

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR
- ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année / 2016

Faculté des sciences
Département de chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Chimie Organique Fine.
Option : Synthèse et Développement de Molécules bioactives.

THÈME

Étude de la résolution cinétique de molécules d'intérêt pharmacologique par alcoololyse et aminolyse enzymatiques : Influence de quelques paramètres.

Présentée par : M^{me}Anna ZAIDI BOUNOUALA

Devant le jury :

Directrice de thèse : M^{me}Louisa ARIBI-ZOUIOUCHE Professeure U.B.M. Annaba

Co-directrice de thèse : M^{me}Mounia MERABET-KHELASSI Maître de conférences A U.B.M. Annaba

Présidente :	M ^{me} Saoussen ZEROR	Professeure	U.B.M. Annaba
Examineurs:	M ^{me} Elisabet DUNĂCH	Directrice de recherche	U. Nice-Sophia Antipolis
	MrSalih HACINI	Professeur	USTO. Oran
	M ^{me} ChafikaBOUGHELOUM	Maître de conférences A	U.B.M. Annaba

ملخص

العنوان: دراسة تأثير بعض العوامل على منحى الفصل الحركي الأنزيمي الأميني لمجموعة من الجزيئات ذات أهمية صيدلانية تفاعل كحولي و تفاعل أميني

التمية المستدامة لطرق بسيطة و فعالة للحصول على جزيئات كيرالية هي الشرط الرئيسي للكيمياء المعاصرة. إحدى هذه الطرق الأكثر شيوعا بالنسبة للجزيئات النقية هي عملية الفصل الحركي باستعمال الليبازات كمحفز حيوي الذي يعتبر القوي بالنسبة للكيمياء الخضراء الفعالة. هذه الأعمال تنمي التصنيع الإنتقائي للمتخيلات لجزيئات بذات أهمية صيدلانية معروفة ، من بينها الأحماض 2-اريل بروبيونيك والأستر. في هذا العمل، درسنا بعض العوامل القادرة على التحكم في التفاعلية والإنتقائية الليبازية خلال تفاعلات الفصل الحركي.

في الجزء الاول من العمل، قمنا بدراسة تفاعلين للفصل الأسيلي عالي الإنتقائية للمتخيلات محفزا بـ *CAL-B* وذلك لمجموعة من الأستيات البنزلية الثنائية في وسط لامائي : الأول باستعمال التفاعل الكحولي والتفاعل الثاني هو التفاعل الأميني. تأثير هام لطبيعة النكليوفيل هو العامل الحاسم لتوجيه الأداء الليبازي. الكحولات المتحصل عليها والأستيات المتبقية وجدت بـ ($ee > 99\%$) ولديها في معظم الحالات التحويل ($C=50\%$). الحركية لأربع تفاعلات الفصل الحركي المحفزة بـ *CAL-B* تم تحقيقها : تفاعلين هما الترانس أسترة (التفاعل الكحولي والتفاعل الأسيلي)، الإماهة، وتفاعل الفصل الأسيلي المحقق بوجود ثلاثي الإثيل الاميني. في عملنا تمكنا من البرهنة على وجود تفاعل إمامة مواز عالي الإنتقائية للمتخيلات، والذي يعتمد على قوة النكليوفيل المستخدم.

في الجزء الثاني للعمل قمنا بدراسة الفصل الحركي المحفز بـ *CAL-B* لبعض الأحماض الكربوكسيلية الكيرالية من عائلة البروفين وذلك باستعمال التفاعل الأميني الكيرالي و اللاكيريالي، فتحصلنا على تحويلات جيدة بدون إنتقائية ($1 \leq E \leq 5$) و ($1 \leq C \leq 5$) بالمقابل نتائج مهمة تحصلنا عليها مع البانتان-2-أمين باستعمال أستيات الإيثيل كمانح الأسيل والفينيل إثيل أمين مع حمض اللوريك.

الكلمات الدالة:

تفاعل الفصل الحركي الاختياري،ليباز،*CAL-B*، تفاعل كحولي ، تفاعلاميني ، تفاعل الأسيلي/الفصل الأسيلي،أريل ألكيل كربينول،أمينات أولية،الأحماض الكربوكسيلية.

ABSTRACT

Title: Study of the kinetic resolution of a set molecules of pharmacological interest via enzymatic alcoholysis and aminolysis: study of some parameters

The development of sustainable, simple and effective methods for the preparation of chiral building blocks is a major imperative of contemporary chemistry. One of the most attractive methods to access enantiopure molecules is the kinetic resolution by the mean of lipases as powerful and soft biocatalysts. This work develops the enantioselective synthesis of enantioenriched bioactive molecules, such as, arylalkyl esters, and 2-arylpropionic acids. We studied some crucial parameters on the reactivity and selectivity of lipase during kinetic resolution reactions.

In the first part, we have developed two highly enantioselective deacylations catalyzed by *CAL-B* of a set of secondary benzyl acetate in non-aqueous media: through alcoholysis and aminolysis, an important effect of the nucleophile as a decisive factor on the lipase performance is noted. In the majority of cases, the obtained alcohols and the remained acetates are enantiopures **ee > 99%** at conversion of **C = 50%**. The kinetic profiles of four kinetic resolution reactions catalyzed by *CAL-B* are elaborated: two transesterification (acylation and alcoholysis), an alkaline hydrolysis reaction, and déacylation in the presence of triethylamine as additive. We have confirmed the presence of a parallel hydrolysis reaction highly enantioselective, which depends directly to the nucleophile used.

In the second part, the *CAL-B* is used in reaction of kinetic resolution using the amines and acids and theirs derivatives: in the first study, the kinetic resolution of chiral carboxylic acids of the family profens by achiral amines, and in the second study, that concerns the kinetic resolution of chiral amines using achiral acyl donors. High conversions of the profens and their corresponding esters without selectivity (**22 ≤ C ≤ 100 and 1 ≤ E ≤ 5**). Interesting results were obtained with the pentan-2-amine using ethyl acetate as acyl donor (and the phenylethanamine with lauric acid, the corresponding amides are recovered optically pure.

Keywords :

enantioselective kinetic resolution , Lipase, *CAL-B*, Alcoholysis, Aminolysis, Acylation / Deacylation, Arylalkylcarbinols, primary amines, carboxylic acids.

RÉSUMÉ

Titre : Étude de la résolution cinétique de molécules d'intérêt pharmacologique par alcoololyse et aminolyse enzymatiques : Influence de quelques paramètres.

Le développement de méthodes durables, simples et efficaces pour la conception de molécules chirales est un impératif majeur de la chimie contemporaine. Une des méthodes les plus attrayantes pour accéder aux molécules énantiopures est le dédoublement cinétique avec les lipases comme biocatalyseurs puissants d'une chimie douce. Ces travaux développent la synthèse énantiosélective de briques moléculaires d'intérêt pharmacologique bien connus, les arylalkyl esters et les acides 2-arylpropioniques. Nous avons étudié quelques paramètres susceptibles de moduler la réactivité et la sélectivité des lipases lors des réactions de dédoublement cinétique.

Dans un **premier volet**, nous avons étudié deux réactions de déacylation hautement énantiosélectives catalysées par la **CAL-B** sur une série d'acétates benzyliques secondaires dans un milieu non-aqueux : la première en utilisant l'alcoololyse et la seconde l'aminolyse. Un effet important de la nature du nucléophile est mis en évidence, c'est un facteur décisif qui oriente la performance lipasique. Dans la majorité des cas, les alcools produits et les acétates résiduels sont obtenus avec des **ee > 99%** à une conversion de **C = 50%**. Le profil cinétique de quatre réactions de dédoublement cinétique catalysées par la **CAL-B** est élaborée: deux réactions de transestérification (alcoololyse et acylation), une réaction d'hydrolyse alcaline, et une déacylation en présence de la triéthylamine. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'une réaction d'hydrolyse parallèle hautement énantiosélective, qui dépend de la force du nucléophile utilisé.

Dans le **second volet**, la **CAL-B** est utilisée dans une réaction de DC mettant en œuvre des amines et des acides et dérivés : d'une part, pour le dédoublement cinétique d'acides carboxyliques chiraux de la famille des Profènes par des amines achirales et d'autre part pour le DC d'amines chirales par des donneurs d'acyle achiraux. De bonnes conversions sont obtenues pour les Profènes et leurs esters sans sélectivité ($22 \leq C \leq 100$ et $1 \leq E \leq 5$). Avec les amines chirales, des résultats intéressants ont été obtenus avec la **pentan-2-amine** en utilisant l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle, et la phényléthanamine avec l'acide laurique, d'où les énantiomères amides sont obtenus optiquement purs.

Mots clés : *Dédoublement cinétique énantiosélectif, Lipase, CAL-B, Alcoololyse, Aminolyse, Acylation/Déacylation, Arylalkylcarbinols, Amines primaires, acides carboxyliques.*

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma famille qu'elle m'a donné le courage, le soutien moral et financier pour atteindre mon but, que dieu me protège et me préserve mes chers parents : ma mère EL-ATRA, mon père SALAH, ma belle-mère ZOUBIDA et mon beau-père SALAH.

A mes chères sœurs, leurs maris et leurs enfants : ASSIA et NAZIHA.

A mes belles sœurs et leurs enfants : IMENE, HAMIDA, RAWDA, FAYZA et KHOULOUD.

A IMANE, DHEHA et ma chère tante FARIDA et sa merveilleuse famille.

A mes chers frères, leurs femmes et leurs enfants : Papa HAJOUJA, MOSTAFA, YAZID, FAOUZI, AMINE.

A mes beaux-frères : A. GHANI, IMAD, ISHAK et ZAKARIA.

A mon mari, bien aimé, pour le grand soutien morale : CHÉRIF.

A tous mes amis sans exception notamment ceux qui m'ont souhaité la réussite dans mes travaux de recherche scientifique : ZAHRA, MANHEL, AFFEF, KARIMA, F.ZOHRRA, NAJETTE, IMENE, ZOUAINA, ISMAHANE et SANA.

A mes fleurs :

ZINA, CHOVAIB, AMEL, AYOUB, RAMI, YASSINE, RAMDHAN, HADIL, IKRAM, IMAN, Seha, JAWAD, KARIM, RANIA, NOUR, BELKICE, SALMA, BARA et HAYTHEM.

*A mon cœur **MOHAMED AYMEN***

A la mémoire de notre oncle EL-BAHI.

AMNA

Remerciements

L'ensemble de ces travaux a été effectué au sein du Laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-compatible (*L.C.A.E*), Université Badji Mokhtar d'Annaba entre *Janvier 2011* et *Janvier 2016* sous la direction de Madame la Professeure **Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE** et madame la docteure **Mounia MERABET-KHELASSI**, maître de conférences classe A.

Mes premiers mots de remerciements vont vers la directrice de ma thèse de doctorat, la Professeure **Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE**, pour son soutien infini, de sa patience et sa grande disponibilité qui ont permis l'aboutissement de cette thèse. Qu'elle reçoive toute l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir attribué ce sujet de recherche, et, pour tout son dynamisme et ses qualités humaines.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à la co-directrice de ma thèse de doctorat, madame la Docteure **Mounia MERABET-KHELASSI** pour son soutien, sa sympathie, sa grande patience et la grande disponibilité, de toutes ses attentions et pour m'avoir fait bénéficier de son aide et surtout ses conseils avisés qui m'ont guidé depuis la première année de cette thèse. Je la remercie, également, pour ses fructueuses discussions au cours de la réalisation de ce travail et pour l'aide considérable qu'elle m'a apporté tout au long de ces années.

Je leurs dis **Merci infiniment**.

Je tiens à exprimer également, ma profonde gratitude à Mr. le Professeur **Olivier Riant** pour son accueil chaleureux et son aide durant mes stages (2 mois + 1 mois) à l'université catholique de Louvain-La-Neuve, Belgique, que je les ai accordé par l'Université Badji Mokhtar-Annaba.

Je remercie madame **Saoussen ZEROR**, professeure de l'enseignement supérieur de l'Université Badji Mokhtar- Annaba, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements aux membres du jury : madame **Elisabet DUNÃCH**, directrice de recherche à l'université Nice-Sophia Antipolis, Monsieur **Salih HACINI**, professeur de l'enseignement supérieur de l'université des sciences et de la

technologie- Mohamed Boudiaf- Oran et madame **Chafika BOUGHELOUM**, Maître de conférences classe A de l'Université Badji Mokhtar- Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, et de m'avoir apporté des remarques et des suggestions intéressantes. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre participation à ce jury et soyez assurés de tout mon respect.

Ce travail de thèse fut aussi un grand moment de partage scientifique ou non avec nombreux personnes. Je remercie chaleureusement madame **Chantal DELAET** pour son soutien inconditionnel et son humour.

J'ai le plaisir de remercier également mes collègues **Manhel BENNAMANE**, **Affef ALALLA**, **Fatma Zohra BELKACEMI** pour leur amitié et leur gentillesse, ainsi que tous les membres du laboratoire (**L.C.A.E**), leur grand soutien et tous les passionnants moments que nous avons partagés.

Je remercie chaleureusement **François BILLARD** et **Fabio LUCACCIONI** pour leur aide à tout moment et la bonne formation en GC. Un grand merci à **Laurent COLLARD** pour la formation en HPLC et pour toute son aide. A Monsieur **Alain JANCART** pour la formation en RMN.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu durant toutes ces longues années d'études et de recherches.

Abréviations, Symboles& acronymes	Signification
AA	Agent acylant
Ac	Acétyle
AE	Acétate d'éthyle
AI	Acétate d'isopropényle
Ar	Aryle
AV	Acétate de vinyle
AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BV	Benzoate de vinyle
C	Conversion
CAL-A	<i>Candida Antarctica Lipase A</i>
CAL-B	<i>Candida Antarctica Lipase B</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DC	Dédoublément cinétique
DCE	Dédoublément cinétique enzymatique
DCL	Dédoublément cinétique lipasique
DIPE	Diisopropyléther
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
E	Facteur de sélectivité
ee _s / ee _p	Excès énantiomérique substrat / produit
Eq.	Equivalent
h	Heure
Hz	Hertz
j	Constante de couplage
LV	Laurate de vinyle
M	Molaire
mg	Milligramme
mmole	Milli mole
P	Produit
S	Substrat
ppm	Partie par million
R _f	Rapport frontal

RMN	Résonance magnétique nucléaire
t.a	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
t _R	Temps de Rétention
TM	Tamis moléculaire

Tableau	Titre	Page
1	<i>Quelques exemples du « Chiral Switch ».</i>	4
2	<i>Les lipases les plus répandus en synthèse organique</i>	26
3	<i>Rendements chimiques des acétates synthétisés.</i>	71
4	<i>Alcoolyse enzymatique du 1-Phényléthyl acétate avec différents nucléophiles</i>	75
5	<i>Alcoolyse enzymatique du 1-Phényléthyl acétate avec différents nucléophiles.</i>	77
6	<i>Alcoolyse lipasique des acétates [2a-3a] avec différents nucléophiles en présence du tamis moléculaire</i>	83
7	<i>Validation de la voie de deacylation par alcoolyse catalysée par la CAL-B d'une série d'acétates benzyliques [1a-7a]</i>	88
8	<i>Aminolyse enzymatique des Arylalkyl acétates avec différentes bases en présence et en absence du tamis moléculaire 4Å</i>	95
9	<i>Deacylation lipasique des acétates [1a-7a] : impact du taux catalytique lipasique</i>	100
10	<i>Structures et rendement chimiques des amidoprofènes synthétisés</i>	119
11	<i>Etude de la réaction d'aminolyse de l'ibuprofène par l'aniline.</i>	121
12	<i>Application des conditions optimales de la réaction d'aminolyse d'acides et d'esters carboxylique par l'aniline.</i>	123
13	<i>Aminolyse lipasique de l'Ibuprofène par différentes amines.</i>	125
14	<i>Rendements chimiques isolés des amides racémiques</i>	134
15	<i>DC des amines 20 et 22 par amidification lipasique.</i>	136

Figure	Titre	Page
1	<i>Illustration de l'importance de la chiralité</i>	1
2	<i>Dépendance activité biologique/ stéréochimie d'une molécule médicamenteuse.</i>	2
3	<i>Les deux énantiomères de la thalidomide.</i>	3
4	<i>Evolution de la biocatalyse</i>	11
5	<i>Structure des enzymes</i>	13
6	<i>Fonctionnement catalytique des enzymes</i>	13
7	<i>Topologie du site actif enzymatique</i>	14
8	<i>Modèles expliquant la liaison enzyme-substrat</i>	14
9	<i>Classification des enzymes.</i>	15
10	<i>Diagramme énergétique d'une réaction catalysée par une enzyme</i>	18
11	<i>Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration</i>	19
12	<i>Illustration du dédoublement cinétique lipasique.</i>	30
13	<i>Principe de désymétrisation.</i>	34
14	<i>Dépendance des excès énantiomériques (eep/ees) à la conversion $E \leq 10$.</i>	42
15	<i>Dépendance des excès énantiomériques (eep/ees) à la conversion $E > 100$.</i>	42
16	<i>Structure tridimensionnelle de la CAL-B</i>	72
17	<i>Profil cinétique des différentes réactions de dédoublement cinétique lipasique étudiées.</i>	107
18	<i>Comparaison de différentes approches de déacylation de l'acétate 1a avec l'acylation de l'alcool 1 catalysées par la CAL-B.</i>	109
19	<i>Structure 3D de la CCL.</i>	132
20	<i>Structure 3D de la CRL.</i>	132

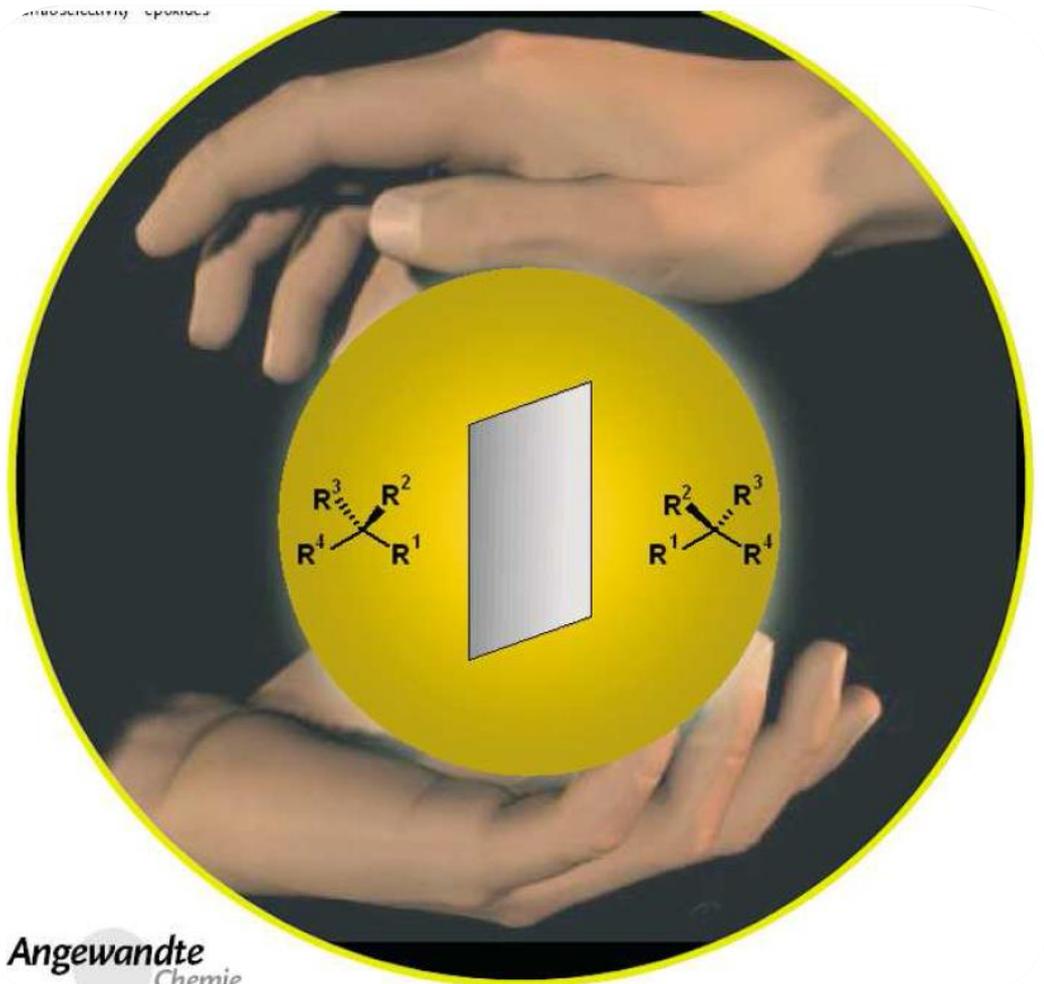
Histogramme	Titre	Page
1	Alcoolise enzymatique de l'acétate 1a avec différents nucléophiles.	76
2	Alcoolise enzymatique de l'acétate 1a avec différents nucléophiles en présence du MS 4Å.	78
3	Comparaison de l'alcoolise de 1a sans et avec tamis moléculaire.	79
4	Influence de la nature de l'amine sur l'évolution de la deacylation de l'acétate 1a sans et avec TMS4Å.	97
5	Impact du taux catalytique de la <i>CAL-B</i> lors de la deacylation des acétates [1a-7a] en présence de la Et ₃ N.	102
6	Effet de la température lors de la deacylation des acétates [1a-7a] en présence de l'Et ₃ N.	103

Schéma	Titre	Page
1	Comparaison de deux procédés industriels pour l'Ibuprofène	9
2	Réaction enzymatique	19
3	Production industrielle biocatalytique du fructose	21
4	Production de la Nicotinamide par Lonza	21
5	Production d'acrylamide par Nitto	22
6	Synthèse industrielle biocatalysée de l'aspartame	22
7	Procédés industriels biocatalysés de l'Amoxicilline et du Céfactor	23
8	Production biocatalysée d'herbicides énantiomériquement purs	23
9	Synthèse de l'acide-(R)-2-(4'-hydroxyphénoxy)propionique	24
10	Acylation lipasique chimio- et régiosélective de la purine	24
11	Spécificité lipasique	25
12	Mécanisme de Réactions catalysées par des lipases	27
13	Ouverture d'un β -lactame par alcoolyse cinétique lipasique	31
14	Principe d'une déracémisation	32
15	La déracémisation de l'indanol par combinaison DCE/Mitsunobu	33
16	Principe d'un dédoublement cinétique dynamique	33
17	DCD du 1-indanol	34
18	Désymétrisation lipasique d'un diol allénique prochiral	35
19	Synthèse du (S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophényl) éthanol via un DCE	36
20	Alcoolyse lipasique de l'ibuprofène	36
21	Synthèse de la (S)-Rivastigmine en passant par un DCE	37
22	Synthèse de la mèsylate Risagiline en passant par un DCE du 1-indanol	37
23	Principe du dédoublement cinétique lipasique.	40
24	Mécanisme d'un dédoublement cinétique lipasique.	40
25	Acylation énantiosélective du rac-N-Boc-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-ol : effet de la nature de lipase.	44
26	DCE du Phényléthanamine par l'AcOEt.	45
27	Hydrolyse lipasique du N-(1-(2-phénylthiazol-4-yl) éthyl)butyramide dans l'eau.	45
28	Hydrolyse lipasique d'un γ -nitro-ester.	46
29	Acylation lipasique d'alcools secondaires hétérocycliques.	47
30	Acylation lipasique d'alcools propargyliques	48
31	Acylation lipasique d'alcools alléniques.	48

32	<i>Hydrolyse lipasique d'acrylates racémiques.</i>	49
33	<i>Amidification d'amines primaires par l'acide 4-pentenoïque.</i>	50
34	<i>Acylation d'amines primaires par la CAL-B.</i>	50
35	<i>Transestérification lipasique des esters de l'ibuprofène.</i>	51
36	<i>Hydrolyse lipasique des esters de l'ibuprofène.</i>	51
37	<i>Catégories d'agents acylant.</i>	52
38	<i>Différentes catégories de donneurs d'acyle utilisées pour la protection des amines.</i>	53
39	<i>DCE du 1-hétéroaryléthanol via alcoolyse enzymatique.</i>	53
40	<i>Estérification de l'ibuprofène : effet de solvant.</i>	54
41	<i>Hydrolyse lipasique d'un acétate hétérocyclique : Effet du co-solvant.</i>	55
42	<i>Transestérification lipasique de 1,1-diphényl-2-propanol.</i>	56
43	<i>Estérification lipasique du 3-(t-butylcyclobutylidène) éthanol.</i>	57
44	<i>Acylation lipasiques d'un alcool ferrocényl primaire à chiralité planaire.</i>	57
45	<i>Acylation/Deacylation lipasiques d'un dérivé ferrocényl à chiralité planaire.</i>	58
46	<i>Acylation lipasique d'alcools secondaires.</i>	59
47	<i>Hypothèse de mécanisme interprétant la diminution d'activité apparente et de sélectivité dans un milieu fort concentré en lipase.</i>	60
48	<i>Hydrolyse lipasique assistée par le carbonate de sodium.</i>	60
49	<i>Premier objectif.</i>	63
50	<i>Deuxième objectif.</i>	63
51	<i>Conception d'alcools énantiomériquement enrichis.</i>	67
52	<i>Différentes possibilités de deacylation des acétates.</i>	67
53	<i>Alcoolyse énantiosélective de l'acétate du α-cyano-benzyle par DCE.</i>	68
54	<i>DCE du 1-hétéroaryléthanol via alcoolyse enzymatique.</i>	69
55	<i>DCE de l'acétate de phényle ortho-substitué par alcoolyse enzymatique.</i>	69
56	<i>Substrats choisis.</i>	70
57	<i>Réduction des cétones benzyliques en alcools correspondants.</i>	71
58	<i>Acylation chimique des alcools secondaires.</i>	71
59	<i>Nucléophiles choisis.</i>	72
60	<i>Alcoolyse enzymatique du phényléthyl acétate par différents alcools.</i>	74
61	<i>Alcoolyse enzymatique du phényléthyl acétate en présence du Tamis moléculaire.</i>	77
62	<i>Alcoolyse lipasique des acétates [2a-3a]</i>	82

63	<i>Comparaison Acylation/ Déacylation lipasique.</i>	89
64	<i>Différentes approches de déacylation lipasique des acétates.</i>	92
65	<i>Aminolyse lipasique d'un azo-acétate.</i>	93
66	<i>Aminolyse enzymatique de l'acétate 1a en présence et en absence du Tamis moléculaire.</i>	94
67	<i>Déacylation lipasique des acétates [1a-7a] : impact du taux catalytique lipasique.</i>	99
68	<i>Déacylation versus acylation.</i>	106
69	<i>Réactions d'investigations</i>	112
70	<i>Aminolyse enzymatique des acides carboxyliques et de leurs dérivés.</i>	112
71	<i>Structure générale des profènes</i>	113
72	<i>Structure des différents profènes.</i>	113
73	<i>Différentes voies biocatalytiques pour la conception des profènes</i>	114
74	<i>Estérification lipasique de l'ibuprofène par le méthanol en utilisant différents solvants.</i>	115
75	<i>Influence de la structure du substrat lors de l'alcoolyse lipasique.</i>	115
76	<i>Acides carboxyliques et leurs dérivés esters choisis.</i>	116
77	<i>Acidification des sels de l'ibuprofène.</i>	116
78	<i>Synthèse des esters d'ibuprofène racémiques</i>	117
79	<i>Synthèse de l'amidoprofène racémique 12a</i>	117
80	<i>Optimisation des rendements chimiques des amidoprofènes synthétisés.</i>	118
81	<i>Aminolyse lipasique de l'ibuprofène par l'aniline.</i>	120
82	<i>Acides et esters carboxyliques choisis.</i>	122
83	<i>Réaction de DC par amidification enzymatique à étudier.</i>	126
84	<i>DCE du Phényléthanamine par l'AcOEt.</i>	126
85	<i>DCE du 2-méthylindoline dans différents solvants.</i>	127
86	<i>Amidification d'amines primaires par l'acide 4-pentenoïque.</i>	128
87	<i>DCE du 4-phényl-2-butanamine.</i>	128
88	<i>DCE du 1-phényléthanamine par le biais de la CAL-B.</i>	129
89	<i>Amines choisies</i>	130
90	<i>Réaction d'investigation.</i>	130
91	<i>Acides carboxyliques choisis.</i>	131
92	<i>Les esters d'énol utilisés.</i>	133
93	<i>Synthèse d'amides racémiques.</i>	134

94	<i>DC des amines 20 et 22 par amidification lipasique avec différents donneurs d'acyle.</i>	135
-----------	---	------------



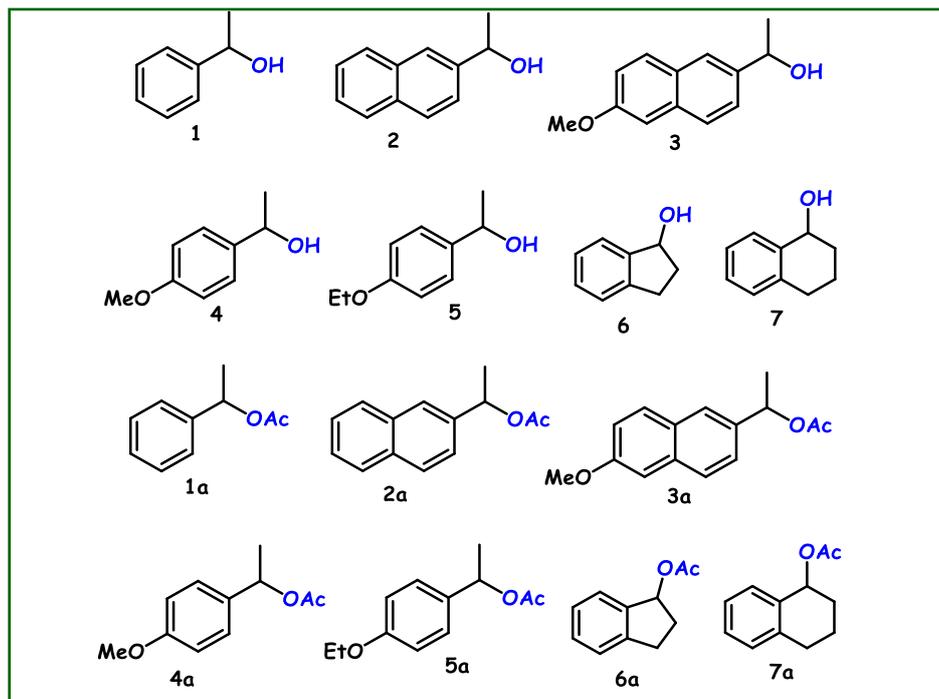
Angewandte
Chemie

Angewandte
Chemie

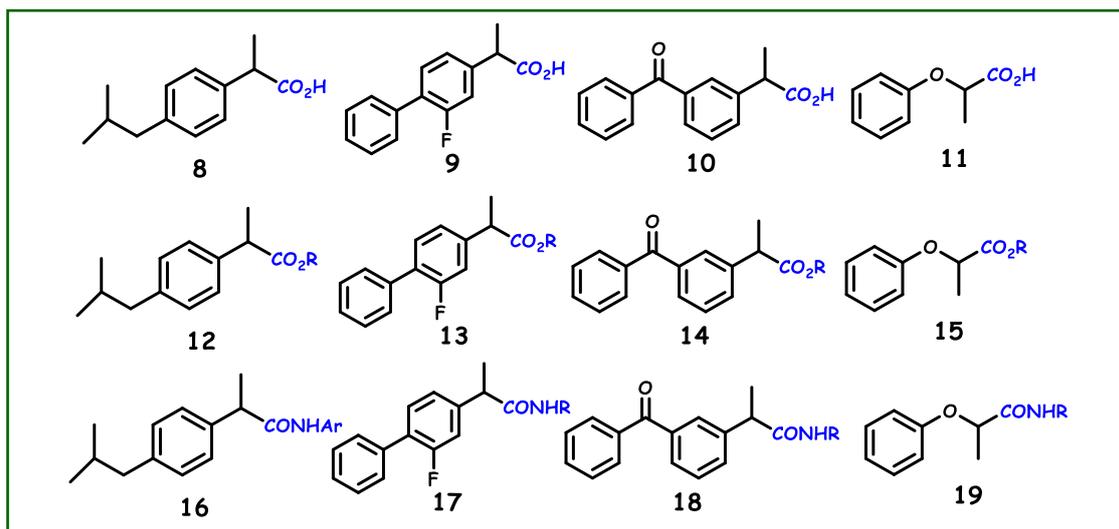
"I call any geometrical figure, or group of points, chiral, and say it has chirality, if its image in a plane mirror, ideally realized, cannot be brought to coincide with itself."

*Lord Kelvin (1904) dans son livre:
Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave
Theory of Light*

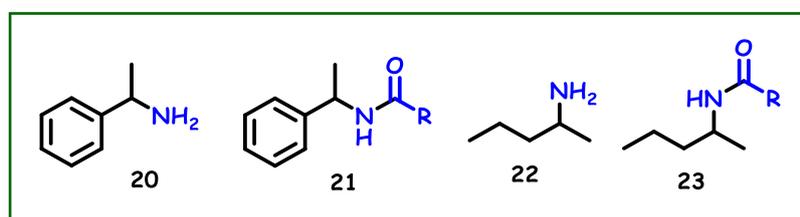
Liste des alcools et des acétates chiraux :



Liste des acides, esters et amides carboxyliques chiraux



Liste des amines et amides chiraux



INTRODUCTION GÉNÉRALE 1**PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE****INTRODUCTION DE LA PREMIÈRE PARTIE** 8**CHAPITRE I : LES ENZYMES ET LEURS APPLICATIONS**

I-1-INTRODUCTION	11
I-2-Généralités sur les enzymes	12
I-2-1-Définition	12
I-2-2-Structure des enzymes	12
I-2-3- Fonctionnement des enzymes	13
I-2-4 -Classification des enzymes	15
I-2-5 -Avantages et inconvénients des enzymes	16
I-3-Mécanisme et cinétique de la catalyse enzymatique	18
I-4-Application industrielles des enzymes	20
I-5-Les lipases.	24
I-5-1-Définitions et origines	24
I-5-2-Réactions catalysées par les lipases	26
I-5-3-Moded'action des lipases	27
I-5-4-Avantages de l'emploi des lipases dans un milieu organique	28
I-5-5- Les règles empiriques de Kazlauskas sur l'énantiopréférence lipasique	28
I-6-Mode d'accès aux molécules énantiomériquement enrichies par les lipases	30
I-6-1- Par dédoublement cinétique lipasique	30
I-6-2 - Par un Processus de déracémisation	31
I-6-2-a - DCL couplée à une stéréoinversion chimique	32
I-6-2-b - Par dédoublement cinétique dynamique	33
I-6-3- Par désymétrisation lipasique	34
I-7- Application des lipases dans la synthèse des molécules à visée thérapeutiques	35
I-7-1- Synthèse du Crizotinob	35
I-7-2- L'Ibuprofène	36

I-7-3- Synthèse de Rivastigmine	36
I-7-4- Synthèse du mésylate Rasagiline	37
I-8-CONCLUSION	37

CHAPITRE II : Dédoublement cinétique lipasique

II-1-INTRODUCTION	39
II-2- Le dédoublement cinétique lipasique	40
II-2-1- Principe	40
II-2-2- Paramètres d'évaluation d'un DCL irréversible	41
II-2-3- Les réactions menées par un DCL	43
II-3- Facteurs influent un dédoublement cinétique lipasique	43
II-3-1- Influence de la nature de la lipase	44
II-3-2- Influence de la structure du substrat à dédoubler	46
II-3-3- Influence de la nature du donneur /accepteur d'acyle	52
II-3-4- Influence du solvant (co-solvant)	54
II-3-5- Influence de la température	55
II-4- Travaux antérieurs du laboratoire	56
II-5-CONCLUSION	61
CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE	62
OBJECTIFS DE LA THÈSE	63

DEUXIEME PARTIE : *RESULTATS ET DISCUSSIONS.*

INTRODUCTION DE LA DEUXIEME PARTIE	64
------------------------------------	----

CHAPITRE III : ALCOOLYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE D'ACÉTATES BENZYLIQUES CHIRAUX CATALYSÉE PAR LA CAL-B

III-1-INTRODUCTION	65
III-2-Problématique posée	66

III-3-Mise au point bibliographique	68
III-4-choix des modèles d'étude	70
III-4-1-choix des substrats	70
III-4-2-choix des nucléophiles	72
III-4-3-Choix de l'enzyme	72
III-5-Etude de l'alcoolyse lipasique des acétates benzyliques choisis	73
III-5-1-Influence de la nature du nucléophile en fonction de l'hydrophobicité du solvant	73
III-5-2-Influence de l'addition du tamis moléculaire lors de l'alcoolyse du 1a	76
III-5-3-Effet de la nature du nucléophile lors de l'alcoolyse des acétates [2a-3a]	81
III-5-4-Validation des conditions de la déacylation par alcoolyse enzymatique avec des acétates d'intérêt pharmacologique [1a-7a]	87
III-6-CONCLUSION	89
CHAPITRE IV : DÉACYLATION PAR AMINOLYSE LIPASIQUE D'ARYLALKYL ACÉTATES	
IV-1-INTRODUCTION	91
IV-2- Objectifs de l'étude	91
IV-3- Aperçu bibliographique	92
IV-4- Etude de la déacylation par aminolyse catalysée par la CAL-B des acétates [1a-7a]	93
IV-4-1- Mise au point de la réaction de Déacylation par aminolyse du 1- phényléthyl acétate 1a	93
IV-4-2- Déacylation des acétates [1a-7a] en présence de l'Et₃N: Impact de la quantité de la CAL-B	98
IV-4-3- Explications et hypothèses	104
IV-4-4-Déacylation versus acylation du 1-phenyléthyléthanol : Profil Cinétique des déacylation de l'acétate 1a	105
IV-5-CONCLUSION	109

**CHAPITRE V: AMINOLYSE LIPASIQUE DE QUELQUES ACIDES
CARBOXYLIQUES ET DE LEURS DÉRIVÉS**

V-1-INTRODUCTION	111
V-2-Objectifs de l'étude	111
V-3- DC par aminolyse lipasique d'acides carboxyliques chiraux et dérivés	112
V-3-1-Aperçu bibliographique	113
V-3-2- Les modèles de l'étude	115
V-3-3- Synthèse des racémiques	116
V-3-3-a- Synthèse des esters d'Ibuprofène racémiques (Estérification de Fischer)	116
V-3-3-b- Synthèse des amidoprofènes racémiques	117
V-3-4- Mise au point de la réaction de DC par aminolyse lipasique des acides chiraux	119
V-3-5- Scope de la réaction d'aminolyse sur quelques acides et dérivés esters	122
V-3-6- Aminolyse de l'ibuprofène par différentes amines	125
V-4- DC par amidification lipasique d'amines chirales	126
V-4-1- Aperçu bibliographique	126
V-4-1- a- Influence de la nature de l'enzyme	126
V-4-1- b- Influence de la nature du solvant	127
V-4-1- c- Influence de la nature du substrat	128
V-4-1- d- Influence de la nature du donneur d'acyle	128
V-4-2- Choix des modèles de l'étude	129
V-4-3-Synthèse des amides racémiques	133
V-4-4- Dédoublément par amidification lipasique d'amines primaires	135
V-5-CONCLUSION	140
CONCLUSION GÉNÉRALE	142
PARTIE EXPÉRIMENTALE	143
ANNEXES	



INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale :

La chiralité est une caractéristique omniprésente du monde vivant. Nos mains fournissent le meilleur exemple qui illustre cette notion, où la main droite est l'image de la main gauche dans un miroir. Sur le plan moléculaire, dans leur majorité, les molécules naturelles, telles : les acides α -aminés et les sucres sont chirales et existent à l'état naturel sous la forme d'un unique énantiomère. Cette propriété détermine les fonctions biologiques et physiologiques des protéines, récepteurs et des différents acides nucléiques des organismes vivants ainsi que les phénomènes régulateurs du développement.¹ En outre, les processus métaboliques et régulateurs des systèmes biologiques sont sensibles à la stéréochimie et différentes réponses peuvent être observées en comparant les activités des énantiomères.²

Par exemple, la stéréospécificité des récepteurs olfactifs peut être illustrée par l'exemple du **limonène** dont l'un des énantiomères donne l'odeur du citron et l'autre celle de l'orange, ou encore par celui de la **carvone**, où la dextrogyre (+) sent du carvi tandis que son antipode optique sent la menthe³ (**Figure.1**)

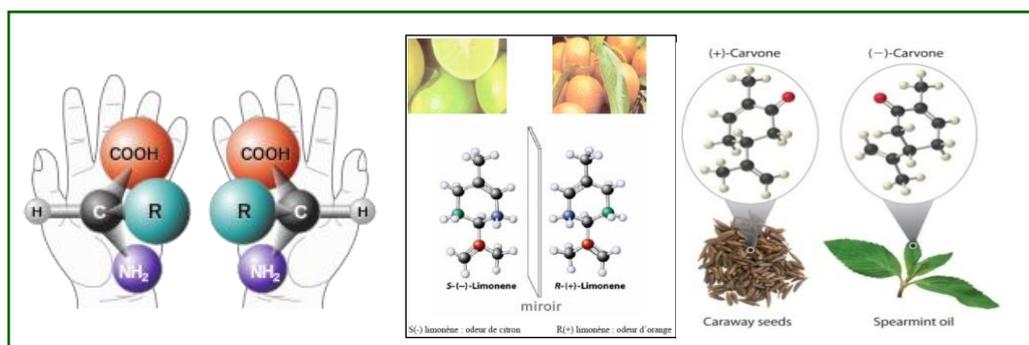


Figure 1 : Illustration de l'importance de la chiralité.

