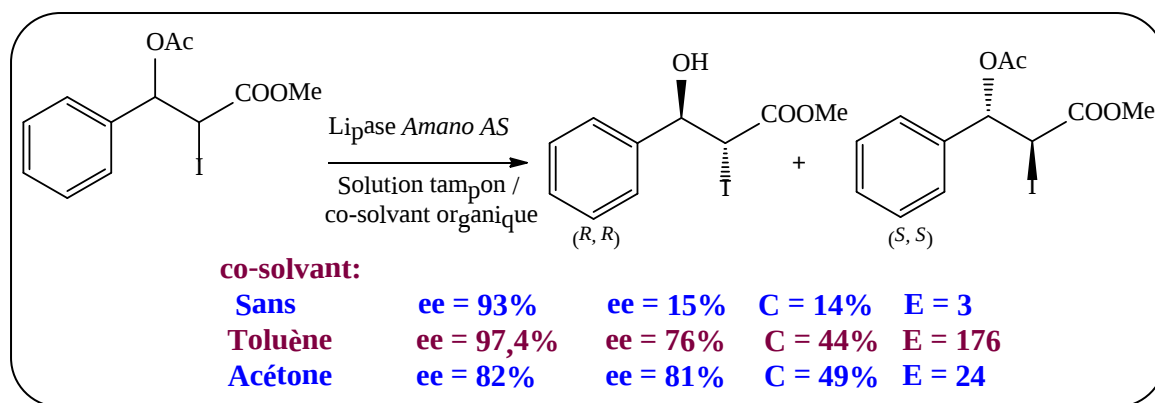


Schéma 21: l'influence du solvant sur la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un ester secondaire

Les résultats montrent que l'hydrolyse dans la solution tampon donne une faible conversion, (C = 14%) avec une sélectivité (E = 32) comparativement à celle avec le toluène comme co-solvant (C = 44%, E = 176). L'utilisation de l'acétone, augmente le taux d'avancement de la réaction d'hydrolyse enzymatique, (C = 49%) mais avec une faible sélectivité, (E = 24).

II-6 : Réaction de transestérification enzymatique

La réaction de transestérification enzymatique est très intéressante pour la résolution des alcools racémiques. Elle a lieu dans des solvants organiques. Le principe de cette résolution est basé sur une estérification énantiosélective d'un énantiomère du mélange racémique de l'alcool par un agent acylant en présence d'une lipase. L'agent acylant est un paramètre qui joue un rôle important pour ce type de réaction, parmi d'autres tels que, la nature de l'enzyme, le substrat, la température et le solvant cité auparavant, dans le cas général, d'un dédoublement cinétique enzymatique.

A: Influence de la nature de l'agent acylant

Plusieurs travaux ont montré l'influence de l'agent acylant sur l'énantiosélectivité de la réaction de transestérification enzymatique. Ces travaux ont été entrepris principalement pour étudier l'influence de la partie acyle de l'agent acylant ainsi que de la partie alcool de l'ester concernant les esters d'énols d'une part et l'anhydride succinique d'autre part, comme il sera illustré ci-dessous par des exemples choisis de la littérature.

L'intérêt d'utiliser des esters d'énols⁵⁸ et des anhydrides d'acides⁵⁹ est de permettre l'établissement d'une réaction irréversible.

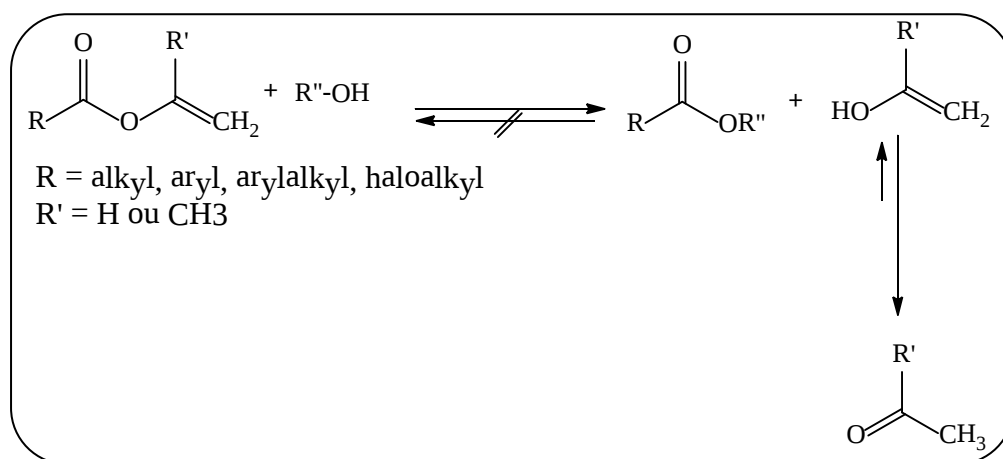


Schéma 22: Réaction de transestérification avec les esters d'énols

L'intérêt de l'anhydride d'acide étant de récupérer les deux énantiomères dans deux phases différentes par simple extraction. L'énantiomère produit est récupéré sous forme d'ester acide dans la phase aqueuse et l'énantiomère alcool restant se trouvant dans la phase organique. Cela permet d'éviter la séparation par la chromatographie sur colonne et l'utilisation importante de solvants organiques.

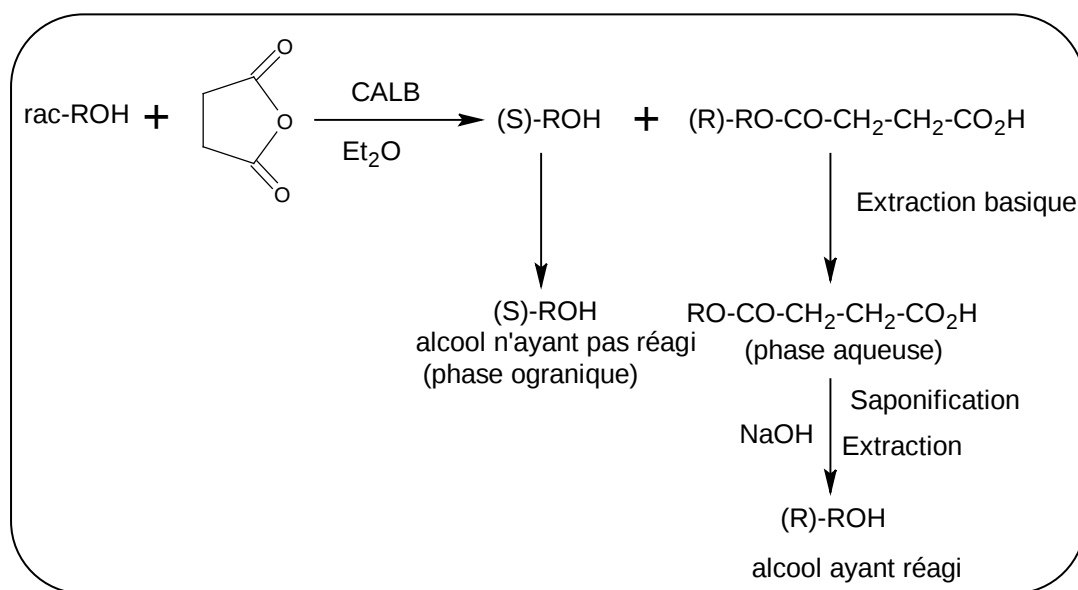


Schéma 23: Réaction de transestérification avec les anhydrides d'acide

⁵⁸ (a) M. Degueil-Castaing, B. De Jeso, S. Drouillard; Tetrahedron Letters., **1987**, 28, 953-954; (b) Y.F. Wang, C.H. Wong; J. Org. Chem, **1988**, 53, 3129.

⁵⁹ D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel; J. Org. Chem., **1988**, 53, 5531.

A-1: Influence des esters d'énols**A-1-a: Influence de la partie acyle de l'agent acylant**

Le facteur de sélectivité dépend de la longueur de la chaîne alkyle de la partie acyle de l'ester. Nous citons comme exemple la transestérification enzymatique de l'alcool secondaire 2-[N,N-diméthylcarbamoyl)méthyl]-3-cyclopenten-1-ol⁶⁰ par des agents acylants de type alkyle de vinyle en présence de la lipase de *Pseudomonas sp* comme le montre le schéma 24 :

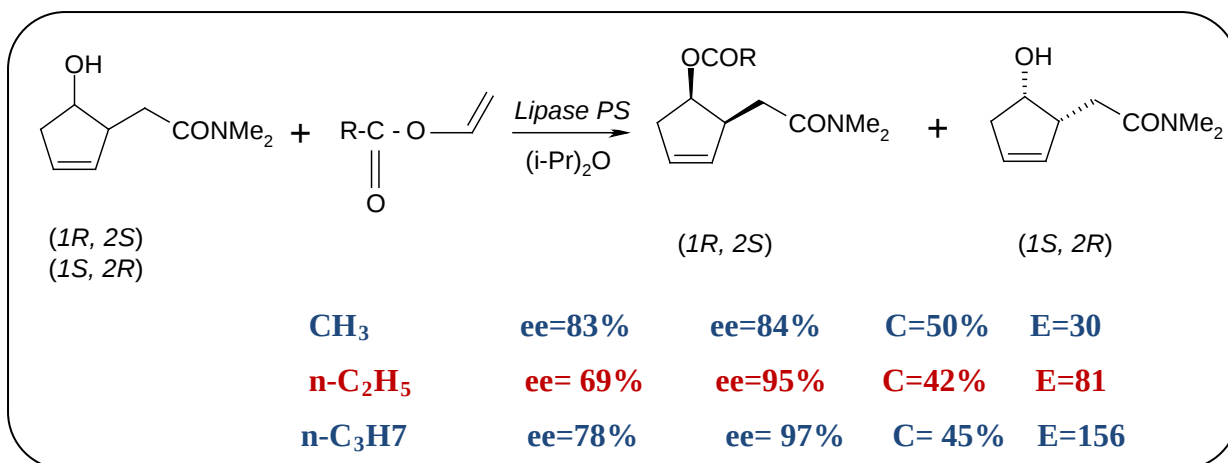


Schéma 24: Influence de la partie acyle en présence de la lipase de Pseudomonas sp

Ces résultats montrent que le facteur de sélectivité varie de façon significative avec l'allongement de la chaîne alkyle, en passant de (E = 30) pour l'acétate de vinyle à (E = 156) avec le butyrate de vinyle.

De leur côté, Kawasaki⁶¹ et Coll ont montré l'influence des agents acylants sur le dédoublement enzymatique du 2-phényl-1-propanol en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacea* (PCL) d'après le schéma 25:

⁶⁰ E.Tadashi, M. Soichi, T. Yusuke, S. Takashi, U. Masanori; Tetrahedron: Asymmetry, **1996**, 7, 625-628.

⁶¹ M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani; Tetrahedron: Asymmetry **2001**, 12, 585-596.

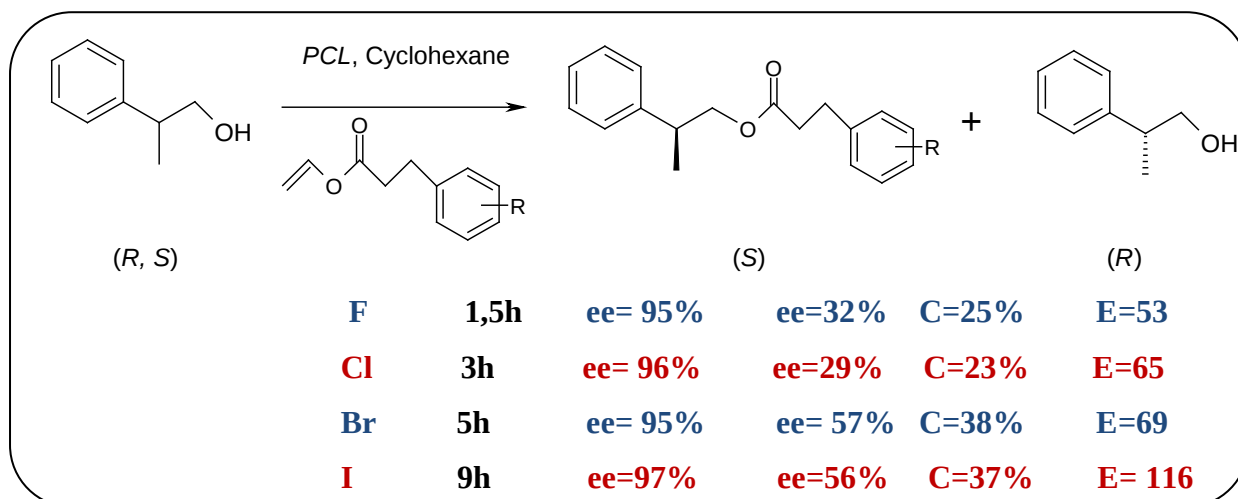


Schéma 25: Influence de la partie acyle sur l'acylation du 2-phényl-1-propanol

La sélectivité augmente en fonction de l'électropositivité de l'atome de l'agent acylant utilisé. Le para-iodo donne la meilleure sélectivité ($E > 100$).

A-1-b: Influence de la partie alcool de l'ester

Bouzemi⁶² et coll ont montré l'importance de la partie alcool de l'ester qui comporte l'acétate de vinyle ($R' = H$) et l'acétate d'isopropényle ($R' = CH_3$) dans une réaction de transestérification enzymatique du 1-phényl éthanol en présence de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) et dans l'éther diéthylique comme solvant schéma 26:

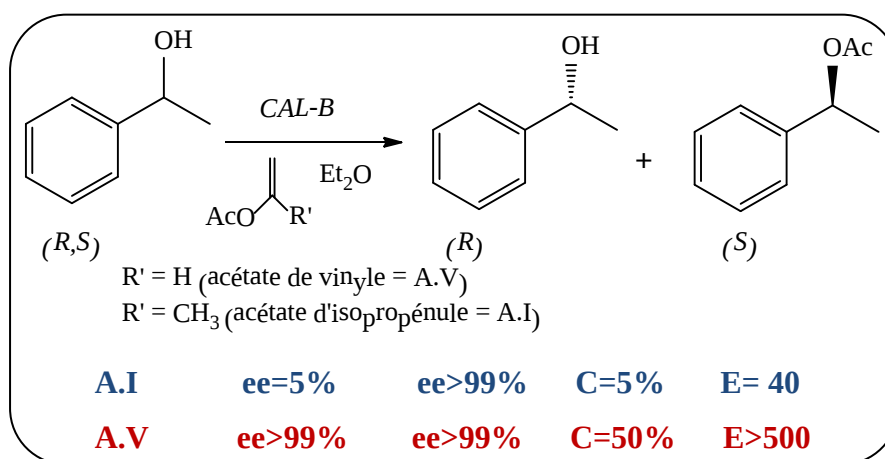


Schéma 26: Acylation enzymatique avec les esters d'énol

⁶² N. Bouzemi, H. Debbèche, L. Aribi-Zouieche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45, 2004, 627-630.

L'acétate d'isopropényle est le meilleur agent acylant comparativement à l'acétate de vinyle pour ce substrat, les deux énantiomères sont obtenus optiquement purs ($ee > 99\%$) pour une conversion de ($C = 50\%$) et une sélectivité élevée ($E > 500$).

A-2 : Influence l'anhydride succinique

Dans des travaux antérieurs de notre laboratoire⁶³, l'influence de l'anhydride succinique sur deux substrats de taille différente a été étudié: le 1-indanol et le 1-acénaphthénol dans une acylation enzymatique en présence de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) et l'éther diéthylique comme solvant selon le schéma 27.

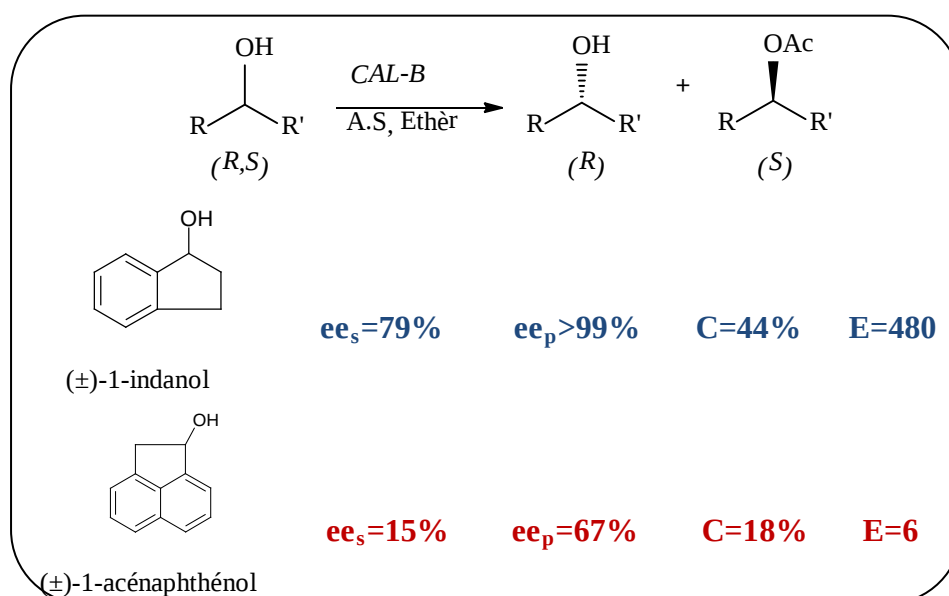


Schéma 27: acylation enzymatique avec l'anhydride succinique

On constate que l'anhydride succinique est utilisé avec une sélectivité élevée pour le dédoublément cinétique enzymatique de l'indanol, $E = 480$, plutôt que pour le 1-acénaphthénol où la sélectivité ($E = 6$) et la conversion ($C = 18\%$) sont faibles.

II-7: Réaction d'hydrolyse enzymatique

La réaction d'hydrolyse enzymatique (schéma 28) est l'une des réactions les plus utilisées initialement avec les lipases⁶⁴.



Schéma 28: Réaction d'hydrolyse enzymatique

⁶³ Réf 62: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45 ,2004, 627-630.

⁶⁴ (a) A.M. Klivanov; Chltech., 1986, 16, 354-359; (b) A.M Klivanov; J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 2767-2768

La réaction d'hydrolyse enzymatique est considérée comme inverse de la réaction de transestérification, les deux énantiomères substrat et produit obtenus étant complémentaires⁶⁵. (schéma 29).

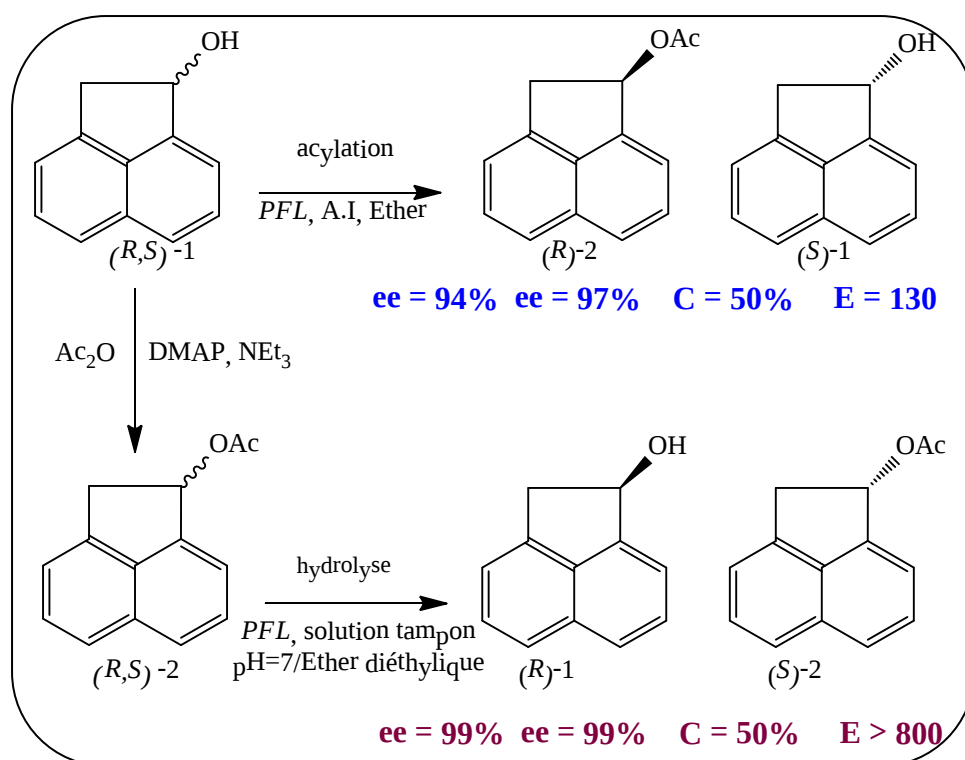


Schéma 29: Enantiocomplémentarité des énantiomères issus de la réaction acylation et d'hydrolyse enzymatique

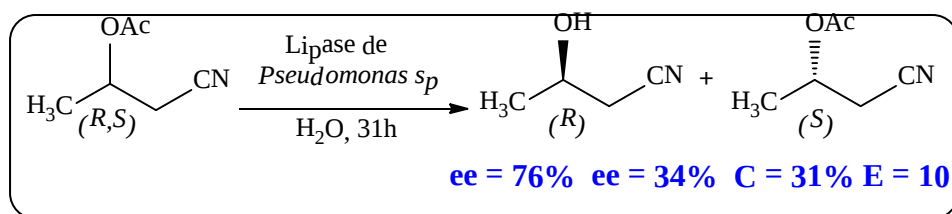
Cette réaction est réalisée en milieu aqueux (eau, solution tampon) ou en milieu aqueux-solvant organique pour les produits qui sont peu solubles dans le milieu aqueux. On présentera, dans ce qui suit les différentes conditions d'hydrolyse enzymatique :

a : L'utilisation de l'eau

Itoh⁶⁶ et coll ont fait la réaction d'hydrolyse enzymatique du β -acétoxybutyronitrile dans l'eau. Catalysé par la lipase de *Pseudomonas sp*, l'énantiomère alcool est obtenu avec un excès énantiomérique modéré, $E=10$ pour un taux d'avancement égal à ($C = 31\%$). (schéma 30).

⁶⁵ L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2000**, 41, 4085-4088.

⁶⁶ T. Itoh, Y. Hiyama, A. Betchaku, H. Tsukube; Tetrahedron Letters, **1993**, 34, 2617-2620.

Schéma 30: Hydrolyse enzymatique du β -acétoxybutyronitrile**b : L'utilisation de l'eau + solvant organique**

Dans un système bi-phasique (eau + solvant organique), la réaction d'hydrolyse enzymatique a été étudiée par Forró⁶⁷ et coll. L'hydrolyse du N-Boc-protégé le 1-(3-acétyloxypropyl) 6-7-diméthoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacea* (PS) dans l'eau / t-BuOMe a permis d'obtenir le produit avec un excès énantiomérique élevé (ee = 96%) à une conversion (C = 23%). La présence du solvant organique, ajouté pour les substrats qui sont peu solubles en milieu aqueux, a amélioré la sélectivité et la réactivité (schéma 31).

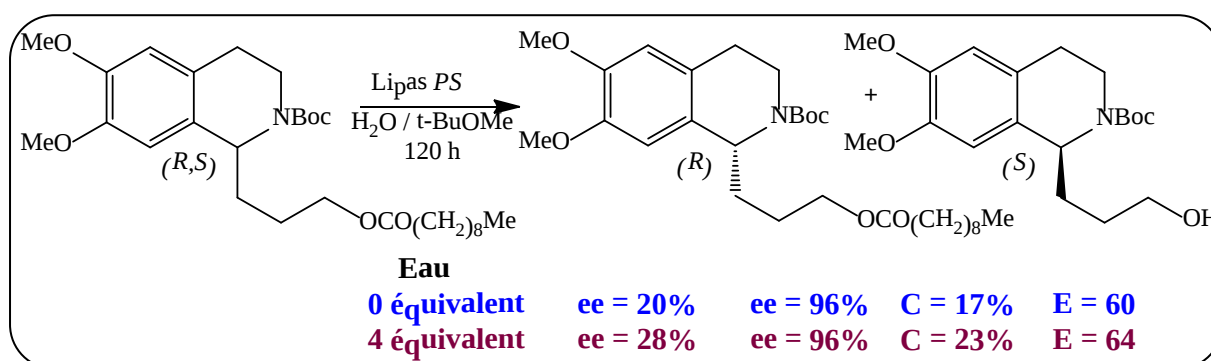


Schéma 31: Hydrolyse enzymatique du N-Boc-protégé

c : L'utilisation de la solution tampon

L'hydrolyse enzymatique du 1-phénoxy-2-propanol acétate a été réalisée par l'équipe de Thorleif Anthonsen⁶⁸ dans une solution tampon à pH neutre (pH = 7), pour assurer l'irréversibilité de la réaction, et ce, en présence de la lipase de *Candida antarctica fraction B* les deux énantiomères sont obtenus avec une bonne pureté optique (ee > 99%). (schéma 32).

⁶⁷ E. Forró, L. Schönstein, F. Fülöp; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1255-1260.

⁶⁸ B. H. Hoff, V. Waagen, T. Anthonsen; Tetrahedron: Asymmetry, **1996**, 7, 3181-3186.

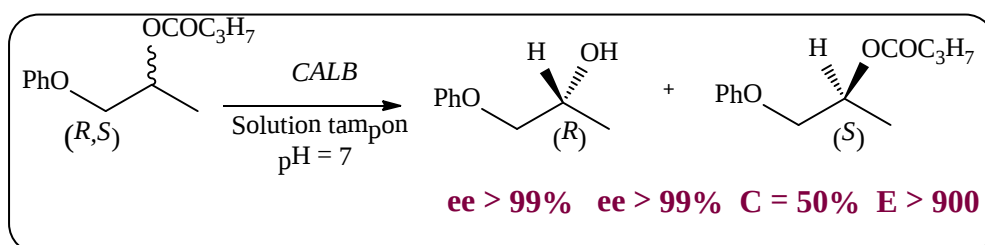


Schéma 32: Hydrolyse enzymatique du (R, S)- 1-phénoxy-2-propanol acétate en solution tampon

Dans une solution tampon Tris-HCl, le 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol est largement utilisé comme tampon, Fadnavis et coll⁶⁹ ont séparé les deux énantiomères (R) et (S) de la rugulactone, un produit naturel utilisé dans la chimio thérapie du cancer. La lipase de la *candida rugosa* a hydrolysé l'ester butyrate de l'alcool 3-hydroxy homoallylique protégé avec une bonne sélectivité (E = 244). (schéma 33).

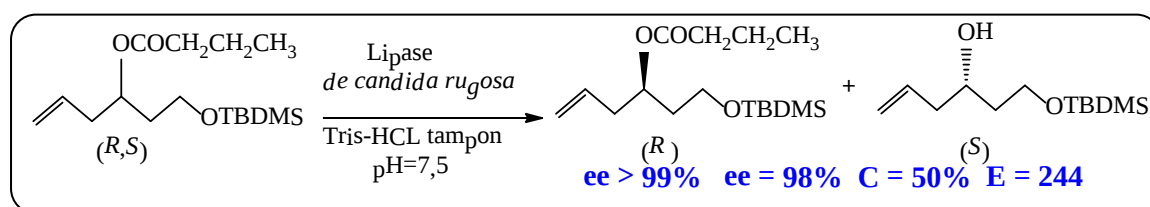


Schéma 33: Hydrolyse enzymatique dans une solution tampon Tris-HCl

Chênevert⁷⁰ et coll se sont intéressés à l'hydrolyse enzymatique du 2-glycerol substitué dans la solution tampon via la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL). Une bonne sélectivité a été observée (E > 200) et le produit est obtenu optiquement pur (ee = 99%) (schéma 34).

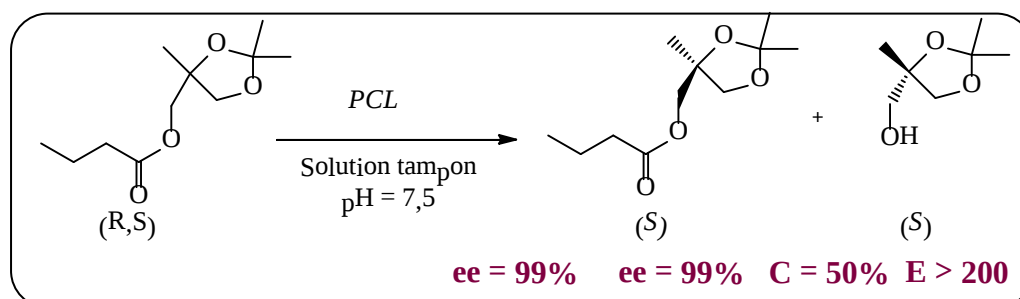


Schéma 34: Hydrolyse enzymatique du 2-glycerol substitué dans la solution tampon

⁶⁹ G. Reddipalli, M. Venkataiah, N. W. Fadnavis ; Tetrahedron: Asymmetry, **2010**, 21, 320-324.

⁷⁰ M. Bolduc, J. Bergeron, A. Michaud, N. Pelchat, P. Morin, M. Dasser, R. Chênevert ; Tetrahedron: Asymmetry, **2012**, 23, 428-233.

d : L'utilisation de la solution tampon+solvant organique

Mangalam S. Nair et coll⁷¹ ont décrit la réaction du dédoublément cinétique par hydrolyse enzymatique de l'ester 4-acetoxy tetralone utilisé dans la synthèse de produits biologiquement actifs, en présence de lipase *pancréatique de porc* (PPL). Les deux énantiomères ont été obtenus avec des excès énantiomériques élevés ($ee_s = 96\%$ et $ee_p = 95\%$), pour un facteur de sélectivité de $E = 151$. (schéma 35).

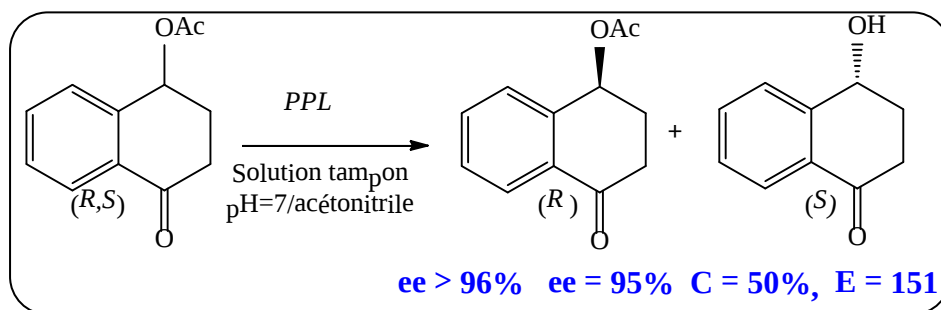


Schéma 35: Hydrolyse enzymatique de l'ester 4-acetoxytetralone

II-8 : Conclusion

Le dédoublément cinétique d'un mélange racémique en présence d'une enzyme est une voie d'accès très intéressante, à condition d'avoir les conditions de réactions irréversibles. Le dédoublément cinétique en générale et enzymatique en particulier est une voie d'accès très sollicitée pour la séparation chirale. On constate que la sélectivité enzymatique est généralement meilleure avec les réactions de transesterification comparativement aux réactions d'hydrolyse. Ces dernières présentent généralement de mauvaises sélectivités, à cause de la faible solubilité des substrats dans l'eau. L'ajout d'un co-solvant organique est nécessaire, on constate que le milieu bi-phasique améliore la sélectivité, et son utilisation s'est étendue. Mais la réaction reste peu utilisée soit à cause du faible rendement issu de cette réaction, qui est du en partie aux extractions répétées pour récupérer les produits. En plus, la réaction se déroule à l'interface (eau/solvant organique) et les interprétations sont difficiles pour établir des conclusions. Les recherches se poursuivent pour pouvoir expliquer les phénomènes mis en jeu. Ces problèmes expliquent le faible intérêt accordé à la réaction d'hydrolyse comparativement à la transestérification enzymatique.

⁷¹ S. Joly and M. S. Nair; Tetrahedron: Asymmetry, **2001**, 12, 2283-2287.

Première partie

Troisième chapitre

*Généralités sur les méthodes de
déracémisation*

III-1 : Introduction

Le dédoublement cinétique des racémiques est la méthode la plus sollicitée en industrie pour la synthèse des composés énantiomériquement purs, et bien que cette méthode soit efficace en termes de sélectivité, elle ne l'est pas en termes de rendement même quand la sélectivité est maximale. Ce dernier présente, en effet, une limitation intrinsèque, dans le cas idéal d'une résolution cinétique ou il ne peut atteindre que les 50% pour chaque énantiomère.

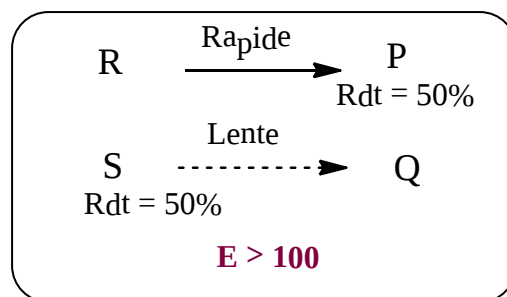


Schéma 36: Dédoublement cinétique enzymatique dans son cas idéal

Menés par les facteurs économiques et environnementaux, d'immenses efforts ont été déployés ces dernières décennies de recherche, pour l'amélioration de cette méthode afin de donner les composés avec la même pureté énantiomérique et un rendement chimique optimal.

L'obtention d'un seul énantiomère avec une excellente pureté optique et un rendement chimique de 100% est donc un processus connu sous le nom de « déracémisation ».

Le terme de « déracémisation » a été proposé pour la première fois⁷² en 1984. Cette terminologie a été très utilisée dans plusieurs sujets avec ambiguïté⁷³, le sens strict de « la déracémisation » étant l'opposé de « la racémisation ». Dans cette optique, il est proposé d'adopter la définition universelle suivante:

La déracémisation est un processus dans lequel le racémique est converti en produit non-racémique avec un rendement maximal, sans une séparation intermédiaire des substrats.

⁷² L. Duhamel, P. Duhamel, J-C. Launay, J-C. Plaquevent ; Bull. Soc. Chim. Fr. II, **1984**, 421-430.

⁷³ W. H. Pirkle, D. S. Reno; J. Am. Chem. Soc, **1987**, 109, 7189-7190.

III-2 : Principe de la déracémisation

Afin d'atteindre l'objectif de la déracémisation, le recyclage de l'énantiomère indésirable après l'étape du dédoublement cinétique enzymatique est nécessaire, ce recyclage peut se faire via une racémisation (spontanée, catalysée par un catalyseur biologique ou chimique), par une stéréo inversion (réactif chimique ou biocatalyseur) ou par un autre type de déracémisation qui repose sur une séquences d'oxydoréductions cycliques. Toutes ces voies constituent les différents types de déracémisation qui seront développés ultérieurement. Le schéma (37) illustre la différence entre le dédoublement cinétique classique et une déracémisation.

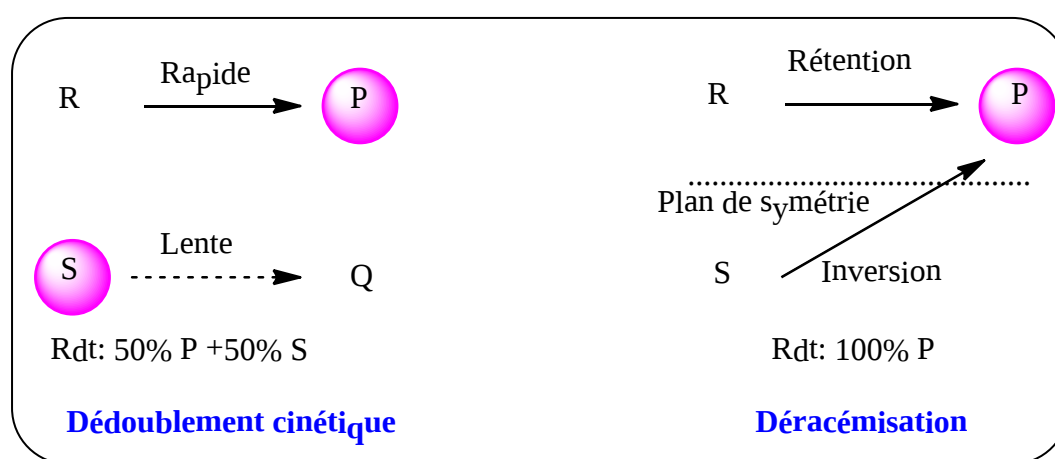


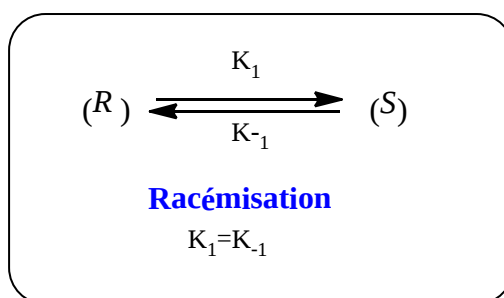
Schéma 37: Comparaison entre le principe du dédoublement cinétique classique et celui de la déracémisation

Avant de décrire les diverses méthodes de déracémisation, il est important d'étudier l'étape clé qui mène à cette diversité, à savoir, la racémisation et les différents types les plus utilisés qui existent.

III-3 : La réaction de racémisation

La réaction de racémisation est définie comme étant la formation irréversible d'un mélange racémique à partir d'un seul énantiomère pur, elle est associée à une perte totale de l'activité optique⁷⁴. Thermodynamiquement, la réaction de racémisation est un processus favorable dû à l'augmentation de l'entropie par la formation de deux énantiomères à partir d'un seul énantiomère. (schéma 38)

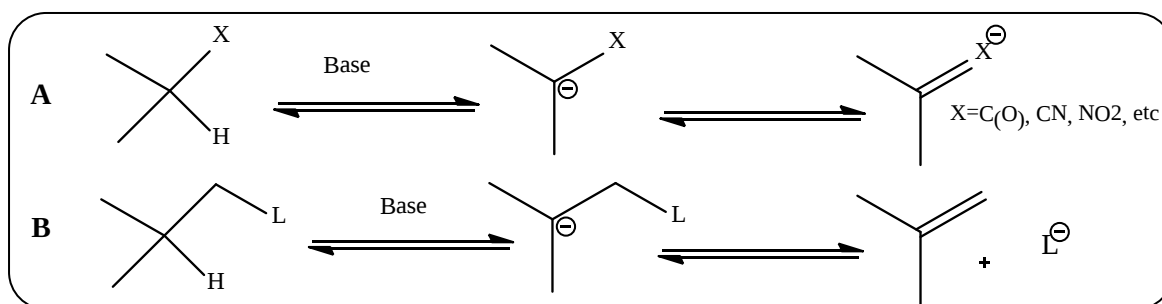
⁷⁴ E.L. Eliel, S.H. Wilen, M.P. Doyle; Basic Organic Stereo-chemistry: Wiley: New York, **2001**, 277-278.

*Schéma 38: Réaction de racémisation***III-3-1 : Les méthodes de racémisation**

Selon la littérature⁷⁵, plusieurs types de racémisation peuvent être distingués dont nous citons les plus utilisés :

❖ Racémisation catalysée par une base

La réaction de racémisation catalysée par une base est fréquemment la plus utilisée. Elle implique l'élimination d'un hydrogène du centre chiral pour former un carbanion. Ce carbanion est stabilisé par le groupement adjacent tel, un carbonyle, un nitrile, un nitro, ou d'autres groupements fonctionnels (schéma 39A), ou par une élimination réversible du β -substituant (schéma 39B).

*Schéma 39: Mécanisme d'une racémisation catalysée par une base*

Nous citons un exemple de ce type de racémisation décrit par Takafumi Noguchi⁷⁶ et coll concernant le traitement de l'énantiomère pur, le (*R*)-aryldichlorométhyl sulfoxides dans le tétrahydrofurane (THF) en présence de différentes bases telles que LDA, LiHMDS, NaHMDS et KHMDS qui a donné une racémisation du centre stéréogénique sulfure des sulphoxydes à – 78°C (schéma 40).

⁷⁵E J. Ebberts, G J.A. Ariaans, J P. M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg; Tetrahedron, **1997**, 53, 9417-9476.

⁷⁶T. Satoh, H. Momochi, T. Noguchi ; Tetrahedron : Asymmetry, **2010**, 21, 382-384.

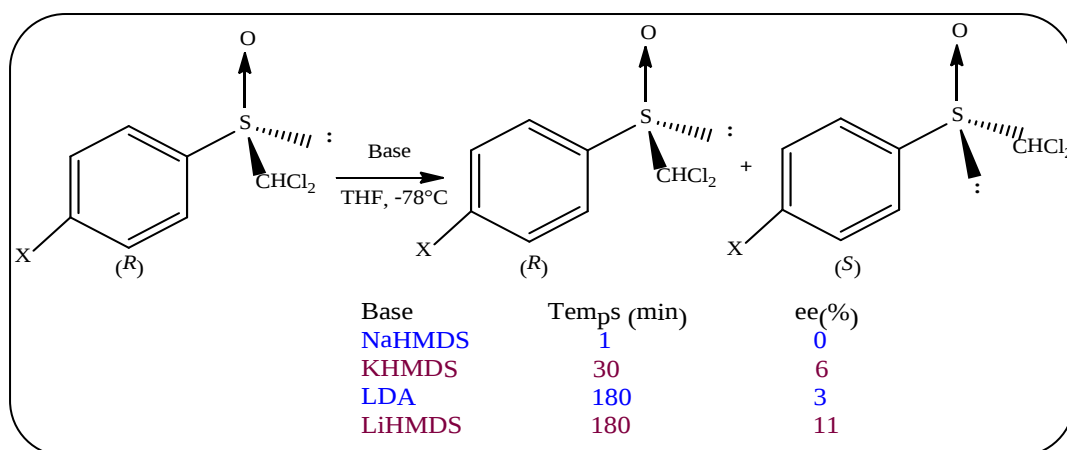


Schéma 40 : Racémisation du centre stéréogénique sulfure des sulfoxydes à -78°C catalysée par une base

❖ Racémisation catalysée par un acide :

L'utilisation de cette méthode est limitée comparée à celle catalysée par les bases. Usuellement il existe deux voies pour cette racémisation :

- 1- La plus fréquemment utilisée est une protonation de la double liaison qui porte l'hétéro atome situé en α du centre chiral, suivie par une abstraction de l'hydrogène du centre asymétrique (schéma 41A).
- 2- Cette racémisation est aussi possible si le substituant est porté par le centre chiral, au cours de la protonation, il se convertira comme un bon groupement partant, cela conduit à la formation réversible du carbocation planaire ce qui génère la racémisation (schéma 41B).

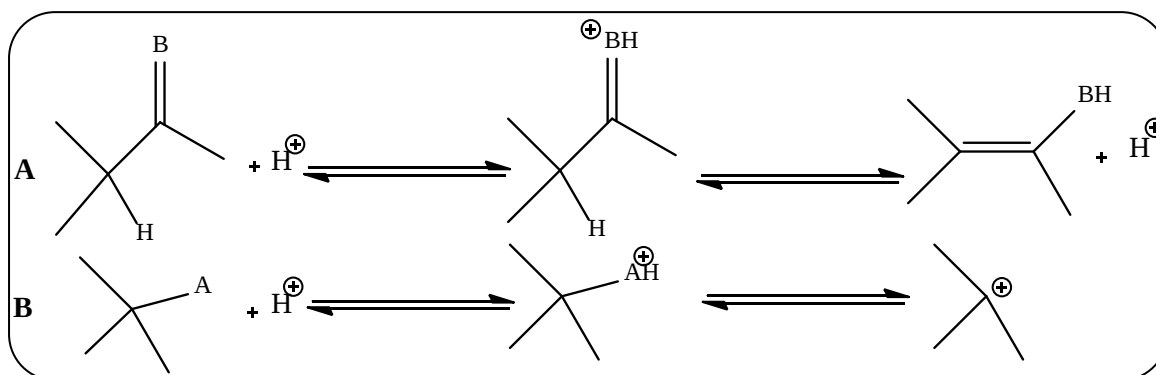


Schéma 41 : Mécanisme d'une racémisation catalysée par un acide

Dans ce contexte, Park⁷⁷ et coll ont étudié la racémisation de l'énantiomère (S) du méthyl N-(2,6-diméthylphényl)alaninate dans le toluène avec un mélange de n-butyraldéhyde et l'acide benzoïque. Le racémique ester est obtenu avec un rendement théorique égal à (rdt = 92%) et un excès énantiomérique (R/S = 50/50). (schéma 42).

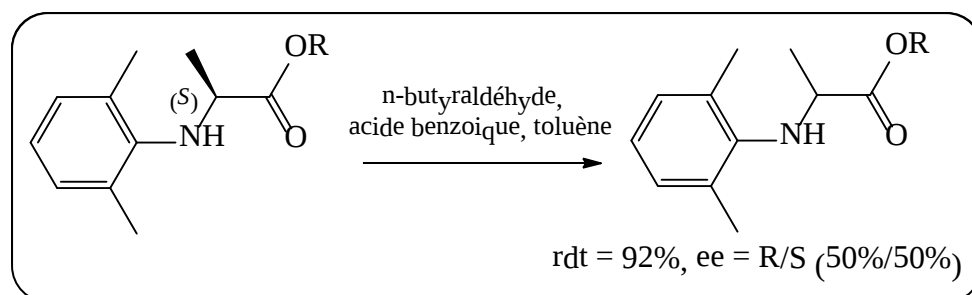


Schéma 42: Racémisation du (S) méthyl N-(2,6-diméthylphényl)alaninate catalysée par un acide

❖ Racémisation thermique :

Un grand nombre de composés optiquement actifs peuvent se racémiser par un simple chauffage sans l'ajout de réactifs⁷⁸ (schéma 43). Cette méthode est applicable avec succès à condition que les substrats mis en jeu possèdent une stabilité thermique suffisante dans les conditions de la réaction. Si la réaction de racémisation est lente à des températures près ou au-dessous de la température ambiante, ceci-ci est souvent attribuée à une racémisation spontanée.

La racémisation thermique peut se faire suivant différents mécanismes. Plusieurs composés n'ayant pas un centre chiral spécifique peuvent se racémiser par une rotation autour d'une liaison. Parfois la racémisation est possible par une rotation et un élargissement de plusieurs liaisons au sein du même composé tel que les hélicènes. Les composés qui ont un hétéro atome comme centre chiral et possèdent trois substituant et une seule paire d'électrons (amines et sulfoxides) peuvent se racémiser par une inversion pyramidale de ce centre stéréogène⁷⁹. La racémisation par réarrangement tel que les retro Diels /Alder s'effectue en l'absence de rupture de liaisons, le dernier type est la racémisation d'un équilibre de tautomérisation qui conserve les composés qui possèdent une fonction cétone en α du centre chirale et se racémisent avec un équilibre céto-énolique.

⁷⁷ O-J. Park, S-H. Lee, T-Y. Park, S-W. Lee, K-H. Cho; Tetrahedron : Asymmetry, **2005**, 16, 1221-1225.

⁷⁸ N W. Fadnavis, A V. Devi, L S. Jasti ; Tetrahedron : Asymmetry, **2008**, 19, 2363-2366.

⁷⁹ D.R. Rayner, A.J. Gordon, K. Mislow; J. Am. Chem. Soc, **1968**, 90, 4854.

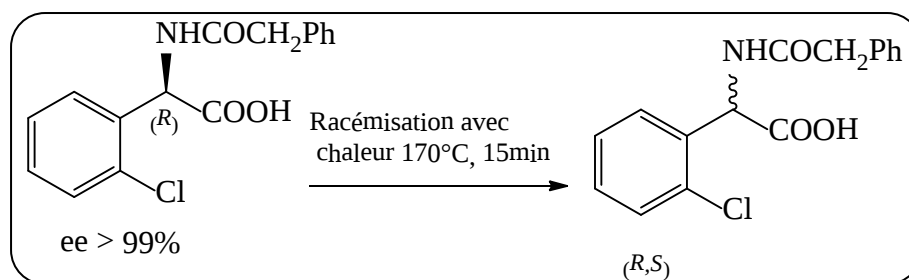


Schéma 43: Racémisation du (R) 2-chlorophényl glycine catalysée par la chaleur

❖ Racémisation par une séquence d'oxydoréductions :

Des réactions d'oxydations et de réductions consécutives peuvent effectuer des racémisations des composés ayant un proton labile sur le centre stéréo génique et un hétéro atome adjacent.

L'oxydation élimine l'hydrogène du carbone asymétrique, générant une espèce intermédiaire avec une géométrie planaire. La réduction restaure l'hybridation initiale de façon non sélective générant ainsi un mélange racémique (schéma 44).

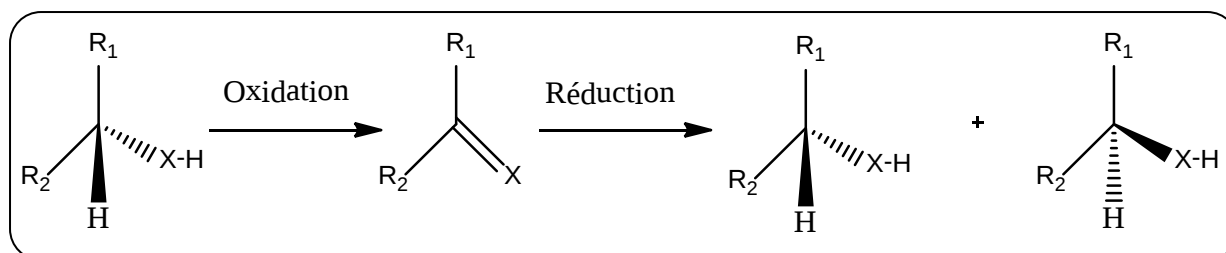


Schéma 44: Mécanisme d'une racémisation par une séquence d'oxydoréductions.

❖ Racémisation catalysée par les enzymes :

Un nombre croissant de biocatalyseurs⁸⁰ (racémase, lactase,...) est décrit comme étant efficace dans les réactions de racémisations. L'avantage de cette racémisation réside dans le fait qu'elle se déroule sous les conditions extrêmement douces de (T° , P et pH). Ainsi, la

⁸⁰ (a) A. Chadha, B. Baskar; Tetrahedron: Asymmetry, **2002**, 13, 1461-1464. (b) U T. Strauss, A. Kandelbauer, K. Faber; Biotechnology Letters, **2000**, 22, 515-520.

racémisation possède une grande chimiosélectivité dont l'élimination des produits secondaires⁸¹.

Dans cette optique, l'équipe de Faber⁸² a étudié la racémisation de l'énantiomère (*R*) pur des α -hydroxyacides aliphatiques avec succès, et ce, dans une solution tampon de pH égal à 6 via des cellules entières [*Lactobacillus* spp (DSM20207)] (schéma 45).

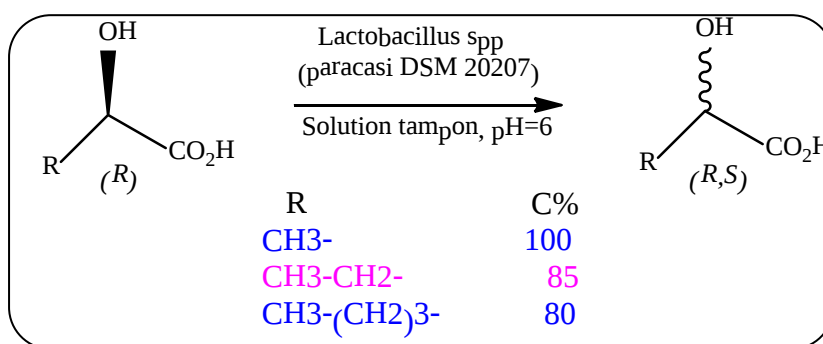


Schéma 45: Racémisation biocatalytique des α -hydroxyacides aliphatiques

❖ Racémisation catalysée par les métaux

Les métaux peuvent aussi assurer une racémisation des alcools secondaires avec succès. L'équipe de Park⁸³ a testé ce type de racémisations sur un alcool chiral, le (*S*)-phényléthan-1-ol avec le catalyseur (η^5 -Indenyl)RuCl(PPh₃)₂ dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) en présence d'une base (KOH). Le produit alcool racémique est obtenu avec une pureté optique nulle (ee = 0 %) en 20 minutes de réaction (schéma 46).

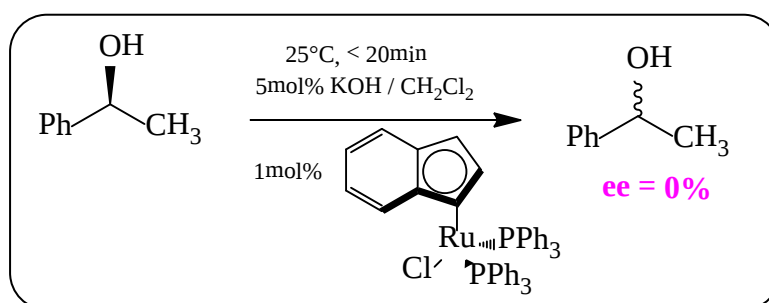


Schéma 46 : Racémisation du (*S*)- phényléthan-1-ol catalysée par le métal

⁸¹ J. E. Backvall, O. Pamier, Trends in Biotechnology; **2003**, 22, 2004.

⁸² S. M. glueck, M. Pirker, B. M. Nestl, B. T. Ueberbacher, B. Larissegger-Schnell, K. Csar, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, K. Faber; J. Org. Chem. **2005**, 70, 4028-4032.

⁸³ J. H. Koh, H. M. Jeong, J. Park; Tetrahedron: Letters, **1998**, 39, 5545-5548.

III-4 : Les différentes méthodes de déracémisations

Les différentes méthodes de déracémisations qui permettent l'obtention d'un seul énantiomère à partir d'un mélange racémique avec un rendement chimique théorique de 100% sont très étudiées d'après la littérature⁸⁴. Elles impliquent les :

- 1- La déracémisation par oxydoréduction cyclique
- 2- Le dédoublement cinétique répété.
- 3- Le dédoublement cinétique dynamique.
- 4- Le processus de l'énantioconvergence
- 5- **Le processus de stéréoinversion.**

III-4-1 : Déracémisation par oxydoréduction cyclique

La déracémisation des alcools secondaires ou des amines est basée dans cette méthode sur une séquence d'oxydoréductions cycliques⁸⁵. Dans un premier lieu, un énantiomère du produit initial racémique (*R*+*S*) subit une oxydation énantiosélective pour former un intermédiaire achiral (*P*) [cétone ou imine respectivement], ce dernier va être réduit d'une façon non sélective pour donner à nouveau le (*R*+*S*) sous forme racémique.

La répétition cyclique des deux réactions indépendantes, à savoir, l'oxydation et la réduction permet de réduire progressivement la quantité de l'énantiomère qui réagit le plus rapidement de son racémique pour donner l'énantiomère lent comme seul produit final avec un rendement chimique théorique de 100%. (schéma 47).

⁸⁴ (a) J. H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil; *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**, 15, 249-256. (b) N. J. Turner; *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**, 14, 115-121. (c) R. Wohlgemuth; *Current Opinion in Microbiology*, **2010**, 13, 283-292. (d) Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park; *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252, 647-658. (e) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall; *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, 11, 226-232. (f) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall; *Trends in Biotechnology*, **2004**, 22, 130-135. (g) N. J. Turner; *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 401-406. (h) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall; *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 407-413. (i) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall; *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 3247-3262. (j) M.-J. Kim, Y. Ahn, J. Park; *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 578-587. (k) R. Azerad, D. Buisson; *Current Opinion in Biotechnology*, **2000**, 11, 565-571. (l) U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117. (m) M. T. El Gihani, J. M. J. Williams; *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**, 3, 11-15. (n) R. S. Ward; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490.

⁸⁵ W. Kroutil, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913.

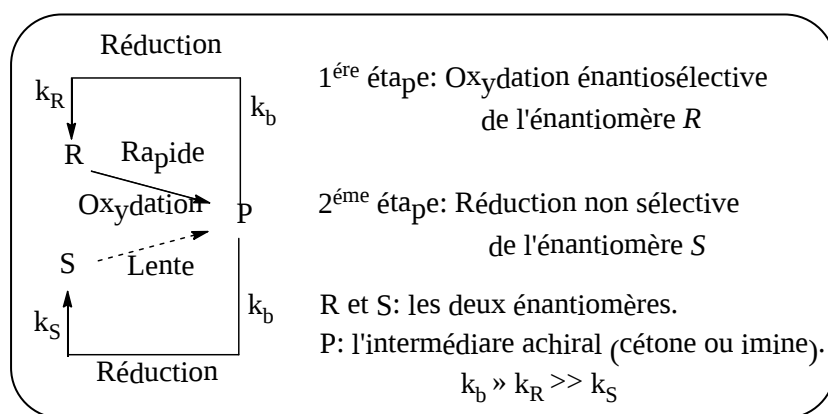


Schéma 47 Principe de la déracémisation des alcools secondaires et des amines par oxydoréduction cyclique

La caractéristique de ce système peut s'expliquer comme suit : si l'on suppose que la première étape est sélective ($k_R \gg k_S$, $E = 200$), l'énantiomère (R) est sélectivement oxydé pour donner le produit (P) achiral avec un rendement de 50% sans toucher à l'énantiomère (S). Dans la deuxième étape, le produit intermédiaire achiral est réduit non sélectivement pour donner (R+S) en quantité égale à 25% pour chacun. Par conséquent, la composition énantiomérique de R/S est égale à 25/75 après le premier cycle. Le rendement chimique de l'énantiomère S augmente progressivement par rapport à celui de l'énantiomère R où il peut atteindre son maximum après plusieurs cycles. (figure 12).

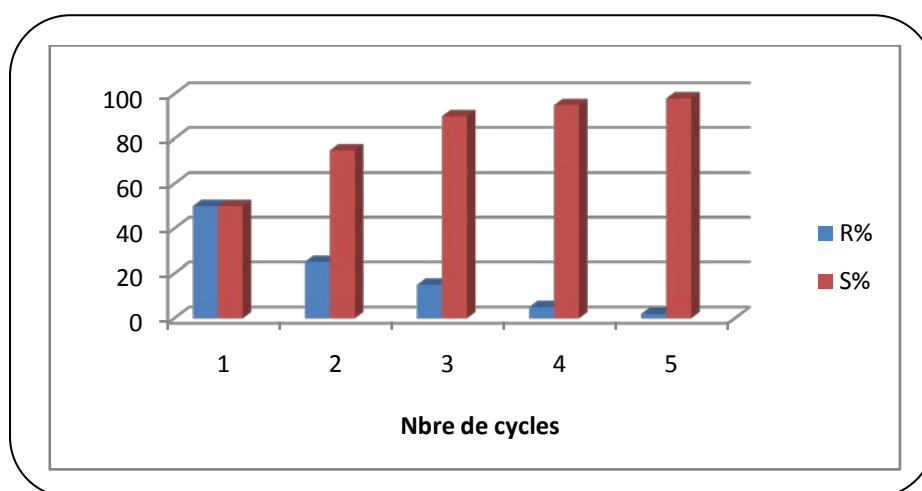


Figure.12: Rendements chimiques théoriques lors d'une racémisation par oxydoréduction cyclique.

Le meilleur résultat de cette méthode est obtenu en « un seul pot », lorsque les deux étapes d'oxydation et de réduction sont compatibles.

Dans cette optique, nous citons l'exemple⁸⁶ de la déracémisation par oxydation-réduction cyclique du racémique N-(1-hydroxy-1-phényléthyl)benzamide via des cellules entières (*Cunninghamella echinulata* NRRL 1384). La déracémisation implique une oxydation sélective de l'énantiomère (S) en cétone suivie par sa réduction partiellement sélective.

L'énantiomère (R) est obtenu avec une pureté optique égale à (ee = 98%) et un rendement chimique (rdt = 82%). (schéma 48).

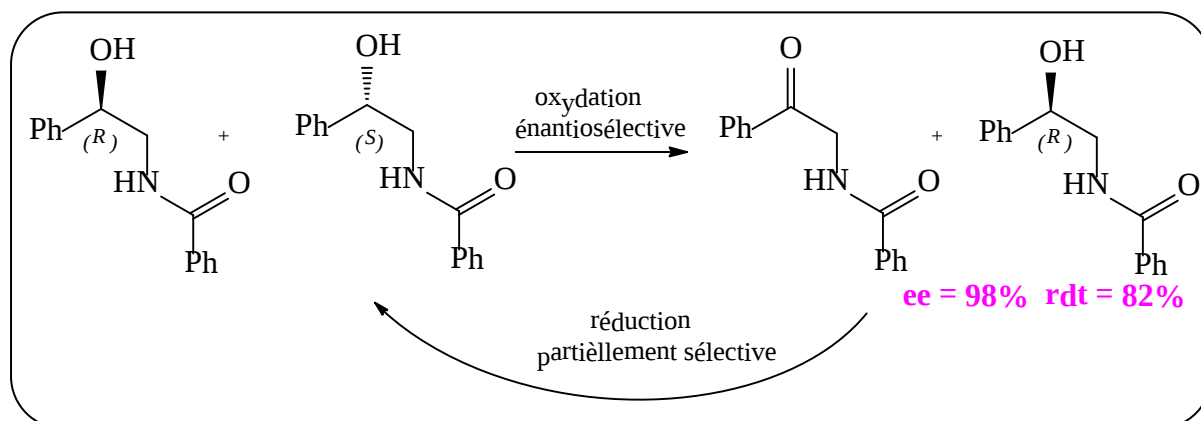


Schéma 48 : Décarémisation microbienne du N-(1-hydroxy-1-phényléthyl)benzamide par oxydoréduction cyclique

La déracémisation par oxydation-réduction cyclique a été réalisée par la combinaison d'un catalyseur biologique et une méthode chimique⁸⁷. La première étape consiste en une oxydation sélective de l'énantiomère (S) du mélange racémique par la *G.jasminoides* immobilisée (cellule plante) afin de donner la cétone, l'antipode restant inchangé. Dans une deuxième étape la cétone est réduite de façon non-sélective par le NaBH₄ pour donner le racémique. Le cycle de déracémisation est répété 6 fois, l'énantiomère (R) est obtenu avec un excès énantiomérique de (ee = 96%) et un rendement chimique de 90%. (schéma 49).

⁸⁶ G J. Cardus, A J. Carnell, H. Tarald, T. Riermeir; Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 239-243.

⁸⁷ C. Magallanes-Noguera, M M. Ferrari, M. Kurina-Sanz, A A. Orden ; Journal of Biotechnology, **2012**, 160, 189-194

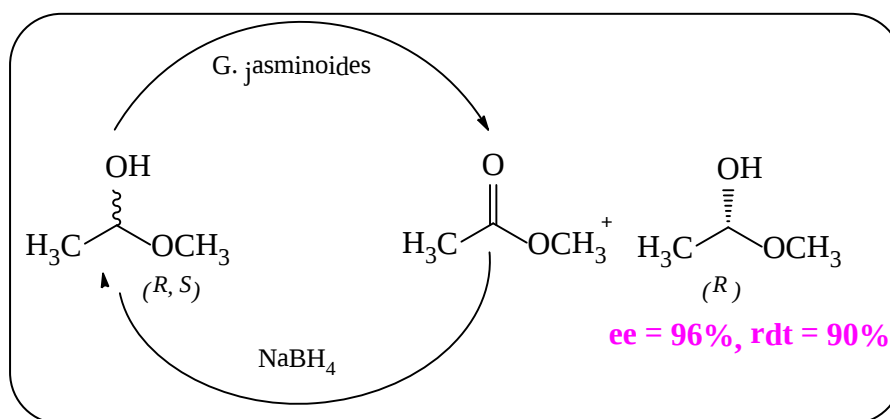


Schéma 49 : Oxydation-réduction cyclique via une combinaison d'un catalyseur biologique et une méthode chimique

III-4-2 : Méthode des dédoublements cinétiques répétés

Dans ce cas, après chaque dédoublement cinétique enzymatique ($C=50\%$, $E=100\%$), la racémisation de l'énantiomère qui n'a pas réagi est nécessaire pour obtenir le produit de la réaction avec un rendement chimique théorique égal à 100%.

La méthode du dédoublement cinétique répété est basée sur le recyclage de l'énantiomère estimé indésirable après sa séparation de son antipode optique désiré, cet énantiomère est, de nouveau, soumis à d'autres dédoublements cinétiques enzymatiques dans des cycles consécutifs et ainsi de suite jusqu'à la consommation totale du produit de la réaction qui va être converti en un seul énantiomère avec un rendement de 100%. (schéma 50).

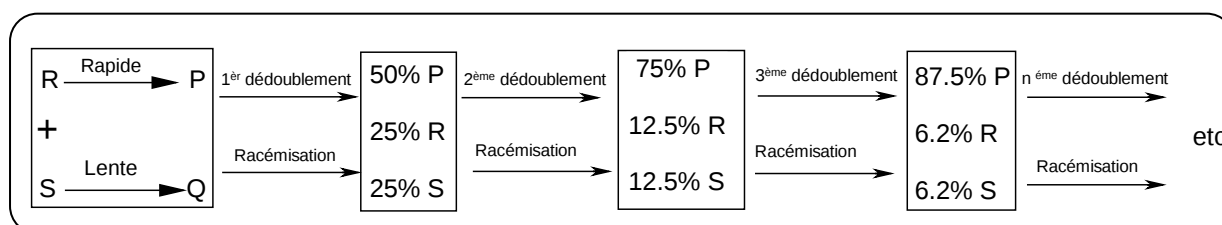


Schéma 50 : Dédoublements répétés via re-racémisation.

Le rendement théorique de l'énantiomère souhaité peut atteindre plus de 95% après cinq cycles seulement (figure 13), ce qui prouve que la réaction du dédoublement cinétique enzymatique suivie d'une réaction de racémisation peut se faire dans des conditions douces sans la perte du produit.

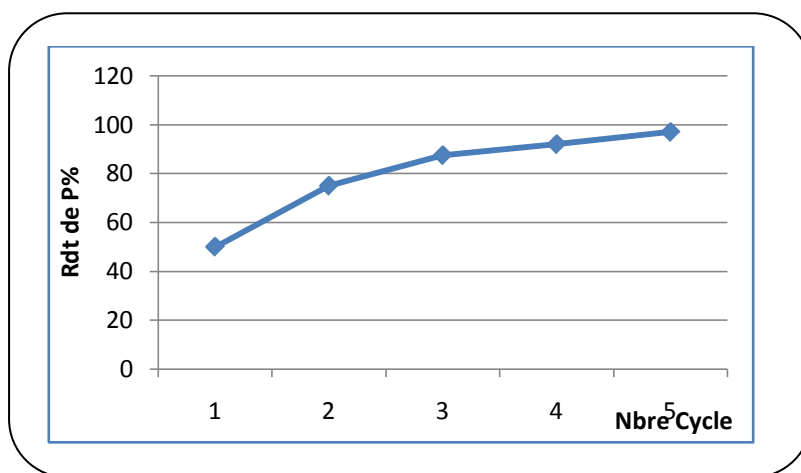


Figure 13 : Rendement chimique théorique d'un dédoublement répété.

L'utilisation de cette méthode est peu justifiable à l'échelle du laboratoire, contrairement aux dédoublements à l'échelle industrielle. Théoriquement, un nombre de cycles est requis pour transformer tout le produit de la réaction en un seul stéréo-isomère

III-4-3 : Le dédoublement cinétique dynamique (D.C.D):

Le dédoublement cinétique dynamique est la combinaison de deux étapes distinctes, à savoir, le dédoublement cinétique et la racémisation in situ. De cette façon, tout le substrat peut être converti en un seul énantiomère avec un rendement chimique théorique de 100%. L'étape de racémisation de l'énantiomère qui réagit lentement doit être rapide, et elle peut être réalisée soit chimiquement, biocatalytiquement ou même spontanément. Les conditions de cette méthode doivent être ainsi choisies pour ne pas causer une racémisation de l'énantiomère produit et pour permettre un dédoublement cinétique enzymatique efficace sans toucher à l'enzyme (schéma 51).

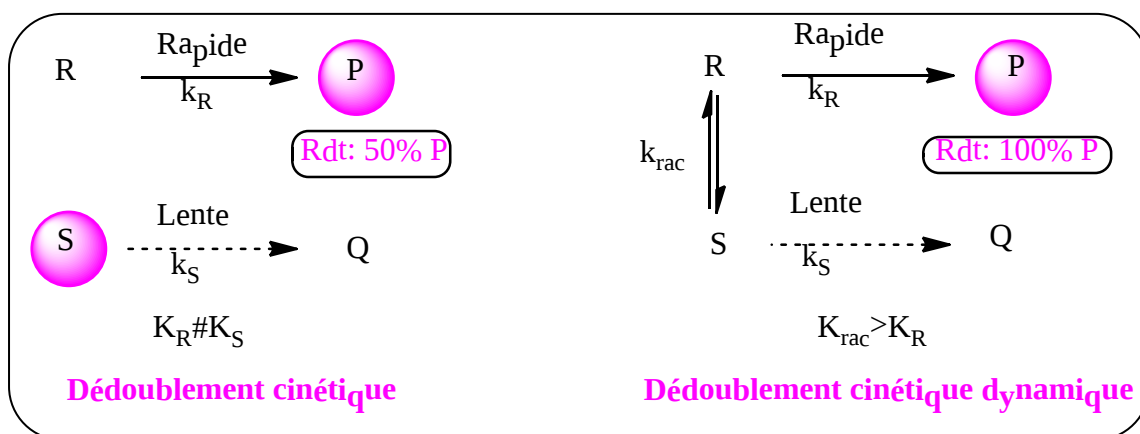


Schéma 51: Dédoubléments cinétique classique et dynamique.

Pour un dédoublement cinétique dynamique efficace, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

- 1- Le dédoublement cinétique, exprimé par un facteur de sélectivité E , doit avoir une grande sélectivité ($E > 20$).
- 2- L'étape de racémisation de l'énantiomère qui réagit lentement doit être supérieure (au moins 10 fois plus grande que celle du dédoublement cinétique ($K_{\text{rac}} > K_S$)).
- 3- Le dédoublement cinétique et la méthode de racémisation doivent être compatibles sous les mêmes conditions de la réaction.
- 4- L'élimination des produits secondaires issus des deux réactions qui interviennent sur ces réactions elles mêmes.
- 5- Le dédoublement cinétique dynamique est limité aux composés qui possèdent un seul centre asymétrique.

III-4-3-1 : Dédoublement cinétique dynamique via une racémisation spontanée

Cette déracémisation est basée sur l'instabilité des substrats vis-à-vis du milieu réactionnel, tels que l'effet du pH, la libération des acides et longue exposition aux enzymes. Ainsi, il se trouve que la racémisation spontanée peut être naturelle.

Rebolledo⁸⁸ et coll ont décrit que l'étape de racémisation spontanée du dédoublement cinétique dynamique est basée sur une migration intramoléculaire du groupement alkoxy-carbonyl entre les deux nitrogènes vicinaux sous l'influence de l'acide acétique libéré. Ils ont étudié la réaction d'aminolyse des racémiques mono carbamate catalysée par la lipase de *Candida antarctica* (CALB), avec le 1-phényléthanol comme donneur d'acyle dans le tert-butylméthyléther (TBME) et la triéthylamine (NEt_3) comme co-solvant à 50°C. Sous ces conditions, un dédoublement cinétique dynamique efficace est obtenu, représenté par la valeur des excès énantiomériques ($ee > 96\%$) et du rendement chimique de 94% selon le substrat (schéma 52).

⁸⁸ F. J. Quijada, V. Gotor, F. Rebolledo; Organic Letters, **2010**, 12, 3602-3605.

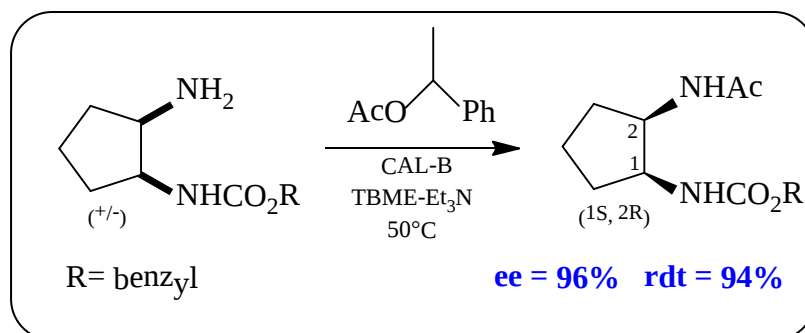


Schéma 52 : DCD enzymatique de la ($\pm$)-cis-N-(Alkoxycarbonyl) cyclopentane-1,2-diamines basé sur une racémisation spontanée

III-4-3-2 : Dédoublage cinétique dynamique via une racémisation biocatalysée

Comme son nom l'indique l'étape de racémisation est assurée par un catalyseur biologique. Dans cette optique, Faber⁸⁹ et coll ont étudié la déracémisation de l'acide mandélique racémique via deux lipases (schéma 53). La première est une réaction d'acylation avec une excellente énantiosélectivité ($E > 200$) de l'acide mandélique catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* sp dans le diisopropyléther et l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle. Dans une deuxième étape, et à une conversion de 50%, la lipase est récupérée par une simple filtration, et le solvant organique est remplacé par une solution aqueuse, l'énantiomère (*R*) n'ayant pas réagi subit une racémisation avec la racémase mandélate immobilisée sans touché le produit formé. Ce processus est répété quatre fois, et l'énantiomère de configuration (*S*) est obtenu comme seul produit avec un excès énantiomérique supérieur à 98% et un rendement chimique de 80%.

⁸⁹ U T. Strauss, K. Faber; Tetrahedron: Asymmetry, **1999**, 10, 4079-4081.

