

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année / 2011

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister

## Thème

*Synthèse énantiosélective d'alcools chiraux via un  
dédoublément cinétique enzymatique combiné à une  
stéréoinversion chimique*

Option :

Synthèse organique et bio organique

Présenté par : M<sup>elle</sup> **GRIB Ismahene**

Devant le jury suivant :

M <sup>me</sup> <b>ZOUIOUECHE Louisa</b>	Pr	Présidente	U. Annaba
M <sup>elle</sup> <b>BOUZEMI Nassima</b>	M.C.A	Rapporteur	U. Annaba
M <sup>me</sup> <b>BOUMENDJEL Amel</b>	M.C.A	Examinatrice	U. Annaba
M <sup>elle</sup> <b>ZEROR Saoussen</b>	M.C.A	Examinatrice	U. Annaba

## ملخص

إن عملية الفصل الحركي للمزيج الراسيمي تشكل إحدى الطرائق الهامة للحصول على جزيئات ذات انتقائية ضوئية عالية، هاته الجزيئات يتم استئصالها في عدة مجالات وعلى رأسها الصناعات الصيدلانية و الغذائية. يتم استئصال عملية الفصل الحركي عن طريق الحلمة الإنزيمية في العديد من طرائق الاصطناع في الكيمياء الضوئية. في إطار هذا البحث قمنا بدراسة تفاعل الفصل الحركي عن طريق الحلمة الإنزيمية للحصول على سلسلة الاستينات الموافقة لكحولات أريل الكيل كاربينول ذات الفائدة الضمنية وذلك بشكل نقي ضوئياً. اهتمت دراستنا كذلك بتأثير كمية الليياز المثبتة *CAL-B* على النظام التفاعلي المتشكل من محلول مائي ذي **PH** ثابت و مذيب عضوي.

في قسم آخر من هذا البحث قمنا بدراسة مختلف المناهج الخاصة بالتفاعلات المؤدية إلى احد الاننتيوميرات بصفة حصرية وذلك انطلاقاً من الاستينات الراسيمية عن طريق الحلمة الإنزيمية المرفوقة بتفاعل كيميائي يلو كس البنية الفراغية لنماذج دراستنا.

الاستينات ذات البنية الفراغية (**S**) المتحصل عليها تمتاز بنقاوة انتوميرية عالية و كذلك بمرودود كيميائي جد مرضي.

## الكلمات الدالة

عملية الفصل الحركي، الليياز، الكحول الثانوية، الاننتيوميرية، الحلمة الإنزيمية.

## Abstract

The resolution of racemic mixtures presents an important route to obtain molecules of high optical purity. These molecules are implied in pharmaceutical and food industries.

The kinetic resolution by enzymatic hydrolysis is a very used approach in organic synthesis. In this study, we have used the kinetic resolution by enzymatic hydrolysis in order to reach a series of enantiomerically pur acetates corresponding to arylalkylcarbinols having a potential interest.

The study has also concerned the effect, of the amount of the immobilized lipase from *Candida antarctica* (CAL-B), on the reactional system constituted from a phosphate buffer solution and a cosolvent. Another part of this work develops deracemization processes that allow an exclusive access to one enantiomer from a racemic mixture of acetates through an enzymatic hydrolysis combined with a stereochemical inversion.

Acetates with (*S*) configuration of studied substrates are obtained with good enantiomeric excesses and very satisfactory yields.

**Key words:** Enzymatic kinetic hydrolysis, lipase, enantioselectivity, deracemization, Mitsunobu reaction.

## **Résumé**

Le dédoublement cinétique d'un mélange racémique constitue une voie importante pour obtenir des molécules de haute pureté optique. Ces molécules sont impliquées dans divers domaines telles que les industries pharmaceutiques et alimentaires.

La résolution cinétique par hydrolyse enzymatique est une voie d'accès très utilisée en synthèse organique.

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis en œuvre la réaction de dédoublement par hydrolyse enzymatique afin de parvenir à une série d'acétates correspondant aux arylalkylcarbinols d'intérêt potentiel, optiquement purs.

L'étude a concerné l'influence de la quantité de la lipase immobilisée *CAL-B* sur le système réactionnel constitué d'une solution tampon et d'un cosolvant. Une autre partie de ce travail développe les méthodes de déracémisation qui permettent un accès exclusif à un énantiomère, à partir d'un acétate racémique, par la réaction d'hydrolyse enzymatique combinée à une stéréoinversion chimique.

Les acétates de configuration (*S*) des substrats étudiés sont obtenus avec de bons excès énantiomériques et des rendements chimiques très satisfaisants.

### **Les mots clés :**

Dédoublement cinétique par hydrolyse, lipase, énantiosélectivité, déracémisation, réaction de Mitsunobu.

## Dédicace

*Je dédie ce travail à toute ma famille, mon père,  
ma mère et ma belle famille, je tiens à remercier  
tout particulièrement mon époux.*

## Remerciements

*Ce travail a été réalisé au « laboratoire de Synthèse Asymétrique et Biocatalyse » à l'université Badji Mokhtar de Annaba dirigé par Madame le Professeur Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE. Il m'est très agréable de lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Je remercie chaleureusement le docteur **Nassima BOUZEMI** de m'avoir dirigée tout au long de ce travail ; pour son aide et ses conseils judicieux ainsi que pour sa grande disponibilité et ses qualités humaines, sans lesquels ce travail n'aurait pas bien abouti. Qu'elle en soit vivement remerciée et qu'elle veuille croire en toute ma considération et tout mon respect*

*Je remercie les membres du jury de ma thèse pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et de juger mon travail :*

- **Pr. ZOUIOUECHE Louisa** pour avoir aimablement accepté d'assurer la présidence de ce jury. Qu'elle soit profondément remerciée.
- **Dr. BOUMENDJEL Amel** me fait la joie et l'honneur de porter un jugement critique à ce travail Qu'elle veuille croire en toute ma considération et tout mon respect.
- **Dr.ZEROR Saoussen** me fait également la joie et l'honneur d'examiner ce travail. Qu'elle soit vivement remerciée.

*Mes vifs remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à enrichir ce travail, tout particulièrement :*

**Monsieur le Professeur Claude Rabiller** du département de biochimie à Nantes qui nous a permis de faire les analyses chromatographiques chirales. Je remercie infiniment **Mme Marie-Joseph Bertrand** technicienne au laboratoire d'analyses chromatographiques au département de chimie de Nantes pour sa disponibilité et ses conseils.

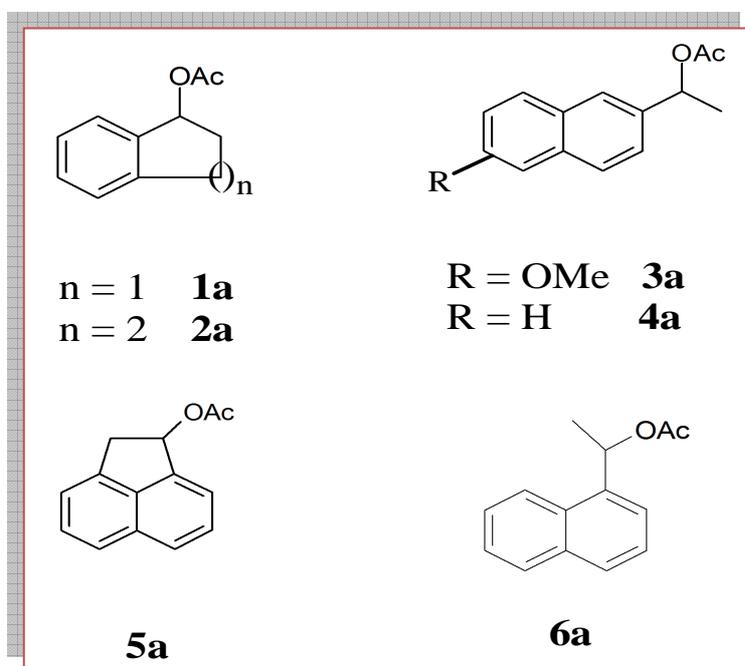
Mes vifs remerciements vont également à **Monsieur le Professeur Olivier Riant** qui nous a permis de compléter les analyses chromatographiques chirales au sein de son laboratoire de chimie organique et médicinale à l'université catholique de Louvain La Neuve.

*J'adresse mes vifs remerciement à toutes les chercheuses du laboratoire 10 « Synthèse asymétrique et biocatalyse » Nabila, Mounia, mourad, Zahia, Yazid, Menhel, Affaf et Nedjma pour leur sympathie et leur amitié.*

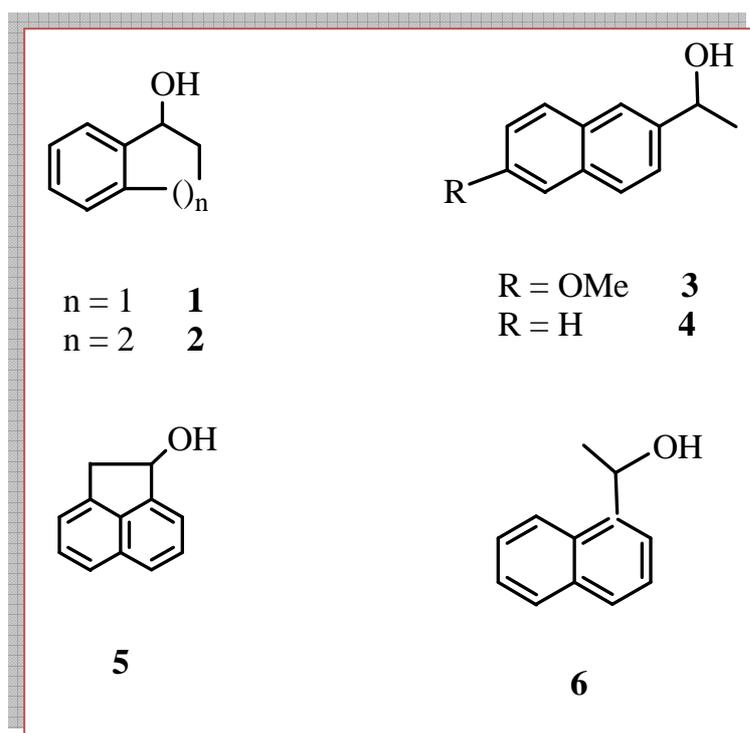
*Je ne manquerai pas cette occasion pour remercier tous mes enseignants de la faculté des sciences Badji Mokhtar Annaba*

## Les substrats étudiés

### Les acétates :



### Les alcools :



## Liste des symboles et des abréviations

<b>Symboles/Abréviations</b>	<b>Identification</b>
<b>ee</b>	Excès énantiomériques.
<b>C</b>	Taux de conversion.
<b>E</b>	Facteur de sélectivité.
<b>Enz</b>	Enzyme.
<b>ee<sub>S</sub></b>	Excès énantiomérique du Substrat.
<b>ee<sub>R</sub></b>	Excès énantiomérique du Produit.
<b>Rdt</b>	Rendement chimique.
<b>CAL B</b>	<i>Candida Antarctica</i> Lipase.
<b>IR</b>	Infrarouge.
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13.
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince.
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide à haute performance.
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention.
<b>DCE</b>	Dédoublment cinétique enzymatique
<b>DCD</b>	Dédoublment cinétique dynamique

## Liste des schémas

N°	Titre	Page
1	Activités biologiques des molécules chirales	2
2	Dédoublement d'un mélange racémique par formation de diastéréoisomères	4
3	Synthèse du taxane	7
4	Principe du dédoublement cinétique enzymatique	12
5	différence d'énergie des états de transition	13
6	Mécanisme réactionnel du dédoublement cinétique catalysé par les lipases.	14
7	Transestérification enzymatique du $\gamma$ -azidoalcool	17
8	Hydrolyse enzymatique du le 2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene	18
9	Hydrolyse enzymatique de l'ester 1-phenylsulfanyl-3-thiocyanatopropan-2-yl	18
10	Hydrolyse enzymatique de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate	19
11	Hydrolyse enzymatique de 1-arylallyl acétate	20
12	Influence de la nature d'enzyme dans la réaction d'hydrolyse enzymatique	20
13	Comparaison entre les principes de dédoublement et de déracémisation	23
14	Principe de racémisation	24
15	Mécanisme d'une racémisation catalysée par une base.	25
16	Mécanisme d'une racémisation par séquence d'oxydoréduction.	25
17	Principe de dédoubléments cinétiques répétés	26
18	Principe de dédoublement cinétique dynamique.	27
19	Déracémisation d'un acétate allylique par DCD	28
20	Dédoublement cinétique enzymatique des alcools secondaires combiné à un racémisation catalysée par un complexe de ruthénium	29
21	Dédoublement cinétique dynamique par transestérification du phényléthanol combinée à une racémisation par un complexe de ruthénium.	29
22	Principe de déracémisation par oxydoréduction cyclique	30
23	Déracémisation du 2-décanol par oxydoréduction cyclique	30
24	Principe de déracémisation de stéréoinversion	31
25	Déracémisation du précurseur d'un pyréthioïde par combinaison d'une hydrolyse et d'une stéréoinversion « in situ ».	32
26	Déracémisation par combinaison d'une transestérification et d'une stéréoinversion in situ	32
27	Mécanisme de la réaction de Mitsunobu	34
28	Déracémisation du précurseur d'un pyréthriinoïde par combinaison d'une hydrolyse enzymatique et d'une stéréoinversion « in situ » selon le protocole de Mitsunobu	35
29	Synthèse énantiosélective du (S)-dictyoprolène via une transestérification enzymatique suivie le protocole de Mitsunobu	35
30	Déracémisation du sulcatol.	36

<b>31</b>	Mise à profit de l'énantiocomplémentarité de la transestérification et de l'hydrolyse pour la déracémisation d'un alcool propargylique.	<b>37</b>
<b>32</b>	Modèles des substrats étudiés	<b>39</b>
<b>33</b>	Hydrolyse enzymatique du 1,2-dihydroacénaphthyl-1-yl acétate avec la PFL	<b>40</b>
<b>34</b>	Hydrolyse enzymatique du 1-(naphthen-1-yl) éthylacétate avec la PFL	<b>40</b>
<b>35</b>	Dédoubléement cinétique d'un acétate benzylique par hydrolyse enzymatique	<b>40</b>
<b>36</b>	Les substrats étudiés	<b>41</b>
<b>37</b>	Synthèse des alcools 2, 3 et 6 par réduction des cétones	<b>42</b>
<b>38</b>	Synthèse des acétates racémiques 1a-6a	<b>42</b>
<b>39</b>	DCE des acétates racémique 1a-6a par hydrolyse enzymatique	<b>43</b>
<b>40</b>	Modèles d'étude pour la déracémisation	<b>51</b>
<b>41</b>	Hydrolyse enzymatique combiné par la stéréoinversion selon le protocole de Mitsunobu des alcools produit 1-4	<b>53</b>
<b>42</b>	Acylation enzymatique et la stéréoinversion selon le protocole de Mitsunobu des alcools produit 1-4	<b>58</b>
<b>43</b>	comparaison de la déracémisation par acylation et par hydrolyse combinées à la réaction de Mitsunobu	<b>60</b>

## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Les différents niveaux de structure des enzymes.	<b>9</b>
<b>2</b>	Mode d'action des enzymes	<b>9</b>
<b>3</b>	Fréquence d'utilisation des enzymes	<b>11</b>
<b>4</b>	Dépendance des excès énantiomériques à la conversion	<b>16</b>
<b>5</b>	Rendement chimique maximum dans un processus de dédoublements et racémisation répétés	<b>26</b>

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Rendements chimiques des acétates racémiques 1a-6a	43
2	Dédoublément des acétates racémiques 1a-6a par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de <i>CAL-B</i>	44
3	Etude de l'influence de la diminution de la quantité de <i>CAL-B</i> sur son énantiosélectivité vis-à-vis du <b>1a</b> et <b>2a</b> .	47
4	Etude de l'influence de la diminution de la quantité de <i>CAL-B</i> sur son énantiosélectivité vis-à-vis du <b>3a</b> et <b>4a</b>	49
5	Etude de l'influence de la diminution de la quantité de <i>CAL-B</i> sur son énantiosélectivité vis-à-vis <b>5a</b> et <b>6a</b>	50
6	Déracémisation des substrats 1a-4a par un processus de résolution inversion	53
7	Tableau des résultats antérieurs de la déracémisation par acylation-inversion	58
8	Déracémisation des substrats 1a-4a par un processus d'hydrolyse- inversion	59

## Table des matières

Introduction générale.....	2
----------------------------	---

### *Chapitre I : Généralité sur le dédoublement cinétique enzymatique*

I-1 Introduction.....	7
I-2 Généralités sur les enzymes.....	8
I-2-1 Structure des enzymes.....	8
I-2-2 Classification des enzymes.....	10
I-2-3 Utilisation des hydrolases en synthèse organique.....	10
I-3 Généralités sur le dédoublement cinétique enzymatique.....	12
I-3-1 Principe du le dédoublement cinétique enzymatique.....	12
I-3-2 Mécanisme réactionnel.....	13
I-3-3 Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique.....	14
I-3-4 Variation des excès énantiomériques en fonction de la conversion.....	15
✱ Facteur de sélectivité faible.....	15
✱ Facteur de sélectivité élevé.....	15
I-4 Synthèse énantiosélective des alcools secondaires avec les hydrolases.....	16
I-4-1 Transésterification enzymatique.....	16
I-4-2 Hydrolyse enzymatique.....	17
I-5 Facteurs influant sur une réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique.....	18
I-5-1 Influence du solvant.....	18
I-5-2 Influence du substrat.....	19
I-5-3 Influence de la nature d'enzyme.....	20
I-5-5 Influence la température et du PH .....	21
I-6 Conclusion.....	21

### *Chapitre II : Généralité sur les méthodes de déracémisation*

II-1 Introduction.....	23
II-2 Principe de déracémisation.....	23
II-3 Stratégies de déracémisation.....	24
✱ Racémisation catalysée par une base .....	24
✱ Racémisation par une séquence d'oxydoréduction .....	25
✱ Racémisation catalysée par les enzymes .....	25
II-3-1-Méthode dédoublements cinétiques répétés.....	26
II-3-2 Dédoublements cinétiques dynamiques.....	27
II-3-3 Déracémisation par oxydoréduction cyclique.....	29
II-3-4 Processus de stéréoinversion.....	31
II-3-4-1 La réaction de Mitsunobu.....	33
II-3-4-2 Application de la réaction de Mitsunobu en synthèse organique.....	34

II-4 L'énantiocomplémentarité des réactions d'hydrolyse et de transestérification..	36
II-5 Conclusion.....	37

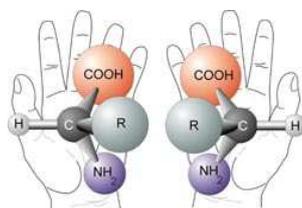
***Chapitre III : Synthèse énantiosélective des alcools chiraux***

III-1 Introduction.....	39
III-2 Etude bibliographique de l'hydrolyse enzymatique de ces modèles... ..	39
III-3 Synthèse des acétates racémiques 1a-6a .....	41
III-4 Dédoublément cinétique enzymatique des acétates racémique 1a-6a par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de <i>CAL-B</i> .....	43
III-5 Etude l'influence de la quantité d'enzyme utilisée sur la sélectivité de l'hydrolyse enzymatique.....	47
III-5-1- Cas du 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acétate (1a) et du 1,2,3,4-tetrahydro naphthalen-1-yl acétate (2a).....	47
III-5-2- Cas du 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) éthyle acétate (3a) et du 1-(naphthalen-2-yl) éthyle acétate (4a) .....	49
III-5-3- Cas du du1,2-dihydroacénaphthylen-1-yl acétate (5a) et du 1-(naphthalen-1-yl) éthyle acétate 6(a).....	50
III-6 Combinaison du protocole de Mitsunobu avec la réaction d'hydrolyse enzymatique.....	51
III-7 Déracémisation par résolution-inversion appliquée aux substrats 1a-4a .....	52
III-8 Etude comparative entre la déracémisation par acylation et par hydrolyse combinées à la réaction de Mitsunobu .....	58
III-9 Conclusion.....	61
Conclusion générale.....	63
Partie expérimentale .....	66

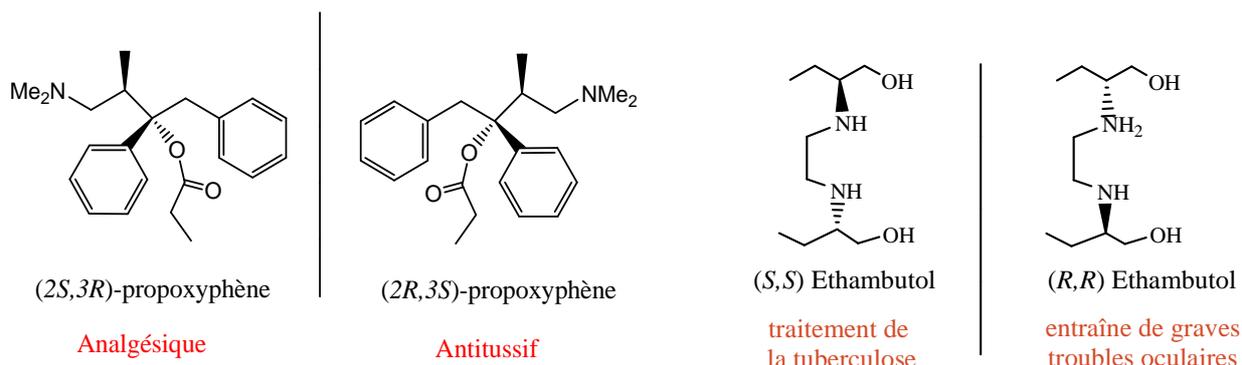
## INTRODUCTION GENERALE

## Introduction générale

La chiralité est inhérente au monde du vivant ; la vie elle-même en dépend puisqu'un grand nombre de fonctions biologiques et physiologiques reposent sur la reconnaissance moléculaire générée par la chiralité. Les acides aminés par exemple sont des fragments clés constitutifs des protéines structurales, des enzymes ou des récepteurs biologiques. Les interactions des systèmes vivants peuvent différer de façon notable, voire radicale, avec l'un ou l'autre des énantiomères. Nos mains fournissent le meilleur exemple de ce cas particulier de dissymétrie. L'étymologie de ce mot vient du grec « *χείρ* » qui signifie la main.



Ces dernières années, environ 80% des composés actifs présents dans les bibliothèques des industries pharmaceutiques<sup>1</sup> sont chiraux et ces chiffres sont en nette progression. En effet, la commercialisation d'une molécule à visée thérapeutique, sous sa forme racémique, s'avère de plus en plus difficile du fait d'une réglementation stricte, mise en place par la F.D.A. (US Food and Drugs Administration) et la Communauté Européenne. Depuis 1992, toute entreprise qui souhaite mettre sur le marché un nouveau composé racémique, se doit de caractériser individuellement les propriétés physiologiques de chacun des énantiomères et de démontrer que l'énantiomère indésirable n'a pas d'effets secondaires ou ne présente pas de toxicité.



**Schéma -1** *Activités biologiques des molécules chirales*

<sup>1</sup> M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, T. Zelinski *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, 43, 788-824.

Parfois, les énantiomères d'un médicament ont des propriétés thérapeutiques complètement différentes. Ainsi le (2*S*, 3*R*)-propoxyphène est un médicament analgésique tandis que son énantiomère est un antitussif. Nous citons également le cas de l'Ethambutol qui, sous sa forme (*S*, *S*), est utilisé pour le traitement de la tuberculose alors que son énantiomère (*R*,*R*) entraîne de graves troubles oculaires (schéma-1).

Depuis 1997, la F.D.A. encourage, par ailleurs, les entreprises pharmaceutiques à développer sous forme d'un unique énantiomère ("single-isomer program") leurs médicaments disponibles sous formes racémiques, en accélérant les processus d'enregistrement et de mise sur le marché des formes énantiopures permettant ainsi de prolonger les brevets des produits racémiques arrivés à expiration. En termes purement médicaux, l'existence de ces médicaments sous forme énantiopure permet d'injecter de moindres doses de produits aux patients et à priori d'atteindre une meilleure efficacité. D'un point de vue économique, si l'un des énantiomères est inactif, la synthèse énantiosélective de la molécule permet d'éviter la perte de la moitié des matières premières engagées ou la mise en place d'une méthode de recyclage.

Face à ces exigences commerciales et médicales, la demande en produits chiraux énantiopures s'est fortement accrue; ce qui a contribué au développement soutenu, ces dernières années, de voies de synthèses énantiosélectives.

Deux stratégies distinctes rassemblent l'essentiel des méthodes de préparation de molécules chirales énantiomériquement enrichies ou énantiopures :

**1-**Une première catégorie en pleine expansion regroupe les réactions basées sur la formation d'un nouveau centre stéréogène de manière stéréocontrôlée<sup>2</sup>. Pour cela, il est nécessaire que le centre réactif soit dans un environnement stéréodéterminant lors de l'état de transition de la réaction. Ceci peut être induit soit par le substrat lui-même, chiral à l'origine (centre stéréogène ou auxiliaire chiral) soit par l'utilisation d'un réactif chiral sur un substrat prochiral. Des avancées notables ont été réalisées en synthèse asymétrique<sup>3</sup> ces trois dernières décennies et plus particulièrement avec l'apport de la chimie organométallique et l'essor de la

---

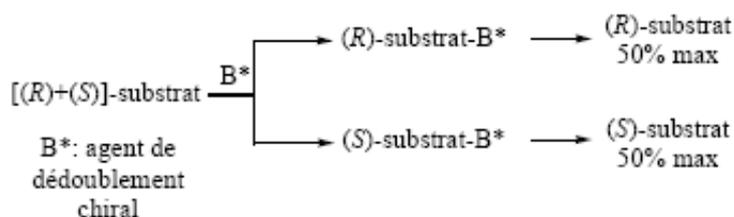
<sup>2</sup> H.B. Kagan, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2449-2468.