Cette propriété est encore plus importante, sur le plan médicamenteux, comptant ce que nous ingérons au quotidien avec des possibilités d'une activité biologique modulable en fonction de la stéréochimie des principes actifs, qui est, soit associée à un des énantiomères, l'autre peut être, au mieux, inactif, ou pire, hautement toxique, soit par le fait que chaque énantiomère possède une activité biologique extrêmement différente de l'autre, ou bien l'un d'eux inhibe l'autre.

¹ P. Kraft, G. Frater, *Chirality*, **2001**, *13*, 388-394.

² C. Gros, G. Boni., *L'actualité chimique*, **Mars 1995**, 9-15.

³ T. J. Leitereg, D. G. Guadagni, J. Harris, T. R. Mon, R. Teranishi, *Nature*, **1971**, *230*, 455-456.

A titre d'exemple, le **(2R,3R)-Propoxyphène (Darvon®)**, un analgésique, son énantiomère (**Novrad®**) est un antitussif, d'autre part, le **(S)-Ibuprofène**, anti-inflammatoire non-stéroïdien et analgésique est 160 fois plus actifs que le **(R)**, ou encore le **(S)-pénicillamine**, fréquemment utilisé contre l'arthrite et anti-inflammatoire, et utile contre les intoxications aux métaux lourds, son antipode optique est hautement toxique, s'attaque aux yeux et est suspecté d'être cancérigène, cet effet antagoniste a été, également détecté pour l'**Ethambutol (Figure.2)**.⁴

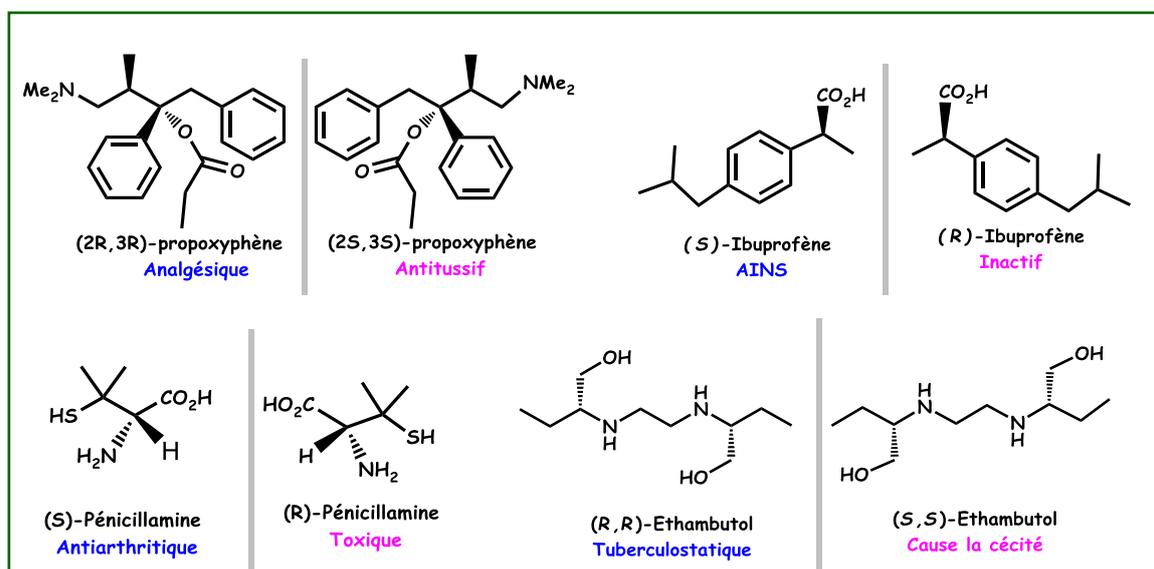


Figure 2 : Dépendance activité biologique/ stéréochimie d'une molécule médicamenteuse.

Le drame le plus tragique lié à la chiralité des molécules médicamenteuses remonte aux années 60, est celui de la **Thalidomide** racémique (**Contergan®**), utilisée comme sédatif chez les femmes enceintes, en 1954, pour soulager les nausées matinales; deux ans après, une augmentation importante du nombre de nouveau-nés possédant des malformations congénitales est remarquée. Ce drame a été attribué à l'énantiomère **(S)** de la **Thalidomide**, le médicament a été retiré directement de la vente.

Quelques années plus tard, des études pharmacologiques réalisées sur des animaux, révèle que la **Thalidomide** se racémise dans le sang, ce qui montre que même l'utilisation de l'énantiomère sédatif mène aux mêmes résultats que l'utilisation du racémique (**Figure.3**). Il a été prouvé que l'effet tératogène ne provient pas de la thalidomide lui-même mais du métabolite.⁵

⁴ (a) H. B. Kagan, *L'actualité chimique*, **2003**,11, 10-14 ; (b) H. Kagan, M. Tabart, *L'Act. Chim.*, **2015**, 393-394, 31-38.

⁵ (a) J. Seyden-Penne, "*Synthèse et Catalyse Asymétriques*". , **1994**, Inter Edition / CNRS ;(b) H.U. Blaser, *Fis. Rend. Acc. Lincei.*, **2013**,24, 213-216.

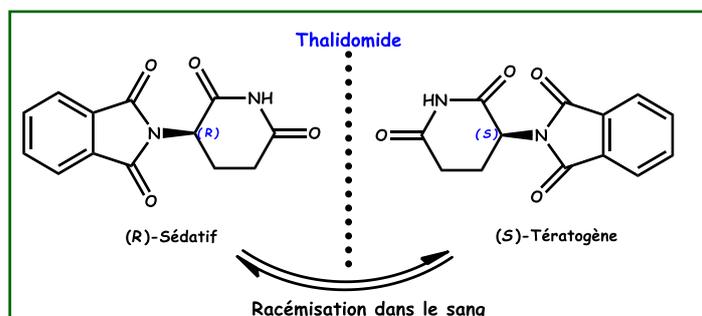


Figure 3: Les deux énantiomères de la thalidomide.

Depuis lors, la séparation des énantiomères et l'obtention des molécules optiquement pures sont devenues une nécessité dans la préparation des médicaments et dans d'autres domaines tels que : l'agrochimie, les arômes et les cosmétiques. Cela est devenu une exigence, par des législations ordonnées par autorités sanitaires réglementaires américaine et européenne la **FDA** (Food and Drug Administration) en **1992**, et l'**ECPMP** (European Committee for Proprietary Medicinal Products) en **1993**, imposant que la commercialisation d'un racémique ne peut être autorisée que si on trouve que les deux énantiomères ont les mêmes propriétés biologiques⁶. Cela est de plus en plus strict lors de la commercialisation des médicaments racémiques. C'est ainsi que les statistiques publiées concernant ces molécules commercialisées sous la forme d'un unique énantiomère représentait près de 9 milliards \$ en **2004** et près de 15 milliards \$ en **2009**, cela estimé à une croissance de plus de 11% par an.⁷

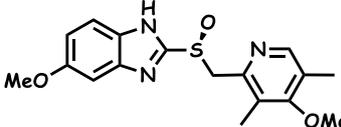
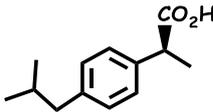
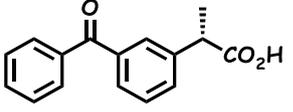
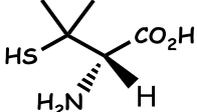
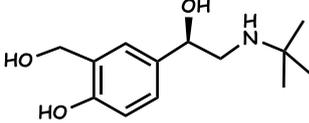
C'est ainsi que la prise de conscience de l'importance de la chiralité avec les besoins de disposer de médicaments sous forme d'un seul énantiomère s'est fortement accrue, et cela a suscité les firmes pharmaceutiques à adopter une nouvelle pratique appelée le « *chiral switch* », par la mise sur le marché l'énantiomère de la molécule précédemment commercialisée. Cela leur permet d'augmenter leurs bénéfices et de prolonger leurs brevets ainsi que de mettre l'énantiomère pur pour plus d'efficacité et de sécurité. Non seulement, pour cette raison mais aussi elles l'utilisent comme stratégie afin de conserver son monopole d'exploitation sur un médicament donné et lutter contre l'industrie du médicament générique.

⁶ (a) K-E. Jaeger, M.T. Reetz., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 68–73; (b) C & EN, "Cover Story", **2003**, 81, (7), 55-73..

⁷ (a) A. Berthod., « *Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications* », Ed. A. Berthod, Springer, **2010**, 1-32; (b) A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News*, **14June2004**, 47-62 ; (c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, **2011**.

Nous citons dans le tableau ci-dessous quelques exemples (*Tableau 1*).⁸

Tableau.1 : Quelques exemples du « Chiral Switch ».

Le Chiral Switch	Arguments de commercialisation
 <p>Esoméprazole (Nexium®) (l'énantiomère S : Anti-secrétoire gastrique et anti-ulcéreux. Inhibiteur de la pompe à proton)</p>	<p>Augmentation de la biodisponibilité par rapport à l'énantiomère (R). Durée d'action plus longue que le racémique : l'Oméprazole (Antra®)</p>
 <p>Dexibuprofène (l'énantiomère S : Anti-inflammatoire non stéroïdien -AINS-)</p>	<p>Action pharmacologique réside dans l'énantiomère (S). Racémisation <i>in vivo</i> est ≈ 60%. Réduction de la dose administrée à 1/3 par rapport au mélange racémique l'Ibuprofène.</p>
 <p>Dexketoprofène (l'énantiomère S : Anti-inflammatoire non stéroïdien -AINS-)</p>	<p>Action pharmacologique réside dans l'énantiomère (S). Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique le Ketoprofène. Contrairement au (R)-Ibuprofène, le pouvoir racémisant <i>in vivo</i> est < 10%.</p>
 <p>D-pénicillamine (l'énantiomère S : Antiarthritique « maladie de Wilson »).</p>	<p>Toxicité de l'énantiomère L (perte de poids, pouvoir mutagène, voire cancérogène...).</p>
 <p>(R)-Salbutamol (Levalbuterol) (l'énantiomère R : Agoniste β_2).</p>	<p>Activité bronchodilatatrice supérieure à celle du mélange racémique et du (S), ainsi que l'absence de tout effet allergique gênant provoqué par ces derniers.</p>

⁸ (a) I. Agranat, H. Caner, & J. Caldwell, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**,1(10), 753-768 ; (b) A. J. Hutt , & J. Valentová, *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana*, **2003**,50(7),23; (c) A.Somogyi, F. Bochner, D. Foster, *Australian Prescriber*, **2004**,27(2),47-49 ; (d) *Pharma-Flash*, ISSN 0378-7958,**2006**, 33, (3),7-10 ; (e) A. G. Nerkar, K. S. Lade, N. A. Gadhave, & S. D. Sawant, *Journal of Pharmacy Research*, **2011**, 4(4), 1300-1303; (f) M. J. Sweet, *Berkeley Technology Law Journal*, **2009**,24(1), 129-147.

Donc, on comprend bien l'utilité d'avoir séparément, les énantiomères du racémique des briques moléculaires d'une haute valeur ajoutée. Pour ce faire, il existe trois modes d'accès ⁹ :

✂ *Par dédoublement d'un mélange racémique* qui peut être, soit spontané¹⁰, soit cinétique avec un réactif chiral (stœchiométrique) ou un catalyseur chiral (enzyme), soit par séparation de diastéréoisomères formés grâce à un auxiliaire chiral optiquement pur.

✂ *Par synthèse asymétrique* qui correspond en l'introduction d'un élément d'asymétrie au sein d'une espèce prochirale à l'aide d'un réactif ou un catalyseur chiral.

✂ *Par transformation hautement stéréosélective de synthons chiraux (le réservoir chiral)* qui sont souvent des molécules d'origine naturelle (*terpènes, monosaccharides, aminoalcools, acides aminés, ...*) qui subissent une succession de transformations hautement stéréosélectives pour parvenir à l'énantiomère souhaité.

Parmi ces méthodes, la synthèse asymétrique et les méthodes de dédoublements sont les plus exploitées à l'échelle industrielle (pharmaceutique, agro-chimique, alimentaire, arômes et parfumerie,...) pour parvenir aux briques moléculaires d'une haute valeur ajoutée. L'un des aspects les plus attrayants est celui de la **catalyse**,¹¹ qui est le 9^{ème} des douze principes fondateurs du concept de la **chimie verte** et étant son pilier,¹² répandant ainsi au contexte le plus général du développement durable, dans lequel les recherches fondamentales s'orientent de plus en plus vers les procédés de bioconversions afin de respecter certaines exigences environnementales et économiques.¹³

Dans ce contexte s'orientent les travaux de recherche développés au sein du laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-Compatible L.C.A.E, sous la direction du Professeur **L. ARIBI-ZOUIOUCHE**, et ce travail de thèse, s'intègre dans ce thème scientifique.

⁹ C. Rabiller., « *Stéréochimie et Chiralité en Chimie Organique* », De Boeck & Larcier, s.a, **1999**.

¹⁰ L. Pasteur, *Ann. Chim. et Phys.*, **1848**, 24, 442.

¹¹ Récompenses de la catalyse par l'attribution des prix Nobel : **2001**: Noyori, Knowles et Sharpless pour leurs travaux sur la catalyse énantiosélective. **2005**: parmi les trois chercheurs récomposés, Yves Chauvin, pour la Métathèse des oléfines.

¹² (a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, **1998**; (b) P. T. Anastas, P. T. Li, *Water as a Green Solvent* (John Wiley & Sons Eds), **2010**; (c) P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 301-312; (d) B. M. Trost, *Science* **1991**, 1471-1477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 107, 285-307, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 259-281.

¹³ (a) F. Hasan, A. Ali Shah, A. Hameed, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39, 235-251; (b) C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Research & Development*, **4**, **2000**, 286-290; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied Biochemistry & Biotechnology*, **2004**, 118, 155-170; (d) J. Venkata Prasad, M. Prabhakar, K. Manjulatha, D. Rambabu, K. Anand Solomon, G. Gopi Krishna, K. Anil Kumar, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 3109-3111; (e) I. Chiarotto, M. M. M. Feeney, M. Feroci, A. Inesi, *Electrochimica Acta*, **2009**, 54, 1638-1644.

L'objectif visé est la mise aux points de procédés propres pour accéder aux molécules bioactives énantiomériquement enrichies ou pures dans un cadre d'une approche éco-compatible. La biocatalyse est l'outil pivot exploité au cours du développement de ce sujet, lors des réactions de dédoublement cinétique enzymatique, particulièrement par aminolyse,¹⁴ et ce, dans le but de mieux comprendre le mode d'action des lipases, en modulant les paramètres susceptibles d'interfèrent directement sur la performance catalytique lipasique des esters benzyliques chiraux, des acides α -arylpropionique (Profènes) et des amines d'intérêt pharmacologique.¹⁵

Nous avons mis aux point deux méthodes faciles de déacylation hautement énantiosélective des acétates benzyliques chiraux d'intérêt pharmacologique, la première par alcoololyse et la deuxième par aminolyse lipasique, et ce, en mettant l'accent sur quelques hypothèses permettent d'appréhender le mode d'action des lipases dans des milieux non-aqueux. Ces méthodes répondent aux critères de chimie éco-compatibles. Nous avons, également, mis en évidence, d'une part, des conditions de résolutions cinétiques lipasiques d'acides carboxyliques chiraux, appartenant à la famille des Profènes (AINS), en utilisant des amines achirales, et d'autre part le dédoublement des amines chirales par le biais des donneurs d'acyle achiraux.

Ce manuscrit de thèse est reparti en deux parties :

La première partie est dédiée à une revue de la littérature sur les différentes voies biocatalytiques de synthèse énantiosélective de molécules d'intérêt potentiel, et ce pour cadrer le sujet de cette thèse. Elle est subdivisée en deux chapitres (**I-II**). **Le premier**, traite l'importance de l'utilisation des enzymes, et particulièrement les lipases. **Le second** est consacré à la mise au point bibliographique sur le dédoublement cinétique lipasique, en illustrant son intérêt par des exemples de la littérature.

¹⁴ (a) V. Gotor, "Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis reactions" in "Enzymes in Action", 117-132, B. Zwanenburg et al. (eds.), ©2000, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands ; (b) V. Gotor, *BioOrg & Med. Chem.*, **1999**, 7, 2189-2197; (c) F. van Rantwijk, M. A. Hacking, & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131(6), 549-569.

¹⁵ (a) N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 627-630 ; (b) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2006**, 17, 797-800; (c) R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14 ; (d) R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252, 659-701; (e) C. Pilissao and M. da Graca Nascimento, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 428-433; (f) A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 4511-4514. (g) R. Irimescu and K. Kato ; *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 523-525.

La **seconde partie** est consacrée à la présentation des résultats et discussions. Elle est répartie sur trois chapitres (**III-V**). Dans les deux premiers chapitres, une étude approfondie de la réaction de dédoublement cinétique par déacylation catalysée par la lipase de *Candida antarctica* (*CAL-B*), dans un milieu non-aqueux, est présentée. Dans le **chapitre (III)** nous détaillons les résultats de la déacylation *via* alcoololyse lipasique, et ce, en examinant l'effet de la nature du nucléophile et l'activité de l'eau. Dans le **chapitre (IV)**, nous présentons les résultats de la déacylation *via* aminolyse lipasique. Nous comparons ensuite les deux voies de déacylation entre elles et également avec d'autres réactions de dédoublement cinétique réalisées. L'étude de leurs profils cinétiques est présentée dans le but de mieux comprendre le processus catalytique lipasique.

Le dernier chapitre (**V**) est consacré à l'étude de la réaction d'aminolyse de divers acides carboxyliques chiraux et achiraux et de leurs dérivés esters *via* un dédoublement cinétique lipasique. Nous décrivons la réaction d'aminolyse lipasique de quelques acides α -arylpropioniques (*Profènes*), en modulant les différents paramètres influençant la réactivité et la sélectivité lipasique. Ensuite une mise au point de la réaction d'amidification lipasique de quelques amines primaires est présentée.

Nous finalisons ce travail par une conclusion générale et des perspectives. La description des protocoles opératoires détaillés et l'indentification spectroscopique des différentes structures synthétisées sont réunis dans la **partie expérimentale**. Les travaux publiés de ce manuscrit sont joints en annexe.

PREMIERE PARTIE

REVUE DE LA LITERATURE

Introduction de la première partie

Aujourd'hui, la protection de l'environnement et la lutte contre la pollution ont imposé à l'industrie chimique de revoir leurs procédés, voire les remplacer par des méthodes propres, pour rester compétitifs sur le marché mondial.¹⁶ Cela est résumé par le concept de la chimie verte, traduit par l'édiction de douze principes fondateurs, dont la catalyse est le pilier. L'objectif étant de ne fournir qu'un seul produit en minimisant les déchets, en réduisant au maximum l'emploi de produits toxiques et le coût énergétique lié à l'activation des molécules par l'utilisation des réactions catalytiques rapides et efficaces, et ce, dans une optique de développement durable.¹⁷

Actuellement, 85-90% des procédés de synthèses industriels impliquent au moins une étape catalytique. De ce fait, le marché mondial de catalyseurs est évalué pour avoir été estimé à presque 23.2 milliards de dollars en 2013 et s'attend à franchir le seuil de 29.9 milliards de dollars avant 2019.¹⁸

Un des exemples les plus représentatifs du remplacement des procédés classiques par autres catalytiques, est celui de la synthèse de l'ibuprofène. Cet anti-inflammatoire, principe actif de plusieurs antidouleurs commerciaux, est synthétisé en quantités industrielles depuis les années **1960** par le procédé Boots. Cette synthèse se déroule en six étapes et génère des quantités très importantes de déchets qu'il faut séparer et éliminer : la production annuelle de **13000 tonnes** d'ibuprofène génère plus de **20000 tonnes** de déchets. Au début des années **1990**, la société Boots-Hoechst-Celanese (BHC, actuellement BASF) a mis au point un élégant procédé alternatif, en trois étapes catalytiques en réduisant la pollution à la source. Ce nouveau procédé, est économe en atome à 100% pour les deux dernières étapes et génère une quantité beaucoup plus faible de produits secondaires, qui sont par ailleurs récupérés et valorisés¹⁹ (*Schéma 1*).

¹⁶ R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, *68*, 381-388.

¹⁷ C. Bruneau, lettre des sciences chimiques du CNRS, L'actualité chimique, novembre **1999**, 127-129.

¹⁸ (a) Global Markets for Catalysts: Focus on Catalyst Regeneration **Jun 2015** By BCC Research; (b) Market Report GlobalCatalystMarket. ThirdEdition. Updated: **March 2015** Publisher: Acmite Market Intelligence.

¹⁹ R. Sheldon, Introduction to green chemistry, organic synthesis and pharmaceuticals. In *Green chemistry in the pharmaceutical industry*, **2010**, 1-20. Edited by Peter J. Dunn, Andrew S. Wells, and Michael T. Williams©**2010** Wiley-VCH .

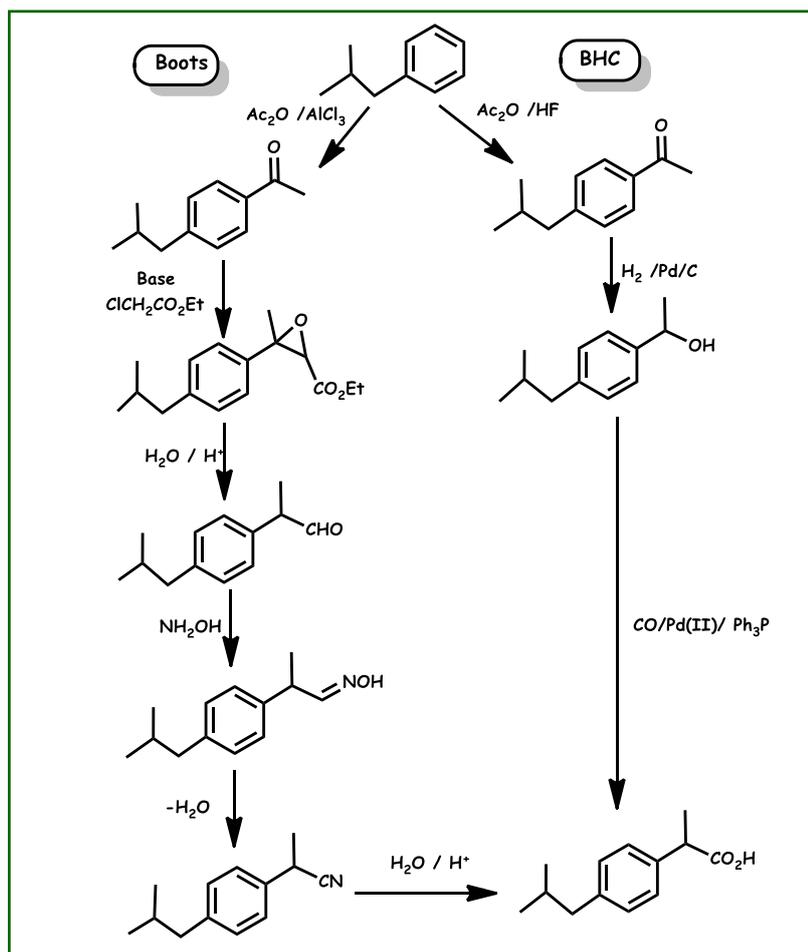


Schéma 1 : Comparaison de deux procédés industriels pour l'Ibuprofène.

En fait, la catalyse permet l'accélération d'une réaction chimique à l'aide d'une substance présente en très faible quantité ce qu'on appelle le « **catalyseur** » et aussi spécifique à une réaction donnée, théoriquement cette substance ne modifie ni le type ni la quantité de molécules qui résultent de la réaction c'est à dire n'intervient pas à la composition final du produit. Et selon la nature du catalyseur, la catalyse est subdivisée en trois branches :

- ↳ **La catalyse hétérogène** dans laquelle le catalyseur et les réactifs forment plusieurs phases, on utilise des catalyseurs, souvent inorganiques, principalement en chimie lourde, 70% des réactions catalytiques emploient ce type de catalyseurs,²⁰ leur exploitation est restreinte en chimie fine à cause de leur faible sélectivité.
- ↳ **La catalyse homogène** : (Oganocatalyse, catalyse organométallique,...) quand le catalyseur et les réactifs ne forment qu'une seule phase. elle est encore peu utilisée

²⁰ H. U. Blaser, *Catalysis Today*, **2000**, 60, 161-165.

dans l'industrie, seulement 20% des réactions catalytiques utilisent ce type de catalyseur, pourtant ils présentent une grande sélectivité.

↳ **La catalyse enzymatique (Biocatalyse):** plusieurs biotransformations industrielles, particulièrement pharmaceutiques et agroalimentaires, font appel aux enzymes pour la fabrication des produits chimiques, par le bien de leur grande efficacité et sélectivité.

Au cours de nos travaux de recherche, comme chimistes organiciens nous sommes intéressées par l'exploitation de cette dernière branche de catalyse, parce qu'elles permettent à accéder aux molécules énantiomériquement enrichies ou pures, dans un cadre de chimie verte. C'est pour cette raison que nous cernons notre mise au point bibliographique autour des applications de biocatalyseurs en synthèse organique qui permettent un accès aisé aux molécules chirales à haute valeur ajoutée, dans cette première partie de notre travail intitulée « **Revue de littérature** ».

Nous avons subdivisé cette partie en deux chapitres :

- Le premier est consacré à une mise au point bibliographique sur les différents biocatalyseurs, particulièrement les lipases, la réaction biocatalysée et les grandes applications de la biocatalyse industrielle, il s'intitule « **Les enzymes et leurs applications** ».
- Le second chapitre intitulé « **Dédoublement cinétique lipasique** » est dédiée à la présentation des différentes réactions catalysées par des lipases et qui peuvent être appliquées pour élaborer des dédoublés cinétiques à partir des racémiques, permettant ainsi de générer des molécules énantiopures, et ce, en présentant quelques exemples de la littérature.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

LES ENZYMES ET LEURS APPLICATIONS

I-1-Introduction:

L'appellation « **catalyse enzymatique** », où encore « **biocatalyse** » remonte au XVIIIème siècle. En 1815, Gay Lussac a utilisé des micro-organismes pour faire une fermentation alcoolique. La *diastase* était la première enzyme isolée par A. Payen et J.F. Persoz,²¹ enzyme capable d'hydrolyser l'amidon. Le diagramme ci-dessous (**Figure 4**) représente l'évolution chronologique de la biocatalyse, qui était très tôt exploitée par rapport à l'édiction du concept de la chimie verte. Actuellement, on parvient à fabriquer des enzymes sur mesure grâce à l'ingénierie des protéines (mutagenèse dirigée, évolution moléculaire...) afin d'obtenir des enzymes plus performantes sous des conditions spécifiques liées à l'application industrielle des modifications au niveau moléculaire.²²

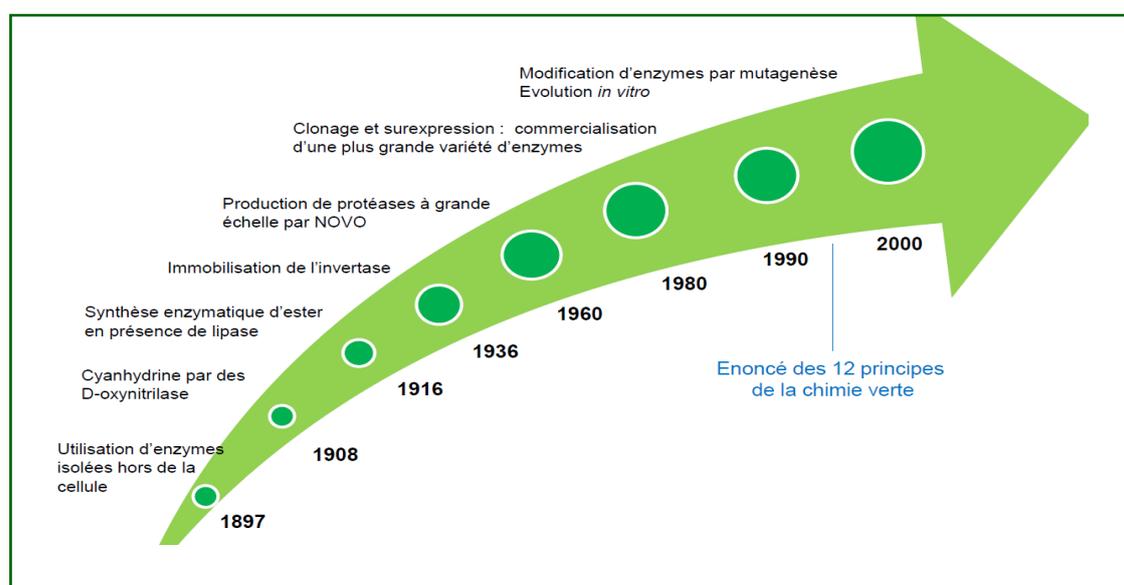


Figure 4: Evolution de la biocatalyse.²³

Ce type de catalyse particulier se traite, soit avec des enzymes isolées, soit avec des micro-organismes entiers, ou encore en faisant recours à des cultures cellulaires, il peut être classé à l'intermédiaire entre la catalyse hétérogène et la catalyse homogène, et ce, par la possibilité du recyclage du catalyseur (avantage de la catalyse hétérogène), et par la haute sélectivité (avantage de la catalyse homogène).²⁴

²¹ A. Payen, J. F. Persoz, *Ann, Chim, Phys*, **1833**, 53, 73–92.

²²(a) W. P. Stemmer, *Nature*, **1994**, 370, 389-391 ; (b) B. Badet, *L'actualité chimique*, Aout-Septembre 2002, pp 4.

²³http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/cnrs_10_juillet_paris_laurence_hecquet.pdf

²⁴ G. Rothenberg, *Catalysis : Concepts and Green application*, Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.

I-2- Généralités sur les enzymes:²⁵

I-2-1- Définition :

L'enzyme est un catalyseur présent dans un organisme vivant. La majorité des enzymes connues sont de nature protéique, c'est-à-dire résultant de la condensation d'acides α -aminés de la série *L* avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé et ainsi de suite, de proche en proche, pour constituer une protéine (polypeptide de masse moléculaire élevée). Les masses moléculaires des enzymes varient de 10 000 Da à 1 000 000 Da environ. Les enzymes peuvent être *monomériques*, c'est-à-dire constitués d'une seule chaîne peptidique, ou bien *oligomériques*, c'est-à-dire constitués d'un nombre défini de chaînes peptidiques identiques ou différentes.

I-2-2- 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 dans laquelle les acides aminés sont disposés linéairement dans la chaîne protéique. Dès que la structure primaire s'enroule sur elle-même elle constitue la **structure secondaire** formant principalement des hélices α et feuillets β . La **structure tertiaire** se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures : hélices et feuillets. Le repliement et la stabilisation de protéines à structure tertiaire dépend de plusieurs types de liaisons faibles qui stabilisent l'édifice moléculaire. La **structure quaternaire** est l'assemblage de deux ou plus de la structure tridimensionnelle. Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation de cette structure. Le principal élément de stabilisation des structures quaternaires est l'interaction hydrophobe entre les acides aminés non polaires (**Figure 5**).

²⁵(a) E. Brown, J.F. Biellmann, © *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, Doc. J 1 240-2*, PP 1-13 ; (b) H. D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle, *Food Chemistry*, 2009 ; (c) C. Vollhardt, "Traité de chimie organique", DeBoeck université, Traduit par P. Depovere, 2^{ème} édition, Bruxelles, 1994 ; (d) Graham L. Patrick, *Chimie pharmaceutique*, 2^{ème} édition, deBoeck supérieur, 2002.

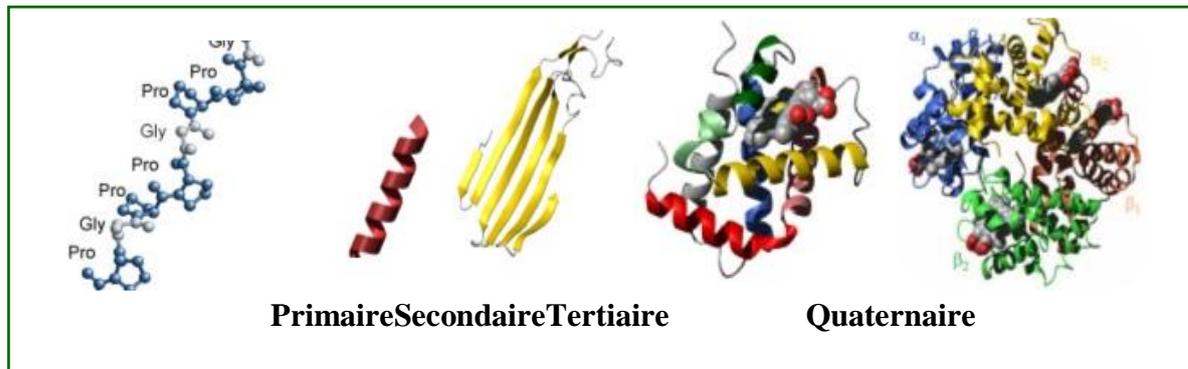


Figure 5: Structure des enzymes.

I-2-3- Fonctionnement des enzymes:

La chaîne polypeptidique se replie pour donner un édifice tridimensionnel bien défini. La diffraction des rayons X sur des cristaux d'enzymes permet de décrire cette structure, dans laquelle on distingue une cavité où s'effectuera la réaction catalysée par l'enzyme. Cette cavité est dite **site actif** (*Figure 6*).

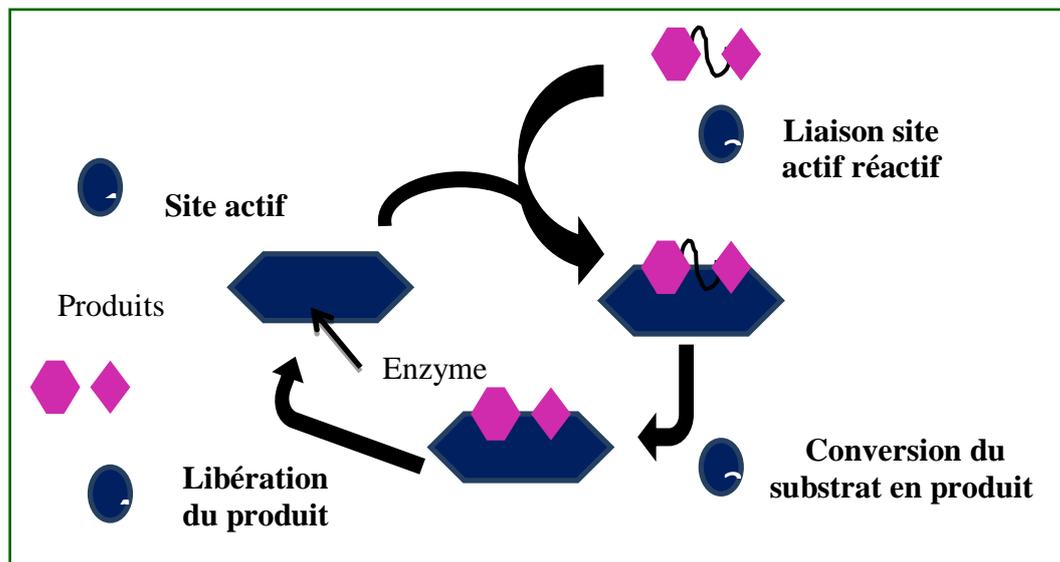


Figure.6 : Fonctionnement catalytique des enzymes.

Les substrats viennent s'ancrer et réagissent au sein du site actif, qui ne présente généralement qu'une partie infime de l'ensemble de la structure de protéine. Il comporte deux sous parties (*Figure 7*):

- ↪ **Le site de fixation**: cette partie du site actif reconnaît le substrat et le maintient bien positionné grâce à des liaisons non covalentes faibles qui s'établissent entre le substrat et les acides aminés. liaisons *homophiles*, c'est-à-dire résultant d'interactions de groupements de polarités similaires (liaisons *hydrophobes* et liaisons *hydrogène*).
- ↪ **Le site catalytique**: Cette partie correspond à un ensemble d'acides aminés qui interagissent directement avec le substrat pour faciliter sa transformation en produit.

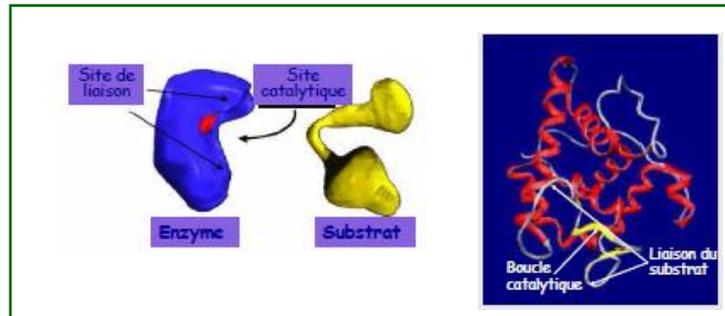


Figure 7: Topologie du site actif enzymatique.

Le mécanisme d'action d'un certain nombre d'enzymes est connu avec un bon degré de certitude. Deux modèles ont été proposés pour expliquer la liaison d'une enzyme à son substrat (**Figure 8**):

- ↪ **Modèle clé-serrure** : proposé par E. Fisher en **1894**.
- ↪ **Modèle de l'ajustement induit** : proposé par D. E. Koshland en **1958**.

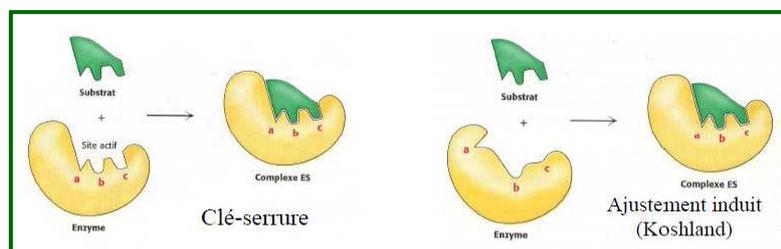


Figure 8: Modèles expliquant la liaison enzyme-substrat.

Cette complémentarité **enzyme-substrat** explique la haute spécificité enzymatique envers un seul type de réaction pour un substrat défini, ce qui confère aux enzymes une grande spécificité.

Il est mentionné que pour plusieurs enzymes la présence d'une molécule, qui n'est pas un acide aminé, appelée *cofacteur* ou *coenzyme* est absolument nécessaire à la catalyse. Ces substances chélatantes vont interagir avec l'enzyme afin qu'elle retrouve son état initial et puisse amorcer un nouveau cycle catalytique. De ce fait, ils ont un rôle d'accepteur et/ou de donneur d'électrons et de protons. Les cofacteurs sont souvent des ions métalliques (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , etc....) et les *co-enzymes* sont des petites molécules organiques.²⁶

Par ailleurs, une enzyme possède sur sa surface externe une couche d'eau de solvation ainsi que quelques molécules d'eau, située en son cœur, appelée l'eau constitutive, et est impliquée dans un réseau de liaison hydrogène qui lui confère la flexibilité structurale indispensable à son fonctionnement et lui permet de jouer un rôle lubrifiant.²⁷

I-2-4- Classification des enzymes: ²⁸

Près de 3 000 enzymes sont reconnues et leur classement a été établi par l'union internationale de biochimie et la biologie moléculaire (**UIBMB**) en collaboration avec l'**IUPAC**. Il est effectué en fonction de la spécificité de l'enzyme pour un seul type de réaction et un substrat déterminé. On distingue les six catégories suivantes (**Figure 9**):

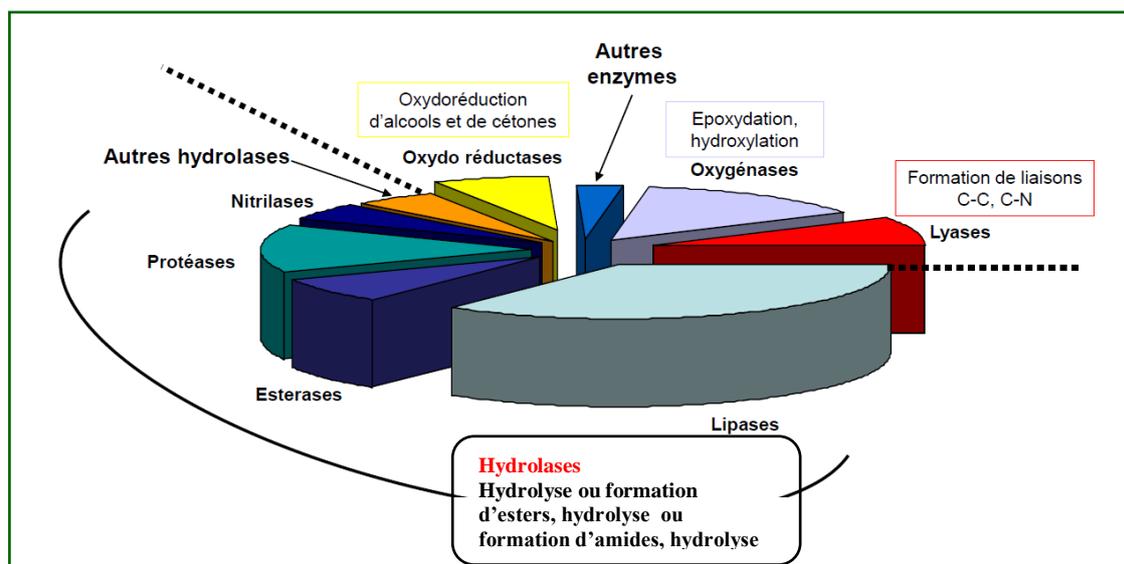


Figure 9 : Classification des enzymes²⁹.