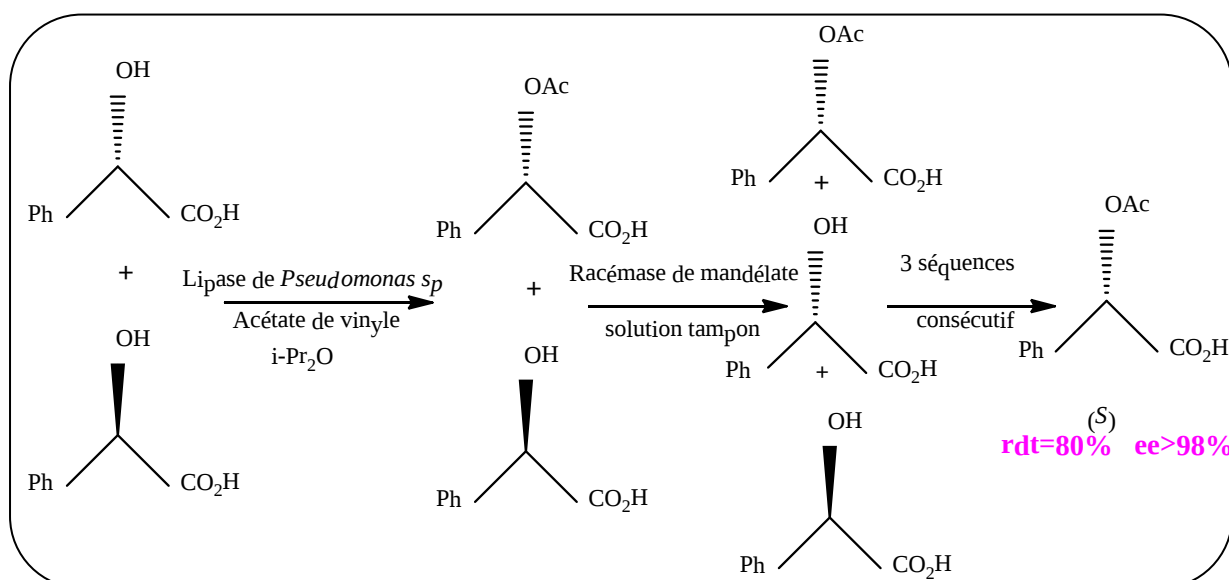


Schéma 53 : Déracémisation de l'acide mandélique ($\pm$) via deux systèmes enzymatiques
lipase-mandélate racémase

III-4-3-3 : DCD via une racémisation catalysée par les métaux

L'utilisation d'une combinaison enzyme-métal de transition en tandem pour assurer un dédoublement cinétique enzymatique avec une racémisation in situ est un processus très utilisé. L'efficacité de ce dédoublement cinétique dynamique dépend de la compatibilité des deux systèmes. La majorité des catalyseurs de racémisation qui sont adaptés aux dédoublements cinétiques dynamiques des alcools sont le complexe de ruthénium, tandis que les catalyseurs de rhodium, palladium, aluminium, et vanadium sont limités aux substrats.

Pour la racémisation avec le métal de transition il existe généralement deux méthodes, l'une via un transfert d'hydrogène (schéma 54a) et l'autre via la formation du π -allylique (schéma 54b).

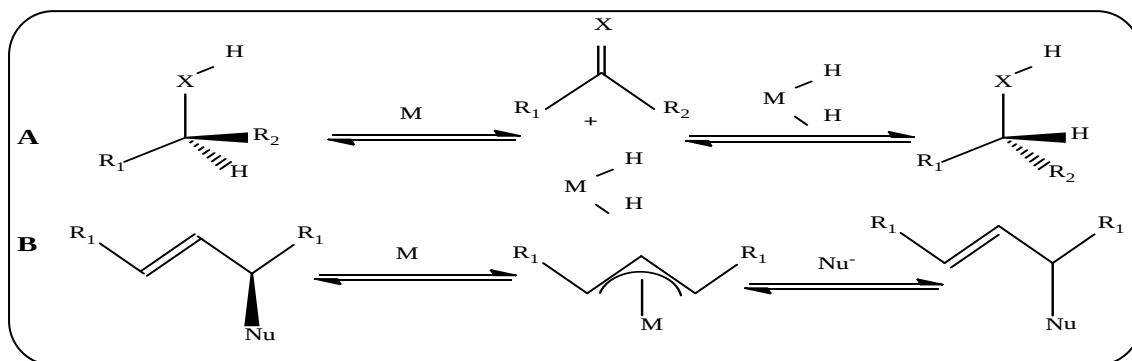


Schéma 54 : Méthodes générales de racémisation catalysée par le métal dans un
dédoublement cinétique dynamique

Ce type de déracémisations concerne les alcools, utilisés comme des auxiliaires chiraux pour les industries chimiques fines telles que les industries pharmaceutique, agrochimique, cosmétique, et industrie des additifs alimentaires. Nous citons quelques exemples de la littérature des couples métal/enzyme utilisés lors des dédoublements cinétiques dynamiques parmi ces systèmes :

❖ Dédoublément cinétique dynamique via un couple Rhodium / enzyme :

Lors du premier dédoublement cinétique dynamique des alcools secondaires, plusieurs complexes de rhodium, iridium, ruthénium, et aluminium ont été testés⁹⁰. Parmi les catalyseurs de racémisation, seuls le $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ et le $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ montrent une activité raisonnable dans le dédoublement cinétique enzymatique du 1-phényléthanol. La racémisation se produit via un transfert d'hydrogène en présence de quantités stœchiométriques de cétone comme un accepteur d'hydrogènes et une base. La réaction enzymatique n'étant pas compatible avec une forte base telle que KOH, le dédoublement cinétique dynamique du 1-phényléthanol est réalisé en l'absence de cette base de KOH en utilisant $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ et la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) et a donné l'énantiomère (R)-1-phényléthylacétate avec un excès énantiomérique de 98% à 60% de conversion après 72 heures. (schéma 55).

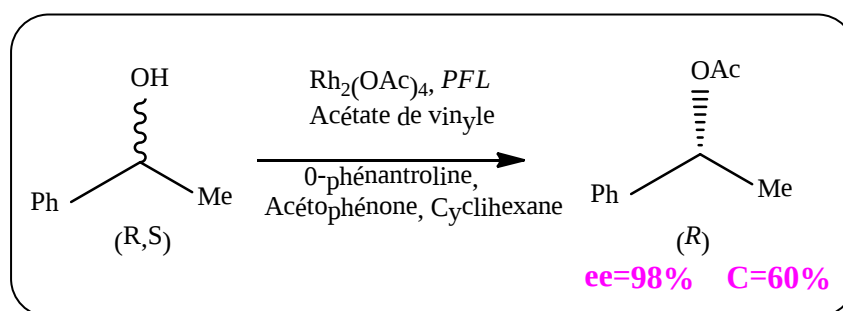


Schéma 55: DCD du 1-phényléthanol par le couple Rhodium / enzyme

❖ Dédoublément cinétique dynamique via un couple Palladium / enzyme :

Le complexe de palladium II, $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$, a été utilisé comme un catalyseur précurseur pour la racémisation des acétates allyliques cycliques. La réaction du complexe palladium avec l'acétate allylique forme un intermédiaire η^3 -allyl paladium, lequel est en équilibre avec les deux énantiomères de l'acétate allylique.

⁹⁰ P M. Dinh, J A. Howarth, A R. Hudnott, J M J. Williams, W. Harris; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 7623-7626.

Après la lipase hydrolyse d'une façon sélective un énantiomère pour donner l'alcool allylique optiquement actif. Le premier exemple réussi concerne l'acétate cyclique⁹¹, lequel est transformé en l'alcool de configuration (S) avec un rendement chimique de 81% et un excès énantiomérique de 96% par le dédoublement cinétique dynamique de 19 jours en utilisant le $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ et la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) dans une solution tampon (schéma 56).

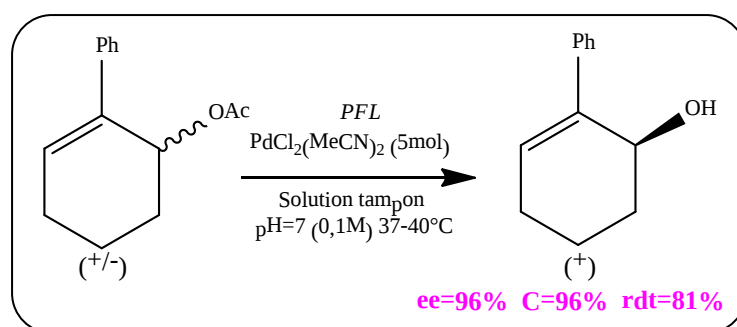


Schéma 56 : DCD de l'acétate allylique cyclique via le couple

Palladium / enzyme

Kim⁹² et coll ont amélioré le dédoublement cinétique dynamique des acétates allyliques linéaires en présence d'un catalyseur de racémisation, le complexe de palladium (0)-dppf [dppf : 1,1'-bis (diphénylphosphino)ferrocène] et le 2-propanol comme accepteur d'acyle. Parmi les différents substrats, le (R)-4-phénylbut-3-en-2-ol est obtenu avec un rendement de 83% et un excès énantiomérique supérieur à 99% en 36 heures de réaction (schéma 57).

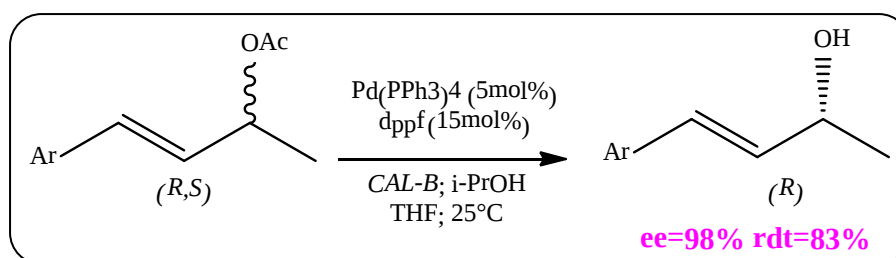


Schéma 57: DCD de l'acétate allylique linéaire via le couple Palladium / enzyme

⁹¹ J V. Allen, J M J. Williams; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 1895-1862.

⁹² Y K. Choi, J H. Suh, D. Lee, I T. Lim, J Y. Jung, M J. Kim; J. Org. Chem, **1999**, 64, 8423-8424.

L'énantiomère qui réagit lentement est racémisé par le $\text{Pb}(\text{PPh}_3)_4$ via la formation d'un intermédiaire (π -allyl) palladium suivie d'une cis-migration de l'acétate. Dans ces conditions la racémisation est accompagnée par une réaction d'élimination et de substitution afin de former le diène et l'éther iso propylique.

❖ **Dédoublage cinétique dynamique via un couple Ruthénium / enzyme :**

Les complexes de ruthénium sont les plus couramment utilisés pour la racémisation des alcools⁹³. Bäckvall et coll ont été les premiers à rapporter l'utilisation du complexe de Shvo $\{[(\eta^5\text{-Ph}_4\text{C}_4\text{CO})]_2\text{H}\}\text{Ru}_2(\text{CO})_4(\eta\text{-H})$ à base de ruthénium dans le dédoublage cinétique dynamique des alcools. Sous l'effet d'un chauffage, ce complexe génère deux espèces mono ruthénium **a** et **b** actives (schéma 58). La cétone est hydrogénée par **a**, et l'alcool par **b**.

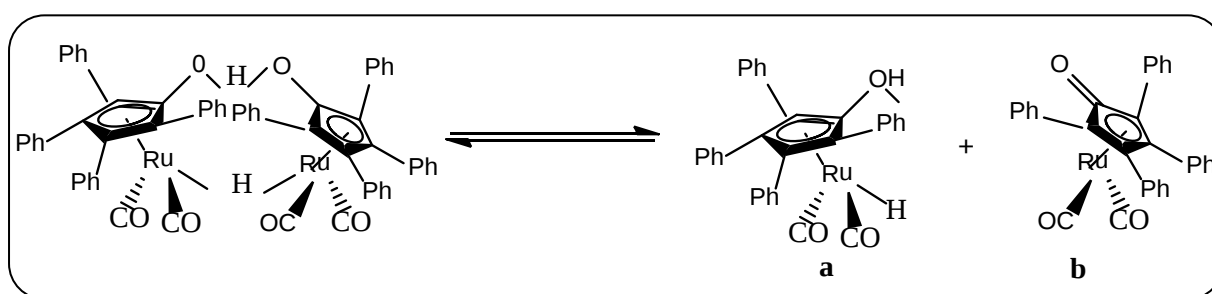


Schéma 58 : Dissociation du catalyseur de racémisation

Cette déracémisation est achevée par la combinaison du ruthénium dimère (complexe de Shvo) et la *lipase de Candida antarctica* (CALB) qui catalyse la réaction d'acylation⁹⁴ avec le p-chlorophénylacétate comme donneur d'acyle dans le toluène à 70°C pendant 87 heures. L'énantiomère (*R*)-1-phényléthylacétate est obtenu optiquement pur ($ee > 99,5\%$) avec un rendement chimique de 92% (schéma 59).

⁹³ (a) P. Hoyos, M. Alberto Quezada, J V. Sinisterra, A R. Alcántara ; Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic, **2011**, 72, 20-24. (b) M R. Atuu, M. Mahmum Hossain; Tetrahedron: Letters, **2007**, 48, 3875-3878. (c) K. Bogár, J-E. Bäckvall; Tetrahedron: Letters, **2007**, 48, 5471-5474. (d) S F G M. van Nispen, J. van Buijtenen, J A J M. Vekemans, J. Meuldijk, L A. Hulshof; Tetrahedron: Asymmetry, **2006**, 17, 2299-2305.

⁹⁴ (a) A L E. Larsson, B A. Persson, J E. Bäckvall; Angew. Chem. Int. Ed, **1997**, 36, 1211. (b) B A. Persson, A L E. Larsson, M L. Ray, J E. Bäckvall; J. Am. Chem. Soc, **1999**, 121, 1645.

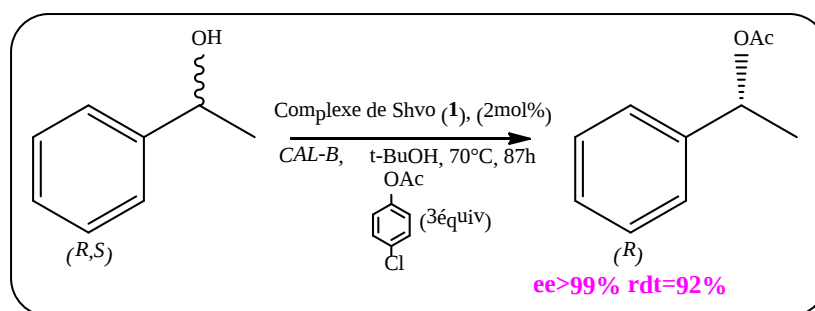


Schéma 59 : DCD du 1-phényléthanol via le complexe de

Shvo / CAL-B

Les catalyseurs du ruthénium existent avec de diverses structures⁹⁵ et ils ont prouvé leur efficacité, les recherches ne cessent d'optimiser les différents facteurs influant sur la déracémisation via le système métal / enzyme tels que la température élevée, les additifs spéciaux, les bases fortes, qui constituent de bons systèmes pour la déracémisation.

Dans ce contexte, nous décrivons l'exemple⁹⁶ d'un nouveau dédoublement cinétique dynamique avec un nouveau catalyseur le cyclopentadienyl benzyl ruthénium (II) dans une réaction de déracémisation catalysée par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) avec l'acétate d'isopropényle comme donneur d'acyle dans le toluène. Le système est mené à température ambiante en présence d'une base K_3PO_4 avec du tamis moléculaire comme additif. Après la racémisation, suit un processus de transfert d'hydrogènes intramoléculaire, le produit acétate est obtenu énantiomériquement pur (ee=99%) avec un rendement chimique de 97% en 10 heures de temps (schéma 60).

⁹⁵ Y. Ahn, S-B. Ko, M-J. Kim, J. Park; Coordination Chemistry Reviews; **2008**, 252, 647-658.

⁹⁶ Q. Chen, C. Yuan; Tetrahedron, **2010**, 66, 3707-3716.

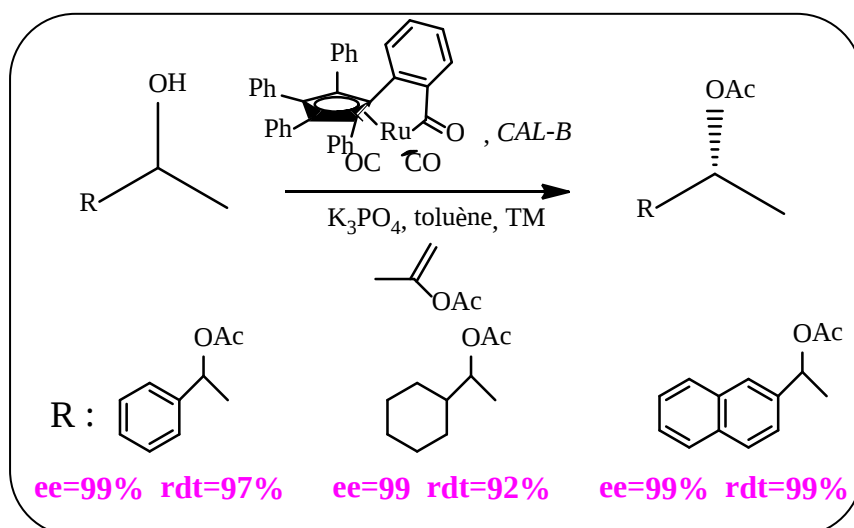


Schéma 60 : DCD du 1-phényléthanol

Le dédoublement cinétique dynamique de ces alcools a été étudié par Merabet-Khelassi et coll⁹⁷ qui ont étudié la racémisation des alcools secondaires par le catalyseur ruthénium $[\text{RuCl}_2(\text{p-cymène})]_2$. Après l'optimisation du système de racémisation $[\text{RuCl}_2(\text{p-cymène})]_2/\text{Ligand}/\text{TEMPO}$, ce dernier est combiné avec la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) et le p-chlorophénylacétate (p-CPA) comme donneur d'acyle dans le toluène et ce dans le but d'avoir un DCD du racémique alcools (schéma 61). Le meilleur résultat est obtenu avec le 1-cyclohexyléthanol dont l'acétate est obtenu avec un bon excès énantiomérique égal à 98% et un rendement chimique de 94% à une conversion totale (C = 100%).

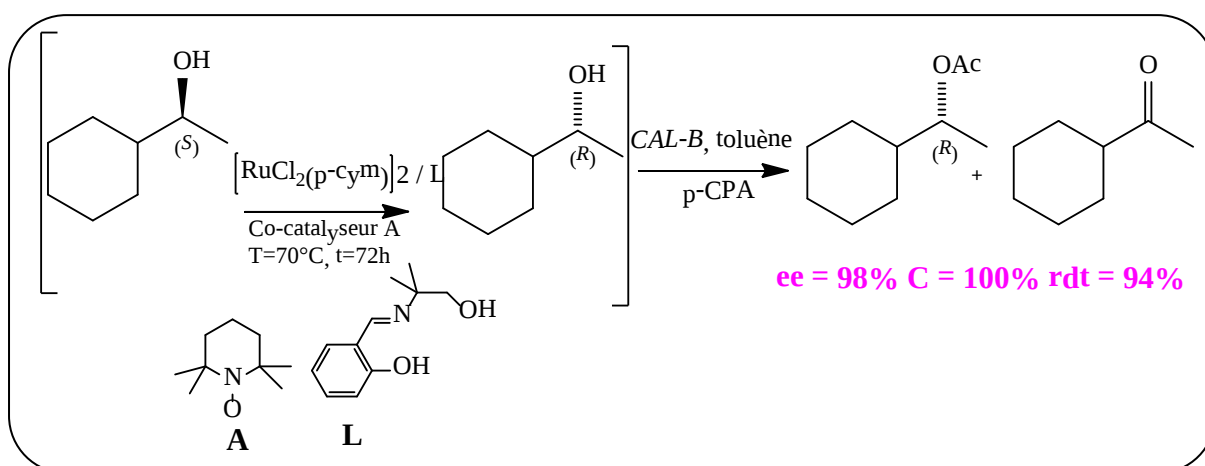


Schéma 61: DCD du 1-cyclohexyléthanol

⁹⁷ M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant ; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1790-1796.

❖ **Dédoublément cinétique dynamique via un couple Aluminium / enzyme :**

Berkessel⁹⁸ et coll ont montré récemment que les complexes d'aluminium pouvaient s'utiliser comme des catalyseurs de racémisation des alcools on se basant sur l'activité catalytique des alkoxides d'aluminium dans la réaction de Meerwein-Ponndorf-Verley-Oppenauer (MPVO). Le complexe alkoxide d'aluminium est généré à partir d'un mélange égal en proportion de AlMe_3 et un ligand bidentate tel que le binol ou le 2,2'-biphénol qui sont des catalyseurs de racémisations efficace pour les alcools.

Le dédoublément cinétique dynamique du 1-phényléthanol est réalisé par une réaction d'acylation catalysé par la *CALB*, avec le 1-phénylvinylacétate comme donneur d'acyle dans le toluène suivie d'une racémisation en présence d' AlMe_3 et le binol. Le produit de déracémisation de configuration (*R*) est obtenu avec une pureté optique égale au rendement chimique (96%). (schéma 62).

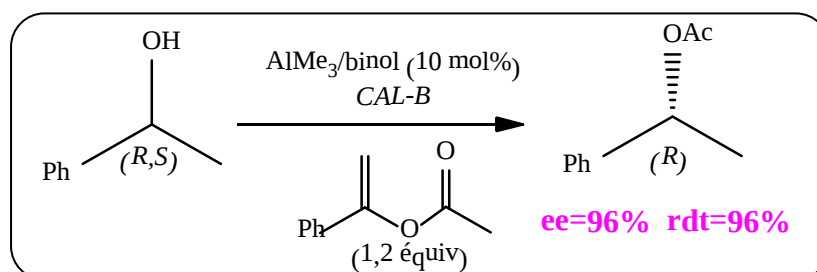


Schéma 62 : DCD d'un alcool benzylique par le système Aluminium / enzyme

III-4-3-4 : Dédoublément cinétique dynamique via une racémisation catalysée par la lumière fluorescente

D'après Park⁹⁹ et coll la lumière fluorescente active le complexe du diruthénium à générer une espèce catalytique possédante une grande activation afin de produire une racémisation des alcools secondaires (schéma 63). En présence de cette lumière en benzène ou en toluène la racémisation s'effectue sur le 1-phényléthanol ($ee = 0,8-3\%$ respectivement) contrairement à son absence qui ne permet pas cette racémisation ($ee\ 99,9\%$).

⁹⁸ A. Berkessel, M I. Sebastian-Ibarz, T N. Müller; Angew. Chem. Int. Ed, **2006**, 45, 6567.

⁹⁹ Y. Do, I-C. Hwang, M-J. Kim, J. Park; J. Org. Chem; **2010**, 75, 5740-5742.

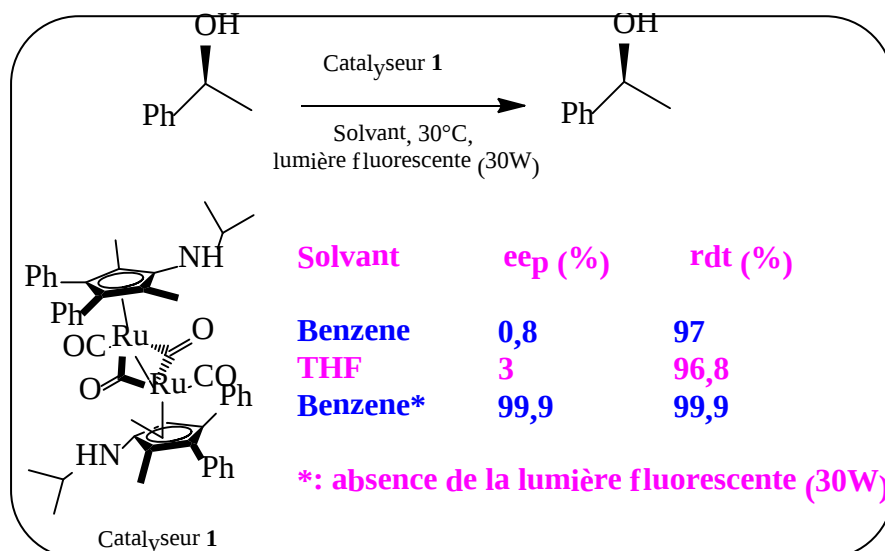


Schéma 63: Racémisation via la lumière fluorescente

Le système catalytique (diruthénium / lumière fluorescente) a été testé dans un dédoublement cinétique dynamique de différents alcools secondaires (schéma 64). Une excellente déracémisation de ces substrats a permis d'obtenir les produits optiquement purs (ee > 99,9%).

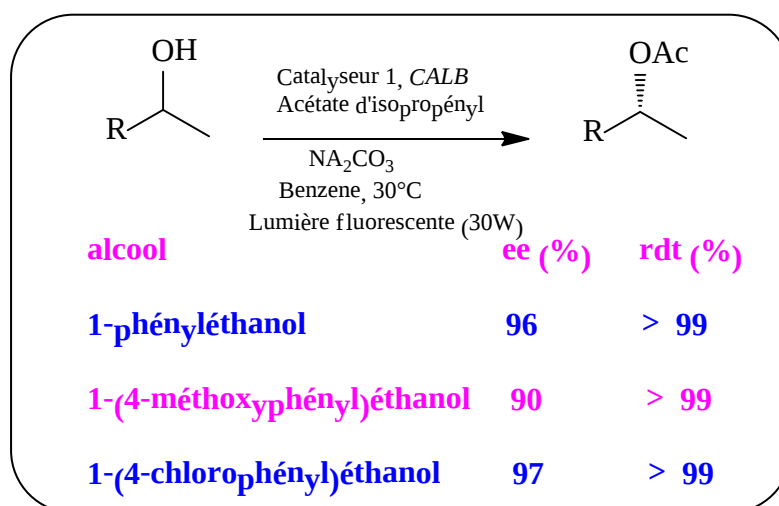


Schéma 64 : DCD catalysé par la lumière fluorescente

III-4-3-5 : Dédoublement cinétique dynamique via une racémisation catalysée par les ondes ultra-courtes

L'irradiation de l'onde ultra-courte est appliquée pour la racémisation et le dédoublement cinétique dynamique (DCD) des amines benzyliques primaires¹⁰⁰. La réaction de racémisation

¹⁰⁰ A N. Parvulescu, E V. der Eycken, P A. Jacobes, D E. De Vos ; Journal of Catalysis, **2008**, 255, 206-212.

catalysée par 5% de Pb/CaSO₄ est rapide et sélective sous les conditions de l'onde ultra-courte. Le catalyseur de racémisation est combiné avec la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) dans un « seul pot » pour accomplir le DCD. L'amide est obtenu optiquement pur (ee=97%) avec un rendement de 88%. (schéma 65).

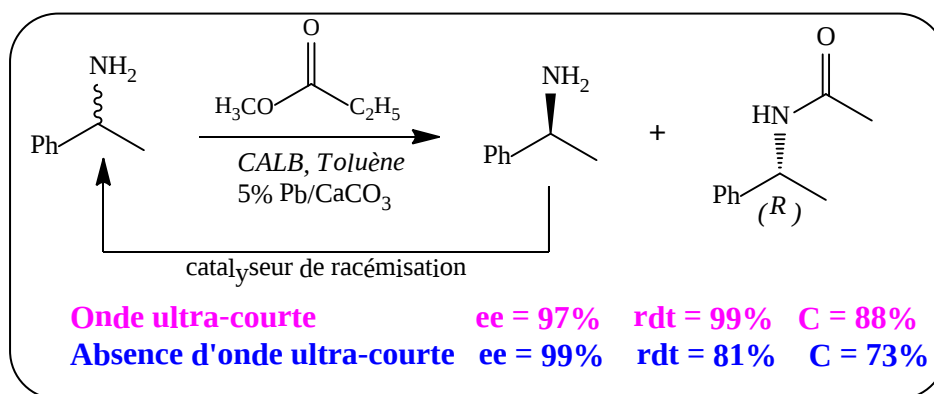


Schéma 65: DCD catalysé par une onde ultra-courte

III-4-3-6 : Dédoublément cinétique dynamique via une racémisation catalysée par l'acide

Un dédoublement cinétique dynamique efficace des alcools secondaires aromatiques qui combine une réaction de transestérification enzymatique et la résine d'acide comme un catalyseur de racémisation a été étudié par l'équipe de Yang¹⁰¹.

La réaction d'acylation catalysée par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) dans le toluène et en présence du 4-chlorophényl valérate comme donneur d'acyle a permis d'obtenir les énantiomères avec de bonnes puretés optiques à une conversion (C = 50%). La transformation de ce dédoublement en DCD est achevée via une racémisation catalysée par un acide (CD8604). L'efficacité de ce catalyseur de racémisation a été largement testée par la même équipe¹⁰². Ce DCD a permis d'obtenir le produit ester avec d'excellents excès énantiomérique et rendement chimique (>99%, >99% respectivement). (schéma 66).

¹⁰¹ G. Xu, Y. Chen, J. Wu, Y. Cheng, L. Yang; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1373-1378.

¹⁰² Y. Cheng, G. Xu, J. Wu, C. Zhang, L. Yang; Tetrahedron Letters, **2010**, 51, 2366-2369.

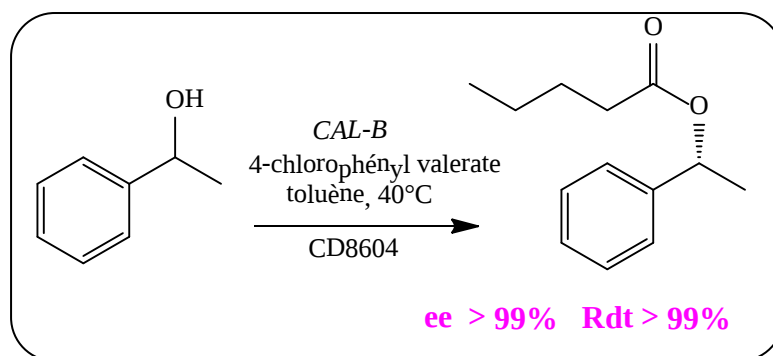


Schéma 66: DCD catalysé par l'acide (CD8604)

III-4-3-7 : Dédoublage cinétique dynamique via une racémisation catalysée par une base

Fülöp¹⁰³ et coll ont étudié le dédoublage cinétique dynamique catalysé par une base afin d'obtenir l'énantiomère (*R*)-1, 2, 3, 4-tétrahydroisoquinoline-1-acide carboxylique (schéma 67). La réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) a permis d'obtenir l'énantiomère (*R*) avec un excès énantiomérique (ee = 94%) et un rendement chimique (rdt = 46%) et l'énantiomère (*S*) avec une pureté optique (ee=92%) et un rendement chimique de 42%. La transformation de ce dédoublage en DCD est achevée via une racémisation catalysée par une base, la dipropylamine, qui racémise le (*S*)-ester. Cette combinaison (hydrolyse/racémisation) a permis d'obtenir le produit (*R*) avec un excès énantiomérique de 96% pour un rendement de 80%.

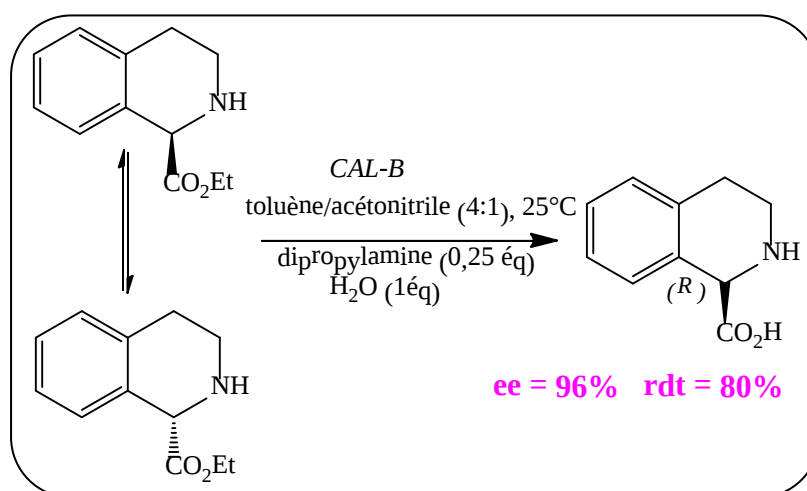


Schéma 67 : DCD catalysé par une base, la Dipropylamine

¹⁰³ T A. Paál, E. Forró, A. Liljeblad, L T. Kanerva, F. Fülöp; Tetrahedron: Asymmetry, **2007**, 18, 1428-1433.

III-4-4 : Le processus d'énantioconvergence

La clé principale du processus énantioconvergent est une transformation énantiosélective de chaque énantiomère individuel du substrat via deux chemins stéréochimiques opposés. Ainsi, et étant donné que l'énantiomère (*R*) réagit pour donner le produit (*P*) avec rétention de configuration, son antipode (*S*) est transformé avec inversion de configuration (schéma 68). Par conséquent, les deux énantiomères du substrat racémique (*R*+*S*) sont convertis en un seul produit stéréochimique avec un rendement chimique théorique de 100%.

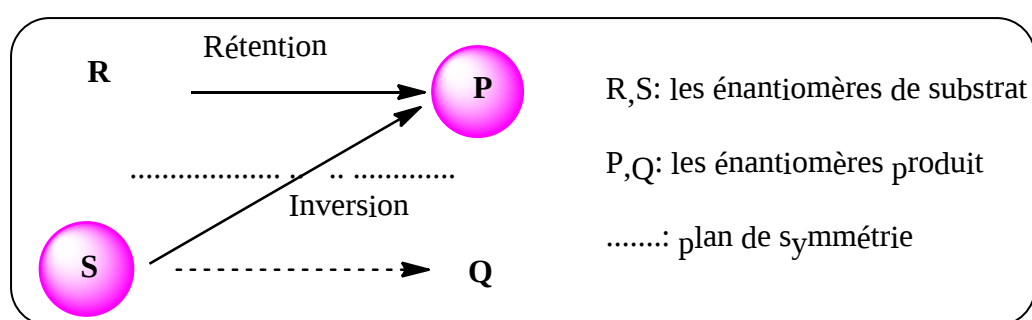


Schéma 68 : Principe de la transformation énantioconvergence.

Il existe trois différents processus d'énantioconvergence qui sont :

a- Énantioconvergence via l'utilisation de deux biocatalyseurs

La biosynthèse énantioconvergente du (*R*)-phényl-1, 2-éthanediol via la combinaison de deux catalyseurs : l'hydrolase époxyde (CcEH) et la (McEH mutant) a été étudié par Min et coll¹⁰⁴ sur l'oxyde du styrène racémique. Ils ont obtenu le produit (*R*)-phényl-1, 2-éthanediol avec une pureté égale à 90% pour un rendement de 95%. (schéma 69).

¹⁰⁴ J Y. Min, E Y. Lee; Journal of Industrial and Engineering Chemistry, **2011**, 18, 160-164.

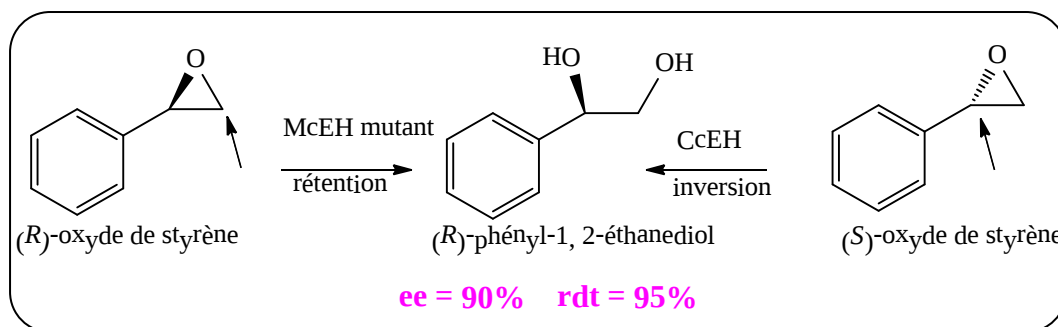


Schéma 69 : Enantioconvergence via deux biocatalyseurs

b- Enantioconvergence par deux catalyseurs, biologique et chimique

Le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de l'époxyde 2-2-disubstitué par l'hydrolase de *Nocardia* EH, donne les (*S*)-diols et les (*R*)-époxydes avec de bonnes sélectivités¹⁰⁵ (ee>86%, rdt>76%), suite à cela, l'époxyde résiduel (*R*) est finalement hydrolysé sélectivement par l'acide sulfurique, avec inversion de configuration, pour donner le (*S*)-diol avec un excès énantiomérique (ee=98%) et un rendement chimique¹⁰⁶ (rdt>98%) (schéma 70).

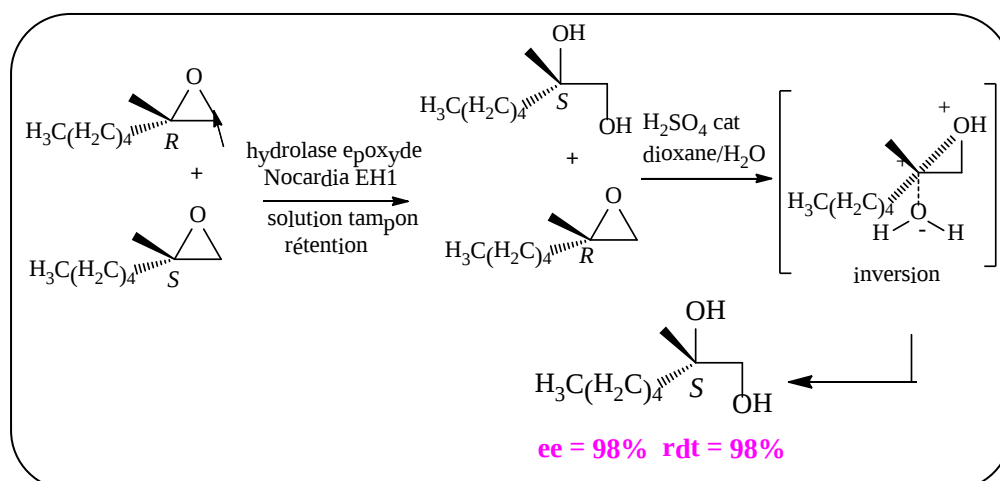


Schéma 70 : Enantioconvergence par deux catalyseurs différents

¹⁰⁵ S.F. Mayer, A. Steinreiber, R.V. Arru, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, 12, 41-43.

¹⁰⁶ R V A. Orru, W. Kroutil, K. Faber; *Tetrahedron: Letters*, **1997**, 38, 1753-1754.

c- Enantioconvergent via un seul biocatalyseur

L'hydrolyse biocatalytique du 2-3-époxyheptane via l'hydrolase *Nocardia* EH1 donne le (2*R*, 3*R*)-heptane-2, 3-diol comme seul produit avec un excès énantiomérique de (*ee*=91%) et un rendement chimique de 79% à une conversion de 100%. Les deux énantiomères sont hydrolysés avec une attaque de [OH⁻] sur l'atome de carbone de configuration (*S*) concomitant avec une inversion de configuration¹⁰⁷. (Schéma 71).

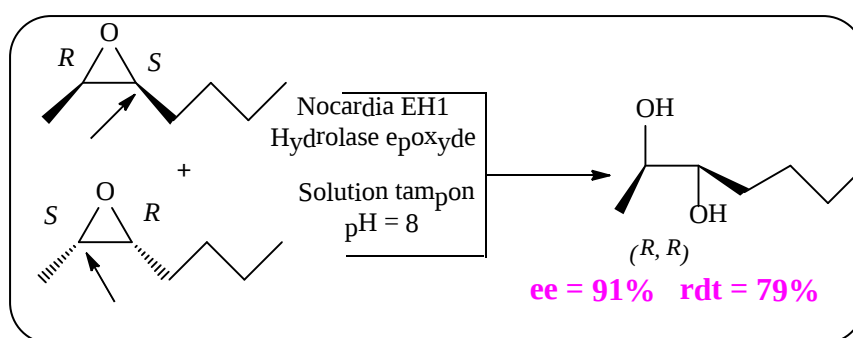


Schéma 71 : Enantioconvergence via un seul biocatalyseur

III-4-5 : Le processus de déracémisation par stéréoinversion

Ce processus basé sur l'inversion de configuration a fait l'objet de plusieurs travaux, notamment par notre équipe, il sera développé en détails dans le quatrième chapitre comme étant l'objectif de notre étude.

III-5 : Conclusion

La réaction de déracémisation est une nouvelle réaction mise en œuvre depuis 1998. Elle est utilisée pour l'obtention des composés optiquement purs avec un rendement chimique théorique de 100%. Elle a un grand intérêt sur le plan économique et environnemental, elle permet d'accéder à ces énantiomères avec un rendement maximum. Nous avons décrit dans ce chapitre les différentes méthodes utilisées avec de nombreux exemples d'application. La racémisation de l'énantiomère non désiré est une étape importante du processus de déracémisation.

¹⁰⁷ W. Kroutil, M. Mischitz, P. Plachota, k. Faber; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 8379-8382.

D'après la littérature, la méthode de déracémisation la plus utilisée est celle du dédoublement cinétique dynamique (métal / enzyme) avec divers métaux. Nous avons essayé de rapporter dans ce chapitre les protocoles les plus importants et les plus utilisés ces dernières années.

Première partie

Quatrième chapitre

Le processus de stéréoinversion

IV-1 : Introduction

Parmi les méthodes de déracémisations, on observe, la déracémisation par stéréo-inversion qui est en progression¹⁰⁸ et qui présente un grand intérêt. Le terme de « stéréo-inversion » a été proposé pour la première fois par Hafner¹⁰⁹. Cette approche de déracémisation ne fait pas appel à une réaction de racémisation « in situ », mais plutôt, à l'intervention d'un intermédiaire prochiral dans les réactions biologiques d'oxydoréduction soit directement par inversion chimique, deux stratégies que nous détaillerons ci-après.

IV-1-1- La première stratégie décrit une stéréo-inversion par oxydoréduction, qui permet la déracémisation du racémique en un seul énantiomère comme elle permet aussi la transformation d'un énantiomère pur à son antipode optique¹¹⁰ (schéma 72).

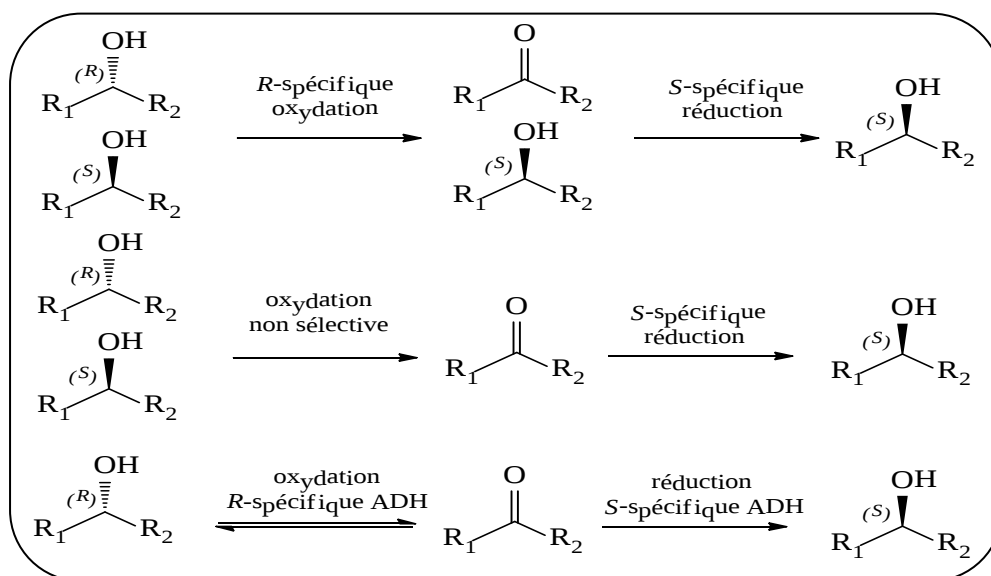


Schéma 72: 1^{ère} stratégie de déracémisation par stéréoinversion

via la réaction d'oxydo-réduction

Dans ce contexte, nous citons le travail de Sun et coll¹¹¹, qui ont étudié le processus d'obtention de l'énantiomère (S)-1-phényl-1,2-éthanediol via des microorganismes. Le processus mis en jeu est un processus de stéréo-inversion qui implique deux réactions successives d'oxydoréductions en présence des oxydoréductases pour régénérer les

¹⁰⁸ L. Ou, D. Ludwig, J. Pan, J. H. Xu, Organic Process Research & Development, **2008**, 12, 192-195

¹⁰⁹ E. W. Hafner and D. Wellner, Proc. Nat. Acad. Sci, **1971**, 68, 987-991.

¹¹⁰ M. Hall and Andreas S. Bommarius, Chem. Rev, **2011**, 111, 4088-4110.

¹¹¹ X. Q. Mu, Y. Xu, M. Yang, Z. H. Sun, Process Biochemistry, **2011**, 46, 233-239.

cofacteurs. Ils ont obtenu le produit désiré avec un bon rendement chimique (rdt=82,5%) et une pureté optique de (ee=91,6%) comme le montre le schéma 73.

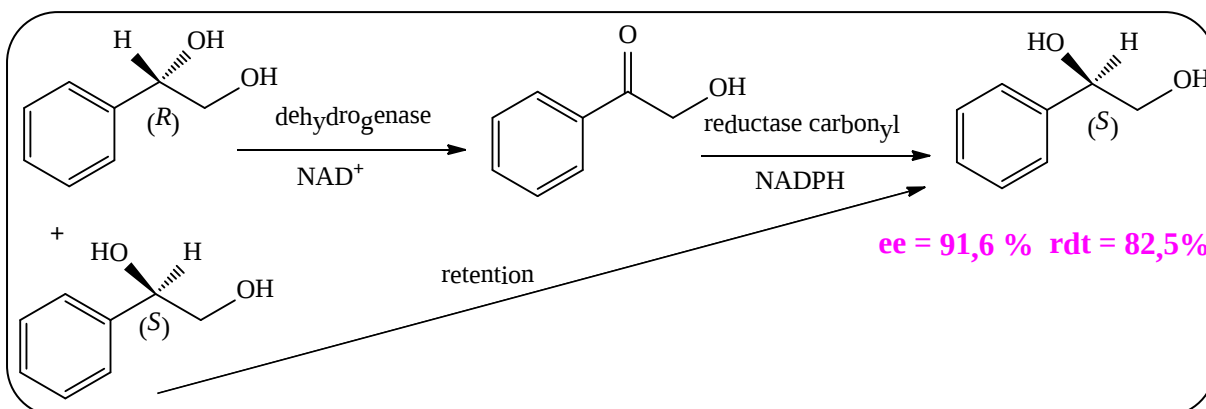


Schéma 73 : Déracémisation via le processus de stéréo-inversion de l'énantiomère

(R)-1-phényl-1,2-éthanediol

Au même titre, l'équipe de Xu¹¹² a fait la déraccémisation des alcools aryl secondaires racémique. La stéréo-inversion de l'énantiomère alcool (R) en énantiomère (S) se fait avec succès (ee>99% et rdt>99%) via une oxydation énantiosélective et une réduction stéréosélective simultanées avec les cellules entières comme biocatalyseur de l'alcool déshydrogénase et de la cétone réductase dans le même pot avec une stéréosélectivité opposée. Les deux catalyseurs possèdent le système de régénération des cofacteurs in vivo. (Schéma 74).

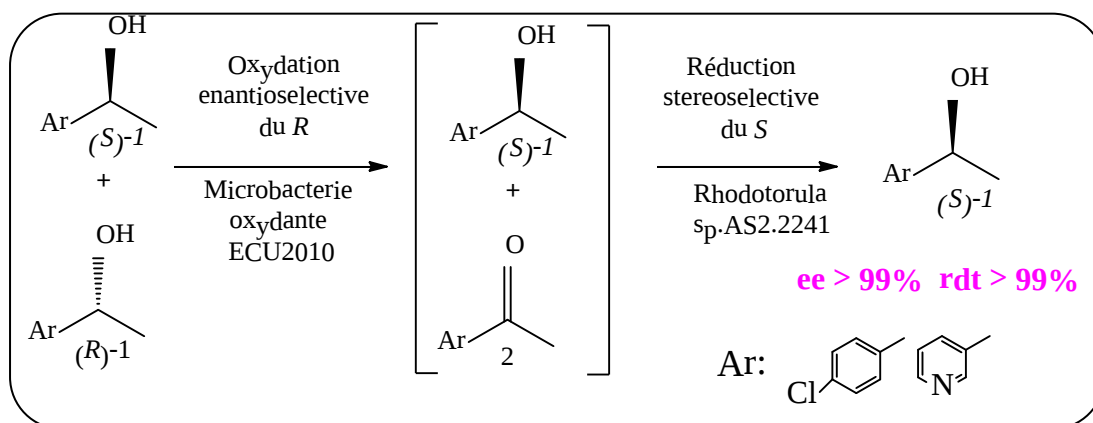


Schéma 74 : Déracémisation des alcools aryl secondaires via une réaction d'oxydoréduction tandem

¹¹² Y-L. Li, J-H. Xu, Y. Xu, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2010**, 64, 48-52.

Au même titre, la déracémisation du 1-phényléthanol en présence de *Candida albicans* CCT 0776 a été décrite par Simone¹¹³ et coll, qui ont déracémisé cet alcool secondaire via une oxydation avec le NADP^+ hautement sélective de l'énantiomère (S) pour donner l'intermédiaire achiral et laissé l'énantiomère (R) sans le toucher dans une première étape, ceci, suivi d'une réduction partiellement sélective lente de la cétone avec le NADH. Donc le (R) est obtenu avec un rendement quantitatif et un excès énantiomérique supérieur à 98% après 24 heures. (Schéma 75)

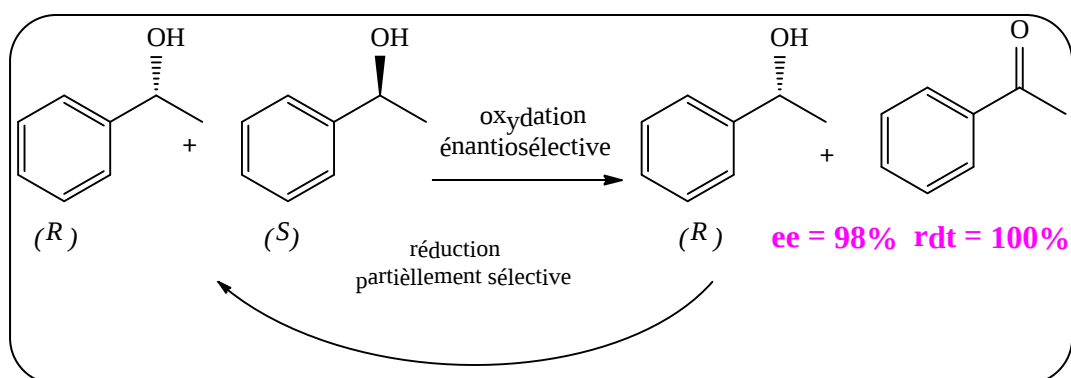


Schéma 75 : Déralcémisation du 1-phényléthanol par stéréo-inversion.

IV-1-2- La deuxième stratégie comprend deux méthodes principales : **la première (Méthode A)** est une réaction indirecte dans laquelle les alcools chiraux sont convertis en premier lieu pour engendrer le groupement partant (mésylate, tosylate, triflate, sulfate, nitrate, borate, etc.) sur l'alcool formé, ces alcools subiront par la suite, une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$ via les nucléophiles utilisés. **La seconde (Méthode B)** est une méthode directe dans laquelle les alcools chiraux sont convertis directement via la réaction de Mitsunobu. (Schéma 76).

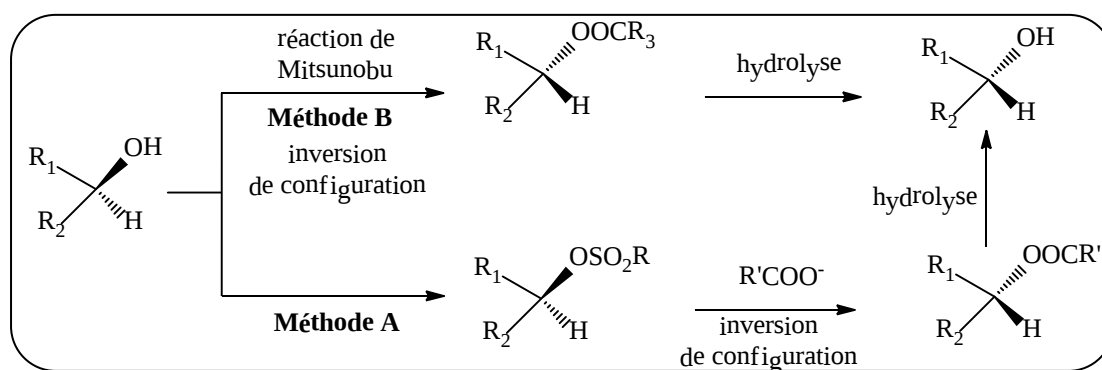


Schéma 76: Deux principales méthodes pour l'inversion des alcools chiraux

¹¹³ S M. Mantovani, C F. F. Angolini, A J. Marsaioli; Tetrahedron: Asymmetry, **2009**, 20, 2635-2638.

Dans l'optique de la première méthode, **la méthode A** (schéma 76), nous citons l'inversion des sulfonates secondaires énantiomériquement purs via la substitution S_N2 en présence du complexe $R_3N-R'COOH$ dans le toluène. Cette inversion a permis d'obtenir les esters correspondants avec des rendements chimiques élevés sans la moindre racémisation comme l'exemple¹¹⁴ suivant. (Schéma 77).

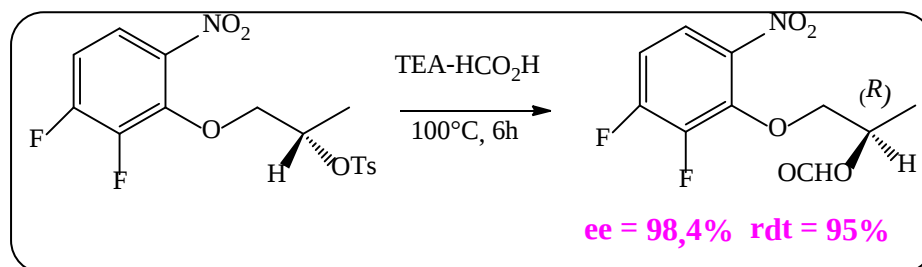


Schéma 77 : Inversion du sulfonate via le couple acide-base

Un autre exemple a été rapporté par le groupe d'Orita¹¹⁵. Cet exemple illustre l'inversion par voie chimique des mésylates et tosylates secondaires sur la surface du solide CsF dans le DMF. Les deux produits acétates sont obtenus avec une excellente pureté optique ($ee=99\%$) et des rendements chimiques élevés $93\% < rdt < 99\%$ (schéma 78).

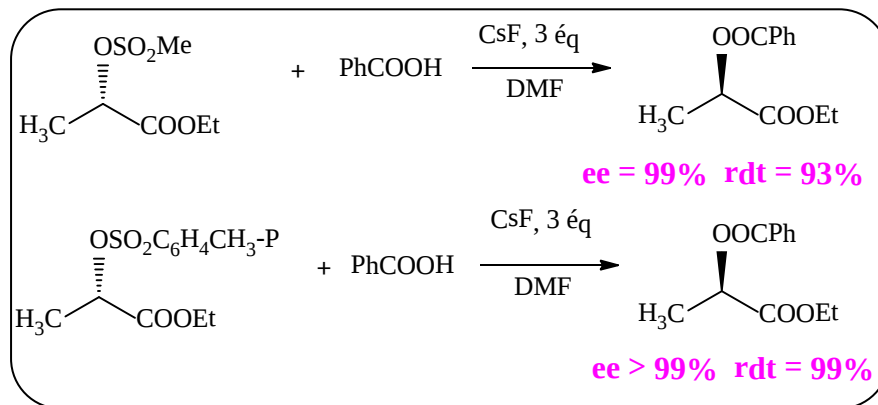


Schéma 78: Inversion des mésylates et tosylates par la substitution-CsF

Au même titre Nakata et coll¹¹⁶ ont décrit l'inversion des alcools secondaires en utilisant le (chlorométhylsulfonyl)oxy et les triflates comme de bons groupements partants avec l'acétate de césium (CsF) en présence de l'éther couronne le 18-crown-6. (schéma 79).

¹¹⁴ X.-X. Shi, C.-L. Shen, J.-Z. Yao, L.-D. Nie, N. Quan, Tetrahedron : Asymmetry, **2010**, 21, 277-284.

¹¹⁵ J. Otera, K. Nakazawa, K. Sekoguchi and A. Orita, Tetrahedron, **1997**, 53, 13633-13640.

¹¹⁶ T. Shimizu, S. Hiranuma, T. Nakata, Tetrahedron Letters, **1996**, 37, 6145-6148.

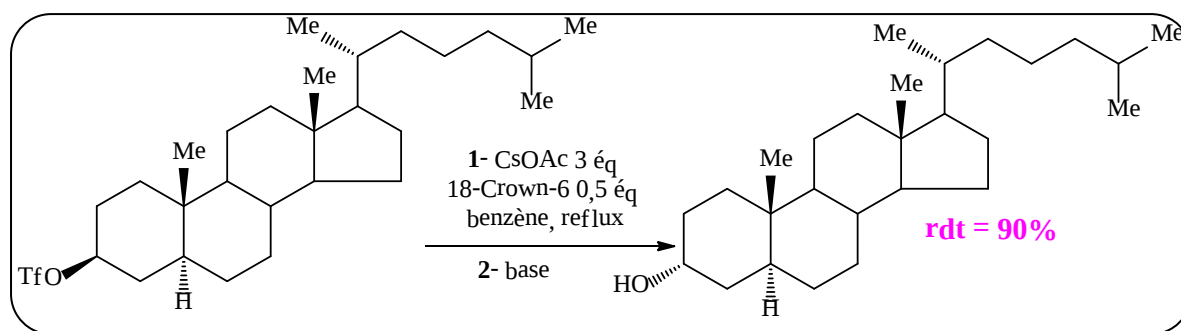


Schéma 79 : Inversion des alcools secondaires avec l'acétate de césium

Cette méthode **(A)** permet la réaction de déracémisation, et ce, avec sa combinaison avec les deux réactions d'acylation et d'hydrolyse enzymatiques. Deux exemples seront présentés :

- a- Déracémisation par hydrolyse enzymatique combinée à une stéréoinversion chimique
- b- Déracémisation par transestérification enzymatique combinée à la stéréo-inversion chimique

a- Déracémisation par hydrolyse enzymatique combinée à une stéréoinversion chimique

Danda et coll¹¹⁷ ont décrit une approche de déracémisation par hydrolyse enzymatique combinée à une stéréoinversion chimique. Après une hydrolyse enzymatique sélective ($E > 100$), les deux énantiomères sont obtenus énantiomériquement purs ($ee > 99\%$). Un dédoublement chimique s'effectue directement « in situ » sur le produit de la réaction par le chlorure de mésyle pour former le groupement partant. Après l'inversion, le mélange est traité par une base forte afin de donner l'énantiomère (*S*)-4-hydroxy-3-méthyl-2-(2-propynyl)-2-cyclopentèn-1-one avec une pureté optique ($ee = 93,6\%$) et un rendement chimique ($rdt = 90\%$). (schéma 80).

¹¹⁷ T. Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, Tetrahedron, **1991**, 47, 8701-8716.

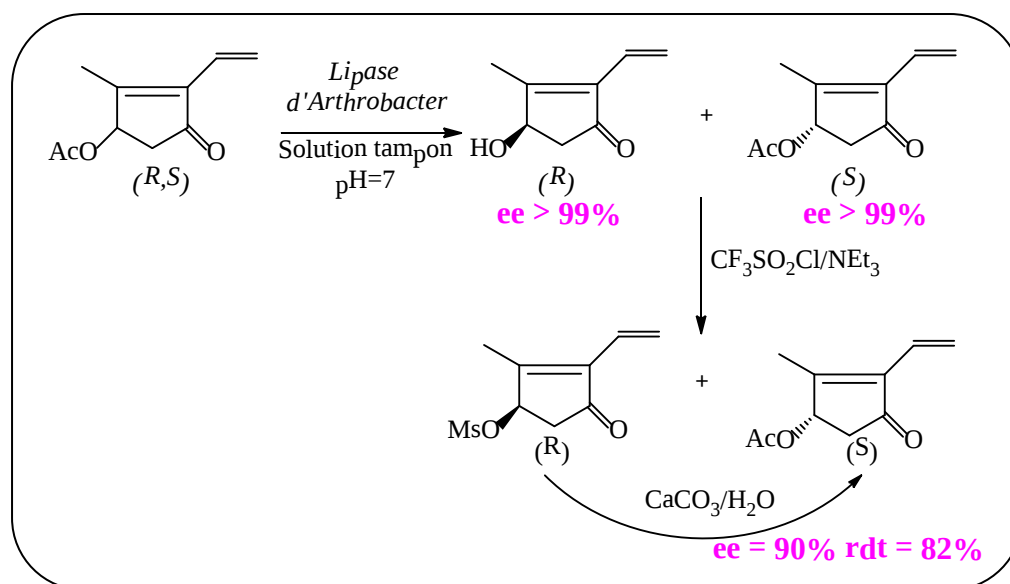


Schéma 80: Déracémisation par une combinaison d'une hydrolyse enzymatique et une stéréo-inversion « in situ »

b- Déracémisation par transestérification enzymatique combinée à la stéréoinversion chimique

Kanerva et coll.¹¹⁸, ont obtenu l'énantiomère (R)-acétoxybutanoate à partir de l'éthyl-3-hydroxybutanoate racémique avec un excès énantiomérique élevé (ee = 92%) et un rendement chimique (85% < rdt < 90%) par acylation énantiosélective avec l'acétate d'isopropényle comme agent acylant en présence de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B), suivi par une réaction chimique de mésylation « in situ » de l'énantiomère (S)-alcool avec inversion de configuration via l'acétate de césium dans le DMF. Le (R)-acétoxybutanoate est soumis à une réaction d'alcoolyse avec l'éthanol et la CAL-B, ce dernier est obtenu avec (ee > 99%). (schéma 81).

¹¹⁸ M.C. Turcu, E. Kiljinen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2007**, 18, 1682-1687.

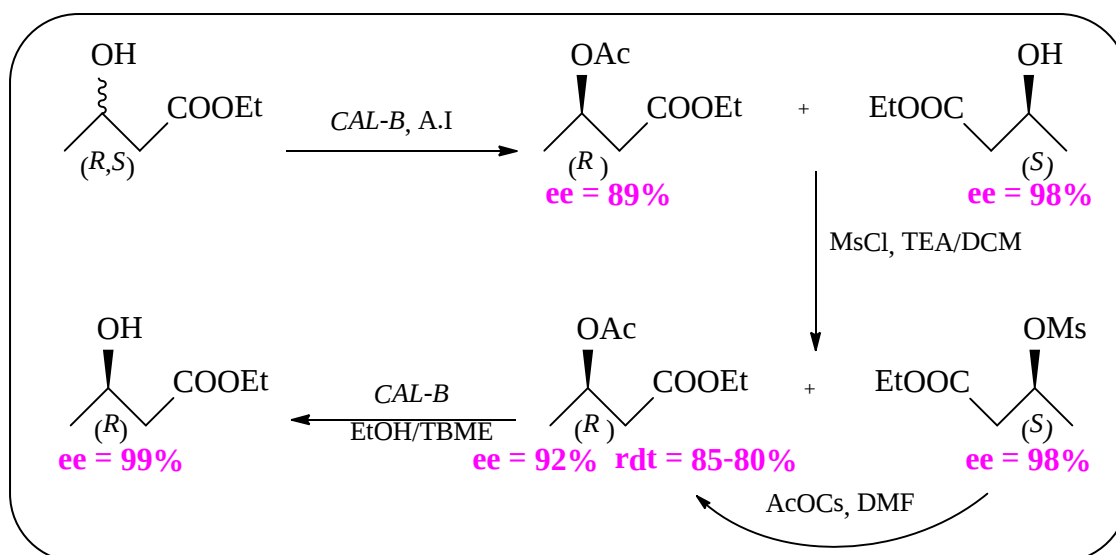


Schéma 81 : Déracémisation de l'éthyl-3-hydroxybutanoate par acylation enzymatique combiné à une stéréo-inversion « in situ »

L'autre méthode est une méthode directe, la **méthode B** (schéma 76) très utilisée, qui est basée sur une substitution nucléophile dans laquelle les alcools chiraux sont convertis directement avec une inversion totale de leur stéréochimie. Cette alternative directe est la réaction de Mitsunobu¹¹⁹, qui utilise une substitution nucléophile procédante par une inversion globale de configuration (schéma 82).

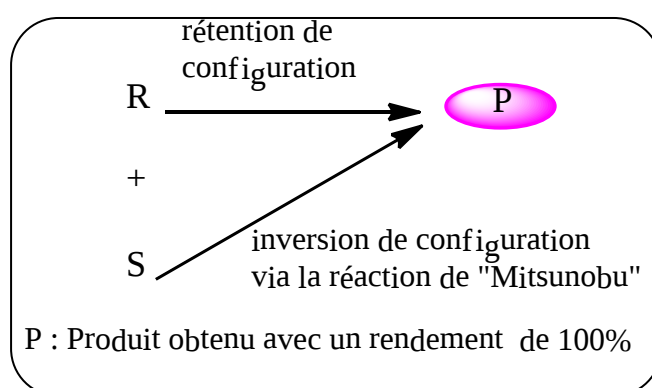


Schéma 82 : Principe de déracémisation par stéréoinversion de Mitsunobu

¹¹⁹ (a) O. Mitsunobu, M. Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn, **1967**, 40, 2380-2382. (b) O. Mitsunobu, M. guchi, Bull. Chem. Soc. Jpn, **1971**, 44, 3427.

a: La réaction de Mitsunobu

En 1967, Mitsunobu et Yamada¹²⁰ ont rapporté l'estérification des acides carboxyliques avec les alcools primaires et secondaires en utilisant le diéthyl azodicarboxyate (DEAD) et de la triphényl phosphine (TPP). En 1971, Mitsunobu et Eguchi¹²¹ ont montré que la condensation d'un acide carboxylique avec un alcool secondaire optiquement pur, en utilisant le système redox formé par le DEAD et la TPP, permet de former un ester avec une inversion de la stéréochimie des alcools secondaires.

Le processus global de cette réaction permet d'inverser la stéréochimie via un processus d'estérification/hydrolyse tel que le montre le schéma 83.

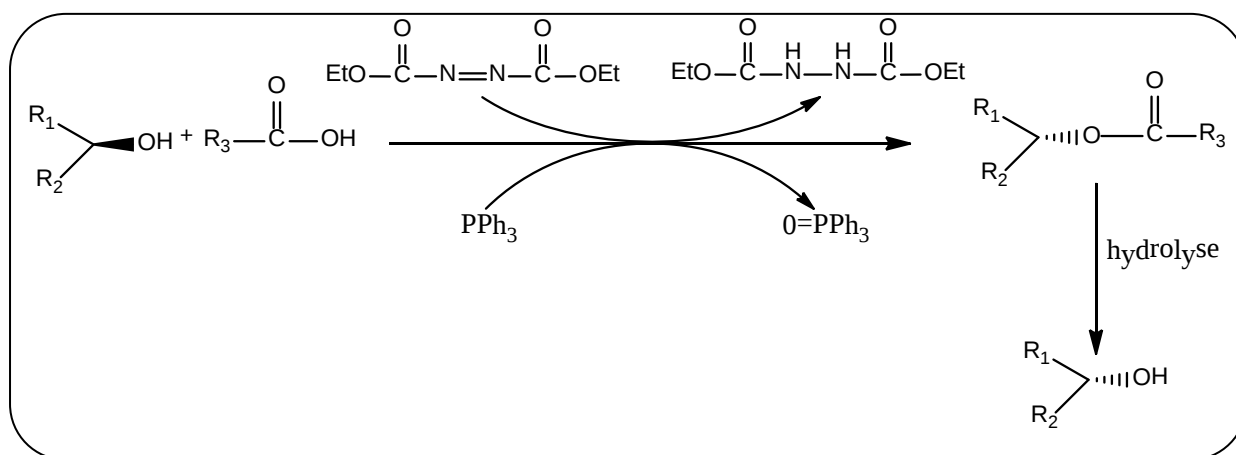


Schéma 83: Estérification d'un alcool secondaire via le protocole de Mitsunobu.

La réaction de Mitsunobu est une réaction de substitution inter- ou intra moléculaire entre un alcool et un nucléophile qui utilise un système redox avec la TPP qui est oxydée et le DEAD qui est réduit.

Cette réaction se déroule dans des conditions réactionnelles douces (0-25°C) compatible avec une grande variété de groupements fonctionnels qui permet de remplacer un groupement hydroxyle par une variété de nucléophiles, la simplicité du protocole expérimental et surtout l'inversion de la stéréochimie rend cette méthode très utilisée en chimie organique. On constate que, la recherche des abstracts résumés par exemple¹²², en « SciFinder » avec «

¹²⁰ Réf 119(a): O. Mitsunobu, M. Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn, **1967**, 40, 2380-2382

¹²¹ Réf 119(b): O. Mitsunobu, M. Eguchi, Bull. Chem. Soc. Jpn, **1971**, 44, 3427.

¹²² K. C. Kumara Swamy, N. N. Bhuvan Kumar, E. Balaraman, K. V. P. Pavan Kumar, Chem. Rev, **2009**, 109, 2551-2651.

réaction mitsunobu » entre 1996 et 2008, montre à peu près 1615 rapports incluant 186 brevets, ce qui montre l'utilité de cette réaction.

b- Mécanisme de la réaction de Mitsunobu

Le mécanisme de la réaction de Mitsunobu procède généralement en 3 étapes¹²³. Dans la première étape, la TPP réagit rapidement avec le DEAD pour former un adduit P-N zwitterionique, communément appelé la « bétaine de Mitsunobu », lequel se protonne en présence de NuH pour former un sel phosphonium (carboxylate d'azophosphonium). Dans une deuxième étape, l'alcool est activé par le transfert du groupement phosphonium pour former le sel d'oxophosphonium et l'hydrazine réduite comme sous-produit. Finalement, dans une troisième étape, le sel d'oxophosphonium subit une réaction de substitution de type S_N2 par le nucléophile déprotoné pour former le produit désiré avec une configuration inversée du centre chiral concerné et l'oxyde de tri phényl phosphine comme deuxième sous produit (schéma 84).

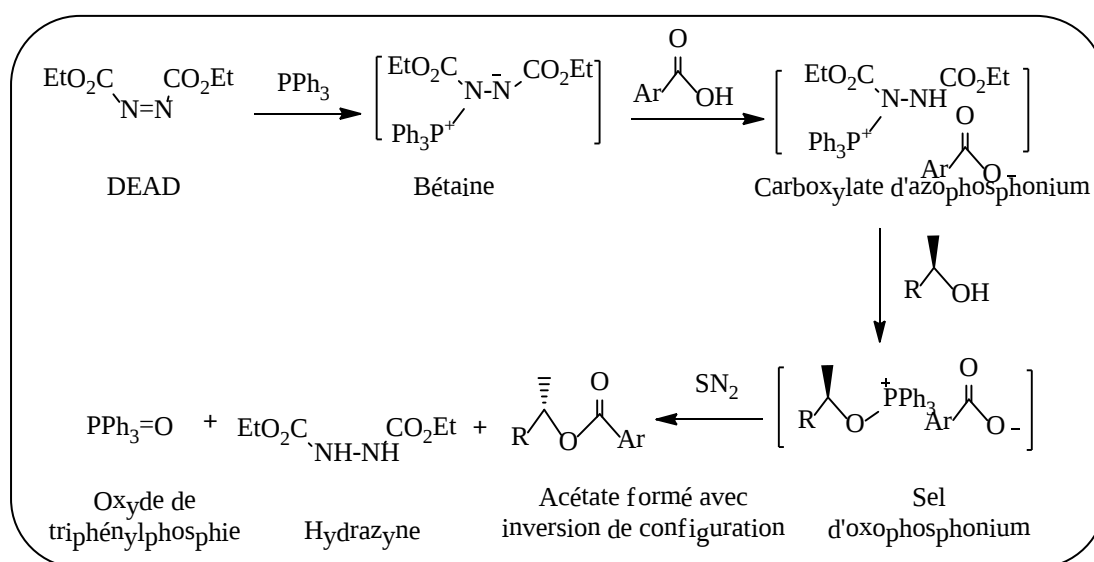


Schéma 84: Mécanisme de la réaction de Mitsunobu

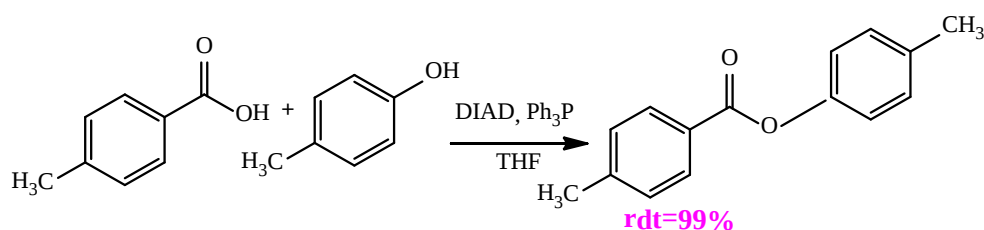
c- Utilisation de la réaction de Mitsunobu en synthèse organique

La réaction de Mitsunobu est une réaction d'alkylation qui utilise le système redox entre le diéthylazodicarboxylate (DEAD) et le tri phénylphosphine (TPP), elle est très utilisée en

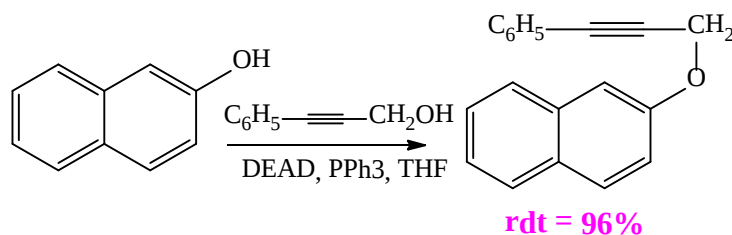
¹²³ (a) E. Grochowski, B. D. Hilton, R. J. Kupper, C. J. Michejda, J. Am. Chem. Soc, **1982**, 104, 6876-6877; (b) D. L. Hughes, R. A. Reamer, J. J. Bergan, E. J. J. Grabowski, J. Am. Chem. Soc, **1988**, 110, 6487-6491.

synthèse organique pour la condensation des alcools et différents nucléophiles. Ces derniers peuvent être les acides carboxyliques, les phénols, les imides, les thiols, et les thioamides. Avec l'utilisation de cette méthode, les alcools peuvent être transformés en esters, thioesters, éthers et en amines. En général, la réaction de Mitsunobu est utilisée pour la construction de différentes liaisons. Le schéma 85 montre quelques exemples sur les applications de cette réaction en synthèse organique.