<sup>3</sup> J.D. Morrison, *Asymmetric Organic Reactions*, Vols. 1-5, Academic Press: New York, **1983-1985**.

catalyse énantiosélective<sup>4</sup>. L'attribution du Prix Nobel en 2001 à R. Noyori, W.S. Knowles et K.B. Sharpless pour leurs travaux dans les domaines de l'hydrogénation et de l'oxydation asymétriques en témoigne<sup>5</sup>.

**2-**L'autre approche est basée sur le dédoublement d'un mélange d'énantiomères; stratégie encore majoritairement exploitée à l'échelle industrielle.

L'obtention d'un unique énantiomère par dédoublement peut reposer sur une méthode de séparation conventionnelle dite "statique" (Schéma -2-) comme la cristallisation préférentielle (qui implique l'utilisation d'une quantité stoechiométrique d'agent de dédoublement chiral) ou sur une technique, largement utilisée, qui exploite la différence de réactivité des énantiomères vis à vis d'un réactif chiral (agent chimique en quantité stoechiométrique ou catalytique, enzyme...). Il s'agit alors de dédoublement cinétique<sup>6</sup>.



**Schéma -2** Dédoublement d'un mélange racémique par formation de diastéréoisomères

Les enzymes peuvent jouer le rôle des catalyseurs dans ces méthodes donnant ainsi lieu à la biocatalyse. La chiralité intrinsèque de ces protéines leur confère la faculté de différencier les énantiomères d'une molécule chirale afin de les séparer et évaluer leurs activités biologiques.

Cependant, l'inconvénient majeur de cette dernière méthodologie, à savoir le dédoublement cinétique demeure la limitation du rendement chimique à 50% au maximum ; ce qui, en termes d'économie d'atomes n'est pas très satisfaisant<sup>7</sup>. De plus, si un seul des énantiomères est désiré, la moitié de la matière est perdue ou doit être recyclée.

<sup>4</sup> a) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley: New York, **1994**. b) E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis I-III*, Springer: New York, **1999**. c) I. Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 2nd Ed., Wiley: New York, **2000**.

<sup>5</sup> a) R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2008-2022. b) W.S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1998-2007. c) K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2024-2032.

<sup>6</sup> a) H.B. Kagan, J.C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, 18, 249-330. b) J.M. Keith, J.F. Larrow, E.N. Jacobsen *Adv.Synth. Catal.* **2001**, 343, 5-26.

<sup>7</sup> B.M. Trost *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 259-281.

Les stratégies de déracémisations qui succèdent aux dédoublements cinétiques enzymatiques sont actuellement en progression pour remédier à cet inconvénient et permettre l'obtention de molécules énantiopures et efficaces avec des rendements chimiques très élevés<sup>8</sup>.

*Le thème de recherche développé par notre groupe est orienté essentiellement vers la synthèse énantiosélective et la catalyse enzymatique de substrats chiraux à haute valeur ajoutée, constituant un intérêt majeur pour la recherche fondamentale, l'industrie du médicament, celle des arômes ou de l'agro-alimentaire. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une thématique qui vise l'obtention de molécules énantiopures avec de bons rendements chimique en utilisant une méthode de déracémisation adéquate.*

*Ce sujet de mémoire constitue également une suite de travaux antérieurs<sup>9</sup>, concernant la déracémisation via une transestérification enzymatique d'une série d'arylalkylcarbinols.*

*Il vise à étudier la réaction d'hydrolyse enzymatique des acétates correspondants en les soumettant par la suite à la même méthode de déracémisation dans le but de mettre en évidence l'énantiocomplémentarité des deux réactions, à savoir, l'acylation et l'hydrolyse enzymatique.*

*\* Le premier chapitre permet une mise au point bibliographique sur les enzymes, la réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique et les facteurs influant sur la réaction de dédoublement cinétique enzymatique.*

*\* Le deuxième chapitre est consacré à une mise au point bibliographique des différentes méthodes de déracémisation, qui permettent d'atteindre un seul énantiomère avec un meilleur rendement chimique à partir d'un mélange racémique.*

*\* Dans le troisième chapitre nous étudierons la synthèse énantiosélective d'alcools chiraux par hydrolyse enzymatique d'une série d'acétates benzyliques combinée à la stéréoinversion chimique, selon le protocole de Mitsunobu.*

*Pour terminer, les protocoles expérimentaux et les résultats d'analyse sont réunis dans la partie expérimentale et une conclusion générale finalise les résultats de ce mémoire.*

---

<sup>8</sup>a) Kroutil.W, Faber.K, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913, b) Strauss.U, Felfer.U, Faber.K, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.

<sup>9</sup> N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.

## CHAPITRE I

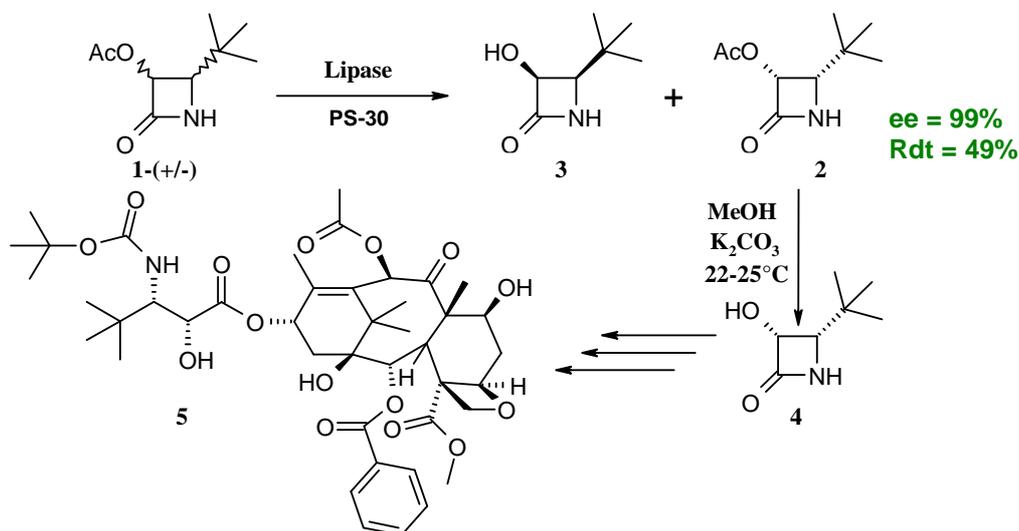
### *Généralités sur le dédoublement cinétique enzymatique*

## I-1-Introduction :

Au cours de l'année **1833**, A. Payen et J. Persoz isolèrent un complexe enzymatique de malt, le nommant diastase<sup>10</sup>. Dans les années qui suivirent, de nombreux biocatalyseurs furent isolés, notamment la lipase de pancréas par Claude Bernard en **1840**. Il fallut néanmoins attendre **1878** pour que Kùch introduise le terme moderne *enzyme*<sup>11</sup>. Après; l'emploi des enzymes a connu un succès remarquable et a entrouvert des perspectives étonnantes.

Actuellement, le nombre de procédés industriels faisant appel à la biocatalyse enzymatique pour la synthèse dans de nombreux secteurs : pharmaceutique, alimentaire, agrochimique, ou des parfums ne cesse d'augmenter. En synthèse organique, la demande de composés optiquement purs et actifs biologiquement aussi bien que de leurs précurseurs est en constante augmentation. Parmi ces méthodes nous nous sommes intéressés au dédoublement cinétique enzymatique des mélanges racémiques, qui représente une méthode de choix pour la synthèse de nombreux médicaments.

Le composé chiral (3*R*)-cis-3-acétyloxy-4-(1,1-diméthylethyl)-2-azétidinone **2** a été préparé pour la semi synthèse du nouveau taxane **5**, un médicament anticancéreux actif<sup>12</sup>. La synthèse du taxane **5** comporte une étape biocatalysée. (Schéma-3)



**Schéma-3 :** Synthèse du taxane

<sup>10</sup> A. Payen, J. F. Persoz, *Ann. Chim. Phys.*, **1833**, 53, 73–92.

<sup>11</sup> L. Penasse, *les enzymes: cinétique et mécanisme d'action*, **1974**.

<sup>12</sup> W.C. Rose, B. H. Long, C. R. Fairchild, F. Y Lee, J. F. Kadow, *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 2016–2021.

Le mélange racémique cis-3-acétyloxy-4-(1,1-diméthylethyl)-2-azétidinone **1a** été dédoublé<sup>13</sup> par hydrolyse enzymatique en présence de la lipase immobilisée PS-30. L'acétate résiduel **2** (Acétoxy β-lactam) a été obtenu avec un excès énantiomérique >99% et un rendement >48%. Ce dernier a été converti en hydroxy β-lactam **4** pour usage dans la semi-synthèse de **5**.

## I-2- Généralités sur les enzymes :

Les enzymes sont des édifices macromoléculaires de nature protéique qui jouent le rôle de catalyseurs avec une efficacité et une spécificité fonctionnelle, elles sont utilisées souvent pour obtenir des molécules chirales à haute pureté optique.

En 1893, Wilhelm Ostwald montra que les enzymes sont des catalyseurs et en 1894 Emil Fisher posa l'acte fondateur de la notion de stéréospécificité dans le phénomène de catalyse enzymatique sous l'image d'une clé qui ouvre une serrure et une seule.

Les mécanismes moléculaires de la catalyse enzymatique ne posent pas de problèmes différents de ceux de la réactivité chimique. Soit la réaction élémentaire catalysée



Où E est l'enzyme, S est le substrat et P le produit.

Les biocatalyseurs sont capables d'accélérer la vitesse de la réaction jusqu'à cent milliards ( $10^{11}$ ) de fois la vitesse de la réaction spontanée en diminuant l'énergie d'activation<sup>14</sup>. Ainsi elles offrent une façon propre et écologique d'exécuter des processus chimiques en conditions douces et avec un haut degré de sélectivité<sup>15</sup>

### I-2-1- Structure des enzymes :

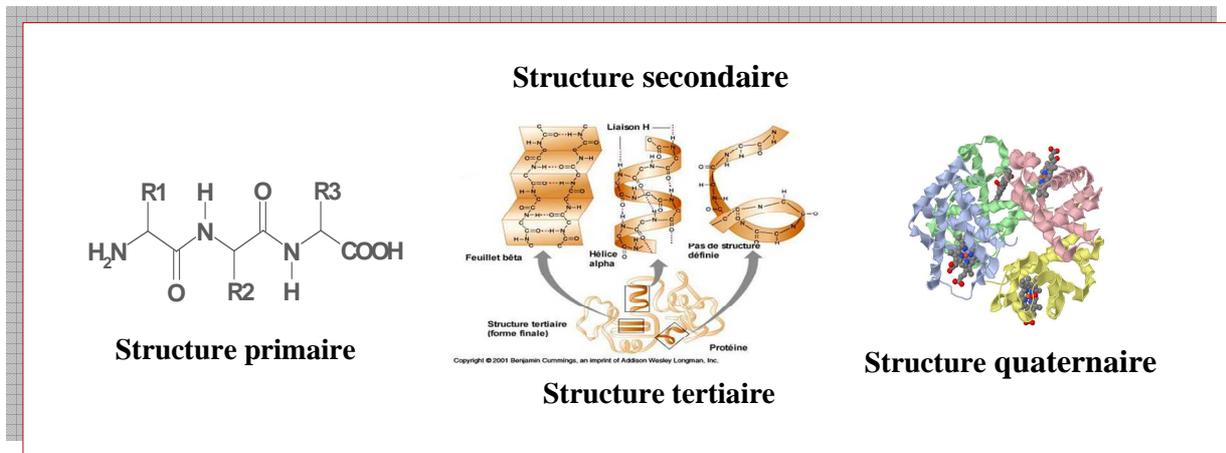
Les enzymes sont des protéines qui sont elles-mêmes des enchaînements des acides aminés de configuration *L*. La structure primaire est la séquence des acides aminés. On reconnaît principalement les structures en hélice α et feuillet β qui représentent la structure secondaire. La structure tertiaire se rapporte aux relations dans l'espace des différentes

<sup>13</sup> R.N. Patel, J. Howell, R. Chidambaram, S. Benoit, J. Knt, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3673-3677.

<sup>14</sup> Ref 11 : L. Penasse, *les enzymes: cinétique et mécanisme d'action*, **1974**.

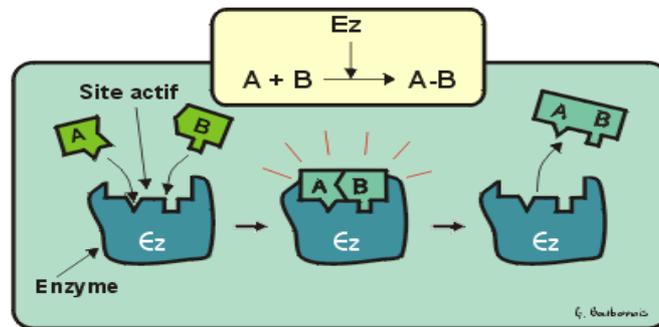
<sup>15</sup> V. Gotor-ferrandez, R.Brieva, V. Gotor, *J .molecular catalysis B: enzymatic*. **2006**, 40, 111-120.

structures; hélices et feuillets. Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation de la structure quaternaire (figure-1)



**Figure-1 :** Les différents niveaux de structure des enzymes.

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure (secondaire et tertiaire) d'un site particulier appelé *le site actif*. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques. Une fois fixés, les substrats vont réagir et se transformer en produits (figure-2).



**Figure-2 :** Mode d'action des enzymes

L'enzyme illustrée ci-dessus catalyse une réaction chimique au cours de laquelle une molécule  $A$  se lie à une molécule  $B$  pour former la molécule  $AB$ . On constate que chacune des deux molécules a une affinité avec le site actif de l'enzyme. Lorsque  $A$  et  $B$  sont fixés dans le site actif, elles sont exactement dans les bonnes conditions pour former une liaison entre elles et former  $AB$ . À la fin de la réaction, la nouvelle molécule  $AB$  se détache de l'enzyme qui, de ce fait, peut à nouveau recommencer la même réaction. L'enzyme n'est pas

altérée par la réaction. Une même enzyme peut refaire la même réaction des milliers de fois à la seconde.

### I-2-2- Classification des enzymes :

Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Il y a six classes principales<sup>16</sup> :

1	<b>oxydoréductases</b>	catalysent les réactions d'oxydoréduction des alcools, cétones, aldéhyde....
2	<b>transférases</b>	transfèrent les groupes : monocarboné, azoté, phosphorés etc...
3	<b>hydrolases</b>	hydrolysent des liaisons esters, amides, thioester
4	<b>lyases</b>	permettent la formation des doubles liaisons ou l'addition des groupements fonctionnels sur ces liaisons (C=C, C=O, C=N).
5	<b>isomérases</b>	permettent l'isomérisation-racémisation
6	<b>ligases</b>	effectuent des synthèses avec une source d'énergie (formation des liaisons (C-O, C-C, C-N, C-S).

Parmi les enzymes les plus utilisées par les chimistes dans le domaine de recherche ou celui de l'industrie, les hydrolases (qui proviennent de diverses origines : animales, fongiques, végétales...) sont les plus importantes, elles ont l'avantage de ne pas utiliser de coenzyme, ainsi leur manipulation est aisée et leur coût est faible.

### I-2-3- Utilisation des hydrolases en synthèse organique :

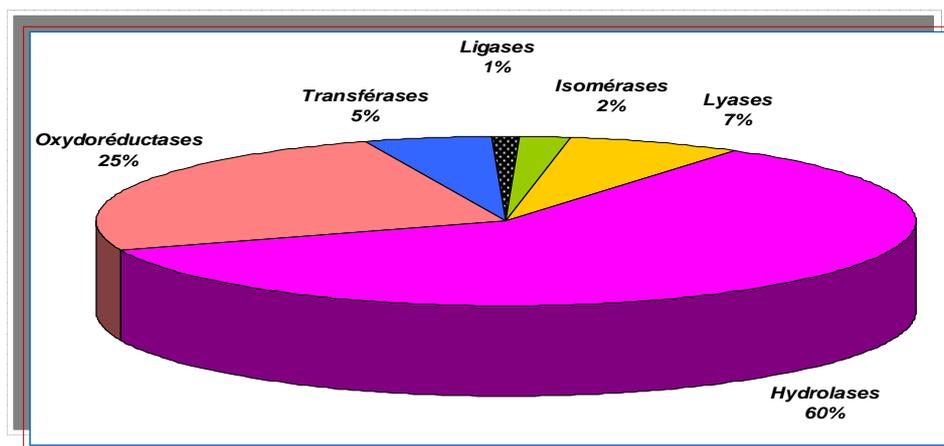
Depuis le milieu des années quatre vingt et grâce aux premiers travaux de Klibanov<sup>17</sup> qui a montré la réactivité des enzymes dans un milieu organique en présence d'un minimum d'eau qui est le milieu naturel des enzymes, l'exploitation de ces biocatalyseurs dans les biotransformations en synthèse organique a connu un développement notable. Comme nous l'avons signalé précédemment, les hydrolases sont les plus fréquemment sollicitées lors des

<sup>16</sup> D.Voet, G. Rousseau, « Biochimie », 2005.

<sup>17</sup> a) B. Cambou, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2687, b) G. Kirchner, M. P Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7072, c) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767.

biocatalyses et les lipases qui en font partie sont largement utilisées<sup>18</sup>. Cette classe d'enzyme est capable d'exécuter des réactions d'hydrolyses énantiosélectives<sup>19</sup>

Nous nous sommes intéressés aux hydrolases plus précisément aux lipases qui sont les enzymes les plus sollicitées par le chimiste organicien, la figure-3 illustre la fréquence d'utilisation des enzymes<sup>20</sup>.



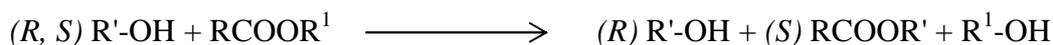
**Figure-3 :** Fréquence d'utilisation des enzymes

Les quatre grands types de réactions où interviennent les lipases sont les suivants :

✿ **Estérification d'un acide par un alcool**



✿ **Transesterification de l'alcool**



✿ **Hydrolyse d'un ester**



✿ **Inter estérification de deux esters**



Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés aux réactions de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique des esters racémiques.

<sup>18</sup> K. Faber, "Biotransformation in Organic Chemistry", Springer, Heidelberg, 1995.

<sup>19</sup> B. G. Davis, V. Boyer, *J. Royal Society of Chemistry.*, 2001, 18, 618–640.

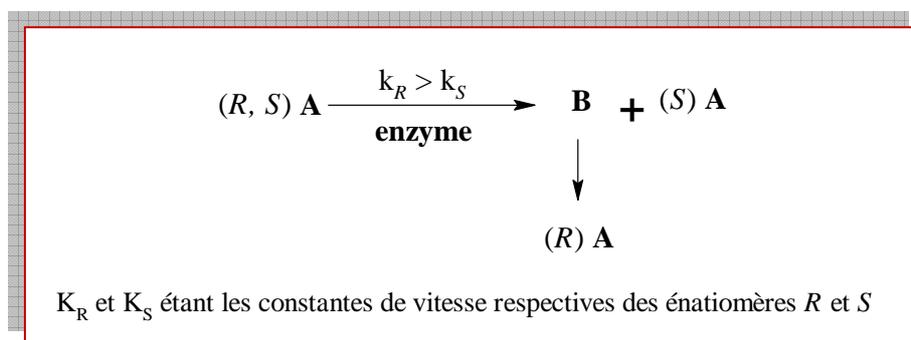
<sup>20</sup> K. Faber, "Biotransformation in organic chemistry", 5th edition. Springer, 22. 2004.

### I-3- Généralités sur le dédoublement cinétique enzymatique :

Les composés optiquement purs peuvent être obtenus par synthèse asymétrique ou par dédoublement de mélanges racémiques. Les deux méthodes ont ceci en commun qu'elles font souvent appel à une substance naturelle chirale laquelle constitue la source primaire d'activité optique. Malgré les progrès incessants de la synthèse asymétrique, le dédoublement des mélanges racémiques reste un procédé très utile du point de vue industriel<sup>21</sup> car les mélanges racémiques sont prédominants lors des diverses synthèses organiques.

#### I-3-1- Principe du dédoublement cinétique enzymatique :

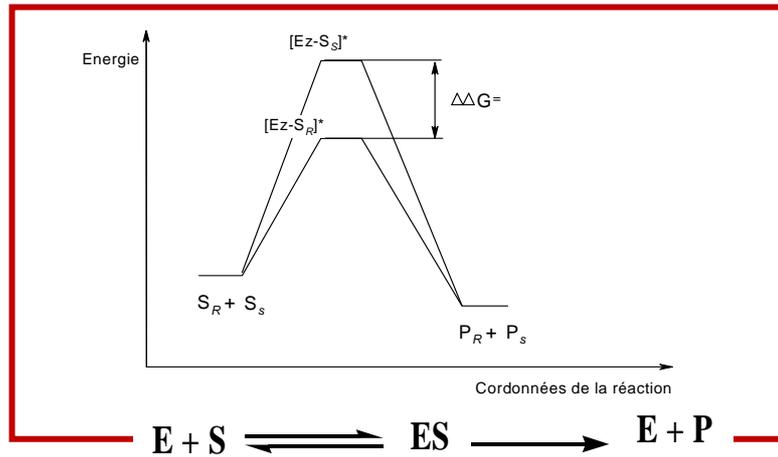
Le dédoublement cinétique enzymatique permet de séparer deux énantiomères existant en mélange dans un racémique en transformant sélectivement un seul des deux, l'origine de l'énantiosélectivité est liée à la différence de vitesse de réaction de chaque énantiomère vis-à-vis d'une enzyme (schéma-4).



**Schéma-4:** Principe du dédoublement cinétique enzymatique

La différence dans les vitesses de réaction des deux énantiomères  $A_R$  et  $A_S$ , découle de la différence d'énergie libre des états de transition ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) des deux complexes enzyme-substrat,  $[Ez- A_R]^*$  et  $[Ez- A_S]^*$  (schéma-5)

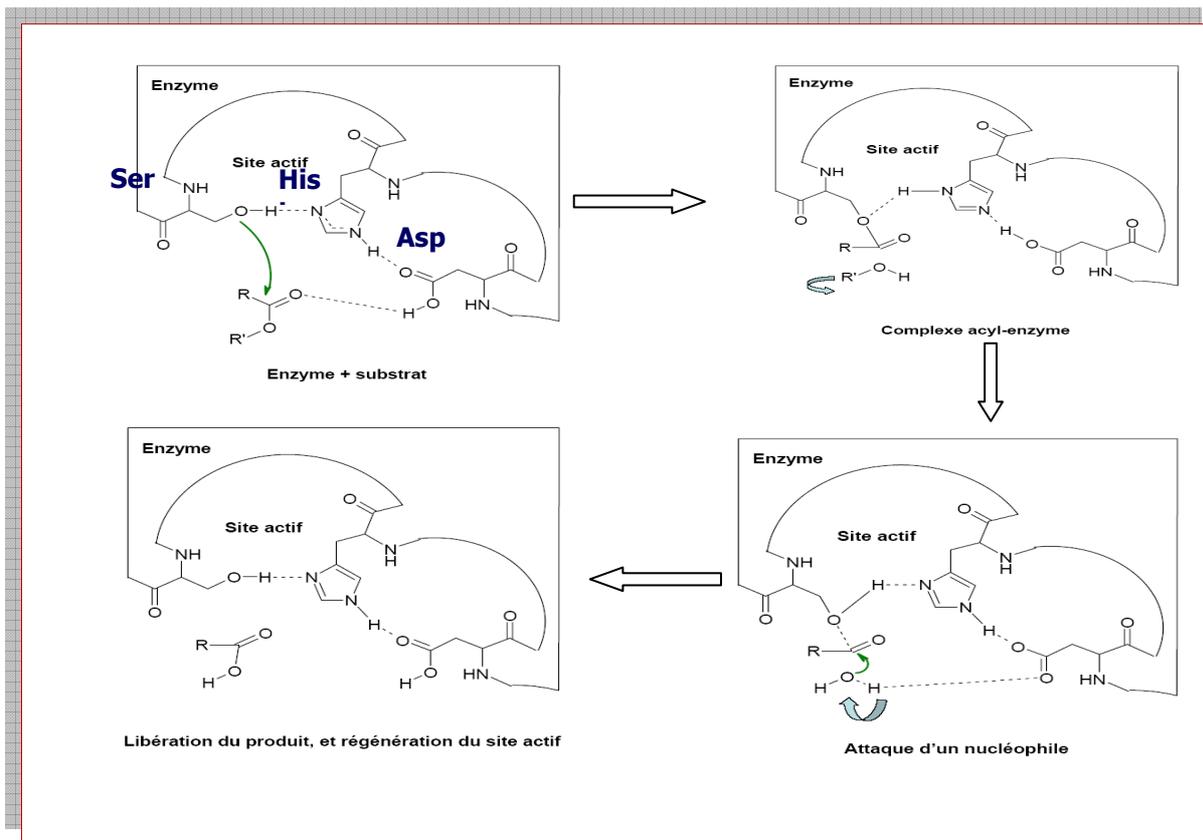
<sup>21</sup> a) J. Touet, L. Faveriel, E. Brown, *Tetrahedron*, **1995**, 51-6, 1709-1720. b) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneib, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 3331-3351.



**Schéma-5:** différence d'énergie des états de transition

### I-3-2- Mécanisme réactionnel :

Le mécanisme réactionnel du dédoublement cinétique avec les lipases est similaire à l'hydrolyse chimique catalysée par une base. Trois acides aminés responsables de la réaction d'hydrolyse du substrat, *l'acide aspartique* (ASP), *l'histidine* (HIS), et *la sérine* (SER). Ces trois acides aminés constituent ce qu'on appelle la triade catalytique. La triade catalytique polarise la liaison OH de la sérine qui devient très acide et capable de protoner l'histidine dans une première étape. Une fois le complexe acyle-enzyme est formé, il survient l'attaque d'une entité nucléophile. Le cycle catalytique se termine par la libération du produit et la régénération du site actif (Schéma-6).



**Schéma-6 :** Mécanisme réactionnel du dédoublement cinétique catalysé par les lipases.

### I-3-3- Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique :

L'efficacité du dédoublement cinétique et la réactivité enzymatique dépendent des paramètres, qui sont identifiés à des relations mathématiques décrites par Kagan et Fiaud<sup>22</sup> ainsi que Sih<sup>23</sup> et coll

- ✓ L'excès énantiomérique (*ee*) : caractérise la pureté énantiomérique du mélange racémique par un des deux énantiomères.