²⁶B. Augère, "Les enzymes biocatalyseurs protéiques". Ell. Edi. Mark, **2001**.

²⁷H. Debbeche, *Réactivité de quelques anhydrides cycliques dans la réaction d'acylation enzymatique d'alcools chiraux* (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba).**2011**, pp 27.

²⁸(a) J. E. Puskas, K. S. Seo, M. Y. Sen, *European Polymer Journal*, **2011**,47,524-534 ; (b) S. Sen, & J. E. Puskas,*Molecules*, 2015,20(5), 9358-9379.

²⁹Réf23: http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/cnrs_10_juillet_paris_laurence_hecquet.pdf

Les classes les plus utilisées en bioconversions industrielles sont les oxydoréductases et les hydrolases. Environ 75% de ces enzymes sont des hydrolases (lipases, estérases, protéases), et 25% sont des oxydoréductases.³⁰ De ce fait, Le marché mondial des enzymes industrielles, a dépassé, en 2010, le seuil de 5.8 milliards de dollars, et la classe des hydrolases lui a dominée.³¹

I-2-5- Avantages et inconvénients des enzymes :

L'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseurs doués d'une haute spécificité a constitué une véritable révolution pour la préparation de nouvelles molécules organiques à intérêt potentiel. Depuis les premiers travaux pivots de Klibanov³² qui expliquent l'effet des modifications physico-chimiques de l'environnement des enzymes par l'utilisation de milieux organiques, ainsi que la réactivité enzymatique dans ces milieux en présence d'un minimum d'eau qui est le milieu naturel des enzymes, l'utilisation de ces outils biocatalytiques a connu une évolution accrue et a attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la recherche fondamentale et en particulier le monde de la chimie organique.³³

La facilité de mise en œuvre de ces catalyseurs, ainsi que l'exploitation de méthodes d'immobilisation des enzymes libres (sous forme sauvage)³⁴, facilite leur récupération par simple filtration et autorise une éventuelle réutilisation, ce qui permet de classer ce type de catalyse comme hétérogène. La biocatalyse est considérée comme complémentaire à la catalyse homogène par le bien de plusieurs aspects tels que : la reconnaissance d'un seul énantiomère, la grande stéréosélectivité des enzymes,³⁵ et un **TON (Number of turn over)** élevé.

L'exploitation des enzymes comme catalyseurs augmente la vitesse d'une réaction chimique jusqu'à 10²⁰ fois, et ce par la diminution de la barrière énergétique. Leur utilisation reste limitée à cause de leur fragilité, leur sensibilité, à savoir leur dénaturation à des températures élevées, leur grande spécificité, la nécessité d'utiliser des cofacteurs et coenzymes qui

³⁰(a) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology*, **13**(6), **2002**, 548-556 ;(b)K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry (5th ed.)*, Springer-Verlag, New York ,**2004**;(c)M. Schober, K. Faber, *Trends in biotechnology*, **2013**, **31**, 468-478.

³¹R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulou, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, **42**, 6437-6474.

³² (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, **107**, 7072-7076; (b) A. M. Klibanov, *Chemtech.* , **1986**, **16**, 354-359 ; (c)A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, **108**, 2767-2768.

³³(a) C. C. de Carvalho, *Biotechnology advances*, **2011**,**29**(1), 75-83; (b)G.de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, &M. W. Fraaije, Recent developments in the application of Baeyer-Villiger monooxygenases as biocatalysts. *ChemBioChem*, **2010**,**11**(16), 2208-2231.

³⁴ P. Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.*,**2013**, **42**, 6406-6436.

³⁵A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, **82**, 3192-3196.

s'avèrent onéreux, solubilité limitée dans les solvants organiques et le risque d'oxydation de certains résidus (Méthionine, Cystéine, Trypsine). Les réactions catalysées par les enzymes se déroulent dans des conditions douces : température inférieure à 100°C, pression atmosphérique et pH neutre par rapport aux réactions chimiques correspondantes.

Finalement, l'atout principal de la biocatalyse est qu'elle obéit parfaitement aux douze principes de la chimie verte ³⁶:

1- Prévention : la haute sélectivité des enzymes permet de réduire les longs enchainements réactionnels de la synthèse organique classique, et conduit non seulement à l'amélioration des rendements des produits mais également de produire moins de déchets plutôt que d'investir dans l'assainissement ou dans leur élimination.

2- Economie d'atomes : la haute sélectivité des enzymes mène à concevoir les synthèses de manière à maximiser l'incorporation des réactifs de départ utilisés au cours du procédé dans le produit final.

3- Synthèses moins nocives : la biocatalyse permet de concevoir autant que possible des procédés de synthèse utilisant et créant des substances plus faiblement dangereuses pour les humains et sans conséquences sur l'environnement.

4- Conception de produits chimiques plus sûrs : les biocatalyseurs sont utilisés typiquement pour la synthèse et ils ne sont pas eux même des produits.

5- Réduction des Solvants et auxiliaires : les biocatalyseurs fonctionnent naturellement dans l'eau, à pH neutre, et à température ambiante. Ils sont fonctionnels également dans les solvants organiques ainsi qu'ils sont compatibles avec les liquides ioniques.

6- Minimiser les dépenses énergétiques : les biocatalyseurs accélèrent nettement les réactions, d'où la non nécessité du chauffage. Egalement, quelques biocatalyseurs sont compatibles avec les méthodes d'activation non conventionnelles, telle que l'utilisation des micro-ondes et des ultrasons qui permettent la réduction des dépenses énergétiques impactant l'économie et l'environnement.

7- Utilisation de matières premières renouvelables : généralement les biocatalyseurs sont issus des cultures cellulaires ou des micro-organismes entiers, et les matières premières pour ces cultures sont les sucres et les acides aminés qui sont renouvelables.

³⁶J.Tao, & R. J. Kazlauskas, (Eds.), 2011, *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

8- Réduction de la quantité de produits dérivés : la haute sélectivité des biocatalyseurs permet d'éliminer toute dérivation de synthèse organique appelant toujours à plusieurs étapes de protection/déprotection.

9- Catalyse : du fait de l'efficacité supérieure des biocatalyseurs, où chaque molécule d'enzyme possède le pouvoir de convertir des milles à des millions de substrats en produits, en un temps modéré (TON très élevé).

10- Conception de substances non-persistantes : les biocatalyseurs sont parfaitement biodégradables.

11- Analyse en temps réel de la lutte contre la pollution : pas de spécial avantage pour les biocatalyseurs. Les réactions biocatalysées sont contrôlées en temps réel par la mesure du pH, etc....

12- Chimie essentiellement sécuritaire afin de prévenir les accidents: Les réactions biocatalysées se déroulent généralement sous des conditions douces, pH, températures ambiantes et pression atmosphériques, d'où l'absence de tout risque d'accidents.

I-3- Mécanisme et cinétique de lacatalyse enzymatique:

L'enzyme, lors de son interaction avec le substrat, modifie la réactivité moléculaire en formant un complexe enzyme-substrat, elle forme un état intermédiaire. Elle facilite la réaction du substrat par une nette accélération et ce sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci, en abaissant, ainsi, la barrière de l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir (*Figure 10*).

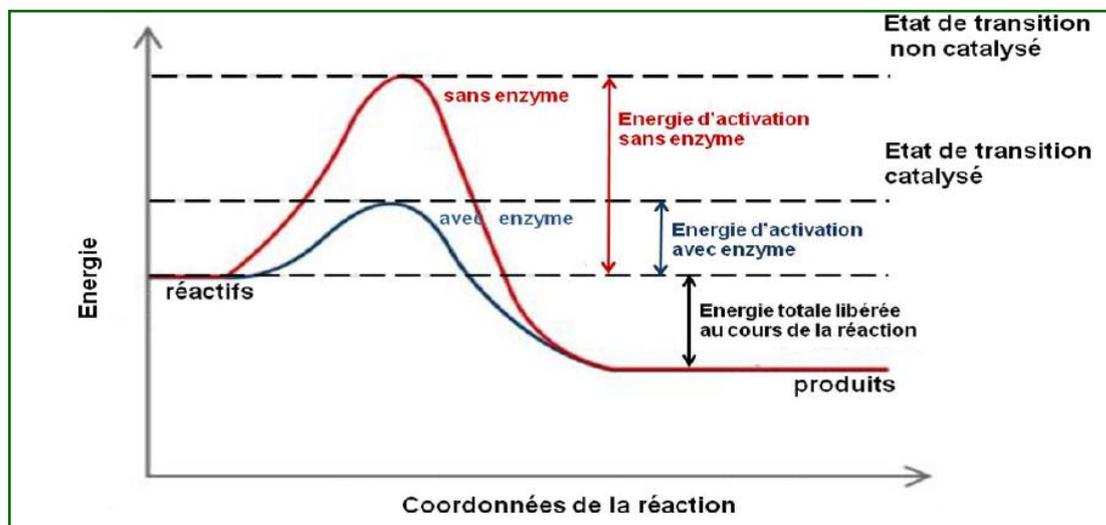


Figure 10 : Diagramme énergétique d'une réaction catalysée par une enzyme.

La plupart des réactions catalysées par les enzymes répondent à un mécanisme réactionnel de type *Michaelis* et *Menten* (1913). Ce modèle est basé sur la formation du complexe Enzyme-Substrat qui se forme rapidement, ensuite il est lentement converti en produit (*Schéma 2*).

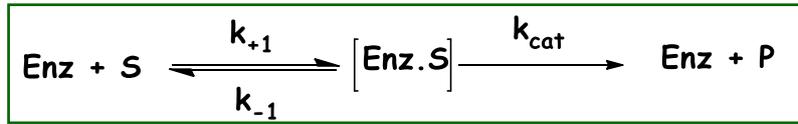


Schéma 2 : Réaction enzymatique.

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

k_{+1} et k_{-1} : Constantes de vitesses de la réaction de formation du complexe enzyme-substrat qui est un équilibre rapide.

k_{cat} : Constante de vitesse de l'étape la plus lente ; c'est la constante de vitesse de l'enzyme. Cette constante est appelée aussi *TON (turnover)* par le fait qu'elle représente le nombre de molécules converties en produit par le site actif enzymatique par unités de temps.

La vitesse initiale d'une réaction biocatalysée (V_0) croît avec la concentration initiale en substrat $[S]_0$ jusqu'à un maximum V_{max} (*Figure 11*).

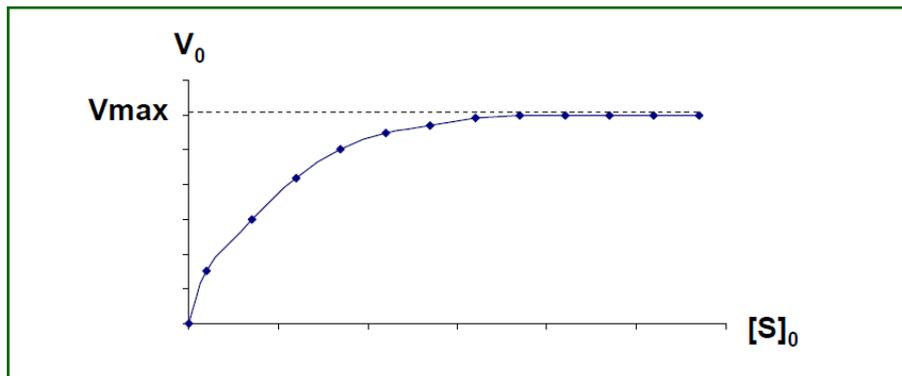


Figure 11 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration.

$$v = k_{\text{cat}} [\text{Enz.S}] = \frac{k_{\text{cat}} [\text{Enz}] [\text{S}]}{k_m}$$

Equation.1.

Or:

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_{+1}}$$

Equation.2.

k_m est la constante de *Michaelis* qui détermine l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Le rapport (k_{cat}/ k_m) appelé constante de spécificité : caractérise l'affinité spécifique d'une

enzyme pour son substrat, et est un paramètre significatif informant sur l'efficacité d'une enzyme.

Les paramètres cinétiques v_{max} et K_m sont importants pour la caractérisation et l'évaluation de l'activité d'une enzyme, puisque cette dernière est nettement dépendante de paramètres décisifs pour la catalyse enzymatique à l'instar de la température, le pH, la présence d'un cofacteur, d'un activateur ou d'un inhibiteur qui peuvent affecter son bon fonctionnement en la dénaturant.

I-4- Applications industrielles des enzymes:

L'utilisation des biocatalyseurs industriellement (les bioconversions industrielles), a été connue depuis l'antiquité. Les premières civilisations ont utilisés des enzymes issues des microorganismes pour la production de quelques fermentations (alcools, bières, fromages et pain)³⁷. Avec l'évolution de l'ingénierie biomoléculaire au cours de ces deux dernières décennies a permis de développer des méthodes de synthèses efficaces en utilisant des biocatalyseurs.

Selon un rapport diffusé par la *Business Communications Company, Inc*, le marché industriel des lipases industrielles est estimé à 4,5 milliard de dollars en **2012** et presque 4,8 milliard dollars en **2013**, et ce marché aurait atteint 7,1 milliard dollars en **2018**, soit un pourcentage d'augmentation annuel de 8,2% entre 2013 et 2018.³⁸

Il existe plus de 134 procédés de bioconversions industrielles, leur majorité utilise des enzymes hydrolytiques (Hydrolases : 44%). Ils sont répartis dans l'industrie agroalimentaire, l'industrie d'amidon et de sucre, l'industrie de la bière, l'industrie laitière, les détergents, le papier, le textile, teintures, et d'une grande part dans l'industrie pharmaceutique³⁹.

³⁷ R. A. Copland, *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Chapter I: A Brief history of enzymology*, 2000, Wiley-VCH.

³⁸ Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **Juin 2014** By [BCC Research](#).

³⁹(a) Réf30(a): A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology*, **2002**, 13(6), 548-556; (b) B. J. Demuner, N.P. Junior, A.M.S. Antunes, *J. Technol. Manag Innov.* **2011**, 6, 148-157; (c) J-M. Choi, S-S Han, H-S Kim, *Biotechnology Advances*, **2015**, 33, 1443-1454; (d) B.M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**, 15, 187-193; (e) N. J. Turner, & M. D. Truppo, *Biocatalytic routes to nonracemic chiral amines. Chiral Amine Synthesis*, **2010**, 431-459.

Parmi les principales applications industrielles biotechnologiques les plus connus⁴⁰, nous citons :

- ↳ **Production du fructose** : plusieurs sociétés sucrières adoptent un procédé biocatalytique industriel pour la préparation du fructose, avec une moyenne de 1 million de tonnes/an, qui est basé sur l'isomérisation du glucose par le biais de la **Glucose isomérase (Schéma 3)**.

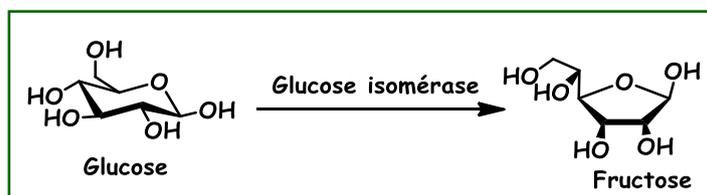


Schéma 3 : Production industrielle biocatalytique du fructose.

- ↳ **La modification des matières grasses** : qui consiste en l'interestérification et l'hydrogénation des acides gras par le biais des lipases de ***Mucor miehei* (IM 20)** et de la ***Candida antarctica* (SP 382)**, pour la production des glycérides, matière première pour la production de beurres, le beurre de cacao (chocolat), la margarine et du savon. La société **Miyoshi Oil & fat Co.**, Japon, a rapporté que l'utilisation de la lipase commerciale de ***Candida Cylindracea* (CCL)**, est très efficace et moins cher, pour la production des polyacides gras insaturés.

- ↳ La **Nitrile hydratase (Lyase)** est utilisée par la société **Lonza** pour la production de la **Nicotinamide** (vitamine B3, Niacinamide) par une fréquence annuelle de 3000 tonnes (**Schéma 4**).

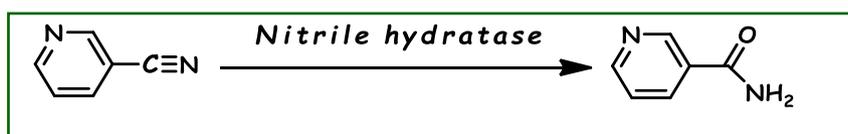


Schéma 4 : Production de la Nicotinamide par Lonza.

⁴⁰(a) H. U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Appl Cata A: General*, **2001**,221, 119-143; (b) Réf13(b):C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Research & Development*, **2000**, 4, 286-290; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied Biochemistry & Biotechnology*,**2004**,118,155-170. (d) C. Bensoussan, *l'actualité chimique*, **Aout-Septembre**, **2002**,48-51.

↪ La même enzyme est utilisée par la compagnie *Nitto* (Japon, maintenant *Mitsubishi Rayon Co.*) pour la production de l'acrylamide par une fréquence de 30 000 tonnes/an (*schéma 5*), sachant que la production mondiale de cet amide est de 250 000 tonnes/an. Il est à noter que cette production représente à ce jour le grand exemple de mise en œuvre d'une enzyme industriellement.

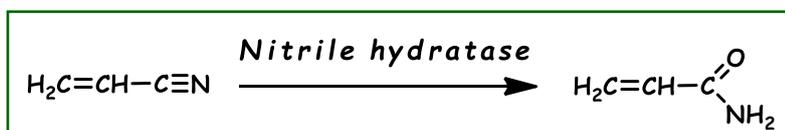


Schéma 5 : Production d'acrylamide par Nitto.

↪ La compagnie *DSM* produit annuellement des Kilotonnes d'aspartame par un couplage peptidique sélectif catalysé par la *Thermolysine (Peptidase)*(*Schéma6*). La D-phénylalanine méthyl-ester restant est racémisé puis recyclé.

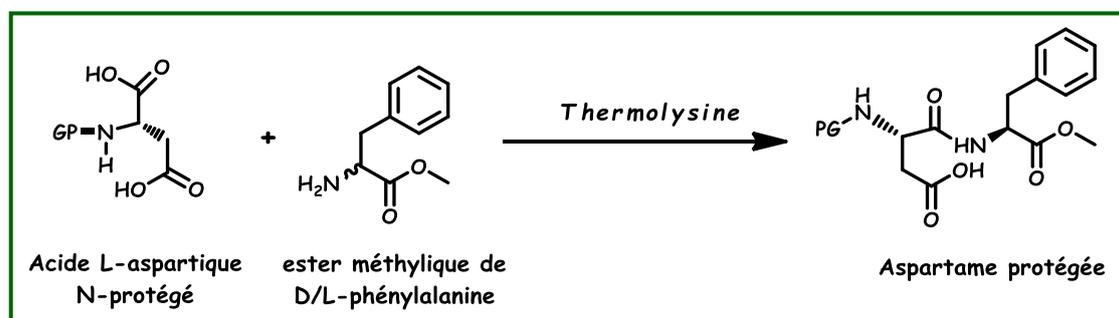


Schéma 6 : Synthèse industrielle biocatalysée de l'aspartame.

↪ La même compagnie utilise La *pénicilline acylase (pénicilline amidohydrolase)* pour l'élaboration d'antibiotiques tels que l'*Amoxicilline* et le *Céfactor*, avec un taux de 2000 tonnes/an. L'enzyme hydrolyse d'abord le groupement acyle présent, puis réintroduit d'autres groupements acyles produisant ainsi plusieurs dérivés(*Schéma7*). Ce procédé rapporte à l'industrie pharmaceutique plus d'un milliard de dollars par an.⁴¹

⁴¹K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. H. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 3948.

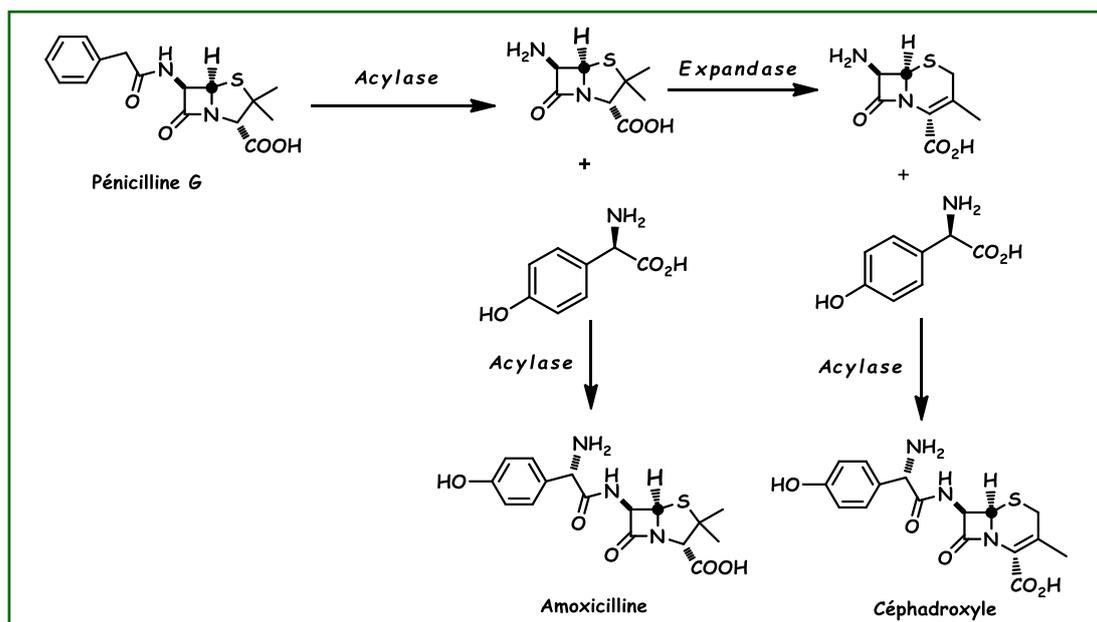


Schéma 7 : Procédés industriels biocatalysés de l'Amoxicilline et du Céfador.

Des bioprocédés de production d'herbicides optiquement purs à partir de l'acide(S)-chloropropionique obtenus par hydrolyse énantiosélective de l'acide 2-chloropropionique racémique par une *déshalogénase*, sont adoptés par la compagnie **Zeneca**(schéma 8). L'acide(S)-chloropropionique énantiomériquement pur est produit avec une fréquence de 2000 tonnes/an.

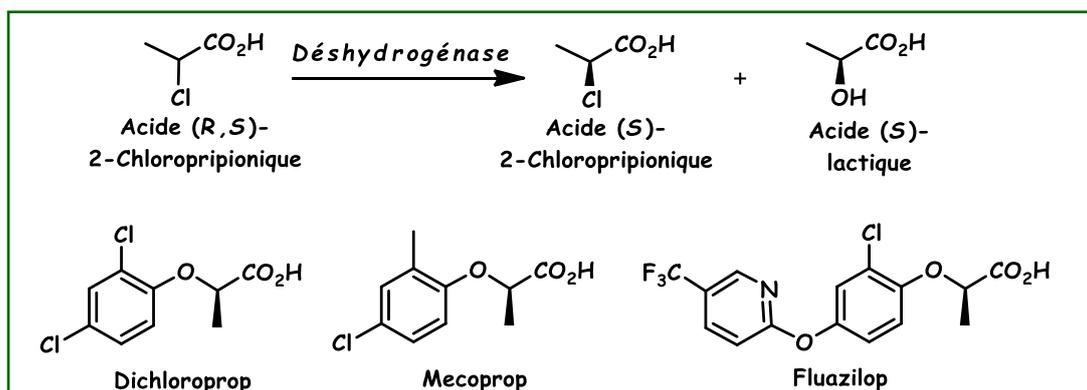


Schéma 8 : Production biocatalysée d'herbicides énantiomériquement purs.

La compagnie **BASF** (Allemagne) procure depuis longtemps plusieurs procédés biotechnologiques. Cette compagnie fabrique des briques moléculaires énantiomériquement enrichies avec un taux de production de plusieurs tonnes/an. Un des procédés adopté par cette compagnie est la production d'un intermédiaire

d'herbicides par une hydroxylation régiosélective de l'acide (*R*)-2-phénoxypropionique par le biais d'une *Oxydase* (Schéma 9).

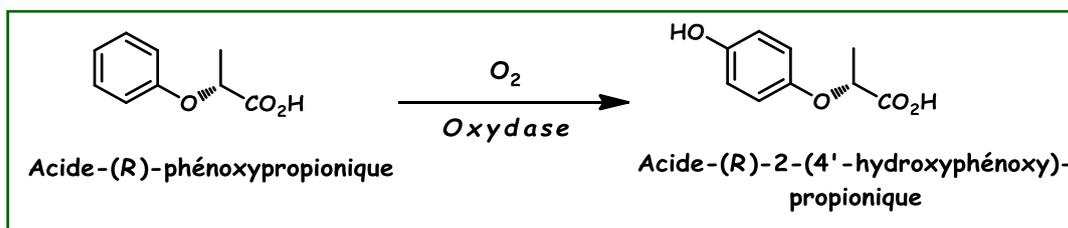


Schéma 9 : Synthèse de l'acide-(*R*)-2-(4'-hydroxyphénoxy)propionique.

↪ La compagnie *Glaxo Welcome* (actuellement *GSK*) a développé un agent anti-leucémique par une acylation à la fois *chimio*- et régiosélective de la purine par le biais de la lipase immobilisée de *Candida antarctica* (Novozyme SP435).⁴² (Schéma 10).

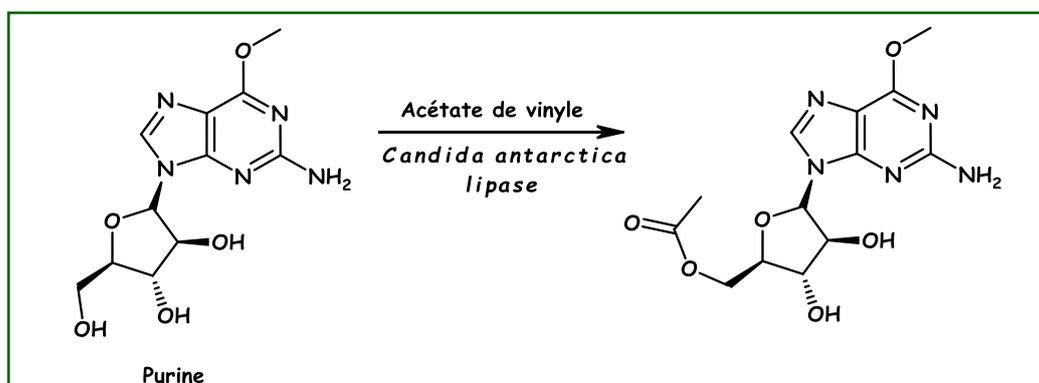


Schéma 10 : Acylation lipasique chimio- et régiosélective de la purine.

I-5- Les lipases :⁴³

I-5-1- Définition et origines :

Les lipases, sous classe des hydrolases, forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants. Le fait que les lipases montrent une activité particulièrement élevée sur des lipides riches en triglycérides (huile d'olive, beurre, graisses animales et végétales, etc.) a

⁴²J. P. Rasor, E. Voss, *Applied Catalysis A : General*, **2001**, 221,145-158.

⁴³(a)W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J. P. Wathelet, & P. Thonart, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2008**, 12(1),57-68 ; (b)Réf13(c): A. Houde, A. Kademi, & D. Leblanc, *Applied biochemistry and biotechnology*, **2004**, 118(1-3), 155-170 ;(c)A. R. Macrae, & R. C. Hammond, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **1985**, 3(1), 193-218.

conduit au choix du terme triacylglycérol acyl-hydrolase (**E.C.3.1.1.3**) comme dénomination officielle.

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. Elles sont d'origine diverses (végétale, mammifère : pancréatique et hépatique, bactériennes et fongique....) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes. Un autre avantage fort intéressant des lipases est qu'elles sont faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme (cofacteur) qui s'avère onéreux.

Leur utilisation en synthèse organique est de plus en plus indispensable, due à une caractéristique remarquable, celle de la haute sélectivité (*chimio-,régio- et stéréo* sélectivité) (**Schéma 11**), qui permet la limitation de la formation de produits secondaires et réduisant, même éliminant les opérations de traitement et de purifications, et ainsi de manipuler tout en respectant quelques principes de la chimie verte. Elles sont de plus en plus sollicitées pour la synthèse de molécules chirales énantiomériquement pures ou enrichies⁴⁴ telles que : les acides carboxyliques⁴⁵, les aminoacides⁴⁶, les alcools¹⁰ et les amines.⁴⁷

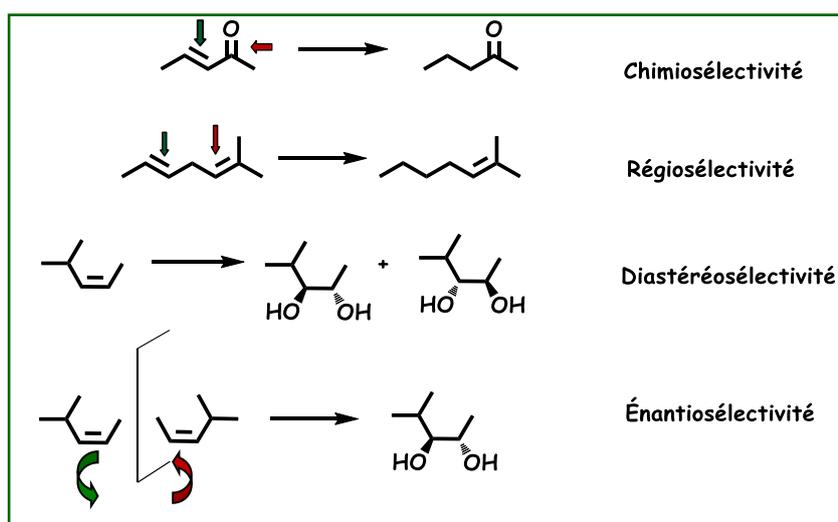


Schéma 11 : Spécificité lipasique.

⁴⁴(a)Réf35:A. Zaks, A. M. Klibanov, Proc. Nalt. Acad. Sci., **1985**, 82, 3192-3196. (b)R. Azerad, *l'actualité chimique*,septembre-aout **2002**, 31-36.

⁴⁵A. Hsu, K. Jones, T. A. Foglia, W. N. Marmer, *Biotechnol. Appl. Biochem.* , **2002**, 36, 181-186.

⁴⁶M.Bakke, M. Takizawa, T. Sugai, H. Ohta, *J. Org. Chem.* , **1998**, 63, 6929-6938.

⁴⁷B. Morgan, A. Zaks, D. R. Dodds, J. Liu, R. Lain, S. Megati, F. G. Njoroge, V. M. Girijavallabhan, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65(18), 5451-5459.

I-5-2- Réactions catalysées par les lipases :

Les lipases sont des catalyseurs polyvalents. La fonction première des lipases, lorsqu'elles sont dans un milieu, aqueux ou biphasique, est l'hydrolyse de liaison ester. Cette activité hydrolytique trouve plusieurs applications dans des domaines à fort tonnage, tels que l'industrie laitière, celle des détergents, d'agroalimentaires, la cosmétologie et le traitement des effluent. D'autre part, et depuis les premiers travaux pivots de Klivanov⁴⁸ qui expliquent l'effet des modifications physico-chimiques de l'environnement des enzymes par l'utilisation de milieux organiques, ainsi que la réactivité enzymatique dans ces milieux en présence d'un minimum d'eau qui est le milieu naturel des enzymes, l'utilisation de ces outils biocatalytiques a connu une évolution accrue et a attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la recherche fondamentale et en particulier le monde de la chimie organique. Et encore plus, les lipases peuvent aussi être fonctionnelles et avec une haute performance, dans des milieux non-conventionnels, autre que les solvants organiques, en l'occurrence les liquides ioniques.⁴⁹ Parmi ces réactions nous citons : l'estérification, la transestérification, l'acidolyse, et l'amidification.⁵⁰ Dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**), nous signalons les lipases (immobilisées et libres) les plus utilisées en synthèse organique et qui sont compatibles avec les milieux organiques pauvres en eau.⁵¹

Tableau.2 : Les lipases les plus répandues en synthèse organique.

Abréviation	Nom usuel (Anglais)	Origine	Autre nomination (Anglais)
<i>PPL</i>	<i>Porcine pancreas</i>	Mammifères	-
<i>CRL</i>	<i>Candida rugosa</i>	Fongiques	<i>CCL (Candida cylindracea)</i>
<i>CAL-B</i>	<i>Candida antarctica</i>		<i>Novozym 435</i>
<i>CAL-A</i>			-
<i>RML</i>			<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>TLL</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>		<i>Lipozyme TM IM</i>
<i>BCL</i>	<i>Burkholdria cepacia</i>	Bactériennes	<i>PCL (Pseudomonas cepacia)</i>

⁴⁸Réf32:(a)G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 7072-7076; (b)A. M. Klivanov, *Chemtech.*, **1986**, *16*, 354-359 ; (c)A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2767-2768.

⁴⁹(a)R. A. Sheldon, R. M. Lau, M. J. Sorgedragger, F. van Rantwijk, & K. R. Seddon, *Green Chemistry*, **2002**, *4*(2), 147-151; (b)P. Domínguez de María, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, *47*(37), 6960-6968.

⁵⁰Réf7(c):K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.

⁵¹P. Adlercreutz, *Chemical Society Reviews*, **2013**, *42*(15), 6406-6436.

PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		AK
-----	--------------------------------	--	----

I-5-3- Mode d'action des lipases :

Les différentes lipases se distinguent l'une de l'autre par le nombre d'acides aminés formant la séquence primaire. Par exemple la Lipase de *Candida Cylindracea* (CCL) est une protéine composée de 534 acides aminés dont une importante proportion de sérine. Par contre la Lipase de *Candida Antarctica B* (SP435, appelée encore, *Novozym*, ou *CAL-B*) contient moins de 200 acides aminés.

Le point commun de ces lipases réside dans la triade catalytique qui constitue leurs sites actifs : **la sérine, l'aspartate (ou glutamate) et l'histidine**. Le fonctionnement de ces trois opérateurs chimiques est élucidé dans le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'un ester par la *sérine hydrolase* (Schéma 12). L'arrangement de ces trois groupes cause une diminution de la valeur de pK du groupement hydroxyle de la sérine ce qui rend l'effet nucléophile plus prononcé, et qui mène à une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du substrat R^1COOR^2 lors d'une première étape. Ainsi, le groupement acyle est lié d'une manière covalente à l'enzyme en formant le complexe acyl-enzyme avec libération d'alcool R^2OH . Dans une deuxième étape, le nucléophile, par exemple l'eau, attaque le complexe acyl-enzyme en régénérant l'enzyme et libérant l'acide carboxylique R^1COOH .

Selon la nature de l'agent nucléophile (eau ou alcool) on est en face d'une hydrolyse en milieu aqueux ou bien d'une estérification ou transestérification en milieu organique.⁵²

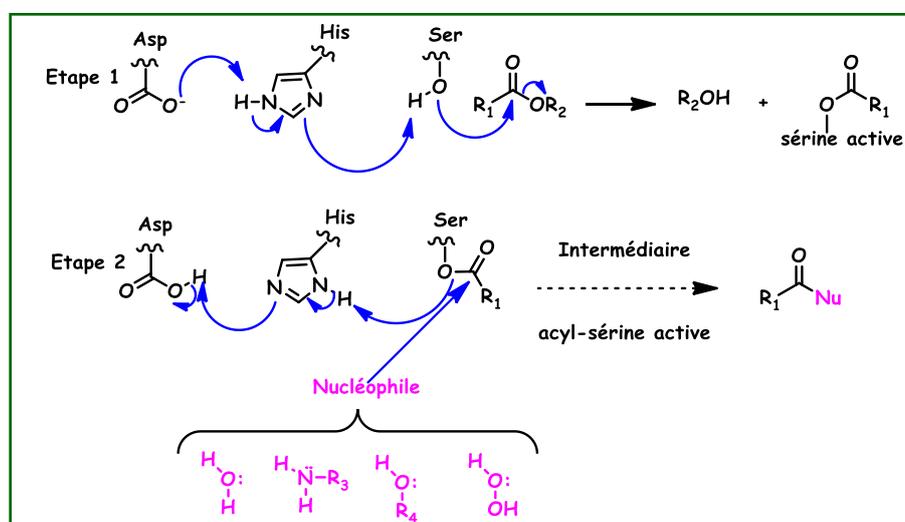


Schéma 12 : Mécanisme de Réactions catalysées par des lipases.

⁵²(a)C.S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, 695; (b)Réf7(c):K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.

I-5-4- Avantages de l'emploi des lipases dans un milieu organique :

La compatibilité des lipases avec les milieux organiques pauvres en eau, a offert de nouvelles opportunités pour faire une chimie propres, et a élargi le champ de leurs applications en synthèse organique, et ce par le bien de plusieurs avantages, tels que⁵³ :

- ✂ Augmentation de la solubilité des substrats apolaires.
- ✂ Traitement aisé, et ce dû à la séparation du catalyseur des produits par une simple filtration et une éventuelle récupération de la lipase si elle est immobilisée.
- ✂ Amélioration des rendements en produits par élimination immédiate du solvant organique par évaporation. la stabilité thermique de certaines enzymes est accrue.
- ✂ La possibilité de moduler la *chimio-*, la *régio-* et l'*énantio-*sélectivité des lipases par un choix judicieux du solvant.

Il est à noter que la polarité des solvants organique est désignée par une corrélation entre l'hydrophobicité d'un solvant organique et le facteur **LogP**, le logarithme du coefficient de partition entre le *n*-octanol et l'eau, peut influencer significativement la réactivité et la sélectivité lipasiques. Précisément en catalyse enzymatique, le paramètre **LogP** quantifie l'hydrophobicité du solvant. Les solvants non-polaires avec **LogP>1** sont les plus sollicités, par contre les solvants hydrophiles avec **LogP<0** sont défavorables, pour risque de dénaturation de l'enzyme. Cette règle reste empirique.

I-5-5- Les règles empiriques de Kazlauskas sur l'énantiopréférence lipasique :

La reconnaissance moléculaire entre une lipase et les énantiomères est le paramètre responsable de l'énantiosélectivité. Avant d'entamer une étude biocatalytique, les chercheurs passent d'abord par un *screening* pour trier les meilleures enzymes. Afin de rationaliser ce problème, des modèles simples des sites actifs enzymatiques ont été élaborés pour mieux comprendre l'énantiosélectivité des hydrolases.⁵⁴ Ces modèles font appels aux règles

⁵³(a) A. M. Klivanov, *Nature*, **2001**, 409(6817), 241-246 ; (b) R. A. Sheldon, **1996**, Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic reactions in organic media* , 266-307, Springer Netherlands;(c)N.Doukyu,& H.Ogino, Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, **2010**,48(3), 270-282.

⁵⁴(a) A. Ghanem, *Tetrahedron* , **2007**, 63,1721-1754; (b) R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Current Opinion in Chemical Biology*,**1998**, 2, 121-126; (c)G. Carrea; S. Riva; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; (d) L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* ,**1997**, 8, 3719-3733.

primaires déposées par Prélog,⁵⁵ et qui permettent de prédire la chiralité des alcools ou des acides carboxyliques lors d'une catalyse enzymatique. Ces règles ont été appliquées afin de prévoir l'énantiosélectivité de cétones par des levures : la *Cuvularia falcata* et la *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger), et ceci sur la base des tailles de substituants situés autour du stéréocentre.