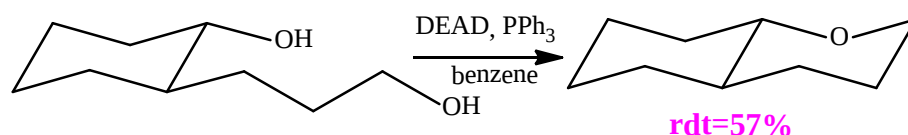
- L'estérification via la réaction de Mitsunobu¹²⁴:



- Ethérification sans cyclisation via la réaction de Mitsunobu¹²⁵:



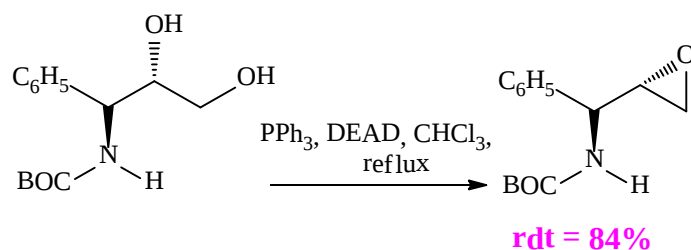
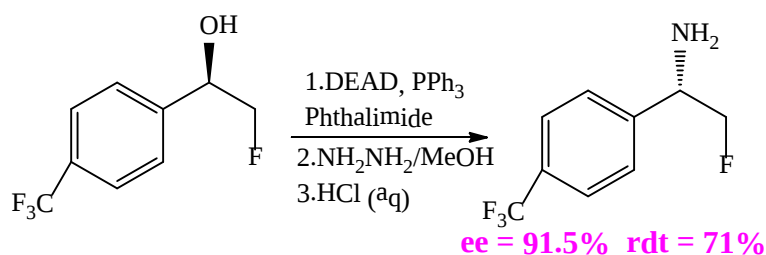
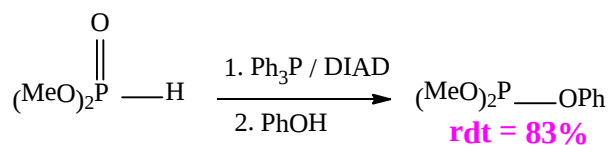
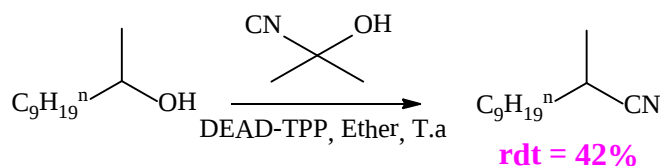
- Ethérification avec cyclisation (intramoléculaire) via la réaction de Mitsunobu¹²⁶:

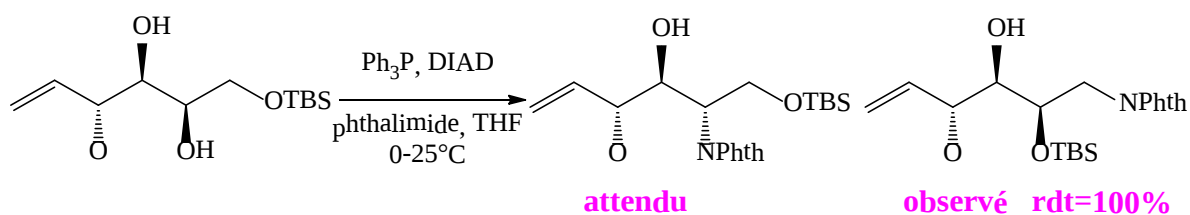


¹²⁴ V. P. Fitzjarrald, R. Pongdee, Tetrahedron Letters, **2007**, 48, 3553-3557.

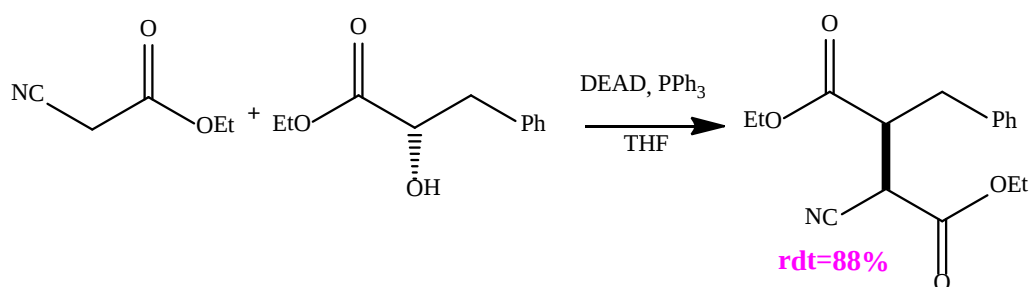
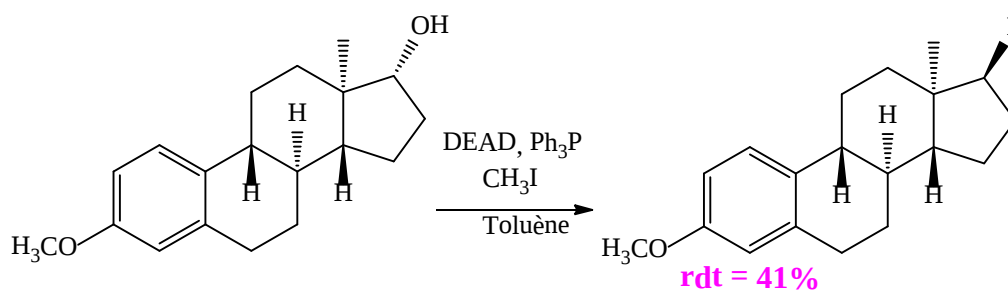
¹²⁵ V. S. Prasada Rao Lingam, D. H. Dahale, K. Mukkanti, B. Gopalan, A. Thomas, Tetrahedron Letters, **2012**, 53, 5695-5698.

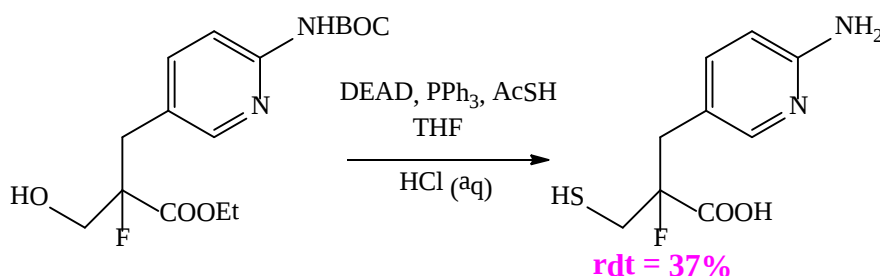
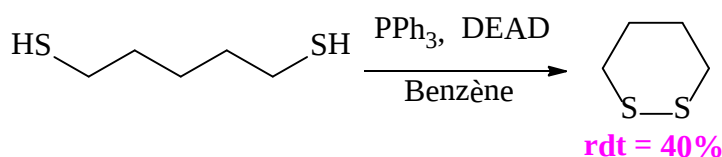
¹²⁶ T. Tsunoda, F. Ozaki, N. Shirakata, Y. Tamaoka, H. Yamamoto, S. Itô, Tetrahedron Letters, **1996**, 37, 2463-2466.

- Formation d'époxyde via la réaction de Mitsunobu¹²⁷:- La liaison C-N¹²⁸:- Phosphitylation via la réaction de Mitsunobu¹²⁹:- Cyanation via la réaction de Mitsunobu¹³⁰:¹²⁷ P. Castejón, M. Pastó, A. Moyano, M. A. Pericàs, A. Riera, *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 3019-3022¹²⁸ T. H. Krane Thvedt, E. Fuglseth, E. Sundby, B. H. Hoff, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6733-6743.¹²⁹ I. D. Grice, P. J. Harvey, I. D. Jenkins, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 1087-1090.¹³⁰ T. Tsunoda, K. Uemoto, C. Nagino, M. Kawamura, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 7355-7358.

- Migration via la réaction de Mitsunobu¹³¹:

- Formation des liaisons via la réaction de Mitsunobu :

➤ La liaison C-C¹³²:➤ La liaison C-halogène¹³³:¹³¹ R. S. Perali, S. Mandava, V. R. Chunduri, Tetrahedron Letters, **2011**, 52, 3045-3047.¹³² T.S.M. Kurihara, I. Kime, M. Wada, O. Mitsunobu, Bull. Chem. Soc. Jpn. **1981**, 54, 2107-2112.¹³³ Z.Y. Cai, D. F. Covey, Steroids, **2007**, 72, 351-359.

➤ La liaison C-S¹³⁴:➤ La liaison S-S¹³⁵:Schéma 85: Quelques applications de la réaction de Mitsunobu en synthèse organique**d- Les paramètres influant sur la réaction de Mitsunobu**

En présence d'un acide, la réaction de Mitsunobu est définie comme étant la seule réaction d'inversion qui utilise un système redox, à savoir, le diéthylazodicarboxylate (DEAD) ou le diisopropylazodicarboxylate (DIAD) et la triphénylphosphine (TPP). En plus, du substrat, du système redox et de l'acide, d'autres paramètres extérieurs peuvent aussi influencer sur la substitution nucléophile tels que les bases.

➤ **Influence de la nature du substrat**

L'influence de ce paramètre sur la réaction d'acylation de Mitsunobu a été étudiée par Itô et coll¹³⁶. L'utilisation d'alcools possédant des encombrements stériques différents (schéma 86) montre l'efficacité de la réaction de Mitsunobu envers ces substrats.

¹³⁴ M. O. Polla, L. Tottie, C. Nordén, M. Linschoten, D. Müsil, S. Trumpp-Kallmeyer, I. R. Aukrust, R. Ringom, K. H. Holm, S. M. Neset, M. Sandberg, J. Thumond, P. Yu, H. Anderson, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 1151-1175.

¹³⁵ D. Camp, I. D. Jenkins, *Aust. J. Chem.* **1990**, 43, 161.

¹³⁶ T. Tsunoda, Y. Yamamiya, Y. Kawamura, S. Itô; *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 2529-2530.

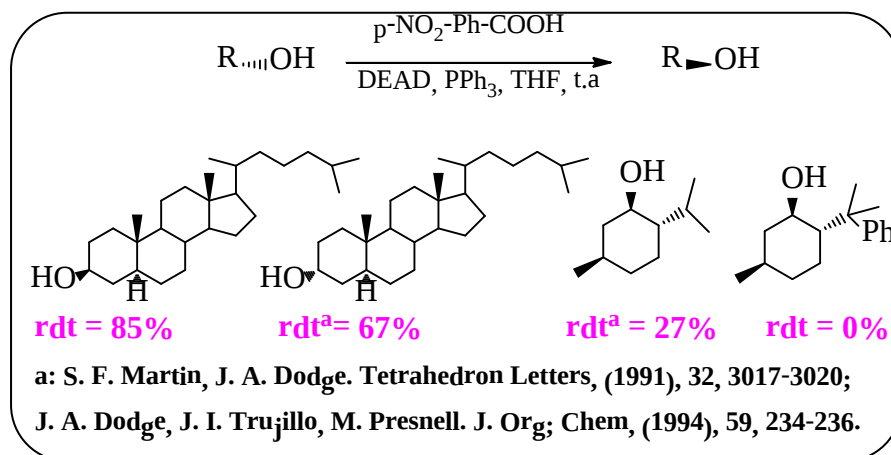


Schéma 86: Influence du substrat sur la réaction de Mitsunobu

Influence du système redox

➤ Influence du dialkyl azodicarboxylate

Afin de tester l'influence du paramètre azodicarboxylate sur la réaction de Mitsunobu, Toy et coll¹³⁷ ont effectué une estérification d'un alcool primaire le 2-phényléthanol avec l'acide 4-nitrobenzoïque en présence de la triphényl phosphine (TPP) et différents réactifs azodicarboxylates dans le tétrahydrofurane (THF) comme solvant. Le meilleur rendement a été obtenu avec le réactif de Mitsunobu le DEAD (rdt = 90%) (schéma 87).

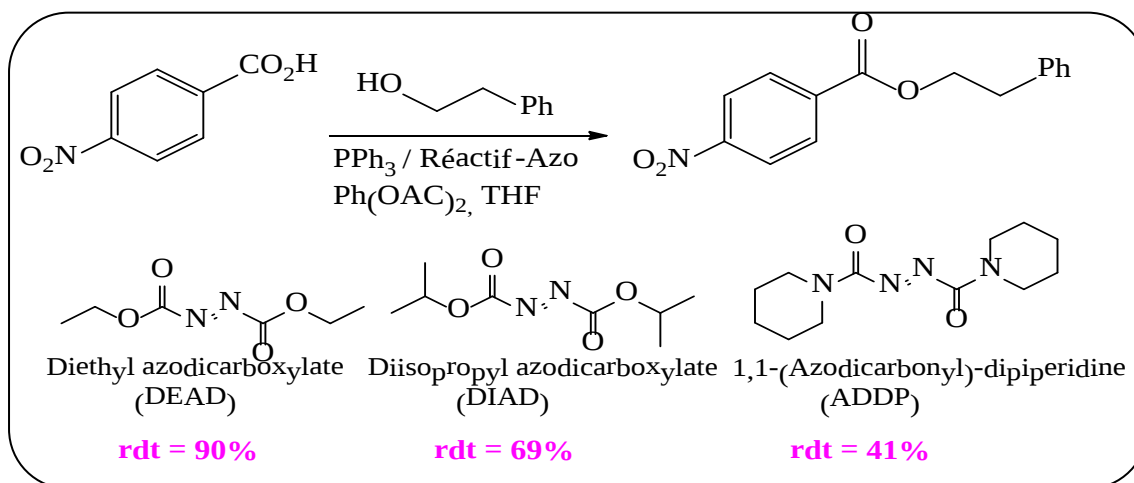


Schéma 87: L'estérification de l'acide 4-nitrobenzoïque via le protocole de Mitsunobu

¹³⁷ T. Y. S. But, P. H. Toy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9636-9637.

Depuis la découverte de la réaction de Mitsunobu, les chercheurs ne cessent de s'intéresser à la synthèse de nouveaux réactifs alkyl azodicarboxylates qui donnent de bons rendements chimiques susceptibles d'être compatibles avec le maximum de substrats.

Dans ce contexte, l'équipe de Yingqi Chen ont synthétisé deux nouveaux réactifs, le Di-p-nitrobenzyle azodicarboxylate (DNAD)¹³⁸ avec un rendement (rdt = 83,6%) et le dicyclopentyl azodicarboxylate (DCpAD) avec un rendement (rdt = 96%). L'équipe a testé les deux réactifs synthétisés avec diverses combinaisons (alcool / nucléophile) dans une réaction d'estérification. Les produits esters sont obtenus avec de bons rendements chimiques (schéma 88).

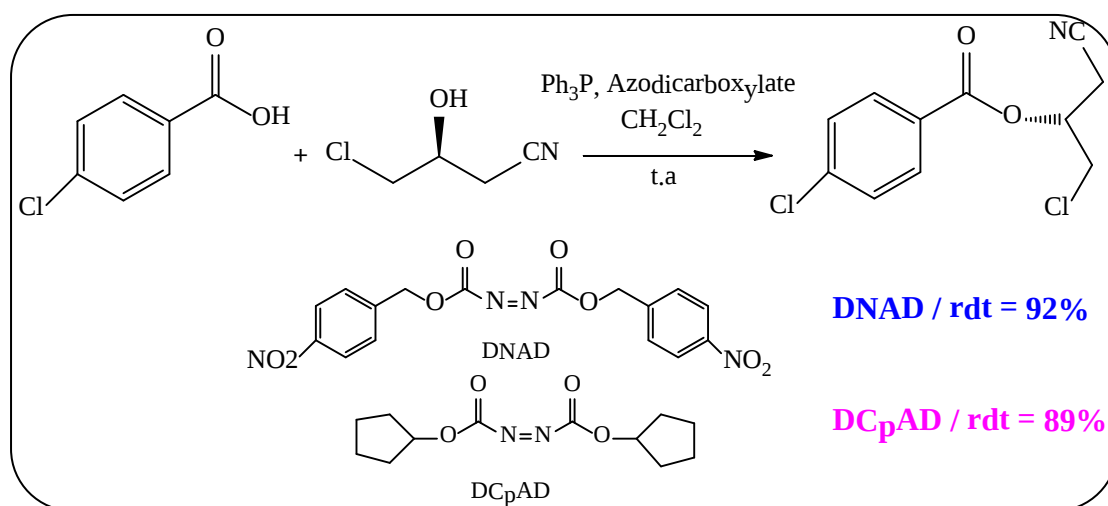


Schéma 88: Estérification avec les nouveaux azodicarboxylates sous les conditions de Mitsunobu

Au même titre, Sugimura et coll¹³⁹ ont synthétisé le di-2-méthoxyéthyl azodicarboxylate (DMEAD) avec un rendement (rdt = 65%). Après, ils ont étudié l'efficacité de ce nouveau réactif sur le (2R, 4R)-2,4-pentanediol stéréochimiquement pur en présence de plusieurs acides. Les bons rendements obtenus encouragea l'équipe de l'utiliser via la combinaison les alcools secondaires et primaires / nucléophiles. Les esters sont obtenus avec de bons rendements. (schéma 89).

¹³⁸ J. Yang, L. Dai, X. Wang, Y. Chen, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 1456-1462.

¹³⁹ K. Hagiya, N. Muramoto, T. Misaki, T. Sugimura, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 6109-6114.

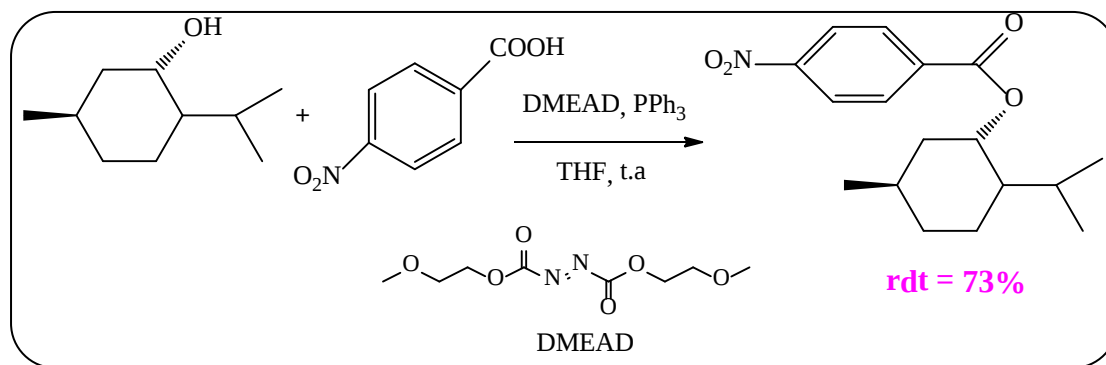


Schéma 89: Estérification avec le DMEAD

IV-2 : Déracémisation par DCE combiné à la réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est utilisée en déracémisation combinée avec les réactions de dédoublements cinétiques enzymatiques de transestérification¹⁴⁰ et d'hydrolyse enzymatique¹⁴¹, et ce, bien que dans la littérature il apparaît qu'elle soit majoritairement appliquée en combinaison avec l'acylation enzymatique.

IV-2-1 : Combinaison de la réaction de Mitsunobu avec l'acylation enzymatique

Au cours d'une étude récente de notre équipe¹⁴². Les auteurs ont pu obtenir l'énantiomère (*R*) acétate des alcools secondaires benzyliques de type arylalkyl carbinols optiquement purs avec de bons rendements chimiques via une combinaison entre la réaction de transesterification enzymatique suivie de la réaction de Mitsunobu. Ils ont montré que la réaction de déracémisation était fonction des substrats étudiés. L'exemple typique de cette combinaison est celui du 1-indanol, où l'acylation enzymatique a donnée les deux énantiomères avec d'excellente pureté énantiomérique (ee>99%). Cette pureté optique est maintenue même après le protocole de Mitsunobu (ee=99%) avec un rendement chimique (rdt=82%) comme le montre le schéma 90.

¹⁴⁰ (a) O. Jacquet, J-Y. Legros, M. Coliboeuf, J. C. Fiaud. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 6530-6536.; (b) G. Guanti, L. Banfi, A. Basso, E. Bevilacqua, L. Bondanza, R. Riva. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 2889-2892.; (c) J-I. Oshida, M. Okamoto, S. Azuma. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 2337-2342.

¹⁴¹ E. Vanttinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786.

¹⁴² Réf 18: N. Bouzemi, L. A. Zouiouche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.

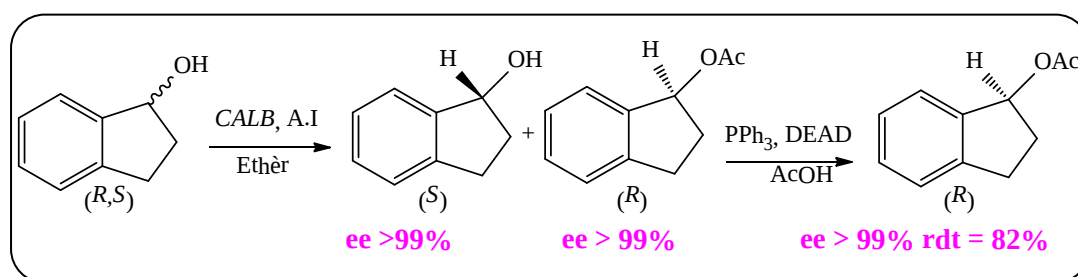


Schéma 90: Déracémisation de 1-indanol racémique

Faber et coll¹⁴³ ont étudié la biotransformation du dictyoprolène racémique à l'échelle préparative en présence de la lipase *Amano PS*. Le dédoublement enzymatique de l'alcool racémique a donné les deux énantiomères avec des excès énantiomériques élevés (ee=91%), le réactif de Mitsunobu est ajouté ensuite au mélange obtenu. L'énantiomère (S)-dictyoprolène, possédant les propriétés odoriférantes, et produit de la déraccémisation a conservé sa pureté optique (ee=91%) avec un excellent rendement chimique (rdt=96%). (schéma 91).

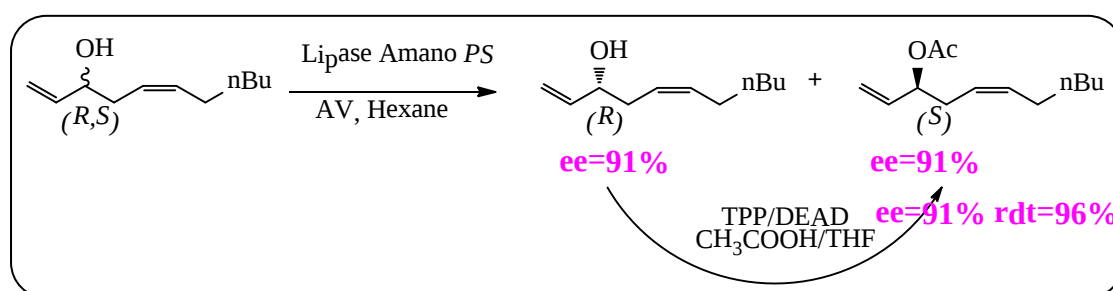


Schéma 91 : Synthèse du (S)-dictyoprolène via le dédoublement/stéριο-inversion enzymatique.

IV-2-2 : Combinaison de la réaction de Mitsunobu avec les réactions d'hydrolyse enzymatique

Nous citons une étude de déraccémisation faite par Matsumoto et coll¹⁴⁴ sur le 1,2-diol monotosylate via la combinaison successive de la réaction d'hydrolyse enzymatique et l'inversion de Mitsunobu. Cette combinaison permis d'obtenir l'énantiomère ester de configuration (S) avec un excès énantiomérique de ee=98% et un rendement chimique

¹⁴³ A. Wallner, H. Mang, S. M. Glueck, A. Steinreiber, S. F. Mayer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432.

¹⁴⁴ Y. Shimada, K. Usuda, H. Okabe, T. Suzuki, K. Matsumoto, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 2802-2808.

rdt=91% et ce après l'optimisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique. Le schéma 92 en fait l'illustration.

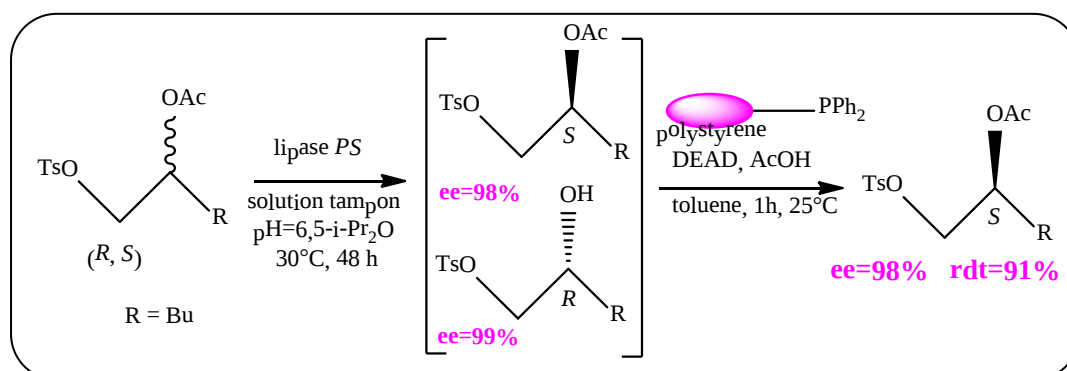


Schéma 92: Déracémisation du 2-acétoxybutyl tosylate racémique

La même combinaison, à savoir, l'hydrolyse enzymatique et le protocole de Mitsunobu a été appliquée par Ogasawara et coll¹⁴⁵. L'hydrolyse enzymatique de l'acétate racémique a été effectuée dans un milieu bi-phasique (solution tampon/acétone) et catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacea* (PS), les deux énantiomères alcool et acétate sont obtenus optiquement purs (ee>99%). Ensuite, le mélange est soumis aux conditions de Mitsunobu, l'énantiomère acétate (S) produit de la déracémisation est obtenu avec un meilleur excès énantiomérique (ee > 99%) avec un rendement chimique (rdt=75%). (schéma 93).

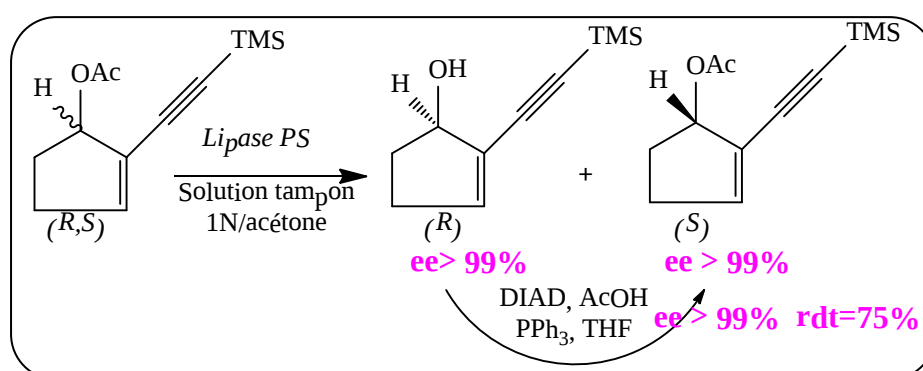


Schéma 93: Déracémisation d'une cyanohydrine aromatique racémique

¹⁴⁵ S. Takano, M. Suzuki, K. Ogasawara ; Tetrahedron: Asymmetry, 1993, 4, 1043-1046.

IV-2-3: Cas de la complémentarité énantiosélective des réactions d'acylation et d'hydrolyse enzymatiques

Lorsque la sélectivité de l'enzyme est élevée dans les réactions d'hydrolyse et d'acylation enzymatiques, on observe une énantiocomplémentarité¹⁴⁶ de ces deux réactions envers un seul énantiomère, les deux énantiomères d'une molécule racémique pouvant être obtenus avec d'excellentes puretés optiques et avec de bons rendements chimiques. Un énantiomère est obtenu lorsque la lipase est énantiocomplémentaire comme dans l'exemple de Faber avec le sulkatol¹⁴⁷, phéromone d'insecte, où ces deux énantiomères ont été obtenus avec des puretés optiques élevées ($ee > 98\%$) et de bons rendements chimiques par l'énantiocomplémentarité des deux réactions combinée à une stéréo-inversion de Mitsunobu sous les conditions des micro-ondes (schéma 94).

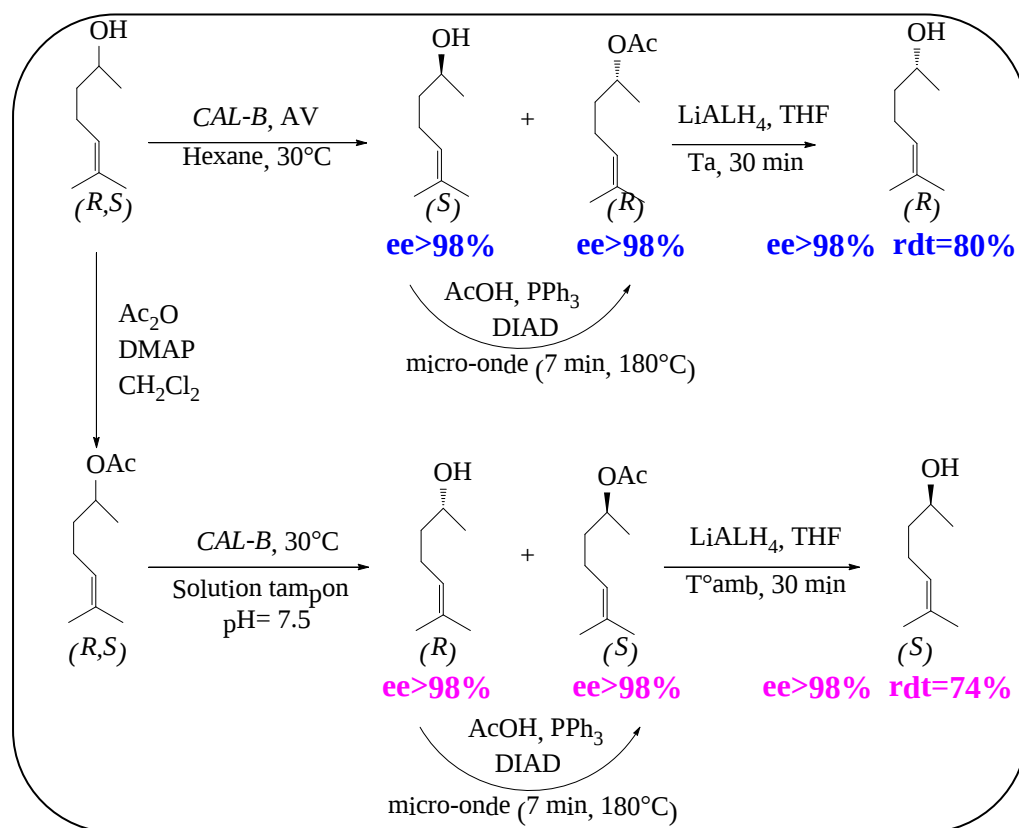


Schéma 94 : Déracémisation par Acylation/hydrolyse combinée au processus de Mitsunobu : Enantiocomplémentarité

¹⁴⁶ (a) A. Zaks, M. Tamaz, T. Li; *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 2351-2357. (b) B. Larissegger-Schnell, S-M. Glueck, W. Kroutil, K. Faber; *Tétrahedron*, **2006**, 62, 2912-2916.

¹⁴⁷ A. Steinreiber, A. Stadler, S-F. Mayer, K. Faber, C-O. Kappe; *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6283-6286.

IV-3: Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une mise au point bibliographique sur la réaction de Mitsunobu. Depuis sa découverte à nos jours, cette réaction ne cesse d'être utilisée en synthèse organique. Elle est sollicitée maintenant dans les processus chimio-enzymatiques en combinaison avec des réactions telles que la transestérification et l'hydrolyse enzymatiques afin d'aboutir à la synthèse de molécules optiquement pures avec de bons rendements chimiques. Nous avons montré que cela est réalisé pour des molécules d'intérêt potentiel, telles que les phéromones d'insectes ou les médicaments.

Conclusion de la première partie

L'activité biologique d'une molécule organique est liée à sa stéréochimie, ainsi, l'obtention des molécules sous forme optiquement pures ou enrichie est une nécessité. Pour se faire, ils existent plusieurs méthodes dont la plus utilisée est le dédoublement cinétique du mélange racémique par acylation ou hydrolyse catalysé par les hydrolases, particulièrement les lipases, à cause de leur grande sélectivité, leur disponibilité et leur accessibilité à des coûts modérés.

La réaction de dédoublement cinétique enzymatique (D.C.E) des racémiques est la plus sollicitée pour la séparation des énantiomères, elle est appliquée pour de nombreuses réactions organiques, les plus utilisées étant la transestérification et l'hydrolyse enzymatique.

La sélectivité enzymatique est généralement meilleure avec les réactions de transesterification comparée aux réactions d'hydrolyse. Ces dernières présentent souvent de faibles sélectivités, liées à la mauvaise solubilité des substrats. L'utilisation d'un milieu bi-phasique avec un co-solvant organique-solution tampon améliore la sélectivité des dédoublements cinétiques enzymatiques. Portant, son utilisation reste limitée ; cela peut être dû au faible rendement issu de ces réactions / ou aux multiples extractions. Par ailleurs, la réaction se déroule à l'interface (eau/solvant organique) dont le mécanisme du phénomène mis en jeu reste inexpliqué.

L'inconvénient capital du D.C.E reste le rendement chimique, égal à 50% dans le cas idéal. Depuis quelques années, l'utilisation de diverses méthodes de déracémisation ont permis d'enlever cet inconvénient par la mise en œuvre de différents protocoles présentés dans cette partie. Parmi ces méthodes, le processus de stéréoinversion par la réaction de Mitsunobu est une voie intéressante qui se développe actuellement et qui est devenue un outil de la déracémisation après avoir été largement utilisé en synthèse organique.

Deuxième partie

*Synthèse énantiosélective d'acétates et
d'alcool optiquement purs par catalyse
enzymatique*

Introduction à la deuxième partie

Dans cette partie nous présentons les résultats de nos travaux de recherche qui concernent le dédoublement cinétique par hydrolyse et par transestérification enzymatique. Nous utilisons cette voie pour dédoubler divers substrats racémiques d'intérêt potentiel. Notre objectif est la recherche d'un processus catalytique fiable qui répond aux principes de chimie verte et qui permette d'aboutir aux molécules énantiopures. La première étape est d'améliorer la sélectivité enzymatique, pour cela, il est nécessaire d'étudier l'influence des divers paramètres de réactions sur la réactivité et la sélectivité enzymatiques.

L'objectif de cette thèse est de parvenir à la synthèse d'alcools énantiopurs par déracémisation via un processus de stéréochimie.

Dans ce contexte, nous avons dédoublé nos substrats, des acétates benzyliques secondaires, par hydrolyse enzymatique en milieu conventionnel (bi-phasique : solution tampon / solvant organique), et nous avons mis en œuvre de nouvelles conditions, plus faciles, pour la réaction d'hydrolyse enzymatique. Nous nous sommes intéressés par ailleurs, à un l'alcool allylique secondaire, le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol, une phéromone d'insecte utilisée comme insecticide propre. Cet alcool allylique est dédoublé par transestérification enzymatique et les meilleures conditions de dédoublement sont mises au point. La réaction d'hydrolyse enzymatique dans les deux milieux réactionnels est combinée au processus de stéréoinversion de Mitsunobu.

Dans cette deuxième partie intitulée « *Synthèse énantiosélective d'acétates et d'alcool chiraux par catalyse enzymatique* » sont réunis les résultats de nos travaux. Nous avons réparti en quatre chapitres ces résultats de recherches. **Le premier chapitre** intitulé « *Etude de l'hydrolyse enzymatique en milieu conventionnel : Optimisation de la quantité d'enzyme* » concerne la résolution enzymatique des acétates benzyliques secondaires par hydrolyse enzymatique dans le milieu bi-phasique, nous avons étudié la réaction d'hydrolyse et optimisé la sélectivité en fonction de la quantité de la CAL-B. **Le deuxième chapitre** intitulé « *Etude de l'hydrolyse enzymatique en milieu non-conventionnel : Développement d'un procédé vert* » est consacré à l'étude des paramètres réactionnels influant sur la réaction d'hydrolyse en milieu non-conventionnel. L'obtention d'un système catalytique enzymatique efficace lors de la réaction d'hydrolyse est examinée dans les deux milieux conventionnel et non-conventionnel. Nous avons appliqué la réaction de Mitsunobu dans un processus de

déracémisation impliquant l'hydrolyse enzymatique dans les conditions non-conventionnelles, dans **le troisième chapitre** intitulé « *Déracémisation par hydrolyse non-conventionnelle avec la CAL-B combiné à la réaction de Mitsunobu* ». **Le quatrième chapitre** intitulé « *Acylation enzymatique du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol* » est consacré au dédoublement cinétique par transestérification enzymatique du seudenol, le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol.

Deuxième partie

Premier chapitre

*Etude de l'hydrolyse enzymatique en
milieu conventionnel*

I-1 Introduction

En raison de leurs activités biologiques¹⁴⁸, les alcools benzyliques chiraux sont des molécules d'un grand intérêt qui a fait que de nombreuses études leurs soient consacrées ; ils constituent, en effet pour la plus part, des précurseurs de molécules intéressantes, à visée thérapeutique et très utilisés dans les industries pharmaceutiques¹⁴⁹ ; des molécules telles que les composés de la famille arylalkyl éthanol qui sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens puissants comme le naproxène¹⁵⁰, l'ibuprofène, et le kétoprofène. Les alcools benzyliques secondaires peuvent aussi servir d'auxiliaires chiraux pour la synthèse de molécules plus complexes¹⁵¹ ou de substrats dans les réactions catalysées par le palladium¹⁵². L'intérêt capital de ces alcools benzyliques secondaires rend leur obtention sous forme optiquement pure ou enrichie une nécessité. Le schéma 95 montre les modèles les plus étudiés.

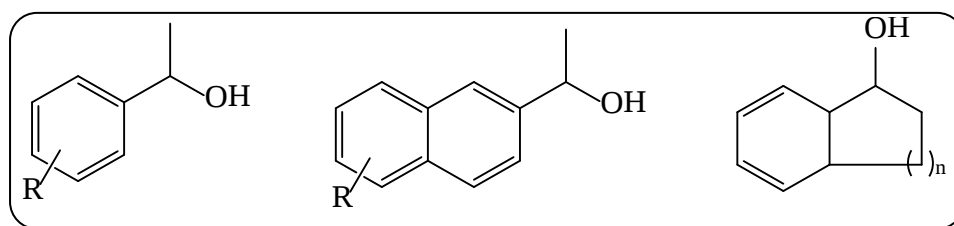


Schéma 95: Modèles des alcools benzyliques étudiés

I-2 Importance des modèles étudiés

Les travaux réalisés en catalyse enzymatique sont nombreux et divers, La réaction la plus étudiée est la transestérification enzymatique, de nombreuses études portent sur l'influence importante de la nature de l'enzyme, du substrat, et de l'agent acylant sur la sélectivité de la réaction du dédoublement cinétique. Ces substrats sont utilisés comme modèles d'étude, et nous en citons essentiellement quelques exemples qui concernent la catalyse enzymatique et l'évaluation de la réactivité et de la sélectivité des lipases, que ce soit dans les réactions d'acylation ou d'hydrolyse.

¹⁴⁸T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe; *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 7997-8000

¹⁴⁹S.-C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, **1992**, 46.

¹⁵⁰Q.-M. Gu, C.-S. Chen, C.J. Sih ; *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, 1763-1766.

¹⁵¹X. Lin, X. Dai, Z. Mao, Y. Wang; *Tetrahedron*, **2009**, 65, 9233-9237

¹⁵²(a) M. Assié, J.-Y. Legros, J.-C. Fiaud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 1183-1187. (b) J.-Y. Legros, M. Toffano, J.-C. Fiaud ; *Tetrahedron*, **1995**, 51, 3235-3246. (c) J.-Y. Legros, J.-C. Fiaud ; *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 2509-2510.

1-Réaction d'acylation enzymatique d'alcools benzyliques

Les alcools benzyliques secondaires de type 1-aryléthanol ont été étudiés par Legros et coll¹⁵³ via une réaction de transestérification dans l'éther catalysée par la lipase *gastrique de lapin* (LGL) et l'acétate d'isopropényle comme donneur d'acyle. (schéma 96).

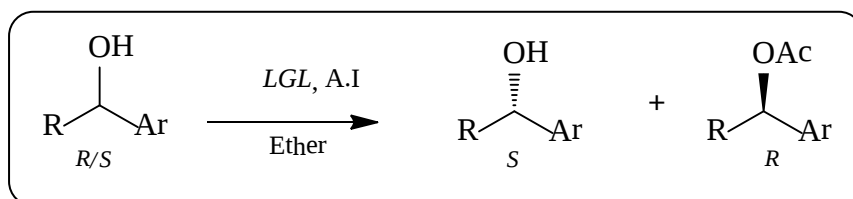


Schéma 96: Transestérification des alcools benzyliques secondaires catalysée par la LGL

Parmi les substrats étudiés, on constate que l'acétate du 1-[2-(6-méthoxy)naphthyl]éthanol est obtenu avec une bonne pureté optique pour un facteur de sélectivité ($E > 500$) (tableau 1). Pour les autres alcools la lipase est peu sélective, même dans le cas du β -naphthyléthanol ($E=23$, $C=41\%$) ; la présence du méthoxy améliore fortement la sélectivité ($E>500$).

Tableau 1: Transestérification enzymatique des 1-aryléthanol avec la LGL

Substrat	Temps (h)	ee alcool (%)	ee acétate (%)	C(%)	E
	96	13	85	13.5	14
	19	59	85.5	41	23
	21.5	78.5	> 99.5	44	>500
	24	80.5	2.5	97	2
	18	54	43.5	55.5	4
	18	95	36	72.5	7

¹⁵³ J-Y. Legros, M. Toffano, S-K. Drayton, M. Rivard, J-C. Fiaud; Tetrahedron Letters, **1997**, 38, 1915-1918.

Au même titre, Suginata et coll¹⁵⁴ ont étudié le même type d'alcools secondaires benzyliques catalysés par différentes lipases dans l'éther isopropylique en présence d'un dicétène comme agent acylant. (schéma 97).

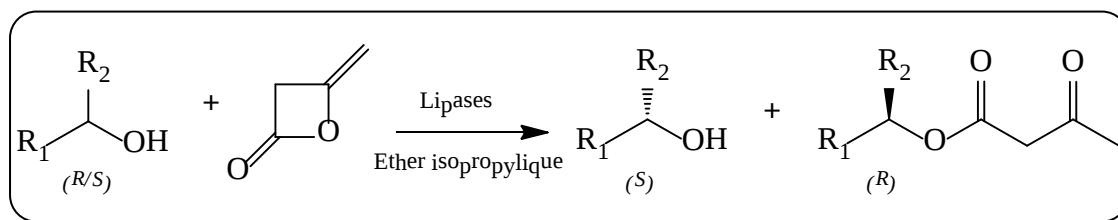


Schéma 97: Acylation des alcools benzyliques secondaires catalysée par différentes lipases

L'étude montre que le produit acétoacétate de la réaction d'acylation avec ces alcools de diverses structures est obtenu avec des excès énantiomériques modérés contrairement à l'alcool résiduel obtenu optiquement pur (ee = 99%), le tableau (2) résume l'essentiel de cette étude.

Tableau 2: Acylation enzymatique des 1-aryléthanol par différentes lipases

Substrat	Lipase	ee alcool (%)	ee acétoacétate (%)	C(%)	E
	Amano AK	99	77	56	39
	CAL	99	80	55	46
	Amano PS	95	82	53	37
	Amano PS	98	80	55	40

2- Réaction d'hydrolyse enzymatique

D'après la littérature, peu d'études ont été consacrées aux réactions d'hydrolyse enzymatique des acétates chiraux, particulièrement les dérivés benzyliques de type arylalkylcarbinol. Depuis quelques années, notre équipe s'est intéressée à l'amélioration de la sélectivité du D.C.E de la réaction sur ces substrats.

¹⁵⁴ K. Suginata, Y. Hayashi, Y. Yamamoto; Tetrahedron: Asymmetry, **1996**, 7, 1153-1158.

Dans ce contexte, nous citons le dédoublement¹⁵⁵ du 1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-1-ate en milieu bi-phasique, catalysé par différentes lipases notamment la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (*PFL*). (schéma 98). Les énantiomères (alcools et acétates) sont obtenus avec de bonnes sélectivités $E > 400$ à une conversion de $C = 45\%$.

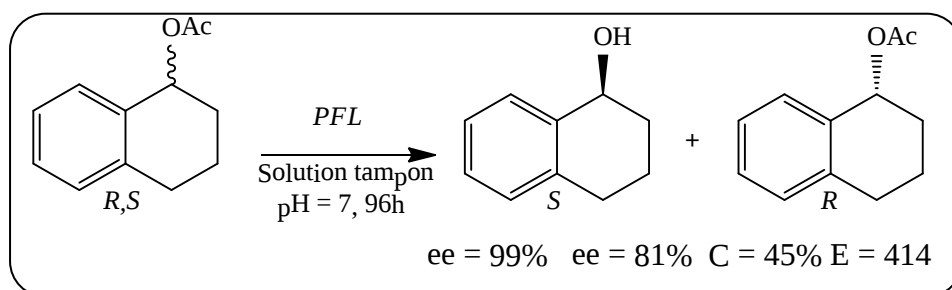


Schéma 98: Hydrolyse catalysée par la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (*PFL*)

D'autres travaux¹⁵⁶ montrent que la même lipase manifeste une grande énantio-discrimination concernant des substrats de structure analogue. (schéma 99). En effet, pour l'acénaphthénol acétate est obtenu énantiomériquement pur, $E > 800$, avec une conversion égale à $C = 50\%$; alors que pour l'hydrolyse du 1-(1-naphthyl)éthanol dans les mêmes conditions où la *PFL* est inactive.

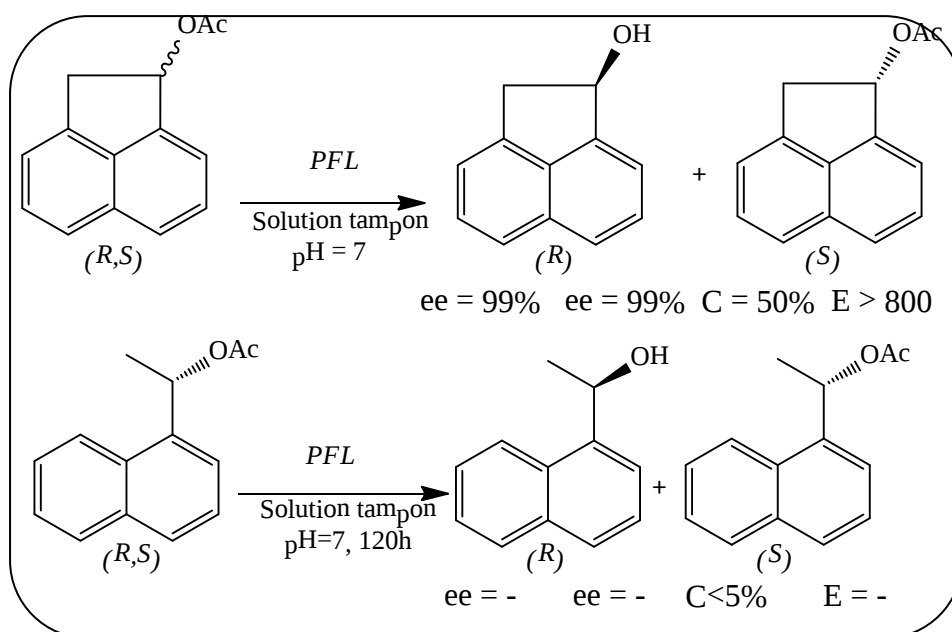


Schéma 99: Hydrolyse enzymatique des acétates secondaires

¹⁵⁵ C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouche, J-Y. Legros, J-C. Fiaud ; J. Soc. Alger. Chem, **1999**, 9, 261.

¹⁵⁶ L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2000**, 41, 4085-4088

I-3 : Synthèse des alcools racémiques (1-9)

Les alcools **1**, **4**, **5** et **7** sont des alcools commerciaux. Les alcools **2**, **3**, **6**, **8** et **9** sont obtenus par réduction des cétones correspondantes.

1 : Synthèse des alcools 2, 3, 6, 8 et 9 par réduction des cétones commerciales correspondantes.

La réduction des cétones correspondantes à ces alcools se fait en présence de l'hydruure de lithium (LiAlH_4) dans l'éther [ou en présence de l'hydro borure de sodium (NaBH_4) dans un mélange de tétrahydrofurane et l'eau (4/1)]. Les alcools sont obtenus avec de bons rendements chimiques (schéma 100).

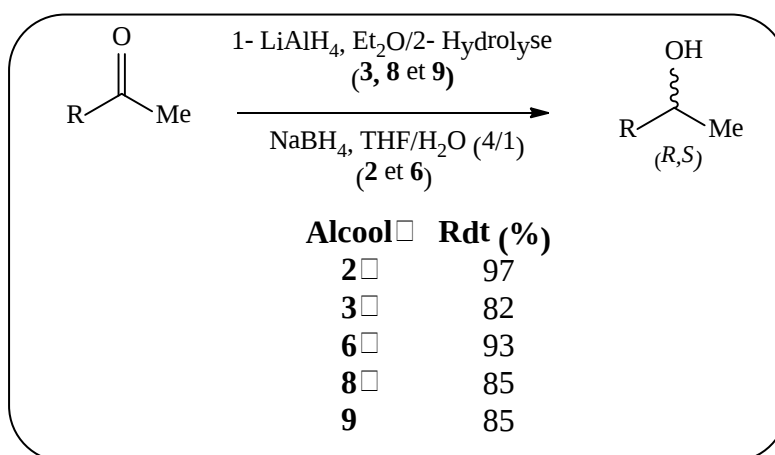


Schéma 100: Synthèse des alcools 2, 3, 6, 8 et 9 par réduction des cétones correspondantes

2 : Synthèse des acétates racémiques (1a-9a)

Par le biais d'une simple réaction d'acylation chimique, nous avons synthétisé les acétates correspondants à ces alcools secondaires benzyliques sous forme racémique pour les utiliser dans les réactions d'hydrolyses objets de cette thèse. Cette acylation se fait avec de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), de l'anhydride acétique (Ac_2O) et de la triéthylamine (NEt_3) selon le schéma réactionnel suivant (101) :

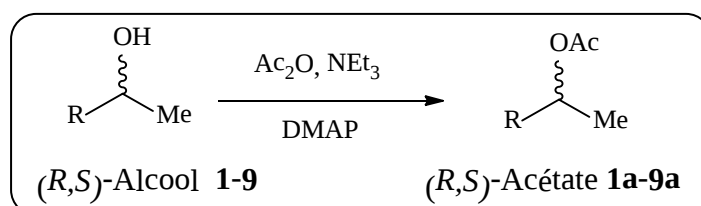


Schéma 101: Synthèse des acétates racémiques 1a-9a par acylation chimique

Les rendements chimiques des acétates obtenus sont réunis dans le tableau 3.

Tableau 3 : Rendements chimiques des acétates racémiques 1a-9a

Acétate	Rdt (%)
1a	90
2a	89
3a	80
4a	91
5a	75
6a	81
7a	95
8a	82
9a	75

Les méthodes spectroscopiques suivantes : infrarouge (IR), résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H) et résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN¹³C) montrent bien les caractéristiques structurales des alcools et des acétates synthétisés.

Dans le but d'hydrolyser nos substrats, nous avons choisi la lipase de *Candida antarctica* fraction B (CAL-B), en quantité de 150 mg, suite aux travaux réalisés par l'équipe de notre laboratoire sur les mêmes substrats via la réaction d'acylation enzymatique¹⁵⁷. Les résultats de ces travaux montrent que la CAL-B est sélective vis-à-vis de l'énantiomère (*R*) en acylation. Il était intéressant de mettre en œuvre une réaction d'hydrolyse pour obtenir l'énantiomère de configuration (*S*).

1-4 : Dédoublément cinétique par hydrolyse des acétates 1a-9a catalysé par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B)

Dans un premier lieu, nous avons utilisé l'hydrolyse conventionnelle sur les acétates benzyliques racémiques (**1a-9a**), la réaction est effectuée dans un milieu bi-phasique (éther diéthylique/solution tampon pH=7 : v/v : 1/6) en présence de 150mg (675 U) de la lipase de

¹⁵⁷ Réf 62: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45 ,**2004**, 627-630.

Candida antarctica B (CAL-B)¹⁵⁸ pour une milli mole de substrat. Le protocole d'hydrolyse enzymatique met en jeu, une milli mole de substrat hydrolysée dans un milieu bi-phasique constitué de 6ml de solution tampon pH=7 et de 1ml d'éther diéthylique (solvant organique) en présence de la lipase¹⁵⁹.

L'acétate résiduel et l'alcool formé sont récupérés après 48 heures de réaction et séparés sur colonne chromatographique de gel de silice. Les excès énantiomériques (ee) sont déterminés par HPLC sur colonne chirale CHIRACEL OD-H (schéma 102).

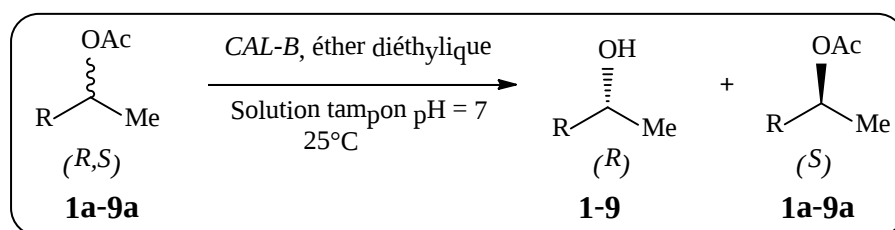


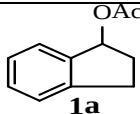
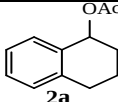
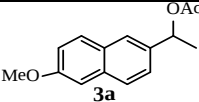
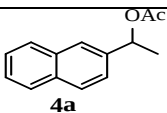
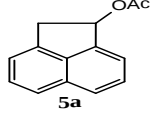
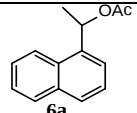
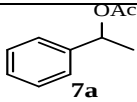
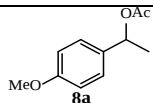
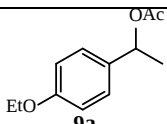
Schéma 102: Dédoublage cinétique des acétates racémiques **1a-9a** par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de CAL-B

Les résultats sont réunis dans le tableau 4.

¹⁵⁸ CAL-B (Chirazyme®, L-2, C-F, C2, Lyo): lipase de *Candida antarctica* fraction B, fournie par Boehringer Mannheim. L'activité spécifique est de 4500 U/G.

¹⁵⁹ C. Bidjou, L. Aribi-Zouieche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2002**, 43, 3025-3027.

Tableau 4: Hydrolyse des acétates racémiques **1a-9a** en présence de 150 mg de CAL-B

Entrée	Substrat ^a	ee _p ^b (%) (R) ^d	ee _s ^b (%) (S) ^d	C ^c (%)	E ^c
1		96	44	32	68
2		98	83	46	>300
3		99	98	49	>500
4		99	96	49	>500
5		99	6	6	200
6		87	75	46	37
7		99	99	50	>200
8		89	99	53	91
9		94	99	51	>150

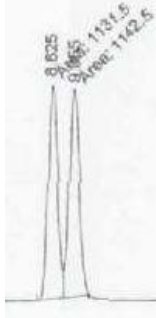
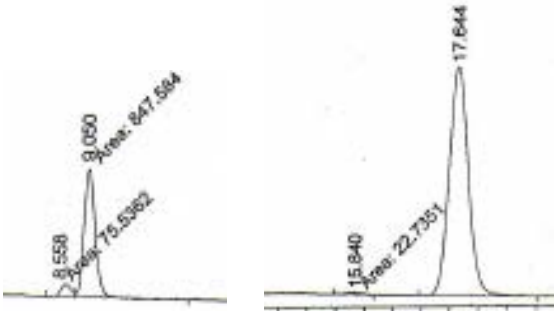
a: Conditions de réactions : 1 mmole de l'acétate racémique, 6 ml de solution tampon pH = 7, 1 ml d'éther diéthylique, 150 mg de CAL-B à 25°C pour 48 heures. b : ee mesuré par HPLC sur colonne chirale CHIRACEL OD-H. c: Conversion et sélectivité : C= ee_s/ee_s+ss_p. : E= Ln [(1-c)(1-ees)]/ Ln[(1-c)(1+ees)]. d: Configuration absolue déterminée par la comparaison entre le pouvoir rotatoire du produit isolé et la littérature (partie expérimentale)

Les résultats du tableau 4 montrent que la sélectivité de la CAL-B pour la majorité des acétates (**2a**, **3a**, **4a**, **7a**, **8a** et **9a**) est élevée 91<E<500 avec des conversions C>46%. La lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) montre une faible conversion (C=6%) vis-à-vis de

l'acétate **5a** malgré une sélectivité élevée $E > 200$ contrairement au substrat **6a** son analogue de structure. La lipase présente une énantio- préférence vers les *R*-alcools.

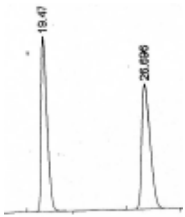
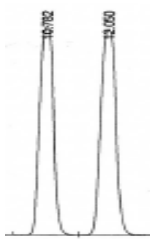
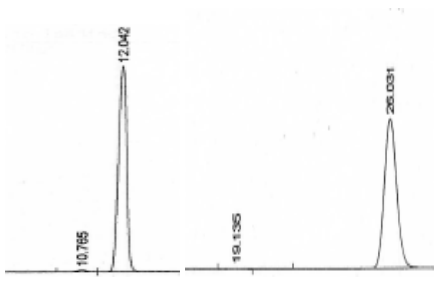
Concernant les deux substrats **1a** et **2a**, on constate que l'augmentation de la taille du substrat **2a** par rapport au substrat **1a** influe d'une façon significative sur la réactivité et la sélectivité. Pour le substrat **2a**, la conversion est égale à $C=46\%$, avec une sélectivité élevée $E > 300$ et pour le substrat **1a** la conversion est de $C=32\%$ avec une sélectivité de $E=68$.

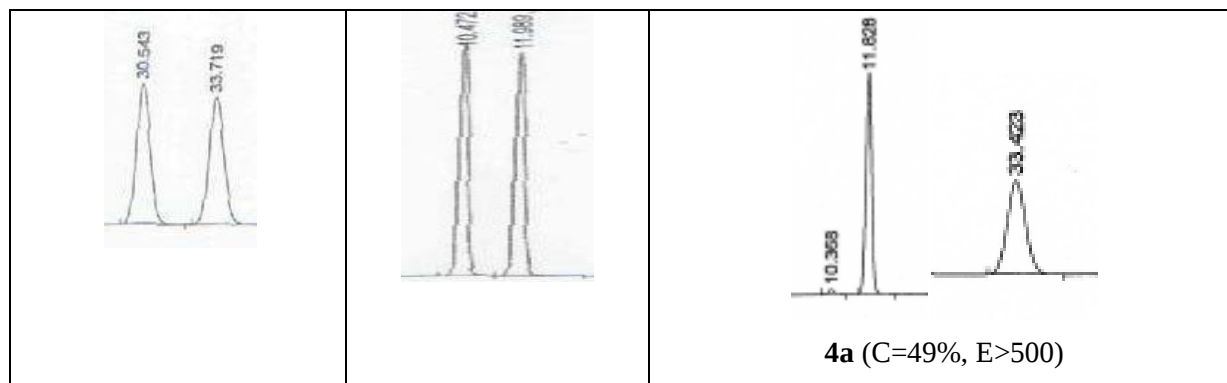
(Chromatogramme 1).

Racémiques		Substrat
Alcool	Acétate	
		 2a ($C=46\%$, $E=319$)

Chromatogramme 1: Hydrolyse enzymatique de l'acétate **2a** avec 150mg de CAL-B

Avec la CAL-B, on constate qu'il y a pas de différence de sélectivité ou de réactivité entre l'acétate **3a** et **4a**, et que l'introduction d'un groupement *méthoxy* en position para au sein de l'acétate **3a** par rapport à l'acétate **4a** non substitué n'a aucune influence. Les sélectivités dans les deux cas sont élevées ($E > 500$). Le chromatogramme 2 illustre ces deux résultats.

Racémiques		Substrat
Alcool	Acétate	
		 3a ($C=49\%$, $E > 500$)



Chromatogramme 2: Hydrolyse enzymatique de l'acétate **3a** et **4a** avec 150mg de CAL-B

Par ailleurs, avec l'acétate **5a** on observe un faible avancement (C = 6%) mais la sélectivité est élevée (E = 200). Si on compare avec la structure de l'acétate **6a**, où nous avons obtenu une bonne réactivité (C = 46%) mais avec une sélectivité modérée (E = 37), on peut conclure que le méthyle libre gêne l'énantiodifférenciation du site actif.

Dans ce cas, on constate que la CAL-B présente une meilleure affinité pour **6a** que pour **5a** contrairement à ce qui a été observé avec la PFL¹⁶⁰.

La comparaison entre les substrats **4a** et **6a** montre une influence remarquable de la substitution en (α) ou en (β) sur la réactivité et l'énantiosélectivité de la lipase. La position (β) de l'acétate **4a** permet une meilleure différenciation par la lipase que la position (α) de l'acétate **6a**.

L'acétate **7a** est le substrat idéal d'un dédoublement cinétique enzymatique où les deux énantiomères sont obtenus optiquement purs (ee > 99%) à une conversion de 50% pour une sélectivité supérieure à 200. Les chromatogrammes suivant montrent le meilleur résultat **7a** obtenu en termes de sélectivité pour une conversion C=50%..

¹⁶⁰ Réf 156 : L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2000**, 41, 4085-4088.

Racémiques		Substrat
Alcool	Acétate	7a
		 7a (C=50%, E>500)

Chromatogramme 3: Hydrolyse enzymatique de l'acétate **7a** avec **150mg** de CAL-B

La substitution en para du substrat **7a** par des groupements méthoxy **8a** ou éthoxy **9a** affecte légèrement la conversion $50\% < C < 53\%$ et conduit à une légère diminution de la sélectivité $91 < E < 200$.

Racémiques		Substrat
Alcool	Acétate	
		 9a (C=51%, E>500)

Chromatogramme 4: Hydrolyse enzymatique de l'acétate **9a** avec **150mg** de CAL-B

I-5 : Influence de la quantité d'enzyme CAL-B sur la sélectivité de la réaction d'hydrolyse :

Dans des travaux antérieurs récents de notre équipe, on observe que la diminution de la quantité d'enzyme améliore la sélectivité de la lipase¹⁶¹. Nous avons étudié l'influence de ce

¹⁶¹ M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche ; C. R. Chimie, **2011**, 14, 978-986.

paramètre sur le déroulement de la réaction d'hydrolyse enzymatique avec les acétates **1a-6a**. Cette diminution du taux catalytique est également favorable d'un point de vue économique et s'inscrit dans les principes de la chimie verte.

La réaction d'hydrolyse enzymatique avec ces acétates a été examinée avec des quantités différentes d'enzymes analogues aux quantités testées dans le travail antérieur sur la réaction de transestérification. Le tableau 5 résume ces résultats

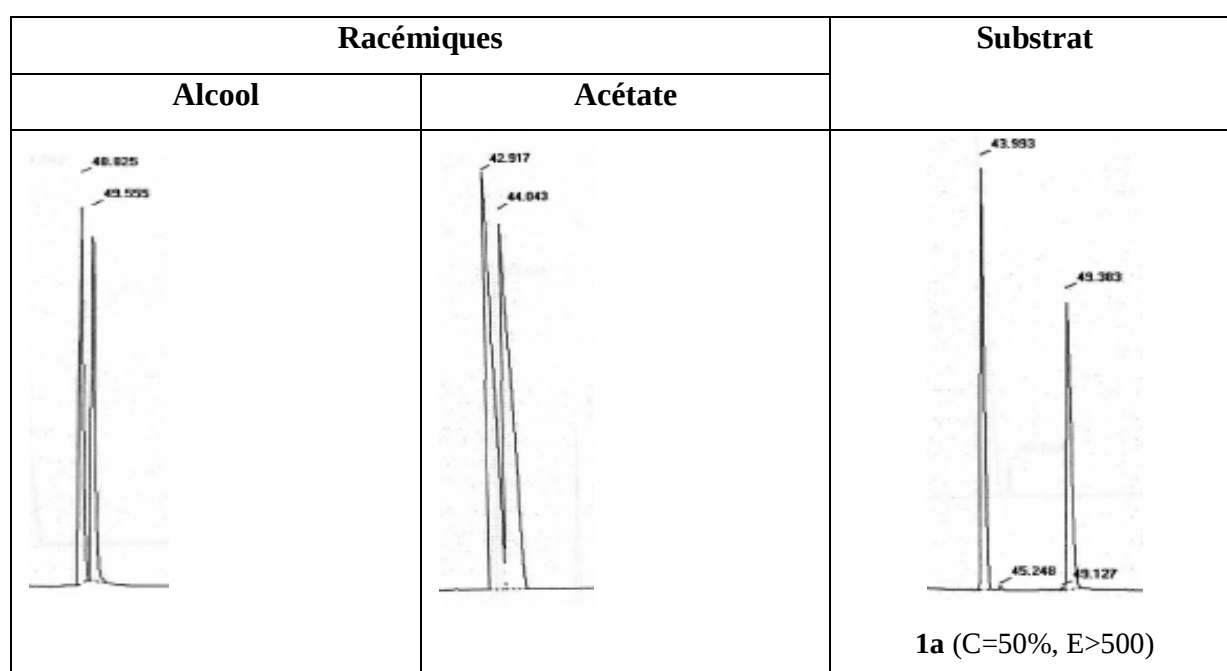
Tableau 5: Hydrolyse des acétates racémiques **1a-6a** en présence de différentes quantités de CAL-B

Substrat	CAL-B ^a (mg)	t (h)	ee _p (%) (R)	ee _s (%) (S)	C (%)	E
1a	150	48	96	44	32	68
	12.5	48	99	98	50	>500
	6	72	93	79	46	70
2a	150	48	98	83	46	319
	50	48	99	99	50	>500
	20	48	96	28	22	64
3a	150	48	99	98	49	>500
	20	48	98	99	49	>500
4a	150	48	99	89	49	>500
	20	50	97	99	49	>500
5a	150	48	99	7	6	200
	60	72	96	1	9	62
	20	72	-	-	-	nd
6a	150	72	87	75	46	37
	60	48	51	99	34	>200
	20	48	44	99	30	>200

^apour 1mmole de substrat acétate.

Les résultats obtenus montrent que pour chaque substrat, il existe une quantité optimale de *CAL-B* qui permet d'obtenir la meilleure sélectivité.

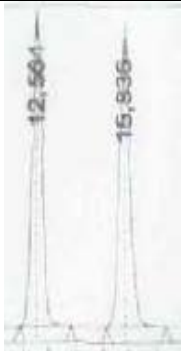
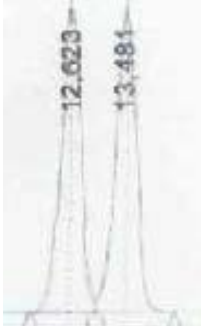
Concernant l'acétate **1a**, en passant de 150 mg de *CAL-B* à 6 mg, on constate qu'à 12.5 mg de *CAL-B*, la conversion s'améliore de $C = 32\%$ à $C = 50\%$ et la sélectivité de $E = 68$ à $E > 500$. Les deux énantiomères (*R*)-alcool et (*S*)-acétate sont obtenus avec de bons excès énantiomériques. La diminution à 6mg de *CAL-B* conduit à une diminution de la conversion, $C=46\%$ et de la sélectivité, $E=70$. Le chromatogramme 5 illustre la réaction d'hydrolyse enzymatique à $C = 50\%$ pour une sélectivité $E > 500$.



Chromatogramme 5: Hydrolyse enzymatique de l'acétate **1a** avec **12.5 mg** de *CAL-B*

Pour le substrat **2a**, la quantité d'enzyme optimale est de 50 mg, et l'on obtient les énantiomères alcool et acétate optiquement purs ($ee > 99\%$) avec une conversion de 50% pour un facteur de sélectivité > 500 . La diminution de la quantité d'enzyme à 20 mg cause une diminution de la conversion $C=22\%$ et de la sélectivité enzymatique $E = 64$.

Pour les substrats **3a** et **4a** la diminution de la quantité de *CAL-B* lors de la réaction d'hydrolyse n'entraîne aucun changement, la réactivité ($C = 49\%$) et la sélectivité ($E > 1000$) étant les mêmes. Les chromatogrammes 6 en donnent l'illustration.

Racémiques		Substrat
Alcool	Acétate	
		 3a (C=49%, E>500)
		 4a (C=49%, E>500)

Chromatogramme 6: Hydrolyse enzymatique de l'acétate 3a et 4a avec **20 mg** de CAL-B.

En ce qui concerne l'acétate **5a**, la réactivité reste très faible quand la quantité de lipase CAL-B est diminuée, même si la sélectivité est élevée lors de l'hydrolyse enzymatique. La conversion augmente légèrement quand on passe de 150mg à 60mg de CAL-B de C=6% à C=9% mais la sélectivité chute de E=200 à E=62. A 20 mg, on observe une inactivité totale de l'enzyme, et après 72 heures de réaction, le mélange racémique est récupéré.

Pour le substrat **6a**, on constate que la diminution de la quantité de la lipase améliore considérablement la sélectivité. A 150mg de CAL-B la conversion égale à 46% avec une sélectivité E=37 et la diminution à 60mg et 20mg respectivement préserve la sélectivité à E>200 avec des conversions de 30%<C<34%.

La diminution de la quantité de lipase a un effet important sur la sélectivité enzymatique. L'hydrolyse enzymatique de la majorité des acétates permet d'obtenir les énantiomères avec de bons excès énantiomériques.

Les énantiomères (alcools et acétates) sont obtenus avec des excès énantiomériques élevés en présence de faibles quantités de lipase, ce qui met en évidence l'inutilité d'utiliser 150mg de *CAL-B* alors que 20mg suffisent pour obtenir de meilleures puretés optiques.

I-6 : Conclusion

Cette mise au point nous a permis de fixer le taux catalytique pour chaque substrat d'étude dans le dédoublement cinétique par hydrolyse conventionnelle en milieu bi-phasique (solution tampon/solvant organique).

La diminution de la quantité de lipase a une influence remarquable sur la réactivité et la sélectivité de la réaction d'hydrolyse enzymatique qui dépend du substrat étudié. Pour les substrats **3a** et **4a** aucune influence n'a été observée en termes de réactivité et de sélectivité. Pour les substrats **1a** et **2a**, la diminution de la quantité de *CAL-B* augmente la réactivité et la sélectivité de la réaction. Ces résultats nous ont permis de relever que chaque substrat nécessite une quantité optimale de lipase dans la réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu bi-phasique (solution tampon/solvant organique) pour obtenir des sélectivités et réactivités élevées. Cette réaction présente néanmoins une limitation importante, et ceci concerne le faible rendement chimique, lié au protocole expérimental qui implique plusieurs étapes avec des extractions liquide/liquide.

Les quantités optimales sont 3 et 10 fois plus faibles pour une meilleure sélectivité de la lipase *CAL-B* en hydrolyse.

Deuxième partie

Deuxième chapitre

*Etude de l'hydrolyse enzymatique en
milieu non-conventionnel :
développement d'un procédé vert*

II-1 : Introduction

L'hydrolyse enzymatique dans les solvants organiques est quasiment non étudiée dans la littérature, la majorité des hydrolyses enzymatiques étant réalisées en milieu aqueux¹⁶² ou en milieu bi-phasique : aqueux / solvant organique¹⁶³, et le mécanisme catalytique de l'hydrolyse se faisant à l'interface des deux phases¹⁶⁴. Peu d'exemples décrivent cette réaction d'hydrolyse en milieu non-conventionnel.