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \quad \text{Equation.1.}$$

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

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad 0 < C < 1 \quad \text{Equation.2.}$$

<sup>22</sup> H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "Kinetic Resolution". *Topics in Stereochemistry*, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Eds; J. Wiley & sons, Inc. Newyork, **1988**, 18, 249-330.

<sup>23</sup> C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294-7299.

- ✓ Le facteur de sélectivité ( $E$ ) : ce paramètre caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour son énantiomère. il est déterminé par le rapport des vitesses des deux énantiomères en compétition dans la réaction.

$$E = \frac{K_R}{K_S} \quad \text{Equation.3.}$$

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - C(1 + ee_p)]}{\text{Ln}[(1 - C)(1 - ee_p)]} \quad \text{Equation.4.}$$

$$E = \frac{\text{Ln}[(1 - C)(1 - ee_s)]}{\text{Ln}[(1 - C)(1 + ee_s)]} \quad \text{Equation.5.}$$

### I-3-4- variations des excès énantiomériques en fonction de la conversion :

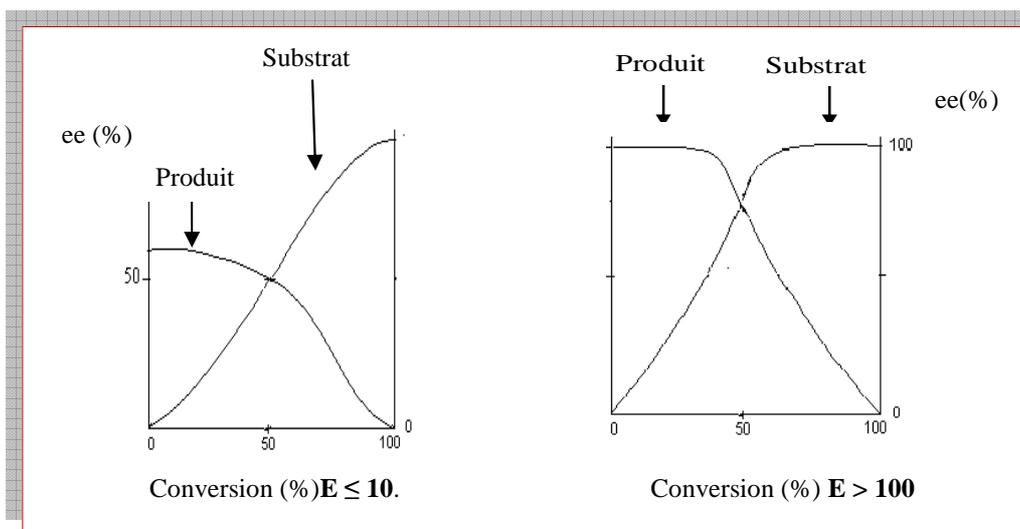
Le facteur de sélectivité  $E$  est exprimé par le taux d'avancement ( $C$ ) de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique, et respectivement ( $ee_s$ ) l'excès énantiomérique du substrat n'ayant pas réagi et ( $ee_p$ ) l'excès énantiomérique du produit formé. L'obtention d'une haute pureté énantiomérique est liée à la rapidité avec laquelle le site actif peut différencier entre les deux énantiomères ainsi que la préférence ou la reconnaissance enzyme-substrat. En effet, si la pureté énantiomérique du produit de départ augmente celle du produit de la réaction doit nécessairement diminuer. Deux cas extrêmes se visualisent :

#### ✿ Facteur de sélectivité faible :

Pour un facteur de sélectivité faible ( $E \leq 10$ ) l'énantiomère n'ayant pas réagi peut être obtenu avec enrichissement optique élevé à une conversion très avancé et l'autre antipode optique avec un excès énantiomérique médiocre.

#### ✿ Facteur de sélectivité élevé :

Dans le cas où ( $E > 100$ ) on pourrait obtenir les deux énantiomères d'un racémique avec une haute pureté optique en un seul dédoublement.



**Figure-4 :** Dépendance des excès énantiomériques à la conversion

#### **I-4- Synthèse énantiosélective des alcools chiraux par les hydrolases :**

Les alcools secondaires chiraux ont un intérêt chimique majeur, quand ils sont disponibles sous la forme optiquement pure, pour la synthèse de composés biologiquement actifs<sup>24</sup>. Les alcools primaires présentent généralement des sélectivités moins importantes ; ceci est probablement dû à l'éloignement de la fonction hydroxyle du centre asymétrique. Les alcools tertiaires sont encore plus difficiles à dédoubler selon les données de la littérature.

De nombreux travaux<sup>25</sup> ont été effectués sur la résolution des alcools secondaires chiraux avec les hydrolases par transestérification et hydrolyse enzymatiques énantiosélectives. Ces réactions sont les plus utilisées car elles sont très efficaces et applicables à un grand nombre de substrats.

##### **I-4-1- Transestérification enzymatique :**

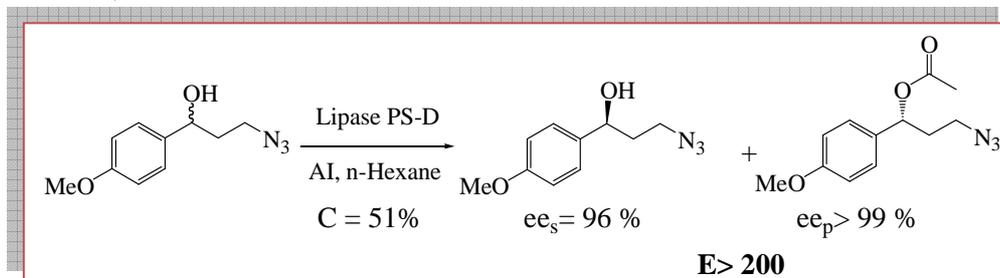
La réaction de transestérification enzymatique est très intéressante pour la résolution des alcools racémiques. Le principe de cette résolution est basé sur une estérification

<sup>24</sup> U. Andreoni, G. Baggi, S. Bernasconi, F. Pelizzoni, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1990**, 33, 633-636.

<sup>25</sup> C.H. Wong, G.M. Whiteside, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon press, Oxford, **1994**, 70-98.

énantiosélective d'un énantiomère du mélange racémique de l'alcool par un agent acylant en présence d'une lipase.

L'exemple suivant<sup>26</sup> illustre l'acylation enzymatique du  $\gamma$ -azidoalcool avec la lipase immobilisée de (*PS-D*) dans le n-hexane, en utilisant l'acétate d'isopropényle comme agent acylant (schéma-7).



**Schéma-7 :** Transestérification enzymatique du  $\gamma$ -azidoalcool.

Les deux énantiomères ont été récupérés avec de bons excès énantiomériques  $ee_s=96\%$  et  $ee_p=99\%$ , à un facteur de sélectivité supérieur à 200.

#### I-4-2- Hydrolyse enzymatique :

Depuis l'utilisation de la première réaction énantiosélective en présence des enzymes pancréatiques en 1900, l'hydrolyse enzymatique a fait un avancement considérable et a été appliquée dans la production industrielle pour l'obtention de composés optiquement actifs.<sup>27</sup>

La réaction de l'hydrolyse enzymatique se déroule généralement dans un système biphasique et la lipase agit sur des substrats insolubles en phase aqueuse. Elle a lieu à l'interface eau/substrat<sup>28</sup>. Il est également possible d'obtenir des alcools avec de bonnes puretés optiques à partir des esters racémiques en présence de lipases dans un mélange solvant/solution tampons.

A.Ghanem et coll<sup>29</sup> ont effectué l'hydrolyse enzymatique du 2-acétoxy-4-phényl-but-3-ène, en présence de la lipase de *CAL-B*. Les deux énantiomères ont été obtenus avec des excès énantiomériques élevés  $ee_s = 80\%$  et  $ee_p = 99\%$ , à un facteur de sélectivité supérieur à 150 (schéma-8).

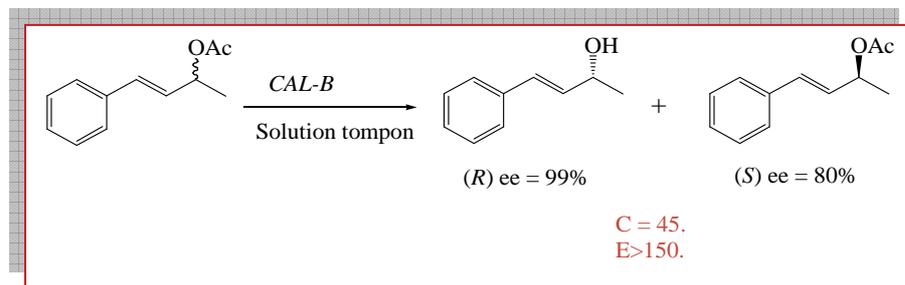
<sup>26</sup> A. Kamal, M. Shaheer Malik, A.A. Shaik, S. Azeza, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1078-1083.

<sup>27</sup> (a) R.D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37, 1608-1633;

(b) A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 548-556.

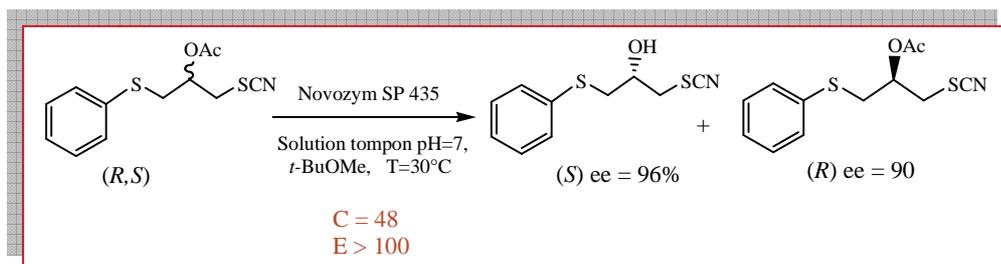
<sup>28</sup> P. Fickers, J. Destain, P.Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, 12 (2), 119-130.

<sup>29</sup> A.Ghanem, V. Schurig *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 57-62.



**Schéma-8 :** Hydrolyse enzymatique de l'ester 2-acétoxy-4-phénylbut-3-ène.

Un autre exemple<sup>30</sup> décrit la réaction du dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de l'ester 1-phénylsulfanyl-3-thiocyanatopropan-2-yl, en présence de Novozym SP 435. Les deux énantiomères ont été obtenus avec des excès énantiomériques élevés  $ee_s = 90\%$  et  $ee_p = 96\%$ , à un facteur de sélectivité supérieur à 100.



**Schéma-9 :** Hydrolyse enzymatique de l'ester 1-phénylsulfanyl-3-thiocyanatopropan-2-yl.

## I-5- Facteurs influant sur une réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique :

De nombreux facteurs peuvent influencer sur la réactivité et la sélectivité dans la réaction d'hydrolyse enzymatique notamment, le solvant, la structure du substrat, la nature de l'enzyme ainsi que le pH et la température.

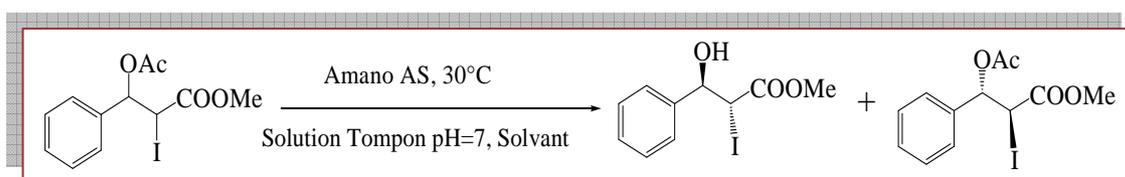
### I-5-1 Influence du solvant :

<sup>30</sup> E. Łukowska, J. Pleniewicz, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2007**, 18, 493-499.

Le solvant joue un rôle important dans les résolutions cinétiques enzymatiques et des modifications importantes de l'activité d'une enzyme peuvent être observées selon la nature du solvant utilisé. Plusieurs travaux ont démontré l'utilité de choisir des solvants qui contiennent un minimum d'eau pour que l'enzyme fonctionne dans les milieux organiques.<sup>31</sup>

Dans le cas des réactions d'hydrolyse enzymatique, le solvant principal est constitué par la solution tampon qui est le milieu aqueux alors que le liquide organique ajouté est considéré comme un co-solvant afin d'augmenter la solubilité du substrat organique dans le milieu réactionnel.

Dans l'exemple suivant qui décrit la réaction de l'hydrolyse de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate, les résultats montrent des différentes sélectivités selon le solvant organique utilisé<sup>32</sup>. L'addition du toluène et de l'acétonitrile, à la solution tampon, s'est avérée bénéfique en termes de taux de conversion et d'énantiosélectivité. En présence de l'hexane, utilisé comme co-solvant, seule la réactivité est améliorée.



**Schéma-10** : Hydrolyse enzymatique de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate.

Solvants	Temps (h)	ee <sub>s</sub> (%)	ee <sub>p</sub> (%)	C (%)	E
Sans solvant	144	17	96	15	32
Toluène	18	76	97.4	44	176
Acétonitrile	12	63	97	40	128
Hexane	76	78	85	47	28

### I-5-2- Influence du substrat :

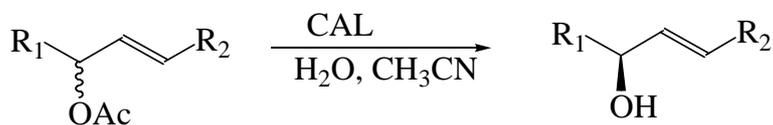
La structure du substrat est un facteur important qui influe considérablement sur l'énantiosélectivité. L'exemple suivant illustre l'hydrolyse enzymatique du 1-arylallyl acétate avec la lipase de *Candida antartica-B* (CAL-B) dans le solvant (eau/acétonitrile).

<sup>31</sup>(a) A. M. Klivanov, *Chemtech*, **1986**, 16, 354-359.

(b) A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2767-2768.

<sup>32</sup> N. Anand, M. Kapoor, S. Koul, S.C. Taneja, R. L. Sharma, G.N. Qazi, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2004**, 15, 3131-3138.

La résolution cinétique par hydrolyse enzymatique montre des résultats différents selon le substituant utilisé<sup>33</sup> (schéma 11). Il est à constater que le substrat avec un substituant électroattracteur manifeste un taux d'hydrolyse plus rapide que son homologue non substitué. Par contre, un substituant donneur d'électrons ralentit la réaction d'hydrolyse et la pureté énantiomérique est indéterminée dans ce cas.

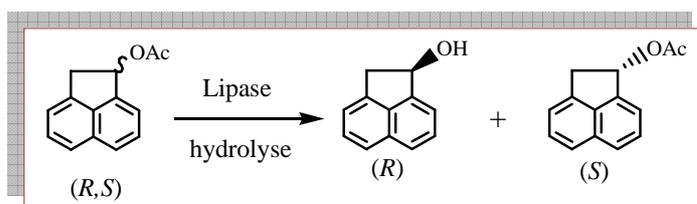


**Schéma-11 :** Hydrolyse enzymatique de 1-aryllallyl acétate

	Durée (h)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	ee <sub>p</sub> (%)
1	24	Ph	H	>99
2	3	<i>p</i> -CN-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
3	48	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	-

### I-5-3- Influence de la nature d'enzyme :

L'activité et l'énantiosélectivité varient d'une enzyme à une autre et grâce à leur stéréospécificité, les enzymes ne donnent pas des résultats identiques avec le même substrat. Cette observation peut être illustrée par l'exemple suivant<sup>34</sup>



**Schéma-12 :** Influence de la nature d'enzyme dans la réaction d'hydrolyse enzymatique.

Lipase (mg)	Temps (h)	ee <sub>s</sub> (%)	ee <sub>p</sub> (%)	C (%)	E
PFL (50)	90	99	99	<b>50</b>	<b>&gt;800</b>
LGL (100)	24	81	51	<b>61</b>	<b>8</b>

<sup>33</sup> E. N. Kadnikova, V. A. Thakor, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2008**, 19, 1053-1058

<sup>34</sup> L. Aribi-Zouiouche, J.C. Fiaud, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 4085-4088

Pour le même substrat, la lipase de *pseudomonas fluorescens* (*PFL*) montre une réactivité et une sélectivité importante par rapport à la lipase *gastrique du lapin* (*LGL*). L'affinité de la *PFL* vis-à-vis de ce substrat est supérieure à celle de la *LGL*.

#### **I-5-4- Influence de la température et du pH :**

L'activité des enzymes est fortement affectée par les changements de pH et de température. Chaque enzyme qui fonctionne le mieux à un certain pH et à une température déterminée voit son activité diminuée à des valeurs qui s'écartent de ces points. Ceci est dû à l'importance de la structure tertiaire de l'enzyme en raison des interactions ioniques et des liaisons hydrogène qui déterminent la forme du site actif.

Les enzymes fonctionnent donc le mieux à une température optimale. Elles sont dénaturées et leur site actif perd sa forme et cesse de fonctionner à températures trop élevées bien que les lipases immobilisées soient plus robustes et supportent des températures qui s'approchent de 80°C (la *CAL-B* en fournit l'exemple d'une lipase qui peut être immobilisée sur résine acrylique).

Comme avec la température, les enzymes ont un pH optimal. Si le pH varie beaucoup, la nature chimique des acides aminés peut changer. Il peut en résulter un changement dans les liens de la structure tertiaire qui peut se décomposer. Le site actif sera perturbé et l'enzyme sera dénaturée également.

#### **I-6 Conclusion :**

Les hydrolases sont les biocatalyseurs les plus sollicités en chimie organique, leurs caractéristiques stéréo-, régio-, et énantiosélectives les mettent parmi les catalyseurs les plus doués pour accéder aux molécules optiquement enrichies. Les lipases et les estérases sont les plus utilisées en chimie fine

Dans ce chapitre nous avons défini la réaction de dédoublement cinétique enzymatique qui permet l'accès aux composés optiquement actifs. Nous avons choisi la réaction d'hydrolyse enzymatique qui constitue un mode d'accès très intéressant aux alcools chiraux et leurs acétates correspondants. Divers paramètres peuvent influencer d'une manière

significative sur le déroulement de la réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique.

## CHAPITRE II

### *Généralités sur les méthodes de déracémisation*

## II-1- Introduction :

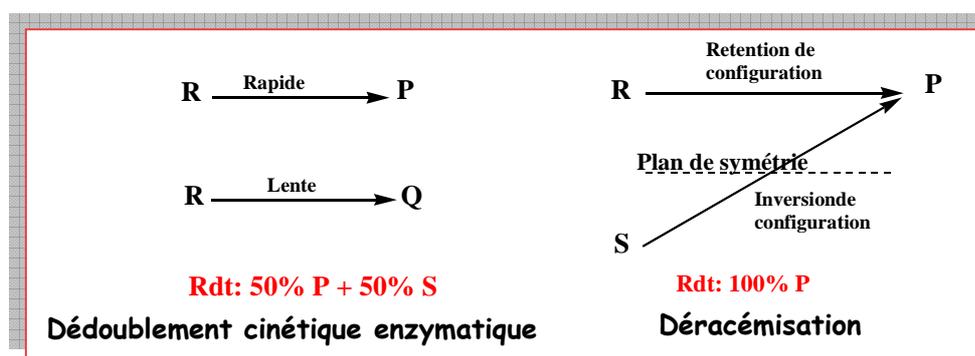
La forte demande qui concerne les médicaments chiraux sous formes énantiomériquement pures a dirigé la recherche académique vers de nouvelles méthodes, lesquelles autorisent la transformation d'un mélange racémique en un produit d'un seul énantiomère avec un rendement chimique théorique qui s'approche de 100%. Ces molécules sont devenues des cibles principales de la synthèse organique contemporaine<sup>35, 36</sup>.

Ces dernières années, le développement des stratégies de déracémisation<sup>37</sup> a permis d'obtenir un énantiomère unique avec un rendement chimique quantitatif, à partir du dédoublement cinétique enzymatique d'un mélange racémique.

## II-2- Principe de déracémisation :

Le dédoublement cinétique enzymatique du mélange racémique d'une molécule chirale donne lieu à deux produits selon les vitesses des deux énantiomères. L'un sous forme de produit obtenu et l'autre sous forme du substrat résiduel, et par conséquent le rendement théorique de chaque énantiomère ne peut jamais dépasser la limite de 50% de conversion<sup>38</sup>. Pour pallier à cet inconvénient, qui réside dans la perte de la moitié du produit de départ notamment dans le cas où seul un énantiomère est souhaité, la déracémisation présente la solution idoine. Elle permet d'aboutir exclusivement à un énantiomère avec une excellente pureté optique et un rendement chimique théorique de 100%.

La déracémisation repose sur le changement de la stéréochimie de l'énantiomère qui réagit le plus lentement afin d'accroître la quantité de celui qui réagit le plus rapidement dans la réaction de transesterification et l'inverse dans la réaction d'hydrolyse (schéma-13-).



**Schéma-13 :** Comparaison entre les principes de dédoublement et de déracémisation

<sup>35</sup> K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5004–5010.

<sup>36</sup> U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.

<sup>37</sup> a) R. S. Word, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1790. b) W. Kroutil, K. Faber *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913. c) U. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.

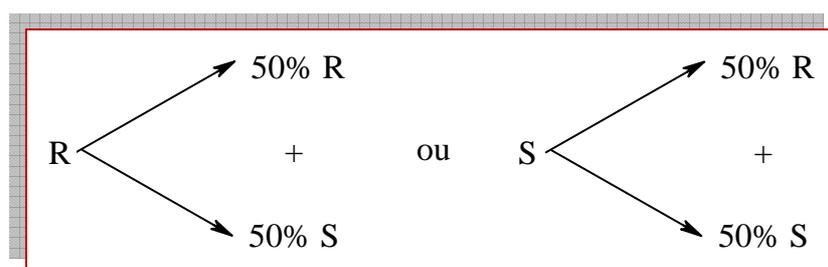
<sup>38</sup> **Ref 36:** U.T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.

### II-3- Stratégies de déracémisation :

Depuis un peu plus d'une décennie, plusieurs méthodes de déracémisation ont abouti à la synthèse de molécules énantiomériquement pures à partir de mélanges racémiques et ceci en atteignant des rendements chimiques très satisfaisants<sup>39</sup>. Elles concernent des :

- ✿ Dédoubléments cinétiques répétés.
- ✿ Dédoubléments cinétiques dynamiques.
- ✿ Processus de stéréo inversion.
- ✿ Déracémisation par oxydoréduction cyclique.

Avant d'entamer une description des différentes approches répertoriées de déracémisation, il importe de définir le processus de racémisation ; c'est une transformation d'un composé optiquement actif en un composé racémique. Le schéma 14 en fait l'illustration :



**Schéma-14** : Principe de racémisation

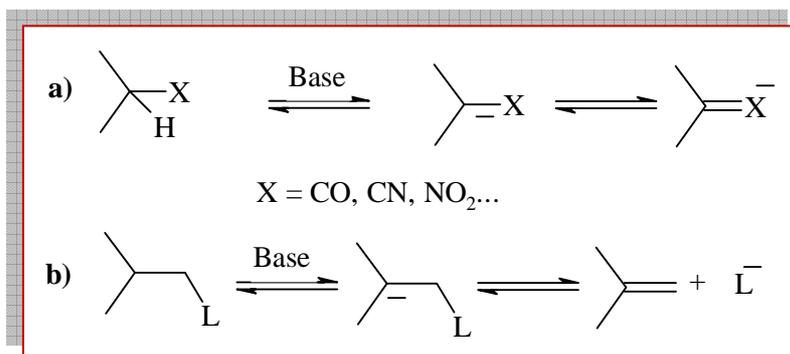
La racémisation peut se produire à travers plusieurs chemins<sup>40</sup>, nous citons ci-dessous les méthodes de racémisation les plus fréquemment utilisées et citées dans la littérature.

#### ✿ Racémisation catalysée par une base

Cette racémisation peut être appliquée pour les composés ayant un hydrogène labile porté sur le centre asymétrique, elle implique l'élimination de l'hydrogène du centre chiral pour former un carbanion. Cet anion est stabilisé soit par la présence d'un groupement adjacent tel un carbonyle, un nitrile ou d'autres groupements fonctionnels (schéma-15 (a)), soit par une  $\beta$ -élimination réversible (schéma-15 (b)).

<sup>39</sup> a) R.S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490. b) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis*, **1997**, 1-6, c) W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913. d) U. Strauss, U. Felper, K. Faber, *Tetrahedron Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117. e) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 5005-5010. f) F.F. Huerta, J.E. Backvall, *Org.Lett.*, **2001**, 3, 1209-1212. g) M. Edin, B. Martin-Matute, J.E. Backvall, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 708-715. h) M. Stirling, J. Blacker, M.I. Page, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 1247-1250.

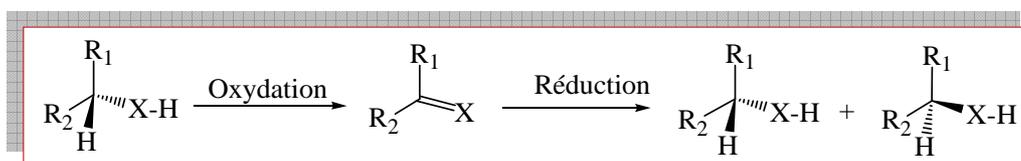
<sup>40</sup> E.J. Ebberts, G.J.A. Ariaans, J.P.M. Houbiers, A. Bruggink, B.Zwanenburg, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 9417.



**Schéma-15** : Mécanisme d'une racémisation catalysée par une base.

### ✿ Racémisation par une séquence d'oxydoréduction

Des réactions d'oxydation et de réduction consécutives permettent d'effectuer une racémisation des composés ayant un hétéroatome adjacent au centre stéréogène (alcools, amines,...). L'oxydation élimine l'hydrogène du carbone asymétrique, générant un intermédiaire de géométrie plane. La réduction restaure l'état d'hybridation initial de façon non sélective, donnant lieu à un mélange racémique (schéma-16).