Kazlauskas *et coll*⁵⁶. les ont élargies à l'hydrolyse d'esters d'alcools chiraux. Ils ont réalisé une étude sur trois hydrolases : la lipase de *Candida Rugosa*, la lipase de *Pseudomonas cepacia* et l'estérase de *Cholestérol* sur divers substrats, où ils ont obtenus la même énantiosélectivité pour les deux lipases vis-à-vis le même substrat et ce en fonction des effets stériques et la taille des substituants. Une énantiosélection (**R**) est obtenue avec les alcools secondaires où cet énantiomère réagit plus vite que l'autre. Pour l'estérase, ils ont obtenu l'inverse.

Due à cette propriété élégante des lipases, permettant aussi bien la différenciation et ainsi le pouvoir de réagir avec un seul énantiomère, couplée avec la *chimio*- et la *régio*sélectivité, les lipases sont utilisées en synthèse organique pour accéder aux molécules énantiomériquement enrichies.

Particulièrement, avec la mise en application du règlement de l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques (REACH), qui traite les deux énantiomères d'une substance chirale comme deux molécules différentes même du racémique, lui-même. Également, ces législations imposent un excès énantiomérique d'au moins de 98% pour les médicaments et de 80% pour les produits agroalimentaires.

Vu tous ces avantages dédiés à l'utilisation de lipases comme des acteurs de qualité pour une chimie éco-compatible, on expose dans ce chapitre les différentes méthodes permettant l'accès aux molécules énantiomériquement enrichies menées par des lipases.

⁵⁵ V. Prélog, *Pure Applied Chem.*, **1964**, 2, 119.

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

I-6- Modes d'accès aux molécules énantiomériquement enrichies par les lipases :⁵⁷

I-6-1 : Par dédoublement cinétique lipasique:⁵⁸

Méthode permettant la séparation des énantiomères d'un mélange racémique, basée sur la différence de vitesse de réaction des deux énantiomères vis-à-vis d'une entité chirale énantiomériquement pure, la lipase, capable d'intervenir préférentiellement au niveau de l'état de transition de la réaction. Cette différence cinétique est la conséquence directe des contraintes structurales imposées par le site actif lipasique, qui se traduit par l'abaissement de la barrière énergétique du bon énantiomère, en le transformant rapidement en produit (**Figure 12**).

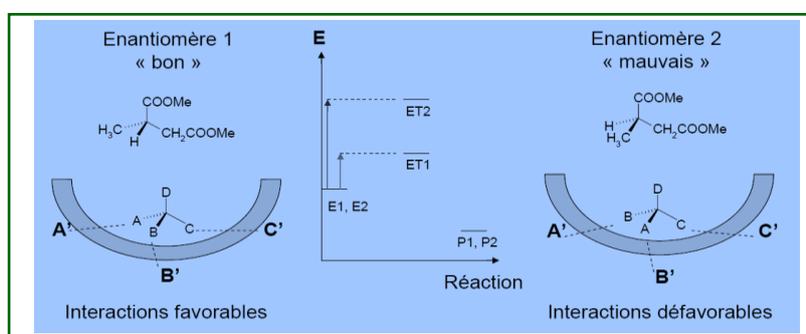


Figure 12 : Illustration du dédoublement cinétique lipasique.

Dans le cas idéal d'un dédoublement de racémique, le rendement théorique de la réaction ne dépasse pas les 50%, pourtant c'est la méthode la plus exploitée en chimie fine.⁵⁹

⁵⁷(a) G. Carrea, & S. Riva, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, John Wiley & Sons, (Eds.) **2008**; (b) V. Gotor, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **1999**, 7(10), 2189-2197; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2011**, 111(7), 3998-4035; (d) E. Forró, & F. Fulop, *Current medicinal chemistry*, **2012**, 19(36), 6178-6187; (e) G. Grogan, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B*, **2011**, 107, 199-225; (f) C. M. Clouthier, & J. N. Pelletier, *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(4), 1585-1605; (g) Réf 28(b); S. Sen, & J. E. Puskas, *Molecules*, 2015, 20(5), 9358-9379; (h) J. H. Schrittwieser, & V. Resch, The role of biocatalysis in the asymmetric synthesis of alkaloids. *RSC advances*, **2013**, 3(39), 17602-17632.

⁵⁸(a) J. C. Fiaud, R. Gil, J. Y. Legros, L. Aribi-Zouiouche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, 33, 6967-6970; (b) H. B. Kagan, M. Tahar, J. C. Fiaud, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1994**, 2, 15-21; (c) J. Y. Legros, M. Toffano, S. K. Drayton, M. Rivard, J. C. Fiaud, *Tetrahedron. Lett.*, **1997**, Vol 38, 1915-1918; (d) L. Aribi-Zouiouche & J. C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088; (e) J. A. Pesti, J. Yin, L. Zhang, L. Anzalone, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 11075-11076.

⁵⁹(a) "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Wong & Whitesides. *Tetrahedron. Org. Chem. Series.*, 12; (b) K. Faber, "Biotransformations in Organic Chemistry", 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**.

Ce mode d'accès permet une préparation aisée de briques moléculaires chirales indispensables à la synthèse des médicaments, des arômes, de l'agriculture et de l'agroalimentaire.⁶⁰

A titre d'illustration, nous citons, un exemple élégant de l'ouverture énantiosélective du β -phénylazétidinone fluoré (β -lactame), un intermédiaire clé pour la synthèse de molécules à visée thérapeutique.⁶¹ Cette réaction est effectuée par un dédoublement cinétique *via* alcoololyse lipasique, en utilisant le MeOH comme nucléophile en présence de la lipase de *Burkholderia cepacia* (**PS-D**). L'ainoester produit et le β -lactame résiduel ont été obtenus énantio-pures ($ee > 99\%$), à une conversion de 50% (**Schéma 13**).

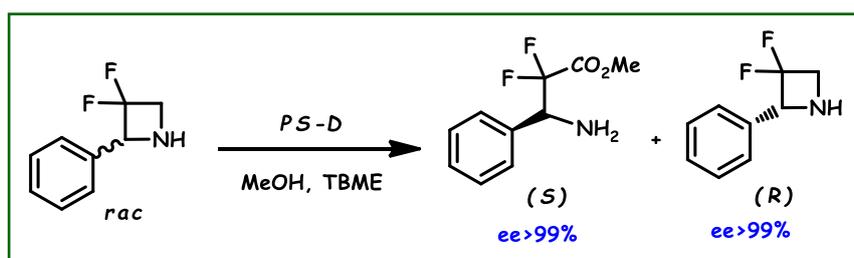


Schéma 13 : Ouverture d'un β -lactame par alcoololyse cinétique lipasique.

I-6-2 : Par un Processus de déracémisation :

Cette dernière décennie, des méthodes efficaces de déracémisation *via* des dédoublements cinétiques biocatalysés hautement énantioselectifs, sont développées et constituent de nouvelles voies d'accès aux molécules énantio-pures, à partir d'un mélange racémique, avec des rendements chimiques quantitatifs et de hautes énantiosélectivités⁶²(**Schéma 14**).

⁶⁰(a) R.N. Pavel, *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, **2003**, 6, 902-920; (b) K. Faber, S. Riva, *Journal of Synthetic Organic Chemistry*, **1992**, 895-910; (c) B. Zhu & J.S. Panek, *Org. Lett.*, **2000**, 2, (17), 2575-2578; (d) T. Maugard, J. Tudella, D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 358-362; (e) T. Maugard, M. D. Legoy, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 8, 275-280, (e) O. McConnell, A. Bachii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. McDonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. Young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658-682.

⁶¹X. G. Li, M. Lähtie, M. Pääviö, & L. T. Kanerva, Enantioselective acylation of alcohols with fluorinated β -phenyl- β -lactams in the presence of *Burkholderia cepacia* lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18(13), 1567-1573.

⁶²(a) H. Stercher, K. Faber, *Synthesis*, **Janvier 1997**, 1-16; (b) U. T. Strauss, U. F. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117; (c) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 5005-5010; (d) N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 401-406; (e) A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeza, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 569-592.

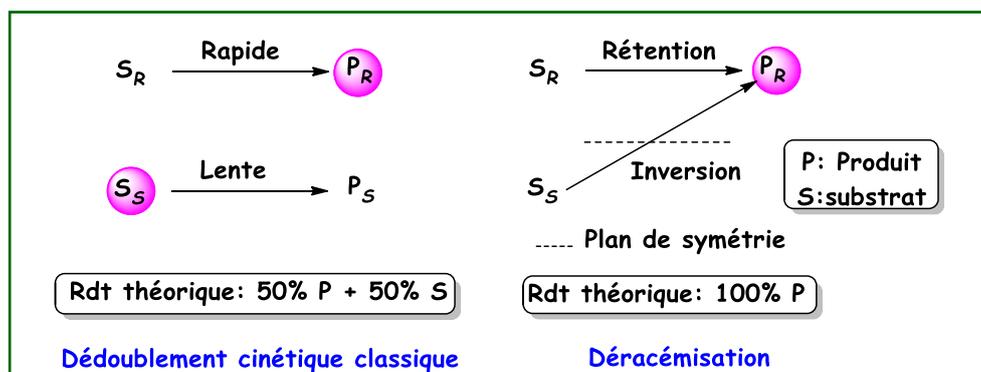


Schéma 14 : Principe d'une déracémisation.

Il y en a plusieurs méthodes de déracémisation, mais dans ce chapitre nous limiterons à décrire deux d'entre elles.

I-6-2-a : DCL couplée à une stéréoinversion chimique:⁶³

Cette technique de déracémisation des alcools secondaires et des amines se déroule « *in situ* » sans faire appel à une étape de racémisation. Elle consiste en deux étapes consécutives, la première est un dédoublément cinétique biocatalysé hautement énantiosélectif (hydrolyse ou transestérification) suivi d'une réaction chimique dans laquelle interviendra une inversion de la configuration de l'un des énantiomères. Parmi les réactions chimiques les plus utilisées lors de ce processus, nous citons la réaction de Mitsunobu,⁶⁴ qui est largement utilisée avec succès pour la déracémisation des acétates et des alcools secondaires⁶⁵.

Ce processus de déracémisation a été étudié au sein de notre laboratoire, par l'association du protocole de Mitsunobu à la réaction de dédoublément cinétique par transestérification et par hydrolyse lipasique d'une série d'alcools benzyliques secondaires chiraux et leurs acétates correspondants.⁶⁶

Nous citons l'exemple de la déracémisation de l'indanol, où l'acétate correspondant de configuration (*R*), est obtenu énantio pur *via* l'acylation lipasique⁶⁷ et son antipode optique est

⁶³(a) L. Ou, D. Ludwig, J. Pan, J. H. Xu, *Organic Process Research & Development*, **2008**, 12, 192-195; (b) R. Azerad, *Current Opinion in Biotechnology*, **2000**, 11, 565-571; (c) J. H. Lee, K. Han, M. J. Kim, & J. Park, *European Journal of Organic Chemistry*, **2010**, 6, 999-1015.

⁶⁴ O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1967**, 40, 2380.

⁶⁵(a) E. Vanttinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786; (b) H. L. Liu, T. Anthonsen, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27.

⁶⁶N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, & L. Aribi-Zouiouche, *Catalysts*, **2014**, 4(3), 215-225.

⁶⁷Réf15(b) : N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17(5), 797-800.

obtenu énantiomériquement enrichi *via* une hydrolyse alcaline.⁶⁸ Les énantiomères (*R*) et (*S*) sont récupérés avec de bons rendements chimiques (*Schéma 15*).

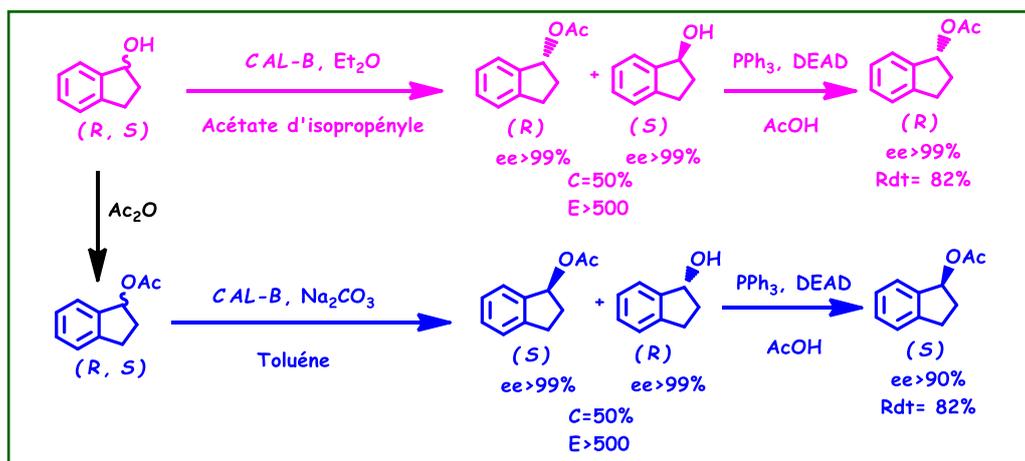


Schéma 15: La déracémisation de l'indanol par combinaison DCE/Mitsunobu.

I-6-2-b : Par dédoublement cinétique dynamique :

Le dédoublement cinétique dynamique⁶⁹ (DCD) permet d'obtenir un seul énantiomère à partir d'un mélange racémique en passant par une étape clé qui est la racémisation « *in situ* » de l'énantiomère qui réagit lentement, jusqu'à sa consommation complète, sans procéder à une séparation préliminaire des deux énantiomères (*schéma 16*). Ce processus possède deux avantages de poids sur le dédoublement cinétique classique : un rendement chimique théorique de 100%, et l'économie d'atome.

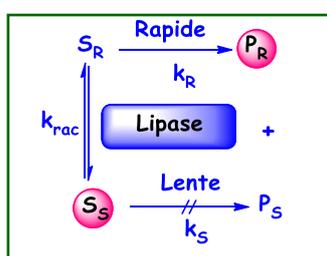


Schéma. 16: Principe d'un dédoublement cinétique dynamique.

⁶⁸Z.Houiene, M.Merabet-Khelassi, N.Bouzemi, O. Riant, & L. Aribi-Zouioueche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24*(5), 290-296.

⁶⁹(a) R. S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 1475-1490; (b) O. Pamies, J. E. Backvall, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 3247-3261; (c) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 8291-8327; (d) B. M. Matute, J. E. Backvall, *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**, *11*, 226-232; (e) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1563-1601. (f) Verho, Oscar, and Jan-E. Bäckvall. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, *137*(12), 3996-4009; (g) de Miranda, S.Amanda, Leandro SM Miranda, and Rodrigo OMA de Souza. *Biotechnology advances*, **2015**, *33*(5), 372-393.

L'étape clé de ce processus de déracémisation consiste en une racémisation de l'énantiomère qui réagit lentement. Cette dernière peut être spontanée ou catalysée par un catalyseur chimique ou un biocatalyseur.⁷⁰

A titre d'exemple, le DCD de l'indanol a été réalisé en combinant la réaction d'acylation lipasique énantiosélective à une racémisation in situ par un complexe de ruthénium/Ligand. Le (*R*)-indényl acétate a été récupéré avec 98% d'excès énantiomérique⁷¹. (Schéma 17)

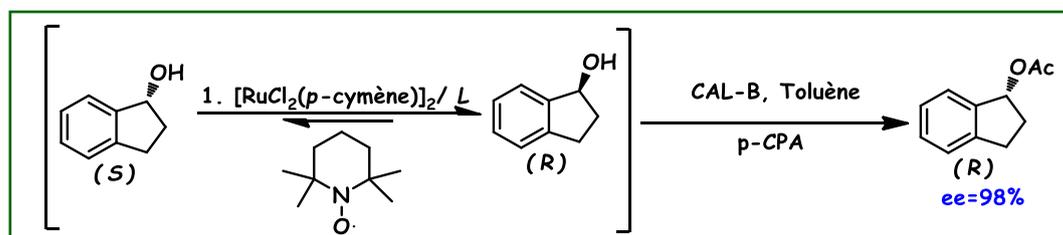


Schéma. 17: DCD du 1-indanol.

I-6-3- Par désymétrisation lipasique:⁷²

Appelé encore synthèse asymétrique lipasique, consiste à transformer des composés prochiraux ou méso par l'élimination de un ou de plusieurs éléments de symétrie présents dans le substrat, et ce en se basant sur la capacité des lipases à différencier les groupements énantiotopes des substrats achiraux et de favoriser la transformation de l'un par rapport à l'autre. Ce mode présente l'avantage d'obtenir des rendements théoriques de 100% (Figure 13). Généralement les désymétrisations sont suivies par un dédoublement cinétique lipasique.

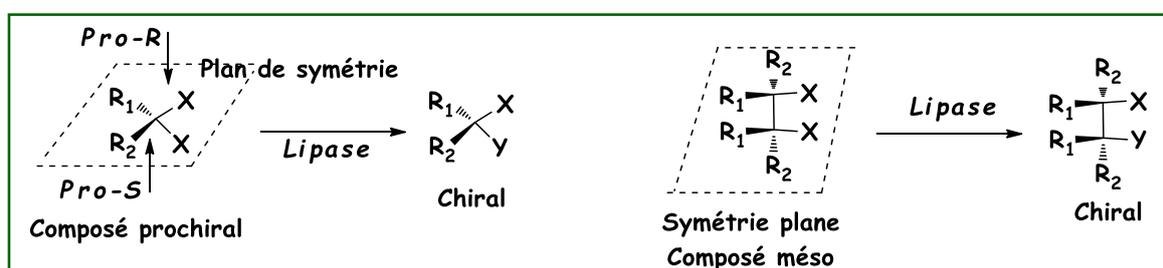


Figure13: Principe de désymétrisation.

⁷⁰(a) M. T. El Gihani, J. M. Williams, *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**, 3, 11-15; (b) M. J. Kim, Y. Ahn, J. Park, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 578-587; (c) O. Pamies, J. E. Backvall, *Trends in biotechnology*, **2004**, 22, 130-135; (d) B. M. Matute, J. E. Backvall, *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**, 11, 226-332

⁷¹M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouioueche, , & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22(18), 1790-1796.

⁷²(a) E.García-Urdiales, I.Alfonso, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2005**, 105(1), 313-354;(b)P. Davoli, E.Caselli, M.Bucciarelli, A. Forni, G. Torre, & F. Prati, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2002**, 1(17), 1948-1953.

Plusieurs exemples de différenciation ou de désymétrisation sont décrits. Deska et al,⁷³ ont réalisé une élégante désymétrisation lipasique d'un diol allénique prochiral, générant ainsi un mono acétate allénique optiquement pur, à chiralité axiale avec de bon rendement, et ce en utilisant la lipase pancréatique du porc (*Schéma18*).

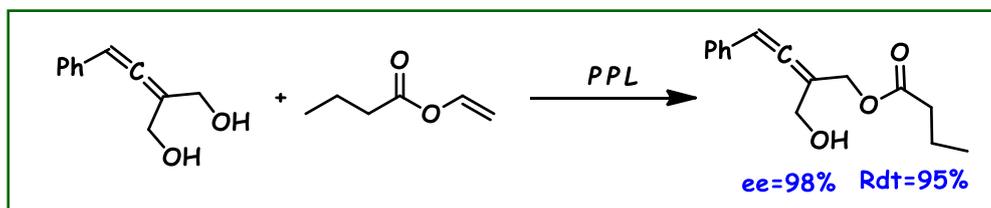


Schéma18: Désymétrisation lipasique d'un diol allénique prochiral.

I-7- Application des lipases dans la synthèse des molécules à visées thérapeutiques :

Par le bien de leurs sélectivités les lipases trouvent une large exploitation dans le domaine de préparation de molécules médicamenteuses, nous citons dans ce qui suit quelques exemples.⁷⁴

I-7-1- Synthèse du Crizotinob :

Le *Crizotinob* est un agent antitumoral.⁷⁵ Un de ses intermédiaires est le (*S*)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophényl) éthanol, (arylalkylcabinol) qui est aisément obtenu énantiomériquement enrichi (ee=80-97%) par un dédoublement cinétique par hydrolyse lipasique de son acétate racémique correspondant⁷⁶ (*Schéma 19*).

⁷³C.Manzana Sapu, J. E.Bäckvall, & J. Deska, *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**,50(41), 9731-9734.

⁷⁴A. C. L. D. M.Carvalho, T. D. S.Fonseca, M. C. D. Mattos, M. D. C. F. D.Oliveira, T. L. G. D. Lemos, F. Molinari, & I. Serra, *International journal of molecular sciences*, **2015**,16(12), 29682-29716.

⁷⁵J. J.Cui, M.Tran-Dubé, H.Shen, M. Nambu, P. P. Kung, M.Pairish, & M. McTigue, *Journal of medicinal chemistry*,**2011**,54(18), 6342-6363.

⁷⁶P. P.Kung, C.Martinez, & J. Tao, **2008**,*U.S. Patent No. 7,465,842*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

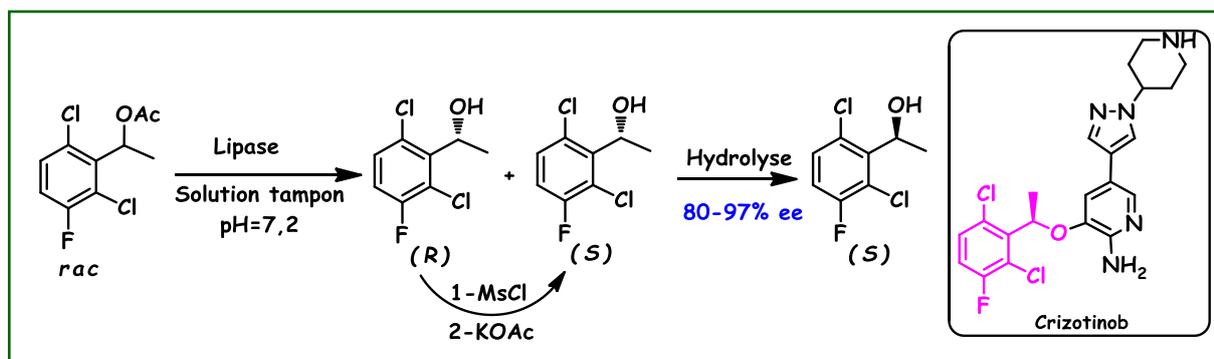


Schéma 19: Synthèse du (S)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophényl) éthanol via un DCE.

I-7-2- L'Ibuprofène :

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien. L'obtention de l'énantiomère (S) est réalisé : soit par hydrolyse des esters correspondants ou par alcoolyse de l'acide racémique. L'utilisation de la forme immobilisée de la lipase de *Candida rugosa* (CRL), lors de l'alcoolyse de l'acide par le 1-butanol, offre le (S)-ester avec un ee=83% (Schéma 20).⁷⁷

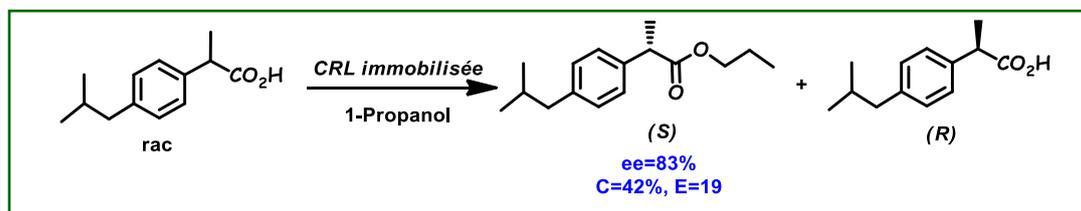


Schéma 20: Alcoolyse lipasique de l'ibuprofène.

I-7-3- Synthèse de la Rivastigmine :

La Rivastigmine, (*Exelon*®) médicament utilisé pour le traitement de démence modérée de la maladie d'Alzheimer. Son activité réside dans la forme énantiomérique (S). Récemment à l'échelle des laboratoires, une synthèse de ce médicament a été développée en passant par un dédoublement cinétique par acylation lipasique d'un alcool secondaire racémique le 1-(3-méthoxyphényl) éthanol, (aryllalkylcarbinol) comme une étape clé pour importer l'énantiopureté au sein de la molécule⁷⁸(Schéma 21).

⁷⁷M. P. Marszałł, & T. Siódmiak, *Catalysis Communications*, **2012**,24, 80-84.

⁷⁸J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández & V. Gotor, Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes. *The Journal of organic chemistry*, **2009**,74(15), 5304-5310.

verte. Elle est également en pleine expansion et même compétitive avec excellence sur le plan industriel dans tous ces domaines pour la production des molécules à haute valeur ajoutée. Parmi les six classes des enzymes, celle des hydrolases est la plus utilisée, particulièrement les lipases considérées comme acteur de la chimie verte en permettant l'accès aisé à un grand nombre de molécules énantiomériquement enrichies *via* différentes méthodologies. L'atout de cette catalyse est sa haute sélectivité (*chimio-*, *régio-* et stéréosélective), d'où son application à grande échelle par les géants des industries, particulièrement, en version asymétrique pour la conception des briques moléculaires énantiomériquement enrichies, en milieu conventionnel ou non-conventionnel particulièrement dans les domaines de la chimie fine et de l'industrie pharmaceutique. La compatibilité des lipases avec les milieux organiques a élargi leur panel d'application en synthèse organique.

Nous avons présenté dans ce chapitre des exemples de la littérature sur l'accès à des molécules énantiomériquement enrichies intéressantes par biocatalyse. Cela permet de constater que cette méthode présente un intérêt pour l'industrie lorsque le DCE est hautement sélectif. Ainsi, l'application des lipases pour la préparation des molécules à visées thérapeutiques montre que le dédoublement cinétique lipasique est une étape clé pour introduire l'énantiosélectivité dans les molécules bioactive, en l'occurrence, les alcools, les amines et les acides 2-aryl- ou alkyl- propionique.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE II

DEDOUBLEMENT CINETIQUE LIPASIQUE

II-1-Introduction:

Une des méthodes d'accès aux molécules chirales énantiomériquement enrichies est le dédoublément de mélanges racémiques (*resolution* en anglais), qui est basé sur le principe de séparation des énantiomères.⁸⁰ Il existe principalement trois processus de dédoublément :

✂ **Dédoublément par cristallisation spontanée** : Découverte de L. Pasteur,⁸¹ qui lui a permis de dédoubler le tartrate d'ammonium et de sodium. Elle consiste en une séparation mécanique appelée encore « *tri* », à l'aide d'un microscope, des cristaux énantiomères d'un mélange de racémique sous forme de conglomerats qui constituent 10% des composés organiques chiraux. Cette technique est toujours utilisée industriellement pour la séparation des énantiomères.

✂ **Dédoublément par formation de diastéréoisomères** : Consiste en une réaction d'un racémique (dl) en présence d'une copule chirale (D). Les diastéréoisomères (dD et lD) formés seront facilement séparables par leur différence de propriétés physiques. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

✂ **Dédoublément chromatographique** : basé sur la formation d'un mélange de diastéréoisomères covalents entre les énantiomères du racémique et une phase chirale (stationnaire ou mobile). Il y a séparation en fonction de la différence de vitesse d'éluion de ces diastéréoisomères. La majorité des dédoubléments chromatographiques sont de nature analytique afin de déterminer la composition énantiomérique.

✂ **Dédoublément cinétique** : basé sur la différence de vitesse de réaction des deux énantiomères vis-à-vis d'une entité chirale énantiomériquement pure (réactif, catalyseur) capable d'intervenir dans la structure de l'état de transition de la réaction

Nous présentons dans ce chapitre un aperçu bibliographique sur le dédoublément cinétique en utilisant les lipases comme entité chirale énantiomériquement pure, qui consiste l'axe sur lequel sont basés nos travaux de thèse.

⁸⁰ Réf9 :C. Rabiller, « *stéréochimie et chiralité en chimie organique* », De Boeck & Larcier, s.a., 1999.

⁸¹ Réf10 :L. Pasteur, *Ann. Chim. et Phys.*, 1848, 24, 442.

II-2- Le dédoublément cinétique lipasique:

II-2-1- Principe :

Le dédoublément cinétique lipasique est un processus de séparation des énantiomères, dans lequel, une transformation chimique s'effectue en faveur d'un seul énantiomère, et ce dépendant la reconnaissance chirale lipasique. . Il est basé sur la différence de vitesse de réaction des deux énantiomères du racémique mis en jeu avec une lipase enzyme pour modifier l'un et laisser l'autre inchangé (*schéma 23*).

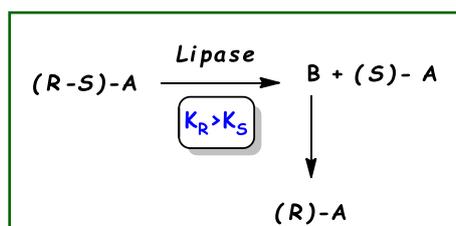


Schéma 23: Principe du dédoublément cinétique lipasique.

Cette biotransformation peut être réversible ou non, selon les conditions sous lesquelles le processus catalytique lipasique s'établit. Pour nous, nous sommes intéressés par la réaction de dédoublément cinétique *irréversible*. Ce processus est décrit par un mécanisme simplifié (*Schéma 24*):

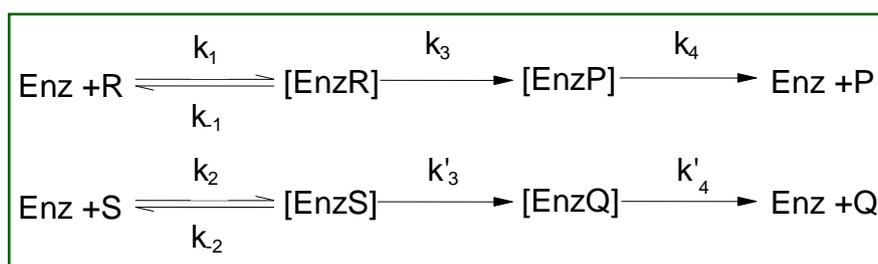


Schéma.24: Mécanisme d'un dédoublément cinétique lipasique.

Enz: enzyme.

R et **S** : Substrats énantiomères réagissant à des vitesses différentes.

[EnzR] et **[EnzS]** : complexes enzyme-substrat.

[EnzP] et **[EnzQ]** : complexes enzyme-produit.

P et **Q** : produits de la réaction.

k₁, **k₋₁**, **k₂**, **k₃**, **k'₃**, **k₄** et **k'₄** : les constantes de vitesse des différentes étapes de la réaction.

II-2-2- Paramètres d'évaluation d'un DCL irréversible:

Dans le cas des réactions de dédoublements cinétiques irréversibles menées par le biais des lipases, l'efficacité du processus catalytique, en matière de réactivité et de sélectivité lipasique est dépendante des paramètres identifiés à base des relations mathématiques décrites par Sih et coll., ainsi que Kagan et Fiaud.⁸²

✂ **L'excès énantiomérique (ee)** : qui caractérise la pureté énantiomérique du mélange racémique par un des deux énantiomères (énantiomères transformé et résiduel).

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \quad \text{Equation.3.}$$

✂ **La conversion (C)** : représente le taux d'avancement de la réaction et dépend des excès énantiomériques du produit obtenu (ee_p) et du substrat non réagi (ee_s).

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad 0 < C < 1 \quad \text{Equation.4.}$$

✂ **Le facteur de sélectivité (E)** : qui est déterminé par le rapport des vitesses des deux énantiomères en compétition dans la réaction.

$$E = \frac{K_R}{K_S} \quad \text{Equation.5.}$$

Pour le produit :

$$E = \frac{\ln[1 - C(1 + ee_p)]}{\ln[1 - C(1 - ee_p)]} \quad \text{Equation.6.}$$

Pour le substrat :

$$E = \frac{\ln[(1 - C)(1 + ee_s)]}{\ln[(1 - C)(1 - ee_s)]} \quad \text{Equation.7.}$$

⁸² (a) C. S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 7294-7299; (b) H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "Kinetic Resolution", *Topics in Stereochemistry*, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Eds, J. Wiley & sons, Inc., New York, **1988**, *18*, 249-330.

D'après ces relations qui ne sont valables que dans le cas où il n'y a aucune inhibition de l'enzyme, le taux d'avancement d'une réaction de dédoublement cinétique enzymatique est directement lié aux excès énantiomériques du substrat non réagi et du produit obtenu, ce qui influe directement sur le facteur de sélectivité E . 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 substrat 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 non réagi peut être obtenu avec un enrichissement optique élevé à une conversion très avancée et l'autre antipode optique avec un excès énantiomérique médiocre (*Figure 14*).

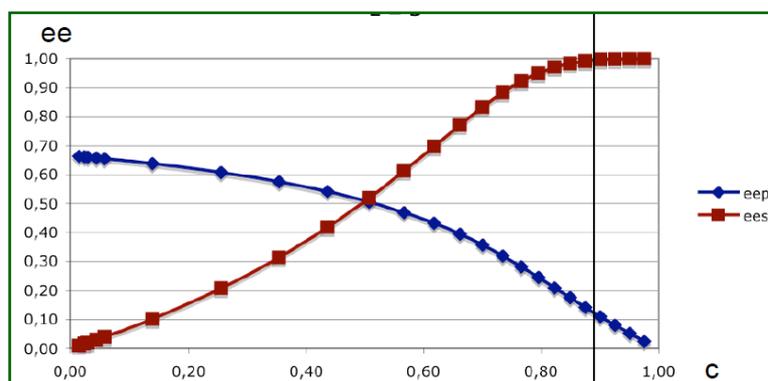


Figure 14 : Dépendance des excès énantiomériques (ee_p/ee_s) à la conversion $E \leq 10$.

✂ **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 15*).

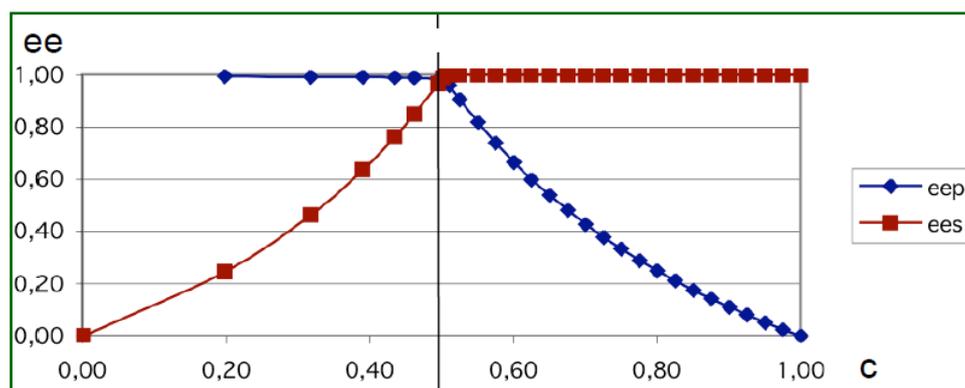
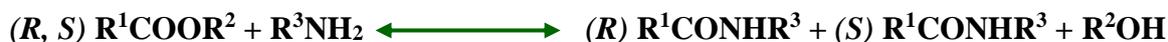


Figure 15 : Dépendance des excès énantiomériques (ee_p/ee_s) à la conversion $E > 100$.

II-2-3- Les réactions menées par un DCL :

Un dédoublément cinétique est réalisable par le biais de différentes réactions possibles par voie lipasique⁸³, telle que :

● **Estérification:**● **Transestérification:**● **Interestérification:**● **Aminolyse (Amidification):**● **Hydrolyse:****II-3- Facteurs influent un dédoublément cinétique lipasique:**

La réactivité et la sélectivité lipasique, peuvent être modulées, à savoir améliorées, en variant quelques paramètres ayant une influence cruciale, et peuvent intervenir directement lors du processus catalytique. Parmi ces facteurs, on peut citer la nature de la lipase, la nature du substrat, la nature du solvant (ou *co*-solvant), celle du nucléophile sans négliger la température, le pH ainsi que l'activité de l'eau. Généralement, la détermination d'un bon système catalytique lipasique pour une synthèse énantiosélective envisagée, passe par plusieurs études systématiques (screening ou criblage) de ces différents facteurs. Nous présentons, ci-après, quelques exemples de la littérature, illustrant l'importance de quelques paramètres.

⁸³ (a)Réf52(a) : C. S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 695. (b)Réf54(a) : A. Ghanem, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754; (c) R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Current Opinion in Chemical Biology*, **1998**, 2, 121-126 ; (d)Réf54(c): G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2226-2254 ; (e)Réf54(d) : L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 3719-3733.

II-3-1- Influence de la nature de la lipase :

La nature de la lipase est un des facteurs déterminants pour élaborer des réactions de DCL. Ce paramètre consiste, dans les pluparts des études décrites, comme la première étape déterminante, de la réactivité et de la sélectivité des lipases étudiées vis-à-vis un substrat sélectionné. Dans ce contexte, d'innombrables exemples sont disponibles dans la littérature.

A titre d'exemple nous citons l'acylation énantiosélective lipasique du *rac*-*N*-Boc-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-ol, en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans le *tertio*-butylméthyléther. Afin de trouver la lipase adéquate pour dédoubler cet arylalkylcarbinol, les auteurs ont examiné plusieurs lipases⁸⁴ (*Schéma 25*).

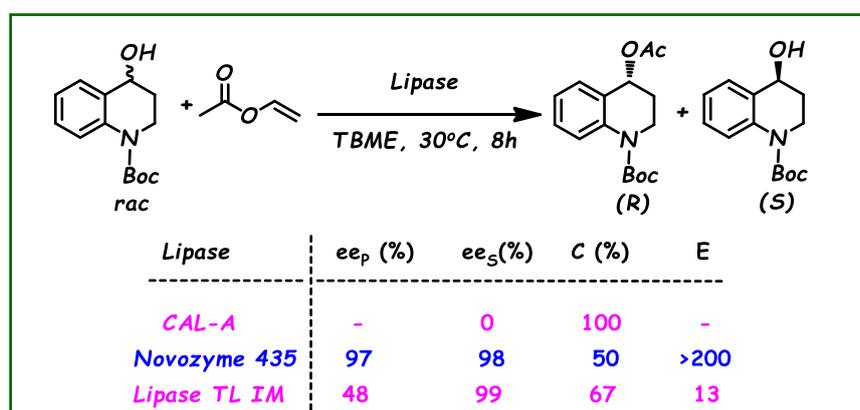


Schéma.25: Acylation énantiosélective du *rac*-*N*-Boc-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-ol : effet de la nature de lipase.

L'utilisation de la *Novozyme 435*, a donné lieu au deux énantiomères, acétate (**R**) produit et alcool (**S**) résiduel énantiomériquement purs, à une conversion de 50%, et un facteur de sélectivité $E > 200$, en faveur de l'énantiomère (**R**). L'utilisation de la *CAL-A* n'a montré aucune sélectivité, les deux énantiomères de l'alcool racémique ont transformés totalement avec les mêmes vitesses en l'ester racémique correspondant ($C=100\%$). Tandis qu'avec la lipase *TL IM*, le produit est obtenu avec un excès énantiomérique modéré (48%) à une conversion de 67%, alors que l'énantiomère résiduel est obtenu énantio-pur.

De même pour les amines, la lipase de *CAL-B* a montré sa performance lors du DCL d'une amine primaire avec l'acétate d'éthyle avec un avancement de 19%, en faveur de

⁸⁴X. Zhou, D.Zheng, B. Cui, W. Han, & Y. Chen, *Tetrahedron*, **2015**, *71*(29), 4738-4744.

l'énantiomère acétamide (*R*-), par contre la *PCL* était totalement inactive, et ce, après cinq jours de réaction⁸⁵. (*Schéma 26*)

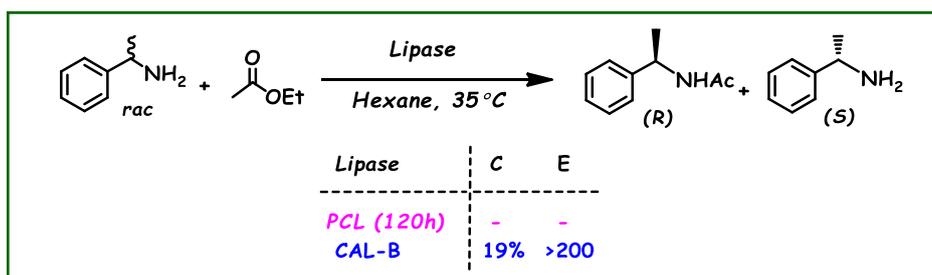


Schéma 26: DCE du Phényléthanamine par l'AcOEt.

D'autre part, la performance de la lipase de *candida antarctica B* (*CAL-B* ou encore *Novozyme 435*), est également prouvée lors de l'hydrolyse du *N*-(1-(2-phénylthiazol-4-yl)éthyl)butyramide dans un milieu aqueux⁸⁶ (*Schéma 27*).