Dans cette optique, nous citons l'exemple de Jin-Hyun Jeong¹⁶⁵, qui rapporte une étude sur l'hydrolyse enzymatique dans un solvant organique avec la lipase *pancréatique de porc*. La PPL hydrolyse l'acétate racémique du *cis*-(3-benzyloxyméthyl)oxiran-2-méthyle dans le xylène. Le produit alcool de la réaction est obtenu avec un excès énantiomérique modéré, (ee = 64%) à une conversion (C=60%) (schéma 103).

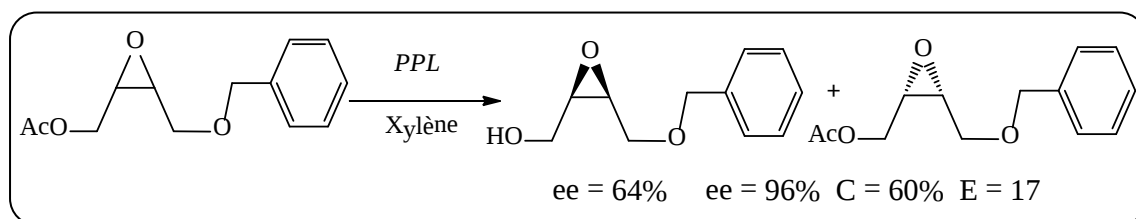


Schéma 103: Hydrolyse enzymatique de l'acétate du *cis*-(3-benzyloxyméthyl)oxiran-2-méthyle

Par ailleurs, Bo Wang et coll¹⁶⁶ ont décrit l'hydrolyse enzymatique de l'acétate racémique du 1-phényléthyle dans le n-hexane via la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B), en présence de l'ammoniaque (NH₃), appelée aussi déacylation, cette réaction a permis d'obtenir l'énantiomère produit énantiomériquement pur (ee > 99%) (schéma 104).

¹⁶² (a) G. Szatzker, L. Moczar, P. Kolonists, L. Novak, P. Huszthy, L. Poppe; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 2483-2490. (b) N. Shimizu, H. Akita, T. Kawamata; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13, 2123-2131. (c) F. Bellezza, A. Cipiciani, G. Riccib, R. Ruzziconib; *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8005-8012.

¹⁶³ (a) L-L. Shen, J-H. Jeong; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1647-1653. (b) C. Petucci, L. Di, O. Mcconnell; *Chirality*, **2007**, 19, 701-705. (c) A. Kirschner, P. Lenger, U-T. Bornschuer; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 2871-2874.

¹⁶⁴ (a) A. Ghanem; *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-2754. (b) R-J. Kazlauskas, H-K. Weber; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, 2, 121-126. (c) G. Carrea, S. Riva; *Angrew. Chem. Int. Ed*, **2000**, 39, 2226-2254. (d) L-E. Janes, R-J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 3719-3733.

¹⁶⁵ L. Shen, F. Wang, H.S. Mun, M. Suh, J. H. Jeong; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1647-1653.

¹⁶⁶ B. Wang, L. Jiang, J. Wang, J. Ma, M. Liu, H. Yu; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 980-985.

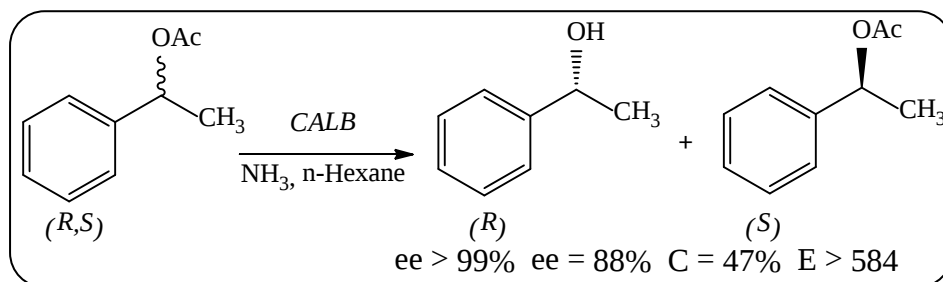


Schéma 104 : Hydrolyse enzymatique de l'acétate du (R, S)-1-phényléthyle en présence de l'ammoniaque (NH₃).

Fülöp et coll¹⁶⁷ ont étudié la réaction d'hydrolyse du N-Boc protégé, 1-(3-acétylpropyl)-6,7-diméthoxy-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline, dans le t-BuOMe en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacea* (PS). Le produit alcool de la réaction est obtenu avec un excès énantiomérique de $ee = 96\%$ avec une faible conversion ($C = 17\%$) (schéma 105).

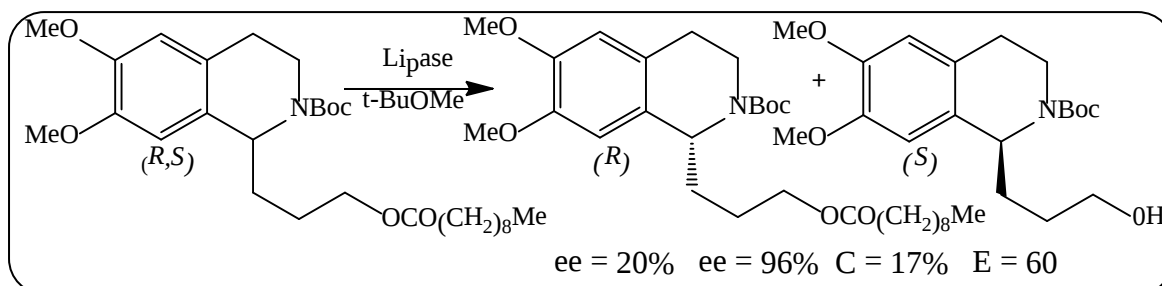


Schéma 105 : Hydrolyse enzymatique de l'acétate du (R, S)-1-phényléthyle en présence de l'ammoniaque

Préambule pour la réaction d'hydrolyse dans un milieu non conventionnel

La réaction d'hydrolyse dans un milieu non conventionnel a été observée au cours des travaux réalisés par notre équipe¹⁶⁸ sur les réactions de dédoublements cinétiques dynamiques. (schéma 106), mises au point par Mme Merabet-Khelassi.

¹⁶⁷ E. Forró, L. Schönstein, F. Fülöp ; Tetrahedron : Asymmetry, **2011**, 22, 1255-1260

¹⁶⁸ Réf 98: M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant ; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1790-1796.

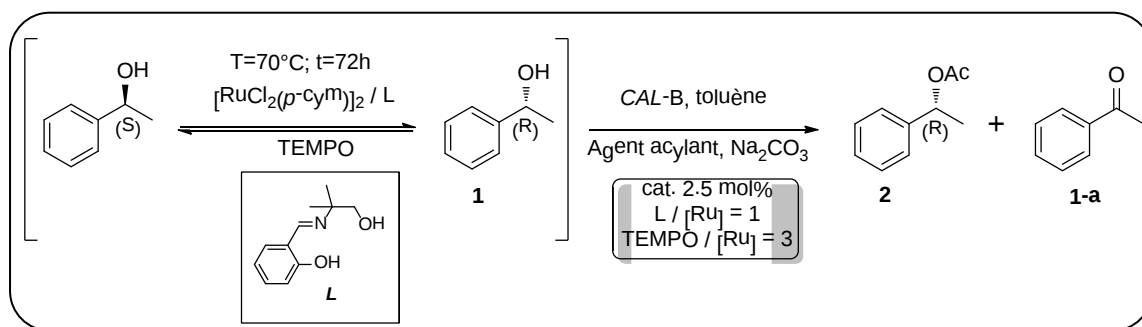
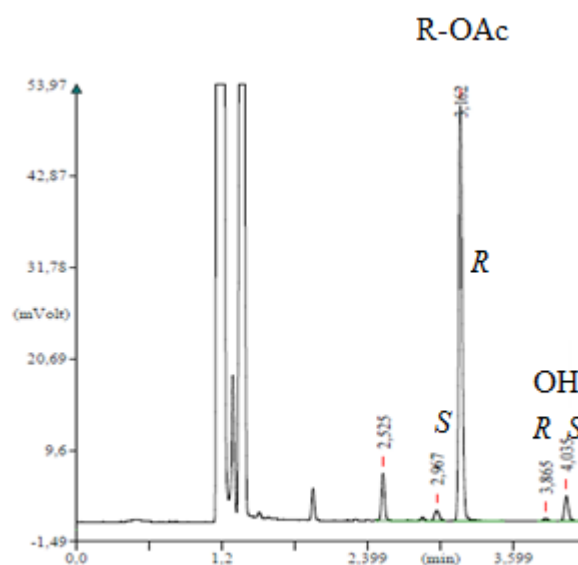


Schéma 106 : Dédoublage cinétique dynamique du phényléthanol

Lors des tests préliminaires de DCD du (+/-)-phényléthanol, nous avons remarqué que l'introduction d'un équivalent de carbonate de sodium joue en faveur de la formation de l'acétate (**R**) correspondant avec un excellent excès énantiomérique ee=96%.

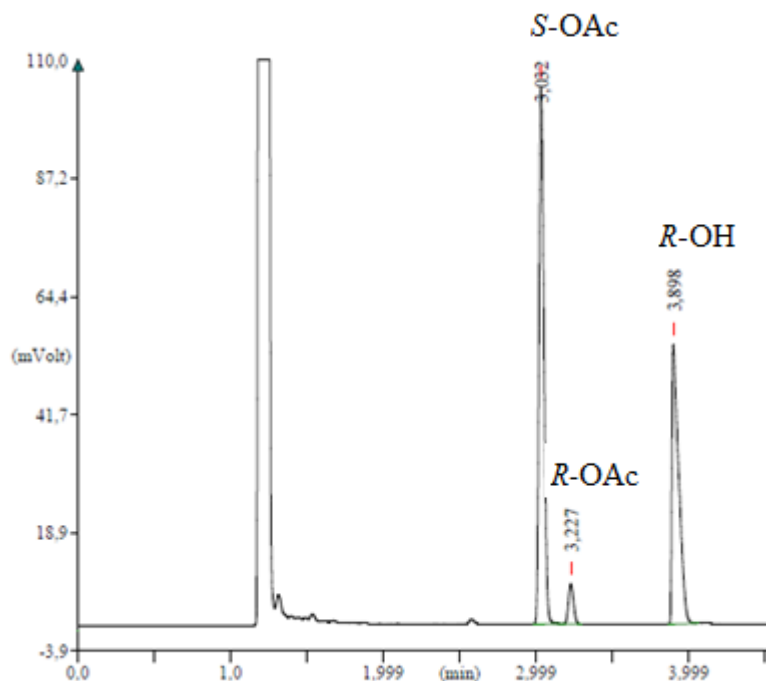
Entrée	Na ₂ CO ₃	Conv (%)	[2 / 1-a]	ee _(R) (%)
1	Sans	91	88/12	93,5
2	Avec	87	92/8	96

On constate que le pourcentage de l'alcool restant n'était pas nul (racémique) mais qu'il existait un certain excès énantiomérique.



Nous avons attribué ce phénomène à la possibilité d'existence d'une réaction d'hydrolyse compétitive. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons réalisé un test en mélangeant un

équivalent acétate racémique du phényléthyl dans 2mL de toluène en présence de 40 mg de CAL-B et un équivalent de Na_2CO_3 comme additif. L'évolution de la réaction a été contrôlée par GC chirale. Après 48 heures, nous avons observé l'apparition d'un nouveau produit énantiomériquement pur ayant le même temps de rétention que le phényléthanol, nous l'avons isolé et nous avons confirmé sa structure par RMN¹H, la configuration étant (*R*).



Généralement l'hydrolyse enzymatique en milieu aqueux ou en milieu bi-phasique n'est pas sélective¹⁶⁹, elle est limitée par la difficulté de contrôler la valeur du pH¹⁷⁰ au cours de la réaction d'hydrolyse, par la nature du cofacteur utilisé et par celle de certains substrats qui sont peu solubles dans ce milieu aqueux. Ces limitations justifient bien les applications modérées de ces deux milieux, à savoir, le milieu aqueux et le milieu bi-phasique en l'hydrolyse enzymatique des acétates secondaires¹⁷¹ et / ou les acétates benzyliques primaires¹⁷² comparativement aux réactions de transestérifications¹⁷³. L'hydrolyse

¹⁶⁹ (a) A. Bierstedt, J. Stölting, R. Fröhlich, P. Metz; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 3399-3407. (b) S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142.

¹⁷⁰ L-L. J. Rakels, J-J. A. Straathof, J-J. Heijneii; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 93-100.

¹⁷¹ (a) S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142. (b) Y. Igarashi, S. Otsutomo, M. Harada, S. Nakano; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 2833-2837. (c) J. Doussot, A. Guy, R. Garreau, A. Falguières, C. Ferroud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 2259-2262 (d) S. Joly, M-S. Nair; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 2283-2287. (e) R. Chênevert, S. Graviil, J. Bolte; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 2081-2086.

¹⁷² (a) O. Goj, A. Burchardt, G. Haufe; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 399-408. (b) M. Goto, M. Kawasaki, T. Kometani; *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, **2000**, 9, 245-250. (c) O. C. A. Machado, A. A. T. da Silvia, C. P. Borges, A. B. C. Simas, D. M. G. Freire; *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, **2011**, 69, 42-46.

enzymatique en milieu organique est quasiment non étudiée, cette nouvelle réaction ayant été découverte au cours du dédoublement cinétique dynamique.

II-2 : Dédoublement cinétique par hydrolyse des acétates 1a-9a catalysé par la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) en milieu non-conventionnel

Suite à ce résultat, nous avons été intéressés par ce phénomène et nous avons effectué la première tentative d'hydrolyse d'acétates secondaires dans le toluène avec le carbonate de sodium en milieu organique exclusivement (schéma 107).

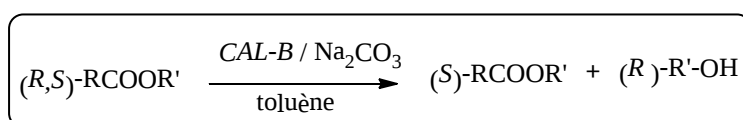


Schéma 107: Dédoublement cinétique d'acétates racémiques par hydrolyse avec la CAL-B et Na_2CO_3

Dans un premier temps, nous avons effectué la réaction d'hydrolyse avec la CAL-B sur l'acétate du 1-phényle éthanol (**7a**) et étudié les différents paramètres influant sur la réactivité et la sélectivité de l'enzyme.

II-3 : Etude de l'hydrolyse en milieu non-conventionnel : Optimisation des paramètres de la réaction

1- Influence de la quantité et la nature de la lipase

Pour l'étude de ce paramètre nous avons choisi quatre lipases commerciales : la lipase de *Candida cylindracea* (CCL ; activité spécifique = 3,85 U/mg), la lipase de *Candida rugosa* (CRL ; 1170 U/mg), la lipase de *Pseudomonas cepacea* (PCL ; > 30,000 U/mg) et la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B ; > 10,000 U/mg). Nous avons examiné la quantité catalytique optimale, le temps de la réaction et la température dans le but de parvenir aux conditions adéquates.

Nous avons étudié en particulier, la source d'eau responsable de l'hydrolyse ; Pour cela, et dans un premier temps le toluène utilisé est mis sur tamis moléculaire.

¹⁷³ (a) N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J.C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2004**, 45, 627-630. (b) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J.C. Fiaud ; Tetrahedron: Asymmetry, **2006**, 17, 797-800. (c) M. Merabet, N. Melaïs, M. Boukachabia, J.C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouche ; J. Soc. Alg. Chim, **2007**, 17, 185-194. (d) M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche ; C. R. Chimie, **2011**, 14, 978-986.

La réaction est effectuée sur une milli mole d'acétate racémique avec une milli mole de carbonate de sodium dans 3ml de toluène avec la lipase. Des réactions témoins sont mise en œuvre pour examiner le rôle de la lipase et de Na_2CO_3 ; Le premier témoin à blanc, est une réaction en l'absence de lipase et de Na_2CO_3 , le second étant est la réaction avec Na_2CO_3 sans lipase.

Nous avons ensuite étudié la réaction avec la *CAL-B* sans Na_2CO_3 , puis examiné le taux catalytique optimal. D'autres lipases ont été mises en œuvre dans cette réaction.

Après 72h de réaction, le mélange acétate résiduel / alcool formé est récupéré. Les excès énantiomériques (ee) sont déterminés par chromatographie chirale (CPG) ou HPLC et les résultats sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Influence de la quantité et la nature de la lipase sur l'hydrolyse de l'acétate 7a

Entrée ^a	Lipase (mg)	Temps (h)	Ee _s (%) ⁱ (S)	Ee _p (%) ⁱ (R)	C (%) ^j	E ^j
1	- ^b	72	-	-	-	-
2	- ^c	72	-	-	-	-
3	<i>CAL-B</i> ^{d,e} (40)	72	9,5	99,5	9	>200
4	<i>CAL-B</i> ^e (40)	72	67	99,5	40	>500
5	<i>CAL-B</i> ^{e,g} (40)	48	86	99,5	46	>500
6	<i>CAL-B</i> ^f (50)	72	49	99,5	33	>500
7	<i>CAL-B</i> ^f (100)	72	70	99,5	41	>500
8	<i>CAL-B</i> ^{f,h} (100)	72	99	99,5	50	>500
9	<i>CCL</i> (100)	6 jours	0,4	7	5	1
10	<i>CRL</i> (100)	6 jours	0,4	12,4	3	1
11	<i>PCL</i> (100)	6 jours	6,4	99,5	6	>500

^a les Conditions de la réaction : 1mmol de l'acétate racémique, 1mmol de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène en de présence de diverses lipases à une température ambiante.

^b réaction se fait sans la lipase et sans Na_2CO_3 , ^c la réaction se fait sans lipase et en présence de Na_2CO_3

^d la réaction en présence de lipase et en l'absence de Na_2CO_3

^e *CAL-B* est de la firme d'Aldrich, l'activité spécifique est >10,000 U/ mg

^f *CAL-B* est de la firme de Sigma, l'activité spécifique est >10,000 U/ mg

^g l'éther diéthylique (Et_2O) comme solvant organique, ^h à 40°C, ⁱ Calculé avec la GC chirale

^j Conversion et sélectivité: [C = ee_s/ee_s+ee_p ; E = Ln[(1-C)(1-ees)] / Ln [(1-C)(1+ees)]

On constate que la *CAL-B* est la seule lipase active et sélective, qui nous a permis d'obtenir des sélectivités élevées ($E > 500$) et de bonnes conversions ($33\% < C < 40\%$) (entrées 4 et 6). Après 6 jours d'agitation, les lipases *CCL* et *CGL* montrent de faibles réactivités et sélectivités $C < 5\%$ et $E = 1$ (entrées 9 et 10). La *PCL* est aussi peu réactive mais montre une sélectivité $E > 500$ (entrée 11).

L'analyse de ce tableau montre qu'il n'y a pas d'hydrolyse en l'absence de la *CAL-B* et du carbonate de sodium (entrée 1). En présence d'un équivalent de Na_2CO_3 et en l'absence de la lipase, aucune réaction d'hydrolyse n'a été observée non plus (entrée 2).

La présence de la *CAL-B* sans Na_2CO_3 conduit à une hydrolyse de l'acétate avec un faible avancement ($C = 9\%$, $E > 200$) après 72 heures (entrée 3).

L'utilisation de la lipase *CAL-B* avec le carbonate de sodium dans la réaction permet d'augmenter l'avancement de la réaction à $C = 40\%$ et la sélectivité, $E > 500$ (entrée 4). La présence de Na_2CO_3 influe directement et de manière significative sur la réactivité de la lipase.

L'augmentation de la quantité de la lipase à 100 mg montre le même avancement de la réaction d'hydrolyse enzymatique ($C = 41\%$) avec le maintien de la sélectivité ($E > 500$) (entrée 7).

Lorsque la température est augmentée jusqu'à 40°C , nous obtenons les deux énantiomères, à savoir, l'acétate résiduel et l'alcool formé de la réaction optiquement purs, $ee > 99,5\%$, à une conversion de 50% , $E > 500$ (entrée 8). Le remplacement du toluène comme solvant de réaction par un solvant hydrophobe, le diéthyléther donne une conversion de ($C = 46\%$) avec sélectivité ($E > 500$) (entrée 5).

En conclusion, l'utilisation des solvants hydrophobes tels que le toluène et l'éther diéthylique permet de dire que l'eau impliquée dans le processus d'hydrolyse de ces acétates benzyliques secondaires est probablement l'eau (native) de la lipase.

Le même phénomène a été observé par Fülöp et coll¹⁷⁴ qui ont noté que l'hydrolyse des acétates se fait sans l'ajout d'eau. L'hydrolyse est attribuée à l'eau présente dans la préparation de la lipase de *Burkholderia cepacea* ou dans le solvant utilisé.

Parmi les lipases que nous avons utilisées, la *CAL-B* est la seule qui donne des sélectivités ($E > 500$) et des conversions élevées ($C > 33\%$).

Nous avons optimisé les conditions réactionnelles de l'hydrolyse enzymatique en milieu organique en présence d'une base avec l'acétate du 1-phényléthanol. Pour valider ce protocole nous l'avons appliqué à une série d'acétates secondaires (schéma 110).

Les acétates benzyliques secondaires **1a–9a** sont hydrolysés selon le nouveau protocole sur une milli mole de substrat dans 3ml de toluène en présence d'une quantité variable de Na_2CO_3 et de la lipase *CAL-B* en quantités ($m_1 = 50\text{mg}$) et ($m_2 = 100\text{mg}$) pour chaque substrat à température égale à 40°C pendant 72 heures.

Après les 72 heures de réaction, les acétates résiduels et des alcools formés sont récupérés après filtration de la lipase et ils sont séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les excès énantiomériques (ee) sont déterminés par GC ou HPLC sur colonne chirale.

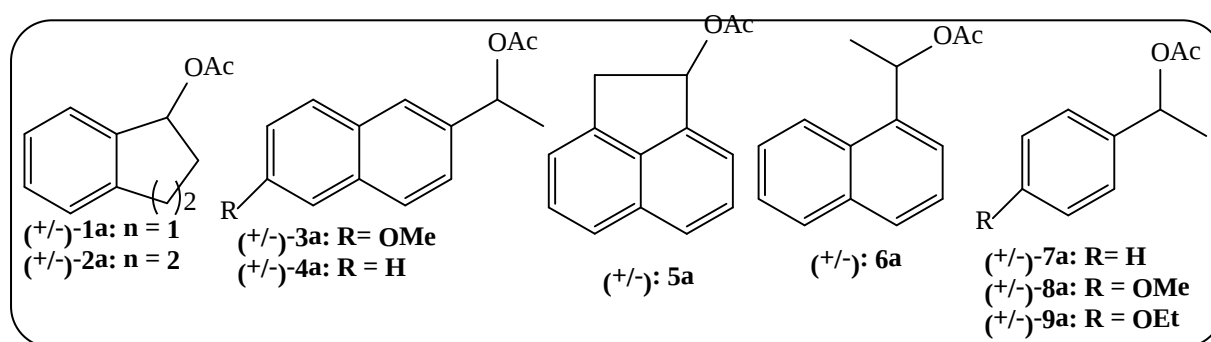


Schéma 108: Dédoublage cinétique des acétates racémiques **1a–9a** par hydrolyse enzymatique dans le toluène en présence du carbonate de sodium

Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau 7.

¹⁷⁴ Réf 167 : E.Forró, L. Schönstein, F. Fülöp ; Tetrahedron : Asymmetry, **2011**, 22, 1255-1260.

Tableau 7 : Hydrolyse enzymatique des acétates racémique 1a-9a dans le toluène

Entré ^a	Substrat	CAL-B (mg)	ee _s (%) ^b (S) ^e	rdt(%) ^c	ee _p (%) ^b (R) ^g	rdt(%) ^c	C ^d (%)	E ^d
1	1a	100	95	35	99.5	30	49	>500
		50	98.2	36	99	32	50	>500
2	2a	100	78	46	99.5	35	44	>500
		50	99.5	48	99.5	48	50	>500
3	3a	100	99	32	99.5	34	50	>500
		50	93	29	96.3	30	49	>500
4	4a	100	95	47	99.5	45	49	>500
		50	98	48	98.6	48	50	>500
5	5a	100	-	-	-	-	-	-
		50	90.3	35	98.2	27	48	>300
6	6a	100	-	-	-	-	-	-
		50	99	-	99	-	50	>200
7	8a	100	95	47	97	46	49	>300
		50	96	48	97	48	50	>200
8	9a	100	92	45	95.6	40	49	150
		50	95	42	97.6	35	49	>300

^aRéaction réalisée avec 1mmol d'acétate racémique, 1mmol de Na₂CO₃ dans 3 ml de toluène à 40°C en présence de CAL-B pendant 72 heures. ^bCalculé par la GC ou HPLC. ^cRendements chimiques isolés ^gConfiguration absolue déterminée par la comparaison entre le pouvoir rotatoire du produit isolé et la littérature (partie expérimentale)

L'examen du tableau 7 fait apparaître l'ensemble des substrats dédoublés avec la lipase CAL-B, les sélectivités élevées E>150 et les conversions maximales C>49%.

En présence de 100 mg de CAL-B, les acétates racémiques sont dédoublés avec de bonnes conversions et d'excellentes sélectivités (E>500) pour les différentes structures. La diminution de la quantité d'enzyme jusqu'à 50 mg n'entraîne aucune influence sur l'hydrolyse, les sélectivités et réactivités étant analogues. On constate que la CAL-B conserve une énantiopréférence pour la configuration (R). La quantité optimale de lipase est égale à 50 mg.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés au rôle du carbonate de sodium dans le système biocatalytique et son influence sur la sélectivité enzymatique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la quantité de Na_2CO_3 et celui de la nature de l'ion carbonate. Pour cela, nous avons modifié la quantité de Na_2CO_3 mise en jeu dans la réaction et nous avons modifié la nature de l'ion carbonate ; Nous avons substitué l'ion sodium Na^+ par l'ion potassium K^+ et l'ion calcium Ca^{2+} .

2- L'influence de la quantité et de la nature du carbonate

Nous avons étudié les effets de la quantité du carbonate de sodium et de la nature de l'ion carbonate. Les résultats sont réunis dans le tableau 8.

Tableau 8 : Influence du carbonate de sodium sur l'hydrolyse enzymatique de l'acétate du 1-phényléthanol 7a

Entrée ^a	Carbonate	Nbr de mmol	ee _s ^d (%)	rdt ^e (%)	ee _p ^d (%)	rdt ^e (%)	C ^f (%)	E ^f
1	Sans ^b	0	9,5	59	99,5	7	9	>200
2	Na_2CO_3 ^c	1	-	-	-	-	-	-
3	Na_2CO_3	3	99,5	15	98	48	50,5	>500
4	Na_2CO_3	2	99,5	18	99,5	24	50	>500
5	Na_2CO_3	1	83	43	99,5	30	46	>500
6	Na_2CO_3	0,5	97,5	23	98,7	22	49,7	>500
7	Na_2CO_3	0,4	99,2	28	>99	15	48	>500
8	Na_2CO_3	0,3	75,2	24	98,2	19	43	>300
9	Na_2CO_3	0,2	36,2	70	>99	15	27	>250
10	Na_2CO_3	0,1	31	26	97	10	24	97
11	K_2CO_3	1	95	28	99,5	15	49	>500
12	K_2CO_3	0,5	99	24	99	19	50	>500
13	CaCO_3	1	15	-	>99	-	13	>250
14	CaCO_3	0,5	15	-	>99	-	13	>250

^a les Conditions de la réaction : 1mmol de l'acétate racémique, quantité adéquate de Na_2CO_3 en mmol dans 3 ml de toluène à 40°C en de présence de 50 mg de CAL-B. ^b la réaction en présence de lipase et en l'absence de Na_2CO_3 . ^c la réaction se fait sans lipase et en présence de Na_2CO_3 . ^d mesuré par la GC ou HPLC. ^e rendements chimiques. ^f Conversion et sélectivité : [C = $\text{ee}_s/\text{ee}_s + \text{ee}_p$; E = $\text{Ln}[(1-\text{C})(1-\text{ees})] / \text{Ln} [(1-\text{C})(1+\text{ees})]$]

Les résultats du tableau 8 confirment qu'il y'a une réaction d'hydrolyse enzymatique dans le toluène, solvant hydrophobe, même en l'absence de Na_2CO_3 (entrée 1). L'eau responsable de l'hydrolyse est probablement celle de la lipase, « l'eau native ».

En l'absence de lipase nous n'avons obtenu aucune réaction malgré la présence du carbonate de sodium (entrée 2). Avec différentes quantités de Na_2CO_3 qui varient de 0,1 à 3 mmoles, la réaction avance de C=24% à 50,5%, la conversion diminue lorsque la quantité de carbonate diminue mais la sélectivité reste élevée (entrées 3-10).

L'utilisation de n= 2, 3, 0,5 et 0,4 mmoles de carbonate de sodium permet d'obtenir les énantiomères (alcool et acétate) optiquement purs pour une conversion de (C=50%) avec une sélectivité supérieure à 500 et des rendements modérés (entrées 3, 4, 6 et 7).

Avec un équivalent de NaCO_3 , nous avons obtenus une conversion de 46%, une bonne sélectivité ($E > 500$) avec de bons rendements chimiques (entrée 5). Une légère diminution de conversion (C= 43%) est obtenue avec 0,3 équivalent avec la récupération des deux énantiomères avec de faibles rendements (entrée 8).

Lors de l'utilisation de 0,1 et 0,2 équivalent de NaCO_3 , nous avons obtenu des conversions modérées ($24\% < C < 27\%$) avec les sélectivités ($97 < E < 250$) (entrées 9 et 10).

L'utilisation du carbonate de potassium avec 0,5 et 1 équivalent permet d'obtenir les énantiomères optiquement purs à une conversion de C = 50% avec une sélectivité $E > 500$ mais avec de faibles rendements (entrée 11 et 12).

Avec le carbonate de calcium, nous avons obtenus un faible avancement (C = 13%), la sélectivité restant élevée ($E > 250$) (entrée 13 et 14).

3- Essais d'interprétation du mécanisme de la réaction d'hydrolyse en milieu non-conventionnel

La littérature montre que l'addition des sels des métaux tels que le LiCl ou le MgCl_2 augmente l'énantiosélectivité de la lipase de *Candida rugosa* (LCR) dans une réaction

d'hydrolyse enzymatique en milieu bi-phasique¹⁷⁵, cette amélioration est due à une meilleure flexibilité de la lipase qui peut avoir plusieurs conformations. Les mêmes observations ont été rapportées par Salgin et coll¹⁷⁶, qui ont montré que le traitement de la *LCR* par les ions du métal et / ou leurs utilisations comme des additifs augmenterait le taux d'hydrolyse du racémique naproxène méthyle ester dans un milieu bi-phasique. Ces additions assurent des interactions électrostatiques entre l'ion du métal /enzyme, ce qui permet de donner une diversité de conformations.

L'approche des substrats du site actif semble plus facile en présence des cations monovalents Na^+ et K^+ lors de l'hydrolyse enzymatique¹⁷⁷ par rapport aux cations divalents Ca^{++} ce qui concorde avec nos résultats où l'on obtient une conversion plus faible ($C = 13\%$) pour CaCO_3 (entrées 13 et 14).

Récemment, l'utilisation du CaCO_3 comme stabilisateur d'une lipase microbienne a été décrite, l'auteur suppose que la stabilisation apporté par cet ion est de sauvegarder le milieu à un $\text{pH} = 6$ durant l'hydrolyse de l'acétate 2-éthylhexyl dans le milieu aqueux¹⁷⁸.

Dans notre cas, la bonne énantiosélectivité de la lipase *CAL-B* est peut être attribuée à l'ion du métal qui capture le groupement partant (AcO^-) au cours de la réaction d'hydrolyse. Les sels formés déplacent l'équilibre dans le sens de la formation du produit, et une simple filtration suffit pour les éliminer.

4- Validation de la méthode d'hydrolyse sur les substrats 1a-9a : Optimisation de la quantité de carbonate

Nous avons effectué la réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu non-conventionnel avec 1 milli mole de carbonate de sodium. Afin d'évaluer la reproductibilité de cette méthode sur les différents substrats, nous avons repris la réaction avec des quantités de Na_2CO_3 de 0.5 milli mole et 1 milli mole, pour 50mg de *CAL-B*. Les résultats sont réunis dans le tableau 9.

¹⁷⁵ T. Okamoto, S. Ueji; Biotechnol. Lett, **2000**, 22, 1169-1171.

¹⁷⁶ S. Sligin, S. Takaç, Chem. Eng. Technol, **2007**, 30, 1739-1743.

¹⁷⁷ M. Tran-Ha, V. Santos ; Wiley, D. E. J. Membr. Sci. 2005, 251, 179-188.

¹⁷⁸ S. Oda, H. Wakui, S. Ohashi ; J. Biosci. Bioeng, **2011**, 112, 151-153

Tableau 9 : Hydrolyse enzymatique des acétates racémique 1a-9a dans le toluène

Entrée ^a	Substrat	Na ₂ CO ₃ 3 (mmol)	ee _s (%) ^b (S) ^d	ee _p (%) ^b (R) ^d	C ^c (%)	E ^c
1	1a	0,5	-	-	-	-
		1	98.2	99	50	>500
2	2a	0,5	89	99	47.5	>500
		1	99.5	99.5	50	>500
3	3a	0,5	-	-	-	-
		1	93	96.3	49	>500
4	4a	0,5	84	99	46	>500
		1	98	98.6	50	>500
5	5a	0,5	-	-	-	-
		1	90.3	98.2	47.9	>300
6	6a	0,5	73	99	42.5	>200
		1	99	99	50	>200
7	7a	0,5	99	99	50	>500
		1	83	99.5	45.5	>200
8	8a	0,5	99	93	52	144
		1	96	97	49.6	>200
9	9a	0,5	99	99	50	>200
		1	95	97.6	49.3	>300

^aréaction réalisée avec 1mmol d'acétate racémique, quantité adéquate de Na₂CO₃ en mmol dans 3 ml de toluène à 40°C en présence de 50mg CAL-B pendant 72 heures. ^bCalculé par GC ou HPLC. ^c Conversion et sélectivité : $[C = ee_s/ee_s + ee_p]$; $E = \ln [(1-C)(1-ees)] / \ln [(1-C)(1+ees)]$. ^dConfiguration absolue déterminée par la comparaison entre le pouvoir rotatoire du produit isolé et la littérature (partie expérimentale)

Les résultats obtenus montrent que la quantité 0,5mmole de Na₂CO₃ pourrait suffire (entrées 2, 4, 6, 7, et 8) mais pour les substrats **1a**, **3a** et **5a**, l'hydrolyse n'avance pas et il est nécessaire d'ajouter 1mmole de Na₂CO₃.

Concernant les substrats étudiés, l'hydrolyse enzymatique avec Na₂CO₃ donne de bonnes conversions (C>45%) et de bonnes sélectivités, E > 150, que ce soit avec 0,5 ou 1 millimole.

5- Comparaison entre l'hydrolyse enzymatique dans les milieux conventionnel et non-conventionnel

Nous avons comparé les deux méthodes d'hydrolyse enzymatiques, l'hydrolyse des acétates aromatiques secondaires **1a-9a** réalisée selon les deux protocoles, le milieu conventionnel et non-conventionnel (schéma 109).

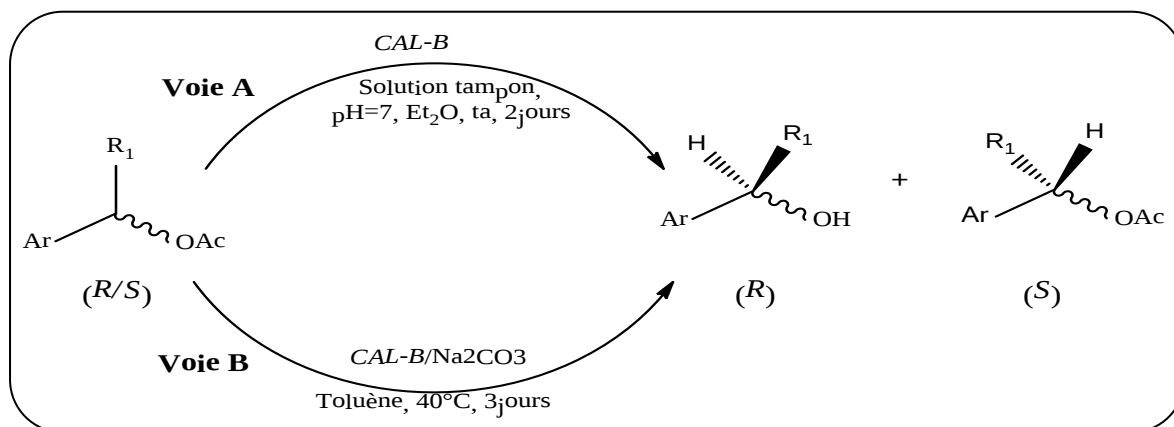


Schéma 109: Dédoublage cinétique des acétates racémiques **1a-9a** par hydrolyse enzymatique dans les deux milieux

La **voie A** présente l'hydrolyse conventionnelle dans le milieu bi-phasique, et la **voie B** présente l'hydrolyse en milieu organique. Les résultats des deux procédés sont intégrés et illustrés par les histogrammes (figure 14 et 15) suivants l'un pour la conversion et l'autre pour la sélectivité.

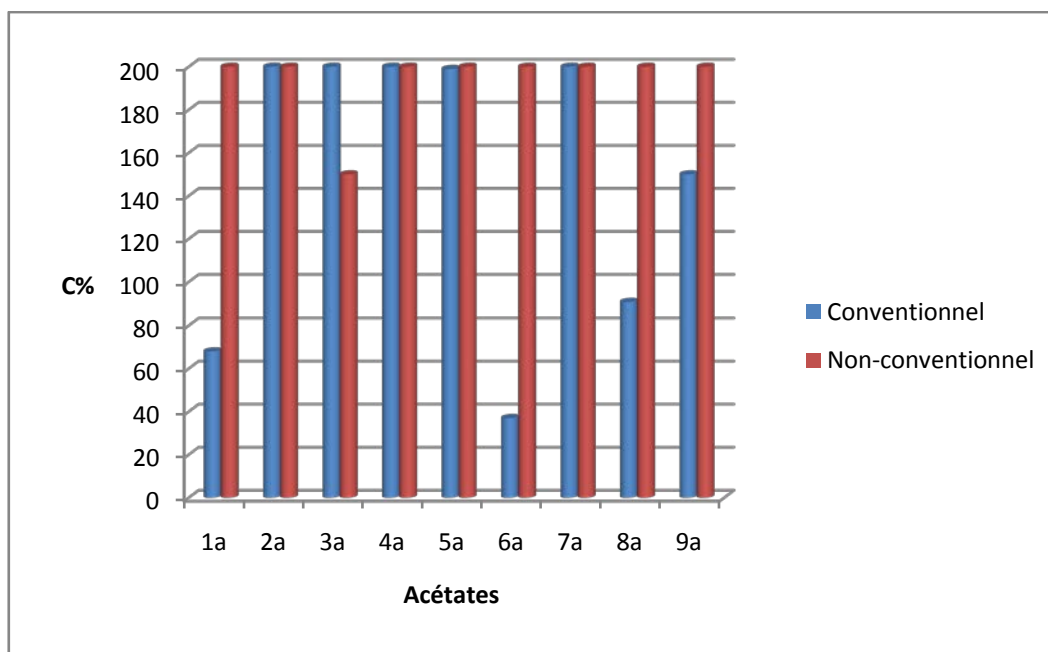


Figure 14 : Comparaison de la conversion entre les deux méthodes

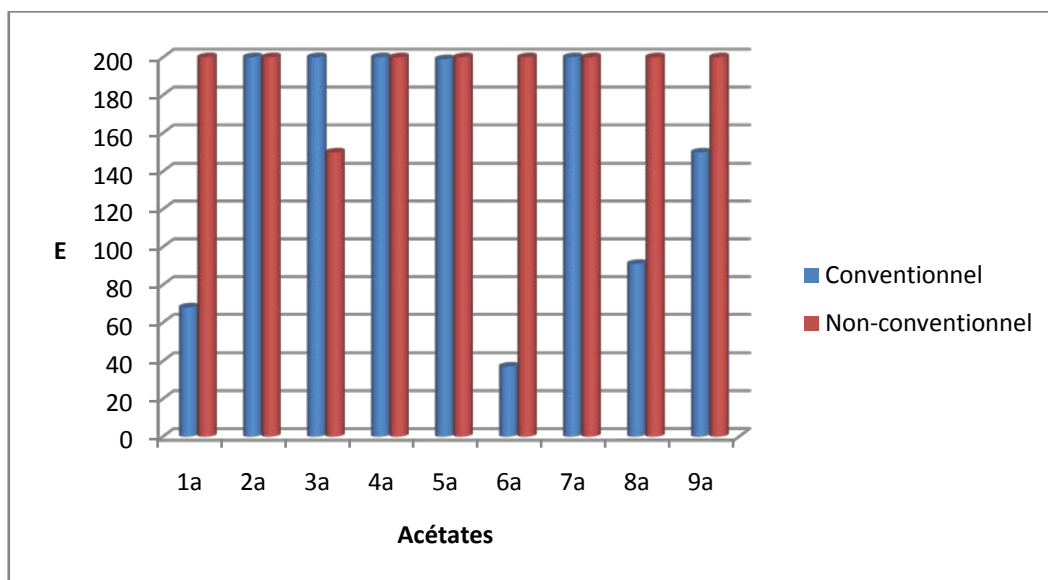


Figure 15 : Comparaison de la sélectivité entre les deux méthodes

L'étude des deux histogrammes montre clairement que l'hydrolyse en présence du carbonate de sodium dans le toluène comme solvant organique donne de bons résultats concernant ces acétates aromatiques secondaires. Cette méthode est aussi beaucoup plus intéressante sur le plan pratique, il suffit qu'une simple filtration pour récupérer le produit tandis que dans le milieu bi-phasique, il est nécessaire d'effectuer une filtration puis une extraction suivie de la récupération des phases organiques, de leur séchage et d'une deuxième filtration. (schéma 110)

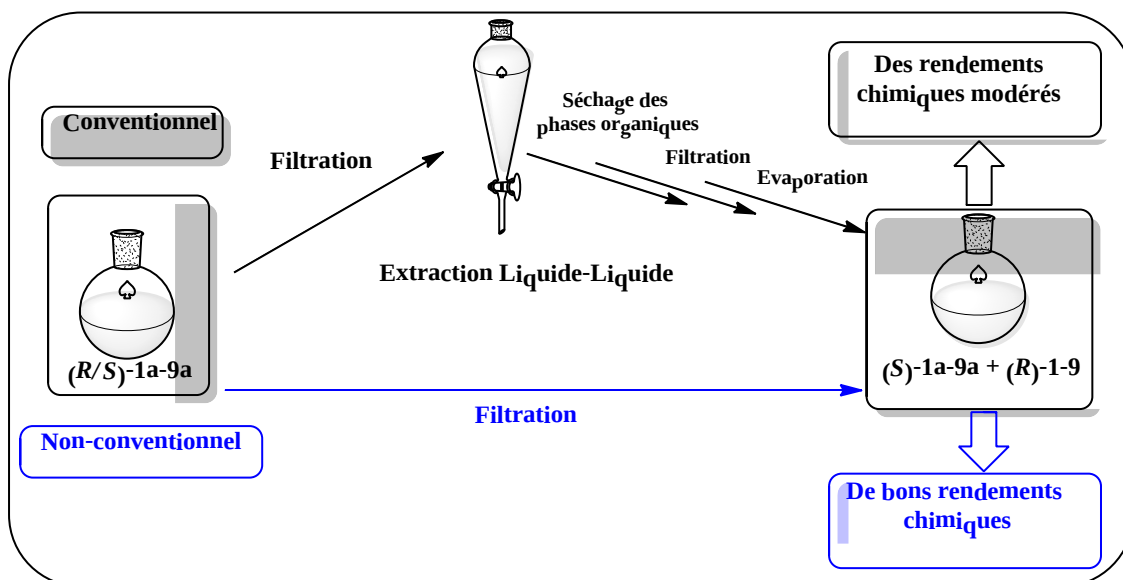


Schéma 110: Comparaison entre les deux méthodes en pratique.

II-4 : Conclusion

Nous avons mis au point une nouvelle méthode de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique en milieu organique en présence des sels de carbonate. La nouvelle réaction est optimisée ; le taux catalytique, la quantité optimale de carbonate, le temps de réaction, la nature du solvant sont mis au point sur le 1-phényléthanol. La réaction est sélective avec la *CAL-B* et le rôle de Na_2CO_3 est essentiel pour l'hydrolyse enzymatique. La validité de cette méthode est testée sur une série d'acétates secondaires de différentes structures. Les sels de carbonate ont un effet significatif sur la conversion de la réaction ; Parallèlement aucune perturbation sur la sélectivité. Une milli mole de carbonate de sodium avec 50mg de la *CAL-B* permet de donner une bonne sélectivité avec un bon rendement chimique. L'hydrolyse enzymatique dans le toluène, solvant hydrophobe, est assurée par la quantité d'eau de la lipase (l'eau nécessaire pour l'activité de la *CAL-B*). La majorité des quantités de Na_2CO_3 permet d'obtenir les énantiomères alcool et acétate avec des excès énantiomériques élevés à une conversion ($43\% < 50,5\%$) avec des sélectivités élevées $E > 300$. Cette méthodologie est simple, facile à utiliser et efficace, elle s'intègre totalement dans les méthodes vertes.

Deuxième partie

Troisième chapitre

Déracémisation par hydrolyse non-conventionnel avec la CAL-B combiné à la réaction de Mitsunobu

III-1 : Introduction

Parmi les méthodes de déracémisations citées auparavant (1^{ère} partie, chapitre IV), le processus de stéréo-inversion combiné à un dédoublement cinétique enzymatique est une méthode très intéressante pour l'obtention d'alcools énantiomériquement enrichis¹⁷⁹. Il existe peu de travaux concernant ce protocole et particulièrement, lorsqu'il est combiné avec les réactions d'hydrolyse enzymatique.

A cet égard, Roncaglia et coll¹⁸⁰ ont étudié la déracémisation du dichloroacétate racémique. L'énantiosélectivité élevée de la réaction d'hydrolyse enzymatique ($E=200$) et la stéréo-inversion de Mitsunobu permettent la conversion quantitative du substrat racémique en un seul énantiomère, le (*R*)-ester avec un excès énantiomérique ($ee=96\%$). (Schéma 111).

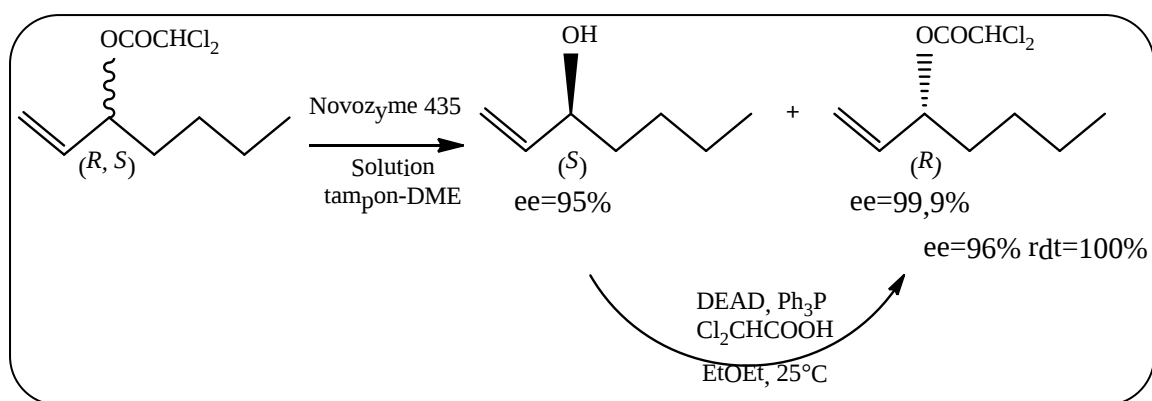


Schéma 111: Déracémisation du dichloroacétate racémique

Récemment, Matsumoto et coll¹⁸¹ ont publié la déracémisation des chaînes aliphatiques longues par hydrolyse enzymatique combinée à la réaction de Mitsunobu (schéma 112).

¹⁷⁹ (a) S. Takano, M. Suzuki, K. Ogasawara; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1043-1046. (b) E. Vanttinen, L-T. Kanerva; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786. (c) L-H. Liu, T. Anthonsen, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27. (d) A. Wallner, H. Mang, S-M. Glieck, A. Steinreiber, S-F. Mayer, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432. (e) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.

¹⁸⁰ F. Felluga, C. Forzato, F. Ghelfi, P. Nitti, G. Pitacco, U. M. Pagnoni, F. Roncaglia, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 527-536.

¹⁸¹ K. Matsumoto, K. Usuda, H. Okabe, M. Hashimoto, Y. Shimada, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 108-115.

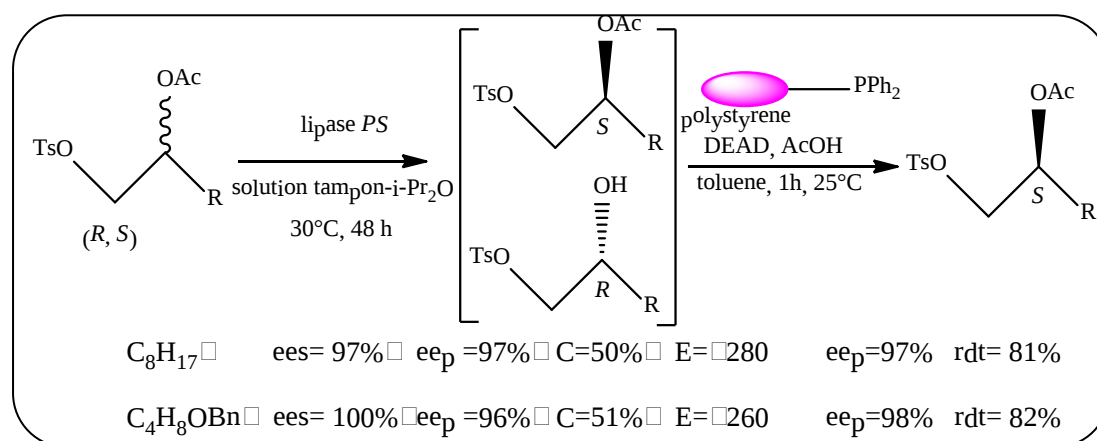


Schéma 112 : Déracémisation du monotosylate 1,2-diol

L'étude montre que les produits ont été obtenus avec de bonnes puretés optiques et de bons rendements chimiques. Dans les cas présentés, on constate que l'hydrolyse enzymatique est effectuée par la méthode conventionnelle c'est-à-dire en solution tampon/solvant organique.

Dans la continuité de travaux antérieurs¹⁸² où nous avons effectué une déracémisation par acylation enzymatique combinée à la réaction de Mitsunobu, et ce, pour obtenir les (R)-acétates énantio-purs avec un rendement quantitatif, nous avons entrepris d'étudier la déracémisation par hydrolyse enzymatique combinée à la réaction de Mitsunobu en utilisant le nouveau protocole d'hydrolyse plus simple, à mettre en œuvre en déracémisation et pour lequel la sélectivité est élevée.

III-2 : Déracémisation par hydrolyse enzymatique dans un solvant organique avec Na_2CO_3 combinée à la réaction de Mitsunobu

L'hydrolyse enzymatique dans le toluène en présence du carbonate de sodium donne de bonnes réactivités et sélectivités comparativement à l'hydrolyse dans le milieu bi-phasique (deuxième partie, chapitre II). Pour effectuer la déracémisation, la nouvelle procédure est simple à utiliser pour la stéréoinversion, il suffit de filtrer le mélange issu du dédoublement cinétique et d'ajouter le réactif de Mitsunobu. Cette procédure ne nécessite pas d'extraction liquide-liquide, permet une économie de solvants et donne de bons rendements chimiques. Ces avantages rendent l'hydrolyse dans le milieu non-conventionnel une voie idéale pour sa combinaison avec le protocole d'estérification de Mitsunobu, afin d'établir la déracémisation par stéréo-inversion.

¹⁸² Réf 19 : N. Bouzemi, L. Aribi-Zouieche, J-C. Fiaud, Tetrahedron : Asymmetry, **2006**, 17, 797-800.

1- Modèles étudiés

Les modèles sont les acétates **1a-9a** choisis pour effectuer l'étude de déracémisation par stéréo-inversion. Ce choix est dû au fait que les énantiomères de ces substrats ont été obtenus avec de bonnes puretés optiques dans les conditions de la réaction. Ils présentent tous des énantiosélectivités maximales à une conversion égale ou voisine de 50%. Ces deux conditions sont idéales pour appliquer une réaction de stéréo-inversion successive à la réaction d'hydrolyse enzymatique.

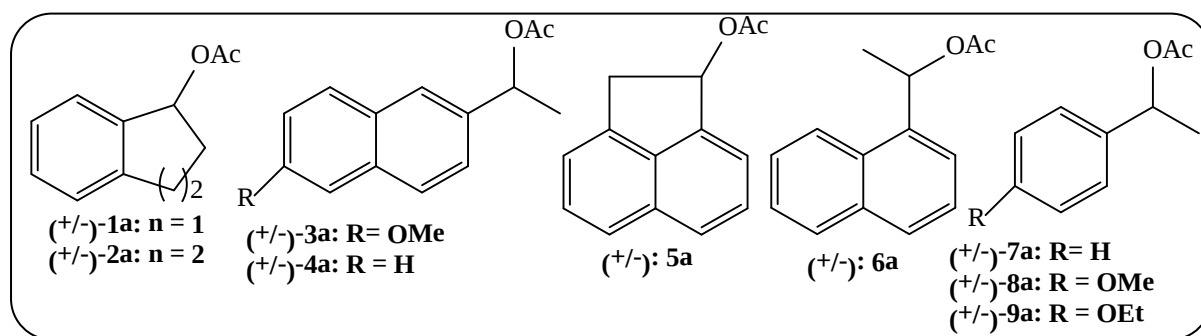


Schéma 113: Acétates racémiques **1a-9a** modèles

La déracémisation est réalisée en deux étapes successives, la première étant une hydrolyse enzymatique dans un milieu organique des acétates **1a-9a** racémiques en présence de Na_2CO_3 et la deuxième est une application directe du protocole de Mitsunobu sur le mélange réactionnel issu de l'étape précédente après filtration de l'enzyme. (schéma 116).

Première étape : hydrolyse enzymatique des acétates **1a-9a** racémiques

Le mode opératoire de la réaction d'hydrolyse enzymatique suivi dans cette étape est celui décrit au deuxième chapitre ; Les acétates sont hydrolysés dans le toluène en présence de Na_2CO_3 à 40°C . Il est important que la conversion obtenue au cours de cette étape doive être égale ou voisine de 50%. A cette conversion, les deux énantiomères sont obtenus avec d'excellentes puretés optiques.

Théoriquement à 50% de conversion, la moitié du substrat acétate se transforme en l'alcool produit et l'autre moitié restante sous forme de substrat résiduel avec d'excellents excès énantiomériques avec de bons rendements chimiques pour chaque énantiomère.

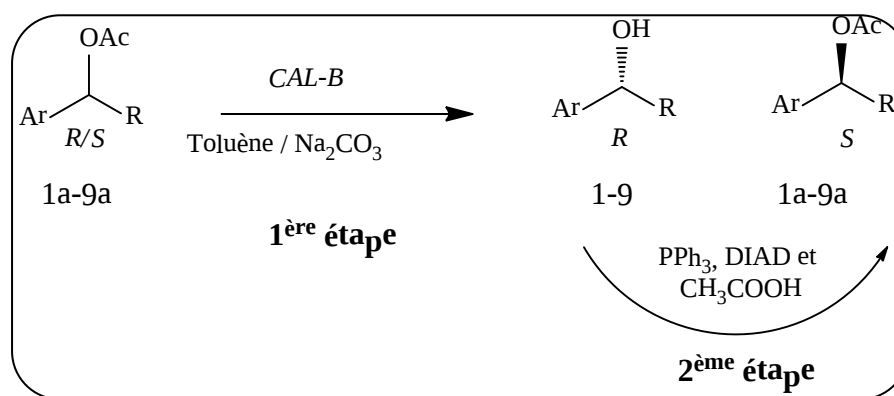


Schéma 114: Déracémisation par un système "hydrolyse enzymatique / protocole de Mitsunobu" dans un milieu non-conventionnel

Deuxième étape : inversion de configuration des alcools produits selon la réaction de Mitsunobu

Lorsque la conversion atteint les 50%, le mélange constitué de l'acétate résiduel (S) et de l'alcool produit (R) est dissous dans de l'éther di éthylique après élimination de l'enzyme par filtration. Ensuite et sans séparation de ces deux énantiomères, le mélange est soumis directement à l'action des réactifs de Mitsunobu où l'alcool produit subit une acylation in situ. L'estérification de l'alcool produit (R) se fait avec inversion de configuration pour donner l'énantiomère acétate (S) identique à celui issu de la réaction d'hydrolyse.

A la fin de la combinaison des deux réactions, à savoir, l'hydrolyse enzymatique et l'inversion de Mitsunobu, le produit acétate de configuration (S) est récupéré après une chromatographie sur colonne de gel de silice. Les résultats sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Déracémisation des substrats **1a-9a** par hydrolyse enzymatique / protocole de Mitsunobu

Entrée	Hydrolyse enzymatique					Réaction de Mitsunobu	
	Substrat ^a	ee _p (%) ^b (R)	ee _s (%) ^b (S)	C ^c (%)	E ^d	ee _s (%) (S)	rdt ^e (%)
1	1a	>99	98	50	>500	90	81
2	2a	>99	>99	50	>500	90	74
3	3a	96	93	49	>150	65	77
4	4a	98	98	50	>500	92	82
5	5a	>99	>99	50	>500	>99	89
6	6a	>99	>99	50	>500	>99	82
7	7a	>99	>99	45.5	>500	>99	70
8	8a	98	95	49	>300	57	72
9	9a	97	96	50	>200	60	89

a: sur 1 mmole de substrat à 40 °C. b : ee mesuré par chromatographie chirale, GC ou HPLC.

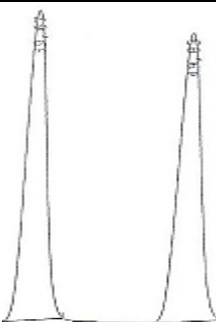
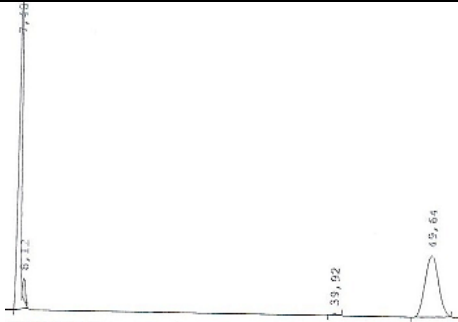
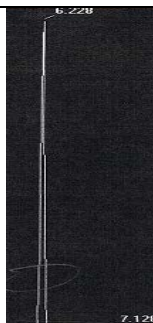
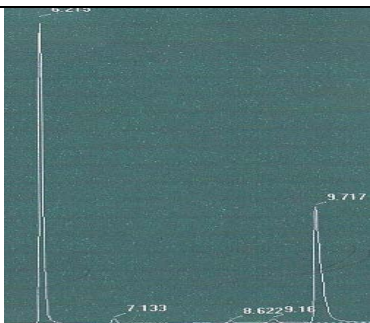
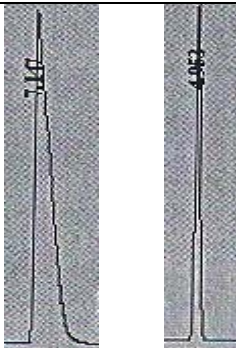
c: $C = ee_s/ee_s + ss_p$. d: $E = \ln[(1-c)(1-ees)] / \ln[(1-c)(1+ees)]$. e: rendement chimique.

On constate que la conversion $45\% < C < 50\%$ et que la sélectivité $E > 150$ après la réaction d'hydrolyse enzymatique pour tous les substrats **1a-9a** étudiés dans l'application de la réaction de Mitsunobu.

Les résultats détaillés du tableau 10 montrent que suite à la stéréo-inversion les (S)-acétates des substrats **1a-9a** sont obtenus quantitativement avec des excès énantiomériques de modérés à excellents ($57\% < ee < 99\%$) et des rendements chimiques élevés ($70\% < rdt < 89\%$). Nous observons une perte significative de la pureté optique des acétates dans certains cas, alors que les acétates obtenus au départ, suite à la réaction d'hydrolyse enzymatique ont d'excellents excès énantiomériques ($96\% < ee < 99\%$). Cette perte d'énantiosélectivité est observée suite à la réaction de Mitsunobu, et l'inversion de configuration ne doit pas être totale.

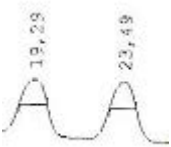
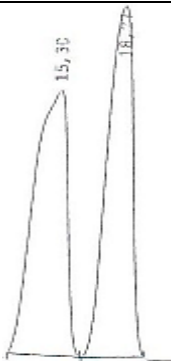
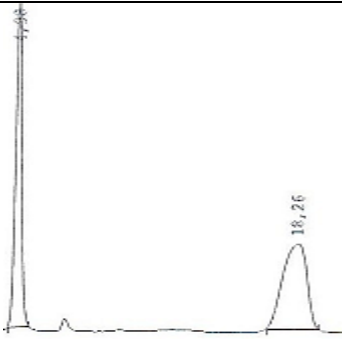
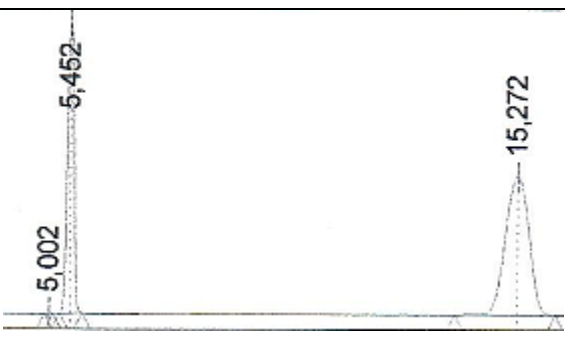
Les (S)-acétates **5a**, **6a** et **7a** sont obtenus avec une stéréo-inversion totale de l'alcool (R) obtenu optiquement pur ($ee > 99\%$) après la réaction d'hydrolyse (entrées 5, 6 et 7). Dans ces cas, les puretés optiques des alcools issus de la réaction d'hydrolyse sont conservées par les

(S)-acétates obtenus optiquement purs (ee > 99%) avec de bons rendement chimiques (70%<rdt<89%). Le chromatogramme 7 illustre ces résultats par la présence d'un seul pic pour chaque énantiomère.

Racémiques		Substrat	
Alcool	Acétate	Hydrolyse enzymatique de l'acétate avec 50 mg de CAL-B et 1mmole de Na ₂ CO ₃ (première étape)	Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)
 5a			
 6a			
 7a			

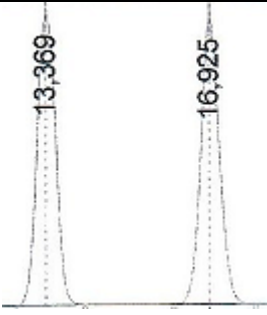
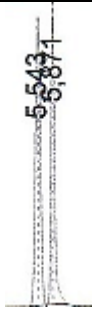
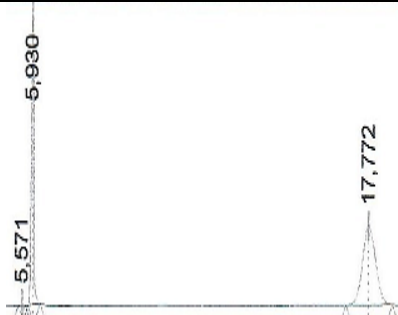
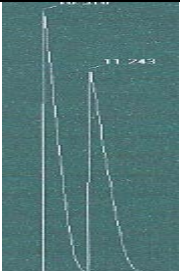
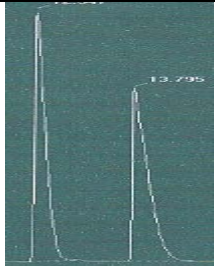
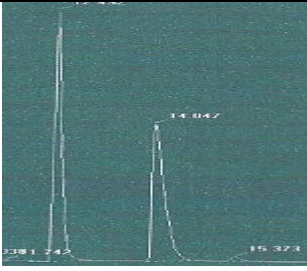
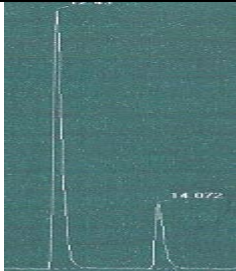
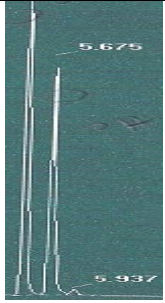
Chromatogramme 7 : Déracémisation des acétates **5a**, **6a** et **7a**

Pour les substrats **1a**, **2a** et **4a**, on note une légère diminution des excès énantiomériques ($90\% < ee < 92\%$) et ce après l'inversion de configuration via la réaction de Mitsunobu comparativement à ceux obtenus par la réaction d'hydrolyse ($98\% < ee < 99\%$). Ces résultats expliquent la présence d'une racémisation partielle qui apparaît au cours de la réaction d'estérification et qui donne les (S)-acétates avec une diminution d'énantiosélectivité approximativement 10% (entrées 1, 2 et 4). L'illustration est faite par le chromatogramme 8.

Racémiques		Substrat	
Alcool	Acétate	Hydrolyse enzymatique de l'acétate avec 50 mg de CAL-B et 1mmole de Na_2CO_3 (première étape)	Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)
 1a			
 2a			
 4a			

Chromatogramme 8: Déracémisation des acétates **1a**, **2a** et **4a**.

La racémisation est plus importante avec les substrats **3a**, **8a** et **9a**, les excès énantiomériques des acétates obtenus après l'estérification de Mitsunobu diminuent ($57\% < ee < 65\%$) (entrées 3, 8 et 9) avec les alcools correspondants à ($96\% < ee < 98\%$). Cela signifie que les alcools (3, 8 et 9) subissent une racémisation importante lors de la réaction de Mitsunobu. Cette racémisation peut être attribuée à la substitution en para¹⁸³ (Le chromatogramme 9).

Racémiques		Substrat	
Alcool	Acétate	Hydrolyse enzymatique de l'acétate avec 50 mg de CAL-B et 1mmole de Na ₂ CO ₃ (première étape)	Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)
 3a			
 8a			
 9a			

Chromatogramme 9: Déracémisation des acétates **3a**, **8a** et **9a**.

¹⁸³ Réf 128: T. H. Krane Thvedt, E. Fuglseth, E. Sundby, B. H. Hoff, Tetrahedron, **2010**, 66, 6733-6743.

III-3 : Comparaison entre les dérécémisations par hydrolyse en milieu non-conventionnel et par transestérification enzymatique combinée à la réaction de Mitsunobu

Lors de l'étude antérieure de notre équipe, la dérécémisation a été effectuée via la combinaison de la réaction de transestérification enzymatique et la stéréo-inversion de Mitsunobu. Cette dérécémisation a été appliquée aux alcools **4-7** (schéma 115).

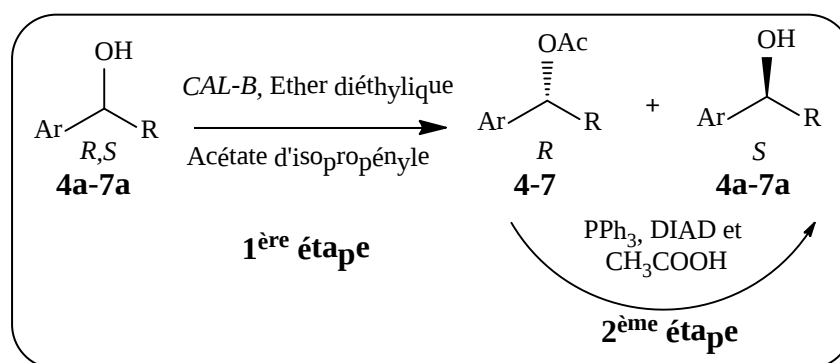


Schéma 115: Dérécémisation par transestérification enzymatique / protocole de Mitsunobu

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Dérécémisation des substrats **4a-7a** par acylation avec la CAL-B combiné au protocole de Mitsunobu¹⁸⁴ (résultats antérieurs)

Entrée	Acylation enzymatique (24-64h)						Réaction de Mitsunobu	
	Substrat	CALB (mg)	ee _p (%) (<i>R</i>)Acétate	ee _s (%) (<i>S</i>)Alcool	C (%)	E	ee _{acétate} (%) (<i>R</i>)	Rdt (%)
1	4a	50	>99	>99	50	>500	91	76
2	5a	120	>99	>99	50	>500	89	83
3	6a	120	>99	>99	50	>500	89	72
4	7a	40	>99	>99	50	>500	90	81

¹⁸⁴ Réf 18 : N. Bouzemi, L.Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud, Tetrahedron : Asymmetry, **2006**, 17, 797-800.

Il nous a paru intéressant de faire une comparaison entre les deux méthodes complémentaires utilisées puisqu'elles visent l'obtention d'un seul énantiomère avec une excellente pureté optique et un bon rendement chimique. Les résultats d'hydrolyse en milieu non-conventionnel sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Déracémisation des substrats **1a-4a** par hydrolyse avec la *CAL-B* / protocole de Mitsunobu

Entrée	Hydrolyse enzymatique dans le milieu non-conventionnel (72 h)						Réaction de Mitsunobu	
	Substrat	CAL-B (mg)	ee _p (%) (<i>R</i>)Alcool	ee _s (%) (<i>S</i>)Acétate	C ^c (%)	E	ee _s (%) (<i>S</i>)	rdt (%)
1	4a	50	98	98	50	>500	92	82
2	5a	50	>99	>99	50	>500	>99	89
3	6a	50	>99	>99	50	>500	>99	82
4	7a	50	>99	>99	45,5	>500	>99	70

L'analyse des tableaux (11 et 12) montre clairement que les deux réactions, à savoir, l'acylation et d'hydrolyse avec la *CAL-B* en milieu organique avec Na₂CO₃ donne, dans les deux cas, les énantiomères (acétates et alcools) optiquement purs à (C=50%) avec des sélectivités élevées (E>500).

L'énantiomère (*S*)-acétate issu de la combinaison "hydrolyse enzymatique/ réaction de Mitsunobu" est obtenu optiquement pur (ee>99%) pour les substrats **5a**, **6a** et **7a** (entrées 2, 3, et 4, tableau 2) et des rendements chimiques élevés (70%<rdt<89%) comparativement à l'énantiomère (*R*) acétate obtenu via la combinaison "transestérification enzymatique/ réaction de Mitsunobu" (90%<ee<89%) (entrées 2, 3, et 4, tableau 1).

Les acétates (*R*) et (*S*) du substrat **4a** sont obtenus avec la même pureté optique par les deux voies complémentaires de déracémisation, bien que le rendement chimique par la réaction d'hydrolyse soit élevé (rdt = 82%) et ce en présence de la même quantité d'enzyme (50mg).

Nous notons une énantiocomplémentarité des deux réactions pour les quatre substrats où un seul énantiomère de configuration (*R*) a été acylé dans la réaction d'acylation et hydrolysé dans la réaction d'hydrolyse enzymatique. L'énantiomère (*R*) est obtenu via la réaction

d'acylation enzymatique tandis que son antipode est obtenu via la réaction d'hydrolyse (schéma 116).

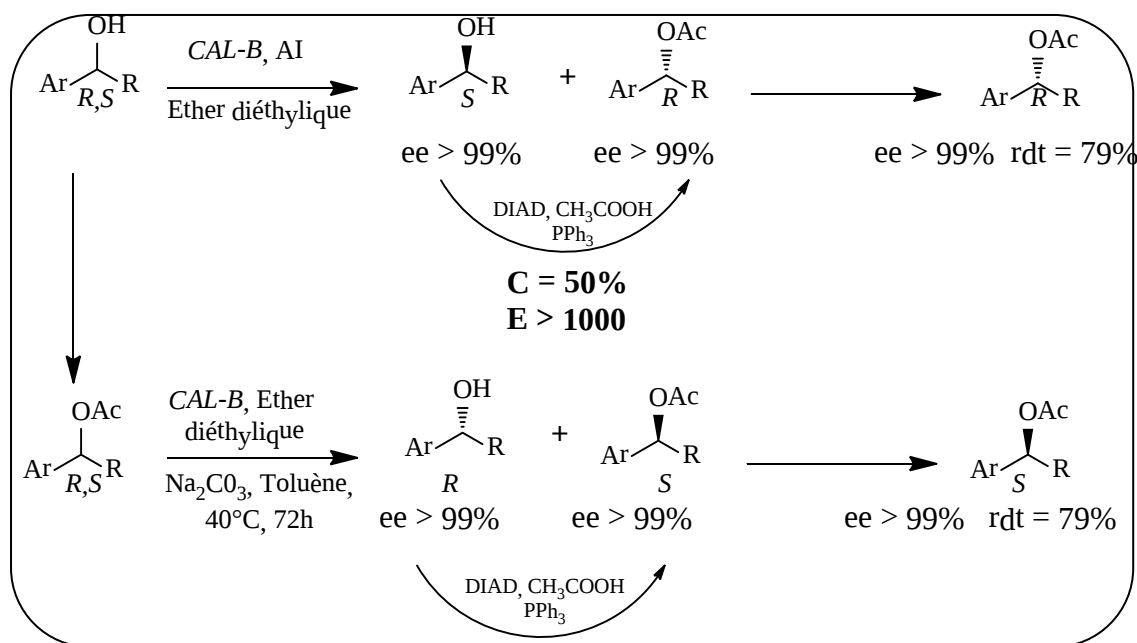


Schéma 116: L'énantiocomplémentarité des réactions d'acylation et d'hydrolyse combinées au protocole de Mitsunobu

III-4 : Conclusion

Nous avons montré que la réaction d'hydrolyse avec la *CAL-B* en milieu non-conventionnel est réalisée avec succès dans un processus de déracémisation combinée à la stéréoinversion.