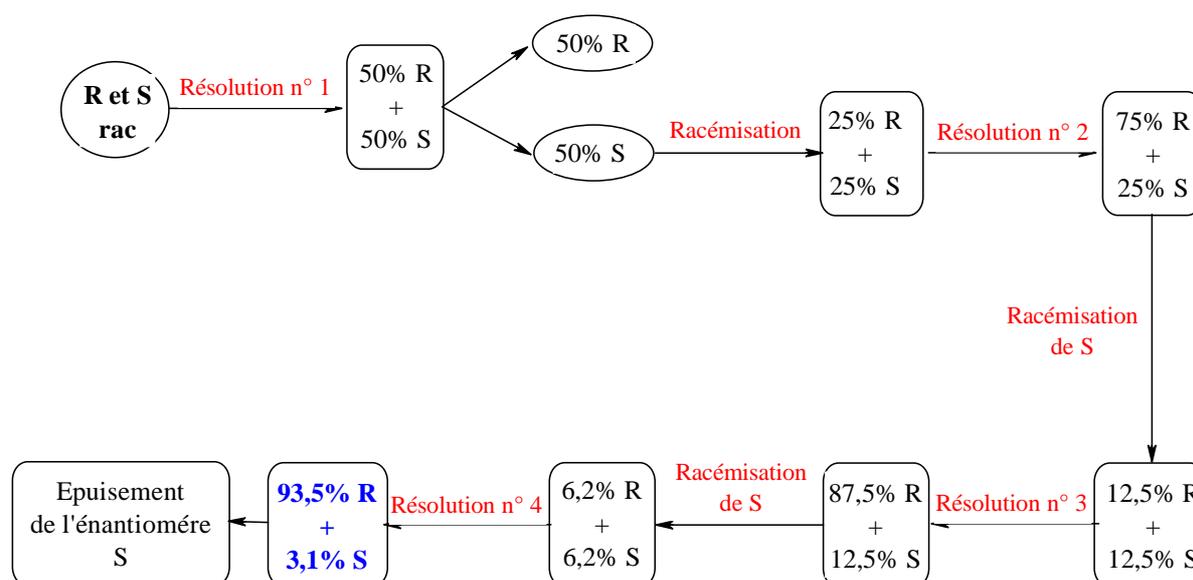
**Schéma-16** : Mécanisme d'une racémisation par séquence d'oxydoréduction.

### ✿ Racémisation catalysée par les enzymes

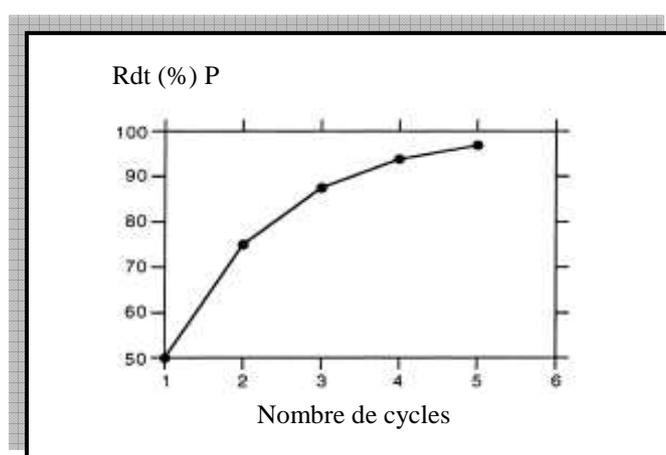
De nombreux biocatalyseurs ont été décrits comme étant efficaces dans des réactions de racémisation. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les conditions opératoires où elles se déroulent sont extrêmement douces : température ambiante, pression atmosphérique et pH neutre, sa grande chimiosélectivité et l'absence de produits secondaires.

### II-3-1- Méthode de dédoublements cinétiques répétés :

Afin d'éviter la perte de la moitié du substrat, une pratique de recyclage est devenue courante suite aux dédoublements cinétiques des mélanges racémiques. Après la séparation du produit désiré, l'énantiomère indésirable est soumis à une nouvelle résolution dans un nouveau cycle. Ainsi, après chaque racémisation effectuée, le mélange racémique nouvellement obtenu est soumis encore à un dédoublement identique au premier jusqu'à la consommation totale de tout l'énantiomère indésirable. Le schéma-17 et la figure-5 suivants illustrent le parcours de cette méthode dans le cas idéal :



**Schéma-17:** Principe de dédoublements cinétiques répétés

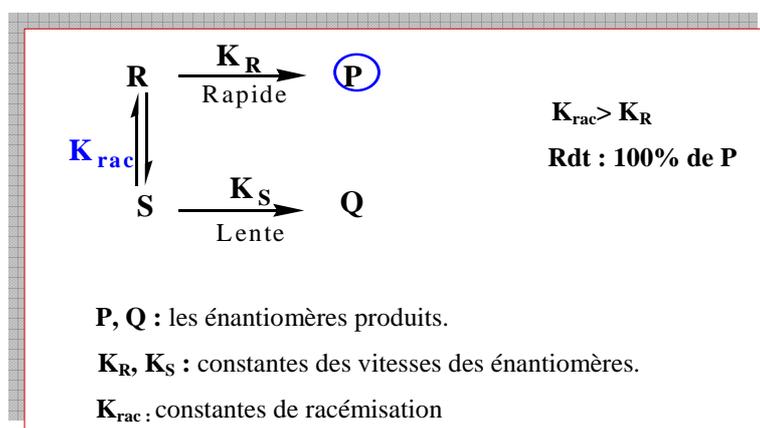


**Figure-5:** Rendement chimique maximum dans un processus de dédoublements et racémisation répétés

On peut voir sur la figure 5 que le rendement global du produit P atteint une valeur de plus de 95% après seulement cinq cycles, à condition que les deux réactions (dédoublément cinétique et racémisation) soient effectuées sans perte de produit. Théoriquement cette méthode est efficace mais pratiquement elle présente des inconvénients, car plusieurs étapes de séparation sont laborieuses et inadéquates pour envisager réellement un bon rendement chimique.

### II-3-2 Dédoubléments cinétiques dynamiques :

Contrairement au dédoublément cinétique répété la racémisation du dédoublément cinétique dynamique s'effectue « *in situ* » pour recycler l'énantiomère résiduel. Le schéma - 18 montre le principe du dédoublément cinétique dynamique<sup>41</sup>.



**Schéma-18:** Principe du dédoublément cinétique dynamique.

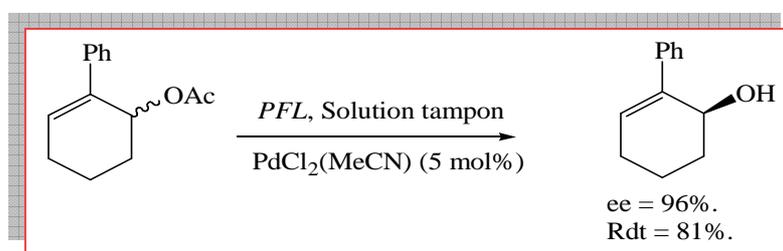
Le dédoublément cinétique dynamique peut intervenir si le substrat racémique de départ est rapidement racémisable dans les conditions de la réaction. Cette racémisation peut être biocatalysée, réalisée chimiquement ou produite spontanément *in situ* (du fait des propriétés intrinsèques du substrat).

Afin d'obtenir un dédoublément cinétique dynamique, plusieurs conditions sont requises simultanément :

<sup>41</sup>a) R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1995**, 68, 36-56. b) R.S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490. c) S. Caddick, K. Jenkins, *Chem. Soc. Rev*, **1996**, 447-456. d) R. Azerad, D. Buisson, *Curr. Opin. Chem. Biol*, **2000**, 11, 565-571. e) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 8291-8327. f) B. Martin-Matute, J.E. Bakvall, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, 11, 1-7.

- ☀ la racémisation au niveau du centre labile ( $K_{rac}$ ) doit être plus rapide que la consommation du substrat ( $K_R, K_S$ ) :  $K_{rac} > K_R, K_S$ .
- ☀ le réactif chiral doit être suffisamment sélectif vis à vis d'un des deux énantiomères du mélange racémique de départ :  $K_R \gg K_S$ .
- ☀ la réaction doit être irréversible et les produits formés relativement stables dans les conditions de la réaction.

Dès 1996, l'équipe de J. Williams a démontré la compatibilité des deux systèmes : enzymes et complexes de métaux de transition en décrivant le premier exemple de DCD chimioenzymatique d'acétates allyliques par hydrolyse. Cette réaction faisait appel à une lipase comme biocatalyseur et un complexe de palladium (II) comme catalyseur induisant la racémisation via un complexe  $\pi$ -allyle (Schéma-19)<sup>42</sup>.



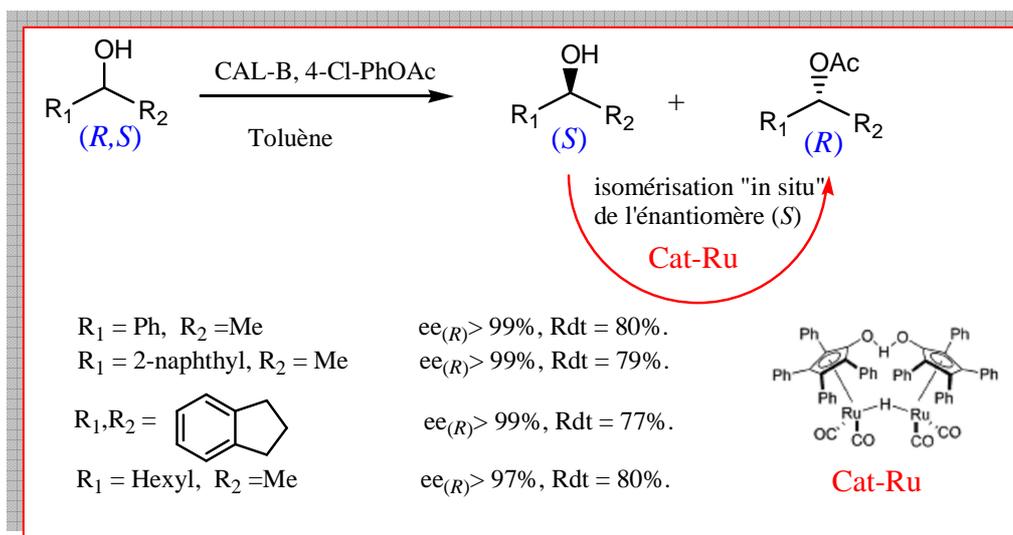
**Schéma-19** : Déracémisation d'un acétate allylique par DCD

Dans cette optique, l'équipe de Backvall<sup>43</sup> a développé ce processus en l'appliquant, avec succès, dans la réaction de transestérification enzymatique d'une variété d'alcools secondaires racémiques. Les acétates correspondants de configuration (*R*) sont obtenus avec de bons rendements chimiques et d'excellentes puretés optiques.

Le complexe de ruthénium binucléaire mis en jeu constitue un excellent système de racémisation de l'alcool résiduel de configuration (*S*). Le schéma -20- démontre l'efficacité de cette méthode :

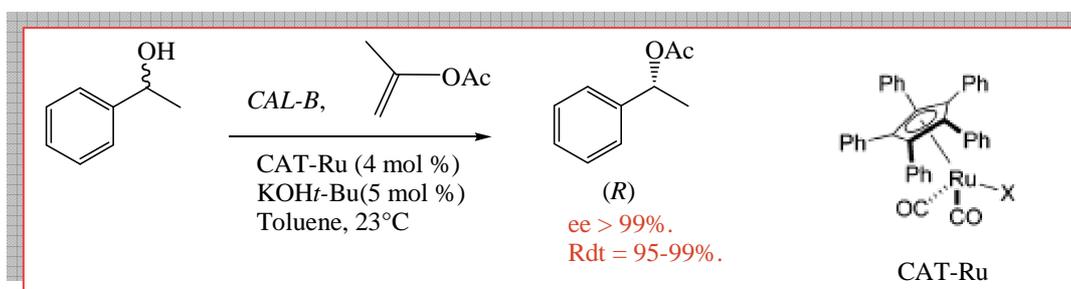
<sup>42</sup> J.V. Allen, J.M.J. Williams, *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37, 1859-1862.

<sup>43</sup> B. A. Persson, A.L.E. Larsson, M. Le Ray, J.E. Backvall, *J.Am.Chem.Soc.*, **1999**, 121, 1645-1650.



**Schéma -20** : Dédoublage cinétique enzymatique des alcools secondaires combiné à une racémisation catalysée par un complexe de ruthénium.

Un autre travail de l'équipe de Backvall<sup>44</sup> a concerné le phényléthanol comme substrat racémique qui a subi une réaction de transestérification enzymatique. Un nouveau complexe au ruthénium, compatible avec les esters d'énol, a été utilisé pour effectuer la racémisation « *in situ* » de l'alcool résiduel. L'acétate correspondant de configuration (R) est obtenu avec un bon rendement chimique et un excès énantiomérique élevé (schéma-21).



**Schéma- 21** : Dédoublage cinétique dynamique par transestérification du phényléthanol combinée à une racémisation par un complexe de ruthénium.

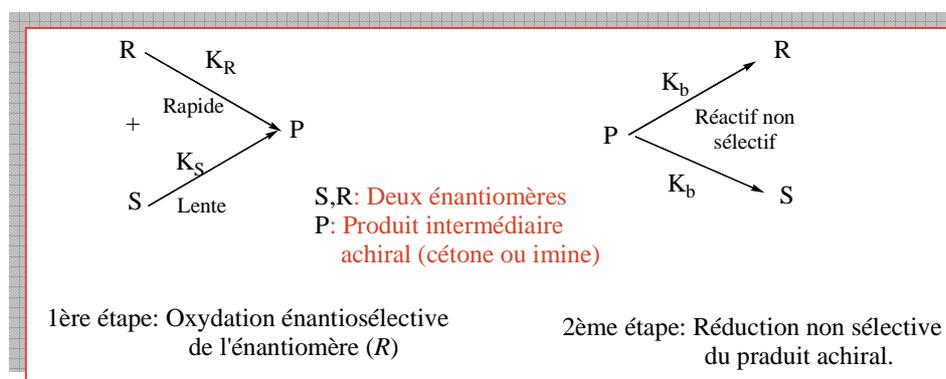
### II-3-3 Déracémisation par oxydoréduction cyclique :

La déracémisation des composés chiraux portant un groupement hydroxy ou amino peut être atteinte grâce à un nouveau procédé consistant en une séquence cyclique d'oxydoréduction<sup>45</sup>. Le système se compose de deux réactions indépendantes décrites dans le schéma-22. Premièrement, l'énantiomère le plus rapide de l'alcool ou l'amine secondaires est

<sup>44</sup> B. Martin-Matute, M. Edin, K. Bogar, F.B. Kaynak, J.E. Backvall, *J.Am.Chem.Soc.*, **2005**, 127, 8817-8825.

<sup>45</sup> W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913.

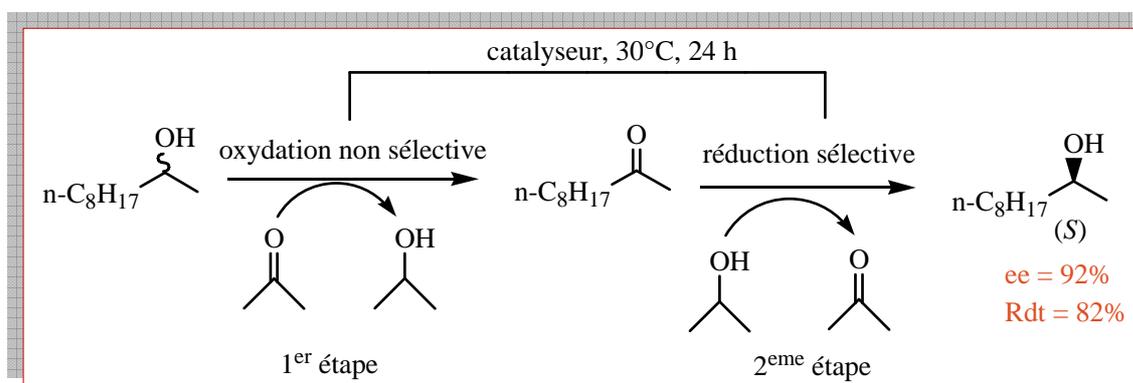
oxydé sélectivement. Le produit achiral intermédiaire obtenu (cétone ou imine) est réduit de manière non sélective pour fournir à nouveau le mélange racémique et le cycle se poursuit jusqu'à extinction de l'énantiomère à recycler.



**Schéma-22** : Principe de déracémisation par oxydoréduction cyclique

La répétition cyclique de ces deux étapes combinées mène à une déracémisation totale, où l'énantiomère réagissant le plus lentement est obtenu comme seul produit avec un rendement chimique théorique de 100%.

L'alcool racémique 2-decanol a été déracémisé<sup>46</sup> via une réaction biocatalytique, par une séquence de l'oxydation/réduction. Les auteurs ont utilisé le même biocatalyseur (cellules entières) pour les deux étapes. L'acétone a été utilisée comme accepteur de l'hydrogène dans la première étape. Au cours de la seconde étape et pour la réduction de la cétone correspondante, le 2-propanol a été employé comme un donneur de l'hydrogène. Le racémique 2-decanol a été transformé en (S)-2-decanol avec un excellent excès énantiomérique  $ee = 92\%$  et un bon rendement chimique  $82\%$  (schéma-23).



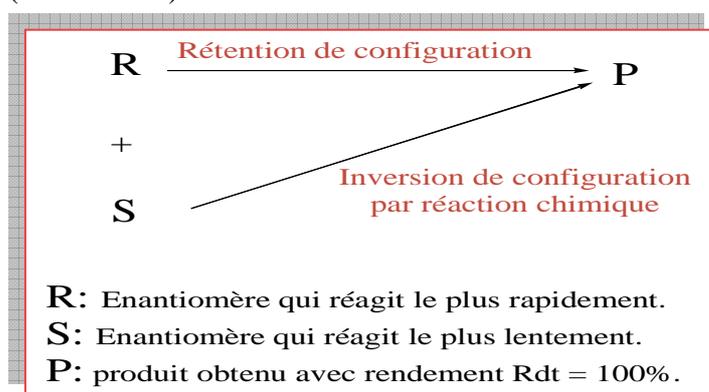
**Schéma-23** : Déracémisation du 2-décanol par oxydoréduction cyclique

<sup>46</sup> C.V. Voss, C.C. Gruber, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 276-281.

### II-3-4 Processus de stéréoinversion :

Cette procédure de stéréoinversion « *in situ* » connaît actuellement un grand essor, notamment pour ses applications concernant les alcools secondaires d'intérêt potentiel et même les amines chirales.

Lors d'une déracémisation par stéréoinversion, l'un des deux énantiomères du mélange racémique préserve sa configuration absolue tout au long du processus, alors que son antipode optique l'inverse, à travers une réaction chimique et sans racémisation, pour donner un seul produit possédant une même stéréochimie avec un rendement chimique théorique qui équivaut à 100% (schéma-24-).



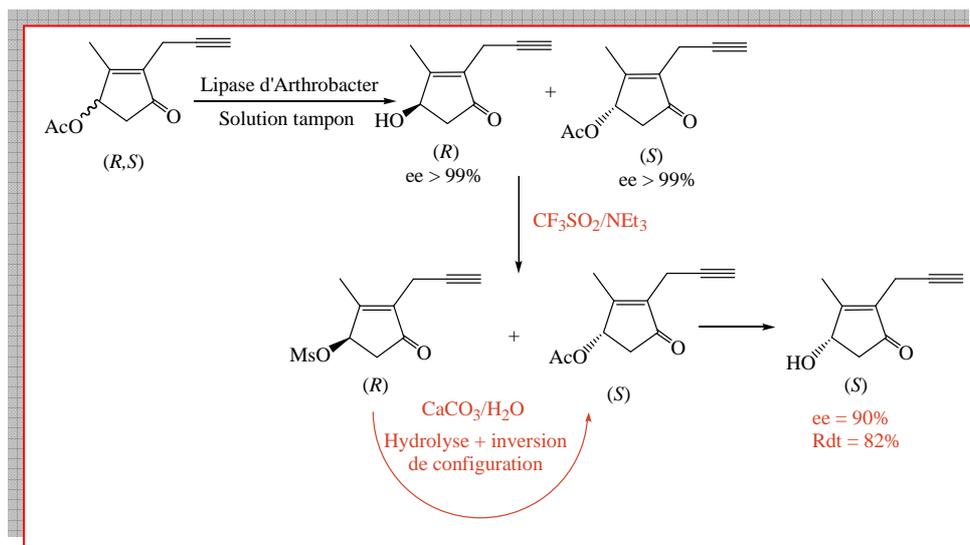
**Schéma-24** : Principe de déracémisation par stéréoinversion chimique.

Cette approche s'effectue selon deux étapes successives, un dédoublement cinétique biocatalysé suivi d'une réaction chimique, qui assure la stéréoinversion « *in situ* » de l'un des deux énantiomères<sup>47</sup>. L'équipe de Danda<sup>48</sup> a décrit la première approche de stéréoinversion chimique, appliquée au dérivé ester racémique d'un précurseur de pyréthriinoïde.

Le protocole suivi a mis en jeu la combinaison d'une hydrolyse enzymatique de l'acétate racémique avec une transformation chimique, procédant par inversion de configuration. Le mélange de l'ester résiduel et de l'alcool formé est traité avec le chlorure de mésyle pour engendrer le groupement partant mésylate sur la structure de l'alcool formé. L'addition ultérieure d'une base forte conduit à l'inversion de configuration de l'intermédiaire activé (*R*) avec une hydrolyse simultanée de l'ester de configuration (*S*). Il en découle l'alcool de configuration (*S*) avec un rendement chimique de 82% et un excès énantiomérique ee = 90% (schéma-25).

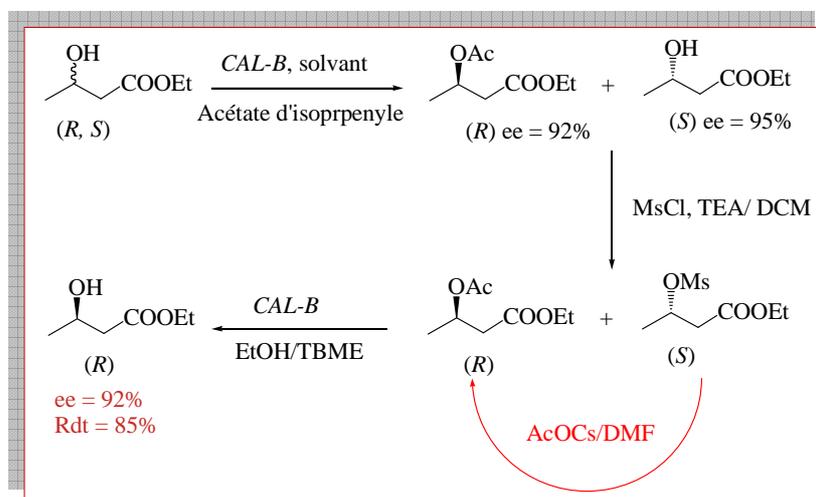
<sup>47</sup>a) H. Danda, Y. Furukawa, T. Umemura, *Synlett*, **1991**, 441-442. b) M.J. Kim, I.S. Lee, *Synlett*, **1993**, 767-768.

<sup>48</sup> T. Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8701-8716.



**Schéma-25** : Déracémisation du précurseur d'un pyréthrianoïde par combinaison d'une hydrolyse et d'une stéréoinversion « in situ ».

Dans le même contexte, l'équipe de Turcu<sup>49</sup> a effectué une déracémisation par stéréoinversion chimique concernant l'éthyl 3-hydroxybutanoate. L'énantiomère de configuration (R) a été obtenu avec un excès énantiomérique ee = 92% et un rendement chimique à 85% (schéma-26).



**Schéma-26** : Déracémisation par combinaison d'une transestérification enzymatique et d'une stéréoinversion in situ

<sup>49</sup> M.C. Turcu, E. Kiljinen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 1682-1687.

Dans l'hydrolyse enzymatique, le mélange des deux énantiomères, l'alcool obtenu et l'acétate résiduel, subit une transformation chimique où la configuration de l'alcool obtenu est inversée. Cette inversion conduit à un seul énantiomère de l'acétate avec un rendement chimique estimé théoriquement à 100%. Plusieurs réactions chimiques permettent l'inversion de configuration d'un énantiomère optiquement pur, mais la plus décrite est celle de Mitsunobu.

### II-3-4-1 La réaction de Mitsunobu :

Cette réaction est largement décrite en synthèse organique et constitue une procédure très appliquée pour l'estérification des alcools. Nous présentons un aperçu de la littérature qui montre l'efficacité de cette méthode de déracémisation où la réaction de Mitsunobu est l'étape chimique de l'inversion de configuration.

En 1967, O. Mitsunobu décrit une méthode pour la condensation d'un acide carboxylique et un alcool, en utilisant un mélange de diéthylazodicarboxylate (DEAD) et de triphénylphosphine (TPP) afin de former un ester<sup>50</sup>. Cette réaction de substitution intermoléculaire ou intramoléculaire est basée sur la formation *in situ* d'un intermédiaire, à savoir une bétaine réactive. Cette dernière capable d'arracher le proton de l'acide nucléophile et d'activer l'alcool électrophile. Le protocole de Mitsunobu est également favorisé par une séquence d'oxydoréduction simultanée dans laquelle, le TPP est oxydé et le DEAD est réduit.