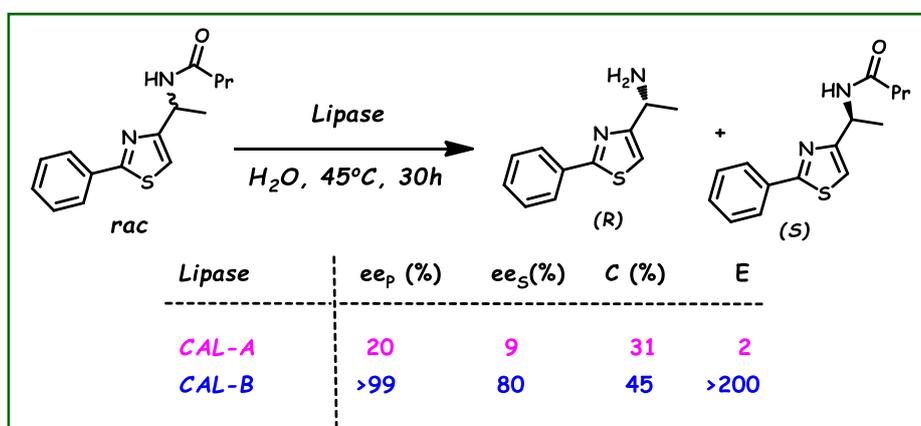


Schéma.27: Hydrolyse lipasique du *N*-(1-(2-phénylthiazol-4-yl)éthyl)butyramide dans l'eau.

Les meilleurs résultats en terme de réactivité sont enregistrés avec la *CAL-B*. D'où après 30 heures d'agitation magnétique à 45°C, l'hydrolyse de l'amide racémique s'est effectuée en faveur de l'énantiomère (*R*), avec un taux de conversion de 45%. Tandis que la *CAL-A* n'a montrée aucune énantio-préférence pour les énantiomères de cet amide.

Les exemples ci-dessus, donnent une impression que la *CAL-B* a toujours une (*R*-) énantio-préférence, ce qui est déjà prouvé pour les alcools secondaires. Mais cet hypothèse

⁸⁵ C. Pilissao, *Process Biochemistry*, **2009**, *44*, 1352–1357.

⁸⁶ A. Radu, M. E. Moisă, M. I. Toşa, N. Dima, V. Zaharia, & F. D. Irimie, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2014**, *107*, 114–119.

n'est pas toujours vrai, et dépend des substrats dédoublés, et des conditions sous lesquelles la lipase est soumise⁸⁷.

A titre d'exemple, une hydrolyse énantiosélective d'une série de γ -nitro-esters est effectuée avec la *Novozyme 435*, avec une (*S*)-éantiosélection⁸⁸. Un des exemples hydrolysé est l'éthyl-3-nitrométhyl-octanoate racémique, dans une solution tampon. Les deux énantiomères, (*S*)-acide produit et (*R*)-ester résiduel sont obtenus énantiomériquement enrichis avec un facteur de sélectivité $E=46$ à une conversion de 63%. (*Schéma 28*).

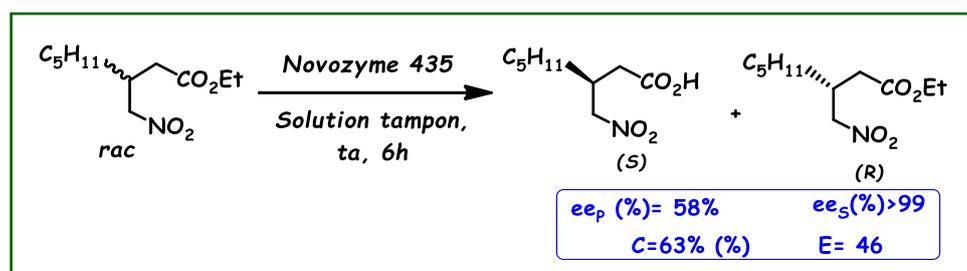


Schéma.28: Hydrolyse lipasique d'un γ -nitro-ester.

II-3-2- Influence de la structure du substrat à dédoubler :

Les réactions de dédoublément cinétique lipasiques sont amplement utilisées pour la conception des molécules à haute valeur ajoutée. Une large panoplie de substrats (alcools, acides carboxyliques, amines, acides aminés...) possédant différentes chiralités (centrale, planaire et axiale) conçus à partir de cette méthode est rapportée, et cette panel nous cesse à s'étendre.⁸⁹ Nous présentons dans ce qui suit quelques exemples concernant précisément les alcools secondaires et leurs acétates correspondants, les acides carboxyliques et leurs esters correspondants ainsi que les amines primaires qui font les substrats principaux de ce sujet de thèse.

⁸⁷ (a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656-2665; (b) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality*, **2008**, 20, 724-735 ; (c) S. W. Tsai, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2016**,127, 98-116.

⁸⁸ F. Felluga, G. Pitacco, E. Valentin, & C. D. Venneri, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19(8), 945-955.

⁸⁹ (a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2011**, 111(7), 3998-4035 ; (b) S. Sen, & J. E. Puskas, *Molecules*,**2015**,20(5), 9358-9379 ; (c) R. Kourist, P. D. de María, & K. Miyamoto, *Green Chemistry*, **2011**,13(10),2607-2618 ;(d) F.van Rantwijk, M. A.Hacking, & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131(6), 549-569 ; (e) **Rét57(d)** : E. Forró, & F. Fulop, *Current medicinal chemistry*, **2012**,19(36), 6178-6187 ; (f) B. Skrobo, J. D. Rolfes, & J. Deska, *Tetrahedron*, **2016**, 72(10), 1257-1275.

✂ Alcools secondaires et leurs acétates correspondants :

Cette catégorie de substrats est amplement étudiée en dédoublément cinétique lipasique, soit par transestérification et par estérification dans les milieux organiques soit par hydrolyse dans les milieux aqueux ou biphasiques, mais le nombre de publications concernant la transestérification et plus important que l'hydrolyse, et ce par le bien des avantages liés à la manipulation dans les milieux organiques. Ils donnent souvent d'excellentes énantiosélectivités par rapport aux alcools primaires et tertiaires qui sont plus délicats à résoudre, et généralement, les alcools benzyliques et cycliques sont les bons candidats pour un dédoublément cinétique lipasique, par rapport aux aliphatiques, cela dû principalement aux formes des sites actifs lipasiques et leur reconnaissance chirale.

Il existe une large variété d'exemples de dédoublément des alcools secondaires fournis par la littérature. Nous en choisissons ici quelques-uns pour démontrer la facilité d'accès de cette catégorie de substrats énantiomériquement enrichis.

Dans ce contexte, nous citons l'acylation lipasique des analogues du chroman-4-ol et du thiochroman-4-ol, qui a été établie par le biais de la lipase de *Burholderia cepacia* (BCL), en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans le TBME.⁹⁰ (Schéma 29). Les résultats obtenus montrent que la nature de l'hétéroatome adjacent du noyau aromatique affecte considérablement l'énantiosélection lipasique.

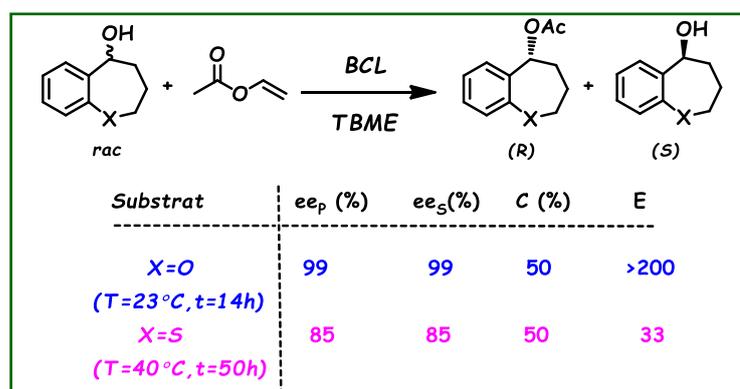


Schéma.29: Acylation lipasique d'alcools secondaires hétérocycliques.

Les alcools secondaires aliphatiques, tels que les propargyliques et les alléniques montrent des sélectivités moins importantes⁹¹ par rapport aux cycliques et benzyliques. Récemment,

⁹⁰ O. V. Kucher, A. O. Kolodyazhnaya, O. B. Smolii, A. I. Boiko, V. S. Kubyskin, P. K. Mykhailiuk, & A. A. Tolmachev, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2014**, *25*(6), 563-567.

⁹¹ K. Burgess, L. D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7434-7436.

deux exemples attrayants du dédoublément cinétique par acylation enzymatique de cette catégorie de substrats ont été décrits. La réussite de ces dédoubléments est due à la présence d'un groupement aryle comme un des substituant du centre stéréogène.

Pour la série propargylique les auteurs ont montré que plus le noyau aryle est éloignée du carbone asymétrique plus la sélectivité augmente lors de l'acylation avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle en présence de la lipase *ps-30* dans le toluène⁹² (*Schéma 30*).

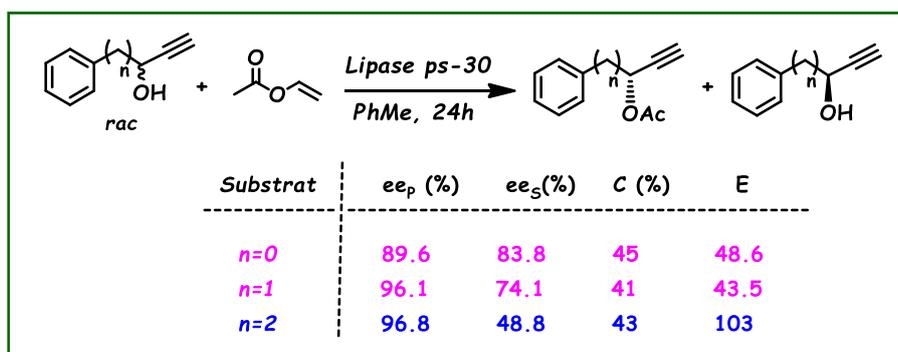


Schéma.30: Acylation lipasique d'alcools propargyliques

Concernant la série allénique, les auteurs ont décrit une influence des effets électroniques importants des substituent en *para*- du noyau aromatique lors de l'acylation d'une série d'alcools aryl- α -alléniques, par le biais de la lipase *AK*, en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans le TBME⁹³. La présence d'un groupement électrodonneur joue en défaveur de la sélectivité, tandis que la substitution en *para* par un groupement électroattracteur améliore nettement la réactivité et la sélectivité lipasique (*schéma 31*).

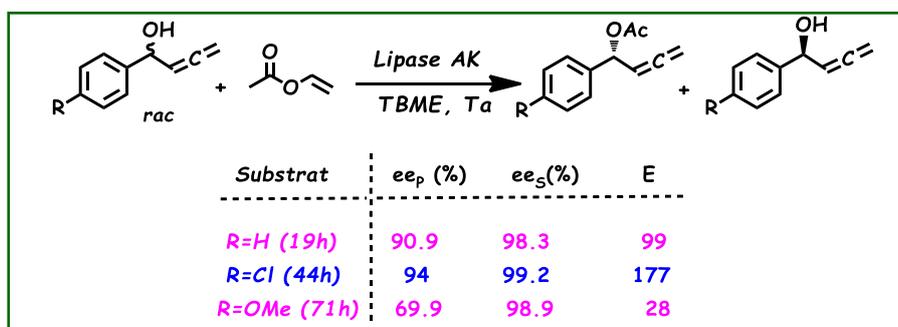


Schéma.31: Acylation lipasique d'alcools alléniques.

⁹²P. Chen, & X. Zhu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**, *97*, 184-188.

⁹³ W. Li, Z. Lin, L. Chen, X. Tian, Y. Wang, S. H. Huang, & R. Hong, *Tetrahedron Letters*, **2016**, *57(5)*, 603-606.

L'influence des effets électroniques est gouvernée par plusieurs circonstances, structures des substrats dédoublés et la réaction mise en œuvre, et non plus de la lipase utilisée. L'exemple ci-dessous, montre des effets contradictoires à ceux de l'exemple précédent, en utilisant la lipase **AK**, pour hydrolyser des acrylates dans une solution tampon pH=7. Où la présence d'un substituant électrodonneur accroît nettement la sélectivité, par contre la substitution en *para* par un groupement électroattracteur cause une considérable chute du facteur de sélectivité (**Schéma 32**).

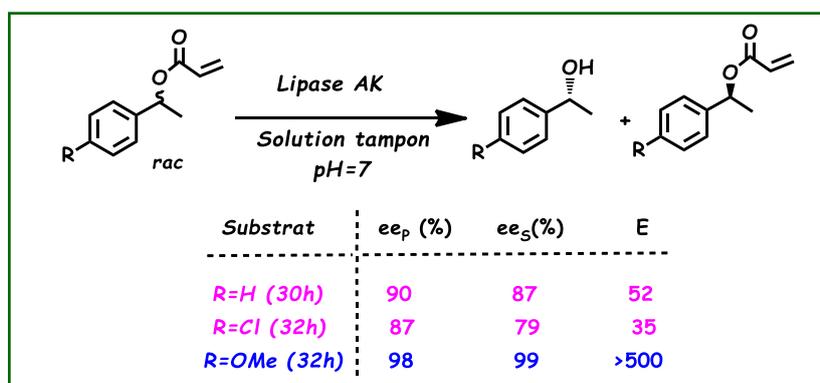


Schéma.32: Hydrolyse lipasique d'acrylates racémiques.

✂ Amines primaires :

Les réactions de dédoublément cinétique par amidification enzymatique avec les lipases sont très utilisées pour la séparation des énantiomères des amines⁹⁴ et de leurs dérivés⁹⁵. Mais le nombre de publications reste restreint malgré l'importance de la conception de cette classe de substrats sous forme énantiopure pour différents domaines⁹⁶, tel que : thérapeutique, agroalimentaire et cosmétique.

L'effet de la structure de l'amine sur l'énantiosélectivité lipasique, est montré lors de l'amidification de quelques amines benzyliques primaires par l'acide 4-pentenoïque catalysée par la **CAL-B** en utilisant des liquides ioniques comme solvants, d'où un effet important de

⁹⁴ Réf15(e) : C. Pilissao and M. da Graca Nascimento ; *Tetrahedron: Asymmetry* , **2006** ,17 ,428–433.

⁹⁵ (a)Réf15(f) : A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar; *Tetrahedron Letters* , **2005** , 46 ,4511–4514. (b)Réf15(g) : R. Irimescu and K. Kato , *Tetrahedron Letters* , **2004** , 45 523–525.

⁹⁶ (a) R. N. Patel, *Enzyme and Microbial Technology*,**2002**, 31, 804–826; (b) A. Baldessari, C. P. Mangone; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , **2001** , 11, 335–341; (c) E. Brenner, R. Schneider , Y. Fort , *Tetrahedron* , **2002** , 58 , 6913–6924 ; (d) J. A. Bender ; N. A. Meanwell; T. Wang; *Tetrahedron* , , **2002** , 58,3111–3128 ; (e) T. Toyo'oka; *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2002**, 54,25–56.

l'éloignement de la fonction amine primaire du centre stéréogène a été remarquée⁹⁷ (**Schéma 33**).

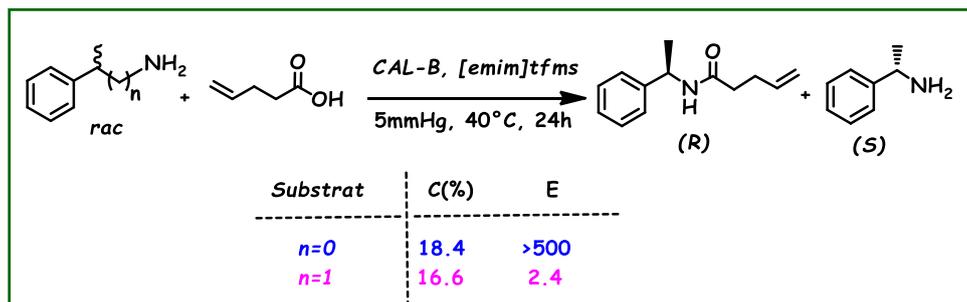


Schéma 33: Amidification d'amines primaires par l'acide 4-pentenoïque.

Une excellente énantiosélectivité a été obtenue avec le 1-phényléthanamine avec un $E > 500$. Cette dernière chute, considérablement, lors du DCE du 2-phénylpropan-1-amine, et ce, pour le même taux d'avancement.

Un autre exemple, décrit par Gotor *et al.*⁹⁸ montre un effet important de la structure du substrat sur l'énantiosélectivité lors de l'acylation d'amines benzyliques primaires catalysée par la **CAL-B**, et en utilisant l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle (**schéma 34**).

La présence d'un groupement *méthoxy* en position *ortho* du noyau benzylique joue en faveur de l'énantiosélectivité lipasique.

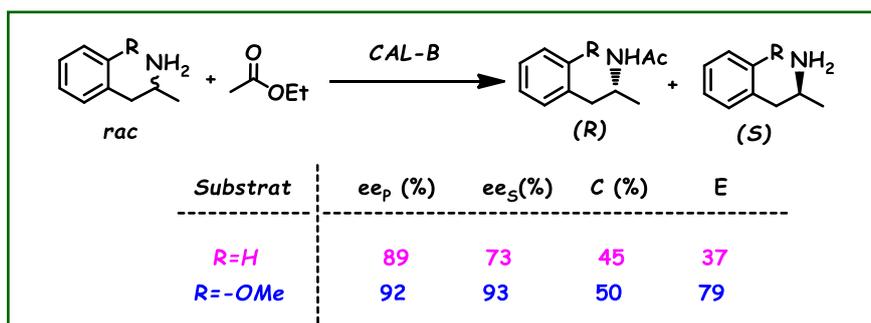


Schéma 34: Acylation d'amines primaires par la CAL-B.

✂ Acides carboxyliques et leurs dérivés :

Parmi les acides carboxyliques ayant une activité biologique importante, les acides α -arylpropioniques et les acides α -aryloxypropioniques. La première classe « les profènes » sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs), où l'activité thérapeutique est

⁹⁷ R. Irimescu, K. Kato, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 30, 189–194.

⁹⁸ J. González-Sabín, V. Gotor, & F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13(12), 1315-1320.

attribuée à l'énantiomère (*S*). Par contre la deuxième classe, utilisée principalement comme herbicides, l'activité biologique est portée par l'énantiomère (*R*).⁹⁹

Leur obtention sous formes énantiomériquement enrichies par dédoublement cinétique lipasique se fait souvent par le biais d'une estérification, inter-estérification, ou par hydrolyse des esters correspondants.

L'exemple ci-dessous, montre l'influence du radical ester sur l'avancement de la transestérification des esters de l'ibuprofène par la **CAL-B** dans le toluène. Le meilleur résultat en termes de réactivité et sélectivité a été obtenu avec l'ester vinylique comparé à l'ester éthylique¹⁰⁰ (**Schéma 35**).

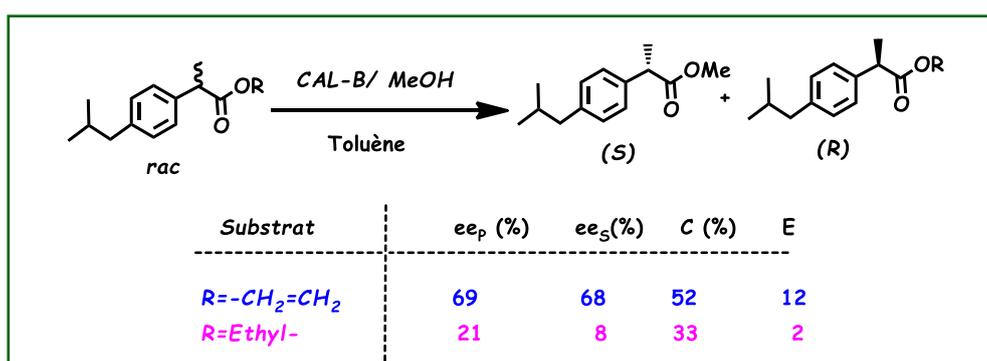


Schéma 35: Transestérification lipasique des esters de l'ibuprofène.

Récemment, une hydrolyse des esters de l'ibuprofène par le biais de la **RML** immobilisée sur silice fonctionnalisée (**CAL-B-époxy**) dans un milieu biphasique est décrite, où les auteurs ont montré une influence cruciale du groupement partant sur l'avancement de la réaction¹⁰¹ (**Schéma 36**).

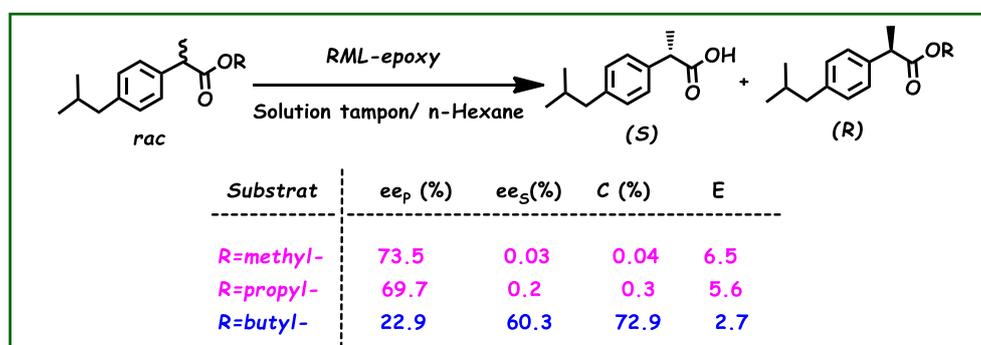


Schéma 36: Hydrolyse lipasique des esters de l'ibuprofène.

⁹⁹ R. A. Sheldon, *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press. 1993.

¹⁰⁰ E. Henke, Schuster, H. Yang, U. T. Bornscheuer, *Monstshefte für chimie*, 2000,131, 633-638.

¹⁰¹ S. Gandomkar, Z. Habibi, M. Mohammadi, M. Yousefi, & S. Salimi, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(4), 550-554.

II-3-3- Influence de la nature du donneur /accepteur d'acyle :**✂ Les donneurs d'acyle achiraux :**

Afin de contourner la réversibilité de la réaction de trans-estérification, deux éventualités se présentent afin de déplacer l'équilibre thermodynamique vers le sens désiré, soit en faisant appel à la loi d'action de masse en utilisant un excès d'agent acylant, soit en utilisant des agents acylants spécifiques pour rendre la réaction irréversible. Pour cela, plusieurs agents acylants peuvent être appliqués. Ces derniers sont classés en trois catégories (*Schéma 37*)¹⁰² :

- **Agents acylants réversibles** : telle que les esters ou les thioesters, ces derniers ne sont pas très utilisés.
- **Agents acylants quasi-irréversibles** : cette catégorie consiste en des donneurs d'acyle assez nucléophiles. Leur utilisation pour le dédoublement cinétique par transestérification enzymatique est très commode pour les amines et les alcools primaires.
- **Agents acylants irréversibles** : cette catégorie de donneurs d'acyle se subdivise en deux : les anhydrides d'acides et les esters d'énols.

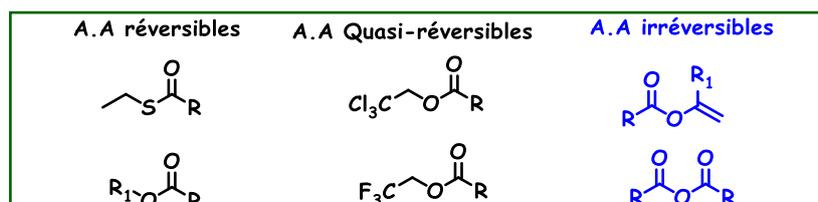


Schéma 37: Catégories d'agents acylant.

Cette dernière catégorie est la plus adéquate et la plus utilisée pour l'acylation des alcools. Pour les amines, le choix du donneur d'acyle est un paramètre très délicat à étudier, et ce vu les limitations imposées par la grande nucléophilie des amines, en la comparant avec celle des alcools. Ils sont repartis selon leurs réactivités en trois catégories, de très réactifs au moins réactifs¹⁰³, (*Schéma 38*) :

- **Catégorie (a)** : réagissent spontanément avec les amines, et ne sont pas, compatibles pour des réactions bio-catalysées.

¹⁰² H. Hanefeld, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2405-2415.

¹⁰³ S. Takayama, S. T. Lee, S-C. Hung, C-H. Wong, *Chem. Commun.*, **1999**, 127-128.

- **Catégorie (b)** : Ces réactifs peuvent réagir spontanément avec des amines, mais avec l'inconvénient de la difficulté d'arracher le groupement partant. Ils sont moins réactifs que la catégorie (a).
- **Catégorie (c)** : Ces réactifs ne réagissent pas spontanément avec les amines, et sont, peut être les mieux adaptés pour des réactions bio-catalysées.

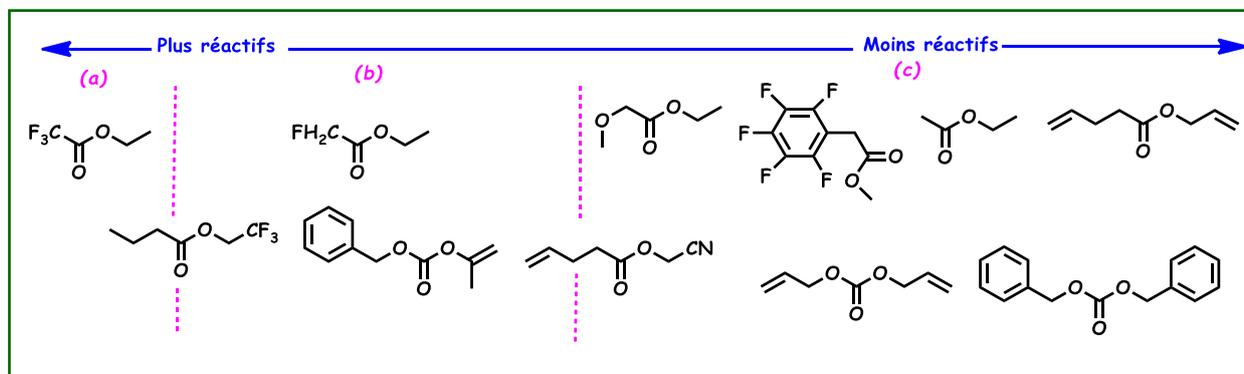


Schéma 38: Différentes catégories de donneurs d'acyle utilisées pour la protection des amines.

✂ Les accepteurs d'acyle achiraux (Nucléophiles) :

C'est un autre paramètre délicat à optimiser, puisqu'il dépend de plusieurs autres conditions, telles que, la nature de l'enzyme et celle du substrat.

Nous citons un exemple démonstratif décrit par l'équipe de Poppe, qui a étudié l'évolution de la réaction d'alcoolyse enzymatique d'une série de 1-hétéroaryléthanol¹⁰⁴. Ils ont montré un effet significatif de l'allongement de la chaîne alkyle du nucléophile sur la sélectivité et la réactivité de la **CAL-B** (**Schéma39**).

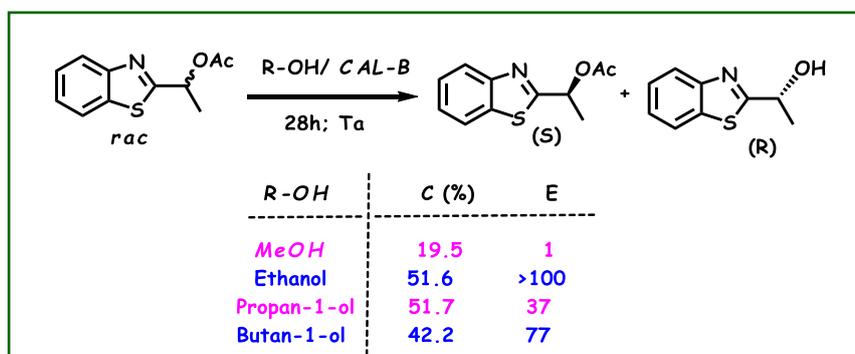


Schéma 39: DCE du 1-hétéroaryléthanol via alcoolyse enzymatique.

¹⁰⁴ M. Tosa, S. Pilbak, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szatzkcs, L. Novak, F-D. Irimie, L. Poppe, *Tetrahedron : Asymmetry*, **2008**,19,18844-1852

Une nette amélioration de la sélectivité lipasique a été notée, en remplaçant le méthanol par l'éthanol, d'où le facteur de sélectivité passe de $E = 1$ à $E > 100$.

II-3-4- Influence du solvant (co-solvant) :

Le solvant joue un rôle important dans les réactions de dédoublement cinétique enzymatique. 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. La présence d'un excès de molécules d'eau (w_a) autour du site actif lipasique peut, soit réduire l'énantiosélectivité enzymatique, soit engendrer une modification de la conformation de la lipase ce qui induit un inversement de l'énantiosélection¹⁰⁵. Généralement, en catalyse enzymatique, la polarité des solvants organique est désignée par une corrélation entre l'hydrophobicité d'un solvant organique et le facteur $\text{Log}P$, le logarithme du coefficient de partition entre le *n*-octanol et l'eau. Les solvants non-polaires avec un $\text{Log}P > 2$ sont les plus sollicités pour les réactions de transestérification enzymatique. Cette règle reste empirique. Des tests préalables doivent être effectués sur une gamme de solvants pour chaque réaction de dédoublement enzymatique.

Cet effet apparait nettement dans l'exemple de l'estérification de l'ibuprofène par le méthanol en utilisant des solvants de diverses polarités, en présence de la lipase de *candida cylindracea* (CCL)¹⁰⁶ (Schéma 40).

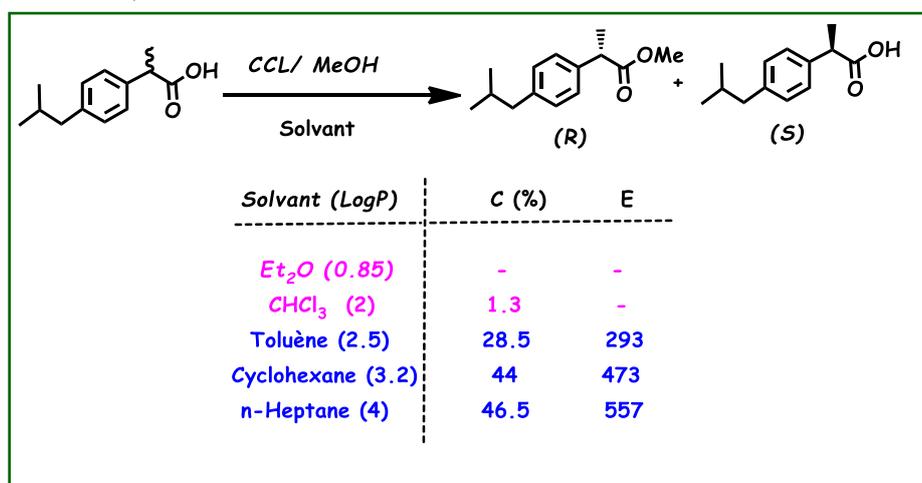


Schéma 40: Estérification de l'ibuprofène : effet de solvant.

¹⁰⁵ (a) Réf53(a) : A. M. Klivanov, *Nature*, **January 2001**, 409, 241-246 ; (b) Patel, R. N.; *Stereoselective Biocatalysis*, **2000**, Dekker, New York ; (c) P. Berglund, *Biomol. Engineering*, **2001**, 18, 13-22 ; (d) V. Gotor-Fernandez; R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B. Enz.*, **2006**, 40, 111-120.

¹⁰⁶ M. G. Kim & S. B. Lee ; *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 81, 269-271.

De même l'utilisation d'un *co*-solvant lors des réactions d'hydrolyse dans un système bi-phasique a un impact important sur la sélectivité et la réactivité lipasique, à l'instar de l'exemple ci-dessous, de l'hydrolyse d'un acétate hétérocyclique catalysée par la *Novozym SP435* (Schéma 41)¹⁰⁷. L'utilisation d'un solvant hydrophobe joue en défaveur de l'énantio-sélectivité, par contre l'addition d'un solvant à caractère hydrophile améliore nettement la sélectivité.

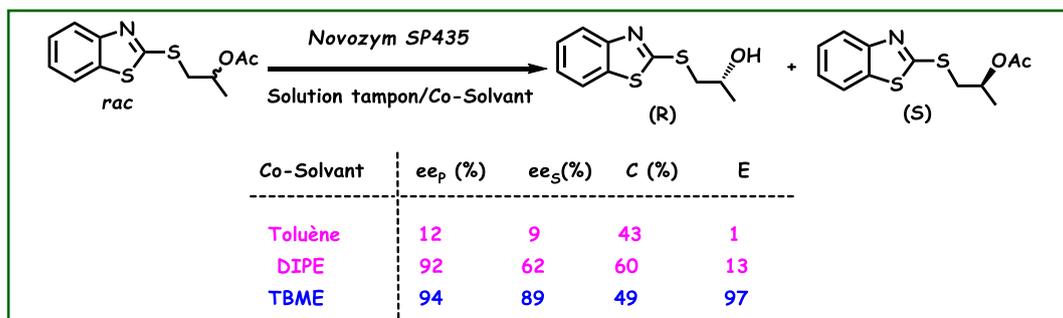


Schéma 41: Hydrolyse lipasique d'un acétate hétérocyclique : Effet du co-solvant.

II-3-5- Influence de la température :

Les enzymes ont des structures aussi complexes que délicates qui ne supportent pas des conditions opératoires dures, telle que les températures élevées, et ce, quelque soit leur nature, sous forme libre ou immobilisées sur support solide. Une augmentation ou une diminution de la température peut causer une dénaturation des protéines enzymatiques. Pour cela la température est un paramètre difficile à optimiser. Klivanov¹⁰⁸ a démontré qu'une enzyme reste thermostable jusqu'à 100°C dans les solvants organiques. Leur immobilisation a rendu plus facile leur utilisation à des températures élevées. Le nombre d'exemples qui montre que les lipases conservent leur énantiosélectivité à de fortes températures reste limité.

Sakai *et al.*¹⁰⁹ ont montré que la lipase immobilisée *PS-C II*, garde une énantiosélectivité constante de 40°C à 120°C, et elle atteint la meilleure conversion entre 80°C et 90°C, et ce, lors du dédoublement cinétique par transestérification enzymatique du 1,1-diphényl-2-

¹⁰⁷ P. Borowiecki, M.Fabisiak, & Z. Ochal, *Tetrahedron*, **2013**, 69(23), 4597-4602.

¹⁰⁸ (a) H. Noritomi, O. Almarsson, G. L. Barietta, A. M. Klivanov, *Biotech & Bioengineering*, **1996**, 51, 95-99 ;

(b) E. Holmberg, K. Hult, *Biotechnology Lett.*, **1991**, 13, 323-326.

¹⁰⁹ T. Ema, M. Kageyama, T. Korenaya, T. Sakai, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3934-3947.

propanol. La conversion est 3% à 30°C, en augmentant la température à 80°C la conversion atteint le seuil de 39%. (Schéma 42)

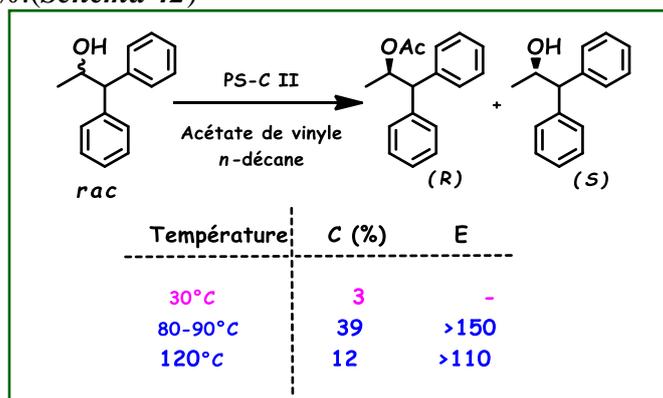


Schéma.42 : Transestérification lipasique de 1,1-diphényl-2-propanol.

II-4- TRAVAUX ANTERIEURS DU LABORATOIRE :

L'équipe du professeur L. Aribi-Zouiouche, s'est intégrée dans les thématiques concernant de la biocatalyse depuis plus de 24 années, très tôt avant la création du laboratoire de catalyse asymétrique éco-compatible (L.C.A.E) en 2012, et même avant l'édition du concept de la chimie verte.

Le thème de recherche développé au cours de ces travaux de thèse s'intègre dans la continuité des travaux antérieurs de notre laboratoire, qui visent la préparation des briques moléculaires énantiopures, présentant un intérêt potentiel en chimie thérapeutique ou en agrochimie. La mise en œuvre de nouveaux procédés stéréosélectifs a permis la préparation aisée de quantités substantielles de composés optiquement purs, par le biais de processus biocatalytiques originaux qui sont mentionnés ci-après.

✂ Alcools à chiralité axiale :

Les dérivés du n-(alkylcycloalkylidène) éthanol possèdent un axe de chiralité, ces alcools primaires sont difficiles à résoudre. Le 3-(*t*-butylcyclobutylidène) éthanol a été dédoublé pour la première fois par une estérification catalysée par la lipase de *pseudomonas fluorescens* (*PFL*) en utilisant l'anhydride succinique comme donneur d'acyle irréversible¹¹⁰ (Schéma 43).

¹¹⁰ Réf. 58(a) J. C. Fiaud, R. Gil, J-Y. Legros, L. Aribi-Zouiouche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, Vol 33, 6967-6970.

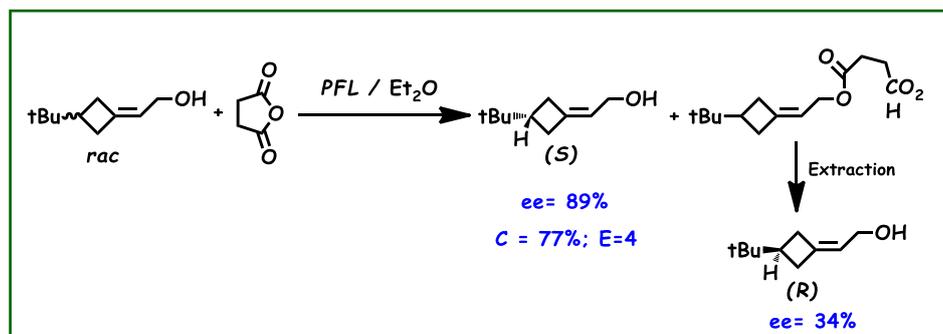


Schéma.43 : Estérification lipasique du 3-(t-butylcyclobutylidène) éthanol.

L'énantiomère n'ayant pas réagi a été récupéré avec un enrichissement énantiomérique de 89% à une conversion de 77%.

✂ Alcools à chiralité planaire :

Les dédoubléments lipasiques des alcools primaires à chiralité planaire type ferrocène, ont fait le scoop, en 2008 et 2009, et ce dans des investigations concernant l'optimisation de la sélectivité et de la réactivité lipase lors des réactions modestement sélectives. Ces optimisations ont été réalisées par la modulation de divers paramètres ayant une influence cruciale sur le processus catalytique lipasique, tels que la nature et la quantité de l'enzyme, la nature de l'agent acylant, celle du solvant ou par le biais de l'introduction des additifs.

Par le biais de ce dernier paramètre, le 2-hydroxyméthyl-1-phénylthioferrocène, alcool primaire à chiralité planaire, a été dédoublé avec succès par une acylation catalysée par la lipase de *candida rugosa* (CRL), en introduisant un alcaloïde comme additif¹¹¹ (Schéma 44).

Solvant	ee _p (%)	ee _s (%)	C (%)	E
TBME (sans additif)	86.9	56.7	40	25
TBME (avec additif)	79.9	99.5	55	52
Toluène (sans additif)	94.5	25.6	21	45
Toluène (sans additif)	90.1	99.1	53	143

Additif:

Schéma.44: Acylation lipasiques d'un alcool ferrocényl primaire à chiralité planaire.

¹¹¹ M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**,19(20), 2378-2384.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant le toluène comme solvant organique, avec un contrôle de l'activité de l'eau dans le milieu par l'ajout du tamis moléculaire.

Plus tard, l'acylation¹¹² et la déacylation alcaline¹¹³ de cet alcool ont été effectuées parfaitement en utilisant la *CAL-B* comme biocatalyseur dans un milieu non-aqueux (**Schéma 45**). Les quatre énantiomères, alcools et acétates, issus de ces deux réactions opposées sont obtenus énantiomériquement enrichies.

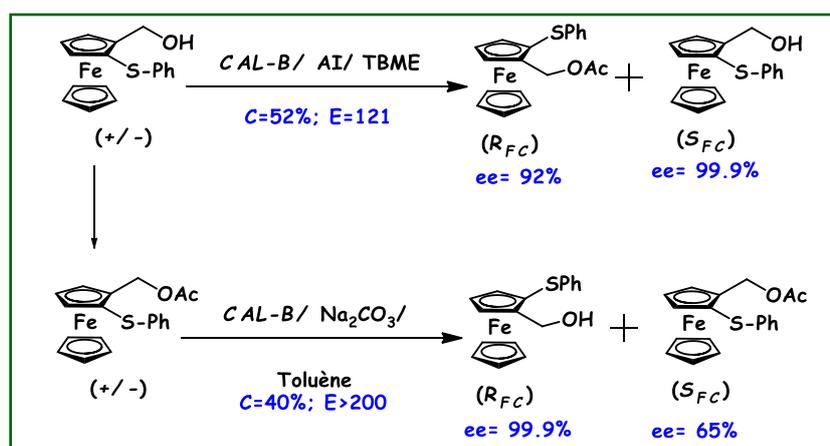


Schéma.45: Acylation/Déacylation lipasiques d'un dérivé ferrocényl à chiralité planaire.