Par le biais de cette méthode, les énantiomères (*R*)-alcools produits et les (*S*)-acétates restant des substrats étudiés sont obtenus avec des excès énantiomérique élevés $ee > 99\%$.

La combinaison de ce nouveau procédé avec la réaction de Mitsunobu permet l'obtention d'un seul énantiomère les (*S*)-acétates **5a**, **6a** et **7a** avec de hautes puretés énantiomériques $ee > 99\%$ et des rendements chimiques élevés $70\% < \text{rdt} < 89\%$.

On constate que l'inversion de configuration par le réactif de Mitsunobu n'est pas totale pour certains substrats qui subissent une racémisation partielle entraînant une diminution de l'excès énantiomérique qui peut atteindre 10% et plus pour les substrats **3a**, **8a** et **9a** dont les structures possèdent des groupements méthoxy- ou éthoxy-.

Cette méthode de déracémisation via le dédoublement cinétique enzymatique avec la *CAL-B* permet d'obtenir les *S*-acétates énantioenrichis avec un rendement optimal. Nous avons comparé nos résultats avec la déracémisation qui met en jeu la réaction d'acylation avec la *CAL-B* et la stéréoinversion. Les résultats montrent clairement que la nouvelle approche donne de meilleurs résultats que ce soit pour les excès énantiomériques ou pour les rendements.

Deuxième partie

Quatrième chapitre

*Acylation enzymatique du
3-méthyl-2-cyclohexèn-1-ol*

IV-1 : Introduction

Les phéromones sont des substances libérées par un insecte et reçues par un second insecte du même genre pour provoquer la libération d'une réponse spécifique telle qu'un comportement défini ou le développement d'un processus.

Karlson¹⁸⁵ et Luscher furent les premiers à donner une signification au terme « phéromone » ; ce dernier est dérivé du grec «*pherein*» = transférer et «*hormon*» = exciter.

La chiralité des molécules impliquées dans ces phénomènes est apparue à la fin des années soixante (1960) quand Silverstein et coll. ont découvert plusieurs phéromones chirales, et depuis, la science des phéromones a soutenu l'avis de Pasteur qui a remarqué que « l'univers est dissymétrique ».

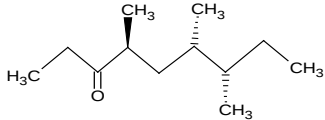
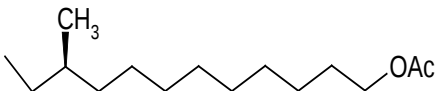
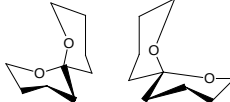
L'étude de l'activité biologique de ces phéromones chirales par le biais de la synthèse énantiosélective a permis de découvrir où peut résider cette activité.

Les phéromones d'insectes peuvent être utilisées comme un nouveau type de pesticides¹⁸⁶ si nous déterminons la résidence de l'activité biologique ; Nous présenterons quelques exemples, qui illustrent la relation structure-activité biologique pour chaque phéromone¹⁸⁷.

¹⁸⁵ P. Karlson, M. Lüscher; Pheromones: A new term for a class of biologically active substance. *Nature*, **1959**, 183, 55-56.

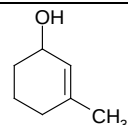
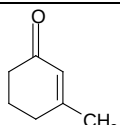
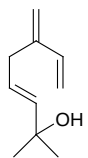
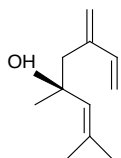
¹⁸⁶ (a) Behavior-modifying chemicals for insect management, **1990**; (b) J.P. Shea; ACS Symp, Ser., **1995**, 595, 22-25.

¹⁸⁷ (a) K. Mori; *Molecules*, **2005**, 10, 1023-1047, (b) K. Mori; *Chirality*, **1998**, 10, 578-586.

 (4S, 6S, 7S)- Serriconin Seulement cet énantiomère est bioactif, Son diastéréoisomère (4S, 6S, 7R) inhibe l'action de la phéromone.	 Phéromone de <i>Adoxophyes</i> sp Un énantiomère est plus actif que l'autre énantiomère, mais le mélange énantiomérique est plus actif que cet énantiomère seul. (R) est plus actif que (S), alors qu'il y a un maximum d'activité pour le ratio (R : S) en proportion de 95 :5.
 (13R, 23S)- <i>Glossina pallidipes</i> (pheromone) Seulement le méso est actif. Ni (R, R), ni (S, S) ne sont bioactifs.	 (R) (♂) (S) (♀) Olean Un énantiomère est actif envers les mâles (♂), l'autre est actif envers les femelles (♀). (Ce cas est rare). La phéromone se présente sous forme racémique.

Ces exemples montrent que l'activité biologique entre les deux énantiomères au sein de la même molécule de phéromones est liée à sa stéréochimie. Sur ce, les chercheurs insistent sur l'importance de l'individualité de l'énantiomère qui porte l'activité biologique.

Les alcools allyliques constituent, pour certains, des molécules actives, ce sont aussi des phéromones. Ces molécules telles que le seudenol, (3,2)-MCH, amitinol et (+)-ipsdienol sont des composants de phéromones d'agrégation ou d'inhibition de l'agrégation des coléoptères d'écorces ravageurs de forêts de conifères.

 (R)-seudenol phéromone agrégation/inhibition. D. pseudotsugae, D. rufipennius, D. simplex.	 (3,2)-MCH phéromone inhibition. D. pseudotsugae de l'agrégation
 amitinol phéromone d'agrégation I. amitinus.	 (S)-(+)-ipsdienol phéromone agrégation pour de nombreuses espèces. I. paraconfusus, I. duplicants, I. pini.....

Nous nous sommes intéressés au seudénol, un alcool allylique secondaire qui a fait l'objet de notre étude. Nous avons entrepris de séparer ses énantiomères par dédoublement cinétique par transestérification enzymatique.

IV-2 : Etude bibliographique

Les alcools secondaires chiraux aliphatiques ou cycliques peuvent servir d'auxiliaires chiraux en chimie organique. Ce sont des précurseurs de nombreuses molécules d'intérêt potentiel. Parmi ces alcools secondaires chiraux : les alcools allyliques cycliques chiraux tels que le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol¹⁸⁸, qui est à la fois un modèle stéréochimique intéressant en catalyse homogène et également une molécule à haute valeur ajoutée de par ses propriétés biologiques, comme phéromone d'insecte.

Le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol (seudénol) est une phéromone active sur les coléoptères d'écorces insectes ravageurs particulièrement dans les forêts canadiennes et aux USA. Ses énantiomères constituent des précurseurs importants à d'autres phéromones d'insectes¹⁸⁹ et aux alcaloïdes¹⁹⁰.

Il est important que cette molécule soit obtenue optiquement pure. Pour cela, la littérature montre que peu de travaux ont été entrepris afin d'aboutir à la méthode adéquate en tenant compte de l'aspect économique.

Kitamura¹⁹¹ et coll ont utilisé l'hydrogénation asymétrique pour obtenir les énantiomères du « seudénol » énantiomériquement pur. Ils l'ont dédoublé en présence du complexe de BINAP-Ru dicarboxylate suivant le schéma 117:

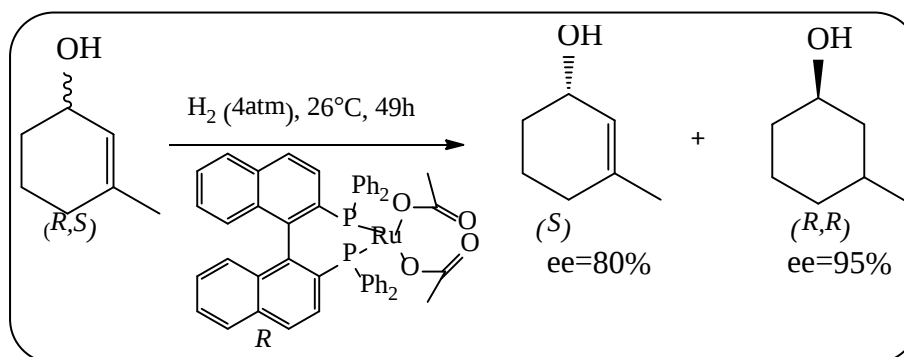


Schéma 117 : L'hydrogénation asymétrique du seudénol.

¹⁸⁸ J. Vite, G. Pitman, A. Fentiman, G. Kinzer. *Naturwissenschaften*, **1972**, 59, 469.

¹⁸⁹ K. Mori, B.G. Hazra, R.J. Pfeiffer, A.K. Gupta, B.S. Lindgren; *Tetrahedron*, . **1987**, 43, 2249-2254.

¹⁹⁰ G. Carrea, B. Danieli, G. Palmisano, S. Riva, M. Santagostino; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, .3, 775-784.

¹⁹¹ M. Kitamura, I. Kasahara, K. Manabe, R. Noyori, H. Takaya; *J.Org. Chem*, **1988**, 53, 708

L'inconvénient de cette méthode est qu'on ne peut avoir qu'un seul énantiomère, le (S)-seudénol, dans des conditions très délicates de pression d'hydrogène et de température. Par ailleurs le catalyseur est coûteux.

Brown¹⁹² et coll. ont dédoublé le seudénol avec le complexe de Sharpless comme le montre le schéma 118, dans une réaction d'oxydation avec les tartrates. La sélectivité de la réaction est faible E=6, le (R)-seudénol est obtenu avec un excès énantiomérique ee=68%. Le dédoublement de cette molécule a permis d'obtenir les deux énantiomères avec des excès énantiomériques modérés.

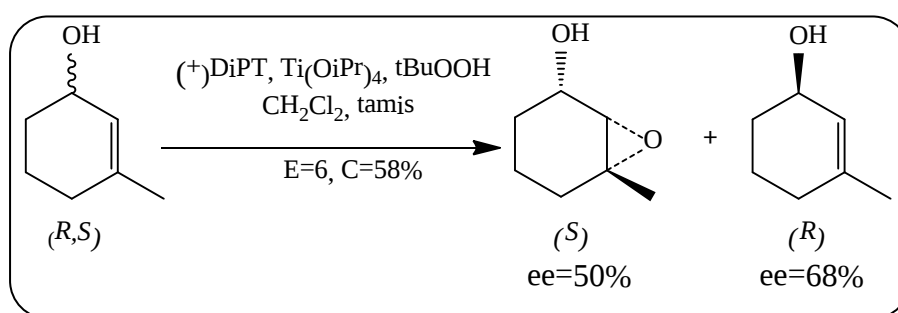


Schéma 118 : Dédoublage chimique en présence du complexe de Sharpless.

Les travaux de Mori¹⁹³ sur le seudénol en utilisant différentes lipases n'ont pas abouti à des résultats significatifs.

D'autre part, Johnston¹⁹⁴ et coll ont dédoublé en quantitatif, le seudénol, en présence de la lipase *Pancréatique de porc* (PPL) suivant le schéma 119:

¹⁹² S.M. Brown, S.G. Davies, A.A. José de Sousa; Tetrahedron: Asymmetry, **1991**, 2, 511-514.

¹⁹³ (a) Réf 189: K. Mori, B.G. Hazra, R.J. Pfeiffer, A.K. Gupta, B.S. Lindgren; Tetrahedron, . **1987**, 43, 2249-2254. (b) K. Mori, J.I.J. Ogoche, A. Liebig; Chem., **1988**, 903.

¹⁹⁴ B.D. Johnston, B. Morgan, A.C. Oehlchlager, S. Ramaswamy; Tetrahedron: Asymmetry, **1991**, 2, 377-380.

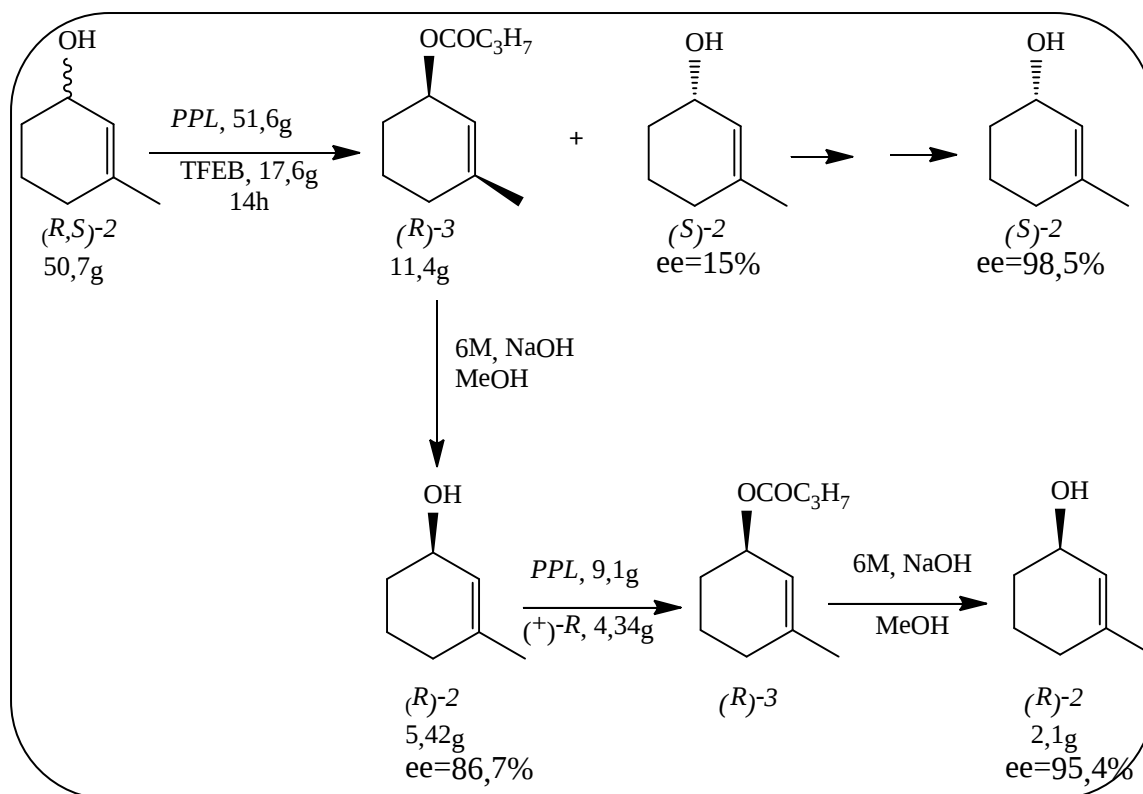


Schéma 119: Dédoublage cinétique enzymatique du seudénol.

L'énantiomère (*R*) est obtenu avec un excès énantiomérique 95,4%, après une double résolution cinétique enzymatique, transestérification suivie d'une hydrolyse. L'énantiomère (*S*) est obtenu avec un excès dérisoire ($ee=15\%$). Pour l'améliorer, Johnson et coll ont fait deux transestérifications nécessaires et obtenu l'alcool avec un excès énantiomérique de 98%.

Lors du dédoublement du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol avec la lipase de *Candida antarctica* (*CAL-B*), Orrenius¹⁹⁵ et coll. ont étudié l'influence du solvant et l'activité de l'eau, afin de parvenir à un dédoublement efficace (schéma 120) avec l'acétate de vinyle comme agent acylant.

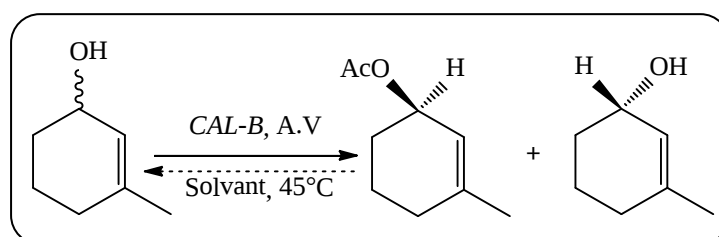


Schéma 120: Transestérification du seudénol

¹⁹⁵ C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, G. Carrea; Tetrahedron: Asymmetry, **1995**, 6, 3023-3030.

Après une transestérification dans les conditions présentées sur le schéma 120, une sélectivité variant entre ($8 \leq E \leq 32$) est obtenue. Malheureusement, aucune relation n'est établie, ni avec l'hydrophobicité des solvants utilisés ni avec la polarité de ces solvants; cependant, pour la même valeur de l'activité de l'eau, une corrélation est obtenue entre l'hydrophobicité du solvant et l'énantiosélectivité qui tend vers un maximum ($E=32$) pour un Log P égal à 2.

L'autre part, Kazlauskas¹⁹⁶ et coll ont décrit le dédoublement cinétique du seudénol par hydrolyse enzymatique d'une part et par la réaction de transestérification d'autre part.

La réaction d'hydrolyse enzymatique de l'acétate correspondant (schéma 121) en présence de la lipase de *Candida Rugosa* et de l'estérase *pancréatique de porc*, montrent des sélectivités médiocres égales à ($E=1$), ($E=3,4$) respectivement. Ils ont étudié l'influence de l'agent acylant, la nature de l'enzyme pour différents pH de la solution tampon et ils ont été convaincus que la réaction d'hydrolyse enzymatique dans ces conditions ne pourrait aboutir à des produits énantiomériquement purs.

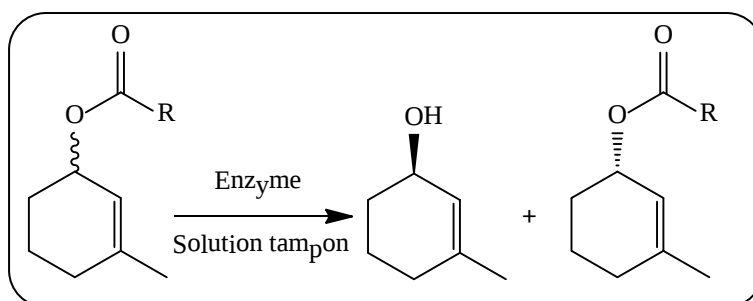
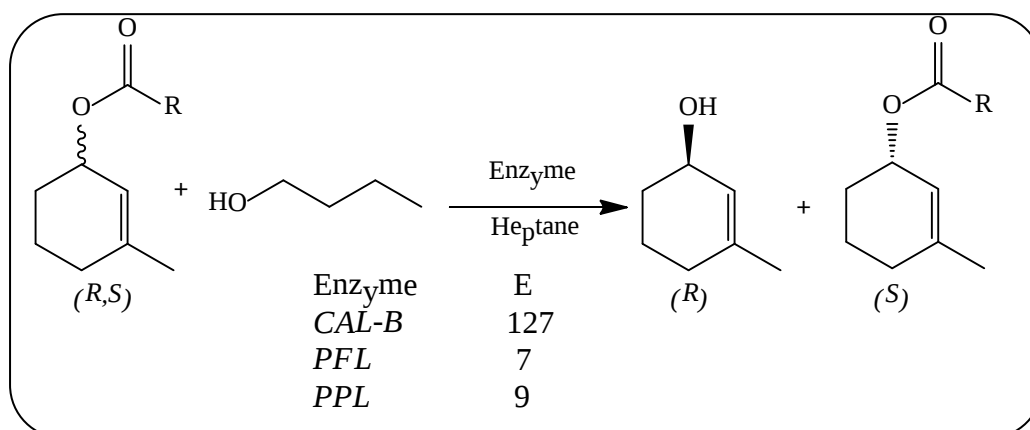


Schéma 121: Hydrolyse enzymatique des esters du seudénol

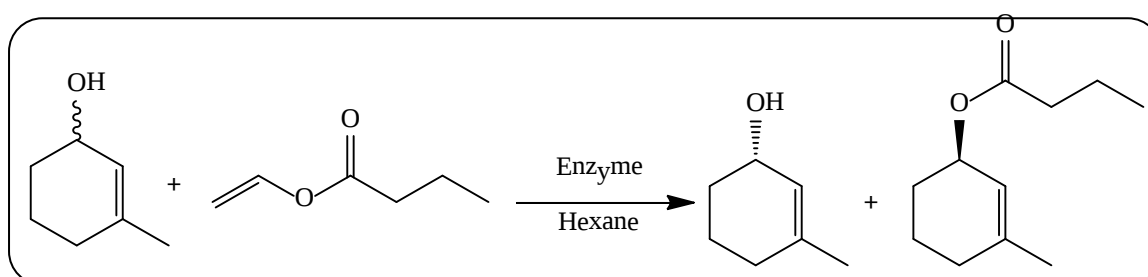
Au cours de la réaction de transestérification enzymatique (schéma 122). La lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) montre une meilleure sélectivité $E=127$, et ce, parmi d'autres lipases utilisées, à savoir, la lipase de *Pseudomonas fluorescens* et la lipase de *Pseudomonas sp*, qui ont donné de faibles sélectivités ($E=7$ et 9).

¹⁹⁶ R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia; J. Org. Chem, **1991**, 56, 2656-2665.

Schéma 122: Transestérification de butyrate du seudénol

Wong¹⁹⁷ a étudié le dédoublement cinétique par acylation enzymatique avec l'acétate de vinyle comme agent acylant, et obtenu le produit acétate avec un excès énantiomérique égal à 67% pour une conversion de 32% et un facteur de sélectivité $E=7$, et ce, avec la lipase de *Pseudomonas sp.* En présence de la lipase AK et le même agent acylant, l'acylation¹⁹⁸ montre une faible sélectivité égale à $E=11$.

En 2000, l'équipe de Karl¹⁹⁹ a réussi à obtenir une sélectivité élevée ($E=187$) (quoique à petite échelle) par l'acylation enzymatique du seudénol en présence de la lipase de *Candida antarctica* fraction B dans l'hexane avec le butyrate de vinyle comme agent acylant (schéma 123).

Schéma 123: Acylation enzymatique du seudénol

¹⁹⁷ Y.F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter, C.H. Wong; J. Am. Chem. Soc, **1988**, 110, 7200-7205.

¹⁹⁸ H. Hagiwara, T. Nakano, H. Uda; Bull. Chem. Soc. Jpn, **1993**, 66, 3110-3112.

¹⁹⁹ D. Rotticci, T. Norin. K. Hult; Org. Lett, **2000**, 2, 1373-1376.

Wilmouth²⁰⁰ et coll ont étudié la possibilité d'obtenir les mêmes résultats à l'échelle industrielle, pour ce faire, ils ont, en premier lieu, réalisé la réaction d'acylation enzymatique dans les mêmes conditions sur 100 g de substrat et les résultats montrent que le produit (*R*) seudénol est obtenu après hydrolyse avec un excès énantiomérique égal à $ee=95.6\%$ et un rendement de 48%. Le même excès énantiomérique ($ee=95,2\%$) est obtenu avec l'acylation à la l'échelle multi-kilogrammes.

Notre travail se situe dans le cadre de la thématique de recherche de notre groupe sur la synthèse énantiosélective de molécules chirales à haute valeur ajoutée. En particulier les alcools allyliques qui sont également des modèles stéréochimiques intervenant en catalyse avec le palladium²⁰¹.

Nous nous sommes intéressées au dédoublement cinétique enzymatique de cet alcool allylique d'intérêt biologique. Le but de ce projet était d'examiner les différents paramètres intervenant sur la sélectivité enzymatique lors du dédoublement cinétique de cette molécule par acylation enzymatique (schéma 124) et de tenter de mettre en œuvre sur cette molécule de nombreux types d'agents acylants tel que l'anhydride succinique (A.S)²⁰² plus aisé à utiliser.

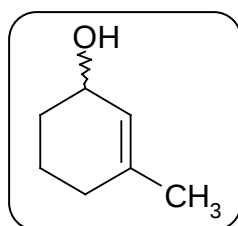


Schéma 124: Le modèle choisi (seudénol)

La réaction du dédoublement cinétique enzymatique est effectuée avec la lipase de *Candida antarctica-B* (CAL-B)²⁰³ qui est une lipase commerciale d'origine microbienne. Elle est très utilisée pour la transestérification dans les milieux organiques²⁰⁴. Un grand nombre d'alcools secondaires cycliques²⁰⁵ et acycliques²⁰⁶ sont dédoublés avec une grande stéréosélectivité

²⁰⁰ R. T. Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J. C. Laigle, F. Lombard, and S. Wilmouth. Organic Process Research & Development, **2004**, 8, 283-286.

²⁰¹ J.C. Fiaud, L. Aribi-Zouieche; J. Chem. Soc., Chem. Commun, **1986**, 390. Stereoelectronic control in transition-metal catalysed substitution and rearrangement of allylic esters and alcohols.

²⁰² Réf 62: N. Bouzemi, H. Debeche, L. Aribi-Zouieche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45 ,**2004**, 627-630.

²⁰³ V. Lafaquière, Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases, **2010**

²⁰⁴ L.F. Garcia-Alles, V. Gotor; Biotech. Bioeng. **1998**, 59, 163

²⁰⁵ V. Gotor, F.L. Limeres, M.J. Garcia, M. Bayod, R. Brieva; Tetrahedron: Asymmetry, **1997**, 8, 995

(E>100). La CAL-B est également utilisée dans la synthèse des produits naturels²⁰⁷, estérification régiosélective des sucres²⁰⁸ et des stéroïdes²⁰⁹, dédoublement asymétrique des diols²¹⁰, et dans l'ouverture de noyaux de polymérisations²¹¹. Cette même lipase est aussi utilisée pour le dédoublement cinétique des amines et des thiols²¹² dans les solvants organiques (E>100). Cette lipase est thermodynamiquement stable²¹³ utilisée dans la recherche comme dans l'industrie, surtout sous sa forme immobilisée.

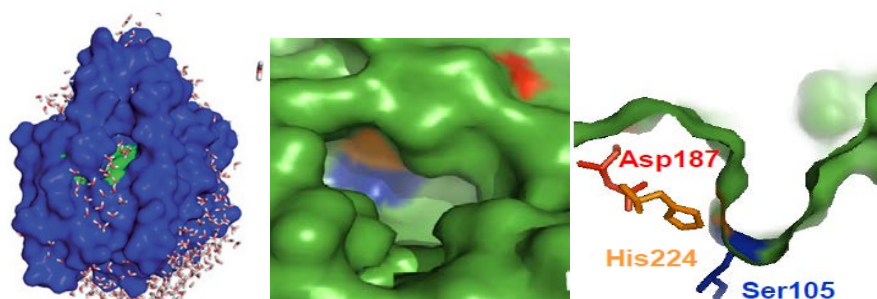


Figure 16: Image 3D de la CAL-B

IV-3 : Dédoublement cinétique enzymatique du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol (D.C.E)

Dans une première étape nous avons entrepris la synthèse des composés de référence, l'alcool racémique étant commercial (Aldrich), et l'acétate est préparé selon le protocole standard.

IV-3-1 : Synthèse de l'acétate correspondant

Par le biais d'une simple réaction d'acylation chimique, nous avons synthétisé l'acétate correspondant à l'alcool allylique cyclique chiral (seudénol) sous forme racémique pour l'utiliser comme référence. Cette acylation se fait avec de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), de l'anhydride acétique (AC_2O) et de la triéthylamine (NET_3) selon le schéma réactionnel suivant (125) :

²⁰⁶ (a) C. Orrenius, N. Öhrner, D. Rottici, A. Matton, K. Hult, T. Norin; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1217; (b) B.A. Hoff, V. Waagen, T. Anthonsen; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 3181; (c) D. Rottici, C. Orrenius, K. Hult, T. Norin; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 359

²⁰⁷ (a) Réf: 205; (b) C.R. Johnson, Y. WU, K.C. Nicolaou, Z. Yang, R. Guy, J.G. Dong, N.T. Berova, *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 3291; (c) M. Ferrero, S. Fernandez, V. Gotor; *J.Org. Chem*, **1997**, 62, 4358

²⁰⁸ (a) M. Gelo-Pujic, E. Guibé-Jampel, A. Loupy, S. Galema, D. Mathé; *J.Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1996**, 2, 777; (b) B. Danielli, M. Luisetti, G. Sampognaro, G. Carrea, S. Riva; *J.Mol. Catal B: Enzym.* **1997**, 3, 193

²⁰⁹ A. Bertinotti, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva; *Tetrahedron*, **1994**, 50, 13165

²¹⁰ C.R. Johnson, S.J. Bis; *Tetrahedron Lett*, **1992**, 33, 7287

²¹¹ H. Uyama, S. Suda, H. Kikuchi, S. Kobayachi; *Chem. Lett.* **1997**, 1109

²¹² M.J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 2199.

²¹³ J. Drouin, J. Costante, E. Guibé-Jampel; *J.Chem. Educ.* **1997**, 74, 992

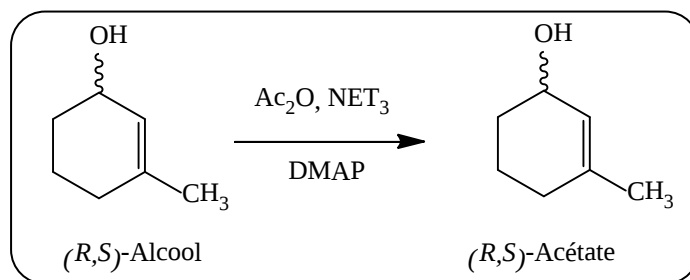


Schéma 125: Acylation chimique du seudénol

Le rendement chimique de l'acétate obtenu est de 79,5 %.

Les méthodes spectroscopiques suivantes : infrarouge (IR), résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H) et résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN¹³C) montrent bien les caractéristiques structurales de l'acétate.

IV-3-2 : Transestérification enzymatique du 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol

Nous avons étudié l'effet de divers paramètres réactionnels à savoir, la nature de l'enzyme, l'agent acylant, le solvant, la température et l'effet de l'addition d'un éther couronne qui peuvent intervenir directement sur le processus catalytique enzymatique en termes de sélectivité et de réactivité, et ce lors, de la réaction du dédoublement cinétique par acylation enzymatique.

Résultats et discussion

- Acylation enzymatique du (+/-)-seudénol

Dans le but de trouver la bonne combinaison biocatalytique : (enzyme/agent acylant/solvant), nous avons effectué, en premier temps, la réaction de transestérification du seudénol sur 1 mmole du **rac- 1**, en présence de différents agents acylants, en ajoutant une quantité adéquate de lipase (schéma 126).

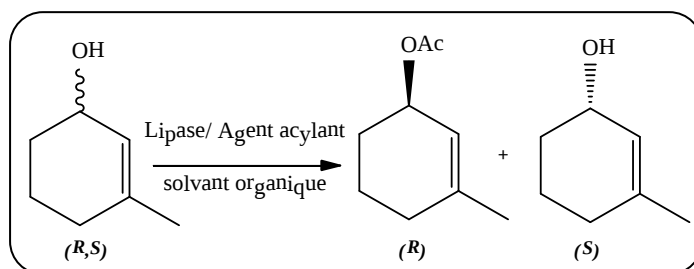


Schéma 126 : Acylation enzymatique

IV-3-2-1 : Effet de la nature et de la quantité d'enzyme

Le dédoublement cinétique par acylation enzymatique du seudénol **1** a été étudié avec deux lipases microbiennes, la lipase de *Candida cylindracea* (CCL), et la lipase gastrique du lapin (LGL), et une lipase immobilisée : la lipase de *Candida antarctica* fraction B (CAL-B). Le taux catalytique a été, également, examiné. Ces réactions sont réalisées avec un excès de l'acétate d'isopropényle, comme donneur d'acyle, dans 6 mL d'éther diéthylique, à température ambiante, durant trois heures. Les résultats obtenus sont mentionnés sur le tableau 13.

Tableau 13:

Entrée ^(a)	Lipase ^(b) (mg)	ee _s (%) ^(c) (S)-1	ee _p (%) ^(c) (R)-2	C ^(d) (%)	E ^(d)
1	CAL-B(6)	46.5	> 99	32	316
2	CAL-B (25)	51	59	46	6
3	CAL-B (80)	48	14	78	2
4	CAL-B (150)	87	61	59	11
5	CCL(6)	3,5	69,4	5	6
6	CCL(90)	14,5	48,3	23	3
7	LGL(5)	1	8,4	9	1

(a) 1mmol d'alcool racémique dans 6 mL d'Et₂O à température ambiante durant 3 heures.

(b) L'activité spécifique des lipases (CAL-B: 42,3 U/mg; de la CCL: 2,8 U/mg et de la LGL: 60 U/mg).

(c) Mesuré par la GC.

(d) Conversion²¹⁴ : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivité: $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$.

Les résultats du tableau 13 montrent que la meilleure sélectivité est obtenue en utilisant 6mg de la CAL-B (entrée 1). L'énantiomère (R) du seudénol est obtenu sous forme optiquement pure, à une conversion C= 32%.

En augmentant la quantité de cette dernière, nous observons une chute importante du facteur de sélectivité, de E>300 à E=2 (entrées 2, 3 et 4). Alors que la réactivité de la CAL-B augmente proportionnellement à la quantité d'enzyme mise en jeu (entrées 1, 2 et 3). Un effet similaire a été remarqué dans des travaux récents de notre équipe²¹⁵. Nous notons aussi que la conversion rechute lorsque l'on passe de 80 mg de CAL-B à 150mg (entrée 3 et 4). Ceci peut être dû à une sursaturation des sites actifs lipasiques.

²¹⁴ (a) C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 7294-7299; (b) H.B. Kagan, J.C. Fiaud, J.-C. «*Kinetic Resolution Topics in stereochemistry*». E.L. Eliel, S.H. Wilen, Ed.J. Wiley & Sons, Inc. New York, **1988**, *18*, 249-330.

²¹⁵ Réf 161 : M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J.-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche ; *C. R. Chimie*, **2011**, *14*, 978-986.

La *CCL* et la *LGL* ne montrent aucune sélectivité lors de l'acylation du **rac-1** (entrées 5 et 7). L'augmentation de la quantité de la *CCL* de 6mg à 90mg entraîne une accélération significative de l'acylation enzymatique (entrée 5 et 6), la sélectivité reste faible avec ces lipases microbiennes libres.

Donc la quantité de 6 mg de *CAL-B* s'avère le bon taux catalytique pour mener l'étude en examinant et modulant les différents paramètres pouvant intervenir d'une manière significative sur le déroulement du processus catalytique lipasique lors de l'acylation du seudénol racémique.

IV-3-2-2 : Effet de la nature et de la concentration de l'agent acylant

Nous avons examiné l'effet de la nature et la proportion de divers agents acylants utilisés lors de l'acylation enzymatique du (+/-)-**1**. Nous avons utilisé deux esters d'énol : l'acétate d'isopropényle (**AI**), l'acétate de vinyle (**AV**) ; ainsi qu'un anhydride d'acide : l'anhydride succinique (**AS**). La réaction est réalisée sur une milli mole d'alcool racémique en présence de 6mg de *CAL-B* à température ambiante. Les résultats sont réunis dans le tableau 14.

Tableau 14 :

Entrée (a)	Qté Agent acylant ^(b)	Temps (h)	ee _s ^(c) (%) (S)-1	ee _p ^(c) (%) (R)-2	C ^(d) (%)	E ^(d)
1	A.I (1/2)	3	44	95	32	50
2	A.I (1/3)	3	46.5	> 99	32	316
3	A.I (1/3)	6	31.2	59	35	5
4	A.V (1/3)	3	25	80.4	23.4	12
5	A.V (1/3)	6	45.5	> 99	31.4	315
6	A.S (1/1)	72	30	43	41	3

(a) 1mmol d'alcool racémique, 6 mg de *CAL-B*, dans Et₂O à température ambiante.

(b) Agents acylant contre l'alcool racémique.

(c) Mesurés par GC.

(d) Conversion: $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivité $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$.

Nous remarquons, que l'utilisation d'un large excès de l'ester d'énol (3 éq) donne les meilleurs résultats, en termes de sélectivité (entrées 2 et 5). La concentration du milieu réactionnel avec de l'acétate d'isopropényle induit une chute importante de la sélectivité de la *CAL-B* (entrées 2 et 1). Cette observation, permet de croire que la réaction de

transestérification enzymatique en utilisant les esters d'énols peut être irréversible. En présence de l'anhydride succinique comme donneur d'acyle, la lipase ne montre aucune énantiosélectivité ($E=3$).

L'effet du temps, semble important et influe d'une manière ambiguë sur l'énantiosélectivité. La prolongation du temps de réaction dans le but d'aboutir à un meilleur avancement, cause une chute pondérale du facteur de sélectivité en utilisant l'acétate d'isopropényle (entrées 2 et 3). Par contre, la sélectivité augmente en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (entrées 4 et 5).

IV-3-2-3 : Effet de solvant

Dans cette partie nous étudions l'effet de plusieurs solvants d'hydrophobicité différentes sur la réaction de transestérification réalisée avec 6mg de *CAL-B* et l'acétate d'isopropényle (A.I). Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 15:

Tableau 15 :

Entrée (a)	Solvant (Log P)	ϵ	ee_s (%) ^(e) (S)-1	ee_p (%) ^(e) (R)-2	$C^{(f)}$ (%)	$E^{(f)}$
1	Heptane ^(b) (4)	1,92	41	97	30	88
2	Toluene ^(b) (2.5)	2,38	37	99	27	301
3	CHCl ₃ ^(c) (2)	4,81	8	99	7	217
4	TBME ^(b) (1,3)	4,50	44	93	32	41
5	Et ₂ O ^(b) (0,8)	4,20	46	99	32	316
6	THF ^(b) (0,49)	7,58	16	99	14	236
7	Acétone ^(b) (-0,23)	20,56	7	71	9	6
8	AI ^(d) (0,6)	-	17	84	17	14
9	AV ^(d) (0,31)	-	12,5	75	14,3	8

(a) 1mmol d'alcool racémique, 3équivalent A.I, 6 mg de *CAL-B*, dans 6mL de solvant organique à température ambiante.

(b) 3 heures de réaction.

(c) 9 heures de réaction.

(d) 6 heures de réaction.

(e) Mesurés par GC.

(f) Conversion : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivité $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$.

Les résultats de ce tableau montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les paramètres physico-chimiques (l'hydrophobicité et la constante diélectrique) du solvant utilisé et la sélectivité de

la réaction de transestérification. Ces observations sur le manque de corrélation entre les caractères physico-chimiques du solvant et l'énantiosélectivité de l'enzyme ont été également faites avec d'autres lipases et d'autres substrats testés par le groupe de Carrea²¹⁶ et coll.

L'utilisation des solvants moyennement hydrophobes donne lieu à de bonnes énantiosélectivités (entrées 1, 2 et 5). Le meilleur résultat en termes de réactivité et de sélectivité a été obtenu en utilisant l'éther diéthylique (entrée 5). L'utilisation des donneurs d'acyle (A.I et A.V) au tant que solvant et donneur d'acyle entraîne une chute de la réactivité et de l'énantiosélectivité (entrées 8 et 9). La diminution de l'activité enzymatique, peut être attribuée au milieu réactionnel qui est devenu épais, entraînant une gêne du mouvement des molécules du substrat ainsi que de l'enzyme.

IV-3-2-4 : Effet de la température

Nous avons procédé à l'étude de l'influence de la température sur l'avancement de la réaction. Le mélange réactionnel : 1 équivalent d'alcool racémique et 3équivalents d'acétate d'isopropényle, en présence de 6 mg de *CAL-B*, est thermostaté aux températures suivantes : 25°C ; 40°C ; 80°C et 120°C.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 16 :

Entrée ^(a)	Temp (°C)	ee _s (%) ^(b) (S)- 2	ee _p (%) ^(b) (R)-1	C ^(c) (%)	E ^(c)
1	25	46.51	99.00	32	316
2	40	54.28	90.8	37.4	36
3	80	67.63	91.2	42.5	44
4	120	57.07	91.4	38.4	40

(a) 1mmol d'alcool racémique, 6 mg de *CAL-B*, dans 6mL d'Et₂O.

(b) Mesuré par la GC.

(c) Conversion : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivité $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$.

L'augmentation de la température jusqu'à 120°C ne dénature pas l'enzyme immobilisée, et la réactivité est maintenue. Par contre, la sélectivité chute d'une manière significative avec l'augmentation de la température. La meilleure sélectivité pour notre substrat est obtenue à température ambiante en utilisant 6mg de *CAL-B*, (E=316). (entrée 1 contre 2,3,4).

²¹⁶ Réf 190: G. Carrea, B. Danieli, G. Palmisano, S. Riva, M. Santagostino; Tetrahedron: Asymmetry, **1992**, .3, 775-784.

IV-3-2-5 : Etude de l'effet d'additifs en fonction de la nature de l'agent acylant

Un des axes de recherche initialisé au sein de notre équipe, s'intéresse à l'étude de l'effet de l'introduction de quelques additifs sur le déroulement de la réaction de DCE notamment l'effet de molécules de type éthers couronnes²¹⁷ ou alcaloïdes²¹⁸. Nous avons étudié l'effet de l'addition d'un éther couronne achiral, le 18-crown-6, lors de l'acylation enzymatique du seudénol **1** avec la CAL-B, avec différents agents acylants. Nous avons effectué deux réactions en parallèle, l'une sans éther couronne et l'autre avec l'éther couronne. Pour les réactions avec l'éther couronne, nous additionnons 5mol % du 18-crown-6, en utilisant des solvants organiques anhydres pour limiter l'effet de l'eau. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau 17.

Tableau 17 :

Entrée ^(a)		Temps (h)	Agent acylant	ee _s (%) ^(c) (S)	ee _p (%) ^(c) (R)	C ^(d) (%)	E ^(d)
1	Sans E.C	3	A.I	46,5	99	32	316
2	Avec E.C			31	13	71	2
3	Sans E.C	6		31	59	34,6	5
4	Sans E.C ^(b)			52	99	34,4	321
5	Sans E.C	6	A.V	42	97	30.2	102
6	Avec E.C			40	92	30.4	35
7	Sans E.C ^(b)			43	99	30,33	298
8	Avec E.C ^(b)			43	99	30	301
9	Sans E.C	72	A.S	30	43	41	3
10	Avec E.C			39.9	3	94	1

(a) 1mmol d'alcool racémique, 6 mg de CAL-B, dans 6 mL de l'éther diéthylique.

(b) Et₂O anhydre

(c) Mesurés par GC.

(d) Conversion: $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivity $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$.

Les résultats de ce tableau montrent un effet très important de l'éther couronne, 18-crown-6, sur la réactivité et la sélectivité de la réaction avec tous les agents acylants utilisés. Cette

²¹⁷ M. Merabet, N. Mélais, M. Boukachabia, J-C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouche; J. Soc. Alger. Chim, **2007**, 17, 185-194.

²¹⁸ M. Merabet-Khalassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant ; Tetrahedron : Asymmetry, **2008**, 19, 2378-2384.

influence dépend également de l'état de l'éther diéthylique utilisé s'il est strictement anhydre ou non.

En présence du 18-crown-6, et après 3 heures de réaction à température ambiante, la réaction est 2 fois plus rapide pour l'acétate d'isopropényle (entrées 1 et 2), par contre une chute de l'énantiosélectivité est observée $E=2$. Un effet similaire de la sélectivité est obtenu avec l'acétate de vinyle (entrées 5 et 6). Dans le cas de la prolongation du temps de réaction (entrée 3), avec l'AI, nous observons aussi une faible énantiosélectivité. Ceci est peut être dû à la présence d'une réaction d'hydrolyse compétitive de l'ester d'énol qui intervient négativement sur l'énantiosélectivité de l'acylation. Afin de remédier à cette problématique nous avons pensé à utiliser des solvants organiques anhydres afin de réduire ou de bloquer cette réaction parasite. Nous avons réalisé la même expérience sans éther couronne en utilisant le Et_2O anhydre. Nous avons ainsi, constaté une augmentation importante de l'énantiosélectivité de $E=5$ à $E>300$ (entrée 3 et 4). Avec l'acétate de vinyle, l'absence de molécules d'eau avec ou sans éther couronne n'a aucune influence ni sur la réactivité ni sur la sélectivité enzymatique (entrées 7 et 8). Avec l'anhydride succinique, nous observons un effet très important de l'éther couronne sur la réactivité enzymatique, alors que la sélectivité reste faible $E=1$ (entrée 9 et 10). Cet effet obtenu avec l'AS comme donneur d'acyle confirme des résultats antérieurs de notre équipe²¹⁹, où l'introduction du 18-C-6 augmente la réactivité de la réaction et facilite probablement la formation de l'acyl-enzyme en modifiant la répartition des molécules d'eau dans l'environnement de l'enzyme par la liaison de l'additif avec ces dernières.

IV-4 : Conclusion

L'énantiomère (*R*)-acétate du 3-méthyl-2cyclohexène-1-ol, seudénol, a été obtenu optiquement pur au bout de 3 heures avec une conversion de ($C=32\%$) dans l'éther diéthylique. L'effet de différents paramètres réactionnels montre leur influence sur la sélectivité et la réactivité de la réaction de transestérification enzymatique.

La meilleure lipase est la *CAL-B* avec une quantité minimale de 6 mg dans l'éther comme solvant.

Aucune corrélation entre les paramètres physico-chimiques du solvant et l'énantiosélectivité de la lipase n'est observée.

²¹⁹ Réf 216 : M. Merabet, N. Mélais, M. Boukachabia, J-C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouche; J. Soc. Alger. Chim, **2007**, 17, 185-194.

L'acétate d'isopropényle (A.I) est l'agent acylant qui permet la meilleure sélectivité vis-à-vis de ce substrat.

Nous constatons que l'allongement du temps de la réaction influe négativement sur la sélectivité, cette observation conforte la présence d'une réaction d'hydrolyse compétitive.

L'ajout d'un additif, le 18-crown-6, accélère la réactivité contrairement à la sélectivité de la *CAL-B* qui chute totalement. L'absence de molécules d'eau, avec ou sans éther couronne, a une influence remarquable sur la sélectivité enzymatique, nous notons aussi que le meilleur excès énantiomérique ($ee > 99\%$) est obtenu avec l'éther anhydre.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons contribué à l'optimisation de la réaction de dédoublement cinétique par divers méthodes ; pour obtenir les molécules optiquement pures ou enrichies. La lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) très sollicitée, a été la plus efficace.

Nous avons étudié l'hydrolyse enzymatique en milieu bi-phasique (solution tampon/solvant organique), ou nous avons examiné l'influence de la quantité de CAL-B sur le système réactionnel de cette réaction afin d'aboutir à des réactivités et des sélectivités optimales. Des résultats intéressants sont obtenus. La diminution de la quantité de lipase a une influence remarquable sur la réactivité et la sélectivité de la réaction d'hydrolyse enzymatique qui dépend du substrat étudié. La diminution de la quantité de CAL-B pour les substrats **1a** et **2a**, augmente la réactivité et la sélectivité de la réaction. Cette réaction présente une limitation importante, cela concerne le faible rendement chimique, lié au protocole expérimental qui implique plusieurs étapes avec des extractions liquide/liquide.

Nous avons étudié une nouvelle méthode de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique en milieu organique en présence des sels de carbonate. Nous avons pu mettre en œuvre un système catalytique efficace et ce par l'étude de l'influence des paramètres sur le 1-phényléthanol acétate. La validité de cette méthode est testée sur une série d'acétates secondaires de différentes structures. Les sels de carbonate ont un effet significatif sur la conversion de la réaction, ou la sélectivité élevée est maintenue. Les différentes quantités de Na₂CO₃ permet d'obtenir les énantiomères alcool et acétate avec des excès énantiomérique élevés à une conversion 43% < 50,5% avec des sélectivités élevées E>300. Cette méthodologie est simple, facile à utiliser et efficace, elle s'intègre totalement dans les méthodes vertes.

La comparaison des conversions et les sélectivités obtenues aux cours de ces deux réactions d'hydrolyse enzymatique, à savoir, en milieu conventionnel et non-conventionnel, montre que la nouvelle méthode donne de bons résultats en termes de réactivité et de sélectivité. Elle est beaucoup plus intéressante sur le plan pratique, ou il suffit qu'une simple filtration pour récupérer le produit tandis que dans le milieu bi-phasique, il est nécessaire d'effectuer une filtration puis une extraction suivie de la récupération des phases organique, de leur séchage et d'une deuxième filtration.

Dans une deuxième phase de notre travail, nous avons montré que la réaction d'hydrolyse avec la *CAL-B* en milieu non-conventionnel est réalisée avec succès dans un processus de déracémisation combinée à la stéréoinversion.

La combinaison de ce nouveau procédé avec la réaction de Mitsunobu permet l'obtention d'un seul énantiomère les (S)-acétates **5a**, **6a** et **7a** avec de hautes puretés énantiomériques $ee > 99\%$ et des rendements chimiques élevés $70\% < \text{rdt} < 89\%$, les substrats **1a**, **2a** et **4a** sont obtenus avec des sélectivités élevées $90\% < E < 92\%$. Par contre, les substrats **3a**, **8a** et **9a** subissent une racémisation partielle qui entraîne une diminution de l'excès énantiomérique à cause de la substitution en para par les groupements méthoxy ou éthoxy, ou ils sont obtenus avec des sélectivités modérés.

Ensuite, nous avons comparés nos meilleurs résultats avec ceux obtenus via la déracémisation qui met en jeu la réaction d'acylation avec la *CAL-B* et la stéréoinversion. Les résultats montrent clairement que la nouvelle approche donne de meilleurs résultats que ce soit pour les excès énantiomériques ou pour les rendements.

Une comparaison de déracémisation par hydrolyse enzymatique en milieu organique / réaction de Mitsunobu a été réalisée avec celle effectuée précédemment par acylation enzymatique / réaction de Mitsunobu, permet d'illustrer une énantiocomplémentarité du substrat **4a-7a** d'où les deux énantiomères ont été obtenus optiquement purs avec de bons rendements.

Le dédoublement cinétique de l'alcool allylique secondaire, le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol, par transestérification enzymatique a permis de donner le produit (*R*)-acétate optiquement pur ($ee > 99\%$) au bout de 3 heures avec une conversion de $C = 32\%$ dans l'éther diéthylique comme solvant. L'effet de différents paramètres réactionnels montre leur influence sur la sélectivité et la réactivité de la réaction de transestérification enzymatique.

Perspectives : Nous envisageons de développer cette nouvelle approche sur d'autres substrats possédant des structures différentes, en l'occurrence l'alcool allylique secondaire, le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol.

Partie expérimentale

Appareillages et méthodes expérimentales

1- L'origine des enzymes et des produits utilisés:

Les produits chimiques utilisés dans ce travail proviennent des sociétés : **Aldrich**, **Acros**, **Fluka** et **Nordisk**.

Les enzymes employées sont commerciales ; la (**LGL**); **lipase Gastrique de lapin** est une lipase d'origine animal, la (**CAL-B**); **lipase de Candida antarctica** est une lipase immobilisée sur résine, **et enfin**, la (**CCL**); **lipase de Candida cylindracia** est une lipase libre issue d'un champignon.

2- Analyse spectroscopique :

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

RMN^1H : ont été enregistrés à l'aide de spectromètres Brucker de type AM 200 à 200 MHz ou AC 250 à 250 MHz ou DPX 250 MHz, dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl_3) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard. Les déplacements chimiques " δ " sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne ($\delta = 7,76$ ppm pour CDCl_3).

$(\text{RMN}^{13}\text{C})$: sont engendrés sur un appareil Brucker de type AM 200 à 50,5 MHz ou AC 250 à 62,9 MHz ou DPX 250 MHz. Les déplacements chimiques sont notifiés en ppm et sont mesurés par rapport à CDCl_3 , pris comme référence interne. Ces spectres sont également enregistrés, sur des spectromètres *Varian GEMINI-300 BB*, *Brüker-250*, *Brüker-300* dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl_3) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard, sauf indication contraire. Les déplacements chimiques " δ " sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne ($\delta = 77,7$ ppm pour CDCl_3).

Les abréviations suivantes ont été utilisées :

s = singulet, **d** = doublet, **dd** = doublet de doublet, **t** = triplet, **q** = quadruplet, **m** = multiplet et **m_a** = massif. Les constantes de couplage (*J*) (valeurs absolues) sont mentionnées en Hertz (Hz).

Les spectres de masse (SM) : ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse FINNIGAN-MAT TSQ-7000 ou FINNIGAN-MAT LCQ par le service spectroscopie de masse de l'Université Catholique de Louvain. Les masses correspondantes aux principaux pics sont suivies des pourcentages relatifs des fragments (m/z).

3- Analyse chromatographiques :

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : ont été effectués à l'aide d'une pompe Spectra Series P100 ; les colonnes chirales sont de type Chiracel OD-H, Chiralpak AD et Chiralpak-IB, de 25cm de longueur et 4,6 de diamètres reliée à un détecteur UV réglé à longueur d'onde $\lambda=254\text{nm}$. Les conditions d'élution sont en générale : hexane / isopropanol avec des proportions différentes et des débits variables. Ils ont été effectués aussi sur un chromatographe avec contrôleur et une pompe Water 600, équipé d'un détecteur UV-VIS Water 996 muni d'une barrette de diode. Les colonnes chirales utilisées sont mentionnées pour les analyses concernées.

La chromatographie en phase gazeuse chirale (CPG) : ont été réalisées sur un appareil HRGC 5300 avec Intégrateur chromato D-2500 ou un appareil ThermoFinnigan Trace GC utilisant une colonne de type CHIRALSIL-DEX CB (25m ; 0,25mm, 25mm). Le détecteur de type FID est chauffé à 300°C et l'injecteur est à 250°C. Les pressions des gaz sont : He : 100kPa ; H₂ : 50kPa et l'air sec à 100kPa.

La chromatographie liquide sur colonne : ont été effectuées sur gel de silice *Merck* 230-400 *Mesh* (0,04-0,063 mm). Les solvants utilisés sont de qualité technique.

La chromatographie analytique sur couches mince (CCM) : ont été réalisées sur des plaques de gel de silice commerciales de type *MERCK* 5179, 250 mesh en aluminium, avec un indicateur fluorescent 60 PF254 ; 0,25 mm d'épaisseur et révélées à l'UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ou à l'aide d'un révélateur chimique l'iode ou KMnO₄.

Les solvants utilisés pour les traitements sont des solvants techniques distillés : L'éther diéthylique (Et₂O) est distillé sur KOH, le dichlorométhane (CH₂Cl₂) est distillé sur P₂O₅. Les solvants utilisés pour les chromatographies liquides sur colonne : l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le cyclohexane sont simplement distillés pour éliminer les graisses.

Les solvants utilisés en HPLC sont de qualité HPLC, filtrés et dégazés avant usage.

DEUXIEME PARTIE

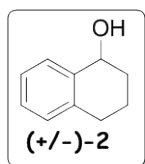
Synthèse des alcools racémiques

Procédure générale de réduction des alcools benzyliques secondaires :

Dans un ballon tricol de 1L contenant 2 équivalent d'hydruure de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) dans 10 ml d'éther anhydre, plongé dans un bain de glace, 1 équivalent de cétone commerciale correspondante dans 5 ml d'éther anhydre sont rajoutés goutte à goutte à 0°C et ce à l'aide d'une seringue. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince.

Après une nuit d'agitation, on hydrolyse avec une solution de soude (NaOH , 2N) lentement à 0°C , jusqu'à la formation d'un précipité blanc et la solution devient limpide. La solution filtrée est lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl) et extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous pression réduite.

Synthèse du 1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-1-ol:



Formule moléculaire: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$
Masse moléculaire: 148 g/mole
Aspect physique: huile incolore

Pour 100 mmoles de l' α -tetralone, soit 14,8 g.

Le résidu réactionnel obtenu est sous forme d'une huile rouge. Après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, on a obtenu une huile incolore, d'une masse de 9,95g, soit un rendement chimique de 67,23%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (300MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1,77-2,02 (m_a , 4H cycliques), 2,2 (s, 1H du OH) 2,35-2,36 (t, $J=4,2$; 1H cyclique) ; 2,72-2,88 (m_a , 2H cycliques) ; 7,12-7,25 (m_a , 3H aromatiques); 7,43-7,46 (m_a , 1H aromatique).

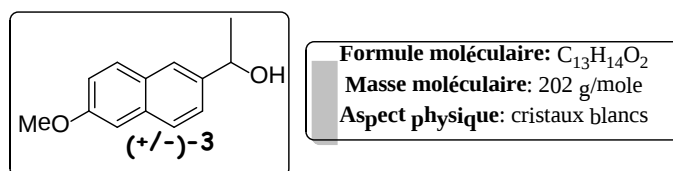
RMN¹³C (75MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 18,87; 29,26; 32,25; 32,92; 68,04; 126,13; 127,51 ; 128,71 ; 137,92 ; 140,51.

Caractéristiques chromatographiques:

Rapport frontal : $R_f = 0,17$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5 minutes. Débit : 1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 63,772$ minutes. $t_{R2} = 65,012$ minutes.

Synthèse du 1-(6-méthoxynaphthalèn-2-yl) éthanol :

Pour 50 mmoles de 2-acétyl-6-méthoxy-naphthalène, soit 10,1g.

Le produit obtenu est sous forme solide blanc d'une masse de 8,24g, soit un rendement chimique de 81,58%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,55-1,58 (d, $J=5,75$, -O-CH-CH₃) ; 2,27 (sl, 1H du OH) ; 3,91 (s, 3H, CH₃-O-) ; 4,98-5,06 (q, $J=6,52$; 1H, -O-CH-CH₃) ; 7,13-7,176 (m_a, 2H aromatiques); 7,45-7,48 (d, $J=6,75$; 1H aromatique); 7,71-7,74 (t, $J=2,75$; 3H aromatique).

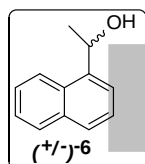
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 24; 32 ; 55; 72; 107; 119 ; 123 ; 124; 127; 128; 129; 134; 142, 158.

Caractéristiques chromatographiques:

Rapport frontal : $R_f = 0,17$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme 180°C. Débit : 1,2 mL/mi.

Temps de rétention : $t_{R1} = 17,185$ minutes. $t_{R2} = 17,747$ minutes.

Synthèse de 1-(naphthalen-1-yl)éthanol (+/-)-6 :Formule moléculaire: $C_{12}H_{12}O$

Masse moléculaire: 172 g/mole

Aspect physique: Solide blanc

Pour 78 mmoles de 1-(naphthalen-1-yl)éthanone, soit 13,42g.

Le produit obtenu est sous forme d'un solide blanc, d'une masse de 11,6 g (67,44 mmol), soit un rendement chimique de 86,43%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,65 et 1,68 (d, $J=6,35\text{Hz}$; 3H, H₃C-CH) ; 2,09 (sl, 1H, OH); 5,62-5,70 (q, $J=6,32\text{Hz}$, 1H, H₃C-CH-OH) ; 7,45-7,85 (m, 3H, aromatiques); 7,86 et 7,88 (d, $J=2,75\text{Hz}$; 1H aromatique); 7,89 et 7,90 (d, $J=3,5\text{Hz}$; 1H aromatique); 8,09 et 8,12 (d, $J=6,75\text{Hz}$; 1H aromatique); 8,13 et 8,15 (d, $J=4,25\text{Hz}$; 1H aromatique).

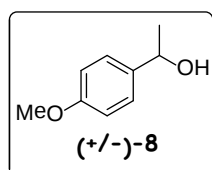
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 21,39; 21,75; 28,51; 30,38; 69,49; 123,21; 123,24; 125,41; 125,72; 126,36; 128,5; 136,44.

Caractéristiques chromatographiques:

Rapport frontal : $R_f = 0,30$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

HPLC chirale : Colonne *Chiralcel OD-H*. **Eluant (v,v):** hexane / isopropanol : 90/10, avec un débit de 0,5m

Temps de rétention : $t_{R1} = 18,49$ minutes. $t_{R2} = 28,87$ minutes.

Synthèse du 1-(4-méthoxyphényl) éthanol :Formule moléculaire: $C_9H_{10}O_2$

Masse moléculaire: 152 g/mole

Aspect physique: Huile transparente

Pour 100 mmoles de 1-(4-méthoxyphényl) éthanone, soit 15,2g.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile transparente d'une masse de 13 g, soit un rendement chimique de 85,53%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,49 (d, CH₃) ; 2,1 (sl, 1H, OH) ; 3,75 (s, 3H, O-CH₃) ; 4,71 (q, 1H, -CH-O-) ; 7,1-7,8 (m_a, 4H aromatiques).

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 23,9; 55,9; 75,8 ; 114,5 ; 118,5 ; 126,02 ; 128,12 ; 133 ; 159,6.

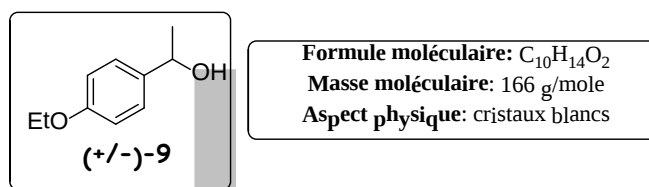
Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,22$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne Chiralsil-DEX CB. Isotherme 135°C. Débit :1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 12,682$ minutes. $t_{R2} = 13,52$ minutes.

Synthèse du 1-(4-éthoxyphényl) éthanol :



Pour 100 mmoles de 1-(4-éthoxyphényl) éthanone, soit 16,6g.

Le produit obtenu est sous forme cristaux blancs d'une masse de 14,14 g, soit un rendement chimique de 85,18%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,61-1,84 (m, 6H des deux groupements -CH₃) ; 1,8 (sl, 1H du OH) ; 4,33-4,92 (q, $J=5,75$; 2H, CH₃-CH₂-) ; 5,16-5,23 (q, $J=8,5$; 1H, -CH-CH₃) ; 7,19-7,24 (m_a, 2H aromatiques); 7,61-7,66 (m_a, 2H aromatiques).

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14,80; 25,03; 63,42; 69,80; 114,32 ; 126,66 ; 137,96 ; 158,18.

Caractéristiques chromatographiques:

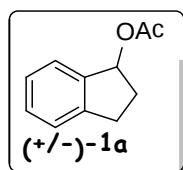
Rapport frontal : $R_f = 0,14$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne Chiralsil-DEX CB. Isotherme 155°C. Débit :1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 13,058$ minutes. $t_{R2} = 13,90$ minutes.

Procédure générale de synthèse des acétates :

Dans un petit ballon sont disposés 1 équivalent d'alcool avec 0,1 équivalents de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 4ml d'éther anhydre et 1,2 équivalent de la triéthylamine (NEt_3), on y ajoute goutte à goutte 1,5 équivalent d'anhydride acétique. La réaction se déroule sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince. Lorsque l'acylation est totale, le mélange est dilué dans l'éther sec et lavé successivement avec une solution de HCl 1N (2x3ml), ensuite avec une solution saturée de NaHCO_3 (2x3ml) et enfin avec une solution saturée de NaCl (5ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée.

Le 2,3-dihydro-1H-inden-yl acétate:Formule moléculaire: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$

Masse moléculaire: 176 g/mole

Aspect physique: huile incolore

Pour 30 mmoles d'alcool (+/-)-1, soit 4,02 g.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile incolore d'une masse de 4,79 g, soit un rendement chimique de 90,71%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2,09 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{O}$) ; 2,12-2,14 (m_a , 1H du cycle) ; 2,4-2,6 (m, 1H du cycle) ; 2,78-2,95 (m, 1H du cycle) ; 3,05-3,2 (m, 1H du cycle) ; 6,2 (m_a , 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-$) ; 7,23-7,26 (m_a , 3H aromatiques) ; 7,27-7,29 (d, $J=4,75\text{Hz}$, 1H aromatique).

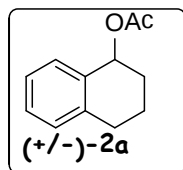
RMN¹³C (75MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 21,3; 30,2; 32,3; 78,3; 124,8 ; 125,5 ; 126,7 ; 128,9 ; 141,1 ; 144,4; 171,1.

Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,80$. **Eluant (v,v):** cyclohexane / acétate d'éthyle (80/20).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5minutes. Débit : 1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 46,058$ minutes. $t_{R2} = 46,992$ minutes.

Le 1, 2, 3, 4-tétrahydronaphthalèn-1-yl acétate:**Formule moléculaire:** C₁₂H₁₄O₂**Masse moléculaire:** 190 g/mole**Aspect physique:** huile trouble

Pour 2 mmoles d'alcool (+/-)-2 (soit 0,296 g).

Le produit obtenu est sous forme d'une huile trouble d'une masse de 0,304 g, soit un rendement chimique de 80%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,687 (sl, 3H) ; 2,0-2,2 (m_a, 4H du cycle) ; 2,5-2,7 (m_a, 2H du cycle) ; 2,8-3 (m_a, 1H du cycle) ; 7,21-7,44 (m_a, 3H aromatiques) ; 7,99-8,02 (d, $J=8,2\text{Hz}$, 1H aromatique).

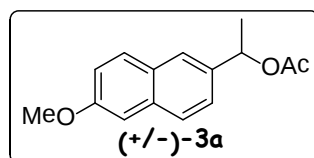
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 23,3 ; 29,7 ; 39,2 ; 70,8 ; 126,6 ; 127,1 ; 128,7 ; 133,4 ; 140,3 ; 144,5 ; 170,4.

Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : R_f = 0,66. **Eluant (v,v):** cyclohexane / acétate d'éthyle (80/20).

CPG chirale: Colonne *Chirasil-DEX CB*. Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5minutes. Débit : 1,2 mL/min.

Temps de rétention : t_{R1} = 57,405 minutes. t_{R2} = 58,677 minutes.

Le 1-(6-méthoxynaphthalèn-2-yl) éthyl acétate :**Formule moléculaire:** C₁₅H₁₆O₃**Masse moléculaire:** 244g/mole**Aspect physique:** cristaux blancs

Pour 2 mmoles d'alcool (+/-)-3 (soit 0,404 g).

Le produit obtenu est sous forme de cristaux blancs d'une masse de 0,366 g, soit un rendement chimique de 75%.

Caractéristiques spectroscopiques

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,62-1,65 (d, $J=6,5\text{Hz}$, 3H, $\text{H}_3\text{C-CH-}$) ; 2,11 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-C=O}$) ; 3,91 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-O-}$) ; 6,01-6,09 (q, $J=6,32\text{Hz}$, 1H, $\text{H}_3\text{C-CH-O-}$) ; 7,13-7,19 (m_a, 2H aromatiques); 7,45-7,45 et 7,48-7,49 (dd, $J=1,5\text{Hz}$, 1H aromatique); 7,73-7,76 (d, $J=8,25\text{Hz}$, 3H aromatique).

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 25; 31; 55,3; 72,4; 105,6; 119,1; 125,1; 127,1; 128,5; 129,5; 134,2; 136,6; 157,8; 170,4.

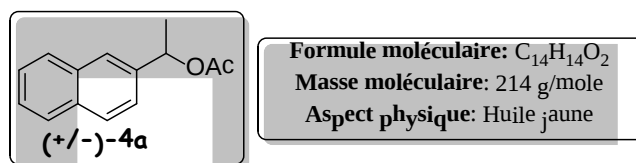
Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : R_f = 0,67. **Eluant (v,v)**: cyclohexane / acétate d'éthyle (80/20).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme :180°C. Débit :1,2 mL/min.

Temps de rétention : t_{R1} = 16,165 minutes. t_{R2} = 16,612 minutes.

Le 1-(naphthalèn-2-yl) éthyl acétate :



Pour 2 mmol de l'alcool (+/-)-4 (soit 0,344 g).

Le produit obtenu est sous forme d'une huile jaune d'une masse de 0,399g, soit un rendement chimique de 93%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,75-1,85 (d, $J=6,75\text{Hz}$, 3H, $\text{H}_3\text{C-CH-O-}$) ; 2,2 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-C=O}$) ; 6,10-6,19 (q, $J=6,75\text{Hz}$, 1H, $\text{H}_3\text{C-CH-O-}$) ; 7,51-7,56 (m_a, 3H aromatiques); 7,85-7,90 (m_a, 4H aromatiques)

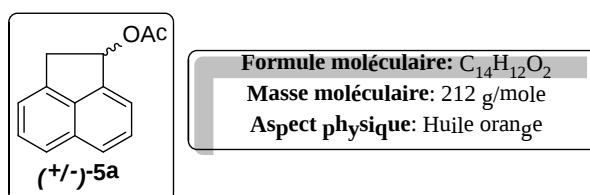
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 20,6; 22,2; 72,5; 124,1 ; 125,1 ; 126,1 ; 126,3 ; 127,7 ; 128,1 ; 128,4 ; 133,1 ; 133,2 ; 139,1 ; 170,4.

Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : R_f = 0,61. **Eluant (v,v)**: cyclohexane / acétate d'éthyle (80/20).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme :170°C. Débit :1,2 mL/min.

Temps de rétention : t_{R1} = 8,63 minutes. t_{R2} = 8,935 minutes.

L'acétate de 1,2-dihydroacénaphthylèn-1-yle (+/-)-5 :

Pour 50 mmoles d'alcool racémique (+/-)-5, soit 8,5g.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile transparente d'une masse de 9,91g, soit un rendement chimique de 93,5%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2,13 (s, 3H, O=C-CH₃) ; 3,3-3,4 (d, 1H du cycle) ; 3,75-3,9 (m_a, 1H du cycle) ; 6,6 (d, 1H, -CH-O-) ; 7,2-7,8 (m, 6H aromatiques).

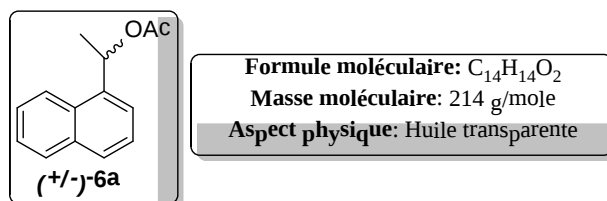
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 21,3; 38,7; 78,7 ; 119,8 ; 122,9 ; 125,4 ; 128,1 ; 130,4 ; 131,1 ; 135,1 ; 137,8 ; 141,2 ; 141,9; 171,2.

Caractéristiques chromatographiques:

Rapport frontal : $R_f = 0,56$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

HPLC chirale : Colonne Chiralcel OD-H. **Eluant (v,v):** hexane / isopropanol (99,3/0,7) avec un débit de 1 ml / mn.

Temps de rétention : $t_{R1} = 11,7$ minutes. $t_{R2} = 13,3$ minutes.

L'acétate de 1-(naphthalèn-1-yl)-éthyle (+/-)-6 :

Pour 10 mmoles d'alcool racémique (+/-)-6, soit 1,72g.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile transparente d'une masse de 1,83 g, soit un rendement chimique de 85,5%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,76 et 1,79 (d, $J=6,5\text{Hz}$; 3H, H₃C-CH) ; 2,21 (s, 3H, O=C-CHH₃) ; 6,65-6,75 (q, $J=6,75\text{Hz}$, 1H, H₃C-CHH-O) ; 7,50-7,75 (m_a, 5H, aromatiques); 7,80 et 7,90 (d, $J=1,75\text{Hz}$; 1H aromatique); 8,3 et 8,5 (d, $J=2,12\text{Hz}$; 1H aromatique)

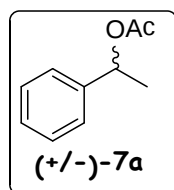
RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 21,4 ; 22,7; 69,4; 123,2 ; 125,4 ; 125,7 ; 126,4 ; 128,1 ; 128,5 ; 128,9 ; 130,3 ; 133,9 ; 137,5; 170,4.

Caractéristiques chromatographiques:

Rapport frontal : $R_f = 0,52$. **Eluant (v,v):** cyclohexane / acétate d'éthyle (8/2).

HPLC chirale : Colonne *Chiralcel* OD-H. **Eluant (v,v):** hexane / isopropanol (90/10) avec un débit de 0,5 ml / mn.

Temps de rétention : $t_{R1} = 9,81$ minutes. $t_{R2} = 12,00$ minutes.

Synthèse de 1-(phényléthyl) acétate :

Formule moléculaire : C₁₀H₁₂O₂
Masse moléculaire: 164 g/mole
Aspect physique: Huile transparente

Pour 100 mmoles d'alcool (+/-)-7, soit 12, 2 g.

L'acétate produit est obtenu sous forme d'une huile transparente, d'une masse de : 15,6g (95 mmoles), soit un rendement chimique de 95%.

Caractéristiques spectroscopiques :

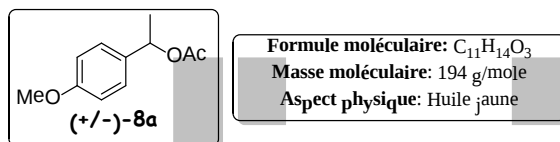
RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,52 et 1,54 (d, $J=6,6\text{Hz}$, 3H, CH₃-CH-) ; 2,06 (s, 3H, O=C-CH₃) ; 5,85-5,87 (q, $J=6,61\text{Hz}$, 1H, -CH-C-O) ; 7,27-7,34 (m, 5H, protons aromatiques).

Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,50$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme 140°C. Débit :1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 2,980$ minutes. $t_{R2} = 3,162$ minute

Le 1-(4-méthoxyphényl)éthyl acétate :

Pour 2 mmoles d'alcool (+/-)-8 (soit 0,304g).

Le produit obtenu est sous forme d'une huile de couleur jaune d'une masse de 0,318g, soit un rendement chimique de 82%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (200MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,6-1,5 (d, 3H, -CH-CH₃) ; 2,1 (s, 3H, O=C-CH₃) ; 3,7 (s, 3H, CH₃-O-) ; 6-5,8 (q, 1H, -CH-CH₃) ; 6,9 (d, 2H aromatiques) ; 7,3 (d, 2H aromatiques).

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 21,4; 21,9; 55,23; 72,01; 76,6 ; 77,66 ; 113,8 ; 127,6 ; 133,7 ; 159,2; 170,4.

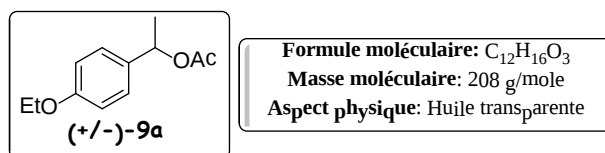
Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,48$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme : 135°C. Débit : 1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 10,888$ minutes. $t_{R2} = 12,125$ minutes.

Le 1-(4-éthoxyphényl)éthyl acétate :



Pour 2 mmoles d'alcool (+/-)-**9** (soit 0,332 g).

Le produit obtenu est sous forme d'une huile incolore d'une masse de 0,312 g, soit un rendement chimique de 75%.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN¹H (250MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,3-1,4 (t, 3H, CH₃-CH₂-O-) ; 1,5 (d, 3H, -CH-CH₃) ; 2 (s, 3H, O=C-CH₃) ; 3,9-4,1 (q, 2H, CH₃-CH₂-O-) ; 5,7-5,9 (q, 1H, -CH-CH₃) ; 6,8-6,9 (d, 2H aromatiques) ; 7,2-7,3 (d, 2H aromatiques).

RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14,8; 21,4; 21,9; 63,4; 72,1; 114,3 ; 127,6 ; 133,5 ; 158,6; 170,4.

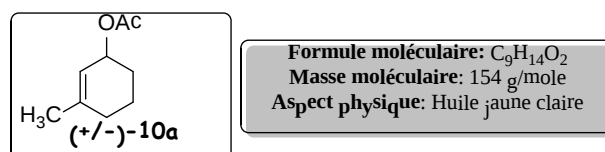
Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,40$. **Eluant (v,v):** cyclohexane: acétate d'éthyle: (8:2).

CPG chirale: Colonne *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme : 155°C. Débit : 1,2 mL/min.

Temps de rétention : $t_{R1} = 12,19$ minutes. $t_{R2} = 13,368$ minutes.

Le 3-méthyl-2-cyclohexène-1-ol acétate :



Pour 2 mmol de l'alcool **10** (soit 0,224g).

Le produit (acétate) obtenu est une huile jaune claire de masse 0,245g, soit un rendement chimique de 79.54%.

Caractéristiques spectrales :

RMN ^1H : δ (ppm) = 5.47 (1H, m) proton vinylique, 5.25 (1H, m) proton déblindé (influencé par le groupement $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ et $\text{C}=\text{C}$), 2.1 (3H, s) groupe méthyle en α de $\text{C}=\text{O}$, 1.9 (2H, m) CH_2 du cyclohexène déblindé (position allylique), 1.75 (2H, m) CH_2 cyclohexène en position B de $\text{C}-\text{O}$, 1.73 ppm (3H, s) groupement méthyle $\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$, 1.67 (2H, m) CH_2 cyclohexène

RMN ^{13}C : δ (ppm) = 170.9 (1C, s) $\text{C}=\text{O}$ ester, 141.1 (1C, s) $\text{C}=\text{C}$ éthylinique, 119.9 (1C, d) $\text{C}=\text{C}$ éthylinique, 68.8 (1C, d) $\text{C}-\text{O}$, 29.9 (1C, t) CH_2 en position α de $\text{C}=\text{O}$, 27.9 (1C, t) $\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$, 23.7 (1C, t) CH_2 cyclohexène, 21.4 (1C, q) $\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$, 18.9 (1C, q) $\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$.

Caractéristiques chromatographiques :

Rapport frontal : $R_f = 0,58$. **Eluant (v,v):** heptane / acétate d'éthyle (80/20).

HPLC chirale: Colonne *Chiralcel* OD-H. Eluant : hexane / isopropanol (300/1) avec un débit de 0,95 ml / mn.

Temps de rétention : $t_{R1} = 22$ minutes. $t_{R2} = 30$ minutes.

CHAPITRE I

1- Dédoublément cinétique enzymatique par hydrolyse en milieu conventionnel (solution tampon/solvant organique)

Mode opératoire

Dans un tube de schlenk on place 2 mmoles d'ester racémique dans 3 ml d'éther diéthylique et 12 ml de solution tampon phosphate pH=7, puis on ajoute l'enzyme. Après agitation a température ambiante, le mélange est filtré sur papier filtre. On extrait avec de l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et l'éther est évaporé sous pression réduite.

Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates dédoublés sur une colonne de gel de silice avec un mélange d'éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle : 80/20. Les excès énantiomériques des alcools et des acétates dédoublés sont déterminés par HPLC sur une colonne chirale.

1a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (98/2))

Acétate résiduel:

ee_s = 44% avec des temps de rétention: $t_R = 10,2$ et $t_R = 11,2$ minutes.

Alcool formé:

C = 32 % E = 68

ee_p = 96% avec des temps de rétention: $t_R = 34,7$ et $t_R = 40,7$ minutes.

2a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = 83% avec des temps de rétention: $t_R = 8,55$ et $t_R = 9,55$ minutes.

Alcool formé:

C = 46 % E >300

ee_p = 98% avec des temps de rétention: $t_R = 15,84$ et $t_R = 17,64$ minutes.

3a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (90/10))

Acétate résiduel:

ee_s = 98% avec des temps de rétention: $t_R = 10,76$ et $t_R = 12,04$ minutes.

Alcool formé:

C = 49 % E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 19,13$ et $t_R = 26,03$ minutes.

4a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = 96% avec des temps de rétention: $t_R = 10,36$ et $t_R = 11,82$ minutes.

Alcool formé:

C = 49 % E >500

ee_p = 99% avec le temps de rétention: $t_R = 33,42$.

5a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = 6% avec des temps de rétention: $t_R = 11,89$ et $t_R = 12,53$ minutes.

Alcool formé:

C = 6 % E = 200

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 28,88$ et $t_R = 34,84$ minutes.

6a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (90/10))

Acétate résiduel:

ee_s = 75% avec des temps de rétention: $t_R = 9,82$ et $t_R = 13,41$ minutes.

Alcool formé:

C = 46 % E = 37

ee_p = 87% avec des temps de rétention: $t_R = 20,57$ et $t_R = 29,06$ minutes.

7a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec le temps de rétention: $t_R = 9,4$ minutes.

Alcool formé:

C = 50 % E > 200

ee_p = 99% avec le temps de rétention: $t_R = 16,08$ minutes.

8a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec le temps de rétention: $t_R = 8,97$ minutes.

Alcool formé:

C = 53 % E = 91

ee_p = 89% avec des temps de rétention: $t_R = 10,49$ et $t_R = 10,84$ minutes.

9a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 150 mg de CALB:

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec le temps de rétention: $t_R = 11,22$ minutes.

Alcool formé:

C = 51 % E > 500

ee_p = 94% avec des temps de rétention: $t_R = 11,56$ et $t_R = 11,78$ minutes.

2- Influence de la quantité d'enzyme CAL-B sur la sélectivité de la réaction d'hydrolyse :

1a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 12,5 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (98/2))

Acétate résiduel:

ee_s = 98% avec des temps de rétention: t_R = 10,2 et t_R = 11,3 minutes.

Alcool formé:

C = 50 % E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 34,8 et t_R = 40,8 minutes.

1a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 6 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (98/2))

Acétate résiduel:

ee_s = 79% avec des temps de rétention: t_R = 10,4 et t_R = 11,5 minutes.

Alcool formé:

C = 46 % E =70

ee_p = 93% avec des temps de rétention: t_R = 36,22 et t_R = 41,9 minutes.

3a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 20 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (90/10))

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec des temps de rétention: t_R = 10,8 et t_R = 12 minutes.

Alcool formé:

C = 49 % E >500

ee_p = 98% avec des temps de rétention: t_R = 20,7 et t_R = 26 minutes.

5a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 60 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = 10% avec des temps de rétention: t_R = 11,9 et t_R = 12,5 minutes.

Alcool formé:

C = 9 % E =62

ee_p = 96% avec des temps de rétention: t_R = 28,9 et t_R = 34,8 minutes.

5a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 20 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (95/5))

Acétate résiduel:

ee_s = non déterminé

Alcool formé:

C = nd % E = nd

ee_p = non déterminé

6a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 60 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (90/10))

Acétate résiduel:**ee_s = 99%** avec des temps de rétention:**Alcool formé:****C = 34 % E >200****ee_p = 51%** avec des temps de rétention:**6a +solution tampon/éther (v/v :6/1) + 20 mg de CALB:**

(Analyse chirale: hexane/ isopropanol (90/10))

Acétate résiduel:**ee_s = 99%** avec des temps de rétention: $t_R = 10,2$ et $t_R = 11,2$ minutes.**Alcool formé:****C = 30 % E >200****ee_p = 44%** avec des temps de rétention: $t_R = 34,7$ et $t_R = 40,7$ minutes.**CHAPITRE II****Dédoublément cinétique enzymatique par hydrolyse en milieu non-conventionnel (solvant organique/base)****Mode opératoire :**

Dans un ballon on place 2 mmol d'ester racémique dans 6 ml de toluène et 2 mmoles de Na_2CO_3 , puis on ajoute l'enzyme. Après agitation à 40°C, le mélange est filtré sur papier filtre. Le solvant est évaporé sous pression réduite.

Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates dédoublés sur une colonne de gel de silice avec un mélange d'éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle : 80/20. Les excès énantiomériques des alcools et des acétates dédoublés sont déterminés par la chromatographie en phase gazeuse chirale (CPG).

1a :**Acétate résiduel:****ee_s = 98,2%** avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.**Alcool formé:****C = 49,75 % E >500****ee_p = 99,2%** avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

2a :

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé:

C = 50% E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

3a :

Acétate résiduel:

ee_s = 92,7% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé:

C = 49% E >150

ee_p = 96,3% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

4a :

Acétate résiduel:

ee_s = 89% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé:

C = 47,5% E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

5a :

Acétate résiduel:

ee_s = 97,8% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé:

C = 49,8% E >500

ee_p = 98,6% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

6a :

Acétate résiduel:

ee_s = 89% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé:

C = 47,5% E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

7a :

Acétate résiduel:

ee_s = 89% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé: **C = 47,5% E >500**

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

8a :

Acétate résiduel:

ee_s = 95,6% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé: **C = 49,6% E >200**

ee_p = 97% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

9a :

Acétate résiduel:

ee_s = 94,9% avec des temps de rétention: $t_R = 10,84$ et $t_R = 18,08$ minutes.

Alcool formé: **C = 49,3% E >300**

ee_p = 97,6% avec des temps de rétention: $t_R = 11,94$ et $t_R = 12,54$ minutes.

1- Influence de la quantité et de la nature du carbonate

La même procédure de l'hydrolyse enzymatique, avec différentes quantités du carbonate.

1a + 3ml de Toluène + 50 mg de CALB sans le Na₂CO₃:

Acétate résiduel:

ee_s = 9,5% avec des temps de rétention: $t_R = 15,6$ et $t_R = 16,3$ minutes.

Alcool formé: **C = 9 % E >200**

ee_p = 99,5% avec des temps de rétention: $t_R = 16,77$ minutes.

1a + 3ml de Toluène + 1millimole de Na₂CO₃, sans la CALB

Pas de réaction

1a + 3ml de Toluène + 3millimole de Na₂CO₃ + 50mg de CALB

Acétate résiduel:

ee_s = 99,5% avec des temps de rétention: $t_R = 6,3$ et $t_R = 7,2$ minutes.

Alcool formé: **C = 50,5 % E >500**

ee_p = 98% avec des temps de rétention: $t_R = 9,2$ et $t_R = 9,7$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 2millimole de Na_2CO_3 + 50mg de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 99,5\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 15,55$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p = 99,5\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,1$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 1millimole de Na_2CO_3 + 50mg de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 83\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 15,6$ et $t_R = 16,2$ minutes.

Alcool formé:

$C = 46\%$ $E > 500$

$ee_p = 99,5\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,8$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,5millimole de Na_2CO_3 + 50mg de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 97,5\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 15,6$ et $t_R = 16,2$ minutes.

Alcool formé:

$C = 49,7\%$ $E > 500$

$ee_p = 98,7\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,9$ et $t_R = 17,6$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,4millimole de Na_2CO_3 + 50mg de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 99,2\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,2$ et $t_R = 9,6$ minutes.

Alcool formé:

$C = 48\%$ $E > 500$

$ee_p = 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,8$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,3millimole de Na_2CO_3 + 50mg de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 75,2\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,08$ et $t_R = 9,56$ minutes.

Alcool formé:

$C = 43\%$ $E > 300$

$ee_p = 98,2\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,8$ et $t_R = 19,7$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,2millimole de Na_2CO_3 + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,7$ minutes.

Alcool formé:

$C = 27\%$ $E > 250$

$ee_p = 36,2\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 17,07$ et $t_R = 20,03$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,1millimole de Na_2CO_3 + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 31\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 15,6$ et $t_R = 16,3$ minutes.

Alcool formé:

$C = 24\%$ $E = 97$

$ee_p = 97\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 16,8$ et $t_R = 17,6$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 1millimole de K_2CO_3 + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 95\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 2,8$ et $t_R = 3,01$ minutes.

Alcool formé:

$C = 49\%$ $E > 500$

$ee_p = 99,5\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 3,5$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,5millimole de K_2CO_3 + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 6,2$ et $t_R = 7,2$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p = 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,1$ et $t_R = 9,64$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 1millimole de $CaCO_3$ + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 15\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,2$ et $t_R = 9,6$ minutes.

Alcool formé:

$C = 13\%$ $E > 250$

$ee_p = 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 17,08$ minutes.

1a +3ml de Toluène + 0,5millimole de $CaCO_3$ + 50mq de CALBAcétate résiduel:

$ee_s = 15\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,07$ et $t_R = 9,57$ minutes.

Alcool formé:

C = 13 % E >250

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 17,00minutes.

2- Hydrolyse enzymatique avec 50mg de CAL-B en présence de 0,5 milli mole de Na₂CO₃ des substrats 2a, 4a et 6a-9a dans 3ml de toluène

2a :

Acétate résiduel:

ee_s =89% avec des temps de rétention: t_R = 10,84 et t_R = 18,08 minutes.

Alcool formé:

C = 47,5 % E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 11,94 et t_R = 12,54 minutes.

4a :

Acétate résiduel:

ee_s =84% avec des temps de rétention: t_R = 15,12 et t_R = 15,44 minutes.

Alcool formé:

C = 46 % E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 16,47minutes.

6a :

Acétate résiduel:

ee_s =73% avec des temps de rétention: t_R = 13,3 et t_R = 14,02 minutes.

Alcool formé:

C = 42,2 % E >200

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 15,9 minutes.

7a :

Acétate résiduel:

ee_s =99% avec des temps de rétention: t_R = 3,09 minutes

Alcool formé:

C = 50 % E >500

ee_p = 99% avec des temps de rétention: t_R = 4,04minutes.

8a :

Acétate résiduel:

ee_s = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 8,94$ minutes.

Alcool formé:

C = 52 % E = 144

ee_p = 93% avec des temps de rétention: $t_R = 10,50$ et $t_R = 10,82$ minutes.

9a :**Acétate résiduel:**

ee_s = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,2$ minutes.

Alcool formé:

C = 50 % E > 200

ee_p = 99% avec des temps de rétention: $t_R = 11,54$ minutes.

CHAPITRE III

Déracémisation des acétates par combinaison de la réaction d'hydrolyse enzymatique dans un milieu conventionnel avec une inversion de configuration selon le protocole de Mitsunobu

Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 ml muni d'un barreau aimanté, 2 mmols de l'acétate racémique sont dissoutes dans 3ml d'éther éthylique. Ensuite, 12 ml de solution tampon phosphaté (pH=7), sont additionnés à ce milieu. Une quantité convenable de la lipase de *Candida antarctica* est ajoutée au mélange. Ce mélange est agité à une température ambiante, pendant un temps approprié jusqu'à ce que la conversion atteigne la valeur de 50%. L'enzyme est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite.

Dans un bicol de 100 ml, le mélange brut contenant les deux énantiomères optiquement purs, l'alcool formé de configuration (*R*) et l'acétate résiduel (*S*), est solubilisé dans 4ml d'éther. Ensuite, 0.144 g (2.4 mmols, 1.2 éq) d'acide acétique (AcOH) et 0.628 g (2.4 mmols, 1.2 éq) de triphénylphosphine (PPh₃) sont additionnés à ce milieu. Le mélange réactionnel obtenu est refroidi à environ 0°C, à l'aide d'un bain de glace, et 0.48 g (2.4 mmols, 1.2 éq) de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) est ajouté, goutte à goutte, sous agitation vigoureuse durant 20 minutes. Le DIAD (de couleur jaune) est instantanément décoloré au fur et à mesure de son addition progressive.

Le mélange est par la suite amené à une température ambiante et son agitation est maintenu pendant une durée de 24 heures. Le milieu réactionnel est concentré et le produit obtenu est repris dans l'éther. On observe alors la précipitation du produit de réduction du DIAD et de l'oxyde de PPh_3 formé. Après filtration et évaporation sous vide, le résidu récupéré est chromatographié sur gel de silice en utilisant un mélange (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 80/20) pour obtenir un seul énantiomère c'est l'acétate de configuration (S).

1a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s = 98\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,29$ et $t_R = 6,82$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 23,95$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 81\%$, $ee_s = 90\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 4,82$ et $t_R = 5,31$ minutes.

2a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 4,9$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 18,3$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 74\%$, $ee_s = 90\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 4,49$ et $t_R = 4,92$ minutes.

3a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s = 93\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,57$ et $t_R = 5,93$ minutes.

Alcool formé:

$C = 49\%$ $E > 150$

$ee_p = 96\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 17,77$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 77\%$, $ee_s = 65\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,58$ et $t_R = 5,96$ minutes.

4a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s = 98\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,00$ et $t_R = 5,45$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p = 98\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 15,27$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 82\%$, $ee_s = 92\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,01$ et $t_R = 5,46$ minutes.

5a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 8,12$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 39,92$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 89\%$, $ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 8,16$ minutes.

6a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 6,21$ minutes.

Alcool formé:

$C = 50\%$ $E > 500$

$ee_p > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 9,72$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 82\%$, $ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 6,27$ minutes.

7a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 7,14$ minutes.

Alcool formé:

$C = 45,5\%$ $E > 500$

$ee_p > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 8,05$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

$Rdt = 70\%$, $ee_s > 99\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 5,2$ minutes.

8a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

$ee_s = 95\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 8,93$ et $t_R = 9,99$ minutes.

Alcool formé:

$C = 49\%$ $E > 300$

$ee_p = 98\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 12,34$ et $t_R = 14,79$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

Rdt = 72 %, ee_s = 57% avec des temps de rétention: $t_R = 8,93$ et $t_R = 9,99$ minutes.

9a :

Après hydrolyse enzymatique avec 50mg de *CAL-B* et 1 mmole de Na_2CO_3 dans 3 ml de toluène (première étape)

Acétate résiduel:

ee_s = 96% avec des temps de rétention: $t_R = 2,24$ et $t_R = 5,4$ minutes.

Alcool formé:

C = 50 % E >200

ee_p = 97% avec des temps de rétention: $t_R = 5,67$ et $t_R = 5,94$ minutes.

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

Acétate formé:

Rdt = 89%, ee_s = 60% avec des temps de rétention: $t_R = 4,93$ et $t_R = 5,99$ minutes.

CHAPITRE IV

Dédoublément cinétique par acylation enzymatique : (D.C.E)

D.C.E. en fonction de la nature de lipase:

Dans un tube de Schlenk muni d'un barreau aimanté, on dissout 1 mmol d'alcool racémique et 3 mmol d'acétate d'isopropényle (A.I) dans 6 ml d'éther, puis on ajoute la *CAL-B* à des quantités différentes (6, 25, 80 et 150) mg. Ensuite, divers l'enzyme*. Sont utilisés.

Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température ambiante pendant 3 heures de temps. La réaction est suivie par CCM.

Après réaction, le mélange est filtré sur papier filtre et l'éther est évaporé

1*-la lipase de *Candida antarctica* (*CAL-B*) qui est une lipase immobilisée est filtrée sur papier filtre pour la récupérer et la réutiliser.

2*-La lipase de *Candida cylindracea* (*CCL*) et la lipase *Gastrique de lapin* (*LGL*) sont filtrées sur célite.

Alcool + A.I + 6 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel: (S)

ee_s = 47% avec des temps de rétention: $t_R = 22,34$ et $t_R = 24,98$ minutes.

Acétate formé: (R)

C = 31,96% E = 316

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,87$ minutes.

Alcool + A.I + 25 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1))

Alcool résiduel:

ee_s = 50,92% avec des temps de rétention: $t_R = 21,93$ et $t_R = 24,77$ minutes.

Acétate formé:

C = 46,25 % E = 6

ee_p = 59,17% avec des temps de rétention: $t_R = 30,14$ et $t_R = 30,68$ minutes.

Alcool + A.I + 80 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1))

Alcool résiduel:

ee_s = 48,40% avec des temps de rétention: $t_R = 22,97$ et $t_R = 25,68$ minutes.

Acétate formé:

C = 77,56 % E = 2

ee_p = 14 % avec des temps de rétention: $t_R = 31,04$ et $t_R = 31,79$ minutes.

Alcool + A.I + 150 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1))

Alcool résiduel:

ee_s = 86,88% avec des temps de rétention: $t_R = 21,97$ et $t_R = 24,88$ minutes.

Acétate formé:

C = 58,82 % E = 11

ee_p = 60,80% avec des temps de rétention: $t_R = 29,86$ et $t_R = 30,33$ minutes.

Alcool + A.I + 6 mg de CCL:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures)

Alcool résiduel:

ee_s = 3,52% avec des temps de rétention: $t_R = 22,72$ et $t_R = 25,74$ minutes.

Acétate formé:

C = 4,82% E = 6

ee_p = 69,41% avec des temps de rétention: $t_R = 31,52$ et $t_R = 32,23$ minutes.

Alcool + A.I + 90 mg de CCL:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 14,52% avec des temps de rétention: $t_R = 23,21$ et $t_R = 26,30$ minutes.

Acétate formé:

C = 23,12% E = 3

ee_p = 48,27% avec des temps de rétention: $t_R = 31,60$ et $t_R = 32,23$ minutes.

Alcool + A.I + 6 mg de LGL:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 0,87% avec des temps de rétention: $t_R = 22,85$ et $t_R = 25,80$ minutes.

Acétate formé:

C = 9,40% E = 1

ee_p = 8,38% avec des temps de rétention: $t_R = 31,63$ et $t_R = 32,33$ minutes.

D.C.E. en fonction de la nature et la concentration (substrat-agent acylant):**Avec les esters d'enols:**

Dans un tube de Schlenk muni d'un barreau aimanté, on dissout 1 mmol d'alcool racémique et 3 (ou 2) mmol d'acétate d'isopropényle (A.I) dans 6 ml d'éther, puis on ajoute 6 mg de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B).

Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température ambiante pour différentes durées de temps. La réaction est suivie par CCM.

Après réaction, le mélange est filtré sur papier filtre et l'éther est évaporé.

Alcool + A.I (2 mmol) + 6 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 44% avec des temps de rétention: $t_R = 20,02$ et $t_R = 25,04$ minutes.

Acétate formé:

C = 32% E = 50

ee_p = 95% avec des temps de rétention: $t_R = 30,97$ et $t_R = 31,32$ minutes.

Alcool + A.I (3 mmol) + 6 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 46,51% avec des temps de rétention: $t_R = 22,34$ et $t_R = 24,98$ minutes.

Acétate formé:

C = 31,96% E = 316

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,87$ minutes.

Alcool + A.I (3 mmol) + 6 mg de CALB:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures (piqûre concentrée)

Alcool résiduel:

ee_s = 31,2% avec des temps de rétention: $t_R = 25,99$ et $t_R = 29,45$ minutes.

Acétate formé:

C = 34,6% E = 5

ee_p = 59% avec des temps de rétention: $t_R = 34,68$ et $t_R = 35,5$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 24,57% avec des temps de rétention: $t_R = 21,67$ et $t_R = 24,27$ minutes.

Acétate formé:

C = 23,41% E = 12

ee_p = 80,38% avec des temps de rétention: $t_R = 29,77$ et $t_R = 30,34$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 45,5% avec des temps de rétention: $t_R = 21,67$ et $t_R = 24,27$ minutes.

Acétate formé:

C = 31,4% E = 315

ee_p > 99% avec des temps de rétention: $t_R = 29,77$ et $t_R = 30,34$ minutes.

Avec l'anhydride succinique:

A 2 mmol d'alcool racémique on ajoute 2 mmols d'anhydride succinique dans 10 ml d'éther, puis on ajoute (12 et 100) mg d'enzyme [la lipase de *Candida antarctica* (CALB)] sous agitation magnétique à température ambiante.

Après le temps de réaction (72 et 168 heures), l'enzyme est filtrée sur papier filtre et le mélange est lavé avec 2 ml d'une solution saturée de Na_2CO_3 (2M), puis extrait avec de

l'éther (2x5 ml), les phases étherées qui contiennent l'alcool qui n'a pas réagi, sont réunies et séchées avec MgSO_4 , filtrées puis évaporées. Ensuite, 4 ml d'une solution de NaOH (1M) sont additionnés à la phase aqueuse qui est ensuite lavée à l'éther, séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée à pression réduite.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.S :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 72 heures

Alcool résiduel: (n'ayant pas réagi)

$ee_s = 29,63\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 21,63$ et $t_R = 24,25$ minutes.

Alcool ayant réagi:

$C = 40,90\%$ $E = 3$

$ee_p = 42,80\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,23$ et $t_R = 24,7$ minutes.

D.C.E. en fonction de la nature du solvant:

Dans un tube de Schlenk muni d'un barreau aimanté, 1mmol d'alcool racémique et 3mmol d'acétate d'isopropényle sont dissous dans 6ml de solvant, ou 3mmol d'acétate d'isopropényle (ou l'acétate de vinyle) sont dissous dans 6ml de l'ester d'énol correspondant, on ajoute ensuite 6 mg d'enzyme (la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B)). Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température ambiante, pour le même temps. La solution est ensuite filtrée sur papier et évaporée sous pression réduite.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec L'éther)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 47\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,34$ et $t_R = 24,98$ minutes.

Acétate formé:

$C = 31,96\%$ $E = 316$

$ee_p > 99\%$ avec un temps de rétention: $t_R = 30,87$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec Toluène)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 37,10\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 21,79$ et $t_R = 24,42$ minutes.

Acétate formé:

$C = 27,25\%$ $E = 301$

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,86$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec T.H.F)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 16,29% avec des temps de rétention: $t_R = 21,5$ et $t_R = 24,04$ minutes.

Acétate formé: **C = 14,12% E = 236**

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,79$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec CHCl₃)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 9 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 8% avec des temps de rétention: $t_R = 21,59$ et $t_R = 24,08$ minutes.

Acétate formé: **C = 7,08% E = 217**

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,82$ minutes.

C = 7,08% E = 217

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec n-Heptane)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 41,47% avec des temps de rétention: $t_R = 21,53$ et $t_R = 24,27$ minutes.

Acétate formé: **C = 30,03% E = 88**

ee_p = 96,59% avec des temps de rétention: $t_R = 30,28$ et $t_R = 30,82$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec T.B.M.E)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 44,12% avec des temps de rétention: $t_R = 21,78$ et $t_R = 22,67$ minutes.

Acétate formé: **C = 32,22% E = 41**

ee_p = 92,80% avec des temps de rétention: $t_R = 30,37$ et $t_R = 30,92$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Avec Acétone)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 7% avec des temps de rétention: $t_R = 21,48$ et $t_R = 24,04$ minutes.

Acétate formé:

C = 9% E = 6

ee_p = 70,97% avec des temps de rétention: $t_R = 30,99$ et $t_R = 33,38$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I + A.I :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures (piqûre concentrée)

Alcool résiduel:

ee_s = 17% avec des temps de rétention: $t_R = 22,96$ et $t_R = 26,07$ minutes.

Acétate formé:

C = 17% E = 14

ee_p = 84% avec des temps de rétention: $t_R = 31,57$ et $t_R = 32,13$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V + A.V:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 12,50% avec des temps de rétention: $t_R = 23,43$ et $t_R = 26,48$ minutes.

Acétate formé:

C = 14,32% E = 8

ee_p = 74,75% avec des temps de rétention: $t_R = 31,79$ et $t_R = 32,42$ minutes.

D.C.E. en fonction de la température:

Dans un tube de Schlenk muni d'un barreau aimanté, 1mmol d'alcool racémique et 3mmol d'acétate d'isopropényle sont dissous dans 6ml de l'éther, on ajoute ensuite 6 mg d'enzyme (la lipase de *candida antarctica* (CAL-B)). Le mélange est soumis à une agitation magnétique à différentes températures pour une même durée. La solution est ensuite filtrée sur papier et évaporée sous pression réduite.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Température: 25°C)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 47% avec des temps de rétention: $t_R = 22,34$ et $t_R = 24,98$ minutes.

Acétate formé:

C = 31,96% E = 316

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 30,87$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Température: 40°C)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 54,28\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,17$ et $t_R = 24,81$ minutes.

Acétate formé:

$C = 37,41\%$ $E = 36$

$ee_p = 90,81\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 30,10$ et $t_R = 30,66$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Température: 80°C)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 67,63\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,29$ et $t_R = 24,92$ minutes.

Acétate formé:

$C = 42,54\%$ $E = 44$

$ee_p = 91,18\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 30,23$ et $t_R = 30,81$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I : (Température: 120°C)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 57,07\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,09$ et $t_R = 24,71$ minutes.

Acétate formé:

$C = 38,43\%$ $E = 40$

$ee_p = 91,43\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 30,01$ et $t_R = 30,55$ minutes.

D.C.E. en fonction de l'ether couronne:**Procédure générale (sans E.C) :**

Dans un tube de schlenk muni d'un barreau aimanté, 1mmol d'alcool racémique et 3 mmol d'acétate d'isopropényle ou' d'acétate de vinyle (la procédure avec l'anhydride succinique est donnée dans l'étude du D.C.E en fonction des agents acylants) sont dissous dans 6ml d'éther anhydre, on ajoute ensuite l'enzyme en quantité adéquate. Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température ambiante, durant un temps variable. La solution est ensuite filtrée sur papier filtre et l'éther est évaporé.

- la même procédure avec l'étude de l'effet de l'eau, on utilise l'éther et l'éther anhydre.

Procédure générale (avec E.C) :

Même procédure que la précédente. La quantité adéquate du 18-crown-6 (5mol%) est ajoutée avant l'addition de l'enzyme.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 47\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 22,34$ et $t_R = 24,98$ minutes.

Acétate formé:

$C = 31,96\%$ $E = 316$

$ee_p > 99\%$ avec un temps de rétention: $t_R = 30,87$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I + E.C:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 3 heures

Alcool résiduel:

$ee_s = 30,87\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 21$ et $t_R = 23,59$ minutes.

Acétate formé:

$C = 71,06\%$ $E = 2$

$ee_p = 12,57\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 29,51$ et $t_R = 30,53$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I + Ether :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures (piqûre concentrée)

Alcool résiduel:

$ee_s = 31,2\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 25,99$ et $t_R = 29,45$ minutes.

Acétate formé:

$C = 34,6\%$ $E = 5$

$ee_p = 59\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 34,68$ et $t_R = 35,5$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.I + Ether anhydre:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures (piqûre concentrée)

Alcool résiduel:

$ee_s = 52\%$ avec des temps de rétention: $t_R = 26,04$ et $t_R = 29,46$ minutes.

Acétate formé:

$C = 34,4\%$ $E = 321$

$ee_p > 99\%$ avec un temps de rétention: $t_R = 35,82$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 42% avec des temps de rétention: $t_R = 21,97$ et $t_R = 24,88$ minutes.

Acétate formé: **C = 30,20% E = 102**

ee_p = 97% avec des temps de rétention: $t_R = 29,86$ et $t_R = 30,33$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V + E.C:

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 40% avec des temps de rétention: $t_R = 21,97$ et $t_R = 24,88$ minutes.

Acétate formé: **C = 30,36% E = 35**

ee_p = 92% avec des temps de rétention: $t_R = 29,86$ et $t_R = 30,33$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V: (Ether anhydre)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 43% avec des temps de rétention: $t_R = 25,62$ et $t_R = 29,30$ minutes.

Acétate formé: **C = 30,33% E = 298**

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 35,67$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.V + E.C: (Ether anhydre)

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 6 heures

Alcool résiduel:

ee_s = 43% avec des temps de rétention: $t_R = 25,79$ et $t_R = 29,30$ minutes.

Acétate formé: **C = 29,87% E = 301**

ee_p > 99% avec un temps de rétention: $t_R = 35,57$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.S :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 72 heures

Alcool résiduel: (n'ayant pas réagi)

ee_s = 29,63% avec des temps de rétention: $t_R = 21,63$ et $t_R = 24,25$ minutes.

Alcool ayant réagi: **C = 40,90% E = 3**

ee_p = 42,80% avec des temps de rétention: $t_R = 22,23$ et $t_R = 24,7$ minutes.

Alcool + 6 mg de CAL-B + A.S + E.C :

(Analyse chirale: hexane/ iPrOH (99/1). Pour 72 heures

Alcool résiduel: (n'ayant pas réagi)

ee_s = 39,89% avec des temps de rétention: $t_R = 22,07$ et $t_R = 25,04$ minutes.

Alcool ayant réagi: **C = 94% E = 1**

ee_p = 3% avec des temps de rétention: $t_R = 22,54$ et $t_R = 25,24$ minutes.

Références bibliographiques

- 1- H. Kagan ; Molécules et matériaux d'intérêt médical. L'actualité chimique-novembre-décembre **2003**. pp. 10-14.
- 2- W. J. Hegeman, R. W. Laane; Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment, Rev. Environ Contam. Toxicol, **2002**, 173, 85-116.
- 3-R. P. Hof, U. Quast, N.S. Cook, S; Blarer, Circ. RES, **1888**, 62, 679.
- 4-(a) V. G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentsher, F. Köhler; Arzheim-Forsch. **1979**, 29, 1640-1646, (b) M. Strong, FDA Policy and Regulation of Stereoisomers: Paradigm Shift and the Future of Safer, More Effective Drugs, Food and Drug Law Journal, **1999**, 54, 463-487.
- 5- (a)Seyden-Penne, Synthèse et Catalyse Asymétriques, **1994**, Inter Edition / CNRS ; (b) réf 1 : H. Kagan ; Molécules et matériaux d'intérêt médical. L'actualité chimique-novembre-décembre **2003**. pp. 10-14.
- 6- (a) Huizinga TW et al.An open study of pentoxifyllie as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis.Ann Rheum Dis **1996**, 55: 833.(b) Stamble C et al. TNFa and response of treatment-resistant adult-onset Still's disease to thalidomide. Lancet **1998**, 352: 544.
- 7- Breban M et al. Efficacy of thalidomide in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum **1999**, 42: 580.
- 8- S. Singhal et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. N Engl J Med **1999**; 341: 1565.
- 9- réf 1: H. Kagan ; Molécules et matériaux d'intérêt médical. L'actualité chimique-novembre-décembre **2003**. pp. 10-14.
- 10- (a) S.C.Stinson, Chem. Engineering new **2001**, 79, 79. (b) R. N. Patel; Biocatalysis in the pharmaceutical and Biotechnology Industry. CRC Press, **2007**.
- 11- A. Berthod; "Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations:A General View, in Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications", (A. Berthod, ed), **2010**, Springer, pp. 1-32
- 12- A.M. Thayer, Chem. Engineering new **2005**, 83, 40.
- 13- A. Maureen Rouhi; Chem. Eng. News, **2004**, June 14, 47-62
- 14- Revues générale sur la synthèse asymétrique : a)J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers ; Chimie Organique, Ed. De Boeck, **2002**, Chap 45 : Synthèse asymétrique, pp. 1219-1243. b) Kagan, H.B. L'actualité chimique, **2003**, 11-12, 10-14.
- 15- (a) C. Rabiller, « stéréochimie et chiralité en chimie organique », De Boeck & Larcier, s.a, **1999**. (b) R. A. Sheldon, in chirotechnology, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- 16- L. Pasteur ; Ann, Chim et Phys, **1848**, 24, 442.
- 17- K. Faber; Chem. Eur. J, **2001**, 7, 5004-5010.

- 18- N. Bouzemi, L.Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.
- 19- Z. Houiene, Magister, soutenu le 28 Février **2007**. Université Badji Mokhtar- Annaba ; Synthèse énantiosélective d'une phéromone d'insecte le 3-méthyl-2-cyclohexenol. Effet de quelques paramètres sur l'acylation avec la lipase de *Candida antarctica* B.
- 20- (a) P. T. Anastas, T. C. Williamson, **1996**, *Green chemistry: An overview*. In *Green chemistry: Designing chemistry for the environment*, pp. 1-17, American Chemical Society, Washington D.C. (b) P. T. Anastas, J.-C. Warner; *Green Chemistry : Theory & Practice*, Oxford University Press, New York, **1998**.
- 21- O.H. Housse, B.M. Trost; *J.Org. Chem*, **1964**, 30, 2502.
- 22- R. Wolfenden, M.J. Snider; **2001** The Depth of chemical Time and Power of Enzymes as catalysts. *Acc.Chem. Res.* 34:938-945.
- 23- R. M . C. Dawson, W.H. Elliott, K. M. Jones; *Data for Biochemical research*, 2 nd Ed. Oxford university Press, **1969**.
- 24- R. E. DcKerson,T. Takano, D. Eisenberg,O.B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, E. Margoliash; *Journal of Biological chemistry*, **1971**, 146, 1551-1553.
- 25- International Union of Biochemistry Enzyme Nomenclature Academic Press:Orlando, **1984**.
- 26- (a) B. Danieli, S. Riva; *Pure& Appl. Chem*, **1994**, Vd. 66, Nos 10/11, pp. 2215-2218. (b) A.A. Assamoi, J. Destain, P. Thonart; *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2009**, 13, 281–294.
- 27- K. Faber; *Pure & Appl. Chem*, **1997**, Vol.69, No.8, pp.1613-1632.
- 28- (a) A.M .Klibanov;*Chltech.*, **1986**, 16, 354-359; (b) A.M. Klibanov; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768
- 29- A. Zaks, A.M. Klibanov;*J.Biol. Chem.* **1988**, 263-3194
- 30- L. Juhász, J. Visy, M. Simonyi, K. Krohn, S. Antus; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13, 1219-1222.
- 31- U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas; *Hydrolyse in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, **1999**.
- 32- (a)J.B. Jones;*Tetrahedron* , **1986**, 42, 3351-3403, (b)K. Faber; *Biotransformations in Organique Chemistry*, edn 4. Berlin: Springer; **2000**.
- 33- U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas: *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotranformations*. Weinhein/ Wiley-VCH; **1999**.
- 34- réf 16: L. Pasteur; *Ann, Chim et Phys.*, **1848**, 24, 442
- 35- H.B. Kagan, J.C. Fiaud. *Kinetic Resolution, Topics in Stereochemistry*. E.L.Eliel, S.H. Wiley & Sons, Inc. New-York.**1988**, 18, 249-330.

- 36- C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294.
- 37- V. Prelog. *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119.
- 38- (a) T. Lee, R. Sakowicz, V. Martichonoc, J.K. Hogan, M. Gold, J.B. Jones. *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50, 697–706. (b) Ghanem ; *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754.
- 39- P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3166.
- 40- (a) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6268. (b) K. Naemura, R. Fukuda, M. Konishi, K. Hirose, Y. Tobe. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1994**, 1253. (c) J.M. Moreno, A. Samoza, C. del Campo, E.F. Liama, J.V. Sinisterra. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 95, 179–192.
- 41- R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, (2656–2665).
- 42- R. Chênevert, S. Gravi, J. Bolte; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 2081-2086.
- 43- S. Koul, J. L. Koul, B. Singh, M. Kapoor, R. Parshad, K. S. Manhas, S. C. Taneja, G. I. N. Qazi; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 2575-2591.
- 44- M. C. Millis ; *J. Chem. Soc. PTI*, **1999**, 1765.
- 45- S. C. Strinson; *Chem. Eng. News*, **1992**, 46.
- 46- A. Ghanem, V. Schurig; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 57-62.
- 47- P. P. Bora, G. Bez, J. M. H. Anal; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, 72, 270-275.
- 48- M. Goto, M. Kawasaki, T. Kometani; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 9, 245-2250.
- 49- E. Santaniello, S. Casati, P. Ciuffreda, G. Meroni, A. Pedretti, G. Vistoli; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 1833-1836.
- 50- A.C. O. Machado, A. A. T. da Silva, C. P. Borges, A. B. C. Simas, D. M. G. Freire; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, 69, 42-46.
- 51- N. Aoyagi, N. Ogawa, T. Izumi; *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 4797-4801.
- 52- E. Tadashi, K. Masafumi, K. Toshinobu, S. Takashi ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3943-3947.
- 53- J. M. Palomo, R. L. Segura, C. Mateo, M. Terreni, J. M. Guisan, R. F-Lafuente; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 869-874.
- 54- T. Sakai, Y. Miki, M. Nakatani, T. Ema, K. Uneyama, M. Utaoka ; *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 5233-5236.
- 55- A. Mezzetti, C. Keith, R. J. Kazlauskas; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3917-3924.
- 56- R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 931-938.

- 57- N. Anand, M. Kapoor, S. Koul, S C. Taneja, R L. Sharma, G N. Qazi; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 3131-3138.
- 58- (a) M. Degueil-Castaing, B. De Jeso, S. Drouillard; *Tetrahedron Letters.*, **1987**, 28, 953-954; (b) Y.F. Wang, C.H. Wong; *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 3129.
- 59- D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel; *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5531.
- 60- E.Tadashi, M. Soichi, T. Yusuke, S. Takashi, U. Masanori; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 625-628.
- 61- M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani; *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 585-596.
- 62- N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouieueche, J.C. Fiaud; *Tetrahedron Letters* 45, **2004**, 627-630.
- 63- Réf 62: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouieueche, J.C. Fiaud; *Tetrahedron Letters* 45, **2004**, 627-630.
- 64- (a) A.M. Klivanov; *Chltech.*, **1986**, 16, 354-359; (b) A.M Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768.
- 65- L. Aribi-Zouieueche, J-C. Fiaud ; *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41, 4085-4088.
- 66- T. Itoh, Y. Hiyama, A. Betchaku, H. Tsukube; *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, 2617-2620.
- 67- E. Forró, L. Schönstein, F. Fülöp; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 1255-1260.
- 68- B. H. Hoff, V. Waagen, T. Anthonsen; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 3181-3186.
- 69- G. Reddipalli, M. Venkataiah, N. W. Fadnavis ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 320-324.
- 70- M. Bolduc, J. Bergeron, A. Michaud, N. Pelchat, P. Morin, M. Dasser, R. Chênevert ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23, 428-233.
- 71- S. Joly and M. S. Nair; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 2283-2287.
- 72- L. Duhamel, P. Duhamel, J-C. Launay, J-C. Plaquevent ; *Bull. Soc. Chim. Fr. II*, **1984**, 421-430.
- 73- W. H. Pirkle, D. S. Reno; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 7189-7190.
- 74- E.L. Eliel, S.H. Wilen, M.P. Doyle; *Basic Organic Stereo-chemistry*: Wiley: New York, **2001**, 277-278.
- 75- E J. Ebbers, G J.A. Ariaans, J P. M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg; *Tetrahedron*, **1997**, 53, 9417-9476.
- 76- T. Satoh, H. Momochi, T. Noguchi ; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2010**, 21, 382-384.
- 77- O-J. Park, S-H. Lee, T-Y. Park, S-W. Lee, K-H. Cho; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2005**, 16, 1221-1225.

- 78- N W. Fadnavis, A V. Devi, L S. Jasti ; Tetrahedron : Asymmetry, **2008**, 19, 2363-2366.
- 79- D.R. Rayner, A.J. Gordon, K. Mislow; J. Am. Chem. Soc, **1968**, 90, 4854.
- 80- (a) A. Chadha, B. Baskar; Tetrahedron: Asymmetry, **2002**, 13, 1461-1464. (b) U T. Strauss, A. Kandelbauer, K. Faber; Biotechnology Letters, **2000**, 22, 515-520.
- 81- J. E. Backvall, O. Pamier, Trends in Biotechnology; **2003**, 22, 2004.
- 82- S M. glueck, M. Pirker, B M. Nestl, B T. Ueberbacher, B. Larissegger-Schnell, K. Csar, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, K. Faber; J. Org. Chem. **2005**, 70, 4028-4032.
- 83- J H. Koh, H M. Jeong, J. Park; Tetrahedron: Letters, **1998**, 39, 5545-5548.
- 84- (a) J H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F G. Mutti, W. Kroutil; Current Opinion in Chemical Biology, **2011**, 15, 249-256. (b) N J. Turner; Current Opinion in Chemical Biology, **2010**, 14, 115-121. (c) R. Wohlgemuth; Current Opinion in Microbiology, **2010**, 13, 283-292. (d) Y. Ahn, S-B. Ko, M-J. Kim, J. Park; Coordination Chemistry Reviews; **2008**, 252, 647-658. (e) B. Martín-Matute, J-E. Bäckvall; Current Opinion in Chemical Biology, **2007**, 11, 226-232. (f) O. Pàmies, J-E. Bäckvall; Trends in Biotechnology, **2004**, 22, 130-135. (g) N J. Turner; Current Opinion in Biotechnology, **2003**, 14, 401-406. (h)) O. Pàmies, J-E. Bäckvall; Current Opinion in Biotechnology, **2003**, 14, 407-413. (i) O. Pàmies, J-E. Bäckvall; Chem. Rev, **2003**, 103, 3247-3262. (j) M-J. Kim, Y. Ahn, J. Park; Current Opinion in Biotechnology, **2002**, 13, 578-587. (k) R. Azerad, D. Buisson; Current Opinion in Biotechnology, **2000**, 11, 565-571. (l) U T. Strauss, U. Felfer, K. Faber; Tetrahedron: Asymmetry, **1999**, 10, 107-117. (m) M T. El Gihani, J MJ. Williams; Current Opinion in Chemical Biology, **1999**, 3, 11-15. (n) R S. Ward; Tetrahedron: Asymmetry, **1995**, 6, 1475-1490.
- 85- W. Kroutil, K. Faber; Tetrahedron: Asymmetry, **1998**, 9, 2901-2913.
- 86- G J. Cardus, A J. Carnell, H. Tarald, T. Riermeir; Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 239-243.
- 87- C. Magallanes-Noguera, M M. Ferrari, M. Kurina-Sanz, A A. Orden ; Journal of Biotechnology, **2012**, 160, 189-194.
- 88- F. J. Quijada, V. Gotor, F. Rebolledo; Organic Letters, **2010**, 12, 3602-3605.
- 89- U T. Strauss, K. Faber; Tetrahedron: Asymmetry, **1999**, 10, 4079-4081.
- 90- P M. Dinh, J A. Howarth, A R. Hudnott, J M J. Williams, W. Harris; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 7623-7626.
- 91- J V. Allen, J M J. Williams; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 1895-1862.
- 92- Y K. Choi, J H. Suh, D. Lee, I T. Lim, J Y. Jung, M J. Kim; J. Org. Chem, **1999**, 64, 8423-8424.

- 93- (a) P. Hoyos, M. Alberto Quezada, J V. Sinisterra, A R. Alcántara ; Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic, **2011**, 72, 20-24. (b) M R. Atuu, M. Mahmum Hossain; Tetrahedron: Letters, **2007**, 48, 3875-3878. (c) K. Bogár, J-E. Bäckvall; Tetrahedron: Letters, **2007**, 48, 5471-5474. (d) S F G M. van Nispen, J. van Buijtenen, J A J M. Vekemans, J. Meuldijk, L A. Hulshof; Tetrahedron: Asymmetry, **2006**, 17, 2299-2305.
- 94- (a) A L E. Larsson, B A. Persson, J E. Bäckvall; Angew. Chem. Int. Ed, **1997**, 36, 1211. (b) B A. Persson, A L E. Larsson, M L. Ray, J E. Bäckvall; J. Am. Chem. Soc, **1999**, 121, 1645.
- 95- Y. Ahn, S-B. Ko, M-J. Kim, J. Park; Coordination Chemistry Reviews; **2008**, 252, 647-658.
- 96- Q. Chen, C. Yuan; Tetrahedron, **2010**, 66, 3707-3716.
- 97- M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant ; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1790-1796.
- 98- A. Berkessel, M I. Sebastian-Ibarz, T N. Müller; Angew. Chem. Int. Ed, **2006**, 45, 6567.
- 99- Y. Do, I-C. Hwang, M-J. Kim, J. Park; J. Org. Chem; **2010**, 75, 5740-5742.
- 100- A N. Parvulescu, E V. der Eycken, P A. Jacobes, D E. De Vos ; Journal of Catalysis, **2008**, 255, 206-212.
- 101- G. Xu, Y. Chen, J. Wu, Y. Cheng, L. Yang; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1373-1378.
- 102- Y. Cheng, G. Xu, J. Wu, C. Zhang, L. Yang; Tetrahedron Letters, **2010**, 51, 2366-2369.
- 103- T A. Paál, E. Forró, A. Liljeblad, L T. Kanerva, F. Fülöp; Tetrahedron: Asymmetry, **2007**, 18, 1428-1433.
- 104- J Y. Min, E Y. Lee; Journal of Industrial and Engineering Chemistry, **2011**, 18, 160-164.
- 105- S.F. Mayer, A. Steinreiber, R.V. Arru, K. Faber; Tetrahedron: Asymmetry, **2001**, 12, 41-43.
- 106- R V A. Orru, W. Kroutil, K. Faber; Tetrahedron: Letters, **1997**, 38, 1753-1754.
- 107- W. Kroutil, M. Mischitz, P. Plachota, k. Faber; Tetrahedron: Letters, **1996**, 37, 8379-8382.
- 108- L. Ou, D. Ludwig, J. Pan, J. H. Xu, Organic Process Research & Development, **2008**, 12, 192-195.
- 109- E. W. Hafner and D. Wellner, Proc, Nat, Acad, Sci, **1971**, 68, 987-991.
- 110- M. Hall and Andreas S. Bommarius, Chem. Rev, **2011**, 111, 4088-4110.
- 111- X. Q. Mu, Y. Xu, M. Yang, Z. H. Sun, Process Biochemistry, **2011**, 46, 233-239.
- 112- Y-L. Li, J-H. Xu, Y. Xu, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2010**, 64, 48-52.

- 113-** S M. Mantovani, C F. F. Angolini, A J. Marsaioli; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 2635-2638.
- 114-** X-X. Shi, C-L. Shen, J-Z. Yao, L-D. Nie, N. Quan, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 277-284.
- 115-** J. Otera, K. Nakazawa, K. Sekoguchi and A. Orita, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 13633-13640.
- 116-** T. Shimizu, S. Hiranuma, T. Nakata, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 6145-6148.
- 117-** T. Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8701-8716.
- 118-** M.C. Turcu, E. Kiljinen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2007**, 18, 1682-1687.
- 119-** (a) O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1967**, 40, 2380-2382. (b) O. Mitsunobu, M. guchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1971**, 44, 3427.
- 120-** Réf 119 (a): O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1967**, 40, 2380-2382.
- 121-** Réf 119 (b): O. Mitsunobu, M. guchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1971**, 44, 3427.
- 122-** K. C. Kumara Swamy, N. N. Bhuvan Kumar, E. Balaraman, K. V. P. Pavan Kumar, *Chem. Rev*, **2009**, 109, 2551-2651.
- 123-** (a) E. Grochowski, B. D. Hilton, R. J. Kupper, C. J. Michejda, *J. Am. Chem. Soc*, **1982**, 104, 6876-6877; (b) D. L. Hughes, R. A. Reamer, J. J. Bergan, E. J. J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc*, **1988**, 110, 6487-6491.
- 124-** V. P. Fitzjarrald, R. Pongdee, *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 3553-3557.
- 125-** V. S. Prasada Rao Lingam, D. H. Dahale, K. Mukkanti, B. Gopalan, A. Thomas, *Tetrahedron Letters*, **2012**, 53, 5695-5698.
- 126-** T. Tsunoda, F. Ozaki, N. Shirakata, Y. Tamaoka, H. Yamamoto, S. Itô, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 2463-2466.
- 127-** P. Castejón, M. Pastó, A. Moyano, M. A. Pericàs, A. Riera, *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 3019-3022.
- 128-** T. H. Krane Thvedt, E. Fuglseth, E. Sundby, B. H. Hoff, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6733-6743.
- 129-** I. D. Grice, P. J. Harvey, I. D. Jenkins, *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 1087-1090.
- 130-** T. Tsunoda, K. Uemoto, C. Nagino, M. Kawamura, H. Kaku, S. Itô, *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 7355-7358.
- 131-** R. S. Perali, S. Mandava, V. R. Chunduri, *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 3045-3047.
- 132-** T.S.M. Kurihara, I. Kime, M. Wada, O. Mitsunobu, *Bull. Chem. Soc. Jpn*. **1981**, 54, 2107-2112.
- 133-** Z.Y. Cai, D. F. Covey, *Steroids*, **2007**, 72, 351-359.

- 134-** M. O. Polla, L. Tottie, C. Nordén, M. Linschoten, D. Müsil, S. Trumpp-Kallmeyer, I. R. Aukrust, R. Ringom, K. H. Holm, S. M. Neset, M. Sandberg, J. Thumond, P. Yu, H. Anderson, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 1151-1175.
- 135-** D. Camp, I. D. Jenkins, *Aust. J. Chem.* **1990**, 43, 161.
- 136-** T. Tsunoda, Y. Yamamiya, Y. Kawamura, S. Itô; *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 2529-2530.
- 137-** T. Y. S. But, P. H. Toy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9636-9637.
- 138-** (a) J. Yang, L. Dai, X. Wang, Y. Chen, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 1456-1462. (b) J. Yang, L. Dai, X. Wang, Y. Chen, *Chinese Chemical Letters*, **2011**, 22, 1047-1050.
- 139-** K. Hagiya, N. Muramoto, T. Misaki, T. Sugimura, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 6109-6114.
- 140-** (a) O. Jacquet, J-Y. Legros, M. Coliboeuf, J. C. Fiaud. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 6530-6536.; (b) G. Guanti, L. Banfi, A. Basso, E. Bevilacqua, L. Bondanza, R. Riva. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 2889-2892.; (c) J-I. Oshida, M. Okamoto, S. Azuma. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 2337-2342.
- 141-** S. Takano, M. Suzuki, K. Ogasawara ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1043-1046.
- 142-** réf 18: N. Bouzemi, L. A. Zouiouche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.
- 143-** A. Wallner, H. Mang, S. M. Glueck, A. Steinreiber, S. F. Mayer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432.
- 144-** Y. Shimada, K. Usuda, H. Okabe, T. Suzuki, K. Matsumoto, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 2802-2808.
- 145-** E. Vanttinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786.
- 146-** (a) A. Zaks, M. Tamaz, T. Li; *Adv. Synth. Catal*, **2009**, 351, 2351-2357. (b) B. Larissegger-Schnell, S-M. Glueck, W. Kroutil, K. Faber; *Tétrahedron*, **2006**, 62, 2912-2916.
- 147-** A. Steinreiber, A. Stadler, S-F. Mayer, K. Faber, C-O. Kappe; *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6283-6286.
- 148-** T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe; *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 7997-8000.
- 149-** S-C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, **1992**, 46.
- 150-** Q-M. Gu, C-S. Chen, C.J. Sih ; *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, 1763-1766.
- 151-** X. Lin, X. Dai, Z. Mao, Y. Wang; *Tetrahedron*, **2009**, 65, 9233-9237
- 152-** (a) M. Assié, J-Y. Legros, J-C. Fiaud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 1183-1187. (b) J-Y. Legros, M. Toffano, J-C. Fiaud ; *Tetrahedron*, **1995**, 51, 3235-3246. (c) J-Y. Legros, J-C. Fiaud ; *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 2509-2510.

- 153-** J-Y. Legros, M. Toffano, S-K. Drayton, M. Rivard, J-C. Fiaud; Tetrahedron Letters, **1997**, 38, 1915-1918.
- 154-** K. Suginaka, Y. Hayashi, Y. Yamamoto ; Tetrahedron: Asymmetry, **1996**, 7, 1153-1158.
- 155-** C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J-Y. Legros, J-C. Fiaud ; J. Soc. Alger. Chem, **1999**, 9, 261.
- 156-** L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2000**, 41, 4085-4088.
- 157-** Réf 62: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouèche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45 ,**2004**, 627-630.
- 158-** CAL-B (Chirazyme®, L-2, C-F, C2, Lyo): lipase de candida antarctica fraction B, fournie par Boehringer Mannheim. L'activité spécifique est de 4500 U/G.
- 159-** C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2002**, 43, 3025-3027.
- 160-** réf 157 : L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud ; Tetrahedron Letters, **2000**, 41, 4085-4088.
- 161-** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouiouèche ; C. R. Chimie, **2011**, 14, 978-986.
- 162-** (a) G. Szatzker, L. Moczar, P. Kolonists, L. Novak, P. Huszthy, L. Poppe; Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 2483-2490. (b) N. Shimizu, H. Akita, T. Kawamata; Tetrahedron: Asymmetry, **2002**, 13, 2123-2131. (c) F. Bellezza, A. Cipiciani, G. Riccib, R. Ruzziconib; Tetrahedron, **2005**, 61, 8005-8012.
- 163-** (a) L-L. Shen, J-H. Jeong; Tetrahedron: Asymmetry, **2008**, 19, 1647-1653. (b) C. Petucci, L. Di, O. Mcconnell; Chirality, **2007**, 19, 701-705. (c) A. Kirschner, P. Lenger, U-T. Bornschuer ; Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 2871-2874.
- 164-** (a) A. Ghanem; Tetrahedron, **2007**, 63, 1721-2754. (b) R-J. Kazlauskas, H-K. Weber; Curr. Opin. Chem. Biol, **1998**, 2, 121-126. (c) G. Carrea, S. Riva; Angrew. Chem. Int. Ed, **2000**, 39, 2226-2254. (d) L-E. Janes, R-J. Kazlauskas, Tetrahedron: Asymmetry, **1997**, 8, 3719-3733.
- 165-** L. Shen, F. Wang, H.S. Mun, M. Suh, J. H. Jeong; Tetrahedron: Asymmetry, **2008**, 19, 1647-1653.
- 166-** B. Wang, L. Jiang, J. Wang, J. Ma, M. Liu, H. Yu; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 980-985.
- 167-** E.Forró, L. Schönstein, F. Fülöp ; Tetrahedron : Asymmetry, **2011**, 22, 1255-1260.
- 168-** réf 98: M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouiouèche, O. Riant ; Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 1790-1796.

- 169-**(a) A. Bierstedt, J. Stölting, R. Fröhlich, P. Metz; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 3399-3407. (b) S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142.
- 170-** L-L. J. Rakels, J-J. A. Straathof, J-J. Heijneii; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 93-100.
- 171-** (a) S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142. (b) Y. Igarashi, S. Otsutomo, M. Harada, S. Nakano; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 2833-2837. (c) J. Doussot, A. Guy, R. Garreau, A. Falguières, C. Ferroud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 2259-2262. (d) S. Joly, M-S. Nair; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 2283-2287. (e) R. Chênevert, S. Gravit, J. Bolte; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 2081-2086.
- 172-** (a) O. Goj, A. Burchardt, G. Haufe; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 399-408. (b) M. Goto, M. Kawasaki, T. Kometani; *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, **2000**, 9, 245-250. (c) O. C. A. Machado, A. A. T. da Silvia, C. P. Borges, A. B. C. Simas, D. M. G. Freire; *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, **2011**, 69, 42-46.
- 173-** (a) N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J_C. Fiaud ; *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 627-630. (b) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J_C. Fiaud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800. (c) M. Merabet, N. Melaïs, M. Boukachabia, J-C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouche ; *J. Soc. Alg. Chim*, **2007**, 17, 185-194. (d) M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche ; *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986.
- 174-** réf 167 : E.Forro, L. Schönstein, F. Fülöp ; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2011**, 22, 1255-1260.
- 175-** T. Okamoto, S. Ueji; *Biotechnol. Lett*, **2000**, 22, 1169-1171.
- 176-** S. Sligin, S. Takaç, *Chem. Eng. Technol*, **2007**, 30, 1739-1743.
- 177-** K. Naemura, M. Murata, R. Tanaka, M. Yano, K. Hirose, Y. Tobe; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 1581-1584.
- 178-** S. Oda, H. Wakui, S. Ohashi ; *J. Biosci. Bioeng*, **2011**, 112, 151-153.
- 179-** (a) S. Takano, M. Suzuki, K. Ogasawara; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1043-1046. (b) E. Vanttinen, L-T. Kanerva; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786. (c) L-H. Liu, T. Anthonsen, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27. (d) A. Wallner, H. Mang, S-M. Glieck, A. Steinreiber, S-F. Mayer, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432. (e) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.
- 180-** F. Felluga, C. Forzato, F. Ghelfi, P. Nitti, G. Pitacco, U. M. Pagnoni, F. Roncaglia, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 527-536.

- 181-** K. Matsumoto, K. Usuda, H. Okabe, M. Hashimoto, Y. Shimada, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 108-115.
- 182-** réf 18 : N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J-C. Fiaud ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.
- 183-** réf 128: T. H. Krane Thvedt, E. Fuglseth, E. Sundby, B. H. Hoff, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6733-6743.
- 184-** Réf 18: N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.
- 185-** P. Karlson, M. Lüscher; Pheromones: A new term for a class of biologically active substance. *Nature*, **1959**, 183, 55-56.
- 186-** (a) Behavior-modifying chemicals for insect management, **1990**; (b) J.P. Shea; *ACS Symp, Ser.*, **1995**, 595, 22-25.
- 187-** (a) K. Mori; *Molecules*, **2005**, 10, 1023-1047, (b) K. Mori; *Chirality*, **1998**, 10, 578-586.
- 188-** J. Vite, G. Pitman, A. Fentiman, G. Kinzer. *Naturwissenschaften*, **1972**, 59, 469.
- 189-** K. Mori, B.G. Hazra, R.J. Pfeiffer, A.K. Gupta, B.S. Lindgren; *Tetrahedron*, . **1987**, 43, 2249-2254.
- 190-** G. Carrea, B. Danieli, G. Palmisano, S. Riva, M. Santagostino; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, .3, 775-784.
- 191-** M. Kitamura, I. Kasahara, K. Manabe, R. Noyori, H. Takaya; *J. Org. Chem*, **1988**, 53, 708
- 192-** S.M. Brown, S.G. Davies, A.A. José de Sousa ; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 511-514.
- 193-** (a) Réf 189: K. Mori, B.G. Hazra, R.J. Pfeiffer, A.K. Gupta, B.S. Lindgren; *Tetrahedron*, . **1987**, 43, 2249-2254. (b) K. Mori, J.I.J. Ogoche, A. Liebigs; *Chem.*, **1988**, 903.
- 194-** B.D. Johnston, B. Morgan, A.C. Oehlchlager, S. Ramaswmy; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 377-380.
- 195-** C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, G. Carrea; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 3023-3030.
- 196-** R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia; *J. Org. Chem*, **1991**, 56, 2656-2665.
- 197-** Y.F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter, C.H. Wong; *J. Am. Chem. Soc*, **1988**, 110, 7200-7205.
- 198-** H. Hagiwara, T. Nakano, H. Uda; *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1993**, 66, 3110-3112.

- 199-** D. Rotticci, T. Norin. K. Hult; Org. Lett , **2000**, 2, 1373-1376.
- 200-** R. T. Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J. C. Laigle, F. Lombard, and S. Wilmouth. Organic Process Research & Development, **2004**, 8, 283-286.
- 201-** J.C. Fiaud, L. Aribi-Zouioueche; J. Chem. Soc., Chem. Commun, **1986**, 390. Stereoelectronic control in transition-metal catalysed substitution and rearrangement of allylic esters and alcohols.
- 202-** réf 62: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J.C. Fiaud; Tetrahedron Letters 45 ,**2004**, 627-630.
- 203-** V. Lafaquière, Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases, **2010**
- 204-** L.F. Garcia-Alles, V. Gotor; Biotech. Bioeng. **1998**, 59, 163
- 205-** V. Gotor, F.L. Limeres, M.J. Garcia, M. Bayod, R. Brieva; Tetrahedron: Asymmetry, **1997**, 8, 995
- 206-** (a) C. Orrenius, N. Öhrner, D. Rottici, A. Matton, K. Hult, T. Norin; Tetrahedron: Asymmetry, **1995**, 6, 1217; (b) B.A. Hoff, V. Waagen, T. Anthonsen; Tetrahedron: Asymmetry, **1996**, 7, 3181; (c) D. Rottici, C. Orrenius, K. Hult, T. Norin; Tetrahedron: Asymmetry, **1997**, 8, 359
- 207-** (a) réf: 205; (b) C.R. Johnson, Y. WU, K.C. Nicolaou, Z. Yang, R. Guy, J.G. Dong, N.T. Berova, Tetrahedron Lett, **1995**, 36, 3291; (c) M. Ferrero, S. Fernandez, V. Gotor; J.Org. Chem, **1997**, 62, 4358
- 208-** (a) M. Gelo-Pujic, E. Guibé-Jampel, A. Loupy, S. Galema, D. Mathé; J.Chem. Soc., Perkin Trans.1.**1996**, 2, 777; (b) B. Danielli, M. Luisetti, G. Sampognaro, G. Carrea, S. Riva; J.Mol. Catal B: Enzym. **1997**, 3, 193
- 209-** A. Bertinotti, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva; Tetrahedron, **1994**, 50, 13165
- 210-** C.R. Johnson, S.J. Bis; Tetrahedron Lett, **1992**, 33, 7287
- 211-** H. Uyama, S. Suda, H. Kikuchi, S. Kobayachi; Chem. Lett. **1997**, 1109
- 212-** M.J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor; Tetrahedron: Asymmetry, **1993**, 4, 2199.
- 213-** J. Drouin, J. Costante, E. Guibé-Jampel; J.Chem. Educ. **1997**, 74, 992
- 214-** (a) C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih; J. Am. Chem. Soc., **1982**, 104, 7294-7299; (b) H.B. Kagan, J.C. Fiaud, J.-C. «Kinetic Resolution Topics in stereochemistry”. E.L. Eliel, S.H. Wilen, Ed.J. Wiley & Sons, Inc. New York, **1988**, 18, 249-330.
- 215-** Réf 161: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche ; C. R. Chimie, **2011**, 14, 978-986.

216- réf 190 : G. Carrea, B. Danieli, G. Palmisano, S. Riva, M. Santagostino; *Tetrahedron: Asymmetry*, 1992, .3, 775-784.

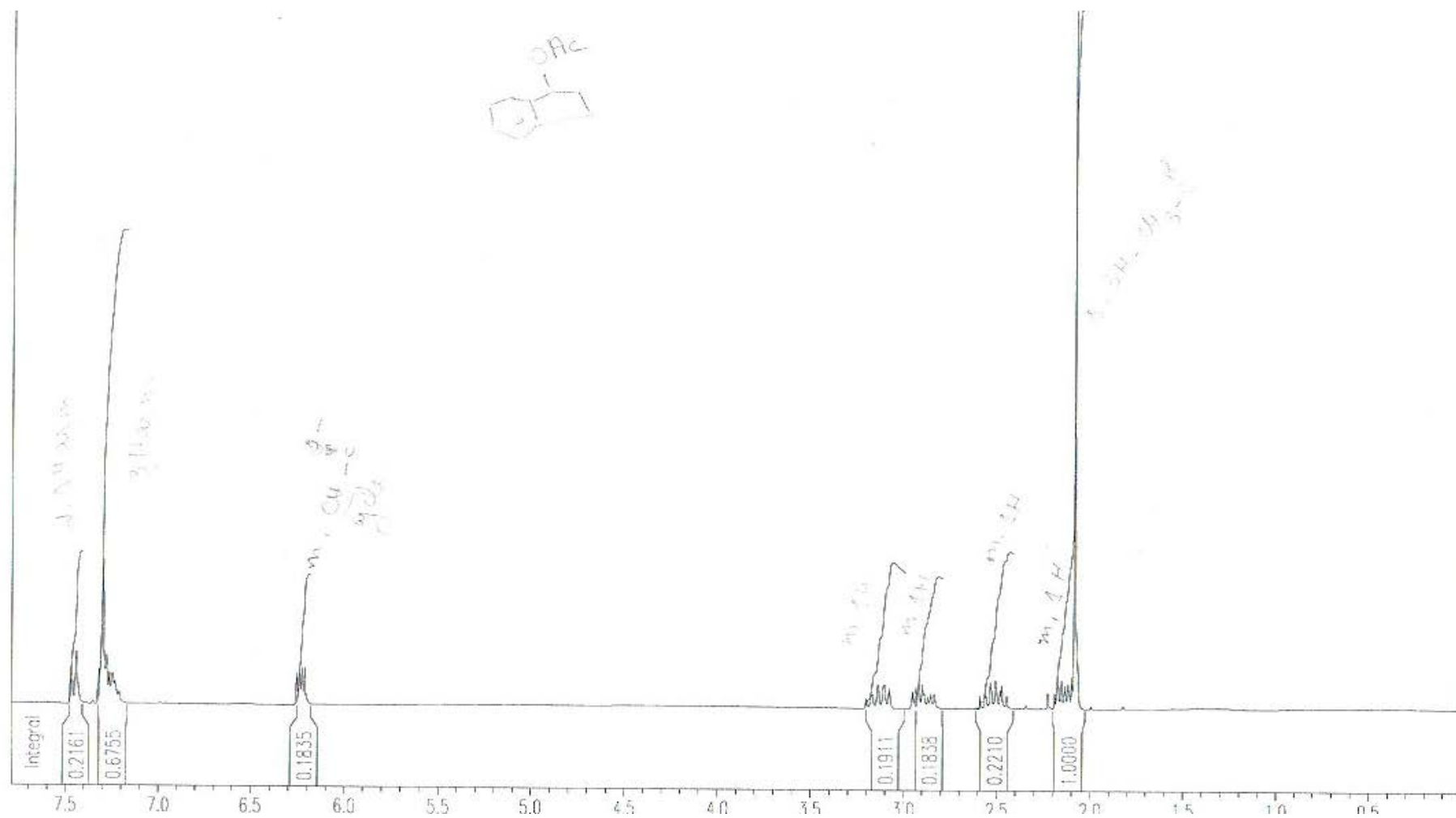
217- M. Merabet, N. Mélais, M. Boukachabia, J-C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouèche; *J. Soc. Alger. Chim*, **2007**, 17, 185-194.

218- M. Merabet-Khalassi, L.Aribi-Zouiouèche, O. Riant ; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2008**, 19, 2378-2384.

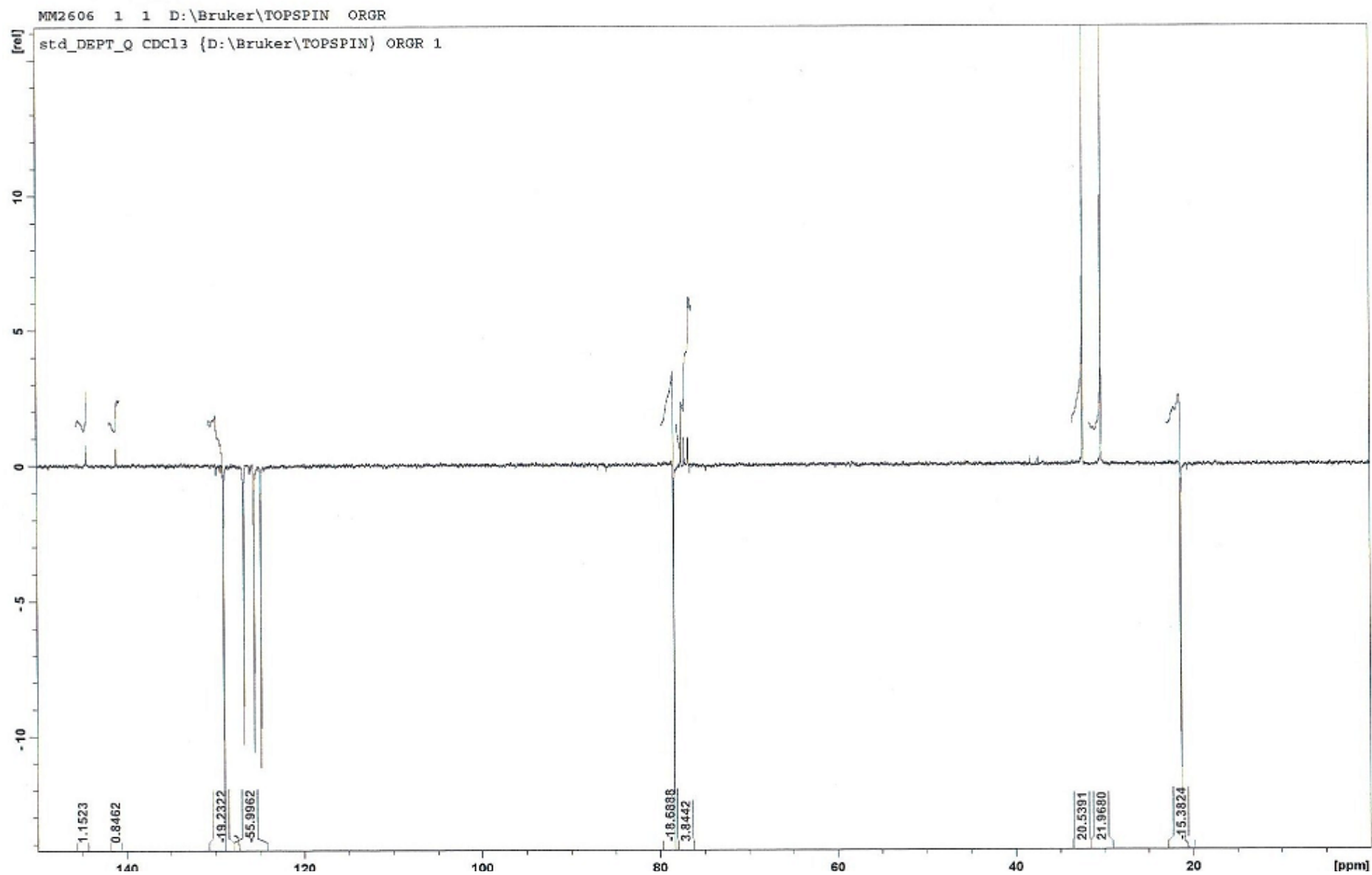
219- réf 217 : M. Merabet, N. Mélais, M. Boukachabia, J-C. Fiaud, L. Aribi-Zouiouèche; *J. Soc. Alger. Chim*, **2007**, 17, 185-194.