#### ✱ Mécanisme

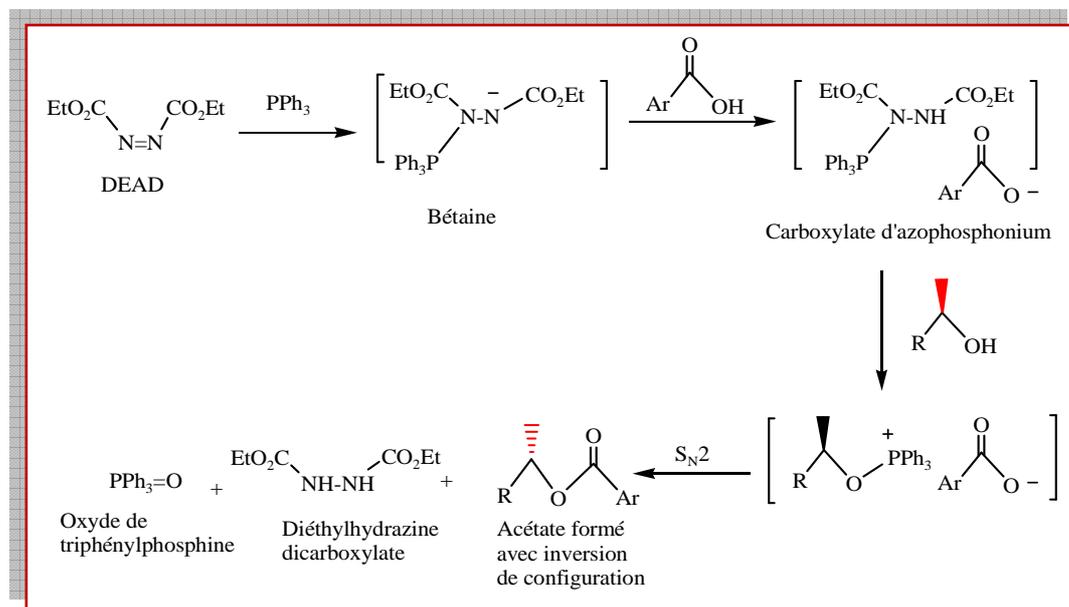
L'addition nucléophile initiale du diéthylazodicarboxylate (DEAD) et du triphénylphosphine (TPP) forme rapidement une bétaine intermédiaire en une première étape. Ensuite et selon l'addition directe, sur la bétaine, de l'acide ou de l'alcool, des mécanismes sont proposés pour décrire les étapes ultérieures de cette réaction<sup>51</sup>.

Lorsque l'acide est ajouté en premier, la bétaine est protonée et un carboxylate d'azophosphonium est formé de façon irréversible. L'atome de phosphore tétra coordonné subit une attaque nucléophile par l'alcool secondaire afin de générer un dérivé activé avec un bon groupement partant. Son déplacement par l'ion carboxylate, via un mécanisme de substitution  $S_N2$  fournit l'ester escompté de configuration inversée avec les oxydes de

<sup>50</sup> O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1967**, 40, 2380.

<sup>51</sup> E.H.B. Grochowski, R.J. Kupper, C.J. Michejda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6876-6877.

triphénylphosphine et de diéthylazodicarboxylate comme produits secondaires. Le schéma-27- en fait l'illustration



**Schéma-27** : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu

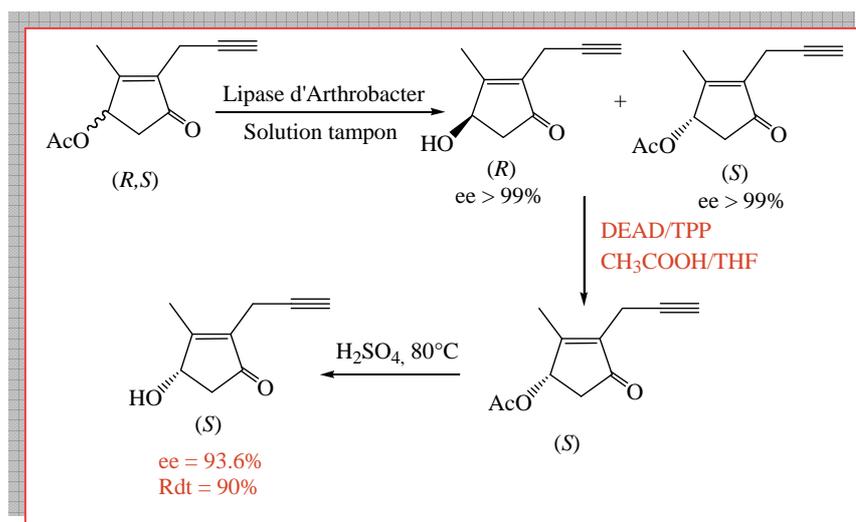
La réaction se déroule sous des conditions douces (de 0°C à température ambiante) dans des solvants apolaires tels que l'éther diéthylique, le tétrahydrofurane ou le toluène qui accélèrent la conversion de l'alcool en ester.

### II-3-4-2 Application de la réaction de Mitsunobu dans la déracémisation :

La réaction de Mitsunobu est une réaction largement utilisée pour la déracémisation des acétates et des alcools chiraux secondaires<sup>52</sup>. Au cours de son étude citée précédemment, l'équipe de Danda<sup>53</sup> a également obtenu le même substrat, à savoir le (*S*)-4-hydroxy-3-méthyl-2-(2-propynyl)-2-cyclopenten-1-one en introduisant pour la première fois la réaction de Mitsunobu, à la suite d'une hydrolyse enzymatique. Un bon résultat est obtenu, où l'alcool de configuration (*S*) est récupéré avec un excès énantiomérique (ee = 93.6%) et un rendement chimique (Rdt = 90%). Le schéma -28- illustre ce résultat :

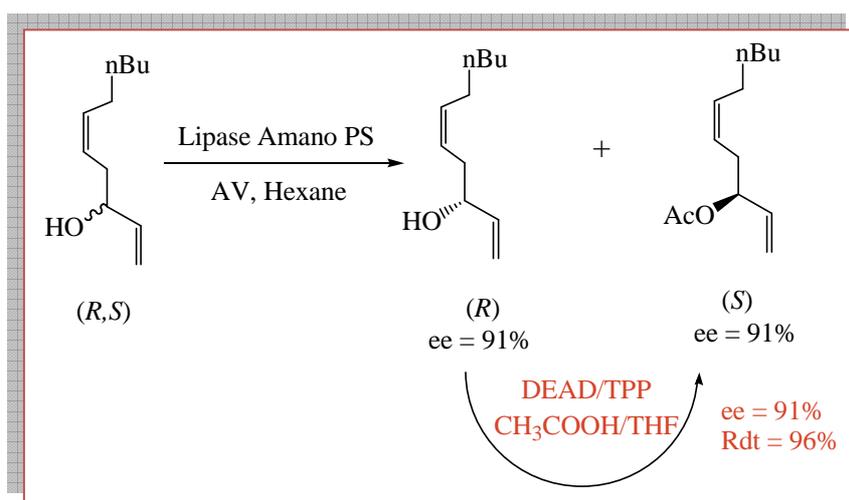
<sup>52</sup>a) E. Vanttinen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1775-1786. b) H.L. Liu, T. Anthonsert, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27.

<sup>53</sup> Ref 48: T.Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8701-8716.



**Schéma-28 :** Déracémisation du précurseur d'un pyréthriinoïde par combinaison d'une hydrolyse enzymatique et d'une stéréoiversion « in situ » selon le protocole de Mitsunobu.

La même stratégie a été appliquée par l'équipe de Faber<sup>54</sup>. Les auteurs ont pu obtenir le (S)-dictyoprolène, un acétate secondaire insaturé possédant des propriétés odoriférantes. Le dédoublement cinétique enzymatique, réalisé par transestérification du mélange racémique de l'alcool correspondant, a donné les deux énantiomères avec des excès énantiomériques (ee = 91%). En additionnant le réactif de Mitsunobu, seul l'ester est obtenu sans perte de sa pureté optique, avec un rendement chimique Rdt = 96% (schéma-29-).



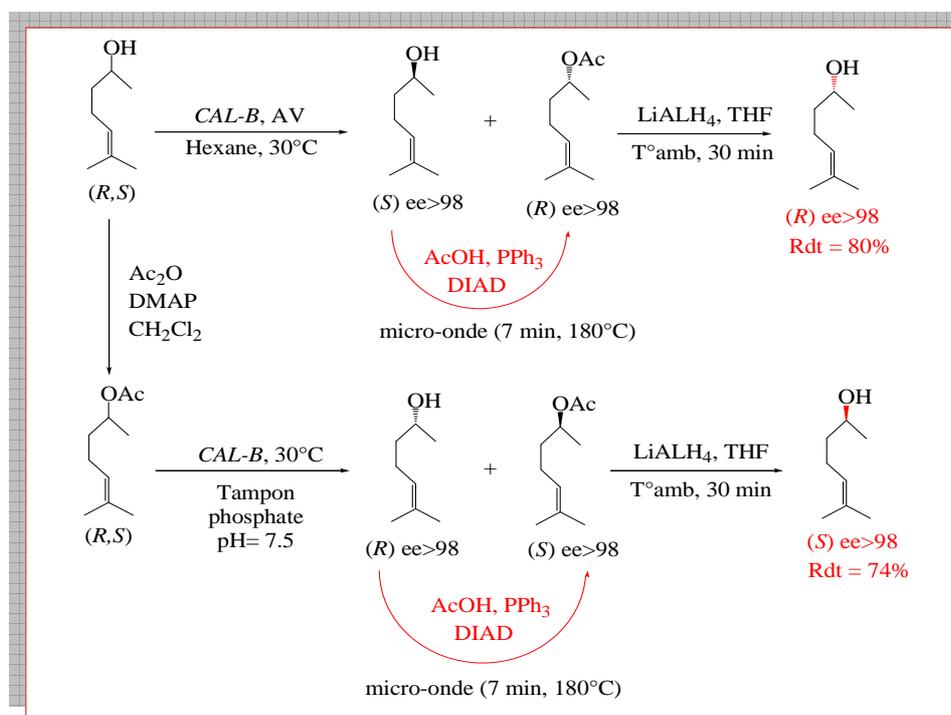
**Schéma-29 :** Synthèse énantiosélective du (S)-dictyoprolène via une transestérification enzymatique suivie du protocole de Mitsunobu.

<sup>54</sup> A. Wallner, H. Mang, S.M. Glueck, A. Steinreiber, S.F. Mayer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432.

## II-4 L'énantiocomplémentarité des réactions d'hydrolyse et de transestérification :

Dans certains cas, les deux énantiomères d'une molécule racémique peuvent être obtenus avec d'excellentes puretés optiques et de bons rendements chimiques. Ceci est réalisé en mettant à profit l'énantiocomplémentarité des deux réactions, à savoir, la transestérification et l'hydrolyse enzymatiques lorsqu'un seul énantiomère réagit au cours des deux réactions.

A cet égard, nous citons l'exemple rapporté par l'équipe de Faber<sup>55</sup> concernant le sulcatol, qui est une phéromone d'insecte. Les deux énantiomères de l'alcool sont obtenus avec des excès énantiomériques  $ee > 98\%$  et de bons rendements chimiques en exploitant l'énantiocomplémentarité des deux réactions : l'acylation et l'hydrolyse suivies par la stéréoinversion chimique selon le protocole de Mitsunobu (schéma-30-).

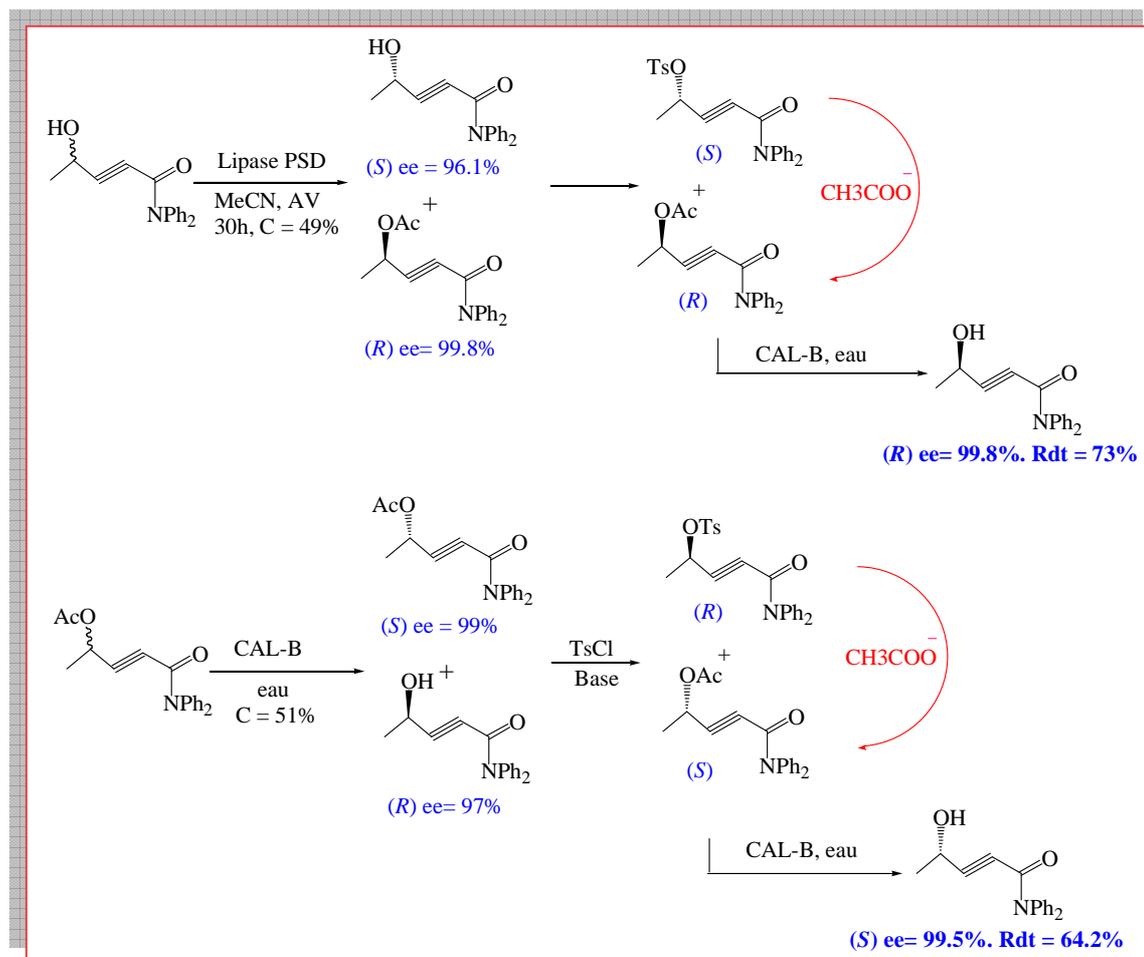


**Schéma-30 :** Déracémisation du sulcatol.

Un autre exemple récent met en évidence cette caractéristique des deux réactions biocatalysées. L'équipe de Tao Li<sup>56</sup> a pu obtenir les deux énantiomères d'un alcool propargylique avec d'excellents excès énantiomériques et des rendements chimiques assez élevés (schéma-31).

<sup>55</sup> A. Steinreiber, A. Stadler, S.F. Mayer, K. Faber, C.O. Kappe, *Tetrahedron Lett*, **2001**, 42, 6283-6286.

<sup>56</sup> A. Zaks, M. Tamarz, Tao Li, *Adv. Synth. Catal*, **2009**, 351, 2351-2357.



**Schéma-31:** Mise à profit de l'énantiocomplémentarité de la transestérification et de l'hydrolyse pour la déracémisation d'un alcool propargylique.

## II-5 Conclusion :

Au cours de ce chapitre nous avons parcouru les différents procédés de déracémisation et de racémisation, cités dans la littérature, avec des exemples montrant l'utilité ainsi que l'intérêt de chaque procédure. Nous nous sommes intéressés particulièrement à la méthode de déracémisation par stéréoinversion car elle nous a paru la plus adaptée à nos substrats. Plusieurs réactions chimiques permettent l'inversion de configuration au cours de cette méthode de déracémisation pour accéder à un seul énantiomère optiquement pur et avec un bon rendement chimique. La réaction la plus décrite à cet effet est celle de Mitsunobu que nous avons utilisée dans notre étude pour sa mise en œuvre aisée également.

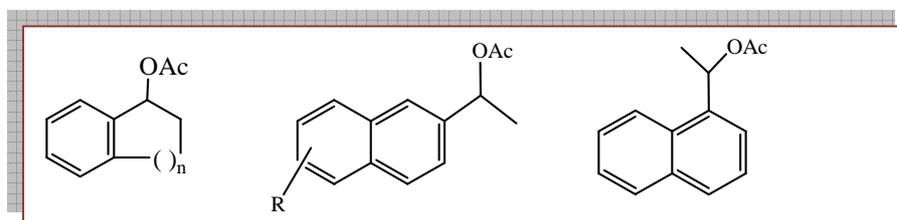
## CHAPITRE III

*Synthèse énantiosélectives des alcools chiraux via une  
hydrolyse enzymatique combinée par la réaction de  
Mitsunobu*

### III-1- Introduction :

Les alcools benzyliques secondaires chiraux sont des molécules d'un intérêt capital en raison de leur activité biologique<sup>57</sup>. Ils constituent, pour la plupart, des précurseurs de molécules intéressantes, fort utilisés dans les industries pharmaceutiques et de la chimie fine<sup>58</sup>. Ce sont notamment des précurseurs de structures d'anti-inflammatoires non stéroïdiens puissants dont le Naproxène<sup>59</sup> et l'Ibuprofène. Ces composés peuvent aussi servir d'auxiliaires chiraux en chimie organique. L'obtention d'alcools benzyliques optiquement purs est donc une nécessité pour la chimie organique.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique, en présence de la lipase de *Candida antarctica B* (CAL-B). Il est également important dans notre cas d'optimiser les conditions d'utilisation, d'un point de vue quantitatif, de la CAL-B, en testant son pouvoir catalytique après diminution de la quantité mise en jeu. Cette étude s'applique sur des substrats qui présentent un intérêt potentiel. Ce sont des acétates correspondant aux alcools benzyliques secondaires chiraux. Le schéma- 32 illustre les structures de ces substrats.



**Schéma -32 :** modèles des substrats étudiés.

### III-2- Etude bibliographique de l'hydrolyse enzymatique de ces modèles:

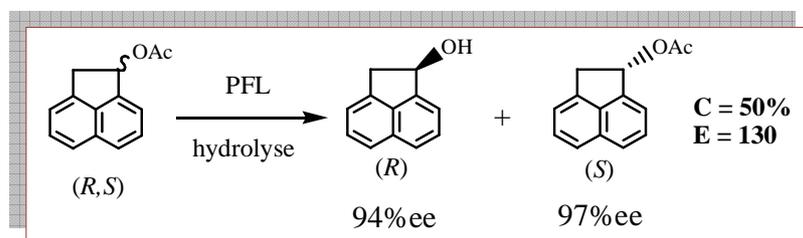
Peu d'études ont concerné le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de ces acétates chiraux correspondant aux alcools benzyliques de type arylalkylcarinols. Les exemples que nous citerons sont des contributions antérieures de notre équipe.

<sup>57</sup> T. Nishikawa, M. Yoshita, K. Obi, M. Isobe, *Tetrahedron Lett*, **1994**, 35, 7997.

<sup>58</sup> S.C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, **1992**, 46.

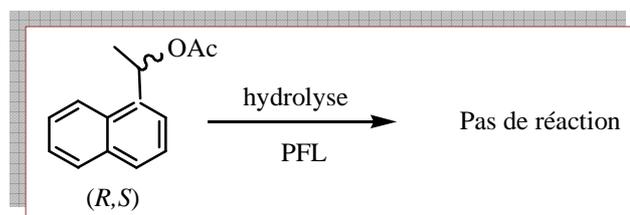
<sup>59</sup> G.M. Gu, C.S. Chen, C.J. Sih, *Tetrahedron Lett*, **1986**, 27, 1763.

L. Aribi-Zouiouèche et Coll<sup>60</sup> ont étudié le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de l'acétate correspondant à l'acénaphthénol, en présence de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). Les deux énantiomères issus de cette réaction sont obtenus avec de bons excès énantiomériques à une conversion de 50%. (schéma-33).



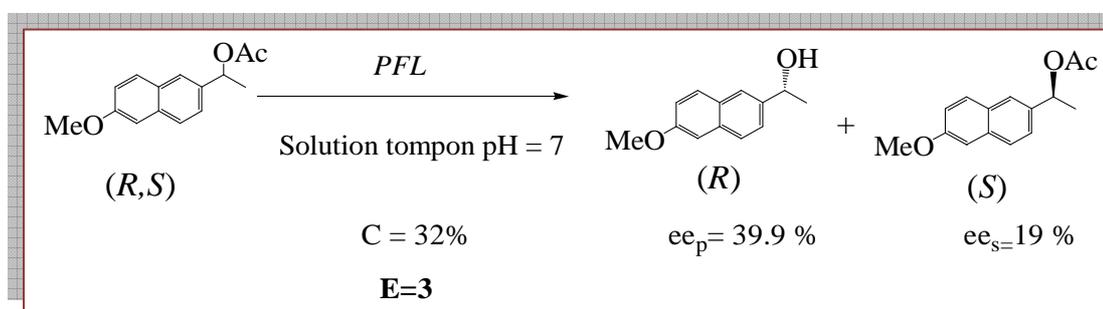
**Schéma-33 :** Hydrolyse enzymatique du 1,2-dihydroacénaphthyl-1-yl acétate avec la PFL

Son isomère de structure est totalement inactif dans les mêmes conditions.



**Schéma-34 :** Hydrolyse enzymatique du 1-(naphthalen-1-yl) éthylacétate avec la PFL

Un autre exemple de l'hydrolyse enzymatique de ces modèles est rapporté par C. Bidjou et coll<sup>61</sup>. L'étude concerne une réaction d'hydrolyse enzymatique en présence de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). La lipase utilisée manifeste une faible énantiosélectivité vis-à-vis du substrat étudié (E = 3) (Schéma-35).



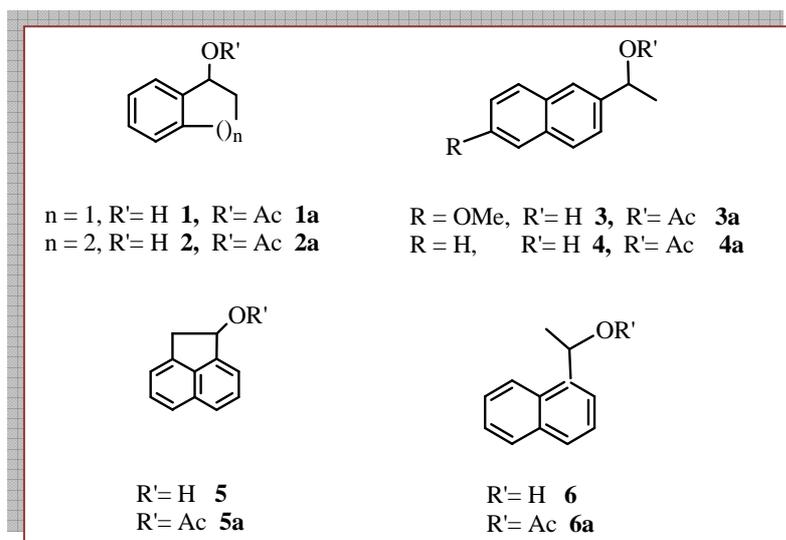
**Schéma-35 :** Dédoublement cinétique d'un acétate benzylique par hydrolyse enzymatique

<sup>60</sup> - Réf 34 : L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 4085.

<sup>61</sup> C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J-Y. Legros, J-C. Fiaud, *J. Soc. Alger. Chim*, **1999**, 9, 261.

Dans un travail antérieur<sup>62</sup>, une série d'arylalkylcarbinols, qui sont des alcools benzyliques secondaires chiraux, a fait l'objet d'une étude de la réaction de dédoublement cinétique par acylation enzymatique, en présence de la lipase de *Candida antarctica lipase B* (CAL-B). L'utilisation de cette lipase a été optimisée en mettant en jeu des quantités catalytiques minimales et efficaces qui maintiennent de bonnes énantiosélectivités.

Les bons résultats obtenus nous ont conforté dans notre choix d'entreprendre une étude de la réaction d'hydrolyse enzymatique sur les acétates correspondant aux alcools précités avec la CAL-B. Les substrats objet de notre étude sont représentés dans le schéma suivant :



**Schéma -36 :** les substrats étudiés

### III-3- synthèse des acétates racémiques 1a-6a:

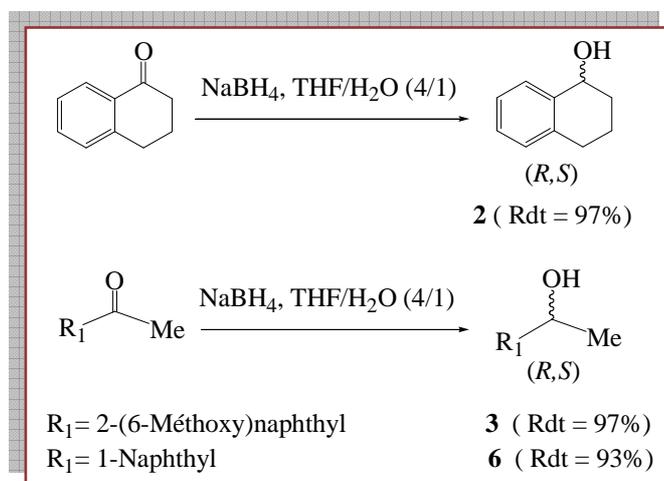
Les acétates, qui constituent les modèles de notre étude, sont issus d'alcools benzyliques chiraux correspondants. Les alcools 1, 4 et 5 sont commerciaux, les alcools 2, 3 et 6 sont obtenus par réduction des cétones convenables.

#### **A) Synthèse des alcools racémiques 2, 3 et 6 par réduction des cétones :**

Les alcools racémiques 2, 3 et 6 sont obtenus par réduction des cétones commerciales correspondantes, en présence de l'hydroborure de sodium (NaBH<sub>4</sub>) dans un mélange de

<sup>62</sup> - Réf 9 : N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**,17, 797-800.