✂ Alcools à chiralité centrale :

Les dédoubléments cinétiques lipasiques des alcools secondaires à chiralité centrale et de leurs dérivés acétates ont été amplement étudiés au sein du L.C.A.E, particulièrement ceux appartenant à la famille des arylalkylcarbinols et hétéroarylalkylcarbinols.¹¹⁴ Ces dédoubléments ont été réalisés soit par transestérification, soit par hydrolyse lipasiques, et plusieurs paramètres ont été examinés, particulièrement, la nature et la quantité de lipase et celle de l'agent acylant. Ces études ont permis d'aller plus loin en réalisant des réactions de

¹¹² M. Merabet-Khellasi, L. Aribi-Zouiouche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**,20(12), 1371-1377.

¹¹³ M. Merabet-Khellasi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouiouche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23(11), 828-833.

¹¹⁴ (a)**Réf15(a)** : N. Bouzemi, H. Debeche, L.Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron letters*, **2004**, 45(3), 627-630 ; (b)**Réf58(d)** : L. Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2000**,41(21), 4085-4088 ; (c) H.Debeche, M. Toffano, J. C. Fiaud, & L. Aribi-Zouiouche, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**,66(3), 319-324 ; (d) C. Bidjou, & L. Aribi-Zouiouche, *J. Soc. Alger. Chim*, **1999**, 9, 261-268 ; (e) C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron letters*, **2002**,43(16), 3025-3027; (f) N. Melais, M. Boukachabia, L. Aribi-Zouiouche, & O. Riant, *Bioprocess and biosystems engineering*, **2015**, 38(8), 1579-1588; (g) M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, L. Zouiouche-Aribi, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, 17(2), 185-194.

déracémisation de ces substrats en valorisant l'énantiomère inutile, soit par dédoubllement cinétique dynamique,¹¹⁵ soit en adoptant le processus de stéréoinversion.¹¹⁶

Les études approfondies du dédoubllement cinétique lipasique, nous a éclaircit plusieurs phénomènes qui interfèrent lors du processus catalytique lipasique, particulièrement dans les milieux non aqueux.

A titre d'exemple, lors de l'étude de l'effet de la quantité de la lipase de *candida antarctica* (**CAL-B**), lors de la transestérification d'une série d'aryalkylcarbinols en utilisant des esters d'énol comme donneur d'acyle, des observations concernant la perturbation de l'énantiosélection lipasique dans un milieu fort concentré en biocatalyseur¹¹⁷ (**Schéma 46**).

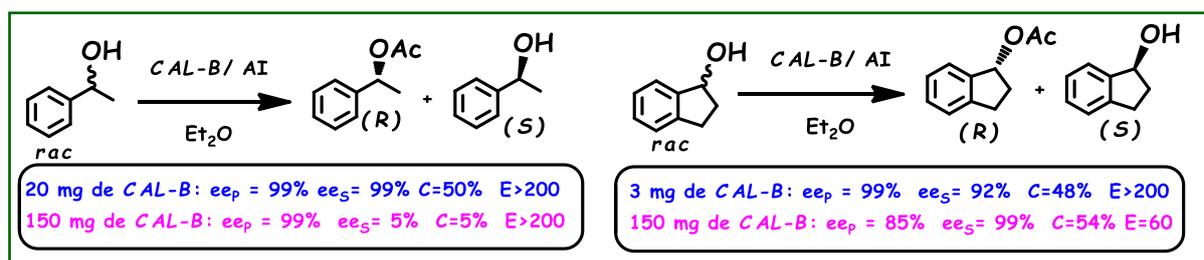


Schéma.46 : Acylation lipasique d'alcools secondaires.

Ce phénomène a été interprété par une probabilité de présence d'une réaction d'hydrolyse compétitive réversible de l'agent acylant à celle de l'acylation, en augmentant la quantité d'enzyme dans certains cas (**Schéma 47**).

¹¹⁵**Réf71 :** M. Merabet-Khelassi, N.Vriamont, L. Aribi-Zouiouche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**,22(18), 1790-1796.

¹¹⁶ (a)**Réf15(b) :** N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17(5), 797-800; (b)**Réf66 :** N. Bouzemi, I. Grib, , Z. Houiene & L. Aribi-Zouiouche, *Catalysts*, **2014**, 4(3), 215-225 ; (c)**Réf68 :** Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant & L.Aribi-Zouiouche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**,24(5), 290-296.

¹¹⁷ M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C. Fiaud, O. Riant, & L. Aribi-Zouiouche, *Comptes Rendus Chimie*, **2011**,14(11), 978-986.

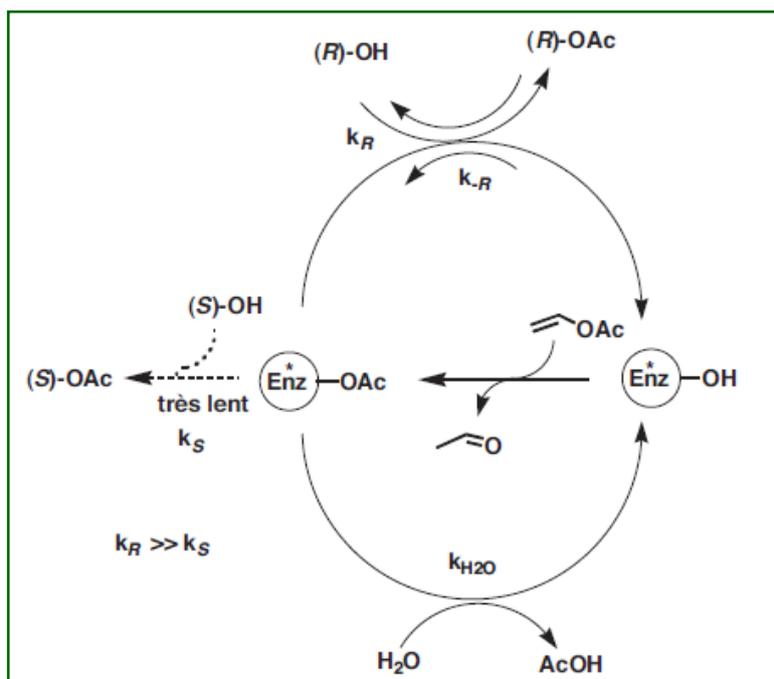


Schéma.47 : Hypothèse de mécanisme interprétant la diminution d'activité apparente et de sélectivité dans un milieu fort concentré en lipase.

A partir de cette hypothèse, qui révèle la possibilité de réaliser une déacylation dans un milieu non aqueux, à été renforcé, après la mise au point d'une réaction d'hydrolyse hautement énantiosélective dans un milieu non aqueux, catalysée par la **CAL-B**, en présence des sels de carbonates, d'une série d'aryllalylacétates (**Schéma 48**).¹¹⁸

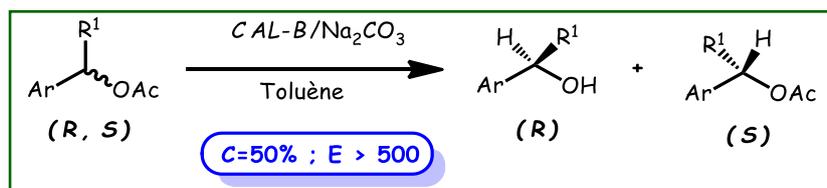


Schéma.48 : Hydrolyse lipasique assistée par le carbonate de sodium.

Au cours de cette étude nous avons constaté que la **CAL-B** possède le pouvoir d'hydrolyser les acétates dans un milieu non-aqueux, juste en faisant appel au carbonate de sodium.

Cela nous a poussé à poser d'autres questions sur l'influence de cette réaction compétitive, sur l'énantiosélectivité lipasique, dans les milieux pauvres en eau....

¹¹⁸Réf113 : M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**,23(11), 828-833.

II-5- Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons présenté une mise au point bibliographique sur la réaction de dédoublement cinétique lipasique ainsi que des paramètres d'évaluation. Nous avons présentés quelques exemples décrits en se focalisant sur les divers paramètres pouvant intervenir d'une manière significative sur la réactivité et l'énantiosélectivité, notamment, la nature de la lipase, du solvant et de l'agent acylant employés, et l'ajout d'additifs. Ces exemples sont choisis en fonction des réactions et des substrats visés par nos travaux de thèse. Nous avons également présentés quelques travaux élaborés au sein de notre laboratoire, qui visent principalement, l'étude des différents paramètres agissants d'une manière significative sur le processus catalytique lipasique afin de le mieux comprendre, pour aboutir facilement et efficacement à des molécules à haute valeur ajoutée énantiomériquement enrichies ou pures.

Conclusion de la première partie

Au cours de cette première partie, nous avons étudié les différents modes d'accès aux molécules chirales, énantiomériquement enrichies par diverses voies biocatalytiques.

Les approches biocatalytiques répondent parfaitement aux exigences environnementales, édictées par les douze principes de la chimie verte, et sont également en pleine expansion sur le plan industriel avec tous ces domaines, et même compétitives avec excellence, pour la production des molécules à hautes valeurs ajoutées.

En chimie fine, le potentiel d'utilisation des biocatalyseurs, en l'occurrence, les enzymes hydrolytiques, et particulièrement les lipases sont les plus attrayants par le bien de leur haute sélectivité (*chimio-*, *régio-* et stéréosélective), ainsi que leur compatibilité avec les milieux organiques a élargit le panel de son application, particulièrement en synthèse organique. Cela est traduit par leur application à grande échelle par les géants des industries, particulièrement, en version catalytique asymétrique pour la conception des briques moléculaires énantiomériquement enrichies, soit dans les milieux aqueux ou non-conventionnelles, et ce, particulièrement dans les domaines de la chimie fine et de l'industrie pharmaceutique.

La mise au point bibliographique, nous permet de constater que les dédoublements cinétiques lipasiques de racémiques sont les plus exploités. De nombreux paramètres peuvent influencer la réactivité et l'énantiosélectivité de ces réactions, notamment, la nature de l'enzyme, la structure du substrat, l'agent acylant, le solvant et l'introduction des additifs. Une bonne maîtrise de ces paramètres donne lieu à un dédoublement cinétique enzymatique sélectif efficace.

C'est dans ce cadre que les travaux de cette thèse s'intègrent.

Objectifs de la thèse

Notre projet de thèse consiste à préparer des briques moléculaires énantio-pures, présentant un intérêt potentiel en chimie thérapeutique ou en agrochimie et de mettre en œuvre des procédés stéréosélectifs permettant la préparation aisée de quantité substantielle de composés optiquement purs, et cela, par le biais de processus biocatalytiques. Nous avons orientés nos investigations dans le but de mieux comprendre les différents paramètres pouvant influencer le processus catalytique lipasique dans des milieux pauvres en eau ou quasi-anhydres. Pour cela nous avons visés la mise au point des procédés de dédoublement cinétique lipasique des molécules à visée thérapeutique, en contrôlant tous les phénomènes accompagnants le processus biocatalytiques. Dans ce contexte, notre travail s'est axé autour de deux objectifs principaux :

- **Premier objectif :** Mettre au point de nouvelles méthodologies de déacylation lipasiques d'une série d'arylakyl-acétates benzyliques, d'intérêt pharmacologique, dans un milieu non aqueux. Pour cela, nous avons étudié l'impact de divers nucléophiles dans des milieux organiques hydrophobes et hydrophiles sur le déroulement du processus de deacylation lipasique par alcoololyse et aminolyse.

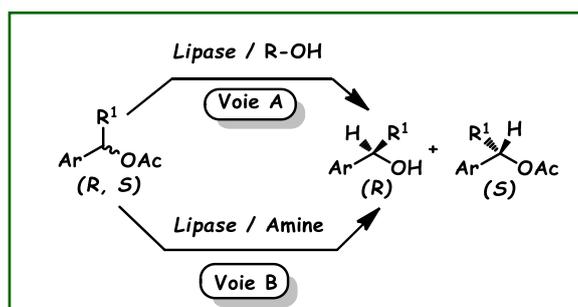


Schéma.49 : Premier objectif.

- **Deuxième objectif :** La mise au point des réactions d'aminolyse d'acides α -arylpropioniques (anti-inflammatoire non-stéroïdiens), et de leurs dérivés esters par divers amines aromatiques achirales, et l'amidification de quelques amines primaires par dédoublement cinétique lipasique.

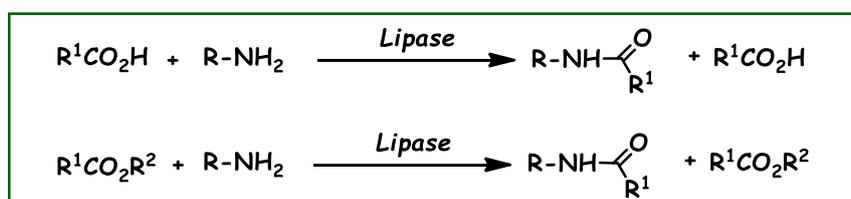


Schéma.50 : Deuxième objectif.

A horizontal green banner with a scroll effect on the left and right sides, containing the text "DEUXIEME PARTIE".

DEUXIEME PARTIE

A horizontal green banner with a scroll effect on the left and right sides, containing the text "RESULTATS ET DISCUSSIONS".

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Introduction de la deuxième partie

L'utilisation des réactions de dédoublement cinétique lipasique offrent une alternative hautement énantiosélective pour la formation d'une liaison ester ou amide (estérification/amidification) par acylation mais aussi la déprotection de ces liaisons par des réactions de déacylation (hydrolyse/alcoolyse).

Ces travaux de thèse traitent de la déacylation hautement énantio- sélective des esters en milieux organique, tel que l'alcoolyse et l'aminolyse de quelques briques moléculaires à haute valeur ajoutée. Pour ce faire, des études systématiques de différents paramètres ayant une influence cruciale sur les réactions biocatalysées ont été réalisées au sein de notre laboratoire,¹¹⁹ pour une meilleure compréhension du mode d'action des lipases, et plus précisément celui de la *CAL-B*.

Dans cette deuxième partie, nous présentons les résultats expérimentaux réalisés. Cela concerne la déacylation d'une série d'arylalkyl acétates par alcoolyse et par aminolyse. Il est composé de trois chapitres. Le premier est intitulé « *Alcoolyse énantiosélective d'acétates benzyliques chiraux catalysée par la CAL-B* » il développe d'une méthode pratique de déacylation par alcoolyse lipasique d'une série d'acétate benzyliques dans des solvants organiques pauvres en eau. Le deuxième chapitre intitulé « *Déacylation par aminolyse lipasique d'arylalkyl acétates* », traite de l'utilisation des amines comme nucléophiles ou additifs pour déacyler quelques acétates benzyliques. Une comparaison des cinétiques des différentes réactions de déacylation des acétates est réalisée. Le troisième chapitre de cette partie, intitulé « *Aminolyse lipasique de quelques acides carboxyliques et leurs dérivés* » est consacré à l'étude du dédoublement cinétique par aminolyse lipasique par deux approches: le DC des acides 2-arylpropioniques en utilisant des amines achirales et ensuite le DC des d'amines primaires chirales en utilisant des donneurs d'acyle achiraux. L'étude de quelques paramètres susceptibles d'intervenir sur l'efficacité catalytiques lipasiques tels que l'influence de la chiralité du donneur d'acyle acylant est abordée dans ce chapitre.

¹¹⁹(a)Réf58(a): J. C. Fiaud, R. Gil, J-Y. Legros, L. Aribi-Zouiouche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, 33, 6967-6970; (b) C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouche, J. Y. Legros, J. C. Fiaud, *J. Soc. Alger. Chim.*, **1999**, 9(2), 261-268; (c)Réf58(d) : L. Aribi-Zouiouche & J.C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088 ; (d)Réf114(e) : C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43,3025–3027.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE III

**ALCOOLYSE ENANTIOSELECTIVE D'ACETATES
BENZyliQUES CHIRAUX CATALYSEE PAR LA
*CAL-B***

III-1-Introduction:

L'utilisation des lipases en synthèse organique permet un accès important aux molécules chirales dans des conditions douces, écologiques, respectueuses de l'environnement.¹²⁰ Les dédoublements cinétiques lipasiques apparaissent comme la méthode la plus exploitée¹²¹. Cette voie d'accès permet de préparer des briques moléculaires chirales indispensables à la chimie fine, domaines des médicaments, des arômes, de l'agriculture et de l'agroalimentaire.¹²² Cette dernière décennie, des méthodes efficaces de déracémisation¹²³ via des dédoublements cinétiques biocatalysés se sont développées et constituent de nouvelles voies d'accès aux molécules énantiopures à partir d'un mélange racémique, avec des rendements chimiques quantitatifs et de hautes énantiosélectivités. Les thèmes de recherche de notre équipe sont axés sur la synthèse de molécules énantiopures par biocatalyse dans des conditions douces. Un des objectifs est de mieux comprendre le mode d'action des lipases lors des réactions de dédoublement cinétique enzymatique par l'étude de différents paramètres susceptibles d'influer directement sur la performance catalytique lipasique.¹²⁴

Les alcools benzyliques chiraux sont des intermédiaires clés pour la génération des molécules à visées thérapeutiques,¹²⁵ leur obtention énantiomériquement purs peut se faire, par

¹²⁰**Réf12:**(a)P. T. Anastas, Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, **1998**; (b)P. T. Anastas, P. T. Li, P. T. Water as a Green Solvent (John Wiley & Sons Eds). **2010**;(c)P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 301-312;(d) B. M. Trost, *Science*, **1991**, 1471-1477, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 107, 285-307).

¹²¹(a)**Réf54(c)** : G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; (b)**Réf43(a)** :W. A. M. Alloue, J. Destain, H. Ghalfi, P. Thonart, M. Aguedo, J.P. Wathelet, C. Blecker, *Base*, **2008**, 12(1), 57-68; (c)**Réf7(c)** :K.Faber, " *Biotransformations in Organic Chemistry*", 6th ed.; Springer-Verlag: BerlinHeidelberg, **2011**.

¹²²(a)**Réf60(a)**:R.N. Pavel, *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, **2003**, 6, 902-920 ; (b)**Réf60(f)**: O. Mcconnell, A. bachii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. Mcdonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658-682.

¹²³(a)**Réf62(a)** : H.Stercher, K. Faber, *Synthesis*, **Janvier 1997**, 1-16 ; (b)**Réf62(d)** : N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 401-406; (c)**Réf62(e)**:A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeza, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 569-592; (d)**Réf71**: M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, O. Riant, L. Aribi-Zouieueche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 1790-1796.

¹²⁴(a)**Réf114(g)**:M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, L. Zouieueche-Aribi, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, 17(2), 185-194 ; (b) **Réf111**:M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouieueche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry*, **2008**, 19, 2378-2384; (c)M. Merabet-khelassi, thèse de doctorat, Soutenu le 10 Mai **2009**. Université Badji Mokhtar -Annaba- « *Étude de l'effet de quelques additifs sur l'énantiosélectivité dans la réaction de dédoublement cinétique enzymatique : accès à quelques alcools ferrocéniques chiraux* » ; (d)**Réf117** : M. Merabet-Khelassi, N.Bouzemi, J.C.Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouieueche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986.

¹²⁵(a)**Réf15(c)**:R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14; (b)**Réf15(d)**:R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252, 659-701; (c) E. J. Corey, C-J. Helal, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1986-2012 ; (d)M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Sturmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824.

trans(esterification) dans des solvants organiques (acylation ou alcoolise),¹²⁶ ou par hydrolyse enzymatique en milieu aqueux ou biphasique.¹²⁷

III-2-Problématique posée:

Dans des travaux antérieurs nous avons montré l'effet de plusieurs paramètres pouvant intervenir sur la réactivité et la sélectivité de la CAL-B dans les réactions de dédoublement cinétique enzymatique.¹²⁸ L'efficacité de la réaction d'acylation enzymatique est multifactorielle, plusieurs paramètres interagissent simultanément sur la sélectivité et réactivité de la lipase: on constate par exemple que le taux catalytique mis en jeu est déterminant. Ainsi, il apparaît que la chute de sélectivité provoquée par l'augmentation de la quantité d'enzyme est due probablement à des réactions d'hydrolyse compétitives dans les systèmes non-aqueux, assurées par l'eau provenant de l'enzyme elle-même.¹²⁹

La résolution cinétique lipasique des acétates racémique englobe deux voies: (i) la transesterification dans des solvants organiques (*Schéma 51A*) ou (ii) l'hydrolyse enzymatique en milieu aqueux ou biphasique (*Schéma 51B*). La réaction d'hydrolyse enzymatique en milieu aqueux reste d'utilisation limitée, en raison principalement de la faible solubilité des substrats organiques en milieu aqueux et/ou biphasique qui entraîne de faibles sélectivités et des rendements modérés.¹³⁰ Cela explique l'utilisation modérée de cette réaction avec les acétates benzyliques secondaires et/ou primaires comparativement à la réaction de transesterification.

¹²⁶(a)Réf54(a): A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721-1754;(b)J.Pan, H. L. Yu, J. H. Xu, & G. Q. Lin, *Advances in biocatalysis: Enzymatic reactions and their applications. In Asymmetric catalysis from a Chinese perspective*, Springer Berlin Heidelberg, **2011**, 67-103 ;(c)A. S. M. Shafioul, C. S. Cheong, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2012**, 74, 199-203.

¹²⁷(a)Réf58(d) :L. Aribi-Zouieche & J.C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088; (b)Réf114(e):C. Bidjou, L. Aribi-Zouieche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 3025-3027; (c) P. P. Bora, G. Bez, J. M. H. Anal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, 72, 270-275; (d) G. Reddipalli, M. Venkataiah, N. W. Fadnavis. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 320-324; (e) S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142.; (f) T. Kumaragura, N. W. Fadnavis, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 775-779.

¹²⁸(a)Réf15(a): N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouieche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett*, **2004**, 45, 627-630;(b)Réf117: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J.C.Fiaud; O.Riant, L. Aribi-Zouieche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986;(c)Réf111:M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouieche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry*, **2008**, 19, 2378-2384; (d)Réf112:M. Merabet-Khellasi, L. Aribi-Zouieche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 1371-2377.

¹²⁹Réf117: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J.C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouieche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986.

¹³⁰ J.L.L. Rakels, A.J.J. Straathof, J.J. Heijneii; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, (1), 93-100.

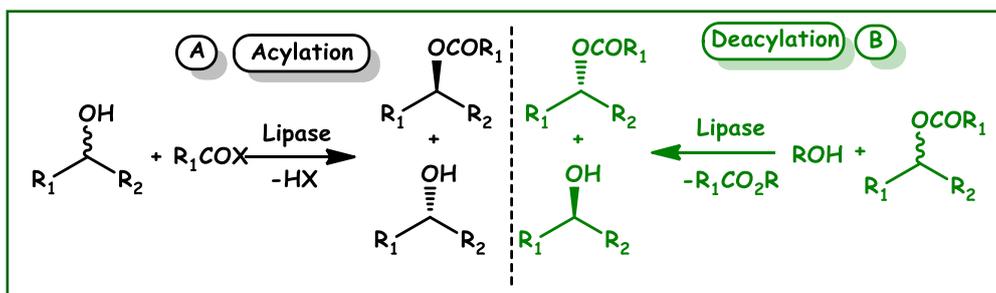


Schéma.51 : Conception d'alcools énantiomériquement enrichis.

Récemment, nous avons mis au point une méthode simple et éco-compatible de déacylation par hydrolyse avec la CAL-B en milieu non aqueux *co*-catalysée avec des sels de carbonates (**schéma 52B**). La réaction est hautement énantiosélective sur une large gamme de substrats, elle a été investie ensuite pour une déracémisation *via* une stéréoinversion par le protocole de Mitsunobu.¹³¹

Dans la continuité de nos investigations, et afin de mieux comprendre le mode de déacylation lipasique en milieux organique, pauvre en eau, nous avons envisagé l'étude de différentes possibilités de déacylation des acétates (**Schéma 52**). L'examen des paramètres pouvant intervenir sur le processus catalytique de cette réaction, tels que la nature du nucléophile, l'hydrophobicité du solvant et la concentration du milieu réactionnel est essentiel pour accéder aux briques moléculaires énantiomériquement enrichies lors de alcoolse enzymatique (**Schéma 52C**).

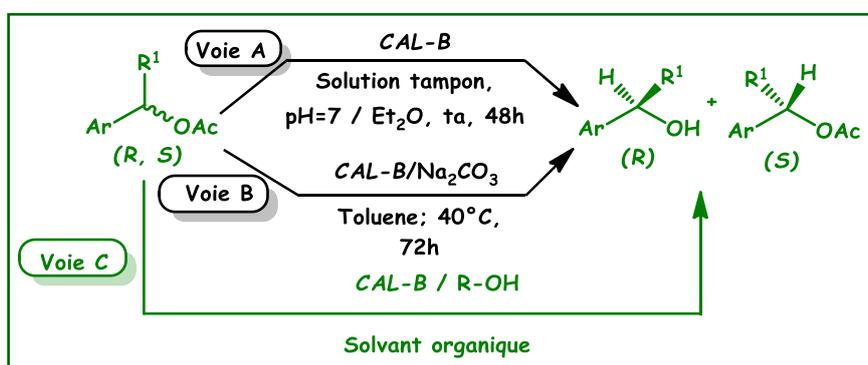


Schéma.52 : Différentes possibilités de déacylation des acétates.

¹³¹(a)**Réf113**: M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, *23*, 823-833 ; (b)**Réf68**: Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24*, 290-296.

III-3-Mise au point bibliographique:

La déacylation énantiosélective des quelques acétates benzyliques par alcoolse est peu étudiée dans la littérature.¹³²Nous citerons ici quelques exemples :

✂ Dans le but de trouver le meilleur système catalytique lipasique, Zhang et *al.* ont dédoublé l'acétate du α -cyano-benzyle par alcoolse énantiosélective en présence de plusieurs lipases à 40°C avec le méthanol comme nucléophile, dans le tétrahydrofurane¹³³ (Schéma 53).

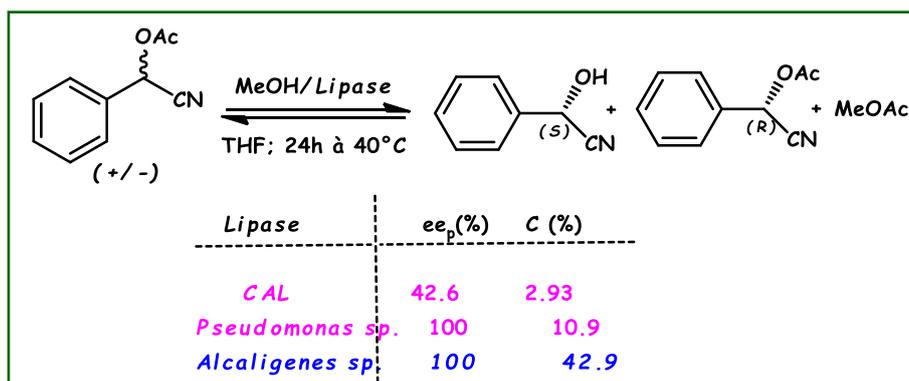


Schéma.53 : Alcoolse énantiosélective de l'acétate du α -cyano-benzyle par DCE.

Le meilleur résultat a été obtenu, en utilisant la lipase d'*Alcaligenes* sp. comme biocatalyseur. La CAL s'est montrée totalement incompatible pour cette réaction.

✂ L'équipe de Poppe a étudié l'évolution de la réaction d'alcoolse enzymatique d'une série de 1-hétéroaryléthanol par le bais d'alcools primaires¹³⁴. Il a montré un effet significatif de l'allongement de la chaîne alkyle du nucléophile sur la sélectivité et la réactivité de la CAL-B (Schéma 54).

¹³²(a) A. Baldessari, L.E. Iglesias, *Methods in molecular biology*, **2012**, 861, 457-69; (b) J. Zhang, J. Wu, L. Yang, *J. Mol. Catal. B: Enz*, **2004**, 31, 67-72; (c) Réf104: M. Tosa, S. Pilbak, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szakacs, L. Novak, F. D. Irimie, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1844-1852; (d) M. Kawasaki, K. Nakamura, S. Kawabata, *J. Mol. Catal. B: Enz*, **1999**, 6, 447-451; (e) R. Zhou, J-H. Xu, *Biochemical Engineering Journal*, **2005**, 23, 11-15; (f) K. Kato, Y. Gong, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, *Biotechnology Letters*, **2002**, 24, 1623-1630; (g) Frank Schieweck and Hans-Josef Altenbach, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 403-406; (h) L. C. Bencze, C. Paizs, M. I. Tos, M. Trif, F. Dan Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 1999-2004; (i) J. Brem, S. Pilbak, C. Paizs, G. Banoczi, F. Dan Irimie, M-I. Tos, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 916-923; (j) F. Faigl, E. Kovacs, D. Balogh, T. Holczbauer, M. Czugler, B. Simandi, *Central European Journal of Chemistry*, **2014**, 12(1), 25-32.

¹³³Réf132(b) : J. Zhang, J. Wu, L. Yang, *J. Mol. Catal. B: Enz*, **2004**, 31, 67-72.

¹³⁴Réf104 : M. Tosa, S. Pilbak, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szakacs, L. Novak, F-D. Irimie, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1844-1852.

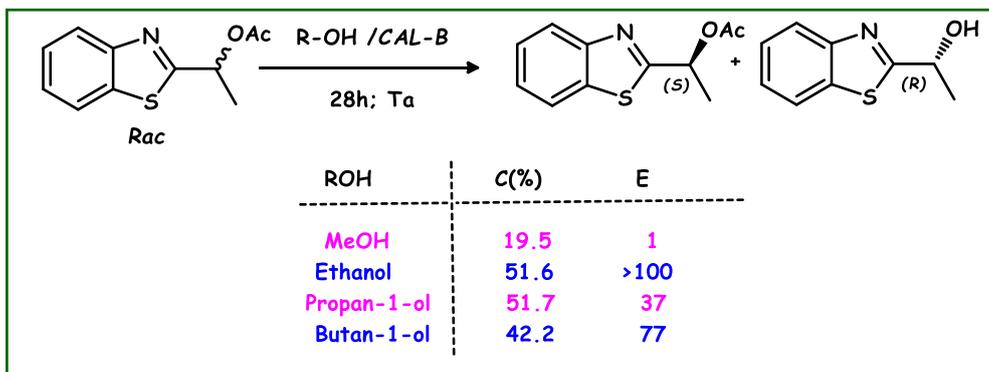


Schéma.54 : DCE du 1-hétéroaryléthanol via alcoololyse enzymatique.

Les résultats obtenus montrent un effet important de la longueur de la chaîne carbonée du nucléophile. En remplaçant le méthanol par l'éthanol, une nette amélioration de la conversion et de la sélectivité est notée. La conversion passe de C=19.5% à 51% avec l'éthanol et le propanol, puis chute légèrement avec le butanol. Le meilleur résultat en termes de réactivité et de sélectivité est obtenu avec l'éthanol.

✂ Finalement, La déacylation par alcoololyse enzymatique des acétates de phényle ortho-substitués avec le 1-butanol a été amplement étudiée par l'équipe de Kawabata ¹³⁵, et ce, en étudiant l'effet de la nature du biocatalyseur, la nature du substrat, et celle du solvant organique (**Schéma 55**).

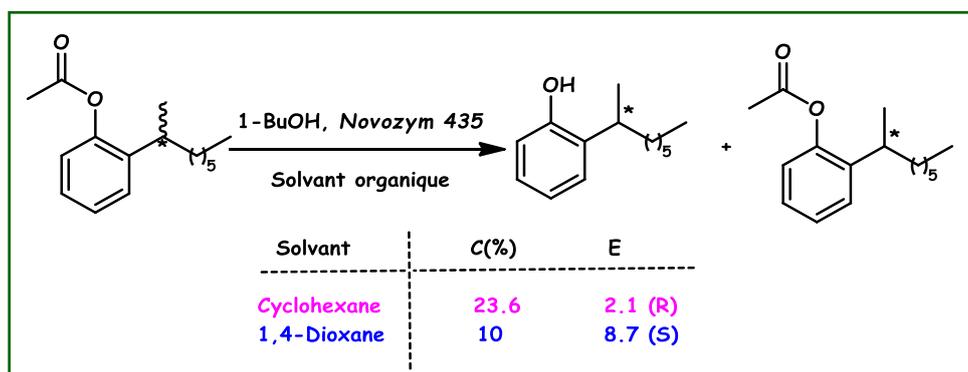


Schéma.55 : DCE de l'acétate de phényle ortho-substitué par alcoololyse enzymatique.

Un phénomène de stéréoinversion liée à l'hydrophobicité du solvant organique mis en jeu dans la réaction d'alcoololyse enzymatique a été noté. En utilisant le 1,4-dioxane au lieu du cyclohexane l'énantio-préférence de la *Novozym 435* passe de l'énantiomère (R)-déacylé vers le (S)-déacylé.

¹³⁵Réf132(d) :M. Kawasaki, K. Nakamura, S. Kawabata, *J. Mol. Cata B: Enz*, **1999**, 6,447-451.

D'après la mise au point bibliographique, nous notons que la réaction de déacylation par alcoolse lipasique des acétates benzyliques secondaires est modestement reportée. Dans ce chapitre nous présentons nos investigations concernant cette réaction.

III-4-Choix des modèles de l'étude:

III-4-1-Choix des substrats :

Pour réaliser cette étude, nous avons choisis une série d'acétates de type arylalkyl éthyle, issus de l'acylation des arylalkyl carbinols, alcools secondaires benzyliques a chiralité centrale (*Schéma 56*) qui sont des molécules intéressantes en raison de leur activité biologique.¹³⁶ Ce sont des précurseurs de molécules a visée thérapeutique,¹³⁷ ils servent également comme modèles dans les réactions catalysées par le palladium¹³⁸.

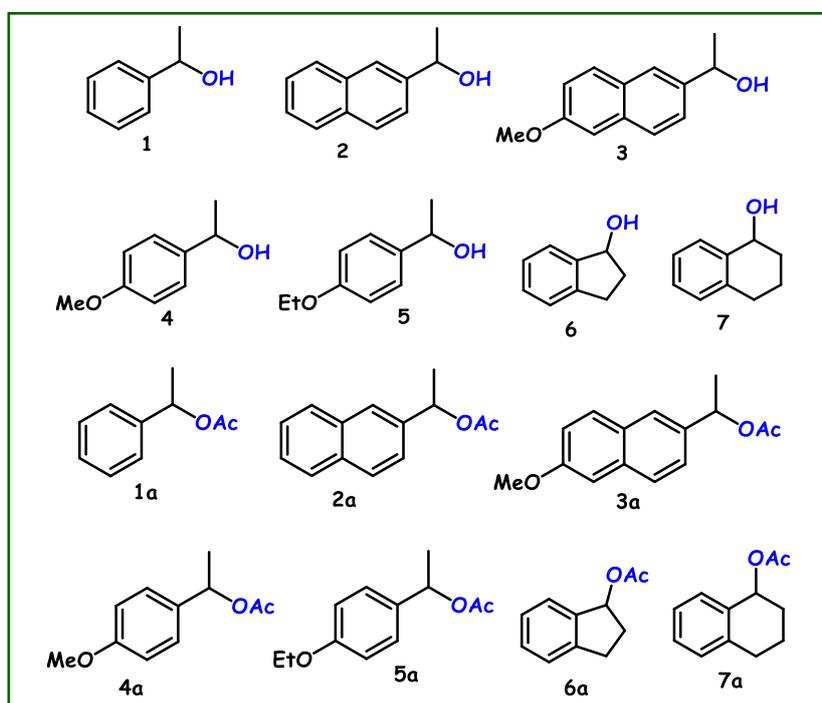


Schéma.56 :Substrats choisis.

Les alcools benzyliques secondaires choisis sont le 1-phényléthanol **1**, le 1-(naphthalen-2-yl)éthanol**2**, le 1-(6-méthoxynaphthalen-2-yl) éthanol**3**, le [1-(4-méthoxyphényl) éthanol **4**,le1-

¹³⁶T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe, tetrahedron letters, **1994**, 35, 7997-8000

¹³⁷S.-C. Stinson, Chemical and engineering News, **1992**, 46.

¹³⁸(a) X. Lin, X. Dai, Z. Mao, Y. Wang, Tetrahedron: Asymmetry, **2009**, 65,1763-1766; (b)M. Assie, J.-Y. Legros, J. C. Fiaud, Tetrahedron: Asymmetry, **2005**, 16, 1183-1187; (c) J.-Y. Legros, M. Toffano, J. C. Fiaud, Tetrahedron, **1995**, 51, 3235-3246.

(4-éthoxyphényl) éthanol **5**, le 2,3-dihydro-1H-indol-1-ol (Indanol) **6** et le 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-ol (l' α -tetralol) **7**. Les alcools **1**, **2** et **6** sont commerciaux. L'obtention des alcools racémiques **3**, **4**, **5** et **7** se fait par réduction des cétones commerciales correspondantes et ce par le biais de l'hydrure de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) dans l'éther anhydre. Cet agent réducteur génère *in situ* un complexe hydrure qui réagit sur le carbonyle de la cétone pour la convertir en l'alcool correspondant selon le (Schéma 57).

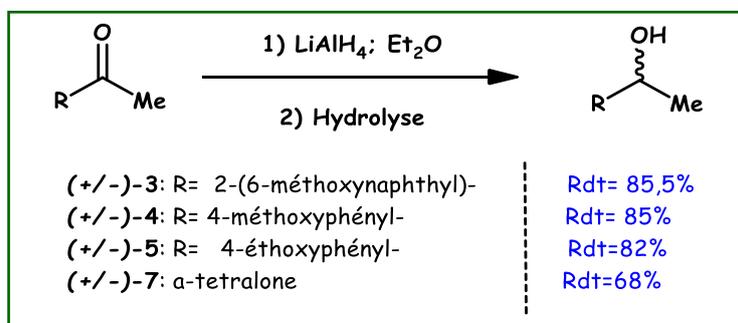


Schéma.57: Réduction des cétones benzyliques en alcools correspondants.

Les alcools benzyliques secondaires racémiques sont produits avec des rendements chimiques convenables. Les acétates racémiques sont obtenus par une acylation chimique des alcools racémiques correspondants qui a lieu en présence d'une quantité catalytique de 4-diméthylamino-pyridine (DMAP) dans l'éther anhydre avec de la triéthylamine (Et_3N) et d'anhydride acétique selon le Schéma 58 :

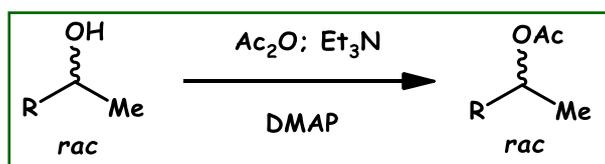


Schéma.58 : Acylation chimique des alcools secondaires.

L'essentiel des résultats obtenus est réuni dans le **Tableau 3**.

Tableau.3 : Rendements chimiques des acétates synthétisés.

Acétate racémique	Rendement (%)	Acétate racémique	Rendement (%)
1a	95	5a	75
2a	93	6a	90
3a	75	7a	80
4a	82	/	/

Les acétates racémiques sont obtenus avec de bons rendements chimiques. Les caractéristiques structurales des alcools et des acétates synthésés sont établies par les méthodes spectroscopiques suivantes : infrarouge (IR) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) et du carbone 13 (RMN ^{13}C).

III-4-2-Choix des nucléophiles :

Nous avons sélectionné une série d'alcools primaires, secondaires et tertiaire comme nucléophiles (*schéma 59*) dans le but d'examiner l'effet de l'encombrement stérique.

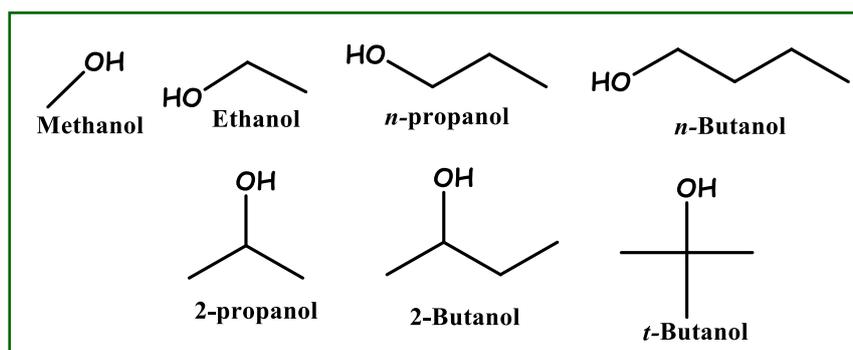


Schéma.59 : Nucléophiles choisis.