Annexe

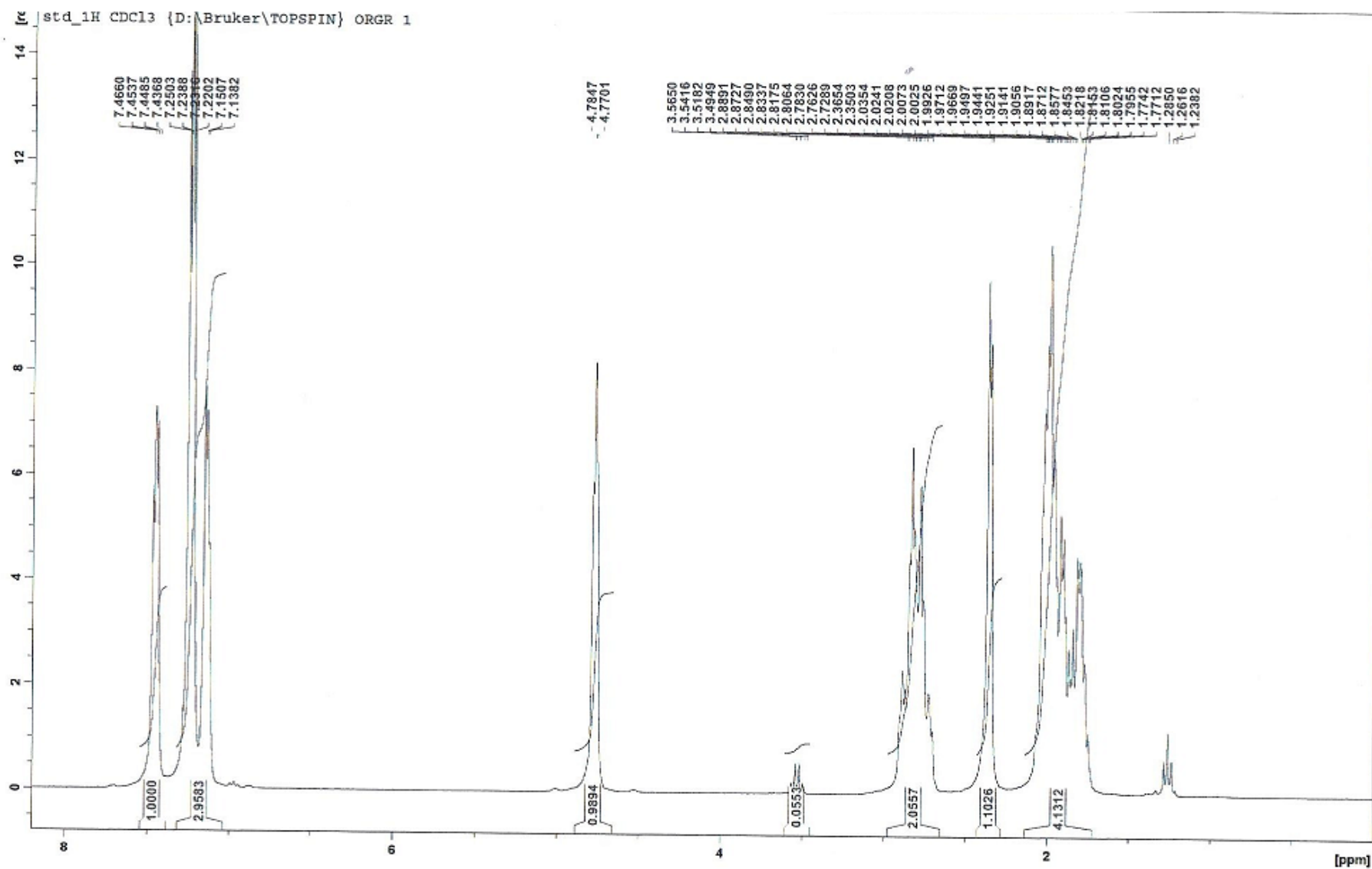
RMN H¹ : 1a



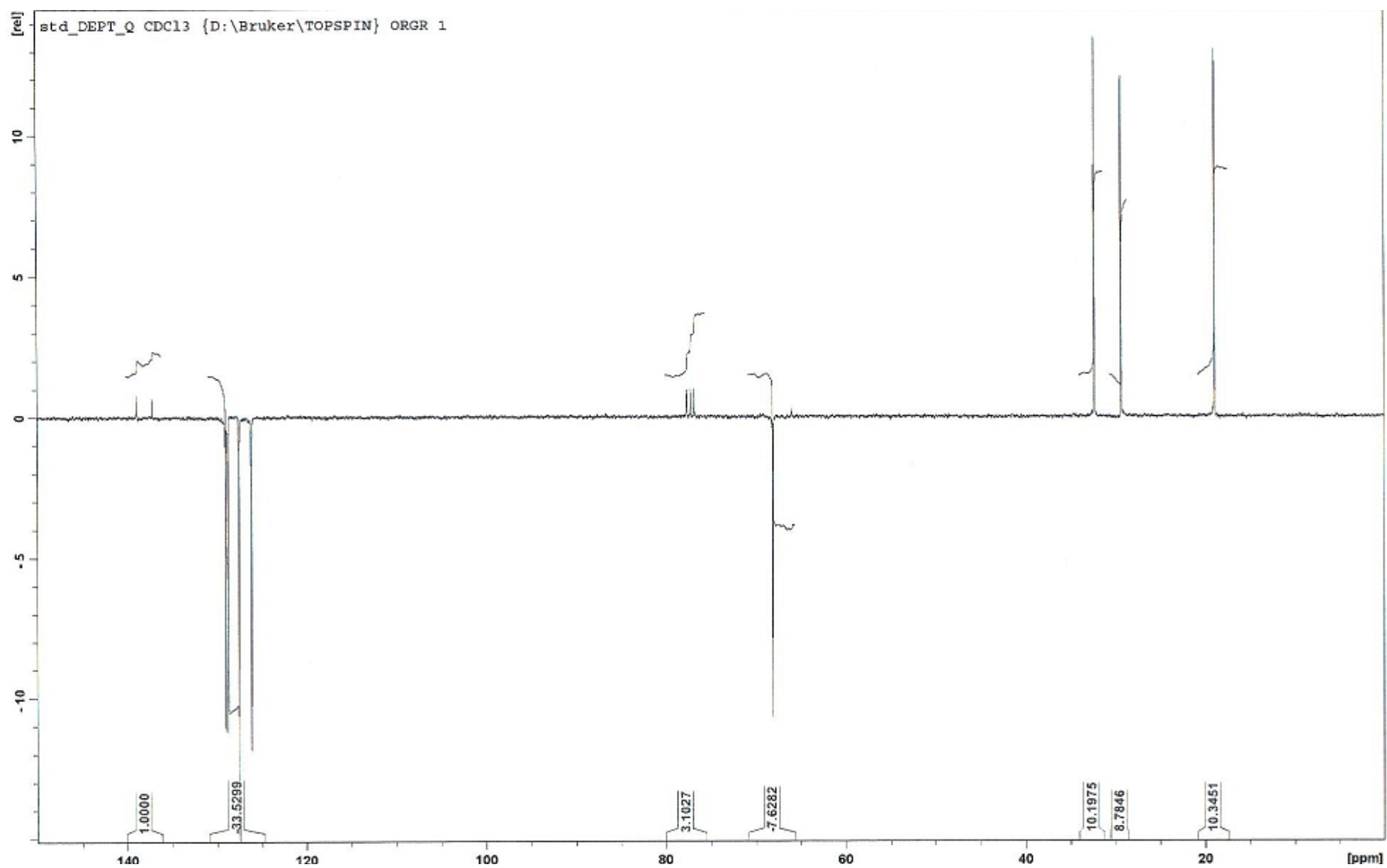
RMN C^{13} : **1a**



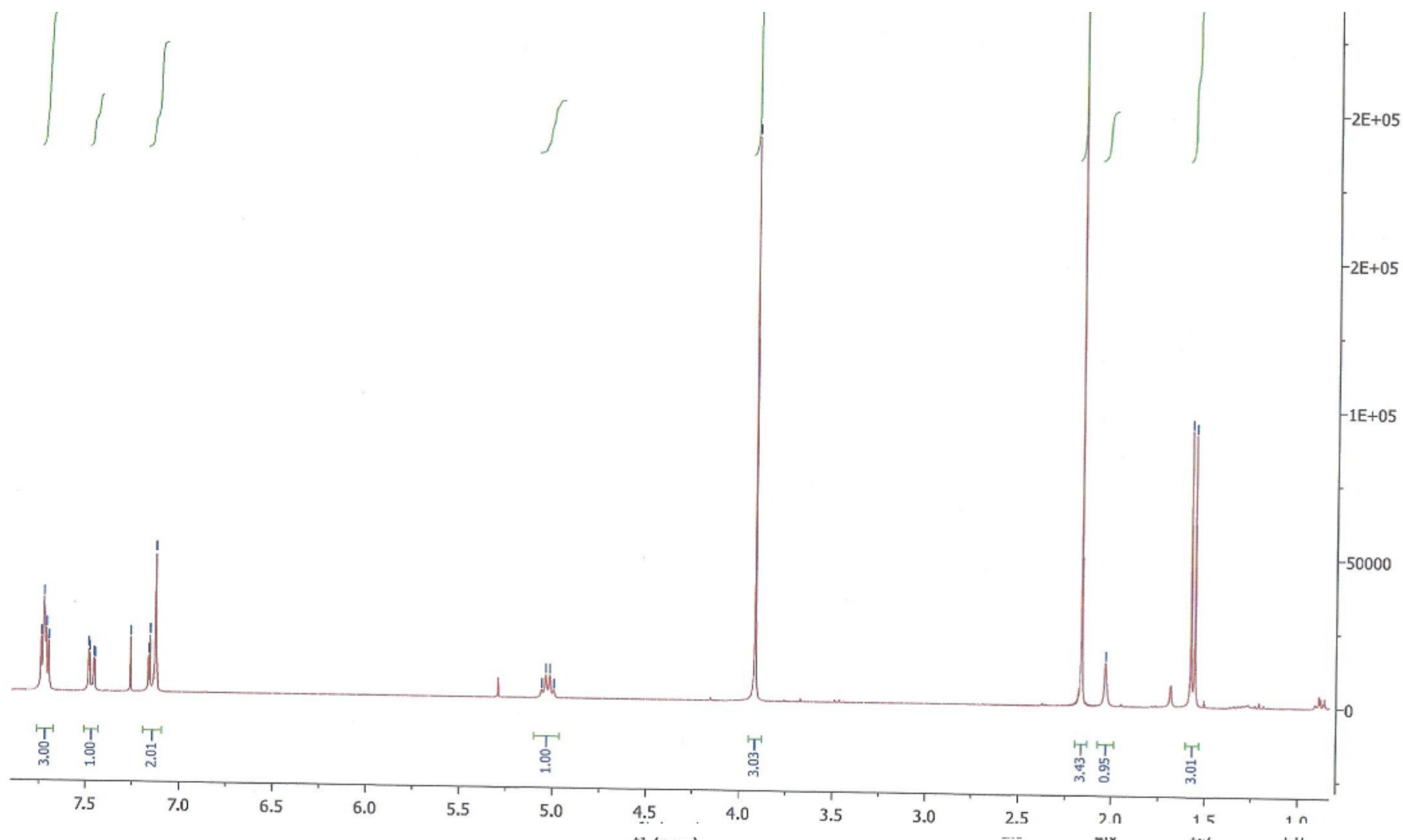
RMN H¹ : 2a



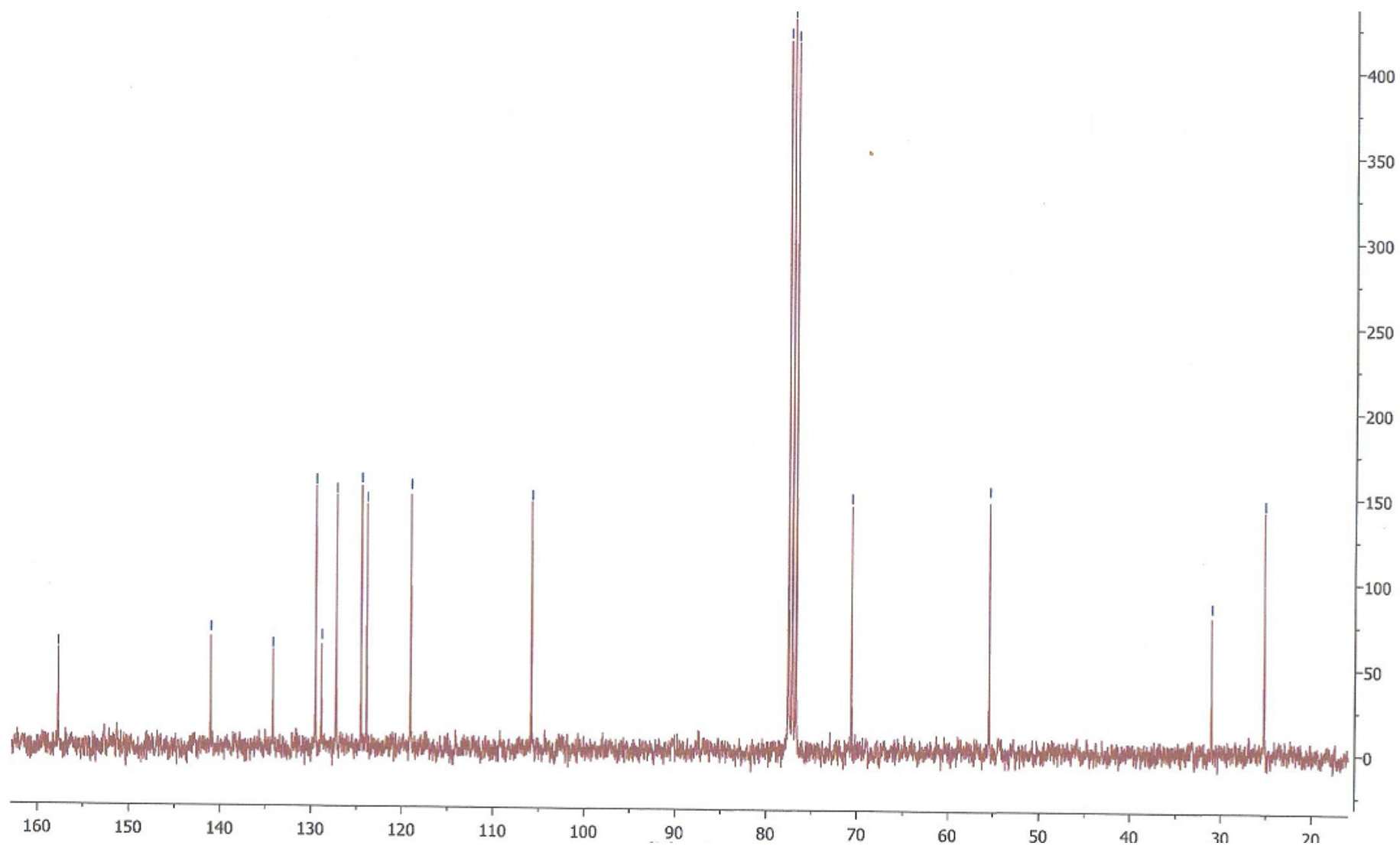
RMN C^{13} : **2a**



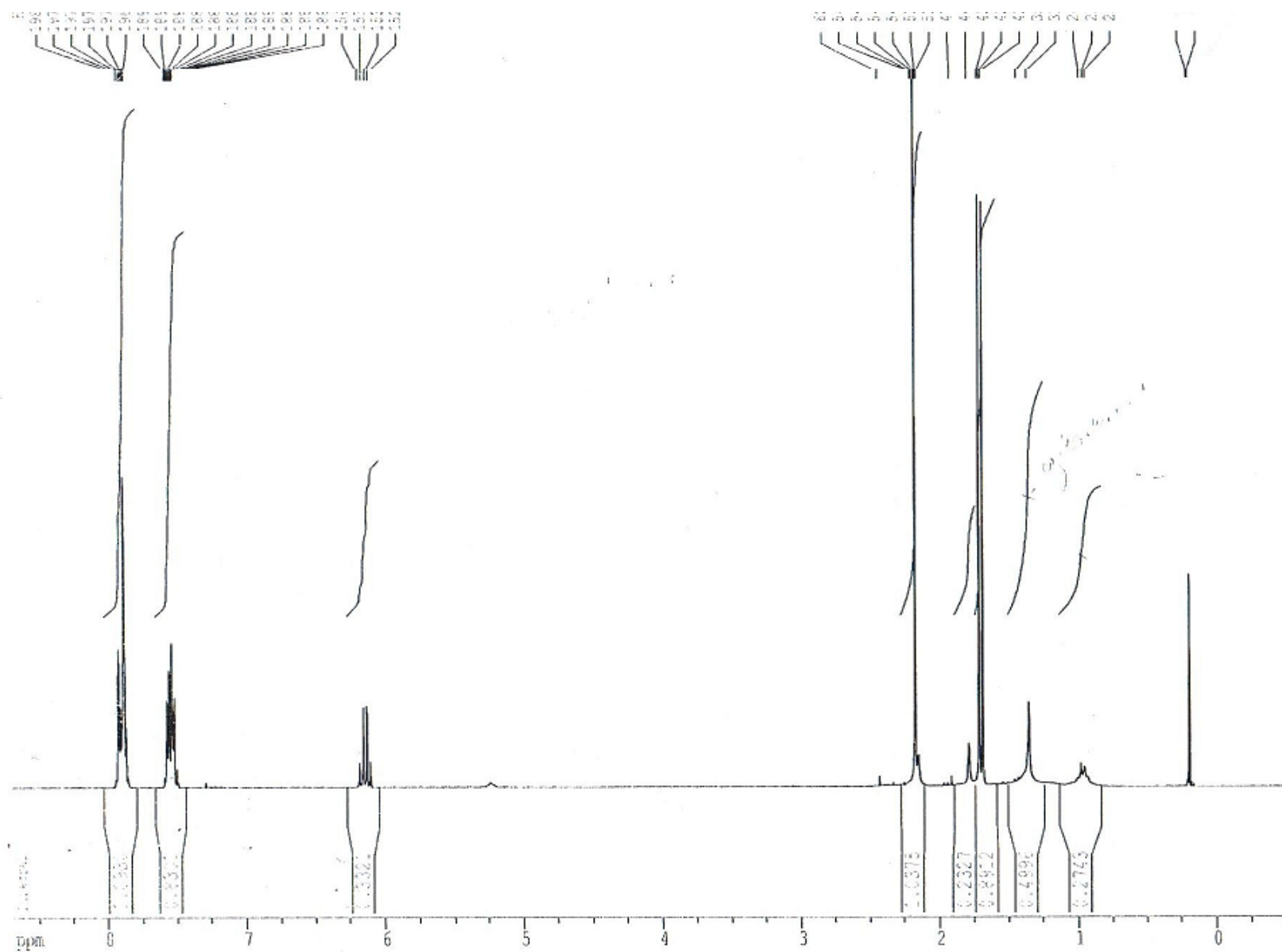
RMN H¹ : 3a



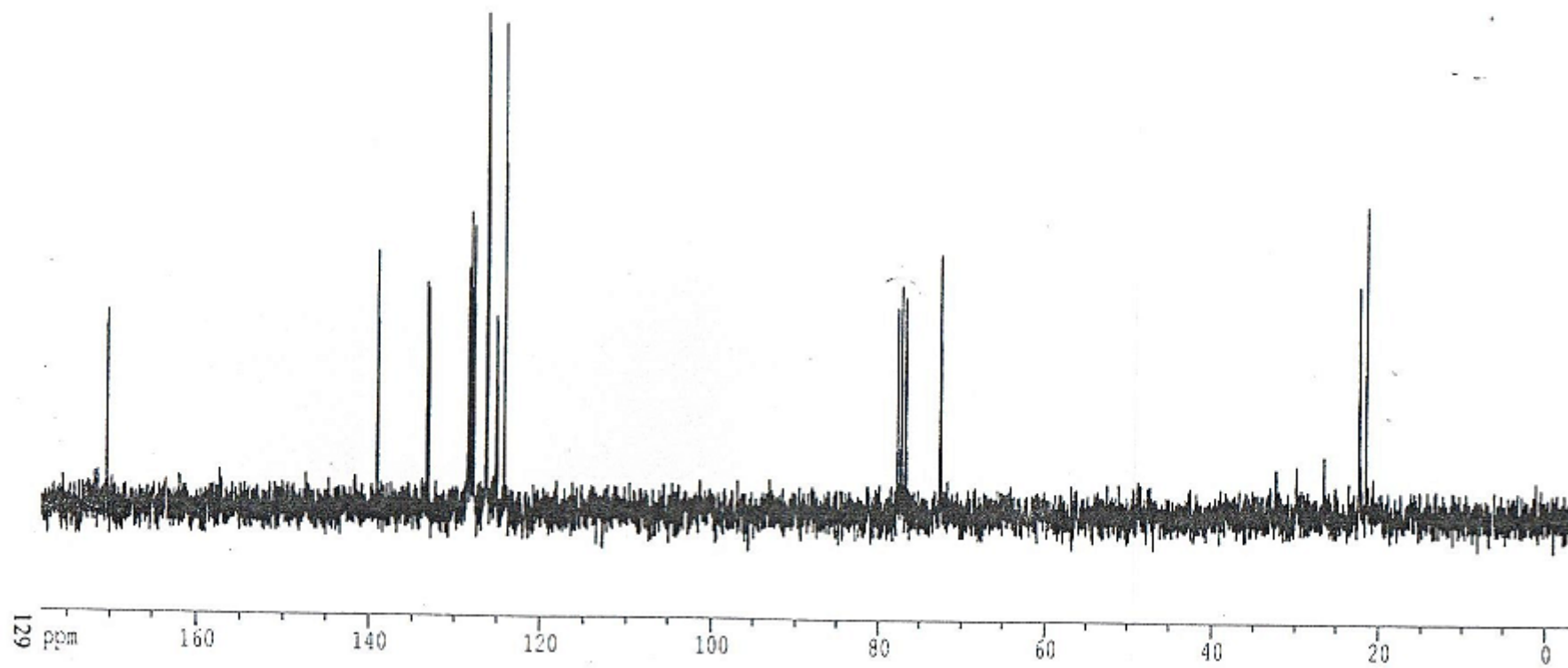
RMN C¹³ : 3a



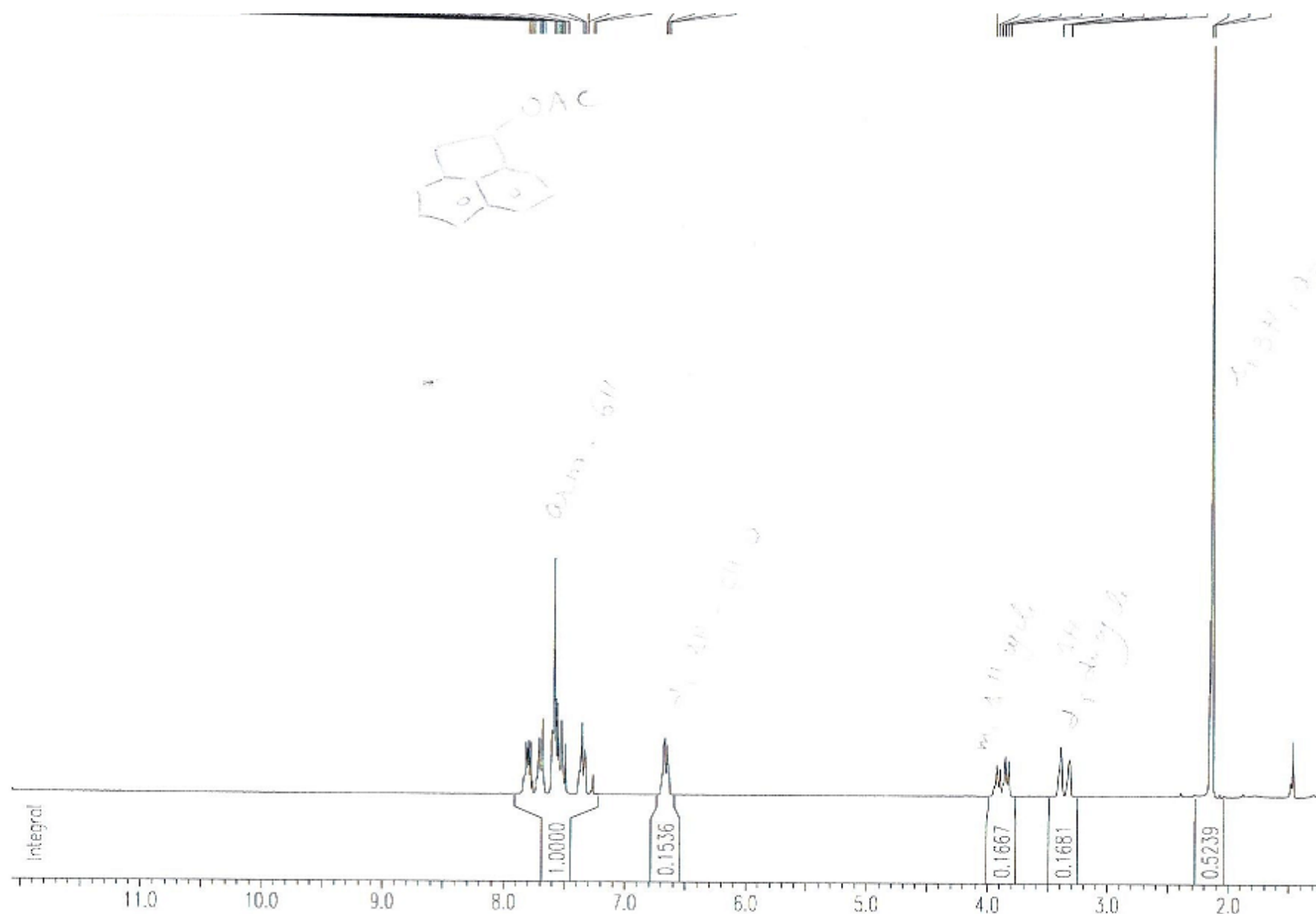
RMN H¹ : 4a



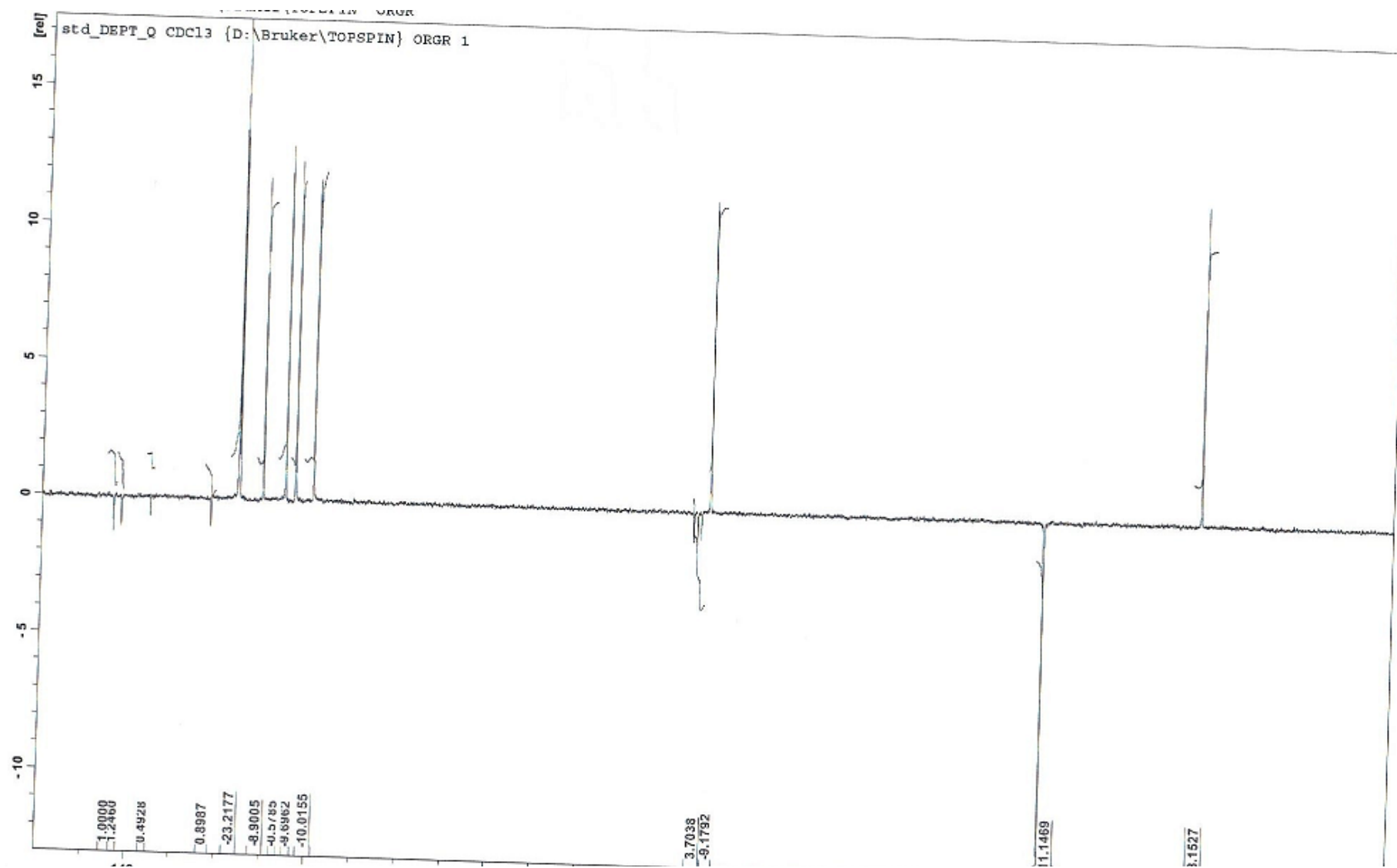
RMN C¹³ : 4a



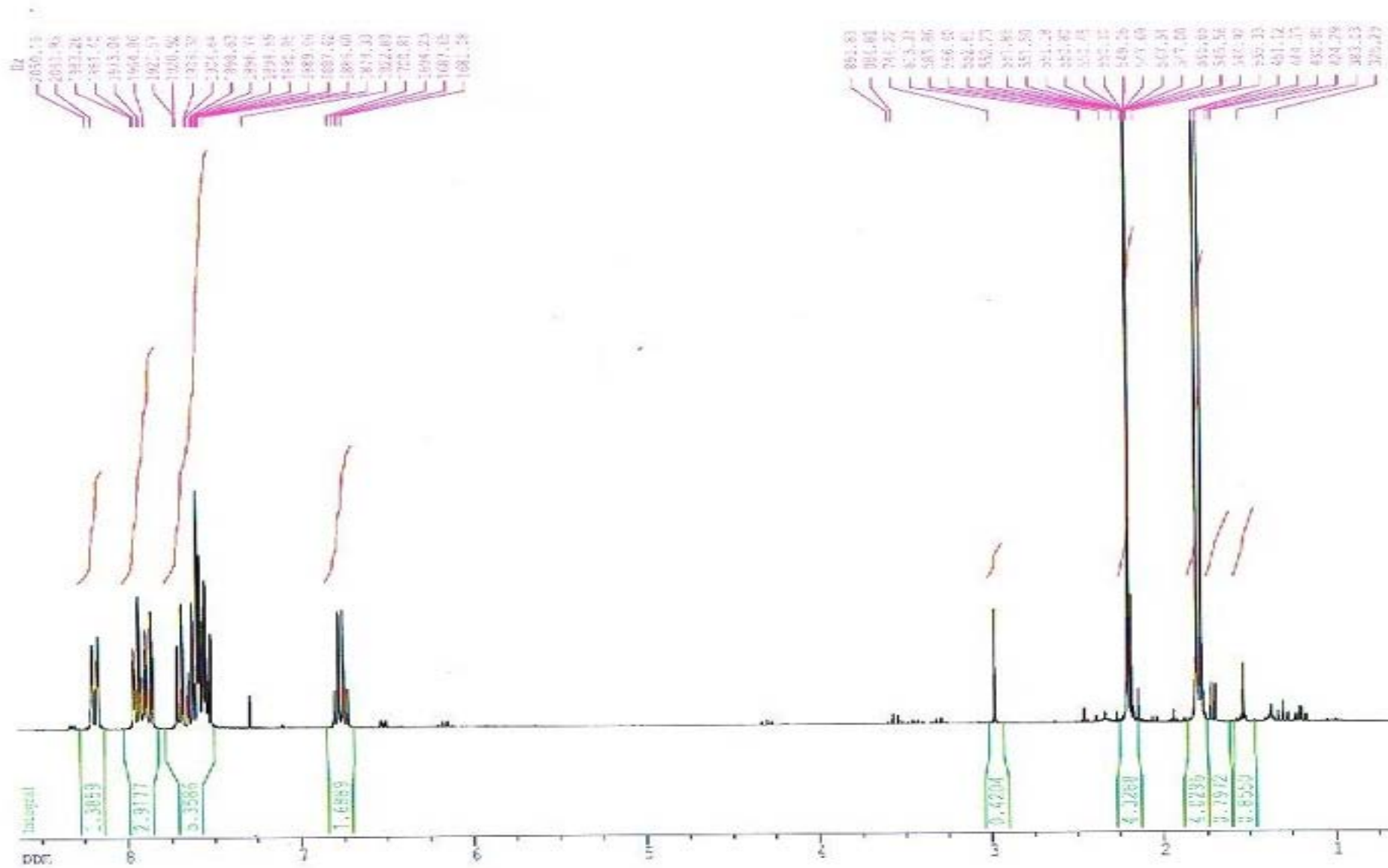
RMN H¹ : 5a



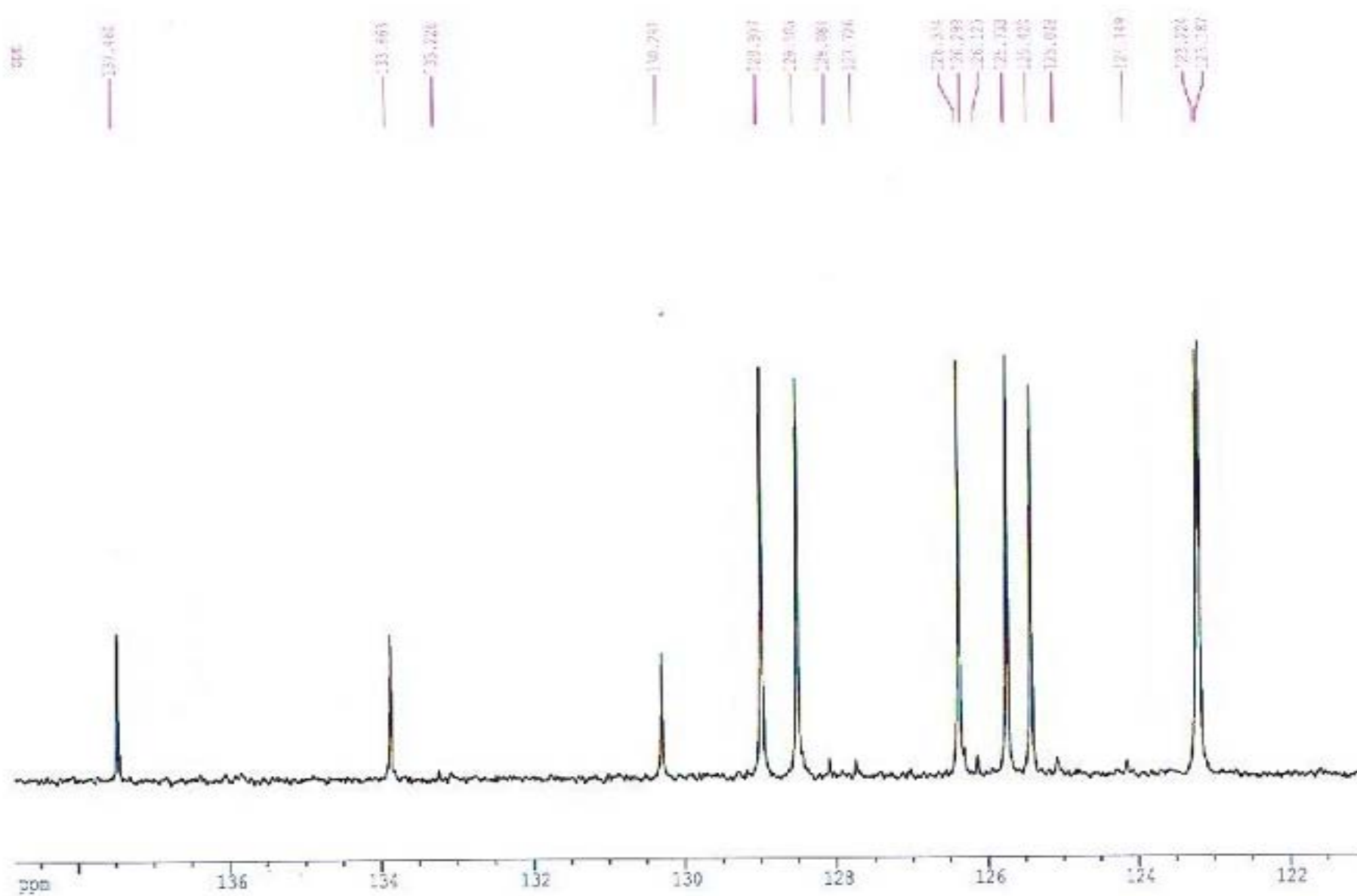
RMN C¹³ : 5a



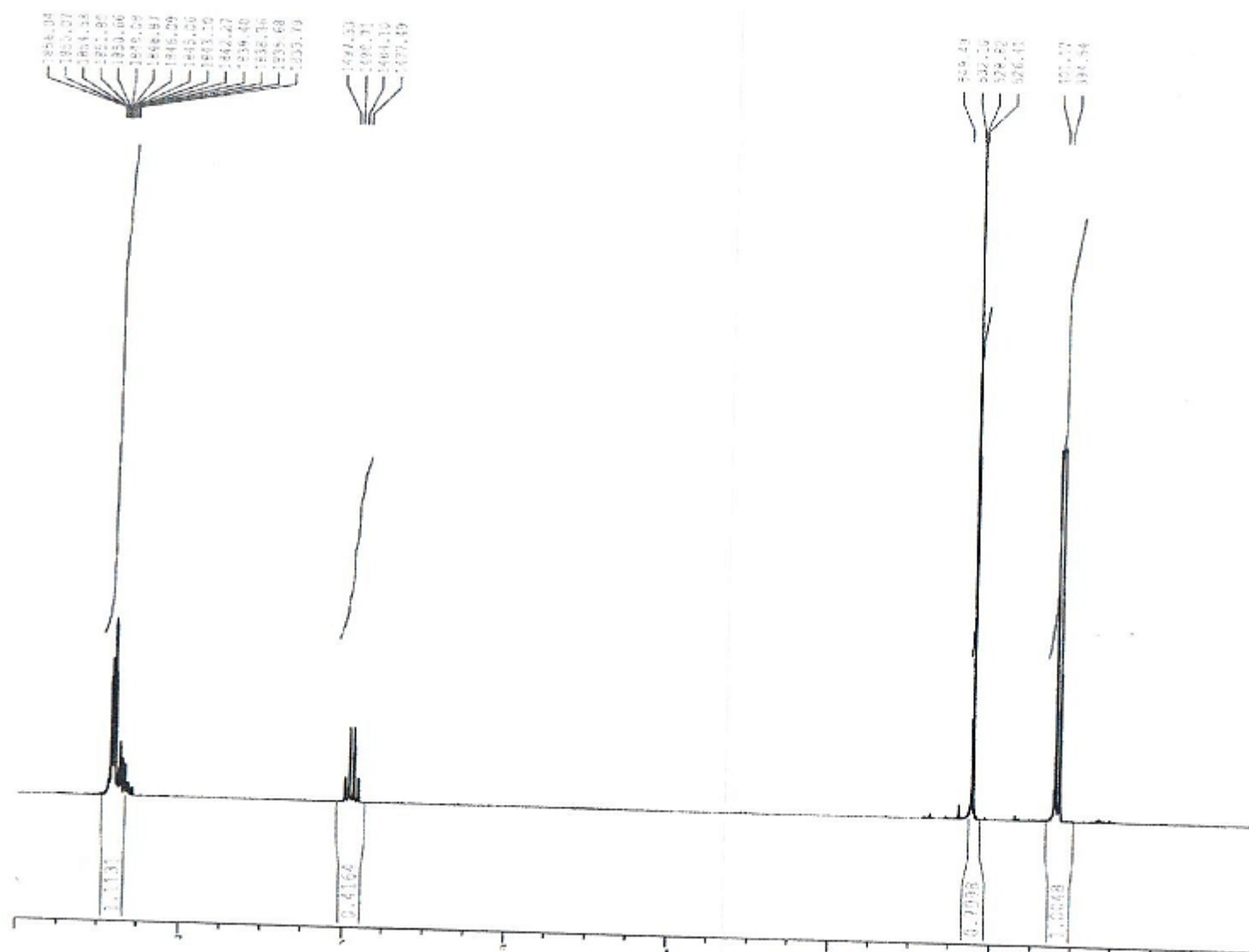
RMN H¹ : 6a



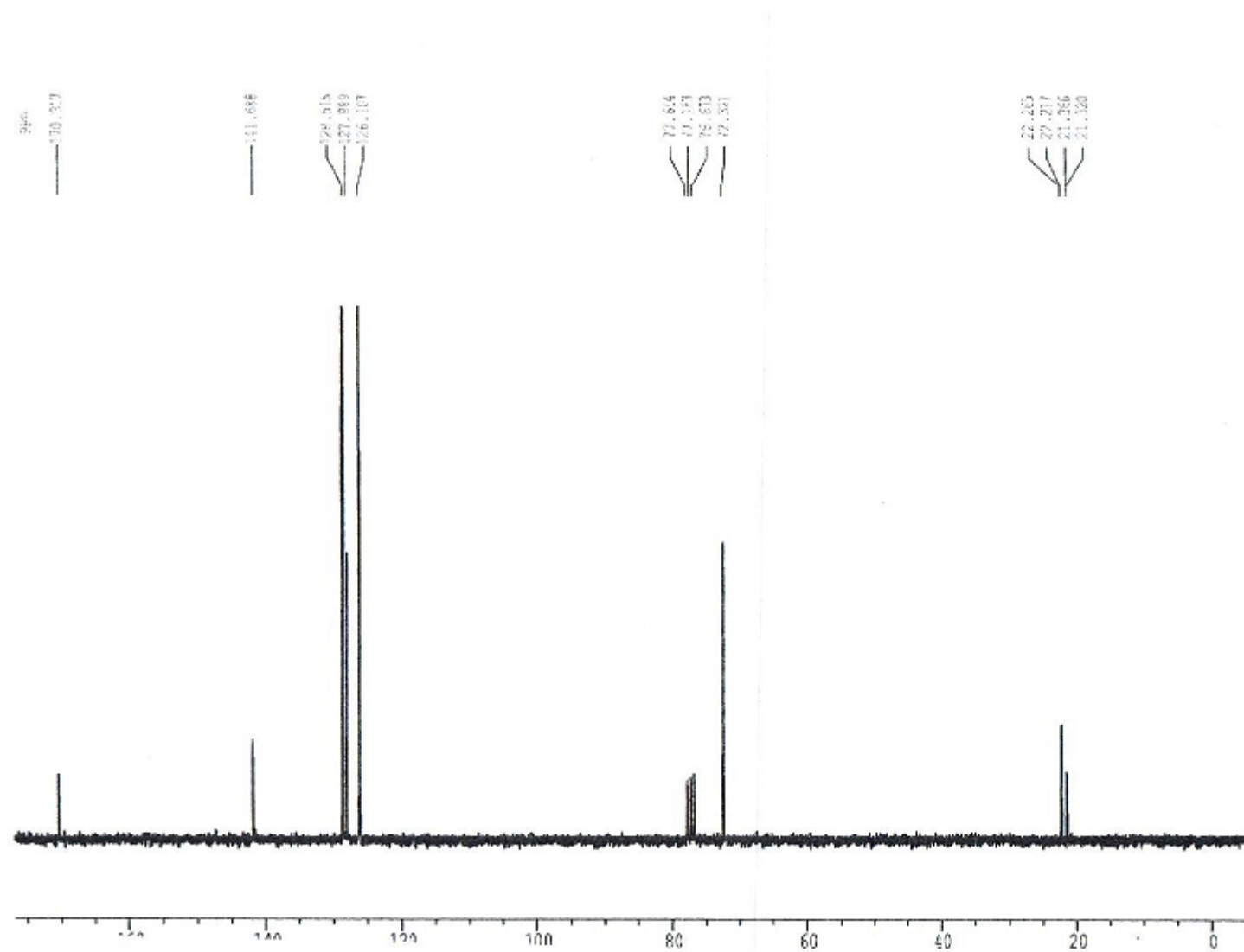
RMN C¹³ : 6a



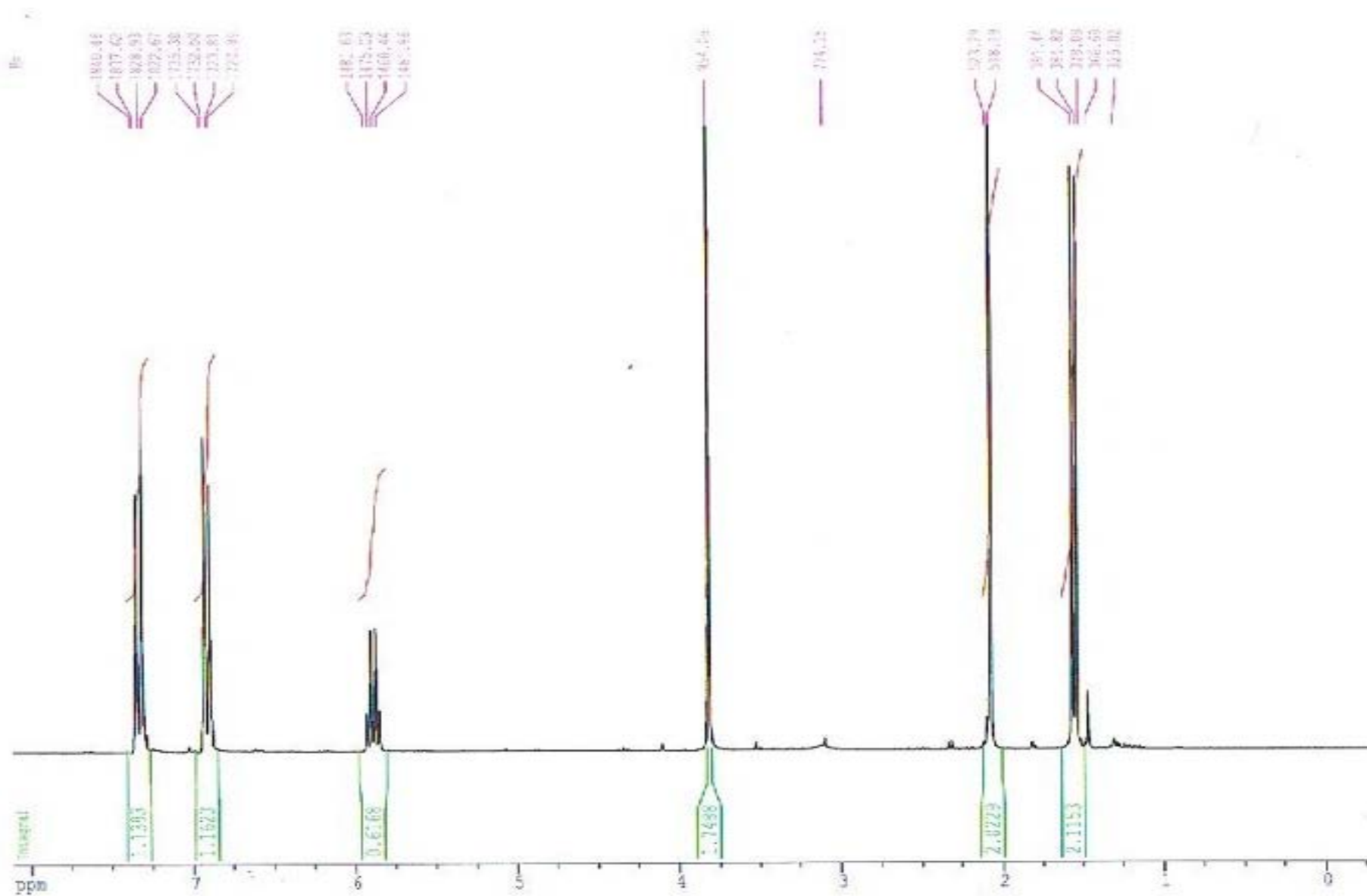
RMN H¹ : 7a



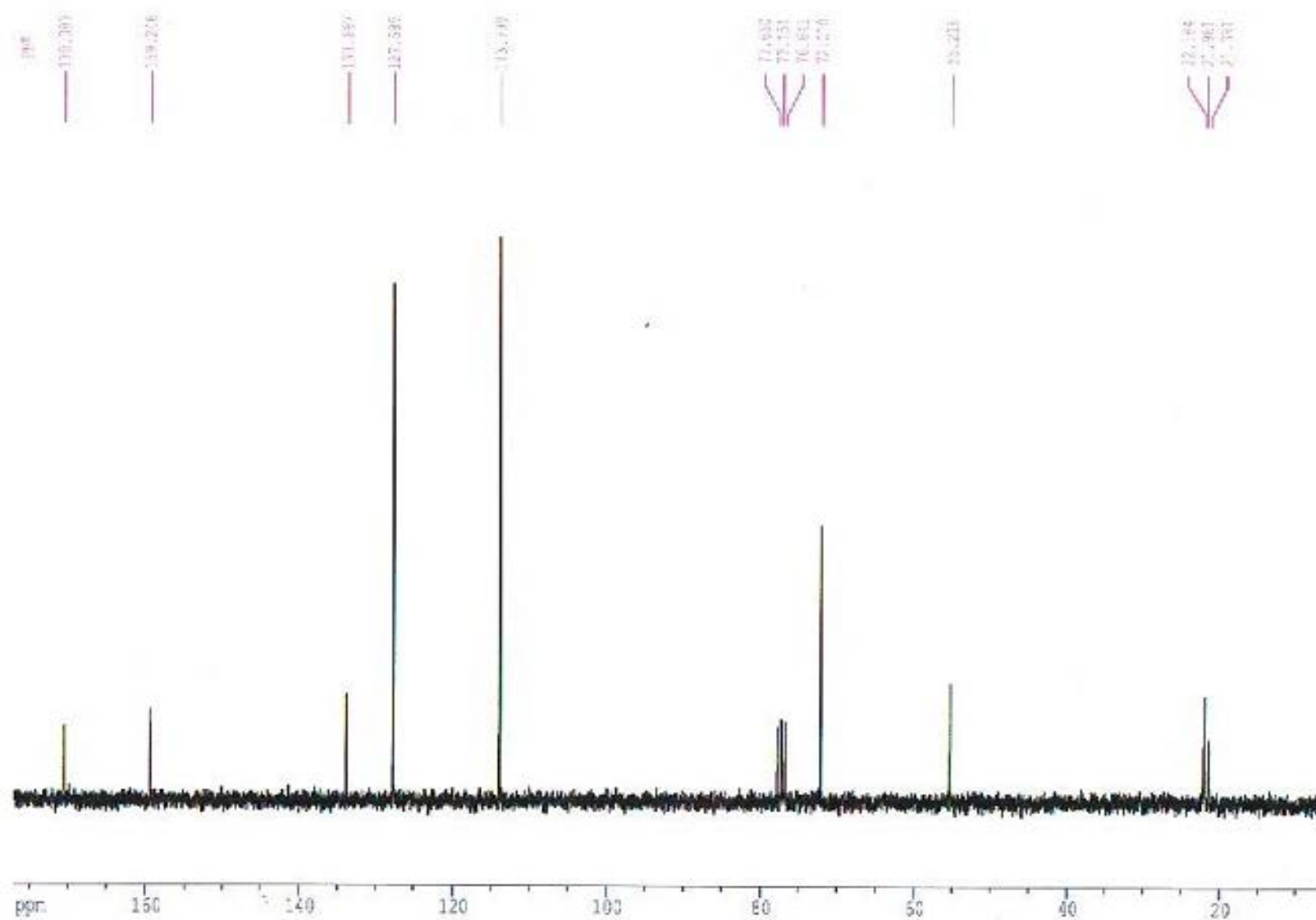
RMN C^{13} : 7a



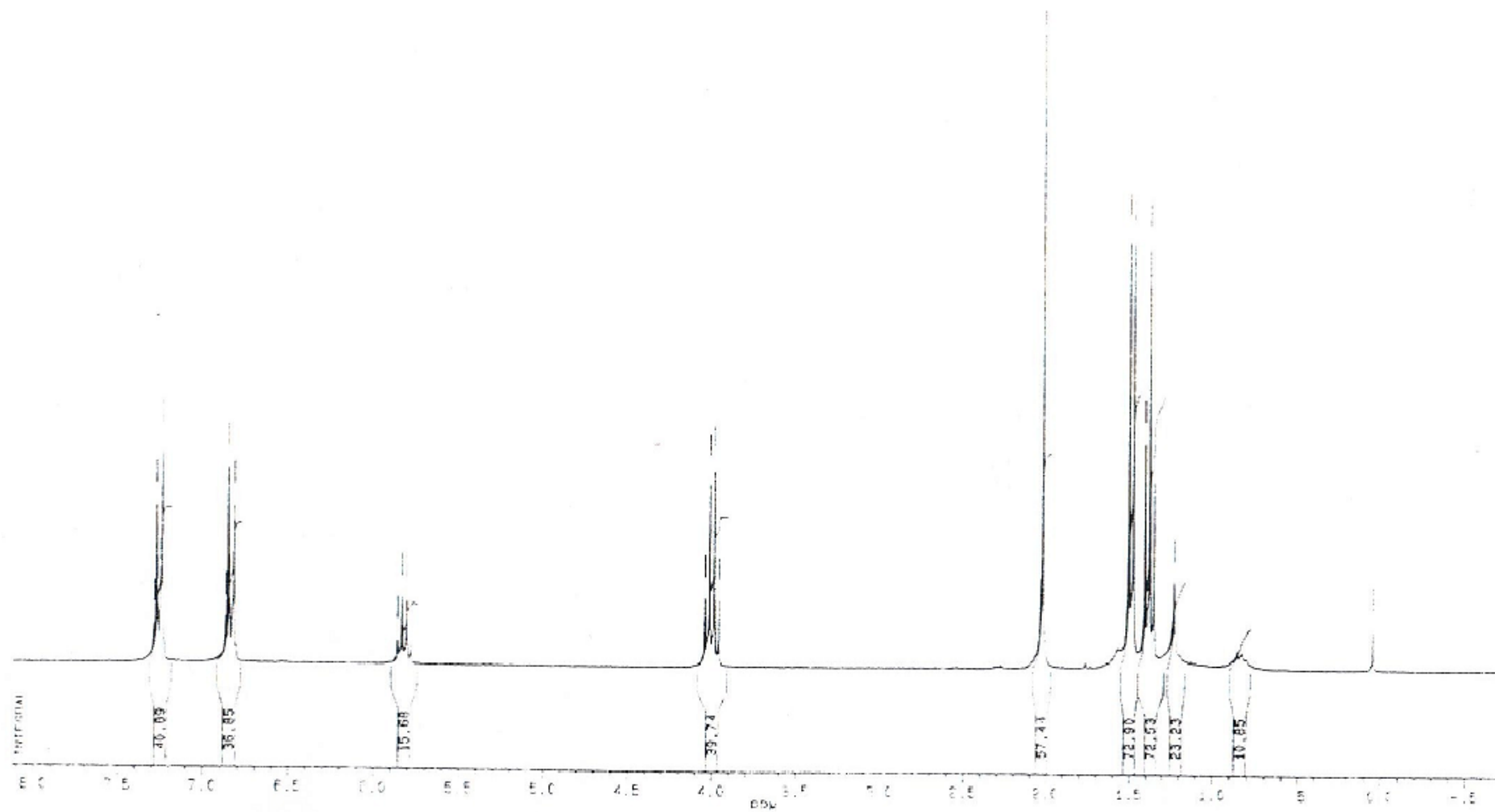
RMN H¹ : 8a



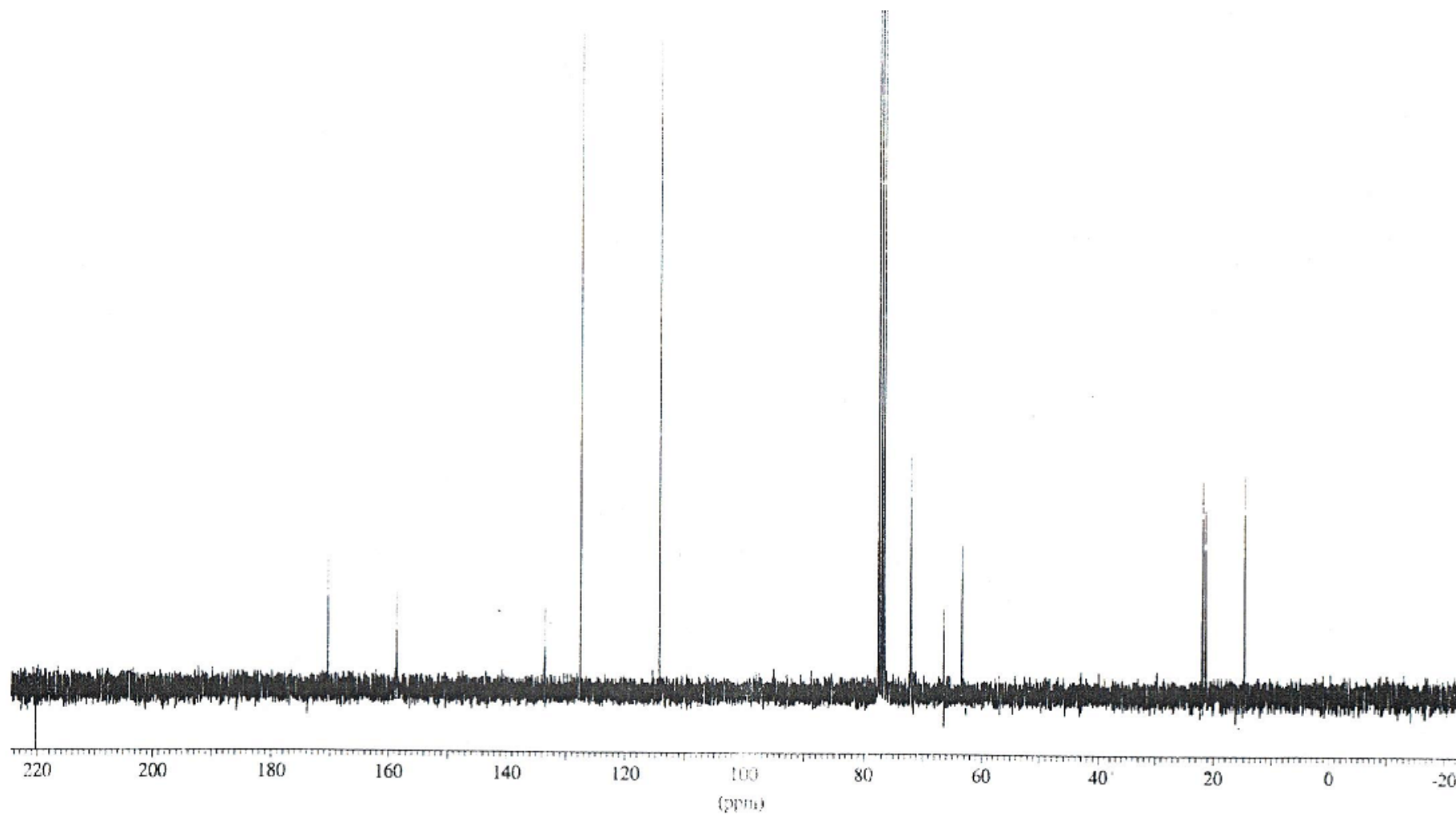
RMN C¹³ : 8a



RMN H¹ : 9a

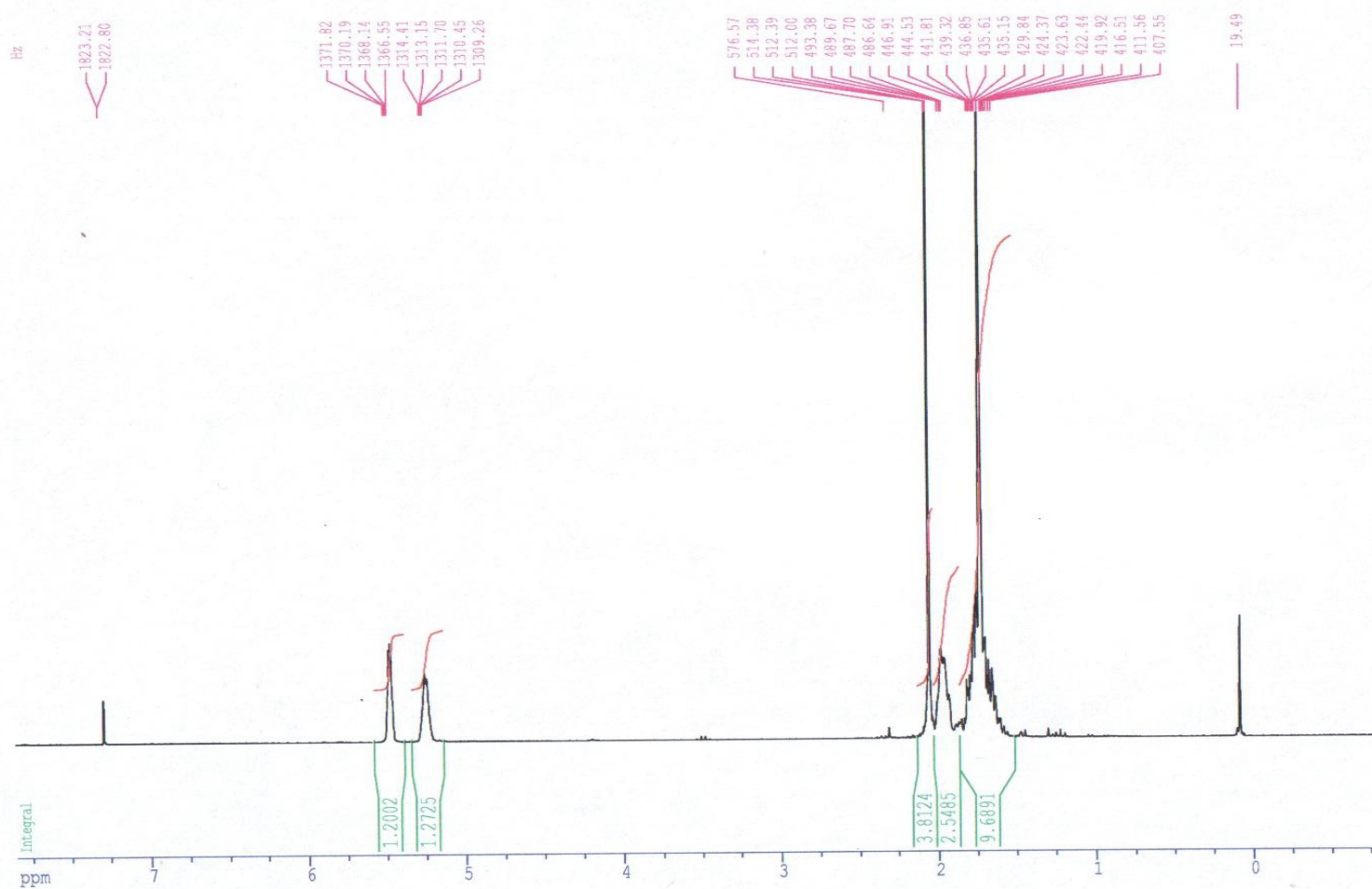


RMN C^{13} : 9a



RMN H¹ : 10a

Spectre proton :ECH: ANACYHZ9



Current Data Parameters

NAME	anacybz9
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	500000
Time	14.10
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm QNP 1H
PULPROG	zg30
TD	32768
SOLVENT	CDCL3
NS	32
DS	2
SWH	5520.287 Hz
FIDRES	0.168466 Hz
AQ	2.9680116 sec
RG	181
DW	90.575 usec
DE	129.39 usec
TE	300.0 K
D1	1.00000000 sec
P1	12.00 usec
DE	129.39 usec
SFO1	250.1322512 MHz
NUC1	1H
PL1	-6.00 dB

F2 - Processing parameters

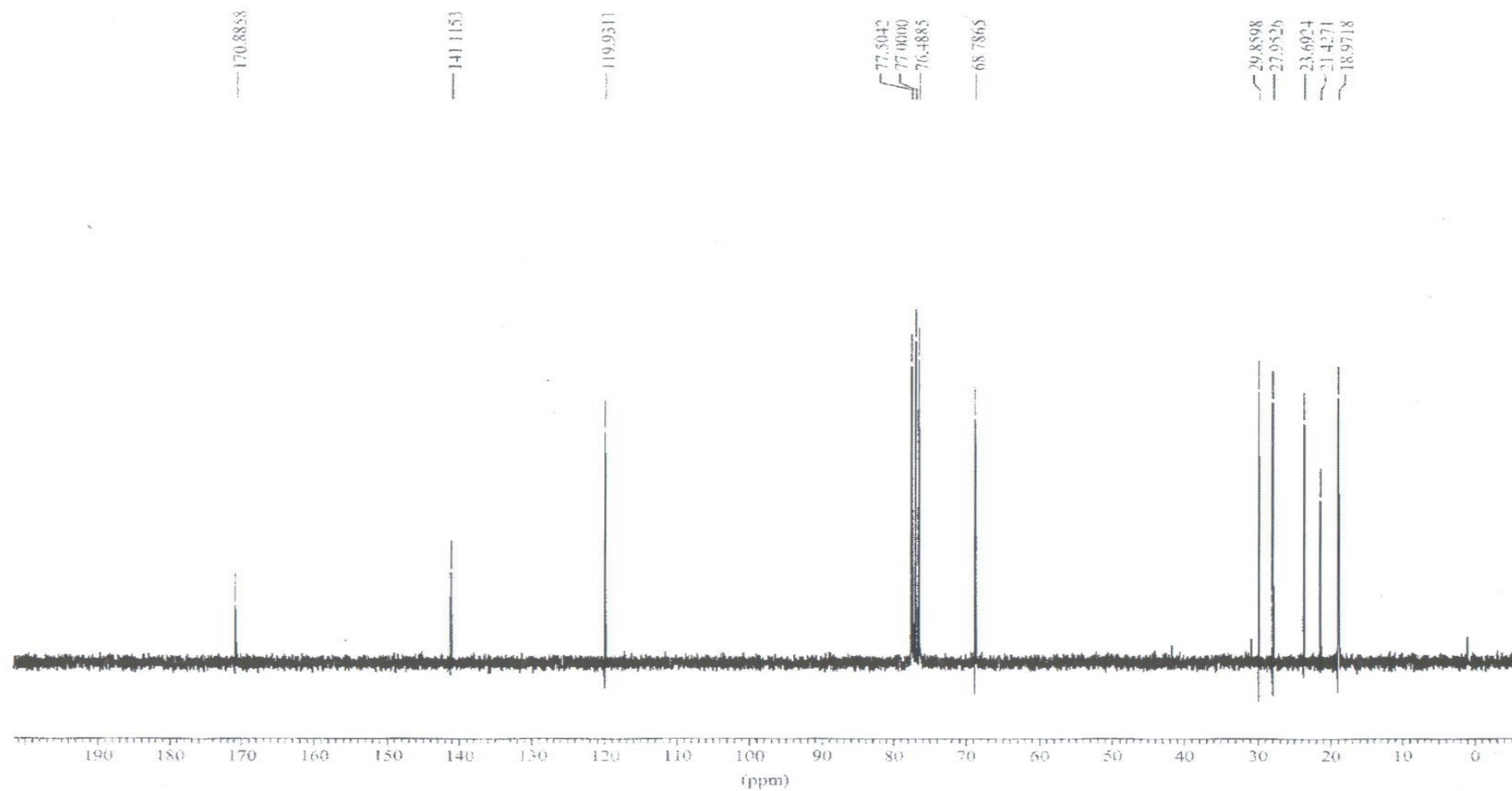
SI	32768
SF	250.1300000 MHz
WDW	no
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	2.00

1D NMR plot parameters

CX	23.00 cm
FLP	7.848 ppm
F1	1963.12 Hz
F2P	-0.810 ppm
F2	-202.70 Hz
PPMCM	0.37647 ppm/cm
HDCM	96.16607 Hz/cm

RMN C¹³ : 10a

HZ-1





A green route to enantioenriched (*S*)-arylalkyl carbinols by deracemization via combined lipase alkaline-hydrolysis/Mitsunobu esterification

Zahia Houiene^a, Mounia Merabet-Khelassi^a, Nassima Bouzemi^a, Olivier Riant^{b,*},
Louisa Aribi-Zouioueche^{a,*}

^a Ecocompatible Asymmetric Catalysis Laboratory (LCAE), Badji Mokhtar Annaba-University, B.P. 12, 23000 Annaba, Algeria

^b Institute of Condensed Matter and Nanosciences Molecules, Solids and Reactivity (IMCN/MOST), Université Catholique de Louvain, Bâtiment Lavoisier, Place Louis Pasteur, 1, bte 3, 1348 Louvain La Neuve, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 December 2012

Accepted 28 January 2013

ABSTRACT

Herein we report results of the chemoenzymatic deracemization of a range of secondary benzylic acetates **1a–9a** via a sequence of hydrolysis with CAL-B lipase in non-conventional media, combined with esterification of the recovered alcohol according to the Mitsunobu protocol following an enzymatic kinetic resolution (KR). The KR of racemic acetates **1a–9a** via an enzymatic hydrolysis, with CAL-B lipase and Na₂CO₃, in non-aqueous media was optimized and gave high selectivities ($E \gg 200$) at good conversions ($C > 49\%$) for all of the substrates studied. This method competes well with the traditional one performed in a phosphate buffer solution. The deracemization using Mitsunobu inversion gave the (*S*)-acetates in moderate to excellent enantiomeric excess $75\% < ee < 99\%$, in acceptable isolated yields $70\% < \text{yield} < 89\%$, and with some variations according to the acetate structure.

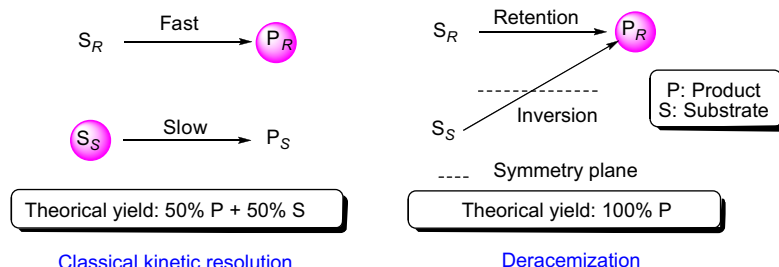
© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biocatalysts, such as lipases are powerful catalytic tools for modern synthetic chemistry and are recognized as important tools for the enantioselective synthesis of functionalized substrates via an enzymatic kinetic resolution¹ under mild and eco-friendly conditions.² Kinetic resolution is one of the most useful methodologies and can be carried out by transesterification in organic solvents³ or hydrolysis in water,⁴ albeit with the main inconvenience of a limitation in the theoretical yield of 50%.