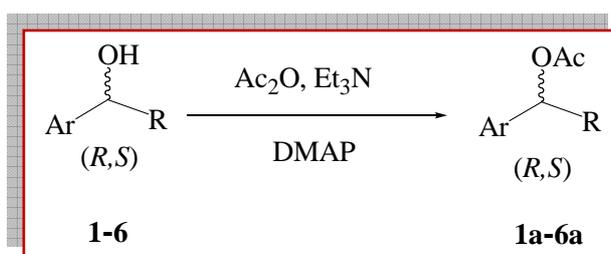
tétrahydrofurane et d'eau (4/1). Ces alcools sont obtenus avec de bons rendements chimiques (schéma-37)



**Schéma-37 :** Synthèse des alcools 2, 3 et 6 par réduction des cétones

### B) Acylation chimique des alcools 1-6:

Les acétates sont obtenus à partir des alcools benzyliques 1-6 correspondants. La réaction d'acylation se fait avec l'anhydride acétique et la triéthylamine en présence de quantité catalytique du 4-diméthylaminopyridine (DMAP) selon le schéma -38.



**Schéma-38 :** Synthèse des acétates racémiques 1a-6a

Les rendements obtenus pour l'acylation chimique sont réunis dans le tableau 1

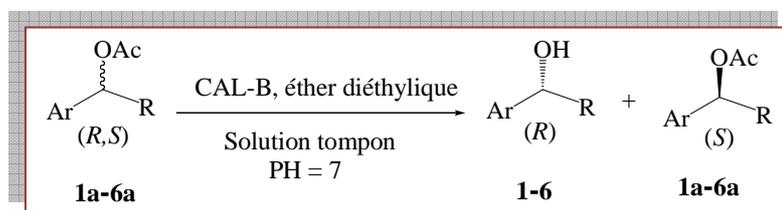
**Tableau 1** : rendements chimiques des acétates racémiques 1a-6a

Acétates	Rdt (%)
1a	89
2a	91
3a	85
4a	87
5a	78
6a	82

Les caractéristiques structurales des alcools et des acétates synthétisés sont établies par les méthodes spectroscopiques suivantes : infrarouge (**IR**) et résonance magnétique nucléaire du proton (**RMN <sup>1</sup>H**) et du carbone 13 (**RMN <sup>13</sup>C**).

### **III-4- Dédoublément cinétique enzymatique des acétates racémiques 1a-6a par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de CAL-B :**

Dans un premier temps, les acétates benzyliques racémiques 1a-6a sont hydrolysés en milieu biphasique (solvant/solution tampon pH=7 : v/v : 1/4) en présence de 150mg (675 U) de la lipase de *Candida antarctica B* (**CAL-B**)<sup>63</sup> pour une millimole de substrat. Après 48 heures de réaction, l'acétate résiduel et l'alcool formé sont récupérés. Les excès énantiomériques (ee) sont déterminés par HPLC sur colonne chirale **CHIRACEL OD-H** (schéma-39).

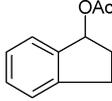
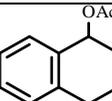
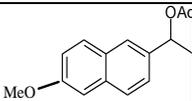
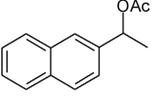
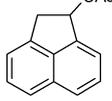
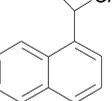


**Schéma-39** : Dédoublément cinétique des acétates racémiques 1a-6a par hydrolyse enzymatique.

<sup>63</sup> CAL-B (Chirazyme®, L-2, c.-F, C2, Lyo) lipase de *Candida antarctica*, fraction B, fournie par Boehringer Mannheim. L'activité spécifique est de 4500U/g.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Dédoublément des acétates racémiques 1a-6a par hydrolyse enzymatique en présence de 150 mg de CAL-B

Substrat <sup>a</sup>	ee <sub>p</sub> <sup>b</sup> (%)	ee <sub>s</sub> <sup>b</sup> (%)	C <sup>c</sup> (%)	E <sup>d</sup>
 <b>1a</b>	96	44	32	68
 <b>2a</b>	98	83	46	319
 <b>3a</b>	99	98	49	>1000
 <b>4a</b>	99	96	49	>1000
 <b>5a</b>	99	6	6	200
 <b>6a</b>	87	75	46	37

a: sur 1 mmole de substrat à 25°C.

b : ee mesuré par HPLC sur colonne chirale CHIRACEL OD-H.

c: C= ee<sub>s</sub>/ee<sub>s</sub>+ss<sub>p</sub>.

d: E= Ln [(1-c)(1-ees)]/ Ln[(1-c)(1+ees)].

### ☀ Résultats et discussion :

Au cours de cette étude, nous constatons que la lipase de *Candida antarctica B* (CAL-B) manifeste une bonne réactivité vis-à-vis des substrats dédoublés à l'exception de l'acétate **5a**.

Nous observons également que les énantiomères de configuration (*R*) sont préférentiellement transformés en alcools conformément aux études établies qui expliquent la réactivité de cette lipase<sup>64</sup>.

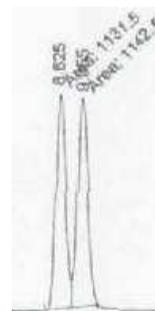
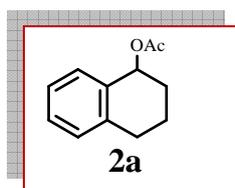
<sup>64</sup> R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem* **1991**, 56, 2656-2665.

Concernant l'énantiosélectivité, nous allons procéder à l'analyse suivante : les énantiomères sous forme d'alcools produits sont obtenus avec de bonnes puretés optiques ( $87 \leq ee \leq 99\%$ ). Dans le cas des acétates **1a** et **2a**, la taille du cycle adjacent au phényle semble influencer sur la sélectivité de la lipase. Ainsi pour l'acétate **1a**, le facteur de sélectivité a une valeur modérée de  $E = 68$  comparativement à celui de l'acétate **2a** ( $E > 300$ ).

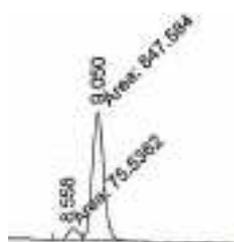
Le chromatogramme -1- illustre ce dernier résultat.



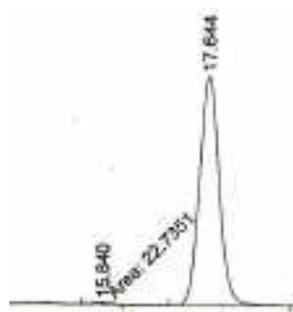
Alcool racémique **2**



Acétate racémique **2a**

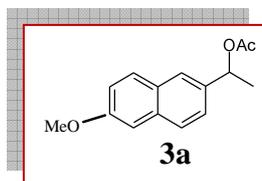


$E = 319$   
 $C = 46$

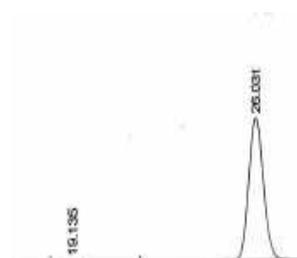


**Chromatogramme -1:** Hydrolyse enzymatique de l'acétate **2a** avec 150 mg de CAL-B.

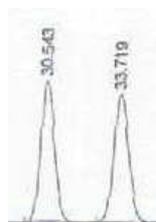
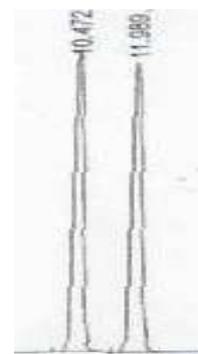
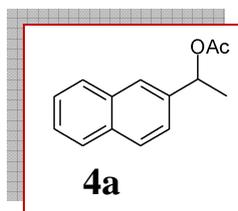
Par ailleurs, l'introduction du groupement polaire méthoxy en position para du cycle aromatique du substrat **3a** ne semble avoir aucune influence sur l'énantiosélectivité par comparaison avec l'acétate **4a** non substitué. Les sélectivités dans les deux cas sont excellentes ( $E > 1000$ ). Les chromatogrammes 2 et 3 illustrent ces résultats.

Alcool racémique **3**Acétate racémique **3a**

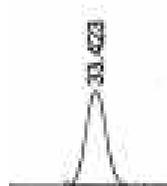
$E > 1000$   
 $C = 49$



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

Alcool racémique **4**Acétate racémique **4a**

$E > 1000$   
 $C = 49$



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

L'autre constatation concerne les substrats **5a** et **6a** qui diffèrent uniquement par la présence d'un méthyle libre ou substitué avec le cycle aromatique. Cette distinction modifie la réactivité et l'énantiosélectivité de la *CAL-B* vis-à-vis des deux acétates lors de l'hydrolyse enzymatique. Cette lipase manifeste une sélectivité remarquable ( $E=200$ ) pour le substrat **5a**, tandis que la réactivité est faible ( $C=6\%$ ). Pour l'acétate **6a**, la lipase est manifestement réactive ( $C=46\%$ ) mais peu sélective ( $E=37$ ). Une autre comparaison peut se faire entre les substrats **4a** et **6a** où la substitution en position  $\beta$  (**4a**) semble favoriser une bonne sélectivité ( $E > 1000$ ) contrairement à la substitution en position  $\alpha$  ( $E=37$ ) (**6a**).

### III-5- Etude de l'influence de la quantité d'enzyme utilisée sur la sélectivité de l'hydrolyse enzymatique :

A ce stade de notre étude de l'hydrolyse enzymatique des acétates **1a-6a**, nous avons tenté d'examiner l'influence, sur notre système réactionnel, de la diminution de la quantité d'enzyme mise en jeu à partir de la valeur initialement décrite de 150 mg de *CAL-B* pour une milli mole de substrat. Le but étant de parvenir à des quantités minimales effectivement réactives et surtout énantiosélectives, et ceci en se référant aux travaux antérieures sur la réaction d'acylation enzymatique sur ces mêmes substrats.

#### III-5-1- Cas du 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acétate (1a) et du 1,2,3,4 tétrahydro naphthalen-1-yl acétate (2a) :

**Tableau 3:** Etude de l'influence de la diminution de la quantité de *CAL-B* sur son énantiosélectivité vis-à-vis du **1a** et du **2a**.

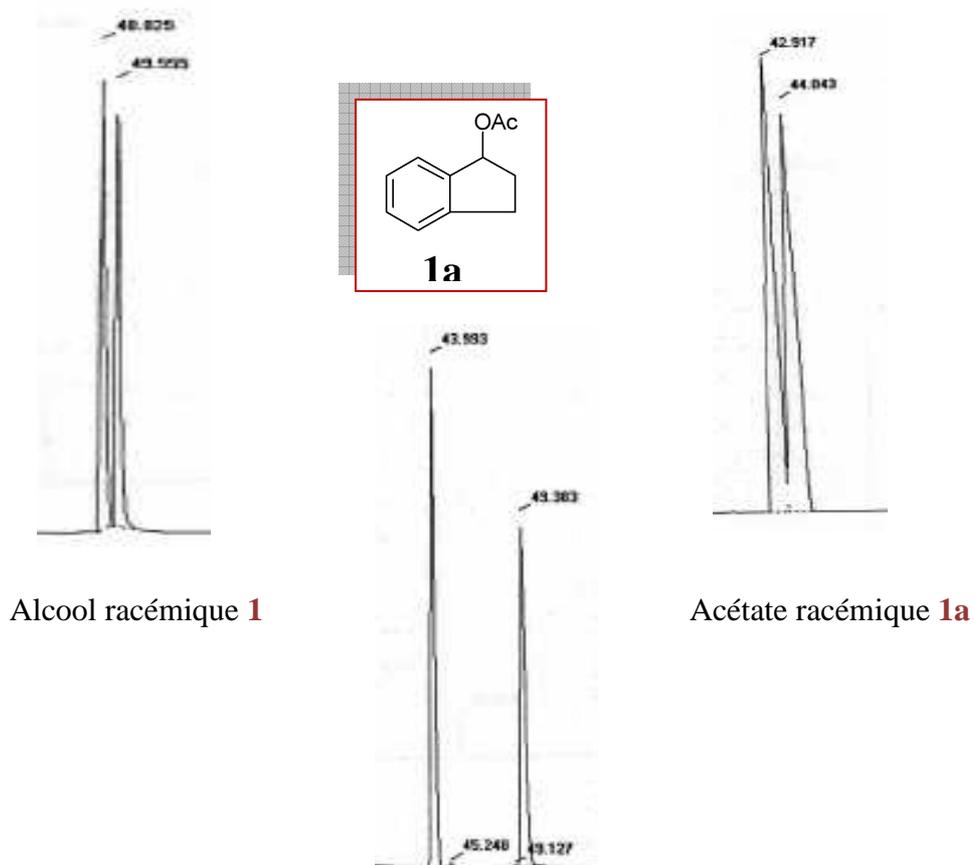
Substrat	<i>CAL-B</i> <sup>a</sup> (mg)	t(h)	ee <sub>p</sub> (%) ( <i>R</i> )	ee <sub>s</sub> (%) ( <i>S</i> )	C (%)	E
<b>1a</b>	150 (675 U)	48	96	44	32	68
	12.5 (56 U)	48	99	98	50	>1000
	6 (27 U)	72	93	79	46	70
<b>2a</b>	150 (675 U)	48	98	83	46	319
	50 (225 U)	48	99	99	50	>1000
	20 (90 U)	48	96	28	22	64

<sup>a</sup> pour 1 mmole de substrat, une activité décroissante de *CAL-B*.

### ☀ Résultats et discussion :

Au cours de l'hydrolyse enzymatique des acétates **1a-6a** en présence de la lipase de candida antarctica *B*, la quantité du biocatalyseur employée a été diminuée afin d'atteindre des valeurs d'activité minimales qui soient encore efficaces.

Pour l'acétate **1a**, nous sommes passés de 150 mg (soit une activité de 675 U) jus qu'à une valeur 12 fois plus faible (12.5 mg, 56 U). On note que la réactivité de la lipase s'améliore de façon significative ainsi que la sélectivité qui augmente en passant de **E = 68** à **E >1000**. Les deux énantiomères sont obtenus avec d'excellentes puretés optiques selon le chromatogramme 4. En diminuant encore la quantité de *CAL-B* jusqu'à 6 mg (27 U), la sélectivité chute de **E >1000** à **E = 70**.



### Chromatogramme -3 : Hydrolyse enzymatique de l'acétate **1a** avec 12.5 mg de *CAL-B*.

En ce qui concerne l'acétate **2a**, une diminution de la quantité de lipase d'une valeur trois fois plus faible (50mg, 225 U) a permis d'obtenir les deux énantiomères optiquement purs avec un facteur de sélectivité **E >1000**. En diminuant encore la quantité de *CAL-B*

jusqu'à 20 mg (90 U), nous avons constaté une chute significative de la réactivité jusqu'à la moitié de sa valeur initiale ( $C=22\%$ ). La sélectivité est également diminuée ( $E=64$ ).

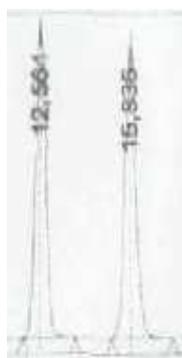
### III-5-2- Cas du 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) éthyle acétate (3a) et du 1-(naphthalen-2-yl) éthyle acétate (4a) :

**Tableau 4:** Etude de l'influence de la diminution de la quantité de CAL-B sur son énantiosélectivité vis-à-vis du **3a** et du **4a**

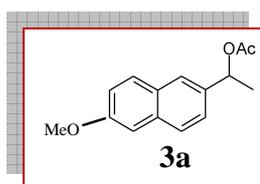
Substrat	CAL-B (mg)	t(h)	ee <sub>p</sub> (%) (R)	ee <sub>s</sub> (%) (S)	C (%)	E
<b>3a</b>	150 (675 U)	48	99	98	49	>1000
	20 (90 U)	48	98	99	49	>1000
<b>4a</b>	150 (675 U)	48	99	89	49	>1000
	20 (90 U)	50	97	99	49	>1000

#### **🌟 Résultats et discussion :**

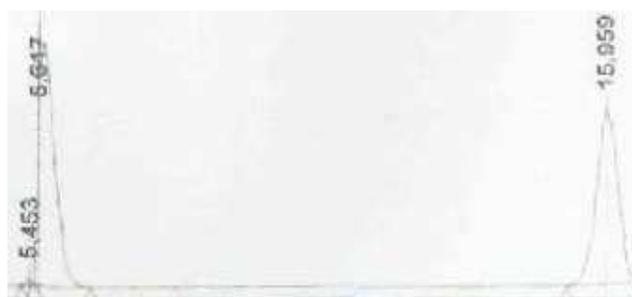
La même procédure a été appliquée à ces deux substrats **3a** et **4a** afin d'étudier l'influence de la diminution de la quantité de CAL-B sur la réactivité et l'énantiosélectivité lors de la réaction d'hydrolyse. L'utilisation d'une quantité de lipase huit fois plus faible n'entraîne aucun changement où les bonnes réactivités ( $C=49$ ) et sélectivités ( $E>1000$ ) sont maintenues. Les chromatogrammes 5 et 6 en donnent l'illustration.



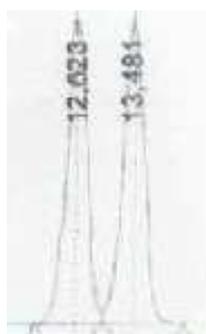
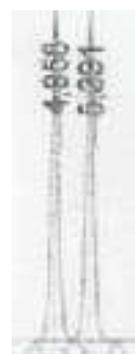
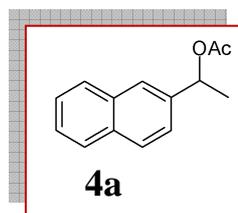
Alcool racémique **3**



Acétate racémique **3a**



**Chromatogramme -5 :** Hydrolyse enzymatique de l'acétate **3a** avec 20 mg de CAL-B.

Alcool racémique **4**Acétate racémique **4a****Chromatogramme -6 :** Hydrolyse enzymatique de l'acétate **4a** avec 20 mg de CAL-B

### III-5-3- Cas du du 1,2-dihydroacénaphthylen-1-yl acétate (**5a**) et du 1-(naphthalen-1-yl) éthyle acétate (**6a**) :

**Tableau 5:** Etude de l'influence de la diminution de la quantité de CAL-B sur son énantiosélectivité vis-à-vis du **5a** et du **6a**

Substrat	CAL-B (mg)	t(h)	ee <sub>p</sub> (%) (R)	ee <sub>s</sub> (%) (S)	C (%)	E
<b>5a</b>	150 (675 U)	48	99	7	6	200
	60 (270 U)	72	96	10	9	62
	20 (90 U)	72	-	-	-	nd
<b>6a</b>	150 (675 U)	72	87	75	46	37
	60 (270U)	48	51	99	34	>200
	20 (90 U)	48	44	99	30	>200

#### ✳ **Résultats et discussion :**

De même pour ces deux isomères de structure, le dédoublement par hydrolyse enzymatique en diminuant la quantité de lipase mise en jeu a fourni les résultats suivants :

Concernant l'acétate **5a**, la diminution de la quantité de lipase d'une valeur initiale de 150 mg de *CAL-B* jusqu'à 60 mg n'améliore pas la réactivité alors que la sélectivité diminue. Lorsque la quantité de lipase est encore abaissée jusqu'à 20 mg, on constate une inactivité totale de l'enzyme. Ainsi, après 72 heures de réaction, le mélange racémique est pratiquement récupéré.

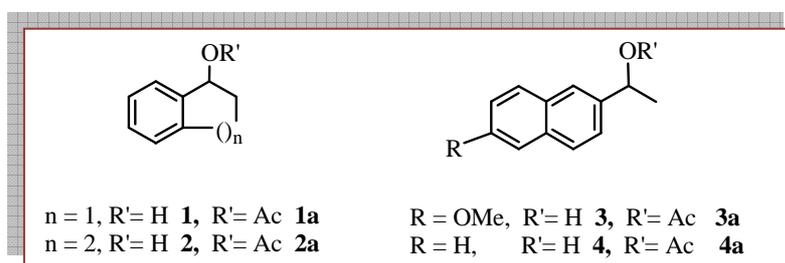
Dans les mêmes conditions, l'acétate **6a** est hydrolysé en diminuant la quantité de *CAL-B* à partir de 150 mg jusqu'à 60 et 20 mg. Nous enregistrons une baisse de la réactivité de la lipase et une amélioration de sa sélectivité où l'acétate résiduel est obtenu optiquement pur.

### III-6- Combinaison du protocole de Mitsunobu avec la réaction d'hydrolyse enzymatique :

Les données de la littérature montrent que l'association de la réaction de Mitsunobu avec celle du dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique a suscité un grand intérêt de la part des chimistes organiciens dans le but d'obtenir des acétates de configuration (*S*) optiquement purs et avec de bons rendements chimiques.

#### modèles étudiés

Les acétates **1a-4a** constituent nos modèles dans cette étude de déracémisation par stéréoinversion. Ce choix est dû au fait qu'ils ont pu être obtenus avec de bonnes sélectivités ( $E > 1000$ ) en présence de quantités minimales et efficaces de *CAL-B*. Ils présentent tous des énantiosélectivités maximum à une conversion *C* égale ou voisine à 50%, ce qui donne lieu aux conditions idéales pour appliquer une stéréoinversion consécutive à la réaction d'hydrolyse enzymatique.



**Schéma -40 :** Modèles d'étude pour la déracémisation.

### III-7 Déracémisation par résolution-inversion appliquée aux substrats

#### 1a-4a:

**Première étape :** Hydrolyse enzymatique des acétates **1a-4a** racémiques

Le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique est réalisé dans un premier temps, en présence de la lipase de *CAL-B*. Les deux énantiomères sont obtenus, l'un sous forme d'acétates résiduel (*S*) et l'autre sous forme d'alcool produit (*R*).

Le protocole opératoire suivi précédemment est maintenu ici. La quantité de lipase utilisée est celle permettant le déroulement efficace de la réaction d'hydrolyse enzymatique. Il est très important de vérifier le taux de conversion lors de cette hydrolyse enzymatique. Sa valeur doit être le plus proche possible de 50%. A cette conversion, les valeurs de sélectivité sont excellentes ( $E > 1000$ ) et les deux énantiomères sont optiquement purs.

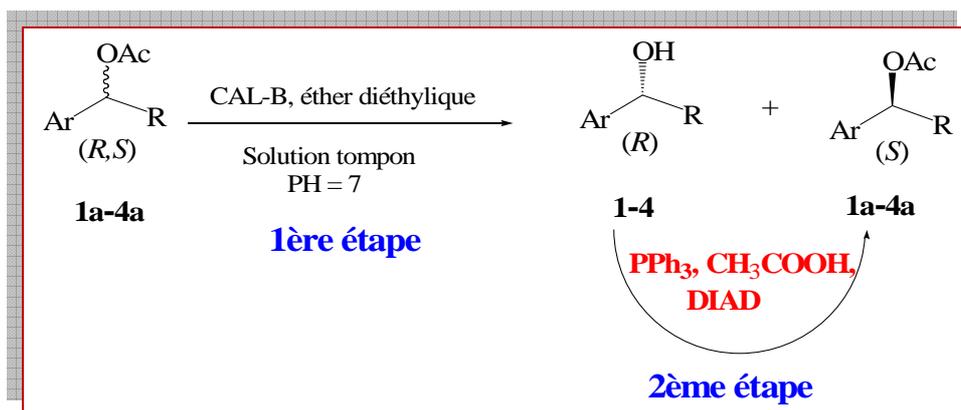
Théoriquement au cours de cette étape, la moitié de la quantité du substrat se transforme en alcool produit et l'autre moitié reste sous forme d'acétate initial avec un rendement maximum de 50% pour chaque énantiomère.

**Deuxième étape :** Inversion de configuration des alcools produits selon le protocole de Mitsunobu.

Le mélange constitué de l'acétate résiduel (*S*) et de l'énantiomère sous forme d'alcool produit (*R*) est dissous dans l'éther diéthylique après élimination de la lipase par filtration. Ensuite, ce mélange est soumis à l'action des réactifs de Mitsunobu où l'alcool produit de configuration (*R*) subit une acylation « *in situ* ».

L'estérification de l'énantiomère produit, à savoir l'alcool (*R*), se fait par inversion de sa configuration absolue, passant de la configuration (*R*) initiale à la configuration (*S*), identique à celle de l'énantiomère résiduel qui est l'acétate (*S*).

A la fin de cette réaction, un seul énantiomère est obtenu sous forme d'acétate (*S*). Les produits secondaires, générés au cours de la réaction de Mitsunobu, sont éliminés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Le schéma suivant résume ces étapes :



**Schéma -41 :** Hydrolyse enzymatique combinée à la stéréo inversion selon le protocole de Mitsunobu des alcools produits **1-4**

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Déracémisation des substrats **1a-4a** par un processus de résolution inversion.

Substrat <sup>a</sup>	Réaction d'hydrolyse enzymatique avec la CAL-B						Réaction de Mitsunobu	
	CAL-B (mg)	T (h)	ee <sub>p</sub> (%) (R)	ee <sub>s</sub> (%) (S)	C <sup>c</sup> (%)	E <sup>d</sup>	ee <sub>acétate</sub> (%) (S)	Rdt (%)
<b>1a</b>	12.5 (56 U)	48	99	98	50	>1000	94	78
<b>2a</b>	50 (225 U)	48	99	99	50	>1000	99	89
<b>3a</b>	20 (90 U)	48	98	99	49	>1000	71	82
<b>4a</b>	20 (90 U)	50	97	99	49	>1000	92	76

a: sur 1 mmole de substrat à 25 °C.

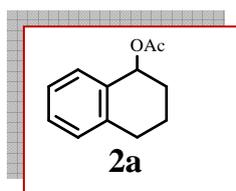
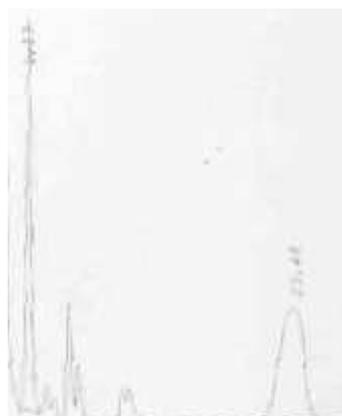
b : ee mesuré par HPLC sur colonne chirale CHIRACEL OD-H.

c: C= ee<sub>s</sub>/ee<sub>s</sub>+ee<sub>p</sub>.

d: E= Ln[(1-c)(1-ees)]/ Ln[(1-c)(1+ees)].