III-4-3-Choix de l'enzyme :

La lipase sélectionnée est la *Lipase de Candida Antarctica* immobilisée sur résine acrylique, fraction **B**(SP435, appelée encore, *Novozym*, ou *CAL-B*), ayant une activité >10000 Unité/g. Elle contient 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 33 kDa (*Figure 16*). Le site actif de cette enzyme est constitué de la triade catalytique suivante : la sérine 105, agissant comme nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique ; l'histidine 224 et l'acide aspartique 187 qui stabilise ce dernier.

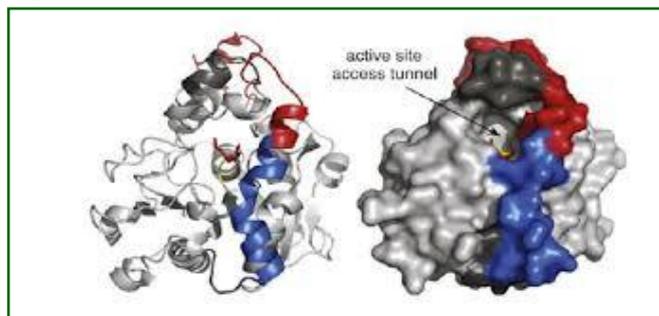


Figure 16 : Structure tridimensionnelle de la CAL-B¹³⁹.

¹³⁹ <http://www.rcsb.org/pdb/>

La **CAL-B** est thermostable en milieu organique et peut être utilisée à 60-80 °C pour de longues durées sans perte d'activité.¹⁴⁰ La lipase utilisée est une espèce de levure du genre *Candida*. Elle est connue par son efficacité et sa sélectivité élevée tel qu'elle est utilisée dans une large gamme d'applications en remplacement des procédés de synthèse industriels comme les résolutions cinétiques, aminolyse, estérification, transestérification.¹⁴¹ Elle est considérée comme source de lipases industriellement importantes.

Dans les applications enzymatiques, l'immobilisation d'enzymes joue un rôle très important dans la stabilisation du catalyseur et permettant sa réutilisation dans des réactions successives. Le matériau d'immobilisation et la méthode utilisée pour l'immobilisation affecte considérablement la performance d'un catalyseur.¹⁴² Ainsi, le choix de la lipase est basé sur d'innombrables avantages de cette enzyme, par le fait qu'elle est immobilisée, elle réutilisable, et douée d'une stabilité structurale augmentée.¹⁴³ De ce fait, les réactions sont réalisables à des températures plus élevées que dans le cas de l'enzyme libre en solution.¹⁴⁴

III-5-Etude de l'alcoololyse lipasique des acétates benzyliques choisis:

Nous avons examiné divers paramètres tels que: la nature du nucléophile, celle du solvant organique et l'influence de l'activité de l'eau sur le déroulement du processus catalytique lipasique de la réaction de dédoublement cinétique *via* une alcoololyse énantiosélective.

III-5-1- Influence de la nature du nucléophile en fonction de l'hydrophobicité du solvant:

Deux paramètres essentiels peuvent intervenir directement sur le processus catalytique enzymatique d'un dédoublement cinétique : la nature du nucléophile et celle du solvant organique, nous les avons étudiés dans la réaction d'alcoololyse du phényléthyl acétate **1a**. Nous avons choisis sept alcools de différentes structures, primaires, secondaires et tertiaires (linéaires et substitués): Méthanol, Ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol, 2-propanol, 2-butanol, *t*-butanol utilisés avec deux solvants organiques d'hydrophobicité différente : le di-*isopropyl* éther et le toluène.

¹⁴⁰N. Zhang, W. C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, *Protein Engineering*, **2003**, 16, 599-605.

E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal Biotransformation*, **1998**, 16(3), 181-204.

¹⁴² M. Pääviö, P. Perkiö, L.T. Kenerva, *Tetrahedron Asymmetry*, **2012**, 23, 230-236.

¹⁴³ A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnology Advances*, **2012**, 30, 550-563.

¹⁴⁴ G.J. Lye, O.P. Pavlou, M. Rosjidi, D.C. Stuckey, *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, 51(1), 69-78.

L'alcoolise du phényléthyl acétate racémique **1a** est effectuée par 2 équivalents d'alcools de différentes structures (primaire, secondaire et tertiaire) en présence d'une quantité catalytique de 12 mg de CAL-B dans 2 ml de solvant organique. La réaction est menée sous agitation magnétique thermostatée à 40°C durant 24 heures (*Schéma 60*). L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince.

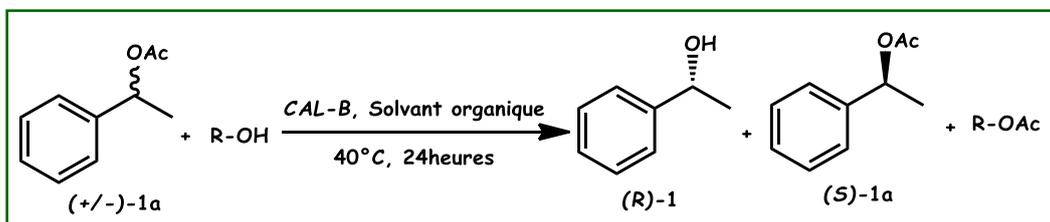


Schéma.60 : Alcoolise enzymatique du phényléthyl acétate par différents alcools.

Les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. L'avancement et les rendements des alcools obtenus sont évalués par GC. Les excès énantiomériques des acétates résiduels et les alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les résultats obtenus sont réunis dans le **Tableau 4** ci-après.

Les résultats du **Tableau 4**, montrent une haute sélectivité de la CAL-B lors de la déacylation du **1a** avec un facteur de sélectivité $E > 500$ en faveur de l'énantiomère (R)-alcool, quelque soit les nucléophiles testés, et ce, dans les deux solvants utilisés. Par contre, la réactivité lipasique est modulée selon la nature et de la longueur de la chaîne carbonée du nucléophile mis en jeu que ce soit dans le DIPE ou le toluène, la conversion varie entre 15% < C < 44%. On constate un taux d'avancement maximal de la déacylation à C = 44%, qui est probablement due à une concurrence entre les deux nucléophiles présents dans le milieu réactionnel que sont l'alcool, nucléophile introduit lors de l'alcoolise enzymatique (entrées 1 et 9) et l'eau de l'enzyme.

Tableau 4 : Alcoololyse enzymatique du 1-Phényléthyl acétate avec différents nucléophiles.

Entrée	R-OH ^(a)	Solvant (logP)	ee _(S) (%) ^(b)	ee _(P) (%) ^(b)	C(%) ^(c)	E ^(c)
1	Sans	DIPE (1.9)	17.2	99.9	15	>500
2	MeOH		28.4	99.9	22	>500
3	EtOH		45.2	99.9	31	>500
4	n-PrOH		69.2	99.9	41	>500
5	n-BuOH		18.1	99.9	15	>500
6	2-PrOH		72.2	99.9	42	>500
7	2-BuOH		77	99.9	43.5	>500
8	t-BuOH		47.6	99.9	32	>500
9	Sans	PhMe (2.5)	12.6	99.9	11.2	>500
10	MeOH		25.3	99.4	20	400
11	EtOH		45.8	96.9	32	99
12	n-PrOH		65.4	99.9	39.6	>500
13	n-BuOH		66.7	99.9	40	>500
14	2-PrOH		62.7	99.9	38.5	>500
15	2-BuOH		74.2	99.9	42.6	>500
16	t-BuOH		49.8	99.9	33	>500

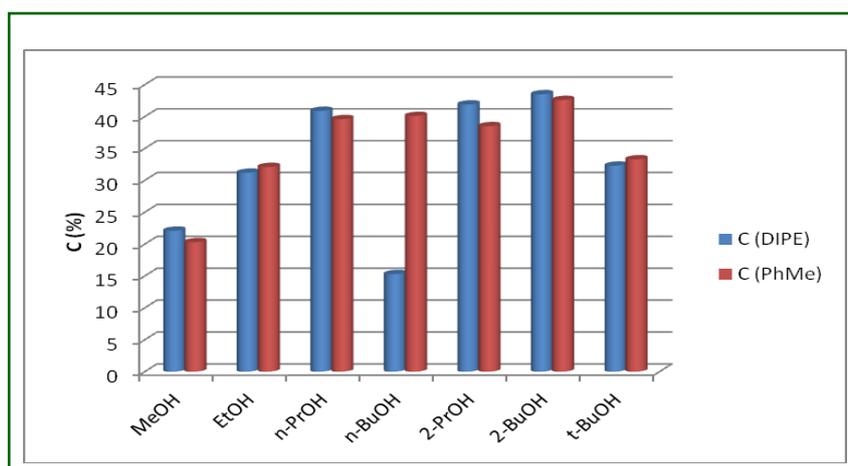
(a): réaction sur 1 éq d'acétate racémique, 2 éq de ROH, 12 mg de CAL-B, dans 2 mL de solvant organique à 40°C. (b) : excès énantiomériques des alcools obtenus et des acétates résiduels sont mesurés par GC chirale. (c) La conversion et la sélectivité conversion: $C = ee_S / ee_P + ee_S$; $E = \ln[(1-C)(1-ee_S)] / \ln[(1-C)(1+ee_S)]$.

Avec les alcools primaires dans le diisopropyléther, solvant aliphatique à caractère peu hydrophobe, nous observons que l'allongement de la chaîne carbonée du radical alkyle du nucléophile joue en faveur de la réactivité lipasique, la conversion passe de C=22% avec le méthanol, à C= 41% avec le n-propanol (entrées 1-3), puis rechute à C=15% en présence du n-butanol (entrée 4). Le meilleur résultat, en termes de conversion, est obtenu avec le 2-butanol dans le DIPE, la conversion est de 43.5%, l'énantiomère (*R*)-alcool est obtenu avec ee_p>99% (entrée 6). On constate que la réactivité s'améliore avec les alcools secondaires (entrées 5 et 6), cela est peut être attribué à l'encombrement de la fonction hydroxyle et à la difficulté de rapprochement du nucléophile du site actif lipasique.

En présence de toluène, solvant aromatique à caractère hydrophobe, on constate que le pouvoir de déacylation de l'acétate par le biais de la CAL-B dépend directement et sans aucune exception, du radical alkyle du nucléophile. Plus la chaîne alkyle est longue et linéaire, plus la lipase est réactive (entrées 8-11). Des observations similaires à ceux obtenus

avec le DIPE, sont enregistrées lors de l'alcoolse de **1a** par des alcools secondaires et tertiaire (entrées 13 et 14 *versus* 6 et 7). Idem que dans le cas où le solvant est le DIPE, le meilleur résultat, dans le toluène, est obtenu avec le 2-butanol avec une conversion de 42.6% en faveur du (*R*)-alcool (entrée 13).

Avec les deux solvants utilisés, nous avons obtenu le même avancement pour l'alcool tertiaire : *t*-BuOH (entrées 7 et 14). Ce résultat est très intéressant, sachant que ce nucléophile est souvent utilisé comme solvant inerte en catalyse enzymatique¹⁴⁵ ou comme co-solvant dans des réactions d'hydrolyse en milieu bi-phasique avec le 1-phényléthyl acétate **1a**,¹⁴⁶ cela implique que cet alcool peut induire une réaction secondaire en catalyse enzymatique. L'histogramme 1 illustre les résultats du Tableau 4.



Histogramme 1 : Alcoolse enzymatique de l'acétate **1a** avec différents nucléophiles.

III-5-2- Influence de l'addition du tamis moléculaire lors de l'alcoolse du **1a** :

Dans le but d'examiner l'effet de la quantité minimale de l'eau présente dans le milieu réactionnel, qui peut être due au solvant, les produits réactionnels ou l'enzyme elle-même, nous avons décidé d'éliminer ces traces d'eaux par l'addition d'une quantité du tamis moléculaire 4Å. Pour ce faire, l'alcoolse du phényléthyl acétate racémique **1a** est effectuée par 2 équivalents d'alcools de différentes structures, primaires, secondaires et tertiaire, en présence d'une quantité catalytique de 12 mg de CAL-B, 60 mg de tamis moléculaire 4Å dans 2 mL de solvant organique. La réaction est menée sous agitation magnétique thermostatée à

¹⁴⁵(a) M.C.R. Franssen, E.L.V. Goetheer, H. Jongejan, A. de Groot, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 8345-8348 ; (b) H. Kitaguchi, P.A. Fitzpatrick, J.E Huber, A.M Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3094-3095; (c) M. Woudenberg-van Oosterom, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*: 328-333.

¹⁴⁶Y. Fan, Z. Xie, H. Zhang, J. Qian, *Kinetic and Catalysis* **2011**, *52*(5), 686-690.

40°C durant 24 heures (**Schéma 61**). L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince.

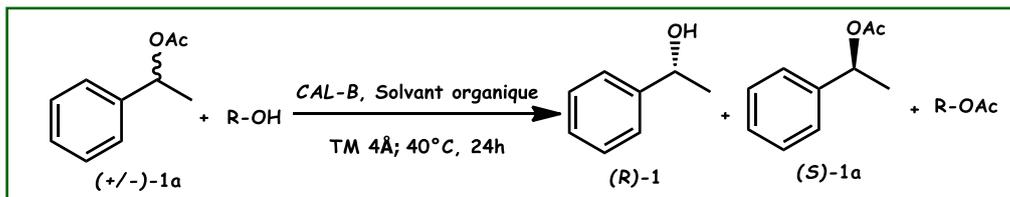


Schéma.61 : Alcoolise enzymatique de **1a** en présence de Tamis moléculaire.

Les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. L'avancement et les rendements des alcools obtenus sont évalués par GC. Les excès énantiomériques des acétates résiduels et les alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 5** :

Tableau 5 : Alcoolise enzymatique du 1-Phényléthyl acétate avec différents nucléophiles en présence de tamis moléculaire.

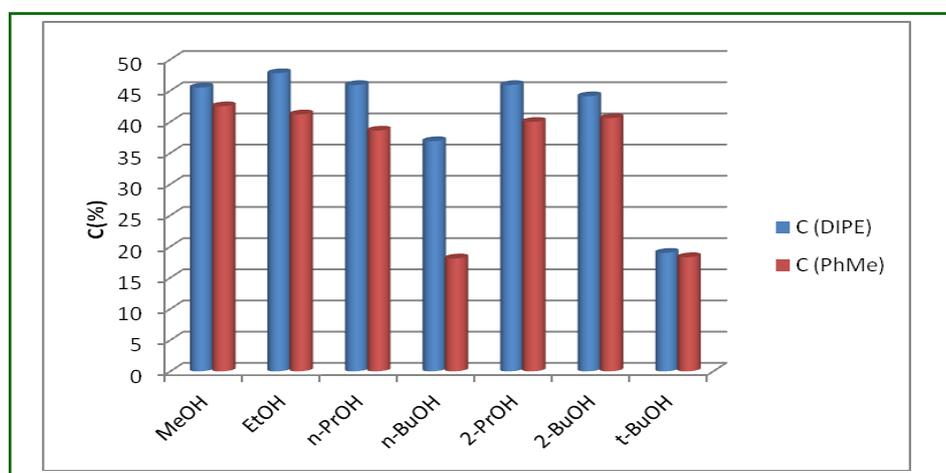
Entrée	R-OH ^(a)	Solvant (logP)	ee _(S) (%) ^(b)	ee _(P) (%) ^(b)	C(%) ^(c)	E ^(c)
1	Sans	DIPE (1.9)	14.6	99.9	12.7	>500
2	MeOH		83.4	99.9	45.5	>500
3	EtOH		91.6	99.9	48	>500
4	n-PrOH		84.8	99.9	46	>500
5	n-BuOH		58.5	99.9	37	>500
6	2-PrOH		84.8	99.9	46	>500
7	2-BuOH		78.7	99.9	44	>500
8	t-BuOH		23.5	99.9	19	>500
9	Sans	PhMe (2.5)	11.4	99.9	10.2	>500
10	MeOH		73.8	99.9	42.5	>500
11	EtOH		70	99.9	41	>500
12	n-PrOH		62.9	99.9	38.6	>500
13	n-BuOH		22	99.9	18	>500
14	2-PrOH		66.7	99.9	40	>500
15	2-BuOH		68.2	99.9	40.6	>500
16	t-BuOH		22.4	99.9	18.3	>500

(a) : réaction sur 1 éq d'acétate racémique, 2 éq de NuOH, 12 mg de CAL-B, 60 mg de MS 4Å, dans 2 mL de solvant organique à 40°C. (b) : excès énantiomériques des alcools obtenus et des acétates résiduels sont mesurés par GC chirale. (c) La conversion et la sélectivité conversion¹²⁻¹³ : C = ee_S/ee_P+ee_S ; E = Ln[(1-C)(1-ee_(S))] / Ln[(1-C)(1+ee_(S))] .

En balayant les résultats du Tableau 5, nous constatons une nette amélioration de la réactivité de la CAL-B lors de l'alcoololyse de l'acétate **1a**, dans les deux solvants utilisés, et ce, sans aucune perturbation de l'énantiosélectivité lipasique ($E > 500$). La réactivité de la CAL-B est modulée en fonction de la nature du nucléophile et l'hydrophobicité du solvant mis en jeu lors de la déacylation de l'acétate **1a** ($18\% < C < 48\%$). L'addition de tamis moléculaire permet une amélioration notable de la réactivité de la CAL-B lors de l'hydrolyse de **1a**, dans les deux solvants et quelque soit le nucléophile mis en jeu, à l'exception du *t*-BuOH, où l'addition du tamis moléculaire cause une chute notable de la réactivité lipasique. L'addition de tamis moléculaire amenuise la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel, provenant soit du solvant, des réactifs ou même de l'enzyme immobilisée, cela limite réduit la compétition entre les deux nucléophiles présents dans le milieu, l'alcool et l'eau en quantité restreinte. La meilleure conversion est achevée, en utilisant l'éthanol comme nucléophile dans le DIPE.

Avec les accepteurs d'acyle primaires, la réactivité de la CAL-B dépend directement de l'allongement du radical alkyl de l'alcool, précisément à partir de 3 carbones, ce qui n'est pas le cas dans des travaux décrits antérieurement. Cet effet est plus prononcé dans le toluène (entrées 2-5 *versus* 10-13) avec l'alcool tertiaire, une diminution notable de la conversion est enregistrée $C = 19\%$ (entrées 8 et 16). Il est à noter que les meilleurs résultats sont obtenus avec les accepteurs d'acyle secondaires (entrées 6, 14 *versus* 7, 15). Ces résultats montrent une dépendance importante « accepteur d'acyle/hydrophobicité du solvant ».

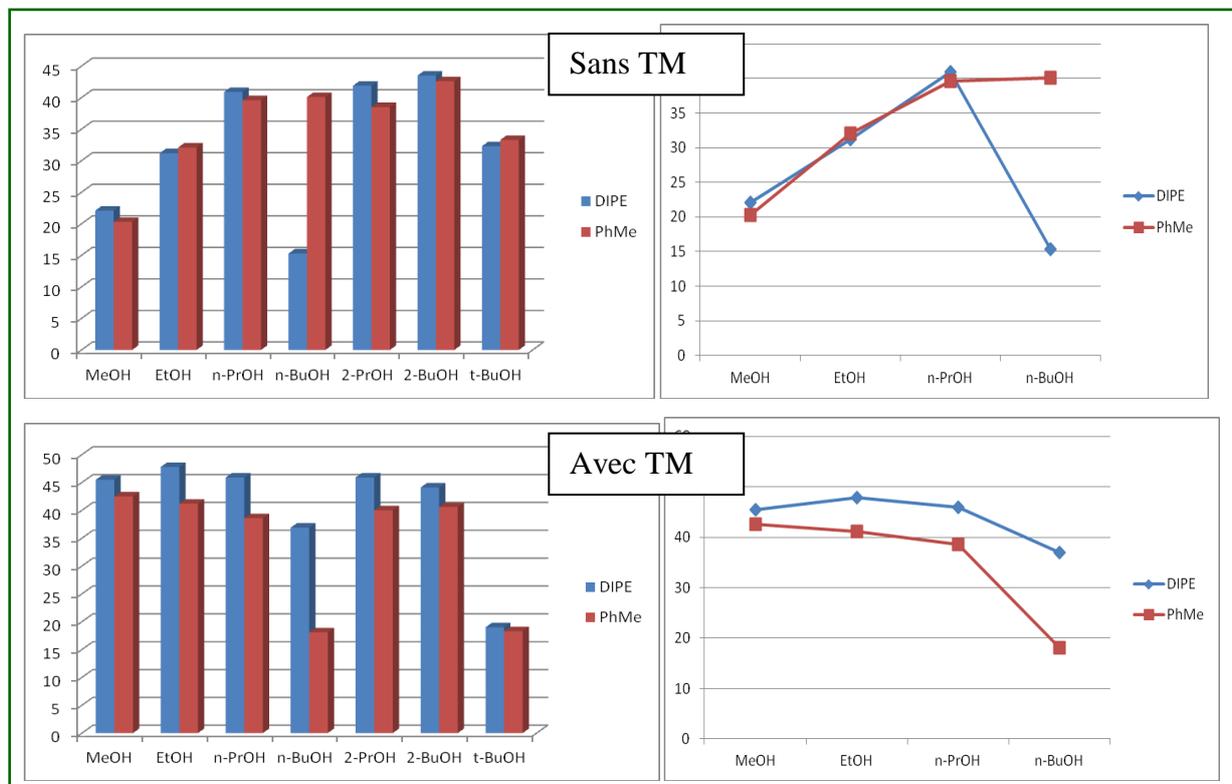
L'histogramme 2 illustre les résultats du tableau 5.



Histogramme 2 : Alcoololyse enzymatique de l'acétate **1a** avec différents nucléophiles en présence du TM 4Å.

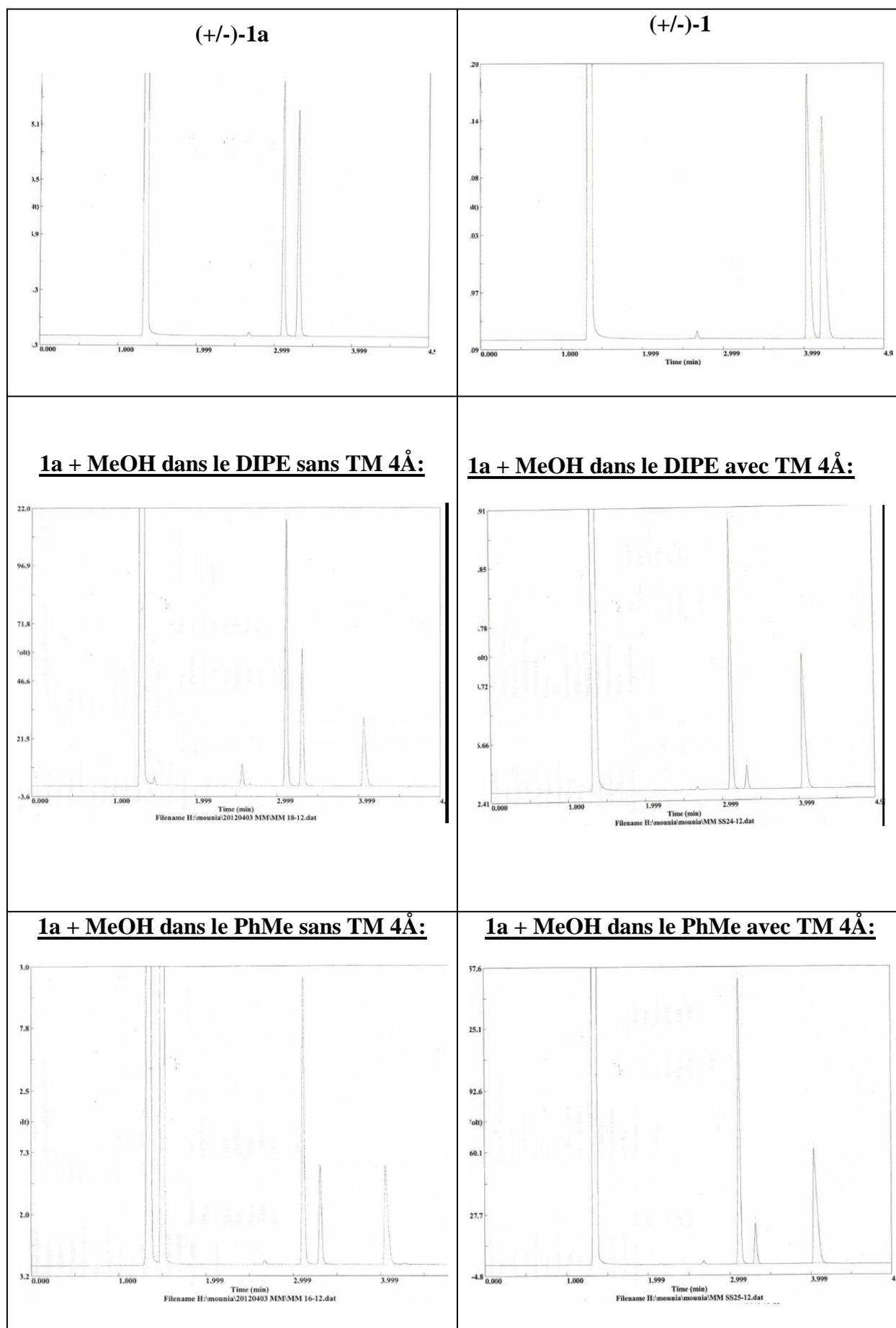
● **Discussion récapitulative:**

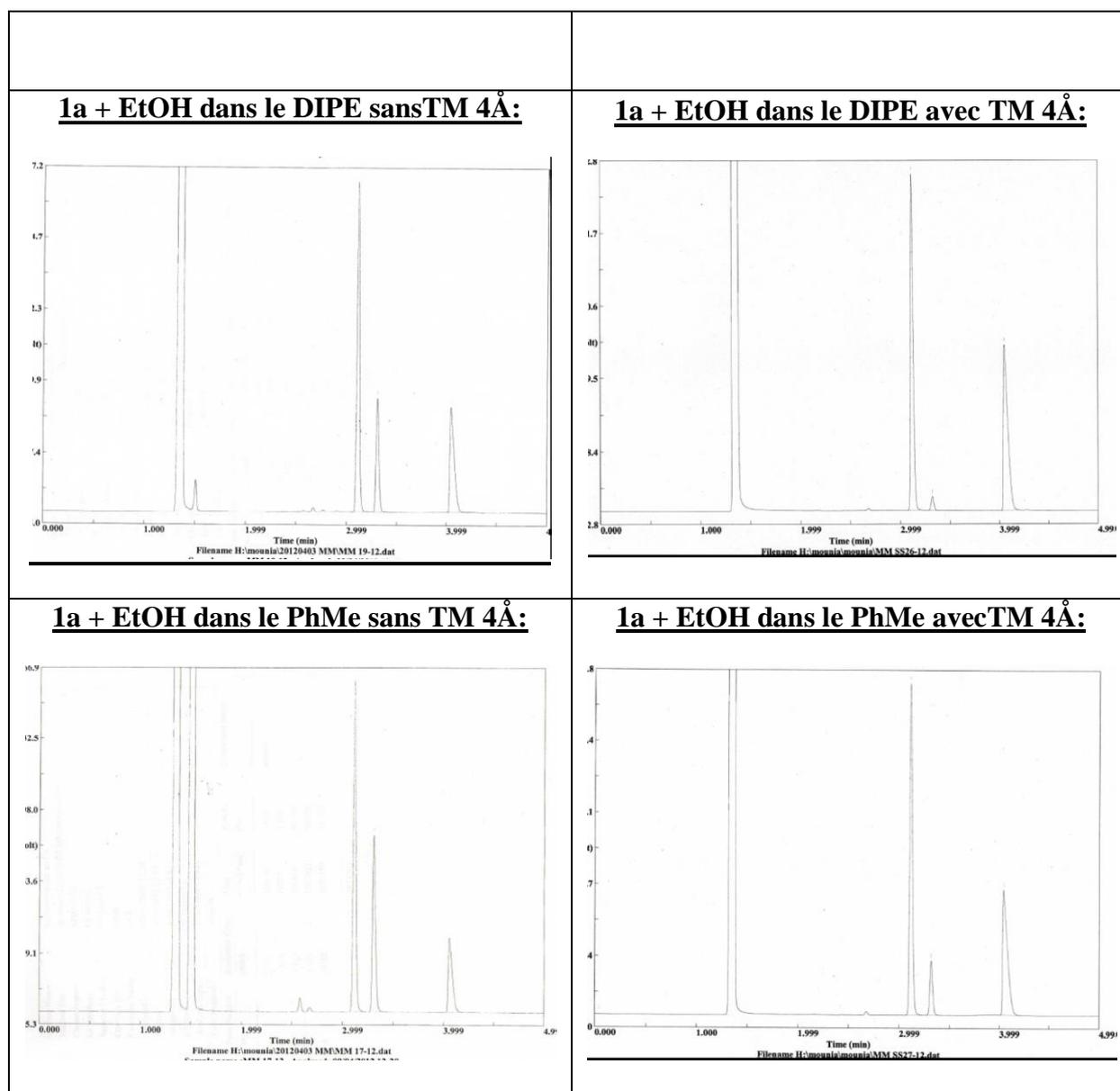
En comparant les résultats des tableaux 4 et 5, nous remarquons que l'addition du tamis moléculaire provoque une amélioration notable de la réactivité de la CAL-B lors de l'hydrolyse de **1a**, dans les deux solvants et ce quelque soit le nucléophile mis en jeu, à l'exception du *t*-BuOH, où l'addition du tamis moléculaire cause une chute notable de la réactivité lipasique (Histogrammes 3 et 4).



Histogramme 3 : Comparaison de l'alcoololyse de **1a** sans et avec tamis moléculaire.

Cela est peut-être dû au fait que l'addition du tamis moléculaire minimise la quantité d'eau minimale présente dans le milieu réactionnel, provenant soit du solvant, des réactifs ou même de l'enzyme immobilisée, ce qui rends la compétition entre les deux nucléophiles alcools et eau plus restreinte. Cet effet explique l'optimisation de réactivité lipasique. Les chromatogrammes suivants montrent les résultats les plus significatifs des Tableaux 4 et 5





Série de chromatogrammes 1: Chromatogrammes de quelques résultats importants des tableaux 4 et 5.

III-5-3- Effet de la nature du nucléophile lors de l'alcoolse des acétates[2a-3a]:

Vu l'impact important du tamis molaire sur la performance catalytique de la CAL-B lors de l'alcoolse de l'acétate **1a**, nous avons appliqué les mêmes conditions opératoires sur deux autres acétates présentant des contraintes structurales différentes¹⁴⁷[**2a-3a**], et qui sont

¹⁴⁷(a) Réf15(c) : R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14; (b) R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252, 659-701.

analogue du naproxène, anti-inflammatoire non-stéroïdien puissant¹⁴⁸ et cela, afin de généraliser la méthode.

L'alcoolise enzymatique est réalisée sur 1 milli mole d'acétate racémique avec 2 équivalents des divers alcools primaires, secondaires et tertiaire en présence d'une quantité catalytique de 12mgde CAL-B, de 60 mg de tamis moléculaire 4Å dans 2 ml de solvant organique. Les réactions sont menées sous agitation magnétique à 40°C durant 24 heures (*Schéma 62*). L'évolution des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince. Les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. L'avancement des réactions et les excès énantiomériques des acétates résiduels et des alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les résultats enregistrés sont réunis dans le **Tableau 6**.

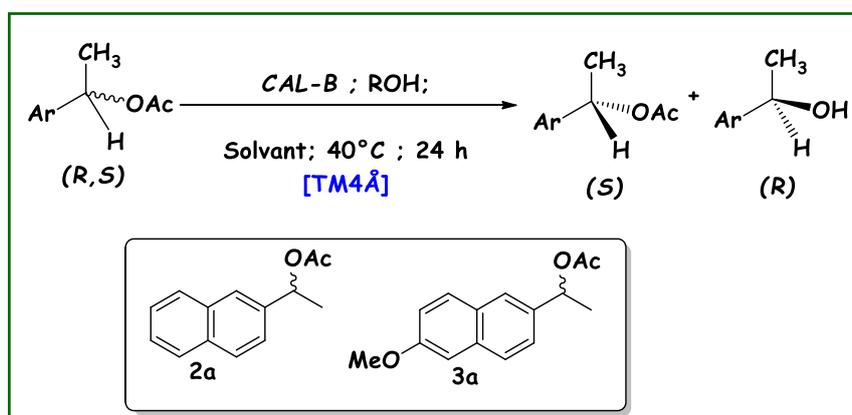


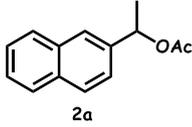
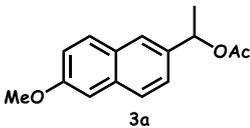
Schéma.62 : Alcoolise lipasique des acétates [2a-3a]

Les résultats obtenus lors de l'alcoolise de ces deux structures vont dans le même sens que ceux obtenus avec le phényléthyl acétate **1a**. La CAL-B se montre hautement énantiosélective ($E > 500$), et ce quelque soit le nucléophile utilisé dans les deux solvants.

La CAL-B montre le même comportement vis-à-vis les deux acétates [2a-3a], dans un milieu hydrophobe, le toluène. Par contre, dans le DIPE, la nature du nucléophile module significativement la réactivité lipasique.

¹⁴⁸Q-M. Gu, C-S. Chen, C. J. Sih, *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 1763-1766.

Tableau 6 : Alcoolse lipasique des acétates [2a-3a] avec différents nucléophiles en présence du tamis moléculaire:

Entrée	Substrat ^(a)	R-OH	Solvant (logP)	ee _(S) (%) ^(b)	ee _(P) (%) ^(b)	C ^(c)	E ^(c)
1	 2a	MeOH	DIPE (1.9)	42	99.9	29.6	>500
2		EtOH		50.9	99.9	33.7	>500
3		n-PrOH		38.8	99.9	28	>500
4		n-BuOH		24.1	99.9	19.4	>500
5		2-PrOH		42.2	99.9	29.7	>500
6		2-BuOH		79.7	99.9	44.4	>500
7		t-BuOH		45.6	99.9	31.3	>500
8		MeOH	PhMe (2.5)	65.9	99.9	40	>500
9		EtOH		31.5	99.9	24	>500
10		n-PrOH		19.8	99.9	16.5	>500
11		n-BuOH		25.9	99.9	20.6	>500
12		2-PrOH		37	99.9	27	>500
13		2-BuOH		62.4	99.9	38.5	>500
14		t-BuOH		18.4	99.9	15.5	>500
15	 3a	MeOH	DIPE (1.9)	-	-	NR ^(e)	-
16		EtOH		17.1	99.9	14.6	>500
17		n-PrOH		20.8	99.9	17.2	>500
18		n-BuOH		25.8	99.9	20.5	>500
19		2-PrOH		63.6	99.9	39	>500
20		2-BuOH		83.4	99.9	45.5	>500
21		t-BuOH		49.8	99.9	33.3	>500
22		MeOH	PhMe (2.5)	81.8	99.9	45	>500
23		EtOH		55	99.9	35.5	>500
24		n-PrOH		13	99.9	11.5	>500
25		n-BuOH		25.2	99.9	20	>500
26		2-PrOH		69.9	99.9	40.4	>500
27		2-BuOH		56.7	99.9	36	>500
28		t-BuOH		49.1	99.9	33	>500

(a) : réaction sur 1 éq d'acétate racémique, 2 éq de NuOH, 12 mg de CAL-B, 60 mg de MS 4Å, dans 2 mL de solvant organique à 40°C. (b) : excès énantiomériques des alcools obtenus et des acétates résiduels sont mesurés par GC chirale. (c) La conversion et la sélectivité conversion¹²⁻¹³ : C=ee_S/ee_P+ee_S; E = Ln[(1-C)(1-ee_S)] / Ln[(1-C)(1+ee_S)] .

✂ Dans le DIPE, pour l'acétate 2a, avec les alcools primaires, la meilleure conversion est enregistrée avec l'éthanol (C=33.7%), tandis qu'avec l'acétate 3a, l'avancement ne dépasse pas le seuil de 20%, en utilisant le n-butanol (entrée 2 vs. entrée 18). En

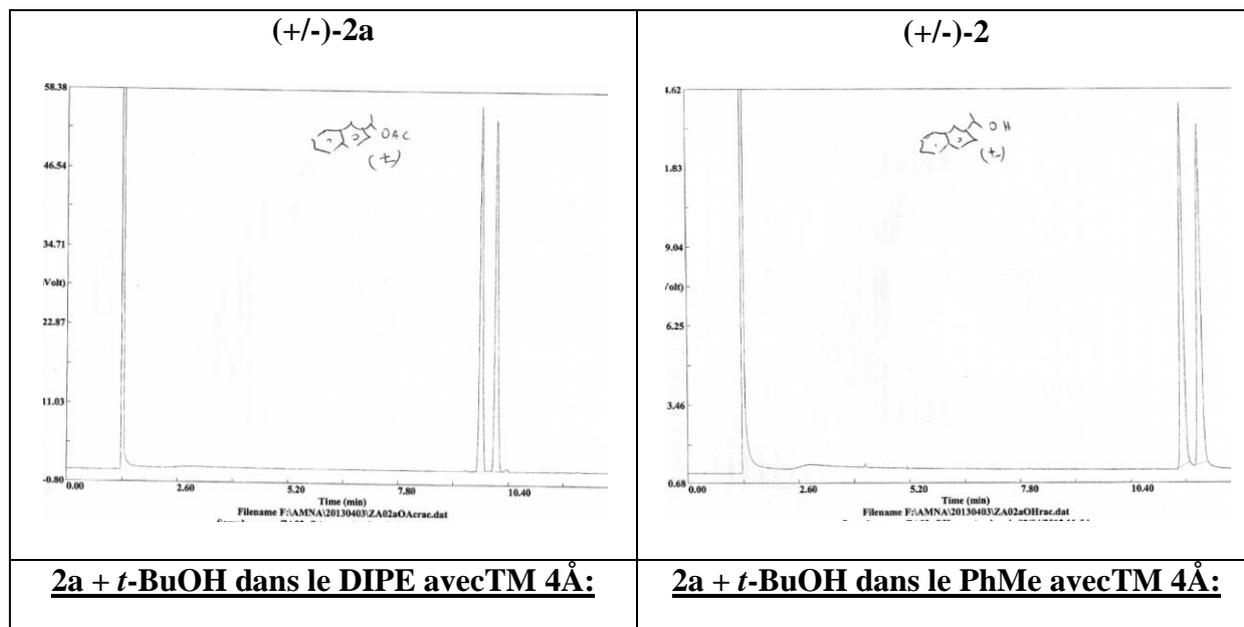
utilisant le 2-BuOH, un alcool secondaire, on obtient, le même avancement avec les deux structures 44% et 45.5% (entrée 6 vs. entrée 20). Idem, avec le *t*-BuOH, l'avancement noté est de 31.3% et 33.3% (entrée 7 vs. entrée 21).

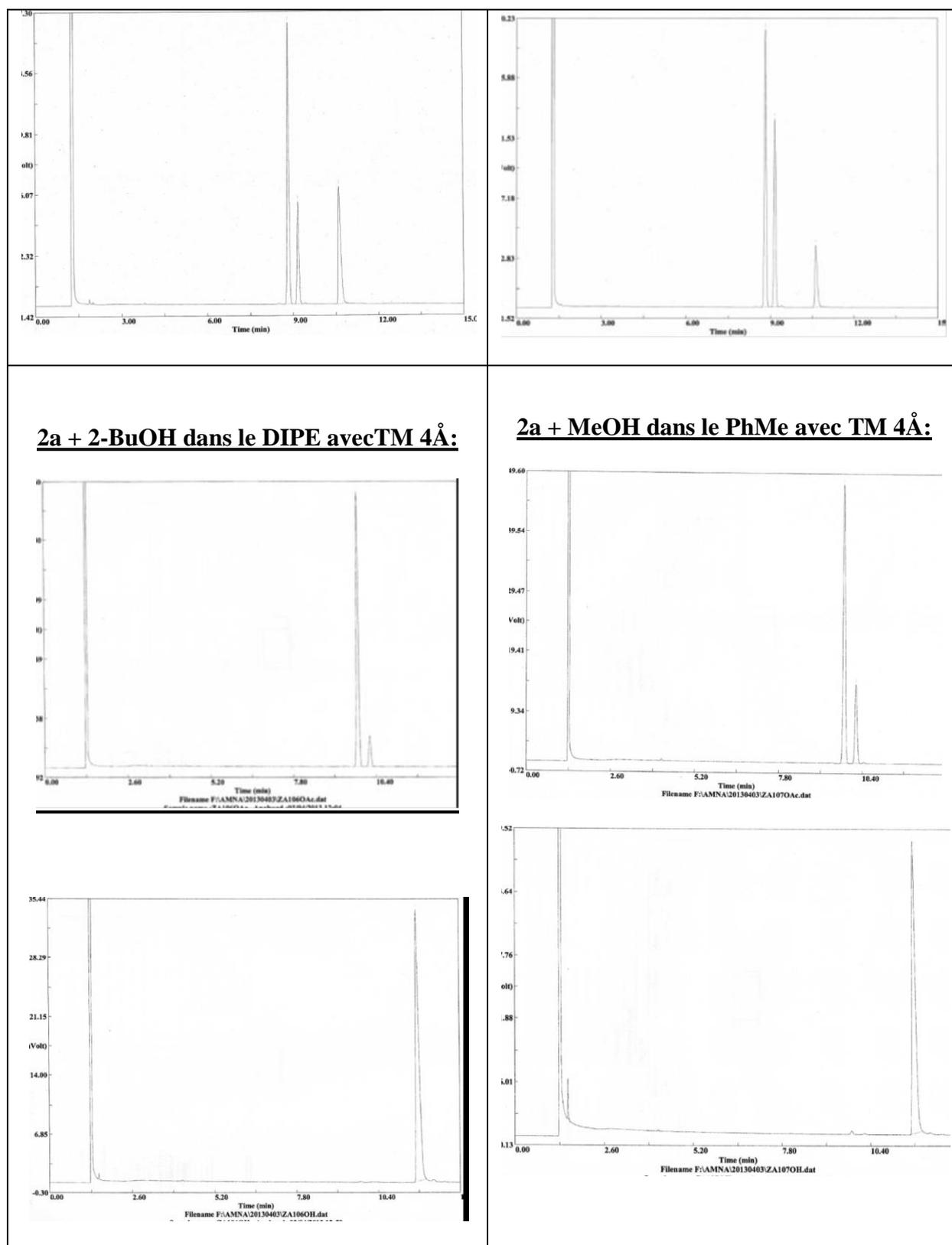
✂ En utilisant le toluène comme solvant organique, nous avons noté des résultats similaires avec les deux structures. Le méthanol se montre le meilleur nucléophile avec une conversion de 40% pour l'acétate **2a** et de 45% pour la structure **3a** (entrée 8 vs. entrée 22).