Over the last decade, efficient methods for deracemization⁵ have been developed and have led to access to single enantiomers with high enantiomeric purity and good chemical yields. The unwanted enantiomer recovered after the classical enzymatic kinetic resolution can be recycled, via spontaneous racemization,⁶ direct stereoinversion⁷ or by an oxido-reduction driven racemization of the substrates.⁸

Among the deracemization methods, stereoinversion combined with enzymatic kinetic resolution (Scheme 1) is one of the most



Scheme 1. Principle of deracemization via stereoinversion.

* Corresponding authors. Fax: +32 (0)10474168 (O.R.); fax: +213 (0)38871712 (L.A.-Z.).

E-mail addresses: olivier.riant@uclouvain.be (O. Riant), louisa.zouioueche@univ-annaba.org (L. Aribi-Zouioueche).

important methods for the production of enantioenriched alcohols.⁷

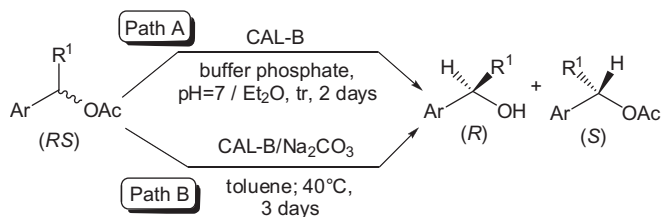
This method uses an in situ transformation of the remaining alcohol to the corresponding carboxylic ester with inversion of configuration at the stereogenic centre. One of the most powerful methods used so far is the Mitsunobu protocol⁹ since it uses an activation of the alcohol and S_N2 mechanism with a carboxylate to yield the desired ester with clean stereoinversion.

Hydrolysis via an enzymatic kinetic resolution is modestly employed¹⁰ due to the difficulty of solubility of organic substrates in aqueous media, which results in moderate yields and selectivities.¹¹ Recently we have reported a novel approach for the enzymatic hydrolysis¹² of various ester derivatives triggered by simple carbonate salts that allowed the use of non-aqueous media under mild conditions. This methodology of alkali-mediated enzymatic hydrolysis can be easily incorporated into a deracemization process via stereoinversion with the Mitsunobu esterification. In a previous investigation,^{7e} deracemization through sequential enzymatic acylation/Mitsunobu inversion gave access to the (*R*)-acetates of arylalkylcarbinols in good yields and with high enantiomeric excesses.

In continuation of our investigations, we herein report an enantiocomplementary pathway by integrating the alkali-mediated enzymatic hydrolysis in non-aqueous media coupled to the Mitsunobu esterification, to give access to the corresponding (*S*)-acetates of arylalkylcarbinols in a straightforward and practical manner.

2. Results and discussion

The enzymatic hydrolysis of the secondary aromatic acetates **1a–9a** (Scheme 2) was carried out with the *Candida antarctica* lipase fraction B immobilized on acrylic resin (CAL-B), following two methods for comparison (Scheme 3).

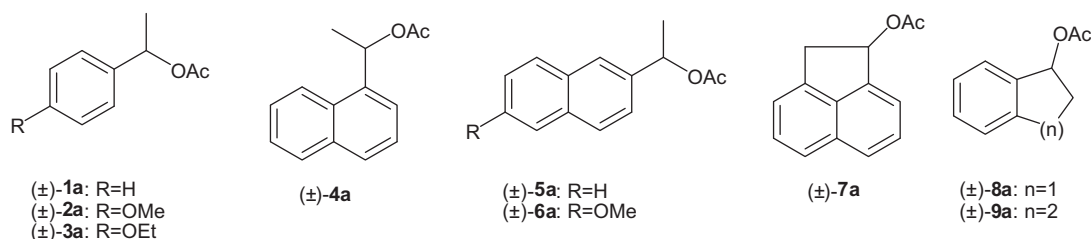


Scheme 3. Enzymatic hydrolysis.

The first method uses the conventional hydrolysis in a biphasic medium and the second uses our protocol involving sodium carbonate in organic solvent. We have examined the selectivity and the reactivity obtained by each hydrolysis method.

2.1. Enzymatic hydrolysis in biphasic media

The enzymatic hydrolysis of racemic acetates **1a–9a** was performed in a biphasic system: phosphate buffer solution/Et₂O (v/v) (6/1) pH 7, according to the classical protocols.¹³



Scheme 2. Substrate models.

One equivalent of the racemic acetate, diluted in 1 mL of ether, was hydrolysed in the presence of 150 mg of CAL-B (specific activity UA = 4500 U/g), in 6 mL of phosphate solution pH 7, at room temperature for two days (Scheme 3, path A).

Both enantiomers of the residual acetates and alcohols formed were recovered after filtration of the lipase and liquid–liquid extraction. The course and selectivity of the enzymatic hydrolysis were quantified by chiral chromatography, and the results are summarized in Table 1.

The results from Table 1, demonstrate the important influence of CAL-B on both selectivity and reactivity depending directly on the structure of the acetates studied during the course of the enzymatic hydrolysis. The CAL-B displays (*R*)-enantiopreference since the (*R*)-acetate was selectively hydrolysed in all cases.

Table 1
Enzymatic hydrolysis of acetates **1a–9a**

Entry	Substrate ^a	ee _P (%) ^b (<i>R</i>) ^d	ee _S (%) ^b (<i>S</i>) ^d	C ^c (%)	E ^c
1	1a	>99	>99	50	>>200
2	2a	89	>99	53	91
3	3a	94	>99	51	>150
4	4a	87	75	46	37
5	5a	>99	89	49	>>200
6	6a	>99	98	49	>>200
7	7a	>99	6	6	200
8	8a	96	44	32	68
9	9a	98	83	46	>>200

^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 12 mL of buffer phosphate pH 7, 2 mL Et₂O, 150 mg of CAL-B, at room temperature for 2 days.

^b Measured by chiral chromatography, GC or HPLC (see Section 5).

^c Conversion and selectivity:¹⁴ C = ee_S/ee_P + ee_S; E = Ln[(1 – C)(1 – ee_S)]/Ln[(1 – C)(1 + ee_S)].

^d Absolute configuration was determined by the sign of the specific rotation of the isolated product with the literature (see Section 5).

The enzymatic hydrolysis was performed according to the conventional protocol (phosphate buffer pH 7) and showed a great diversity of results, with reactivities in the range of 6% < C < 53% and selectivities ranging 37 < E < 200, for various acetate structures. The best results were obtained with the acetates **1a**, **2a**, **3a**, **5a**, **6a** and **9a** (entries 1, 2, 3, 5, 6 and 9), with high selectivities 91 < E < 200 and conversions 46% < C < 52%. The comparison between the results obtained with **2a** and **3a** and **1a**, shows that the substitution of the *para*-position on the aromatic ring with methoxy- and ethoxy-groups, respectively, led to a decrease in the selectivity factor E >> 200 to E = 91 (entry 1 vs 2) with a slight improvement of the conversion. However, the presence of a polar moiety on the naphthyl ring of structure **6a** compared to **5a**, did not have any influence on the reactivity or on the selectivity (entry 5 vs 6).

When a monocyclic aryl ring was replaced with an α -naphthyl **4a**, the reactivity of the lipase was preserved, albeit with a strong decrease in the selectivity (C = 46%; E = 37; entry 4). However, in the case of isomer **5a**, the lipase gave excellent selectivity while

keeping excellent conversion $C = 49\%$ and $E \gg 200$ (entry 5). Low to moderate reactivity was observed with cyclic substrates **7a** and **8a**, albeit with a high selectivity for **7a** (entries 7 and 8). Finally, an excellent selectivity was observed for the flat cyclic substrate **9a**, with only a slight decrease in the overall reactivity (entry 8).

This large diversity of results and the lack of obvious structure–activity relationship could be attributed to the structure of the substrates, and also to their moderate solubility in the aqueous media.

2.2. Enzymatic-alkaline hydrolysis in non-aqueous media

We carried out the enzymatic-alkaline hydrolysis of acetates **1a–9a** in toluene, according to the literature.¹² The hydrolysis reaction was carried out in 1 mmol of substrate (Scheme 3, path B), 3 mL of toluene, in the presence of 50 mg of CAL-B, for three days at 40 °C. We checked the influence of the amount of sodium carbonate (0.5 and 1 equiv) in order to assess the generality, flexibility and reproducibility of our method on various substrates (Table 2).

The carbonate promoted hydrolysis presented in Table 2 showed good to high reactivities and selectivities ($42.5\% < C < 50\%$, $E > 150$) within the range of the acetates studied.

We also saw that a stoichiometric equivalent of sodium carbonate gave the best conversions, while keeping the best selectivities $E > 200$ at optimal conversions in all cases.

Recapitulative histograms of the two sets of experiments (Fig. 1) allow a comparative illustration (conversion C and selectivity E) between both methods of enzymatic acetate hydrolysis. It is obvious from both figures that our new method performs better than the conventional hydrolytic method in aqueous media, within the range of substrates studied.

The alkaline-enzymatic hydrolysis using Na_2CO_3 is thus a very attractive method due to the high reactivities and selectivities recorded. It also facilitates the work-up procedure and avoids the use of liquid–liquid extraction, thus providing an economy of solvent and optimization of the isolated chemical yields. These advantages of our non-conventional methodology make it an ideal candidate to be combined with the Mitsunobu esterification protocol (Fig. 2), in order to establish deracemization via stereoinversion. The two steps can be combined through a simple filtration of the enzyme, and addition of the Mitsunobu reagents immediately to the reaction mixture without any prior work-up.

3. Deracemization through a selective alkaline-enzymatic hydrolysis/Mitsunobu esterification sequence

The reaction mixture containing the (*S*)-remaining acetate and the (*R*)-recovered alcohol from hydrolysis reaction underwent the Mitsunobu reaction to yield the (*S*)-acetate (Scheme 4).

Acetates **1a–9a** were hydrolysed according to the conditions established below. After three days at 40 °C, the enzyme was filtered. The enantiomeric excesses of the remaining acetate and the recovered alcohol were evaluated by chiral chromatography (GC or HPLC). Next, 1.2 equiv of triphenyl phosphine, and 1.2 equiv of acetic acid were added directly to the filtrate. The diisopropylazodicarboxylate (DIAD) (1.2 equiv) was added slowly at 0 °C, to convert the (*R*)-alcohol into the (*S*)-acetate. The desired acetate was then isolated after standard work-up and purification by silica-gel column chromatography. The enantiomeric purity was determined by chiral chromatography (GC or HPLC), and the absolute configuration was determined by the sign of the specific rotation compared to the literature data. The results are shown in Table 3.

The results detailed in Table 3 show that the (*S*)-acetates **1a–9a** were obtained quantitatively in moderate to high enantiomeric excesses $57\% < ee < 99\%$. We have noted in some cases some notable loss in the enantiomeric purity of the acetates, whereas the starting materials present excellent enantiomeric excesses $96\% < ee_p < 99\%$. This decrease was recorded after the Mitsunobu esterification. The (*S*)-acetates **1a**, **4a** and **7a** were recovered with clean stereoinversion of the (*R*)-alcohol obtained after hydrolysis with $ee > 99\%$ (entries 1, 4 and 7); in these cases the enantiomeric purities of the initial alcohols were conserved through the (*S*)-acetates, which were recovered in excellent enantiomeric purity $ee > 99\%$ and good isolated chemical yields (70–89%). However, for alcohols **5**, **8** and **9** ($98\% < ee < 99\%$ after hydrolysis), partial racemization occurred during the Mitsunobu reaction to yield the corresponding (*S*)-acetates with an overall decrease of the enantiomeric excesses of approximately 10% (entries 5, 8 and 9). This effect was even more important with substrates **2a**, **3a** and **6a** since the enantiomeric excesses of the remaining acetates after Mitsunobu esterification decreased to $57\% < ee < 65\%$ (entries 2, 3 and 6). This shows that these alcohols underwent the Mitsunobu reaction with almost full racemization.

Table 2
Optimization of the enzymatic alkaline-hydrolysis in non aqueous media

Entry	Substrate ^a	Amount of Na_2CO_3 (mmol)	ee_s (%) ^b (<i>S</i>) ^c	ee_p (%) ^b (<i>R</i>) ^c	C (%)	E ^c
1	1a	0.5	>99	>99	50	$\gg 200$
2		1	83	99.5	45.5	$\gg 200$
3	2a	0.5	>99	93	52	144
4		1	95	98	49	$\gg 200$
5	3a	0.5	>99	>99	50	$\gg 200$
6		1	96	97	50	$\gg 200$
7	4a	0.5	73	>99	42.5	$\gg 200$
8		1	>99	>99	50	$\gg 200$
9	5a	0.5	84	>99	46	$\gg 200$
10		1	98	98	50	$\gg 200$
11	6a	0.5	ND ^d	ND ^d	ND ^d	ND ^d
12		1	93	96	49	>150
13	7a	0.5	ND ^d	ND ^d	ND ^d	ND ^d
14		1	>99	>99	50	$\gg 200$
15	8a	0.5	ND ^d	ND ^d	ND ^d	ND ^d
16		1	98	>99	50	$\gg 200$
17	9a	0.5	89	>99	47.5	$\gg 200$
18		1	>99	>99	50	$\gg 200$

^a Reaction conditions: 2 mmol of racemic acetate, appropriate amount of Na_2CO_3 , 6 mL of toluene, 50 mg of CAL-B, 40 °C for 3 days.

^b Measured by chiral chromatography, GC or HPLC (see Section 5).

^c Conversion and selectivity:¹⁴ $C = ee_s/ee_p + ee_s$; $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_s)]/\ln[(1 - C)(1 + ee_s)]$.

^d Not determined.

^e Absolute configuration was determined by the comparison of sign of the specific rotation of the isolated product with the literature (see Section 5).

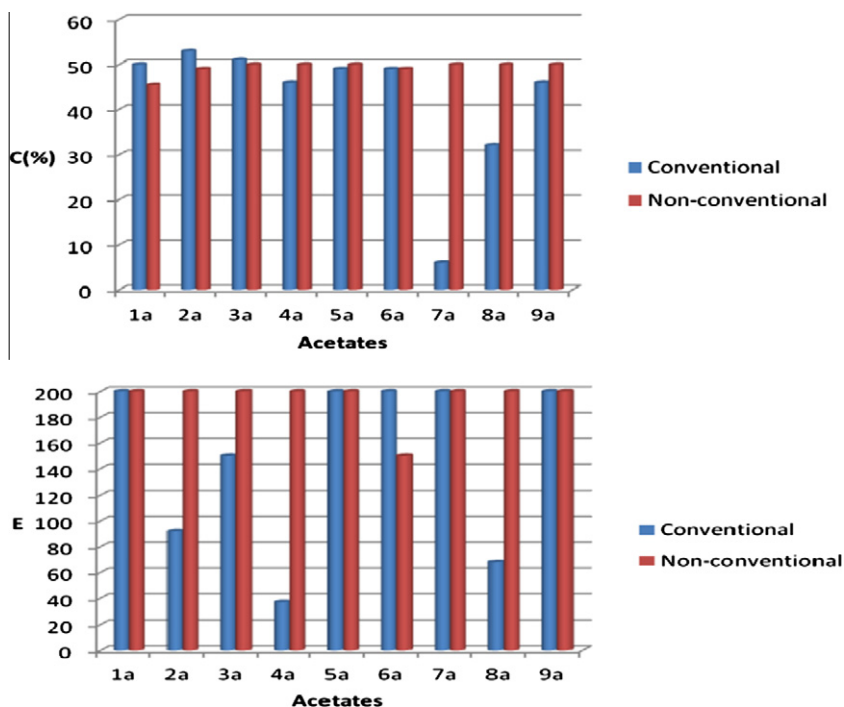


Figure 1. Comparison between the efficiency of the alkaline hydrolysis and the conventional one.

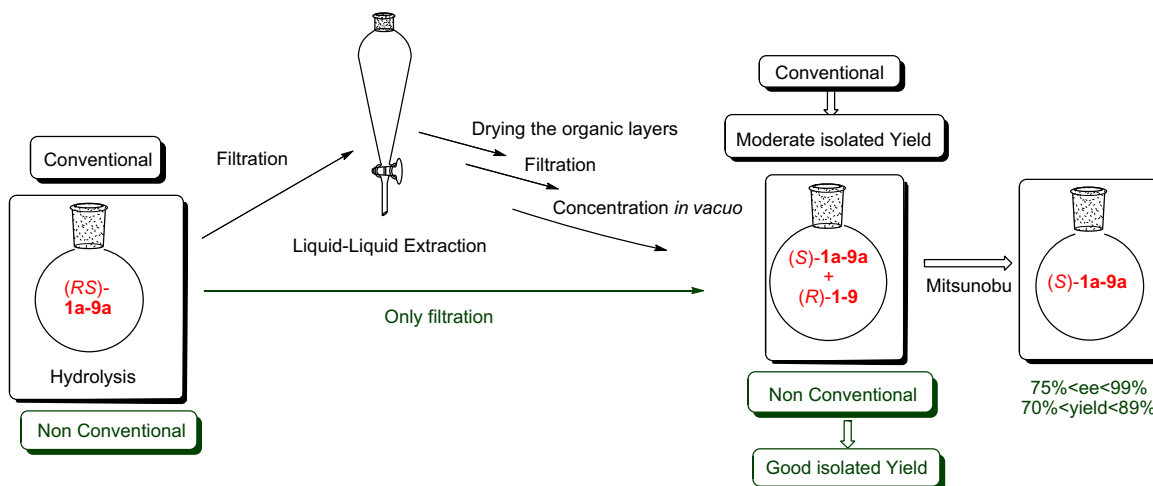
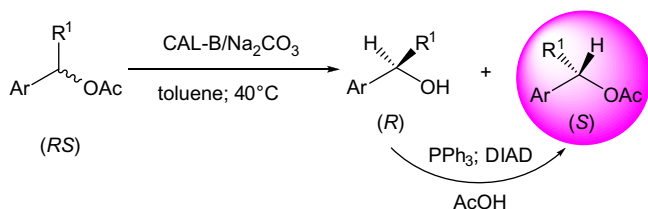


Figure 2. Comparison between the two processes.



Scheme 4. Deracemization via a combined enzymatic-alkaline hydrolysis/Mitsunobu inversion.

Similar observations were also noted in our previous investigations regarding deracemization through enzymatic acetylation/

Mitsunobu esterification, under the same conditions, where a racemization phenomenon occurred during the enantioselective synthesis of (R)-acetates.^{7e}

In our case, we observed a strong decrease in the enantioselectivity for the substrates bearing a strong electrodonating group on the aryl ring. Recently, a similar observation was reported regarding a racemization occurring over the course of an enantioselective synthesis via Mitsunobu substitution.¹⁵ This loss of enantiomeric purity may arise from a competitive substitution process that proceeds via an attack of the carbocation intermediate, via a non-stereoselective (S_N1) process to generate the racemic product,¹⁶ which in our case will give rise to an overall decrease in the enantiomeric excess of recovered (S)-acetates.

Table 3
Deracemization via a combination of the alkaline enzymatic hydrolysis with Mitsunobu inversion

Entry	Substrate ^a	Enzymatic alkaline hydrolysis ^c			Mitsunobu inversion	
		ee _s (%) ^b (S)-remaining acetate	ee _p (%) ^b (R)-recovered alcohol	E ^c	ee (%) ^b (S)-acetate	Yield ^d (%)
1	1a	>99	>99	>500	>99	70
2	2a	95	98	>300	57	72
3	3a	96	97	>200	60	89
4	4a	>99	>99	>500	>99	82
5	5a	98	98	>500	92	87
6	6a	93	96	>150	65	77
7	7a	>99	>99	>500	>99	89
8	8a	98	>99	>500	90	81
9	9a	>99	>99	>500	90	74

^a Reaction conditions: 2 mmol of racemic acetate.

^b Measured by chiral chromatography, GC or HPLC (see Section 5).

^c Conversion and selectivity: $^{14}C = ee_s/ee_p + ee_s$; $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_s)]/\ln[(1 - C)(1 + ee_s)]$.

^d Isolated yield.

4. Conclusion

We have prepared (S)-arylalkylcarbinol acetates **1a–9a** through deracemization via alkaline-hydrolysis catalysed by CAL-B lipase combined with Mitsunobu esterification. The hydrolysis using CAL-B in the presence of Na₂CO₃ gave high selectivities and reactivities $C > 49\%$ for all of the studied substrates, and we have shown that this method is more advantageous than the traditional one in an aqueous media buffer. This process reduces the number of steps and gives a more practical experimental protocol. After optimization of the amount of the sodium carbonate used, this hydrolysis pathway was combined with Mitsunobu esterification after simple filtration. The recovered (S)-acetates after the stereoinversion protocol were isolated in excellent enantiomeric purity $ee > 99\%$ for **1a**, **4a** and **7a**, to good $ee > 99\%$ for **5a**, **8a** and **9a** and moderate $ee > 57\%$ for **2a**, **3a** and **6a**. For these three cases, we observed almost full racemization during the nucleophilic substitution reaction due to the presence of an electron donating substituent on the aromatic ring.

5. Experimental

5.1. General

NMR spectra were performed with Bruker spectrometers (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts were reported in δ ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as internal standard for ¹H NMR and chloroform-*d* (δ 77.0 ppm) for ¹³C NMR. The enantiomeric excesses were measured by gas chromatography (ThermoFinnigan Trace GC) equipped with an automatic autosampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 μ m), or by a chiral stationary phase HPLC on Chiralcel-ODH column. Retention times are reported in minutes. Optical rotations were determined using a Perkin–Elmer 241 Polarimeter at room temperature using a cell of 1 dm length at 589 nm.

5.2. General procedure for the synthesis of racemic acetates **1a–9a**

The acetates were synthesized by chemical acetylation from the corresponding racemic alcohol (1 equiv), using 1.5 equiv of acetic anhydride, 1.2 equiv of Et₃N and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (0.1 equiv) diluted in ether. The acetates were obtained with enough purity after standard work up. The ¹H NMR spectra of these products were in good agreement with the literature.

5.3. General procedure for the conventional hydrolysis of racemic acetates **1a–9a** with *Candida antarctica*-B lipase

At first, 2 mmol of racemic acetates **1a–9a** was dissolved in 2–3 mL of ether and added to 12 mL of phosphate buffer pH 7. Next, 300 mg of CAL-B (UA = 4500 U) was added. The suspension was stirred at room temperature for two days. The reaction mixture was filtered on Celite and concentrated in vacuo. The acetate formed and the remaining alcohol were separated by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) and analysed by chiral HPLC or GC.

5.4. General procedure for the alkaline-hydrolysis of racemic acetates **1a–9a** with *Candida antarctica*-B lipase

A dry Schlenk tube was charged with 1 mmol of racemic acetates **1a–9a**, which was dissolved in 3 mL of solvent before the addition of 1 mmol of sodium carbonate and 50 mg of CAL-B. The suspension was stirred at 40 °C for the indicated time. The reaction mixture was filtered on Celite and concentrated in vacuo. The acetate formed and the remaining alcohol were separated by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) and analysed by chiral HPLC or GC.

5.5. General procedure for the esterification under Mitsunobu conditions

To the filtrate recovered after the enzymatic-alkaline hydrolysis, 1.2 equiv of AcOH and 1.2 equiv of PPh₃ were added; followed by the slow addition of 1.2 equiv of DIAD, at 0 °C. The reaction mixture was stirred vigorously at room temperature for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by silica-gel column chromatography using petroleum ether/ethyl acetate (80/20).

5.6. Chiral GC analysis and/or chiral HPLC analysis

The absolute configurations of all chiral compounds (isolated after chromatography) were determined by polarimetry by comparison with the literature. The conditions for the analysis of alcohols (R)-**1–9** and acetates (S)-**1a–9a** are reported below.

5.6.1. (R)-(+)-1-Phenylethanol **1**

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 3.9$ min, $t_S = 4.1$ min ($T_{col-umn} = 140$ °C, flow 1.2 mL/min).

5.6.2. (R)-(+)-1-(4-Methoxyphenyl) ethanol 2

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 12.7$ min, $t_S = 13.5$ min ($T_{\text{column}} = 135$ °C, flow 1.2 mL/min).

5.6.3. (R)-(+)-1-(4-Ethoxyphenyl) ethanol 3

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 13.1$ min, $t_S = 13.9$ min ($T_{\text{column}} = 155$ °C, flow 1.2 mL/min).

5.6.4. (R)-(+)-1-(Naphthalene-1-yl) ethanol 4

Chiral HPLC: Chiracel OD-H column, $t_R = 20.05$ min, $t_S = 28.90$ min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 90/10; flow 0.5 mL/min.

5.6.5. (R)-(+)-1-(2-Naphthyl) ethanol 5

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 10.2$ min, $t_S = 10.5$ min ($T_{\text{column}} = 170$ °C, flow 1.2 mL/min).

5.6.6. (R)-(+)-1-(6-Methoxynaphthalen-2-yl) ethanol 6

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 17.2$ min, $t_S = 17.7$ min ($T_{\text{column}} = 180$ °C, flow 1.2 mL/min).

5.6.7. (R)-(-)-Acenaphthenol 7

Chiral HPLC: Chiracel OD-H column, $t_R = 28.80$ min, $t_S = 34.67$ min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 95/5; flow 0.5 mL/min.

5.6.8. (R)-(-)-1-Indanol 8

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_R = 51.2$ min, $t_S = 51.9$ min ($T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, after 135 °C for 5 min, flow 1.2 mL/min).

5.6.9. (R)-(-)-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-1-ol 9

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 63.7$ min, $t_R = 65.0$ min ($T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, then 135 °C for 5 min, flow 1.2 mL/min).

5.6.10. (S)-(-)-1-(Phenylethyl) acetate 1a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 2.9$ min, $t_R = 3.2$ min ($T_{\text{column}} = 140$ °C, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -136$ (c 0.1, CHCl₃) for 99% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +135.9$ (c 1, CHCl₃) for 99% ee (R)}.¹⁷

5.6.11. (S)-(-)-1-(4-Methoxyphenyl)ethyl acetate 2a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 10.9$ min, $t_R = 12.1$ min ($T_{\text{column}} = 135$ °C, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -8$ (c 0.2, CHCl₃) for 57% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +11.4$ (c 1.2, CHCl₃) for 84% ee (R)}.¹⁷

5.6.12. (S)-(-)-1-(4-Ethoxyphenyl)ethyl acetate 3a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 12.2$ min, $t_R = 13.4$ min ($T_{\text{column}} = 155$ °C, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -70.8$ (c 0.5, CHCl₃) for 60% ee, {Lit. $[\alpha]_D = -113.1$ (c 0.9, CHCl₃) for >85% ee (S)}.¹⁸

5.6.13. (S)-(-)-1-(Naphthalen-1-yl) ethyl acetate 4a

Chiral HPLC: Chiracel OD-H column, $t_R = 9.87$ min, $t_S = 13.50$ min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 90/10; flow 0.5 mL/min. $[\alpha]_D^{20} = -46.5$ (c 0.2, CHCl₃) for 99% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +49.5$ (c 1, CHCl₃) for 99% ee (R)}.¹⁷

5.6.14. (S)-(-)-1-(Naphthalen-2-yl) ethyl acetate 5a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 8.6$ min, $t_R = 8.9$ min ($T_{\text{column}} = 170$ °C, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -104$ (c 0.2, CHCl₃) for 92% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +110.2$ (c 1, CHCl₃) for 99% ee (R)}.¹⁷

5.6.15. (S)-(-)-1-(6-Methoxynaphthalen-2-yl) ethyl acetate 6a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 16.2$ min, $t_R = 16.6$ min ($T_{\text{column}} = 180$ °C, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -64.5$ (c 0.3, CHCl₃) for 65% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +110$ (c 1, EtOH) for 99% ee (R)}.¹⁷

5.6.16. (S)-(-)-1-Acenaphthyl acetate 7a

Chiral HPLC: Chiracel OD-H column. $t_S = 11.88$ min, $t_R = 12.52$ min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 95/5; flow 0.5 mL/min;

$[\alpha]_D^{20} = -79.4$ (c 0.2, CHCl₃) for 90% ee, {Lit. $[\alpha]_D = -85.2$ (c 2.4, CHCl₃); 99% ee (S)}.^{13a}

5.6.17. (S)-(-)-2,3-Dihydro-1H-inden-yl acetate 8a

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_S = 46.1$ min, $t_R = 46.9$ min ($T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, after 135 °C for 5 min, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -100$ (c 0.5, CHCl₃) for 90% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +85$ (c 1, CHCl₃) for 80% ee (R)}.¹⁷

5.6.18. (S)-(-)-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-1-yl acetate 9a

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 57.4$ min, $t_S = 58.6$ min ($T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, after 135 °C for 5 min, flow 1.2 mL/min). $[\alpha]_D^{20} = -97.5$ (c 0.5, CHCl₃) for 90% ee, {Lit. $[\alpha]_D = +105$ (c 1, CHCl₃) for 92% ee (R)}.¹⁷

Acknowledgments

Algerian Ministry of education and scientific research (FNR 2000 and PNR), Université catholique de Louvain and FNRS are gratefully acknowledged for their financial support of this work.

References

- (a) Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072–7076; (b) Klibanov, A. M. *CHEMTECH* **1986**, *16*, 354–359; (c) Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2767–2768; (d) Faber, K.; Riva, S. *J. Synth. Org. Chem.* **1992**, 895–910; (e) Zhu, B.; Panek, J. S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2575–2578; (f) Reetz, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145–150; (g) Pavel, R. N. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **2003**, *6*, 902–920; (h) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2011; (i) Ahmed, M.; Kelly, T.; Ghanem, A. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6781–6802.
- (a) Trost, B. M. *Science* **1991**, 1471–1477. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *107*, 285–307; Trost, B. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 259–281; (b) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998; (c) Anastas, P. T.; Li, P. T. *Water as a Green Solvent*; John Wiley & Sons, 2010; (d) Anastas, P. T.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312.
- (a) Carrera, G.; Riva, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2227–2254; (b) Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721–1754; (c) Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouieche, L.; Riant, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1371–2377; (d) Chênevert, R.; Pelchet, N.; Morin, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1191–1196; (e) Merabet-Khelassi, M.; Bouzemi, N.; Fiaud, J.-C.; Riant, O.; Aribi-Zouieche, L. *C. R. Chim.* **2011**, *14*, 978–986.
- (a) Boland, W.; Frossl, C.; Lorenz, M. *Synthesis* **1991**, 1049–1072; (b) Kawasaki, M.; Nakamura, K.; Kawabata, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 447–451; (c) Kang, S.-K.; Jeon, J.-H.; Yamaguchi, T.; Kim, J.-S.; Ko, B.-S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2139–2142; (d) Aoyagi, N.; Ogawa, N.; Izumi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4797–4801; (e) Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Fadnavis, N. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 320–324; (f) Bora, P. P.; Bez, G.; Anal, J. M. H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *72*, 270–275.
- (a) Stercher, H.; Faber, K. *Synthesis* **1997**, 1–16; (b) Strauss, U. T.; Felfer, U. F.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 107–117; (c) Faber, K. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5005–5010; (d) Turner, N. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 401–406; (e) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 407–413; (f) Matute, B. M.; Bäckvall, J.-E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226–232; (g) Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. H.; Azeza, S. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *569*–592; (h) Merabet-Khelassi, M.; Vriamont, N.; Riant, O.; Aribi-Zouieche, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1790–1796; (i) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769–3802.
- (a) van den Heuvel, M.; Cuiper, A. D.; van der Deen, H.; Kellogg, R. M.; Feringa, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1655–1658; (b) El Ghiani, M. T.; Williams, J. M. *J. Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 11–15.
- (a) Takano, S.; Suzuki, M.; Ogasawara, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1043–1046; (b) Vanttinen, E.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1779–1786; (c) Liu, H. L.; Anthonsen, T. *Chirality* **2002**, *14*, 25–27; (d) Wallner, A.; Mang, H.; Gliciek, S. M.; Steinreiber, A.; Mayer, S. F.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2427–2432; (e) Bouzemi, N.; Aribi-Zouieche, L.; Fiaud, J. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 797–800.
- (a) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969–13972; (b) Mu, X. Q.; Xu, Y.; Yang, M.; Sun, Z. H. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 233–239.
- Mitsunobu, O.; Yamada, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380.
- (a) Danda, T.; Nagatomi, T.; Maehara, A.; Umemura, T. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8701–8716; (b) Steinreiber, A.; Stadler, A.; Mayer, S. F.; Faber, K.; Kappe, O. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6283–6286; (c) Shimada, Y.; Usuda, K.; Okabe, H.; Suzuki, T.; Matsumoto, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2802–2808.
- Rakels, J. L. L.; Straathof, A. J. J.; Heijneij, J. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 93–100.
- Merabet-Khelassi, M.; Houiene, Z.; Aribi-Zouieche, L.; Riant, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 823–833.

13. (a) Bidjou, C.; Aribi-Zouiouèche, L.; Fiaud, J.-C. *J. Soc. Alg. Chim.* **1999**, 9, 261–268; (b) Aribi-Zouiouèche, L.; Fiaud, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4085–4088; (c) Bidjou, C.; Aribi-Zouiouèche, L.; Fiaud, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3025–3027.
14. (a) Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294–7299; (b) Kagan, H. B.; Fiaud, J.-C. In *Kinetic Resolution Topics in Stereochemistry*; Eliel, E. L., Wilen, S. H., Eds.; J. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1988; Vol. 18, pp 249–330.
15. Thvedt, T. H. K.; Fuglseth, E.; Sundby, E.; Hoff, B. H. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6733–6743.
16. (a) Warmerdam, E. G. J. C.; Brussee, J.; Kruse, C. G.; Van der Gen, A. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, 75, 3–6; (b) Hillier, M. C.; Desrosiers, J. N.; Marcoux, J. F.; Grabowski, E. J. J. *Org. Lett.* **2004**, 9, 573–576.
17. Bouzemi, N.; Debbeche, H.; Aribi-Zouiouèche, L.; Fiaud, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 627–630.
18. Naemura, K.; Murata, M.; Tanaka, R.; Yano, M.; Hirose, K.; Tobe, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1581–1584.



Green methodology for enzymatic hydrolysis of acetates in non-aqueous media via carbonate salts

Mounia Merabet-Khelassi^a, Zahia Houiene^a, Louisa Aribi-Zouieueche^{a,*}, Olivier Riant^{b,*}

^a Equipe de Synthèse Asymétrique et Biocatalyse LCAE, Université Badji Mokhtar-Annaba, B.P.12, 23000 Annaba, Algeria

^b Institute of Condensed Matter and Nanosciences Molecules, Solids and Reactivity (IMCN/MOST), Université Catholique de Louvain, Bâtiment Lavoisier, Pl. Louis Pasteur, 1, bte 3, 1348 Louvain La Neuve, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2012

Accepted 7 June 2012

ABSTRACT

Herein we report a new approach to enantiomerically enriched acetates using a lipase-catalyzed hydrolysis in non-aqueous media by alkaline carbonate salts. The use of sodium carbonate in the enzymatic hydrolysis with *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) of racemic acetates shows a large enhancement of the reactivity and selectivity of this lipase. The role of the carbonate salts, the amount and the nature of the alkaline earth metal on the efficiency of this new pathway are investigated. The enzymatic kinetic resolution of acetates **1a–9a**, by enzymatic-carbonate hydrolysis under mild conditions is described. In all cases, the resulting alcohols and remaining acetates were obtained in high ee values (up to >99%) while the selectivities reached $E > 500$.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

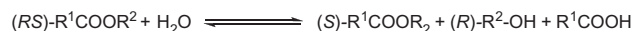
Hydrolytic enzymes are very attractive and are one of the most useful synthetic tools, which integrate numerous organic transformations in a large variety of catalytic reactions. Their use contributes to the development of the basic principles of green chemistry.¹ Serine hydrolases (EC.3.1.1.3) are the most widely used for their ease of manipulation and for their remarkable chemo-, regio-, and enantioselectivity,² especially in kinetic resolutions.³ They offer access to a wide range of biotransformations, such as the manufacture of pharmaceuticals, cosmetics, agricultural chemicals, and fine chemicals.⁴

Furthermore, their utility has also been reinforced by the possibility of combining enzymatic and homogeneous catalysis. Moreover, efficient methods for deracemizations via biocatalyzed kinetic resolutions have been developed over the last decade, and offer new pathways for the production of enantioenriched molecules with high yields and selectivities.⁵

Lipases are highly active and stable, both in water and organic solvents. They are powerful tools for biotransformations involving either (*trans*)esterification of carboxylic acids and alcohols in organic media, or hydrolysis in aqueous media.⁶ Recently, an efficient approach for deacylation of secondary acetates using free ammonia in non-aqueous media has been described.⁷

The most conventional methods for the enzymatic kinetic resolution through hydrolysis, as reported in the literature,⁸ were per-

formed in aqueous media,⁹ or in a biphasic system: aqueous/organic solvent.¹⁰ The catalytic mechanism of the hydrolysis¹¹ is held on the interface of the two phases (Scheme 1).



Scheme 1.

However, enzymatic hydrolysis in biphasic media (water, buffer or water saturated) is still limited because of two major disadvantages; the first is the decrease of the lipase's enantioselectivity due to the co-solvent nature; the second is the difficulty of controlling the pH value of the aqueous solution during the hydrolysis procedure.¹² These limitations explain its moderate applications for the resolution of secondary^{9b,13} and/or the primary benzylic acetates¹⁴ compared to the enzymatic transesterifications.¹⁵

Herein we have developed a green and easy pathway for enzymatic hydrolysis in non-aqueous organic media, in the presence of sodium carbonates. We have also applied this procedure to a large range of aromatic acetates.

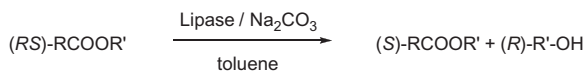
2. Results and discussion

The enzymatic hydrolysis was carried out on an equimolecular mixture of racemic acetates and sodium carbonate in the presence of catalytic amounts of lipase, in toluene, without the addition of any more water (Scheme 2). We examined various parameters of the reaction and then studied the effect of the sodium carbonate

* Corresponding authors.

E-mail address: olivier.riant@uclouvain.be (O. Riant).

according to these parameters, such as the lipase's nature, its catalytic loading and the temperature.

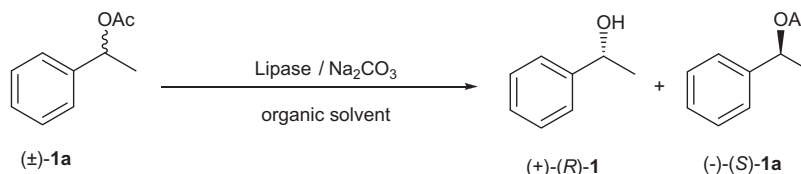


Scheme 2.

2.1. Effect of the amount and the nature of the lipase

In our preliminary kinetic resolution investigation, the racemic phenylethyl acetate **1a** was chosen as a model substrate in order to evaluate the suitable reaction conditions.

Various commercially available lipases were screened: the *Candida cylindracea* lipase (CCL; LA = 3.85 U/mg), *Candida rugosa* lipase (CRL; LA = 1170 U/mg), *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL; LA >30,000 U/mg) and an immobilized lipase: the *Candida antarctica* lipase fraction B immobilized on acrylic resin (CAL-B; LA >10,000 U/g). The catalytic amount of the biocatalysts, reaction times and temperature were also examined (Scheme 3) in order to



Scheme 3.

determine the appropriate conditions. Hydrophobic solvents, subjected beforehand to molecular sieves, were employed, in order to determine the water source in the hydrolysis reaction media. The course and selectivity of the kinetic resolution were checked by sampling the reaction mixture by chiral GC. The results are summarized in Table 1.

Table 1
Effect of the amount and the nature of lipase

Entry ^a	Lipase (mg)	Time (h)	ee _S (%) ⁱ - (S) ^k	ee _P (%) ⁱ - (R) ^k	C (%)	E ^j
1	— ^b	72	—	—	—	—
2	— ^c	72	—	—	—	—
3	CALB ^{d,e} (40)	72	9.5	99.5	9	>200
4	CAL-B ^e (40)	72	67	99.5	40	>500
5	CAL-B ^{e,g} (40)	48	86	99.5	46	>500
6	CAL-B ^f (50)	72	49	99.5	33	>500
7	CAL-B ^f (100)	72	70	99.5	41	>500
8	CAL-B ^{f,h} (100)	72	99	99.5	50	>500
9	CCL (100)	6 days	0.4	7	5	1
10	CRL (100)	6 days	0.4	12.4	3	1
11	PCL (100)	6 days	6.4	99.5	6	>500

^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 1 mmol of Na₂CO₃ in 3 mL of toluene in the presence of lipase at room temperature.

^b Reaction was performed without lipase or Na₂CO₃.

^c Reaction was performed without lipase and in the presence of Na₂CO₃.

^d Reaction was performed in the presence of lipase and without Na₂CO₃.

^e CALB purchased from Aldrich. Specific activity >10,000 U/g.

^f CALB purchased from Sigma. Specific activity >10,000 U/g.

^g Et₂O as the organic solvent.

^h At 40 °C.

ⁱ Measured by GC.

^j Conversion:¹⁶ $C = ee_S/ee_P + ee_S$; selectivity¹⁶ $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_S)] / \ln[(1 - C)(1 + ee_S)]$.

^k The absolute configuration was determined by the sign of the specific rotation of the isolated product with the literature (see Section 4).

The data from Table 1 show that no hydrolysis took place in the absence of both lipase and sodium carbonate (entry 1). Furthermore, none of the corresponding alcohol was obtained when 1 equiv of sodium carbonate but no biocatalyst was used (entry 2).

A slight improvement in the hydrolysis of **1a** occurred, only in the presence of CAL-B, and the conversion reached C = 9% after 3 days (entry 3). The (R)-phenylethanol was obtained with an excellent enantioselectivity (ee >99.5%). With the introduction of both Na₂CO₃ and CAL-B, the conversion achieved C = 40% while maintaining high enantioselectivity (entry 4). In contrast, the use of free lipases: CCL, CRL, and PCL, gave very low reactivity, with only C <10% conversion of starting material being obtained after 6 days (entries 9, 10 and 11), although PCL gave high enantioselectivity (entry 11). With the immobilized lipase CAL-B, our results showed a significant improvement, giving high selectivities E >500 and good conversion 33% < C < 40% (entries 4 and 6).

When the amount of immobilized lipase was doubled, 40% conversion of the starting acetate was reached after stirring for 72 h (entry 7). While heating at 40 °C, we achieved the optimum conversion, C = 50%, and both the remaining acetate and the resulting alcohol were obtained with ee values of up to 99% (entry 8).

The use of another hydrophobic solvent Et₂O, gave an analogous selectivity E >500 and reactivity (entry 5), than those obtained when toluene was employed as the organic media.

From all of these data, we are able to conclude that since the solvents used were hydrophobic (aromatics and ether), the water implicated in the hydrolysis processes probably originates from the lipase.

Fülöp et al. reported similar phenomena and noted that hydrolysis of an acetate took place without the addition of any H₂O. This fact was attributed to the residual water present in the *Burkholderia cepacia* lipase preparation or in the solvent used.¹⁷

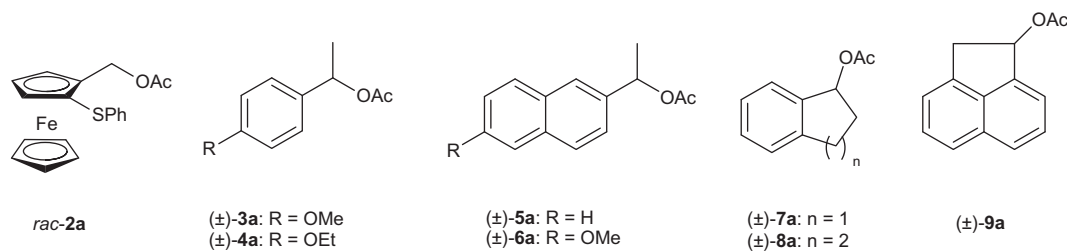
The CAL-B and PCL lipases displayed good enantioselectivities, but only the CAL-B exhibited high reactivity. In contrast, CRL and CCL were inactive for the hydrolysis processes in these cases.

In order to validate this novel approach, we decided to apply the optimized conditions of the enzymatic kinetic resolution via hydrolysis to a series of primary and secondary aromatic acetates **2a–9a**.

2.2. Enzymatic-alkaline hydrolysis of racemic acetates 2a–9a

The enzymatic-alkaline hydrolysis reactions of racemic acetates **2a–9a** (Scheme 4), under the new reaction conditions, were performed. All experiments were carried out with 1 mmol of substrate, with 1 equiv of sodium carbonate in the presence of a catalytic amount of CAL-B, in 3 mL of toluene for 72 h at 40 °C. The results are summarized in Table 2.

All of the substrates showed good to high selectivities (Table 2), albeit with slight differences in the reactivity of the lipase toward some substrates, in the presence of sodium carbonate in organic media.



Scheme 4.

Table 2
Enzymatic-alkaline hydrolysis of aromatic acetates

Entry ^a	Substrate	CAL-B (mg)	Solvent	ee _S (%) ^b -(S) ^g	Yield ^c (%)	ee _P (%) ^b -(R) ^g	Yield ^c (%)	C ^d (%)	E ^d (%)
1	2a	40	Hexane	19.5	ND ^e	99.5	ND ^e	16	>500
2	2a	40	Et ₂ O	5	ND ^e	99.5	ND ^e	4	>500
3	2a	40	iPr ₂ O	11	ND ^e	99.5	ND ^e	10	>500
4	2a	40	TBME	20.5	ND ^e	99.5	ND ^e	17	>500
5	2a	40	CH ₂ Cl ₂	—	—	—	—	NR ^f	—
6	2a	40	Toluene	34	ND ^e	99.5	ND ^e	25	>500
7	2a	80	Toluene	69	42	99.5	30	41	>500
8	2a	100	Toluene	65	40	99.5	35	40	>500
9	5a	100	Toluene	95	47	99.5	45	49	>500
10	5a	50	Toluene	98	48	98.6	48	50	>500
11	6a	100	Toluene	99	32	99.5	34	50	>500
12	6a	50	Toluene	93	29	96.3	30	49	>150
13	8a	100	Toluene	78	46	99.5	35	44	>500
14	8a	50	Toluene	99.5	48	99.5	48	50	>500
15	3a	100	Toluene	95	47	97	46	49	>300
16	3a	50	Toluene	96	48	97	48	49.6	>200
17	4a	100	Toluene	92	45	95.6	40	49	150
18	4a	50	Toluene	95	42	97.6	35	49.3	>300
19	7a	100	Toluene	95	35	99.5	30	49	>500
20	7a	50	Toluene	98.2	36	99	32	50	>500
21	9a	50	Toluene	90.3	35	98.2	27	47.9	>300

^a Reactions were carried out with 1 mmol of racemic acetate, 1 mmol of Na₂CO₃ in 3 mL of solvent at 40 °C, in the presence of a catalytic amount of CAL-B (>10,000 U/g), for 72 h.

^b Measured by GC or HPLC.

^c Isolated yields.

^d Conversion:¹⁶ $C = ee_S/ee_P + ee_S$; selectivity¹⁶ $E = \ln[(1 - C)(1 - ee_S)]/\ln[(1 - C)(1 + ee_S)]$.

^e Not determined.

^f No reaction.

^g Absolute configuration was determined by comparison of the sign of the specific rotation of the isolated product with the literature (see Section 4).

The amount of CAL-B was then reduced to 50 mg (entries 10, 12, 14, 16, 18, 20, and 21); the lipase's reactivity and selectivity remained unaffected, for most of the substrates tested.

In general, lipases showed high enantioselectivity toward secondary alcohols or ester derivatives, but exhibited low enantioselectivity toward primary substrates. The best selectivity $E > 500$ was reached using 80 mg of lipase, at 40 °C, with a high conversion, $C = 41\%$ (entry 7).

We were pleased to note that we could obtain the (*R*_{FC})-2-hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene **2**, via hydrolysis of the primary acetate **2a**, with excellent enantiomeric excess $ee = 99.5\%$. Furthermore, the other enantiomer, (*S*_{FC})-2-hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene was obtained with high enantioselectivity via enzymatic acylation in our previous investigations.¹⁸ Both enantiomers of this primary substrate were thus obtained in high enantioselectivity with the same lipase.

This methodology for enzymatic-alkaline hydrolysis is simple, easy to use, and effective and can be used under environmentally friendly conditions. We have improved upon these novel reaction conditions for a range of various potentially useful substrates with CAL-B. The enantiomerically enriched alcohols and acetates have been obtained in good isolated chemical yields.

2.3. Effect of the sodium carbonate

We next studied the influence of carbonate salts on the outcome of the enzymatic hydrolysis in non-aqueous organic media. The nature of the counter-ion of the carbonate was first investigated. For this, we chose Na⁺, K⁺ and Ca²⁺. We also studied the influence of the amount of sodium carbonate on the hydrolysis reaction, which was performed with 1 mmol of phenylethyl acetate **1a** with 50 mg of CAL-B in 3 mL of toluene, for 72 h at 40 °C. The amount of sodium carbonate was varied from 0.1 to 3 mmol. The results are shown in Table 3.

2.4. Attempt to interpret the reaction mechanism

The reaction was performed in toluene, a hydrophobic solvent. Without any added carbonate, it was thought that the hydrolysis was probably triggered by the structural water molecules from the enzyme. Using these conditions, moderate conversion (9%) was obtained (Table 3; entry 1). In the presence of sodium or potassium carbonate, a high increase in the lipase reactivity was noted and a conversion of $C = 50\%$ was reached (Table 3; entry 6) without any noticeable change in the selectivity.

Table 3
Effect of the carbonate salts

Entry ^a	Carbonate (mmol)	ee _S ^d (%)	Yield ^e (%)	ee _P ^d (%)	Yield ^e (%)	C ^f (%)	E ^f
1	Without ^b	9.5	59	99.5	7	9	>200
2	Na ₂ CO ₃ ^c (1)	—	—	—	—	—	—
3	Na ₂ CO ₃ (3)	99.5	15	98	48	50.5	>500
4	Na ₂ CO ₃ (2)	99.5	18	99.5	24	50	>500
5	Na ₂ CO ₃ (1)	83	43	99.5	30	46	>500
6	Na ₂ CO ₃ (0.5)	97.5	23	98.7	22	49.7	>500
7	Na ₂ CO ₃ (0.4)	99.2	28	>99	15	48	>500
8	Na ₂ CO ₃ (0.3)	75.2	24	98.2	19	43	>300
9	Na ₂ CO ₃ (0.2)	36.2	70	>99	15	27	>250
10	Na ₂ CO ₃ (0.1)	31	26	97	10	24	97
11	K ₂ CO ₃ (1)	95	28	99.5	15	49	>500
12	K ₂ CO ₃ (0.5)	99	24	99	19	50	>500
13	CaCO ₃ (1)	15	—	>99	—	13	>250
14	CaCO ₃ (0.5)	15	—	>99	—	13	>250

^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, appropriate amount of carbonate in 3 mL of solvent at 40 °C, in the presence of 50 mg of CAL-B (>10,000 U/g) for 72 h.^b Reaction in the presence of lipase and without a carbonate.^c Reaction without lipase and in the presence of a carbonate.^d Measured by GC or HPLC.^e Isolated yields.^f Conversion: $^{16} C = ee_S/ee_P + ee_S$; selectivity $^{16} E = \ln[(1 - C)(1 - ee_S)]/\ln[(1 - C)(1 + ee_S)]$.

Recently, the use of CaCO₃ as a stabilizing agent of fungal lipase has been reported. The authors assumed that this stabilization brought about by Ca²⁺ and by safeguarding the medium at pH 6 during the hydrolysis of 2-ethylhexyl acetate in aqueous media.¹⁹

In our case, maintaining the lipase's excellent enantioselectivity could be attributed to the capture of the leaving group (AcO[−]) by the metal ion during the course of the reaction; a minimum of 0.5 equiv was crucial in activating the hydrolysis process. The presence of cations Na⁺, K⁺, or Ca²⁺, afforded a salt residue, which was easy to remove by simple filtration with the lipase. The salts formed may shift some equilibrium toward the desired direction. When the reaction is carried out in aqueous media; the by-product formed is an acid. In addition, the literature reports that the addition of metal salts, such as, LiCl or MgCl₂ enhanced the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase (CRL) during the course of enzymatic hydrolysis in biphasic media.²⁰ This enhancement in enantioselectivity was attributed to a change of conformation and the lipase's flexibility. Similar observations have been reported by Salgin et al., who demonstrated that the treatment of CRL with metal ions, or their use as additives, increased the hydrolysis rate of racemic naproxen methyl ester in biphasic media. These additives may ensure electrostatic interactions between metal ions/enzyme, thus inducing conformational changes. The increase in the interaction energy allows better accessibility to the enzyme by the substrate.²¹

In our case, it is noteworthy that in the absence of a carbonate salt, moderate reactivity with an optimum conversion of 9% is reached. The introduction of an increasing amount of Na₂CO₃ has an important effect on the reaction rate and an optimum C = 50% was finally reached; this was also observed with K₂CO₃. When, a divalent cation Ca²⁺ was introduced, we observed a dramatic decrease of the reaction rate, and the conversion does not exceed 13%, showing almost no improvement compared to the reaction carried out without a carbonate (Table 3, entries 13 and 14); attesting more difficulties that reduced the substrate penetration to the active site. However, the approach of substrates to the active site seemed to be easier in the presence of monovalent cations in the reaction medium.²²

The resolution of acetates with CAL-B, an immobilized lipase, via hydrolysis in the presence of carbonate salts is applicable on equimolar scale in organic media; optimal conversion was achieved with C > 45% with monovalent carbonates. When, in the

presence of divalent carbonates, a marked decrease of the reaction rate to C = 13% was observed. It should be noted that the selectivity was still high with all of the substrates studied E > 250.

3. Conclusion

Herein we have reported a novel methodology for kinetic resolution via enzymatic hydrolysis in non-conventional media via carbonate salts. The performance of this reaction was improved with various types of primary and secondary aromatic acetates.

Enzymatic hydrolysis was carried out under hydrophobic organic media, in the presence of both sodium carbonate and CAL-B lipase. The effect of the carbonate salts was investigated, and proven to have a significant influence on the enzymatic reactivity, without any perturbation on its selectivity. An equimolar amount of Na₂CO₃ must be present in order to achieve the optimal conversion. Finally, we have developed a novel methodology for the enzymatic hydrolysis, in the presence of sodium carbonate, using simple and green chemistry.

4. Experimental

4.1. General

NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts are reported in δ ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard for ¹H NMR and chloroform-*d* (δ 77.0 ppm) for ¹³C NMR. Coupling constants (*J*) are given in Hertz. The following abbreviations classify the multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad signal. The mass spectra were obtained from the mass-service at the Catholic University of Louvain (FINNIGAN-MAT TSQ 7000 and FINNIGAN-MAT LQC spectrometers). IR spectra were recorded on Shimadzu FTIR-8400S spectrometer. Optical rotations were determined using a Perkin-Elmer 241 Polarimeter at room temperature using a cell of 1 dm length and λ = 589 nm. The enantiomeric excesses were measured by a chiral stationary phase HPLC on Chiralpak[®] AD column and Chiralcel[®] ODH or by gas chromatography (ThermoFinnigan Trace GC) equipped with an automatic autosampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 μm). Retention times are reported in minutes.

4.2. Synthesis of 2-hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene

The starting racemic 2-hydroxy-methyl-1-phenylthio-ferrocene was prepared as previously described starting from commercially available *N,N*-dimethylamino-ferrocene.¹⁸ Ortholithiation by *tert*-butyllithium in diethyl ether followed by electrophilic trapping with diphenyl disulfide afforded the *N,N*-dimethylaminomethyl-1-phenylthio-ferrocene. The alcohol was then generated by the reaction of the amine in acetic anhydride followed by methanolysis the resulting the 2-acetoxymethyl-1-phenylthioferrocene.

4.2.1. *N,N*-Dimethylaminomethyl-1-phenylthio-ferrocene¹⁸

Mp: 70 °C. IR (film, cm⁻¹): ν = 690.4; 736.7; 817.7; 1026; 1080; 1103.2; 1176.5; 1261.3; 1477.3; 1581.5; 2765.7; 2812; 2939.3. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.02 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3.37 & 3.42; 3.43 & 3.47 AB (dd, J = 13.3 Hz for each one, 2H, CH₂N(CH₃)₂); 4.6 (s, 5H, C_p); 4.32 (s, 1H, C_p), 4.46 & 4.50 (d, 2H, J = 13.6 Hz, C_p); 7.01–7.11 (m_a, 5H, Ar). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 45.1; 57.0; 69.1; 70.3; 71.3; 75.6; 76.0; 88.0; 124.8; 126.2; 128.5; 140.0. MS (D-APCI; m/z): 242.18 ([FcCH₂NMe₂]⁺, 100%); 307 ([FcSPhCH₂]⁺, 49%); 350.08 ([M–H]⁺, 35%); 351 ([M]⁺, 24%); 352.04 ([M+H]⁺, 6%).

4.2.2. 2-Acetoxymethyl-1-phenylthioferrocene 2a¹⁸

Mp: 128 °C. IR (film, cm⁻¹): ν = 690.4; 744.4; 817.7; 952.7; 999; 1022.2; 1238.2; 1369.3; 1577.6; 1728.1 (νC=O). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.75(s, 3H, O=C–CH₃); 4.27 (s, 5H, C_p); 4.41(s, 1H, C_p), 4.52 et 4.55 (d, 2H, J = 10.17Hz, C_p); 4.90 et 4.94 (d, J = 11.38 Hz, 1H) et 5.07–5.11 (d, J = 12.39Hz, 1H) CH₂OH; 7.04–7.2 (m_a, 5H, Ar). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.61; 61.00; 69.62; 70.21; 71.83; 76.17; 85; 124.95; 126.17; 128.48; 141.5; 172. MS (EI; m/z): 43.9 ([Ac]⁺, 86%); 148.8 ([Fc–H]⁺, 71%); 185.8 ([Fc]⁺, 53%); 366 ([M]⁺, 100%); 367.1 ([M+H]⁺, 24%).

4.2.3. 2-Hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene 2¹⁸

MP: 127 °C. IR (film, cm⁻¹): ν = 690.4; 740.6; 817.7; 987.4; 1006.7; 1076.2; 1107; 1249.7; 1481.2; 1581.5; 3244 (ν OH). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.51 (br s, OH); 4.27 (s, 5H, C_p); 4.41(s, 1H, C_p); 4.37(m, 2H, C_p), 4.53 (m, 1H, C_p + 2H, CH₂OH); 7.06 (m, 3H, Ph); 7.17 (m, 2H, Ph). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 59.0; 70.1; 70.0; 75.6; 91.0; 96.2; 125.2; 125.8; 128.9; 140.0. MS (EI; m/z): 185.8 ([Fc]⁺, 100%); 323.9 ([M]⁺, 100%).

4.3. General procedure for the synthesis of racemic acetates 1a–9a

The acetates were synthesized by classical chemical acetylations via the corresponding racemic alcohol (1 equiv), using 1.5 equiv of anhydride acetic, 1.2 equiv of Et₃N, and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (0.1 equiv) in 4 ml of ether. The acetates were obtained pure after standard work-up. The ¹H NMR spectra of these products were in good agreement with the literature.

4.4. General procedure for the hydrolysis of racemic acetates 1a–9a with *Candida Antarctica*- B lipase

A dry Schlenk tube was charged with 1 mmol of the racemic acetate 1a–9a is dissolved in 3 mL of solvent before the addition of 1 mmol of sodium carbonate and 50 mg of CAL-B. The suspension was stirred at 40 °C for the indicated time. The reaction mixture was filtered on Celite and concentrated in vacuo. The acetate formed and the remaining alcohol were separated by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) and analyzed by chiral HPLC or GC.

4.5. Chiral GC analysis and/or chiral HPLC analysis

The chemical analysis was performed by gas chromatography (ThermoFinnigan Trace GC) equipped with an automatic autosampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 μm), or by a chiral stationary phase HPLC on Chiralpak-AD column or Chiralcel-ODH column. Retention times are reported in minutes. The absolute configurations of all chiral compounds were determined by polarimetry in comparison with the literature data. The conditions for the analysis of alcohols (*R*)-1–9 and acetates (*S*)-1a–9a are reported below.

4.5.1. (*R*)-(+)-1-Phenylethanol 1

GC (Chiralsil-Dex CB): t_R = 3.9 min, t_S = 4.1 min (T_{column} = 140 °C), $[\alpha]_D^{20}$ = +53 (c 0.2, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.2. (*R*)-(+)-1-(4-Methoxyphenyl) ethanol 3

GC (Chiralsil-Dex CB): t_R = 12.7 min. t_S = 13.5 min (T_{column} = 135 °C), $[\alpha]_D^{20}$ = +40 (c 0.2, CHCl₃) for 97% ee.²³

4.5.3. (*R*)-(+)-1-(4-Ethoxyphenyl) ethanol 4

GC (Chiralsil-Dex CB): t_R = 13.1 min., t_S = 13.9 min (T_{column} = 155 °C). $[\alpha]_D^{20}$ = +41 (c 0.5, CHCl₃) for 97.6% ee.²⁴

4.5.4. (*R*)-(+)-1-(2-Naphthyl) ethanol 5

GC (Chiralsil-Dex CB): t_R = 10.2 min, t_S = 10.5 min. T_{column} = 170 °C, $[\alpha]_D^{20}$ = +38.3 (c 0.25, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.5. (*R*)-(+)-1-(6-Methoxynaphthalen-2-yl) ethanol 6

GC (Chiralsil-Dex CB): t_R = 17.2 min. t_S = 17.7 min. T_{column} = 180 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = +39.8 (c 0.15, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.6. (*R*)-(–)-1-Indanol 7

GC (Chiralsil-Dex CB), t_R = 51.2 min. t_S = 51.9 min. T_{column} = 80 °C for 7 min, after 135 °C for 5 min. $[\alpha]_D^{20}$ = –16 (c 0.1, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.7. (*R*)-(–)-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-1-ol 8

GC (Chiralsil-Dex CB), t_S = 63.7 min. t_R = 65.0 min. T_{column} = 80 °C for 7 min, after 135 °C for 5 min. $[\alpha]_D^{20}$ = –28 (c 0.5, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.8. (*R*)-(–)-Acenaphthenol 9

Chiral HPLC: Chiralcel OD-H column, t_R = 38.2 min; t_S = 41.5 min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 97/3; debit 0.5 mL/min; $[\alpha]_D^{20}$ = –1.4 (c 0.5, CHCl₃) for 98.2% ee.^{13d}

4.5.9. (*R*)-(–)-2-Hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene 2

Chiral HPLC: Chiralpak AD column, t_R = 30.6 min, t_S = 34.1 min. Eluant (v,v): hexane/EtOH: 97/3; debit: 1 mL/min. $[\alpha]_D^{20}$ = +56 (c 1, CH₂Cl₂) for 99% ee.^{18a}

4.5.10. (*S*)-(–)-1-(Phenylethyl) acetate 1a

GC (Chiralsil-Dex CB), t_S = 2.9 min. t_R = 3.2 min, T_{column} = 140 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = –136 (c 0.1, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.11. (*S*)-(–)-1-(4-Methoxyphenyl)ethyl acetate 3a

GC (Chiralsil-Dex CB), t_S = 10.9 min. t_R = 12.1 min, T_{column} = 135 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = –13 (c 0.3, CHCl₃) for 96% ee.²³

4.5.12. (*S*)-(–)-1-(4-Ethoxyphenyl)ethyl acetate 4a

GC (Chiralsil-Dex CB), t_S = 12.2 min. t_R = 13.4 min. T_{column} = 155 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = –110 (c 0.5, CHCl₃) for 95% ee.²⁴

4.5.13. (S)-(-)-1-(Naphthalen-2-yl) ethyl acetate 5a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 8.6$ min. $t_R = 8.9$ min. $T_{\text{column}} = 170$ °C. $[\alpha]_D^{20} = -110.7$ (c 0.12, CHCl₃) for 98% ee.^{15b}

4.5.14. (S)-(-)-1-(6-methoxynaphthalen-2-yl) ethyl acetate 6a

GC (Chiralsil-Dex CB), $t_S = 16.2$ min. $t_R = 16.6$ min. $T_{\text{column}} = 180$ °C. $[\alpha]_D^{20} = -110$ (c 0.1, CHCl₃) for 99% ee.^{15b}

4.5.15. (S)-(-)-2,3-dihydro-1H-inden-yl acetate 7a

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_S = 46.1$ min. $t_R = 46.9$ min. $T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, after 135 °C for 5 min. $[\alpha]_D^{20} = -101$ (c 0.8, CHCl₃) for 97% ee.²³

4.5.16. (S)-(-)-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-1-yl acetate 8a

GC (Chiralsil-Dex CB): $t_R = 57.4$ min. $t_S = 58.6$ min. $T_{\text{column}} = 80$ °C for 7 min, after 135 °C for 5 min. $[\alpha]_D^{20} = -107$ (c 0.7, CHCl₃) for 99% ee.²³

4.5.17. (S)-(-)-1-Acenaphthyl acetate 9a

Chiral HPLC: Chiracel OD-H column. $t_S = 11.5$ min; $t_R = 12.8$ min. Eluant (v,v): hexane/*i*-PrOH: 99.3/0.7; debit 1 mL/min; $[\alpha]_D^{20} = -78$ (c 0.15, CHCl₃) for 90% ee.^{13d}

4.5.18. (SfC)-(-)-2-Acetoxyethyl-1-phenylthioferrocene 2a

Chiral HPLC: Chiralpak AD column. $t_S = 9.5$ min, $t_R = 12.8$ min. Eluant (v,v): hexane/EtOH: 99/1; debit 1 mL/min.^{18a}

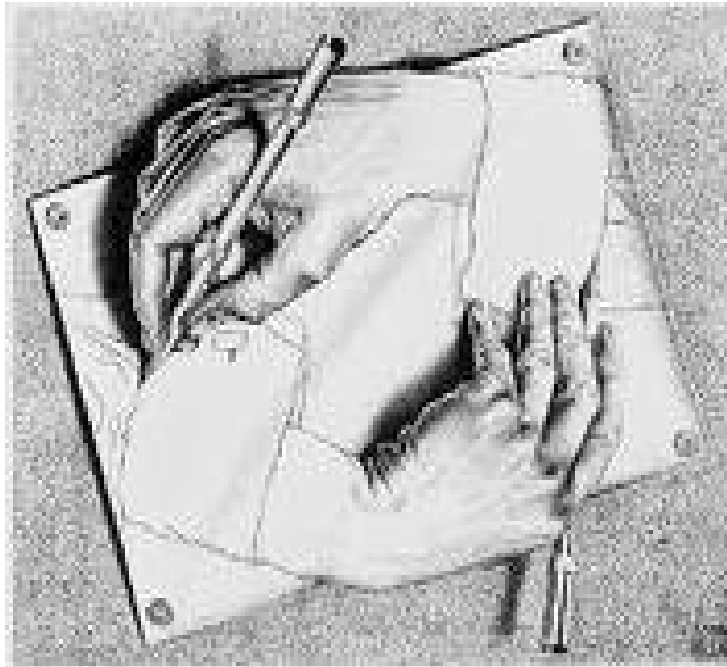
Acknowledgments

Algerian ministry of education and scientific research (FNR 2000 and PNR), Catholic University of Louvain, and FNRS are gratefully acknowledged for financial support of this work.

References

- (a) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998; (b) Anastas, P. T.; Li, P. T. Water as a Green Solvent. (John Wiley & Sons Eds.); 2010.; (c) Anastas, P. T.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301–312; (d) Trost, B. M. *Science* **1991**, 1471–1477; (e) Trost, B. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, 34, 259–281.
- (a) Klivanov, A. M. *Chemtech* **1986**, 16, 354–359; (b) Klivanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2767–2768; (c) Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klivanov, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7072–7076.
- (a) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Pergamon Press: Oxford, 1994. p 24; (b) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011.
- (a) Pavel, R. N. *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* **2003**, 6, 902–920; (b) Faber, K.; Riva, S. J. *Synth. Org. Chem.* **1992**, 895–910; (c) Zhu, B.; Panek, J. S. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2575–2578; (d) Maugard, T.; Tudella, J.; Legoy, D. *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 358–362; (e) Maugard, T.; Legoy, M. D. *J. mol. catal. B: Enzym.* **2000**, 8, 275–280; (f) Mcconnell, O.; Bachii, A.; Balibar, C.; Byrne, N.; Cai, Y.; Carter, G.; Chlenov, M.; Di, L.; Fan, K.; Goljer, I.; He, Y.; Herold, D.; Kagan, M.; Kerns, E.; Koehn, F.; Kraml, C.; Marathias, V.; Marquez, B.; McDonald, L.; Nogle, L.; Petucci, C.; Schlingmann, G.; Tawa, G.; Tischler, M.; Williamson, R. T.; Sutherland, A.; Watts, W.; Young, M. D.; Zhang, M. Y.; Zhang, Y.; Zhou, D.; Ho, D. *Chirality* **2007**, 19, 658–682.
- (a) Stercher, H.; Faber, K. *Synthesis* **1997**, 1–16; (b) Strauss, U. T.; Felfer, U. F.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 107–117; (c) Faber, K. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5005–5010; (d) Turner, N. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 401–406; (e) Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. H.; Azeeda, S. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 569–592; (f) Merabet-Khelassi, M.; Vriamont, N.; Riant, O.; Aribi-Zouieueche, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1790–1796.
- Boland, W.; Frossl, C.; Lorenz, M. *Synthesis* **1991**, 1049–1072.
- Wang, B.; Jiang, L.; Wang, J.; Ma, J.; Liu, M.; Yu, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 980–985.
- (a) Moreno, J. C. M.; Samoz, A.; de Campo, C.; Llama, E. F.; Sinisterra, J. C. V. J. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 95, 179–192; (b) Steenkamp, L.; Brady, D. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 32, 472–477.
- (a) Szatker, G.; Moczar, I.; Kolonists, P.; Novak, L.; Huszthy, P.; Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2483–2490; (b) Shimizu, N.; Akita, H.; Kawamata, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 2123–2131; (c) Belleza, F.; Cipiciani, A.; Riccib, G.; Ruzziconib, R. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8005–8012.
- (a) Shen, L.-L.; Jeong, J.-H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1647–1653; (b) Petucci, C.; Di, L.; Mcconnell, O. *Chirality* **2007**, 19, 701–705; (c) Kirschner, A.; Lenger, P.; Bornscheuer, U. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2871–2874.
- (a) Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721–1754; (b) Kazlauskas, R. J.; Weber, H. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 121–126; (c) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 2226–2254; (d) Janes, L. E.; Kazlauskas, R. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 3719–3733.
- Rakels, J. L. L.; Straathof, A. J. J.; Heijneii, J. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 93–100.
- (a) Kang, S. K.; Jeon, J.-H.; Yamaguchi, T.; Kim, J.-S.; Ko, B.-S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2139–2142; (b) Igarashi, Y.; Otsutomo, S.; Harada, M.; Nakano, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2833–2837; (c) Doussot, J.; Guy, A.; Garreau, R.; Falguieres, A.; Ferroud, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 2259–2262; (d) Aribi-Zouieueche, L.; Fiaud, J.-C. *Tetrahedron: Lett.* **2000**, 41, 4085–4088; (e) Joly, S.; Nair, M. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2283–2287; (f) Chênevert, R.; Gravi, S.; Bolte, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 2081–2086.
- (a) Goj, O.; Burchardt, A.; Haufe, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 399–408; (b) Goto, M.; Kawasaki, M.; Kometani, T. *J. mol. catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 245–250; (c) Machado, A. C. O.; da Silva, A. A. T.; Borges, C. P.; Simas, A. B. C.; Freire, D. M. G. *J. mol. catal. B: Enzym.* **2011**, 69, 42–46.
- (a) Bouzemi, N.; Debbeche, H.; Aribi-Zouieueche, L.; Fiaud, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 627–630; (b) Bouzemi, N.; Aribi-Zouieueche, L.; Fiaud, J. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 797–800; (c) Merabet, M.; Melaïs, N.; Boukachabia, M.; Fiaud, J.-C.; Aribi-Zouieueche, L. *J. Soc. Alg. Chim.* **2007**, 17, 185–194; (d) Merabet-Khelassi, M.; Bouzemi, N.; Fiaud, J.-C.; Riant, O.; Aribi-Zouieueche, L. C. R. *Chimie* **2011**, 14, 978–986.
- (a) Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294–7299; (b) Kagan, H. B.; Fiaud, J.-C. In *Kinetic Resolution Topics in Stereochemistry*, Eliel, E. L., Wilen, S. H., Ed.; J. Wiley & Sons, New York, 1988; Vol. 18, pp 249–330.
- Forro, E.; Schönstein, L.; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1255–1260.
- (a) Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouieueche, L.; Riant, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 2378–2384; (b) Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouieueche, L.; Riant, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1371–2377.
- Oda, S.; Wakui, H.; Ohashi, S. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, 112, 151–153.
- Okamoto, T.; Ueji, S. *Biotechnol. Lett.* **2000**, 22, 1169–1171.
- Sligin, S.; Takaç, S. *Chem. Eng. Technol.* **2007**, 30, 1739–1743.
- Tran-Ha, M. H.; Santos, V.; Wiley, D. E. *J. Membr. Sci.* **2005**, 251, 179–188.
- Naemura, K.; Murata, M.; Tanaka, R.; Yano, M.; Hirose, K.; Tobe, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1581–1584.
- Bidjou, C.; Aribi-Zouieueche, L.; Fiaud, J.-C. *J. Soc. Alg. Chim.* **1999**, 9, 261–268.

**“L’univers est dissymétrique”
Louis Pasteur (1893)**



**“La vie est l’orchestration de
processus catalysés par les enzymes”
(Willstätter 1912)**