### ✿ Résultats et discussion :

L'observation du tableau récapitulatif montre un bon résultat pour le substrat **2a** où l'acétate de configuration (S) est obtenu optiquement pur (ee>99%). Cette pureté optique est identique à celle obtenue après l'hydrolyse enzymatique. Un bon rendement chimique est enregistré (Rdt= 89%). Le chromatogramme -7- met en évidence ce résultat.

Alcool racémique **2**Acétate racémique **2a**

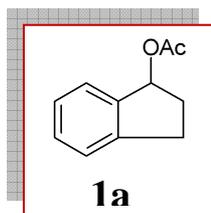
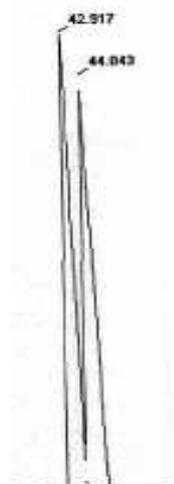
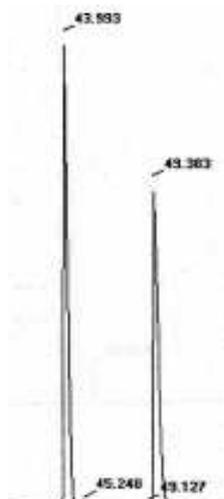
*Hydrolyse enzymatique de l'acétate 2a avec 50 mg de CAL-B (première étape)*



*Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

### **Chromatogramme -7 : Déracémisation de l'acétate 2a**

Par ailleurs, une légère diminution des excès énantiomériques est constatée pour les substrats **1a** et **4a** après la réaction de Mitsunobu. Les valeurs des excès énantiomériques pour les acétates (S) obtenus ont enregistré une baisse inférieure à 10% (de l'ordre de 4 à 7%) par rapport aux valeurs notées directement après l'hydrolyse enzymatique. Les chromatogrammes 8 et 9 illustrent ces résultats. De bons rendements chimiques sont obtenus (78% et 76% respectivement) pour les acétates **1a** et **4a**.

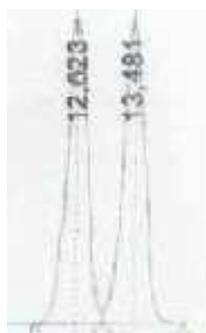
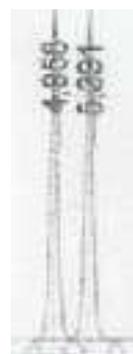
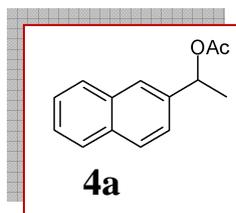
Alcool racémique **1****1a**Acétate racémique **1a**

*Hydrolyse enzymatique de l'acétate **1a** avec 12.5 mg de CAL-B (première étape)*



*Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

**Chromatogramme -8 : Déracémisation de l'acétate **1a****

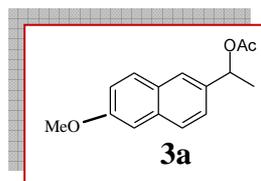
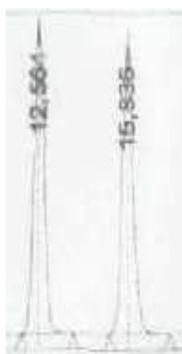
Alcool racémique **4**Acétate racémique **4a**Hydrolyse enzymatique de l'acétate **4a** avec 20 mg de CAL-B (première étape)

Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

### **Chromatogramme -9 : Déracémisation de l'acétate **4a****

Concernant le substrat **3a**, on constate une diminution significative de l'excès énantiomérique de l'acétate (*S*) obtenu après la réaction de Mitsunobu. Une chute de l'ordre de 30% est enregistrée. Ainsi, l'énantiomère de configuration (*S*) passe d'un excès ee= 99% après hydrolyse enzymatique à un ee= 71% après la réaction de stéréoinversion chimique. Le chromatogramme -10- illustre ce résultat.

Une explication de cette diminution de la pureté optique est attribuée à l'influence de la structure du substrat au cours d'un processus secondaire de racémisation qui intervient suite aux conditions réactionnelles de Mitsunobu. Ceci rend la substitution nucléophile n'est pas totalement stéréosélective.

Alcool racémique **3**Acétate racémique **3a**

Hydrolyse enzymatique de l'acétate **3a** avec 20 mg de CAL-B (première étape)



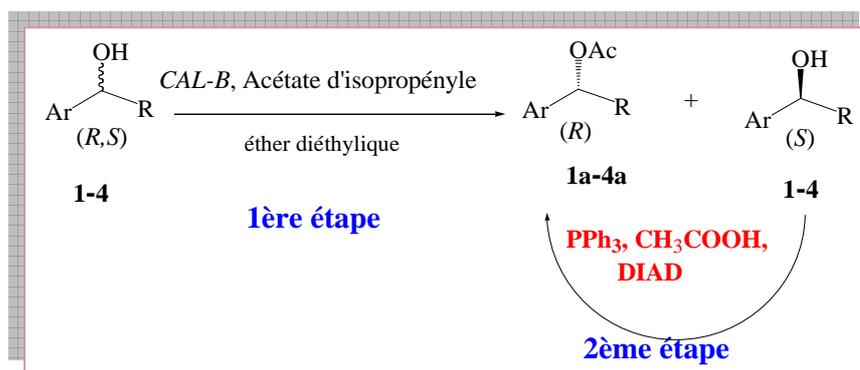
Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)

**Chromatogramme -10** : Déracémisation de l'acétate **3a**.

### III-8- Etude comparative entre la déracémisation par acylation et par hydrolyse enzymatiques combinées à la réaction de Mitsunobu:

Dans une étude antérieure de notre équipe<sup>65</sup>, une déracémisation a été effectuée en combinant une transestérification enzymatique avec la stéréoinversion selon Mitsunobu. Cette méthode de déracémisation a été appliquée aux alcools **1-4**.

Il nous a paru intéressant de procéder à une comparaison entre les deux voies utilisées dans le but d'atteindre un seul énantiomère optiquement pur avec un rendement chimique satisfaisant.



**Schéma -42 :** Acylation enzymatique suivie de la stéréoinversion selon le protocole de Mitsunobu des alcools **1-4**

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** tableau des résultats antérieurs de la déracémisation par acylation-inversion

Substrat <sup>a</sup>	CAL-B (mg)	Acylation enzymatique (24h)				Réaction de Mitsunobu	
		ee <sub>s</sub> (%) (S)	ee <sub>p</sub> (%) (R)	C (%)	E	ee acétate (%) (R)	Rdt %
<b>1</b>	6 (27 U)	>99	>99	50	>1000	>99	82
<b>2</b>	50 (225U)	>99	>99	50	>1000	>99	79
<b>3</b>	20 (90 U)	>99	>99	50	>1000	>99	74
<b>4</b>	25 (112 U)	>99	>99	50	>1000	91	76

a: sur 1 mmole de substrat à 25 °C

<sup>65</sup> N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J.-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800.

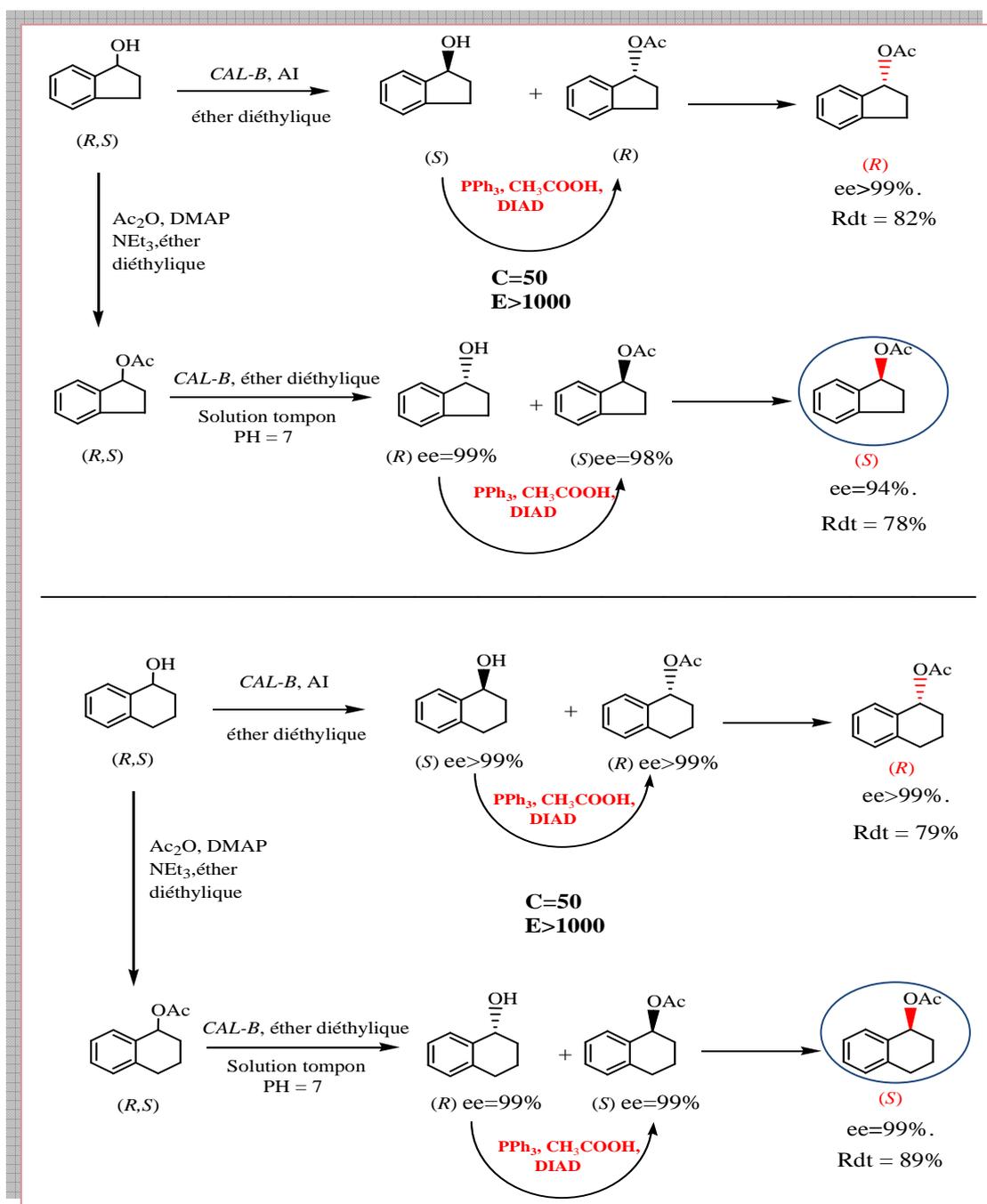
**Tableau 8(6) :** Déracémisation des substrats **1a-4a** par hydrolyse-inversion.

Substrat <sup>a</sup>	Réaction d'hydrolyse enzymatique avec la CAL-B						Réaction de Mitsunobu	
	CAL-B (mg)	t(h)	ee <sub>p</sub> (%) (R)	ee <sub>s</sub> (%) (S)	C <sup>c</sup> (%)	E <sup>d</sup>	ee <sub>acétate</sub> (%) (S)	Rdt (%)
<b>1a</b>	12.5 (56 U)	48	99	98	50	>1000	94	78
<b>2a</b>	50 (225U)	48	99	99	50	>1000	99	89
<b>3a</b>	20 (90 U)	48	98	99	49	>1000	71	82
<b>4a</b>	20 (90 U)	50	97	99	49	>1000	92	76

En comparant les deux tableaux qui réunissent les résultats obtenus lors des deux voies décrites pour la déracémisation par stéréoinversion, nous pouvons relever les points suivants :

- Les deux procédés mis en jeu visent l'obtention d'un seul énantiomère optiquement pur avec un rendement chimique élevé.
- Les résultats obtenus sont en conformité avec les données de la littérature où la réaction d'hydrolyse enzymatique est plus lente que celle de l'acylation enzymatique pour pratiquement la même activité spécifique mise en jeu. Au bout de 24 heures, les deux énantiomères des substrats **1-4** sont obtenus optiquement purs, alors que la durée est doublée pour la réaction d'hydrolyse enzymatique.
- Dans les conditions optimisées des deux réactions enzymatiques, de bonnes sélectivités sont obtenus (E>1000) à la conversion C voisine ou égale à 50%.
- Nous constatons une énantiocomplémentarité des deux réactions où un seul énantiomère réagit dans les deux cas ; c'est l'énantiomère (R) qui est acylé dans la première réaction d'acylation enzymatique et hydrolysé dans la seconde réaction. Il en découle, qu'après la réaction de Mitsunobu, c'est l'acétate (R) qui est obtenu dans le cas de l'acylation et l'acétate (S) est obtenu dans le cas de l'hydrolyse.
- Après la réaction de Mitsunobu consécutive à la réaction d'acylation enzymatique, les acétates **1a-3a** de configuration (R) sont obtenus optiquement purs (ee>99%) sans aucune perte de la pureté énantiomérique alors que l'acétate **4a** de configuration (R) enregistre une baisse de 10% de sa pureté optique. Par ailleurs, seul l'acétate **2a** de configuration (S) est obtenu optiquement pur après la réaction de Mitsunobu. Les autres acétates (S) subissent, soit une légère baisse de la pureté optique (**1a** et **4a**), soit une diminution significative de la pureté optique tel le cas de l'acétate **3a** (S).

- Il est également intéressant de mettre en évidence le fait que les deux énantiomères de l'acétate **2a** peuvent être obtenus optiquement purs avec de bons rendements chimiques grâce à l'énantiocomplémentarité des deux réactions, l'acylation et l'hydrolyse enzymatiques. Même constatations peut concerner le substrat **1a** dont la déracémisation par les deux voies donne de bons résultats et constitue un bon exemple de l'énantiocomplémentarité. Le schéma suivant en donne un résumé :



**Schéma -43 :** comparaison de la déracémisation par acylation et par hydrolyse enzymatiques combinées à la réaction de Mitsunobu des substrats **1** et **2**.

### III-9 Conclusion :

Dans cette étude, nous avons relevé l'efficacité de la réaction d'hydrolyse enzymatique appliquée à cette série de substrats. La quantité de 150 mg (675 U) de *CAL-B* mise en jeu pour le dédoublement d'une milli mole d'acétate a permis d'obtenir de bonnes sélectivités pour les substrats **2a-5a**.

Nous avons également examiné l'influence de la diminution de la quantité de *CAL-B* sur le déroulement de la réaction d'hydrolyse enzymatique. Pour la plupart des substrats étudiés, la diminution de la quantité de *CAL-B* mise en jeu se traduit par une nette amélioration de sa réactivité ainsi que de son énantiosélectivité. Pour le substrat **1a**, une activité de (56 U) a donné un facteur de sélectivité ( $E > 1000$ ) à un taux de conversion  $C = 50\%$ . Pour les acétates **3a** et **4a**, une activité de l'ordre de (90 U) a permis d'aboutir aux meilleures sélectivités ( $E > 1000$ ).

Cependant, en abaissant encore l'activité spécifique de la lipase au-dessous d'une limite encore efficace, un effet négatif est constaté sur ces propriétés dans certains cas (**1a**, **2a** et **5a**). Ainsi, la *CAL-B* devient totalement inactive lors de l'hydrolyse du **5a** en présence de 20 mg (90 U) de cette lipase. Ces résultats nous ont permis de mettre au point la quantité minimale de *CAL-B* qui soit encore effective lors de l'hydrolyse enzymatique de ces substrats.

La combinaison de l'hydrolyse biocatalysée avec la stéréoinversion chimique selon le protocole de Mitsunobu s'est montrée un procédé très efficace qui a permis d'obtenir un seul énantiomère de l'acétate de configuration (*S*).

La première étape de l'hydrolyse enzymatique a donné les meilleurs sélectivités requises ( $E > 1000$ ) à une conversion voisine ou égale à 50%. Sa combinaison avec la réaction d'inversion de configuration de Mitsunobu a donné des résultats très significatifs aussi bien pour les puretés optiques ( $ee = 92-99\%$ , excepté pour l'acétate **3a** où  $ee = 71\%$ ) que pour les rendements chimiques ( $Rdt = 76-89\%$ ) obtenus.

Les acétates de configuration (*S*) peuvent être facilement transformés en alcools correspondants de même configuration. Ces résultats ne sont pas décrits auparavant pour ces substrats lors d'une combinaison de l'hydrolyse enzymatique et de la réaction de Mitsunobu.

## CONCLSION GENERALE

---

---

## Conclusion générale

Les résultats de notre étude nous ont permis de constater que la réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique possède une grande efficacité afin d'obtenir des molécules énantiomériquement pures ou enrichies, ayant un intérêt majeur dans divers domaines (industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires). Les hydrolases et notamment les lipases constituent la classe d'enzymes la plus indiquée pour atteindre cet objectif ; elles ont souvent une préférence stéréospécifique pour un seul énantiomère d'un substrat chiral.

Nous avons mené notre étude sur des acétates correspondant aux alcools secondaires benzyliques chiraux, à savoir, les arylalkylcarbinols dont l'intérêt pharmacologique et l'implication en chimie fine sont reconnus.

Dans un premier lieu, nous avons examiné l'influence de la quantité de la lipase de *Candida antarctica B* (*CAL-B*), sur le système réactionnel, pour aboutir à une réactivité et énantiosélectivité optimales lors de la réaction du dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique. Des résultats intéressants sont obtenus. Bien que la quantité de 150 mg (675U) de *CAL-B*, mise en jeu pour le dédoublement d'une millimole d'acétate, soit efficace pour obtenir de bonnes sélectivités pour la plupart des substrats étudiés ( $E > 200$ ), la diminution de cette quantité a été favorable à d'excellentes sélectivités.

Nous avons noté une nette amélioration de l'énantiosélectivité de la *CAL-B* vis-à-vis des substrats étudiés à l'exception de l'acétate **5a**. Dans le cas du 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acétate **1a**, une quantité 12 fois plus inférieure de la lipase conduit efficacement à un facteur de sélectivité  $E > 1000$  pour un taux de conversion de 50%. De même, les deux énantiomères du 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl acétate **2a** sont obtenus optiquement purs (avec  $c=50\%$  et  $E > 1000$ ) en utilisant une quantité trois fois plus petite.

Dans un second volet de notre travail, nous avons mis en jeu un processus de déracémisation par stéréoinversion des substrats **1a-4a**, visant une valorisation quantitative de ces acétates obtenus optiquement purs par hydrolyse enzymatique. A cet effet, la réaction de dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique, menée jusqu'à une conversion d'environ 50% avec des facteurs de sélectivités  $E > 1000$ , a été combinée à une réaction d'inversion de

configuration chimique de l'énantiomère produit obtenu sous forme d'alcool de configuration (*R*). C'est le protocole de Mitsunobu qui a été mis en jeu pour réaliser cette transformation en acétate de configuration (*S*), ce qui explique l'augmentation du rendement chimique au-delà de 50%.

Des résultats très significatifs sont obtenus. Ainsi, les acétates (*S*) des substrats **1a**, **2a** et **4a** sont obtenus avec d'excellentes puretés optiques  $92\% \leq ee \leq 99\%$  après la déracémisation. Les rendements chimiques sont également très satisfaisants  $76\% \leq \text{rdt} \leq 89\%$ . Seul l'acétate (*S*) du substrat **3a**, est obtenu avec une baisse de la pureté optique  $ee = 71\%$  après la réaction consécutive de Mitsunobu.

Une comparaison de cette étude de déracémisation par hydrolyse enzymatique suivie de la réaction chimique de stéréo inversion a été réalisée avec celle effectuée précédemment par acylation enzymatique suivie du même protocole de Mitsunobu. Elle a mis en évidence une énantiocomplémentarité qui a permis d'obtenir les deux énantiomères du substrat **2a** optiquement purs ( $ee > 99\%$ ) et avec de bons rendements chimiques. Le substrat **1a** illustre également cette énantiocomplémentarité des deux réactions biocatalysées.

## PARTIE EXPERIMENTALE

## Appareillages et méthodes expérimentales :

Les produits chimiques utilisés dans ce travail proviennent des sociétés : *Aldrich*, *Fluka* et *Novo Nordisk*. La lipase utilisée dans cette étude est : *Candida antarctica Lipase B (CAL- B)* qui est une enzyme immobilisée.

### 1-Analyse spectroscopique :

Les spectres RMN<sup>1</sup>H : sont 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<sub>3</sub>) 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 (δ = 7,24 ppm pour CDCl<sub>3</sub>). Les abréviations suivantes ont été utilisées : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, et m= massif.

Les spectres RMN<sup>13</sup>C : sont conçus 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<sub>3</sub> pris comme référence interne.

Les spectres infrarouges (IR) : sont élaborés sur un appareil d'absorption infrarouge *Shimadzu IR 408* ou *Perkin - Elmer 883*. Les échantillons liquides sont déposés en film entre deux pastilles de NaCl, tandis que les solides sont préparés dans des pastilles de KBr parfaitement anhydre. Les nombres d'onde "ν" sont exprimés en cm<sup>-1</sup>

### 2-Analyse chromatographie :

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : sont effectués à l'aide d'une pompe *Spectra Series P100* ; les colonnes chirales sont de type *Chiralcel 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 λ = 254 nm. Les conditions d'élution sont en général : hexane / isopropanol avec des proportions différentes et des débits variables.

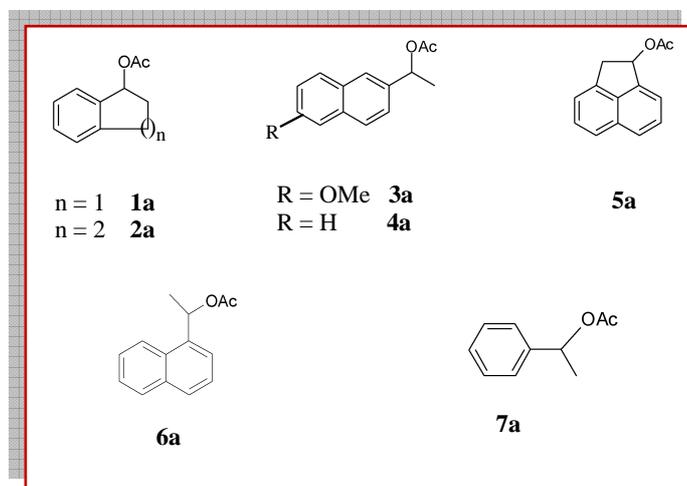
La chromatographie liquide sur colonne : sont effectuées sur gel de silice *Merck 230-400 Mesh* (0,04-0,063mm). Les éluants utilisés ont consisté en des mélanges de :

cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20), hexane/acétate d'éthyle (80/20), heptane/acétate d'éthyle (80/20), éther de pétrole/acétate d'éthyle (80/20).

**La chromatographie sur couche mince (CCM) :** sont réalisées sur des plaques de gel de silice (*Merck* 60 F<sub>254</sub>) en aluminium ou en plastique. La détection des taches est assurée par rayonnement UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) ou à l'aide d'un révélateur chimique qui est l'iode.

## Préparation des modèles 1a-6a :

Les acétates étudiés au cours de ce travail sont les suivants :



Les acétates **1a-6a** sont obtenus par acylation chimique des alcools correspondants, ces derniers sont soit commerciaux soit obtenus par réduction des cétones commerciales correspondantes.

### **A- Préparation des alcools racémiques :**

#### Protocole opératoire général :

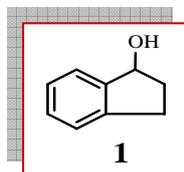
Dans un ballon tricol de 500 ml muni d'un réfrigérant, on ajoute à une solution de THF/H<sub>2</sub>O (4/1 : 160ml/40ml), 6 équivalents de borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub> : 120mmole soit 4,5g) ; le mélange est soumis à une agitation magnétique à 0°C. Par la suite, on additionne 20 mmole de cétone dans 120ml de THF à l'aide d'une seringue. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM).

#### **✳ Traitement**

Dés que le produit de départ est totalement consommé ; on effectue une hydrolyse du mélange réactionnel avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl : 1N) lentement et à froid. Le mélange est filtré puis partiellement évaporé sous pression réduite. Le résidu (alcool dans la phase aqueuse) est extrait avec l'acétate d'éthyle (3x180ml) et la phase organique est lavée

par une solution saturée de NaCl, séchée avec le sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) puis concentrée sous pression réduite.

### 1- 1-Indanol :



**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O.

**Masse moléculaire :** 134g/mole.

**Aspect :** solide de couleur blanche

Le 1-Indanol est un alcool commercial. Sous forme solide de couleur blanche.

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.33

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

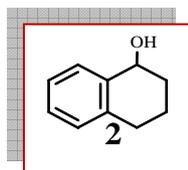
**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (98/2).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub>= 37.020.  
t<sub>r2</sub>= 43.244.

### 2- 1, 2, 3,4-tetrahydronaphthalen-1-ol (α-tétralol) :



**Formule brute :** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O.

**Masse moléculaire :** 148g/mole.

**Aspect :** huile incolore.

**Rendement :** 97 %.

Selon la procédure décrite précédemment 0.76g de la 3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (5 mmoles) de la cétone correspondante sont réduits. Le produit obtenu est sous forme d'une huile incolore.

### Caractéristiques spectrales :

**RMN <sup>1</sup>H:** δ (ppm): 1.5-1.78 (m, 4H cycliques); 1,98 (s, 1H du OH) 2,78(t, 2H cycliques); 7,1-7,4(ma, 4H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:** δ (ppm): 32.2 (-CH<sub>2</sub>-CH-OH); 71.5 (-CH<sub>2</sub>-CH-OH); 31.8 (=C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH-OH); 27.2 (=C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH-OH); 128-137 (-C=C- aromatiques).

### Caractéristiques chromatographiques:

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**Rf** = 0.68

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

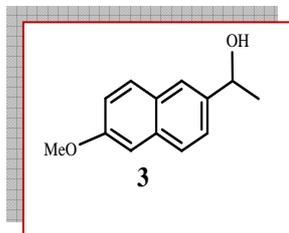
**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1}$ = 15.824

$t_{r2}$ = 17.648

### 3- 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) ethanol:



**Formule brute:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O.

**Masse moléculaire :** 202g/mole.

**Aspect :** poudre jaunâtre.

**Rendement :** 97 %.

Même procédure pour réduire 1.01g de cétone (5 mmole) du 2-acétyl-6-méthoxy-naphthalène). Le produit est obtenu sous forme d'une poudre jaunâtre.

### Caractéristiques spectrales :

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 670, 740, 810, 850, 900, 940, 960, 1020, 1070, 1110, 1160, 1190, 1210, 1250, 1380, 1450, 1475, 1595, 1620, 3250 ( $\nu_{OH}$ ).

**RMN <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm): 1.5-1.6 (d, 3H); 1.85 (s, 1H du OH); 3.90(s, 1H du OMe); 5.02 (q, 1H); 7.1-7.75 (ma, 6H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:**  $\delta$  (ppm): 55.3(CH<sub>3</sub>-CH-OH); 66.4 (CH<sub>3</sub> -OMe); 70.5(CH<sub>3</sub>-CH-OH); 123.7-131.1 (-C=C- aromatiques).

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**Rf** =0.32

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

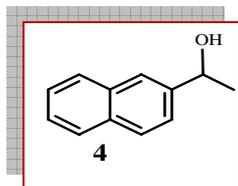
**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1}$ = 19.477

$t_{r2} = 26.696$ .

#### 4- 1-(naphthalen-2-yl) ethanol :



**Formule brute :**  $C_{12}H_{12}O$ .

**Masse moléculaire :** 172g/mole.

**Aspect :** solide de couleur blanche.

Le 1-(naphthalen-2-yl) ethanol est un *alcool commercial*. Sous forme solide de couleur blanche

#### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.28

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

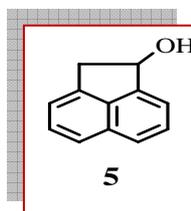
**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1} = 30.543$   
 $t_{r2} = 33.719$

#### 5- 1, 2-dihydroacénaphthylen-1-ol (acénaphthenol):



**Formule brute:**  $C_{12}H_{10}O$

**Masse moléculaire :** 170g/mole.

**Aspect :** huile incolore.

L'acénaphthenol est un *alcool commercial*. Sous forme d'une huile incolore.

#### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.17

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

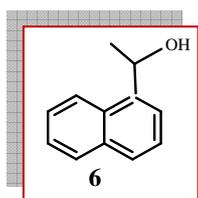
**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1} = 28.802$   
 $t_{r2} = 34.672$ .

### 6- 1-(naphthalen-1-yl) ethanol :



**Formule brute:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O.

**Masse moléculaire :** 172g/mole.

**Aspect :** solide de couleur blanche

**Rendement :** 91 %.

Même démarche pour réduire 0.8 g (5 mmole) de la cétone correspondante. Le produit obtenu sous forme solide de couleur blanche.

### Caractéristiques spectrales :

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 698, 802, 1369, 1442, 1508, 1593, 2974, 3193 ( $\nu_{OH}$ ).

**RMN <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm): 1.80 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH); 2.15 (s, 1H du OH); 5.50-5.75 (ma, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-OH); 7.50-8.10 (ma, 7H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:**  $\delta$  (ppm): 24.4 (CH<sub>3</sub>-CH-OH); 66.9 (CH<sub>3</sub>-CH-OH); 122.1-141.4 (-C=C- aromatiques).

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.20

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1}$  = 20.058.  
 $t_{r2}$  = 28.902.

## **B- Préparation des acétates racémiques :**

### Protocole opératoire général :

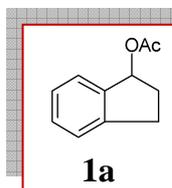
Dans un petit ballon ; on additionne à 1mmole d'alcool, 0,1mmole de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 4ml d'éther anhydre et 1,2 mmole de triméthylamine (NEt<sub>3</sub>) ; puis on ajoute goutte à goutte 1,5 mmole d'anhydride acétique. La réaction se déroule

sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM).

### **Traitement**

Lorsque l'acylation est totale, le mélange est dilué dans l'éther diéthylique et lavé successivement avec une solution de HCl 1N (2x3ml), ensuite avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (2x3ml) et enfin avec une solution saturée de NaCl (5ml). La phase organique est séchée avec le sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrée et concentrée.

### 1- 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acétate:



**Formule brute :** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>.

**Masse moléculaire :** 176g/mole.

**Aspect :** huile incolore.

**Rendement :** 89%.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile incolore avec un rendement : 89%

### Caractéristiques spectrales :

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 750, 885, 950, 1010, 1230, 1360, 1360, 1465, 1720 ( $\nu_{C=O}$ ), 2800.

**RMN <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm): 2.09 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-C=O), 2.12-2.14 (ma, 2H du cycle) (t, 2H du cycle), (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-O-), 7.1-7.3 (ma, 3H aromatiques), 7.4--7.5 (d, 1H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:**  $\delta$  (ppm): 126.7-144.4 (C=C aromatiques), 171.1 (C=O de l'ester).

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.87.

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

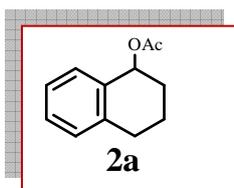
**Éluant:** Hexane/isopropanol (98/2).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub>= 10.141.

t<sub>r2</sub>= 11.185.

### 2- 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl acétate :



**Formule brute :** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>.

**Masse moléculaire :** 190g/mole.

**Aspect :** huile incolore.

**Rendement :** 91%.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile trouble

### Caractéristiques spectrales :

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 760, 1240, 1485, 1735 ( $\nu_{C=O}$ ), 2800.

**RMN <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm): 1.7-2 (m, 4H cycle) ; 2.2 (s, 3H); 2.6-3(m, 2H du cycle) ; 5.9-6.1 (t, 1H) ; 7.2-7.4 (m, 4H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:**  $\delta$  (ppm): 25.7 (CH<sub>3</sub>-C=O); 39.8 (-CH<sub>2</sub>-CH-OAc); 70.8(-CH<sub>2</sub>-CH-OAc); 33.8(=C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH-OAc); 16.8 (=C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH-OAc); 128-145.5 (-C=C- aromatiques); 170.9 (C=O de l'ester).

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Eluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**Rf** = 0.90

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

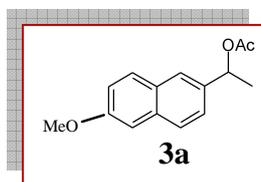
**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub> = 8.625.  
t<sub>r2</sub> = 9.055.

### 3- 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) éthyle acétate:



**Formule brute:** C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>.

**Masse moléculaire :** 244g/mole.

**Aspect :** solide de couleur jaune.

**Rendement :** 85%.

Le produit obtenu est sous forme d'un solide jaunâtre.

### Caractéristiques spectrales :

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) : 670, 920, 1020, 1170, 1230, 1470, 1590, 1720 ( $\nu_{C=O}$ ).

**RMN <sup>1</sup>H:** δ (ppm): 1.6(d, CH<sub>3</sub>-CH-O-); 2.07 (s, CH<sub>3</sub>-C=O); 3.9(s, CH<sub>3</sub>-C-O-); 6.01(q, CH<sub>3</sub>-CH-O-); 7.1-7.25 (ma, 2H aromatiques); 7.4-7.45 (d, 1H aromatique); 7.7-7.75(m, 3H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:** δ (ppm): 105.60-157 (C=C aromatiques), 170.4(C=C aromatiques), 171.1 (C=O de l'ester).1 (C=O de l'ester).

### **Caractéristiques chromatographiques :**

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.75

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

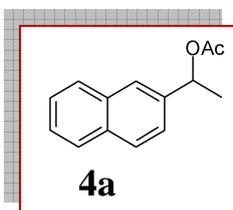
**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub>= 10.782

t<sub>r2</sub>= 12.050.

### **4- 1-(naphthalen-2-yl) éthyle acétate:**



**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>.

**Masse moléculaire :** 214g/mole.

**Aspect :** huile

**Rendement :** 87%.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile

### **Caractéristiques spectrales :**

**RMN <sup>1</sup>H:** δ (ppm): ): 1.7-1.8 (d, 3H, H<sub>3</sub>C-CH-O-), 2.2 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-C=O), 6.10-6.25 (q, 1H, H<sub>3</sub>C-CH-O-), 7.50-7.60 (m, 7H aromatique)

### **Caractéristiques chromatographiques :**

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.76

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

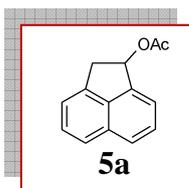
**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub>= 10.472.

t<sub>r2</sub>= 11.989.

### 5- 1,2-dihydroacénaphthylen-1-yl acétate:



**Formule brute:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**Masse moléculaire :** 212g/mole.

**Aspect :** huile incolore.

**Rendement :** 78 %.

Le produit obtenu est sous forme d'une huile incolore.

#### Caractéristiques spectrales :

**RMN <sup>1</sup>H:** δ (ppm): 2.1 (s, 3H, O=C-CH<sub>3</sub>), 3.2-3.3 (d, 2H du cycle), 6.6 (d, 1H, -CH-O), 7.2-7.8 (m, 6H aromatique).

#### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince:

**Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**R<sub>f</sub>** = 0.54

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

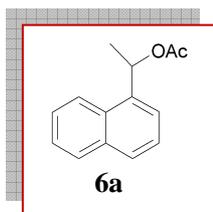
**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :** t<sub>r1</sub>= 11.889.  
t<sub>r2</sub>= 12.526.

### 6- 1-(naphthalen-1-yl) éthyle acétate:



**Formule brute:** C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>.

**Masse moléculaire :** 214g/mole.

**Aspect :** huile

**Rendement :** 82%.

Le produit obtenu sous forme d'une huile.

#### Caractéristiques spectrales :

**RMN <sup>1</sup>H:** δ (ppm): 1.80 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH); 2.2 5 (s, 1H du OH); 6.75 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-OH); 7.50-8.25 (ma, 7H aromatiques).

**RMN <sup>13</sup>C:** δ (ppm): 24.4 (CH<sub>3</sub>-CH-OH); 66.9 (CH<sub>3</sub>-CH-OH); 123.1-137.4 (-C=C- aromatiques)

### Caractéristiques chromatographiques :

Chromatographie sur couche mince: **Éluant :** Ether de pétrole /AcOEt (80/20).

**Rf = 0.53**

Analyse par HPLC chirale de l'alcool:

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

**Temps de rétention (min) :**  $t_{r1}$  = 9.870.  
 $t_{r2}$  = 13.503.

### **C- Dédoublément cinétique enzymatique par hydrolyse enzymatique :**

#### Protocole opératoire générale :

Dans un ballon de 50 ml muni d'un barreau aimanté, 2 mmoles de l'acétate racémique sont dissoutes dans 3 ml 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 B* est ajoutée au mélange. Ce mélange est agité à température de 25°C, pendant un temps approprié jusqu'à ce que la conversion atteigne la valeur de 50%. L'enzyme est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite

#### 1- Cas du 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acetate (1a):

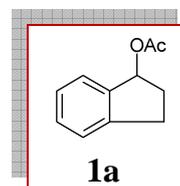
✿ Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (98/2).

**Débit (ml/ min) :** 0.5



*Acétate résiduel :*  $ee_{(S)} = 44\%$ .

*Alcool formé :*  $ee_{(R)} = 96\%$ .

**C= 32%, E=68.**

✿ Avec 12.5 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** CPG chirale : colonne : Chiralsil.DEX CB. Isotherme 140°C.

**Débit (ml/ min) :** 1.2

*Acétate résiduel :*  $ee_{(S)} = 98\%$ .

*Alcool formé :*  $ee_{(R)} = 99\%$ .

**C= 50%, E>1000.**

✿ **Avec 6 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 72 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (98/2).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 79%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 93%.*

**C= 46%, E = 70.**

**2- Cas du 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl acétate (2a) :**

✿ **Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 83%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 98%.*

**C= 46%, E=319.**

✿ **Avec 50 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (99/01).

**Débit (ml/ min) :** 1

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 99%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 99%.*

**C= 50%, E>1000.**

✿ **Avec 20 mg de CAL-B/1 mmole**

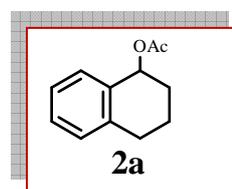
**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** CPG chirale : colonne : Chiralsil.DEX CB. Isotherme 140°C.

**Débit (ml/ min) :** 1.2

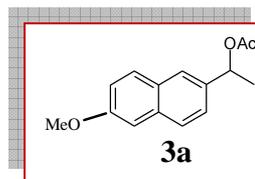
*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 28%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 96%.*



C= 22%, E = 64.

**3- Cas du 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) éthyle acétate:**



✱ **Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 98%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 99%.*

C= 49%, E>1000.

✱ **Avec 20 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiralpak-IB.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

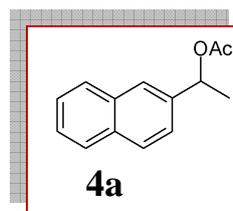
**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 99%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 98%.*

C= 49%, E>1000.

**4- Cas du 1-(naphthalen-2-yl) éthyle acétate:**



✱ **Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 0.5

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 89%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 99%.*

C= 49%, E>1000

☼ Avec 20 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 50 heures

**Colonne :** Chiralpak-IB.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

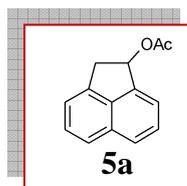
**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 99%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 97%.*

**C= 49%, E>1000.**

5- Cas du 1,2-dihydroacénaphthylen-1-yl acétate:



☼ Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 48 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 1

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 6%.*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 99%.*

**C= 6%, E = nd.**

☼ Avec 60 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 72 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : 10%*

*Alcool formé : 96%.*

**C= 9%, E =62.**

☼ Avec 20 mg de CAL-B/1 mmole

**Durée de la réaction:** 96 heures

**Colonne :** Chiracel OD-H.

**Éluant:** Hexane/isopropanol (95/5).

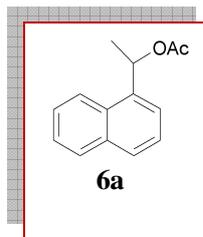
**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : non déterminé*

*Alcool formé : non déterminé*

**C= nd, E = nd.**

**6- Cas du 1-(naphthalen-1-yl) éthyle acétate:**



✿ **Avec 150 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 72 heures  
**Colonne :** Chiracel OD-H.  
**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).  
**Débit (ml/ min) :** 0.5

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 75%.  
Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 87%.*

**C= 46%, E =37.**

✿ **Avec 60 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48 heures  
**Colonne :** Chiral-pak-IB.  
**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).  
**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : 99%  
Alcool formé : 51%.*

**C=34%, E =566.**

✿ **Avec 20 mg de CAL-B/1 mmole**

**Durée de la réaction:** 48heures  
**Colonne :** Chiral-pak-IB.  
**Éluant:** Hexane/isopropanol (90/10).  
**Débit (ml/ min) :** 1.

*Acétate résiduel : 99%.  
Alcool formé : 44%.*

**C=30%, E = 454.**

## Déracémisation des acétates par combinaison de la réaction d'hydrolyse enzymatique avec une inversion de configuration selon le protocole de Mitsunobu :

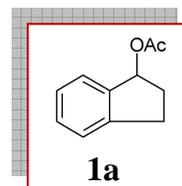
### ☀ Protocole opératoire

Dans un ballon de 50 ml muni d'un barreau aimanté, 2 mmoles de l'acétate racémique sont dissoutes dans 3 ml 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 B* est ajoutée au mélange. Ce mélange est agité à température de 25°C, pendant un temps approprié jusqu'à ce que la conversion atteigne la valeur de 50%. L'enzyme est filtrée 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 4 ml d'éther. Ensuite, 0.144 g (2.4 mmoles, 1.2 éq) d'acide acétique (AcOH) et 0.628 g (2.4 mmoles, 1.2 éq) de triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>) 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 mmoles, 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 température ambiante et son agitation est maintenue pendant une durée de 24 heures. Le milieu réactionnel est concentré et le produit obtenu est repris dans de l'éther. On observe alors la précipitation du produit de réduction du DIAD et de l'oxyde de PPh<sub>3</sub> 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*).

### Cas du 2,3-dihydro-1H-inden-1-yl acetate (1a):



### ☀ Après Hydrolyse enzymatique Avec 12.5 mg CAL-B/1mmole (première étape)

Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 98%, t<sub>R</sub> = 43.993 min.

Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 99%, t<sub>R</sub> = 49.383min.

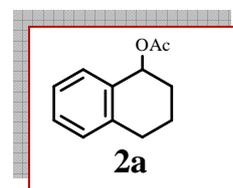
**C= 50%, E>1000.**

☀ *Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

L'acétate formé de configuration (*S*) est obtenu avec un rendement de **78%**.

$$ee_{(S)} = 94\%$$

2- Cas du 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl acétate (2a) :



☀ *Après Hydrolyse enzymatique Avec 50 mg CAL-B/Immole (première étape)*

Acétate résiduel :  $ee_{(S)} = 99\%$ ,  $t_R = 5.13$  min

Alcool formé :  $ee_{(R)} = 99\%$ ,  $t_R = 23.48$  min

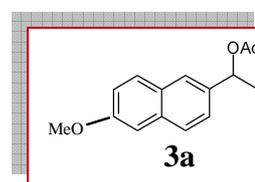
$$C = 50\%, E > 1000.$$

☀ *Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

L'acétate formé de configuration (*S*) est obtenu avec un rendement de **89%**.

$$ee_{(S)} = 99\%, t_R = 5.14 \text{ min.}$$

3- Cas du 1-(6methoxynaphthalen-2-yl) éthyle acétate:



☀ *Après Hydrolyse enzymatique Avec 20 mg CAL-B/Immole (première étape)*

Acétate résiduel :  $ee_{(S)} = 99\%$ , %,  $t_R = 5.617$  min.

Alcool formé :  $ee_{(R)} = 98\%$ , %,  $t_R = 15.959$  min.

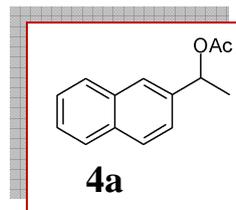
$$C = 49\%, E > 1000.$$

☀ *Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

L'acétate formé de configuration (*S*) est de rendement **82%**.

$$ee_{(S)} = 71\%,$$

4- Cas du 1-(naphthalen-2-yl) éthyle acétate:



✿ *Après Hydrolyse enzymatique Avec 20 mg CAL-B/Immole (première étape)*

*Acétate résiduel : ee<sub>(S)</sub> = 99%, t<sub>R</sub> = 5.382 min*

*Alcool formé : ee<sub>(R)</sub> = 97% t<sub>R</sub> = 13.439min*

**C= 49%, E>1000.**

✿ *Après la réaction de Mitsunobu (deuxième étape)*

L'acétate formé de configuration (*S*) est de rendement **82%**.

**ee<sub>(S)</sub> = 76%,**

## RERERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

## Référence bibliographique

### Introduction générale

- 1-** M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, T. Zelinski *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824
- 2-** H.B. Kagan, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2449-2468.
- 3-** J.D. Morrisson, *Asymmetric Organic Reactions, Vols. 1-5, Academic Press: New York, 1983-1985.*
- 4-** a) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis, Wiley: New York, 1994.* b) E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis I-III, Springer: New York, 1999.* c) I. Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis, 2nd Ed., Wiley: New York, 2000.*
- 5-** a) R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2008-2022. b) W.S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1998-2007. c) K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2024-2032.
- 6-** a) H.B. Kagan, J.C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, 18, 249-330. b) J.M. Keith, J.F. Larrow, E.N. Jacobsen *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 5-26.
- 7-** B.M. Trost *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34, 259-281.
- 8-** a) Kroutil.W, Faber.K, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9, 2901-2913, b) Strauss.U, Felfer.U, Faber.K, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10, 107-117.
- 9-** N. Bouzemi, L. Aribi-Zouieueche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17, 797-800.

### Chapitre 1

- 10-** A. Payen, J. F. Persoz, *Ann. Chim. Phys.* **1833**, 53, 73-92.
- 11-** L. Penasse, *les enzymes: cinétique et mécanisme d'action*, **1974.**
- 12-** W.C. Rose, B. H. Long, C. R. Fairchild, F. Y Lee, J. F. Kadow, *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 2016-2021.
- 13-** R.N. Patel, J. Howell, R. Chidambaram, S. Benoit, J. Knt, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3673-3677.
- 14- Réf 11 :** L. Penasse, *les enzymes: cinétique et mécanisme d'action*, **1974.**
- 15-** V. Gotor-ferrandez, R. Brieve, V. Gotor, *J. molecular catalysis B: enzymatic.* **2006**, 40, 111-120.
- 16-** D. Voet, G. Rousseau, « *Biochimie* », **2005.**
- 17-** a) B. Cambou, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2687, b) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7072, c) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767.
- 18-** K. Faber, "*Biotransformation in Organic Chemistry*", Springer, Heidelberg, **1995.**
- 19-** B. G. Davis, V. Boyer, *J. Royal Society of Chemistry.*, **2001**, 18, 618-640.
- 20-** K. Faber, "*Biotransformation in organic chemistry*", 5th edition. Springer, 22. **2004.**
- 21-** a) J. Touet, L. Faveriel, E. Brown, *Tetrahedron*, **1995**, 51-6, 1709-1720. b) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneib, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 3331-3351.
- 22-** H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "*Kinetic Resolution*". *Topics in Stereochemistry*, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Eds; J. Wiley & sons, Inc. Newyork, **1988**, 18, 249-330.
- 23-** C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294-7299.
- 24-** U. Andreoni, G. Baggi, S. Bernasconi, F. Pelizzoni, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1990**, 33, 633-636.

- 25-** C.H. Wong, G.M. Whiteside, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon press, Oxford, **1994**, 70-98.
- 26-** A. Kamal, M. Shaheer Malik, A.A. Shaik, S. Azeza, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1078-1083.
- 27-** (a) R.D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37, 1608–1633;  
(b) A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 548–556.
- 28-** P. Fickers, J. Destain, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, 12 (2), 119-130.
- 29-** A. Ghanem, V. Schurig *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 57–62.
- 30-** E. Łukowska, J. Plenkiewicz, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 493-499.
- 31-** (a) A. M. Klivanov, *Chemtech*, **1986**, 16, 354-359.  
(b) A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2767-2768.
- 32-** N. Anand, M. Kapoor, S. Koul, S.C. Taneja, R. L. Sharma, G.N. Qazi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 3131-3138.
- 33-** E. N. Kadnikova, V. A. Thakor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1053-1058
- 34-** L. Aribi-Zouiouche, J.C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088

## Chapitre 2

- 35-** K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5004–5010.
- 36-** U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.
- 37-** a) R. S. Word, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1790. b) W. Kroutil, K. Faber *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913. c) U. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.  
d) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 17, 797-800
- 38- Ref 36:** U.T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117.
- 39-** a) R.S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490. b) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis*, **1997**, 1-6, c) W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913.  
d) U. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117. e) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 5005-5010. f) F.F. Huerta, J.E. Backvall, *Org.Lett.*, **2001**, 3, 1209-1212. g) M. Edin, B. Martin-Matute, J.E. Backvall, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 708-715. h) M. Stirling, J. Blacker, M.I. Page, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 1247-1250.
- 40-** E.J. Ebbers, G.J.A. Ariaans, J.P.M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 9417.
- 41-** a) R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, 68, 36-56. b) R.S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490. c) S. Caddick, K. Jenkins, *Chem. Soc. Rev.*, **1996**, 447-456. d) R. Azerad, D. Buisson, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 11, 565-571. e) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 8291-8327.  
f) B. Martin-Matute, J.E. Backvall, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, 11, 1-7.
- 42-** J.V. Allen, J.M.J. Williams, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1859-1862.
- 43-** B. A. Persson, A.L.E. Larsson, M. Le Ray, J.E. Backvall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1645-1650.
- 44-** B. Martin-Matute, M. Edin, K. Bogar, F.B. Kaynak, J.E. Backvall, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 8817-8825.
- 45-** W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2901-2913.
- 46-** C.V. Voss, C.C. Gruber, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 276-281.
- 47-** a) H. Danda, Y. Furukawa, T. Umemura, *Synlett*, **1991**, 441-442. b) M.J. Kim, I.S. Lee, *Synlett*, **1993**, 767-768.
- 48-** T. Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8701-8716.
- 49-** M.C. Turcu, E. Kiljunen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 1682-1687.
- 50-** O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1967**, 40, 2380.

- 51-** E.H.B. Grochowski, R.J. Kupper, C.J. Michejda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6876-6877.
- 52-**a) E. Vantinen, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1775-1786. b) H.L. Liu, T. Anthonsert, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27.
- 53- Ref 48 :** T.Danda, T. Nagatomi, A. Maehara, T. Umemura, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8701-8716.
- 54-**A. Wallner, H. Mang, S.M. Glueck, A. Steinreiber, S.F. Mayer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2427-2432.
- 55-** A. Steinreiber, A. Stadler, S.F. Mayer, K. Faber, C.O. Kappe, *Tetrahedron Lett*, **2001**, 42, 6283-6286.
- 56-** A. Zaks, M. Tamarz, Tao Li, *Adv. Synth. Catal*, **2009**, 351, 2351-2357.

### Chapitre 3

- 57-** T. Nishikawa, M. Yoshita, K. Obi, M. Isobe, *Tetrahedron Lett*, **1994**, 35, 7997.
- 58-** S.C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, **1992**, 46.
- 59-** G.M. Gu, C.S. Chen, C.J. Sih, *Tetrahedron Lett*, **1986**, 27, 1763.
- 60- Réf 34 :** L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 4085.
- 61-**C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J-Y. Legros, J-C. Fiaud, *J. Soc. Alger. Chim*, **1999**, 9, 261
- 62- Réf 9 :** N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouèche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**.
- 63-** CAL-B (Chirazyme®, L-2, c.-F, C2, Lyo) lipase de *Candida antarctica*, fraction B, fournie par Boehringer Mannheim. L'activité spécifique est de 4500U/g.
- 64-** R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem* **1991**, 56, 2656-2665.