Il est à souligner que les résultats obtenus en utilisant un alcool tertiaire, le *t*-BuOH, sont les premiers décrits, pour l'alcoolse des alcools secondaires (entrée 7, 21 et 28). Avec la structure **2a** en utilisant cet alcool, la conversion chute de 31.3% dans le DIPE à 15.5% (entrée 7 vs. entrée 14). Cet effet s'incline complètement avec l'acétate **3a**, ou la conversion enregistrée est la même dans les deux solvants, C=33% (entrée 21 vs. entrée 28).

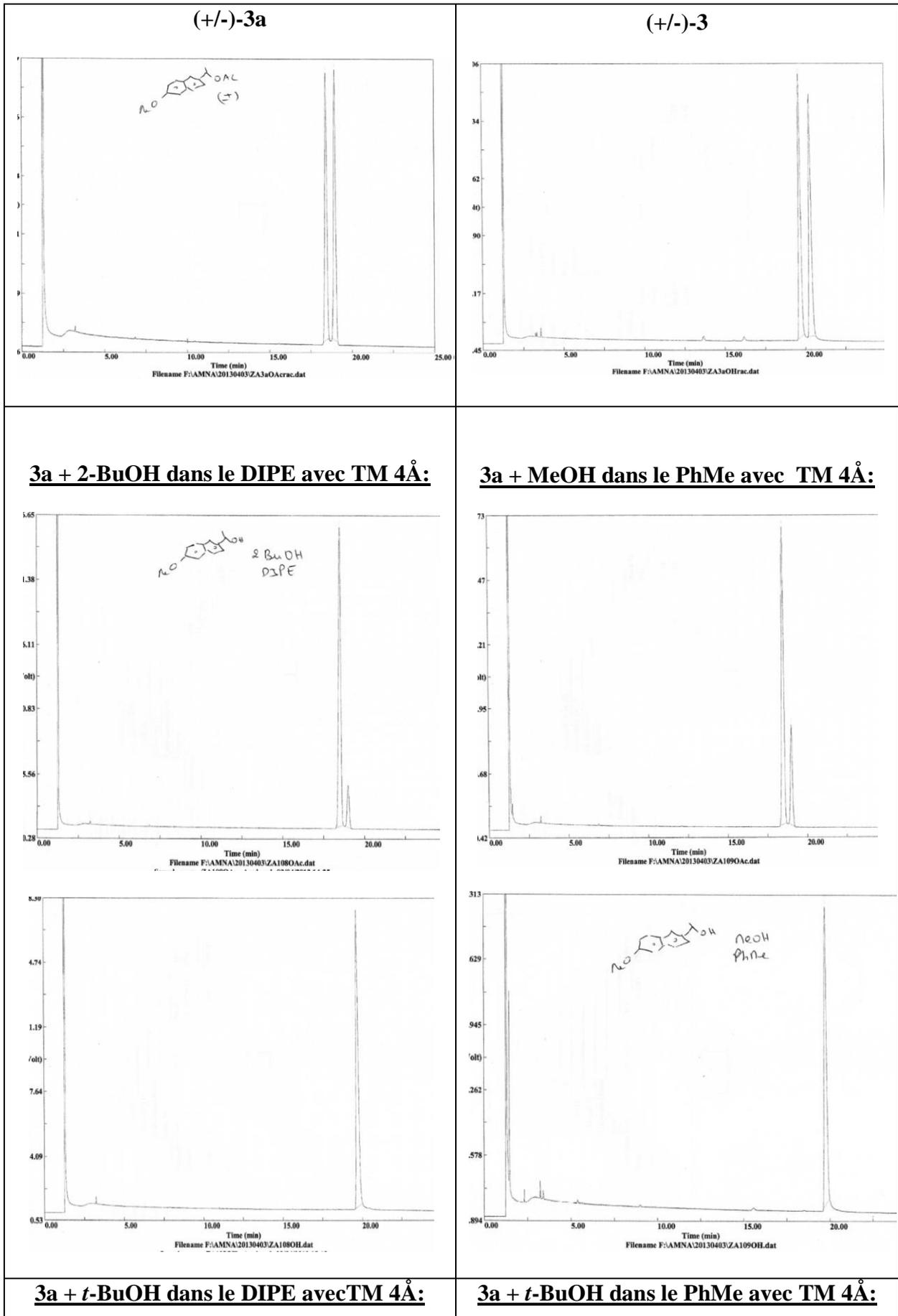
Ainsi, on confirme bien la dépendance importante « accepteur d'acyle/hydrophobicité du solvant ». **On souligne bien que le meilleur nucléophile est le 2-BuOH dans le DIPE, et que le meilleur accepteur d'acyle est le MeOH dans le toluène.**

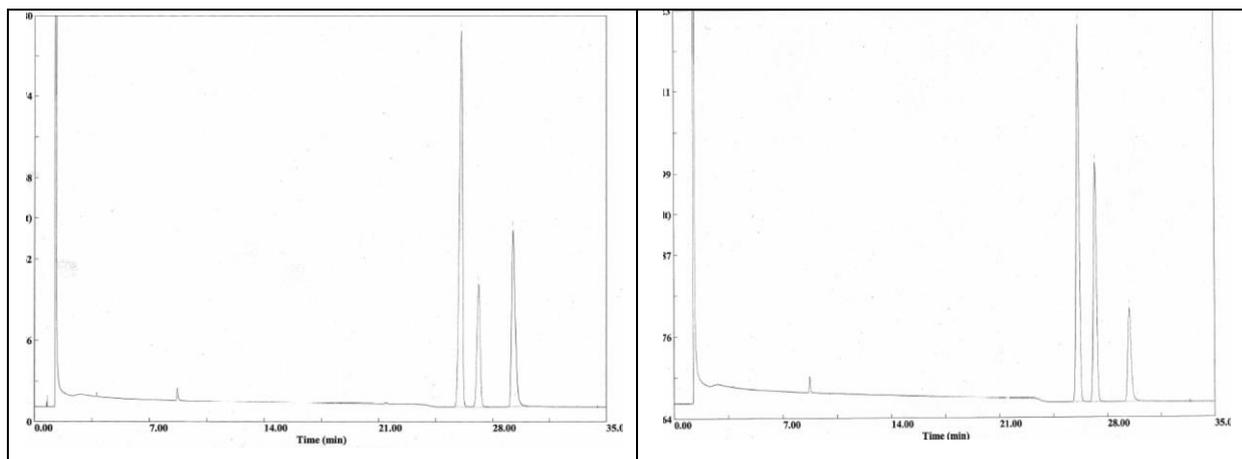
Les chromatogrammes suivants montrent les résultats les plus significatifs du tableau 6.





Série de chromatogrammes 2: Chromatogrammes de l'alcoolise lipasique de l'acétate 2a.



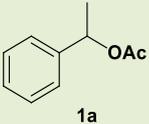
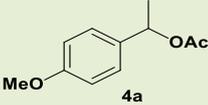
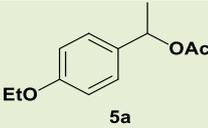
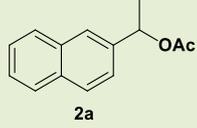
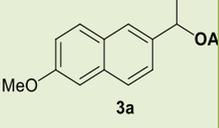
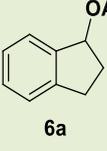
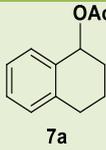


Série de chromatogrammes 3: Chromatogrammes de l'alcoolse lipasique de l'acétate **3a**.

III-5-4- Validation des conditions de la déacylation par alcoolse enzymatique avec des acétates d'intérêt pharmacologique [1a-7a] :

Vu les résultats significatifs de la réaction d'alcoolse obtenu avec les acétates [**1a-3a**], nous avons envisagé la validation de la méthode de déacylation par alcoolse catalysée par la CAL-B avec d'une série d'acétates benzyliques d'intérêt pharmaco-thérapeutique. Nous avons effectué une série de réactions d'alcoolse des acétates racémique [**1a-7a**] suivant le mode opératoire mis au point et avec les deux meilleurs nucléophiles : 2-BuOH et MeOH. Les excès énantiomériques des acétates résiduels et les alcools obtenus sont obtenus par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les rendements chimiques des produits isolés sont évalués après séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 7** :

Tableau 7 : Validation de la voie de déacylation par alcoolse catalysée par la CAL-B d'une série d'acétates benzyliques[**1a-7a**].

Entrée	Substrat ^(a)	ROH	Solvant (logP)	ee _(S) (%) ^(b) Rdt (%) ^(d)	ee _(P) (%) ^(b) Rdt (%) ^(d)	C ^(c)	E ^(c)
1		2-BuOH	DIPE (1.9)	78.7 (36.6)	99.9 (38.9)	44	>500
2		MeOH	PhMe (2.5)	73.8 (35.5)	99.9 (25.6)	42.5	>500
3		2-BuOH	DIPE (1.9)	76.9 (44.5)	99.9 (21.3)	43.5	>500
4		MeOH	PhMe (2.5)	82.3 (36.5)	99.9 (32.6)	45	>500
5		2-BuOH	DIPE (1.9)	78.9 (30.8)	99.9 (19.5)	44	>500
6		MeOH	PhMe (2.5)	90.5 (18.8)	99.9 (33.5)	47.5	>500
7		2-BuOH	DIPE (1.9)	79.7 (43.3)	99.9 (21.9)	44.4	>500
8		MeOH	PhMe (2.5)	65.9 (49.6)	99.9 (34)	39.8	>500
9		2-BuOH	DIPE (1.9)	83.4 (20.4)	99.9 (34.9)	45.5	>500
10		MeOH	PhMe (2.5)	81.8 (52.2)	99.9 (42.8)	45	>500
11		2-BuOH	DIPE (1.9)	75.8 (16.2)	99.9 (30.5)	43.1	>500
12		MeOH	PhMe (2.5)	77.3 (44.8)	99.9 (41.6)	43.6	>500
13		2-BuOH	DIPE (1.9)	73.7 (50.8)	99.9 (37.1)	42.45	>500
14		MeOH	PhMe (2.5)	57.3 (48.9)	99.9 (24.9)	36.4	>500

(a) Conditions de réaction: 1 mmole d'acétate racémique, 2 mmole d'alcool, 12 mg of CAL-B, 60 mg of MS 4Å dans 2 mL de solvant organique à 40°C. (b) Les Excès énantiomériques des alcools restants et des acétates produits sont mesurés par CPG chirale. (c) Conversion : $C = ee_S / ee_P + ee_S$; Selectivity: $E = \ln [(1-C) (1-ee_S)] / \ln [(1-C) (1+ee_S)]$. (d) Isolated yields.

Les résultats du **tableau 7** montrent que l'alcoolse des acétates racémiques [**1a-7a**] en milieu organique présente des conversions élevées $40\% < C < 48\%$ et de hautes sélectivités $E > 500$ de la CAL-B avec les nucléophiles sélectionnés. La réactivité de la CAL-B est nettement modulée selon de la combinaison binaire : nature du nucléophile (ROH) et hydrophobicité du solvant mise en jeu lors du processus catalytique de déacylation par le biais de la lipase. Les

alcools de configuration (*R*) sont obtenus énantiomériquement purs avec des rendements chimiques isolés convenables. Ces résultats valident l'efficacité des conditions de déacylation par alcoolise enzymatique mis au point sur le phényléthyl acétate **1a**.

La comparaison des résultats obtenus en utilisant la *CAL-B* entre l'alcoolise enzymatique sur le phényléthyl acétate **1a** et la réaction transestérification du phényléthanol **1** avec l'acétate d'isopropenyle permet de montrer une parfaite énantiocomplémentarité des deux réactions avec une énantio-préférence en faveur de l'énantiomère (*R*)-produit. La réaction d'alcoolise constitue une voie de déacylation est une alternative intéressante, complémentaire à la réaction d'hydrolyse pour la résolution d'alcools. Cette étude contribue à la compréhension des éléments intervenant sur la sélectivité de la *CAL-B* lors de la réaction d'alcoolise (**Schéma 63**).

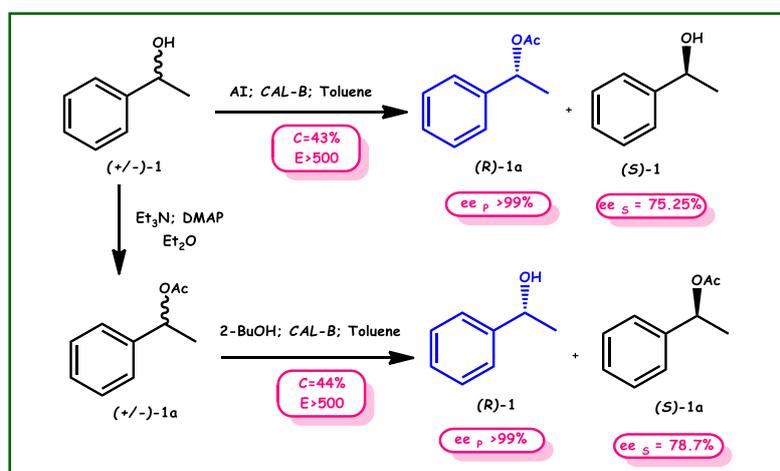


Schéma.63: Comparaison Acylation/ Déacylation lipasique.

III-6-Conclusion :

Dans ce chapitre nous avons examiné l'effet de la nature du nucléophile et l'hydrophobicité du milieu réactionnel lors de la déacylation par alcoolise avec la *lipase de Candida antarctica* (*CAL-B*), enzyme immobilisée sur une résine acrylique sur une série d'acétate benzylique [**1a-7a**]. Nous avons montré que ces deux paramètres ont une influence sur le déroulement de la réaction. La modulation de la nature du nucléophile et de l'hydrophobicité

du solvant organique améliore considérablement l'énantiosélectivité de la lipase lors de la déacylation. Dans tous les cas, nous obtenons une (*R*)-énantiopréférence avec un facteur de sélectivité $E > 500$. La réactivité de la CAL-B dépend de la nature du nucléophile (ROH) mis en jeu, et ce, quelque soit le solvant utilisé. Les alcools primaires et secondaires donnent les meilleurs résultats en conversion $C > 40\%$, et sélectivité $E > 500$ lors du dédoublement cinétique par alcoololyse enzymatique des acétates étudiés dans les deux solvants utilisés. L'addition de tamis moléculaire favorise la réactivité lipasique en diminuant la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel. Le meilleur résultat a été obtenu avec l'éthanol, dans le DIPE, en présence du tamis moléculaire. Les résultats obtenus lors de l'alcoololyse enzymatique de cette série d'acétates benzyliques montrent une parfaite énantiocomplémentarité avec la réaction de transestérification enzymatique. L'ensemble des résultats ont été publiés dans une revue de spécialité.¹⁴⁹

¹⁴⁹A.Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, & L. Aribi-Zouiouche, *Catalysis Letters*, 2015, **145**(4), 1054-1061.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE IV

DEACYLATION PAR AMINOLYSE LIPASIQUE D'ARYLALKYL ACETATES

IV-1-Introduction:

Suite aux résultats obtenus dans divers travaux antérieurs¹⁵⁰ ou lors du dédoublement cinétique d'acétates benzyliques secondaires par hydrolyse avec la *CAL-B* en milieu organique en présence de sels de carbonates¹⁵¹ nous constatons que ces approches bénéficient de nombreux avantages dont l'essentiel est de permettre une utilisation des lipases en milieu non aqueux¹⁵².

Dans la continuité des résultats de la déacylation sélective d'acétates benzyliques en milieu non aqueux rapportée dans le chapitre précédent,¹⁵³ nous avons abordé une nouvelle approche "l'aminolyse". Cette voie constitue une autre alternative de déacylation d'acétates en milieu non-aqueux, c'est une méthode facile, douce, verte qui a été étudiée, essentiellement, pour la préparation des amides et des carbamates optiquement actifs¹⁵⁴, pour la déacylation régiosélective non enzymatique des acétates aromatiques¹⁵⁵ ainsi que pour la déacylation énantiosélective de divers acétates. Actuellement son utilisation reste modeste malgré l'intérêt du procédé.¹⁵⁶

IV-2-Objectifs de l'étude:

Dans la continuité de nos investigations, et vu les sélectivités élevées obtenues dans les réactions de déacylation par alcoolyse¹⁵⁵ catalysées par la *CAL-B* en milieu organique, nous avons exploré une nouvelle voie de déacylation, l'aminolyse d'acétates benzyliques modèles

¹⁵⁰ (a)**Réf117**: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986; (b)**Réf111**: M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry*, **2008**, 19, 2378-2384; (c)**Réf112**: M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 1371-2377; (d)**Réf114(g)**: M. Merabet, N. Melaïs, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, & L. Zouiouche-Aribi, *journal-societe algerienne de chimie*, **2007**, 17(2), 185.

¹⁵¹(a)**Réf113** : M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23, 823-833 ; (b)**Réf68** : Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 290-296.

¹⁵² V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, « use of lipases in organic synthesis » chapter 18, in « Industrial enzymes », J. Polaina & A. P. MacCabe (eds.), pp 301-3015, ©2007 Springer.

¹⁵³**Réf149** : A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche. *Catalysis Letters*, **2015**, 145(4), 1054-1061.

¹⁵⁴ **Réf14(a)** V. Gotor, "Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis reactions" in "Enzymes in Action", pp. 117-132, B. Zwanenburg et al. (eds.), ©2000, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands; (b)V. Gotor, *BioOrg & Med. Chem*, **1999**, 7, 2189-2197; (c) F. van Rantwijk, M. A. Hacking, & R. A. Sheldon, *Monatshfte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131(6), 549-569).

¹⁵⁵ Per Manson, *Tetrahedron Lett*, **1982**, 23, 1845-1846

¹⁵⁶ (a) B. Wang, L. Jiang, J. Wang, J. Ma, M. Liu, H. Yu, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 980-985; (b) A. Prechter, H. Groger, M. R. Heinrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 3384-3387; (c) E. Garcia-Urdiales, F. Rebollo, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343, 646-654; (d) E. Garcia-Urdiales, F. Rebollo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 1459-1463.

[1a-7a] avec la même lipase dans le but de comprendre l'influence du pouvoir nucléophile sur la sélectivité et la réactivité de la CAL-B.

Nous avons modulé quelques paramètres pouvant intervenir directement sur le processus catalytique lipasique du DCE et notamment la présence de la réaction d'hydrolyse compétitive et son interaction sur le processus catalytique (*Schéma 65A*).

Il était intéressant de comparer ensuite les trois voies de déacylation enzymatique avec la lipase CAL-B et les divers nucléophiles, ces voies seront également comparées à l'acylation lipasique qui est la voie la plus utilisée pour l'obtention des alcools secondaires benzyliques énantiomériquement purs (*Schéma 64* : voies A, B et C versus voie D).

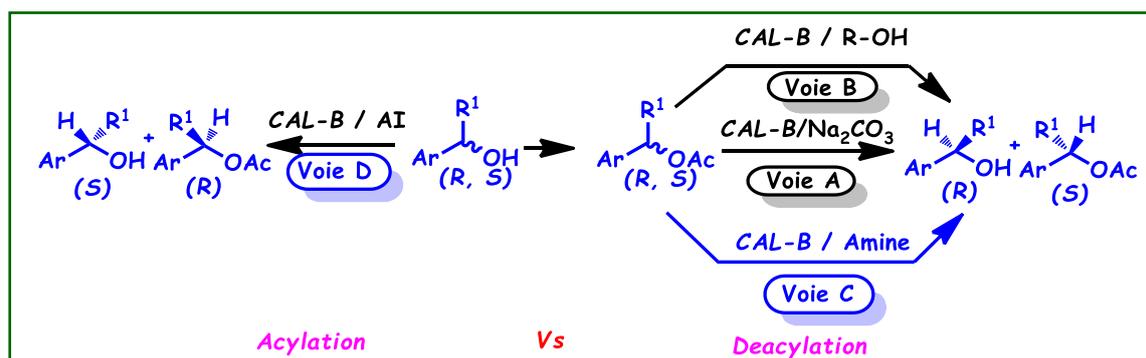


Schéma.64 : Différentes approches de déacylation lipasique des acétates.

IV-3-Aperçu bibliographique:

L'exploitation de l'aminolyse lipasique pour déacyler les acétates est rarement reportée dans la littérature. Heinrich et coll. ont décrit la déacylation par aminolyse d'un azo-acétate catalysée par la CAL-B en utilisant des amines achirales comme accepteurs d'acyle dans un milieu hydrophile (Acetonitrile).¹⁵⁷ Le meilleur résultat est enregistré en utilisant 5 équivalents de benzylamine. L'augmentation de la concentration en amine joue en défaveur de la sélectivité et de la réactivité. (*Schéma 65*)

¹⁵⁷ A. Prechter, H.Gröger, & M. R. Heinrich, *Organic & biomolecular chemistry*, **2012**, *10*(17), 3384-3387.

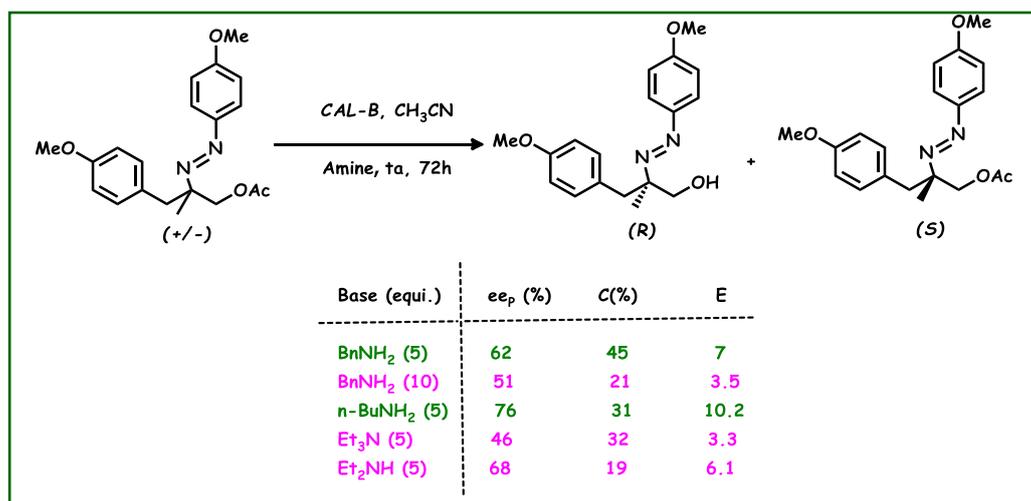


Schéma.65 : Aminolyse lipasique d'un azo-acétate.

IV-4-Etude de la déacylation par aminolyse catalysée par la CAL-B des acétates [1a-7a]:

L'étude préliminaire est réalisée avec le 1-phényléthyl acétate **1a**, substrat modèle. Nous avons examiné l'effet de la structure de trois amines en présence de deux solvants organiques d'hydrophobicité différentes et modulés par l'introduction de tamis moléculaire 4Å. Les conditions optimisées de déacylation par aminolyse enzymatique ont été ensuite appliquées sur une série d'acétates benzyliques de structures diverses [**2a-7a**].

IV-4-1- Mise au point de la réaction de Déacylation par aminolyse du 1-phényléthyl acétate 1a :

Les réactions de déacylation du 1-phényléthyl acétate **1a** par aminolyse avec la *CAL-B* sont réalisées selon le protocole opératoire mis au point lors de l'alcoolyse.¹⁵⁸ La combinaison hydrophobicité du solvant / nucléophile est étudiée. Nous avons choisis deux solvants d'hydrophobicité différentes, le toluène et le DIPE avec trois amines achirales de différentes nucléophilies: l'aniline, la benzylamine et la triéthylamine. Les réactions sont réalisées avec et sans tamis moléculaire 4Å afin de moduler l'effet compétitif de l'hydrolyse de l'acétate **1a** versus l'aminolyse (Eau/Amine) en régulant l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel.

La réaction d'aminolyse est effectuée sur 1 mmole de **1a**, 2 mmoles d'amine dans 2 mL de solvant organique en présence de 12 mg de *CAL-B*. La réaction est menée sous agitation

¹⁵⁸ Réf149: A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche. *Catalysis Letters*, **2015**, 145(4), 1054-1061.

magnétique à 40°C durant 24 heures (*Schéma 66*). L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince.

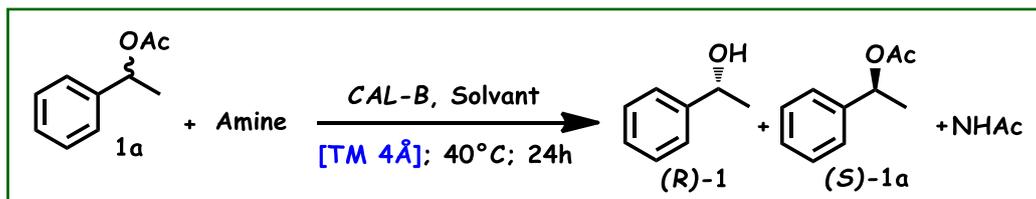


Schéma.66: Aminolyse de **1a** en présence et en absence du Tamis moléculaire.

Les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. La conversion et les excès énantiomériques des acétates résiduels (*S*)-**1a** et des alcools (*R*)-**1** obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale, et ce après séparation par chromatographie sur gel de silice. Les résultats sont réunis dans le **Tableau 8**.

Les résultats du **tableau 8** montrent un effet significatif conjoint de la nature de l'amine et de l'hydrophobicité du solvant organique complété par l'effet du tamis moléculaire. La présence d'une réaction d'hydrolyse hautement énantiosélective de l'acétate sans intervention du nucléophile, et cela quelque soit le solvant organique utilisé avec et sans tamis moléculaire, a été enregistrée (entrées 1-5-9 et 13).

L'hydrophobicité du solvant organique joue un rôle primordial sur l'aminolyse du phényléthyl acétate **1a** par la lipase *CAL-B*, en fonction de l'amine utilisée, précisément sur la réactivité sans perturber la sélectivité liasique, De même, l'introduction du tamis moléculaire n'a pas un impact important sur la déacylation dans le toluène et le DIPE.

Quelque soit l'amine utilisée, de hautes sélectivités sont obtenues dans le toluène ($E > 200$) avec et sans tamis moléculaire (entrées 10-12 et 14-16) mais les conversions sont faibles à modérées ($2\% \leq C \leq 20\%$). L'introduction de la triéthylamine comme additif, offre une meilleure conversion, elle est doublée par rapport à la réaction à blanc, et ce, avec et sans tamis moléculaire (entrée 12 *versus* 9 et entrée 16 *versus* 13). Le même effet a été enregistré avec la benzylamine, utilisée comme accepteur d'acyle, uniquement, en présence du tamis moléculaire (entrée 13 *versus* 15), et ce n'est pas le cas avec l'aniline, où l'avancement est faible $C = 2\%$ (entrée 14).

Tableau 8 : Aminolyse enzymatique des Arylalkyl acétates avec différentes bases en présence et en absence du tamis moléculaire 4Å.

Entrée	Base	TM 4Å	Solvant (logP)	ee _(S) (%)(^c)(Rdt%)(^e)	ee _(P) (%)(^c)(Rdt%)(^e)	C ^(d)	E ^(d)
1	-	Sans ^(a)	DIPE	17	99.9	15	>200
2	PhNH ₂	Avec ^(b)	(1.9)	16.2 (17)	99.9 (11)	14	>200
3	BnNH ₂			5 (38)	9 (15)	34	1
4	Et ₃ N			12 (31)	99.9 (traces)	11	>200
5	-			15	99.9	13	>200
6	PhNH ₂			19 (56)	96 (15)	16	67
7	BnNH ₂			1 (21)	2 (5)	35	1
8	Et ₃ N			43 (42)	99.9 (15)	30	>200
9	-			Sans ^(a)	PhMe	12	99.9
10	PhNH ₂	Avec ^(b)	(2.5)	10 (40)	99.9 (7)	9	>200
11	BnNH ₂			14 (26)	99.9 (3)	12	>200
12	Et ₃ N			25 (38)	99.9 (10)	20	>200
13	-			11	99.9	10	>200
14	PhNH ₂			2 (45)	99.9 (-)	2	>200
15	BnNH ₂			23 (36)	99.9 (2)	19	>200
16	Et ₃ N			21 (27)	99.9 (9)	18	>200

(a) 1 mmol acétate, 2 mmole amine, 12 mg CAL-B, dans 2 ml de solvant à 40°C.

(b) 1 mmol acétate, 2 mmole amine, 12 mg CAL-B, 60 mg de TM 4Å, dans 2 ml de solvant à 40°C.

(c) Excès énantiomérique des acétates résiduels et d'alcools produits sont évalués par GC chirale

(d) Conversion : $C = ee_S / ee_P + ee_S$; Selectivity: $E = \ln [(1-C) (1-ee_S)] / \ln [(1-C) (1+ee_S)]$

(e) Rendement isolé.

L'utilisation du DIPE comme solvant donne une diversité de résultats qui dépend fortement de la nature de l'amine. Une importante activation de la CAL-B est enregistrée en introduisant la triéthylamine avec le tamis moléculaire, la conversion est triplée par rapport au blanc de réaction, et cela, sans affecter la sélectivité $E > 200$ (entrée 8 *versus* 5), cela est due probablement à l'élimination de toutes traces d'acide carboxylique, générées par la réaction compétitive d'hydrolyse.

Ainsi, l'utilisation de l'aniline comme accepteur d'acétyle donne le même avancement que la réaction à blanc (entrée 2 *versus* 1), une légère diminution de la conversion de $C = 15\%$ à

C = 11% est obtenue en utilisant la triéthylamine (entrée 4 *versus* 1). L'utilisation d'un nucléophile plus fort, la benzylamine active la réaction, le taux de conversion est triplé sans sélectivité E=1 (entrée 3 *versus* 7) avec ou sans tamis. L'introduction du tamis moléculaire dans le milieu réactionnel, influence significativement la réactivité de la CAL-B, uniquement avec la triéthylamine où la conversion passe de C = 10% à C = 30% avec une haute sélectivité E > 200 (entrée 4 *versus* 8). Avec l'aniline et en présence de tamis moléculaire, la sélectivité chute de E > 200 à E = 67 avec une légère amélioration de la conversion (entrée 6 *versus* 2).

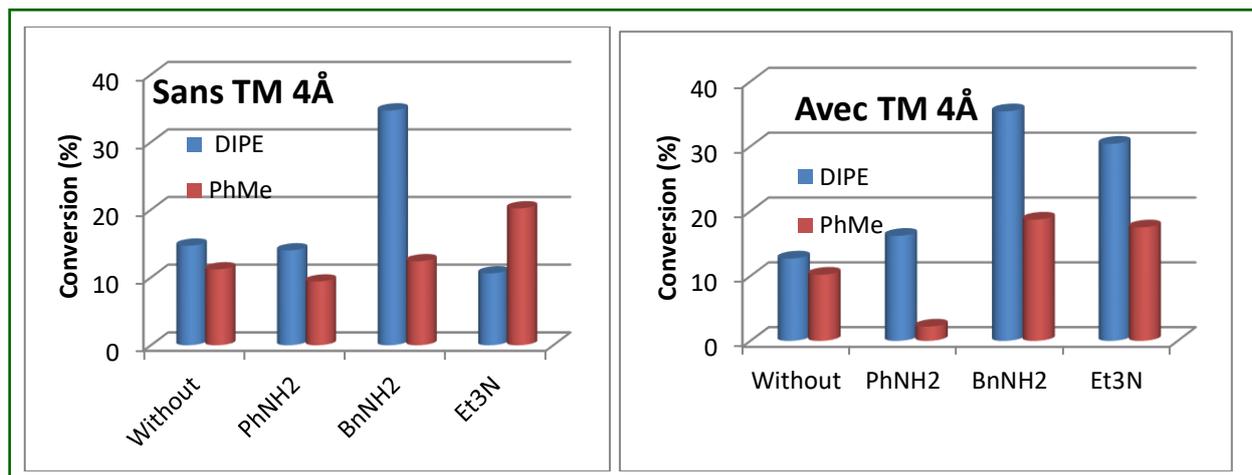
L'utilisation du toluène permet une régulation de la réactivité et de la sélectivité de la CAL-B avec et sans tamis moléculaire. Un effet analogue sur la réactivité de la lipase CAL-B a été enregistré lors de l'alcoolyse de **1a** dans un milieu hydrophobe ($\log P \geq 2$), qui est le milieu le plus utilisé pour les réactions de transesterification.¹⁵⁹

L'utilisation d'aniline et de benzylamine sans tamis moléculaire donne des résultats analogue à la réaction à blanc (entrées 10 et 11 *versus* 9) alors qu'une amélioration de la réactivité est enregistrée en présence de la triéthylamine dans le milieu réactionnel (entrée 12). L'introduction du tamis moléculaire avec l'aniline entraîne une chute de la conversion de C=9% à C=2% (entrée 14 *versus* 10), tandis qu'avec la benzylamine la conversion est légèrement améliorée de C=12% à C=19%, cet effet est analogue à celui noté avec la triéthylamine dans les mêmes conditions (entrées 15 et 16).

La triéthylamine est la meilleure base, à savoir additif, pour la déacylation du phényléthyl acétate **1a** avec la CAL-B, les meilleurs résultats en terme de réactivité et de sélectivité sont obtenus avec les deux solvants utilisés (20% <C < 31% et E > 200). L'énantiomère (R)-phényléthanol produit est obtenu énantiomériquement pur ee > 99%. L'utilisation du tamis moléculaire assure une augmentation de la réactivité dans le DIPE.

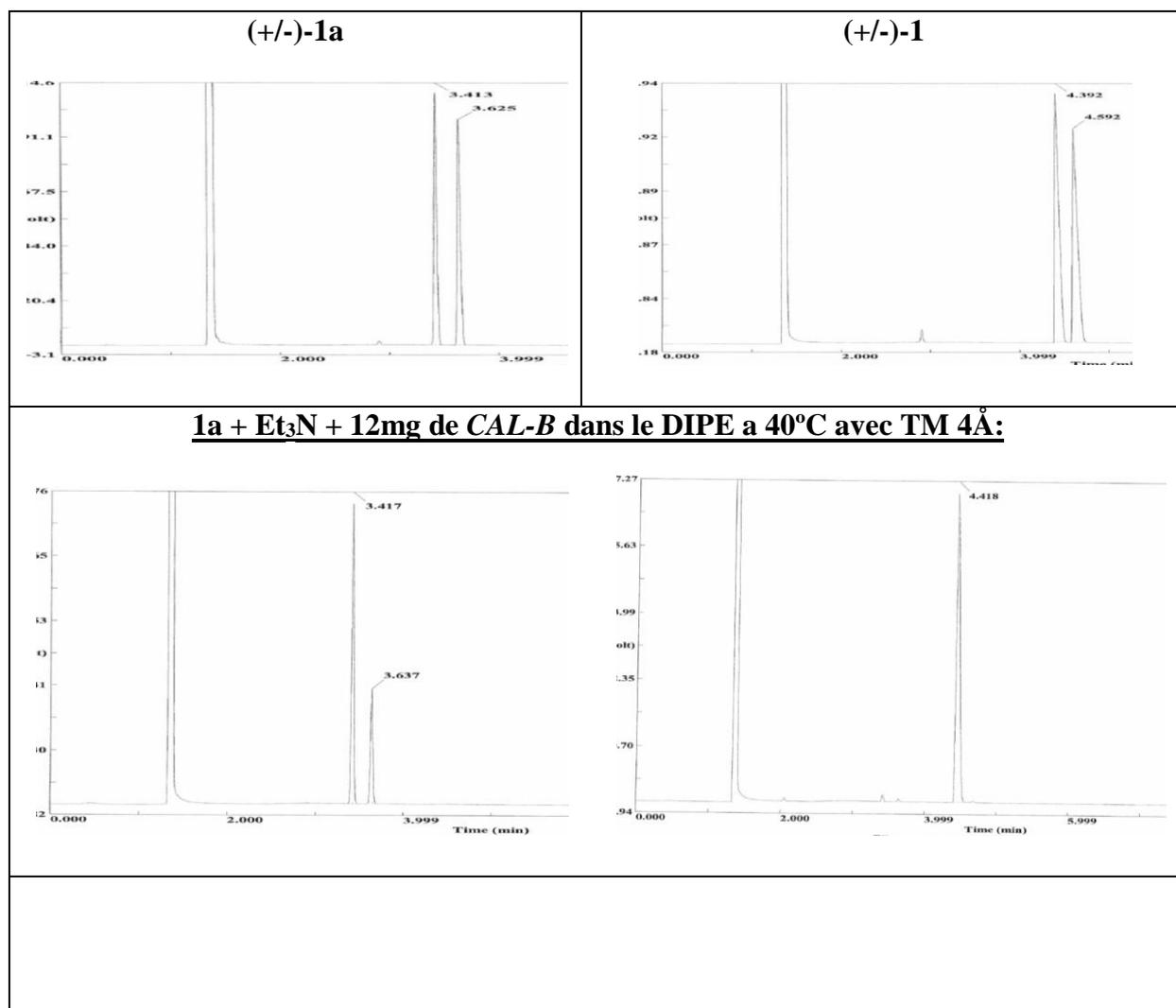
L'histogramme ci-dessous illustre les résultats obtenus.

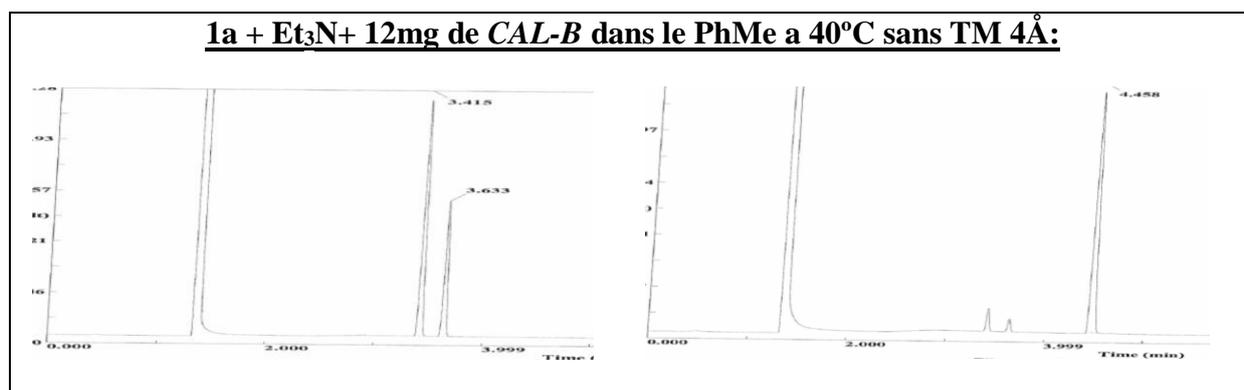
¹⁵⁹ (a)Réf53(a): A. M. Klivanov, *Nature*, **January 2001**,409,241-246; (b)Réf105(b): Patel, R. N.; *Stereoselective Biocatalysis*, **2000**, Dekker, New York; (c)Réf105(c): P. Berglund, *Biomol. Engineering*, **2001**, 18,13-22; (d) V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Cata B. Enz*, **2006**, 40, 111-120 ; (d)Réf105(d): L. T.Kanerva, & A. Liljeblad, (2010). Transesterification-Biological in Encyclopedia of Catalysis. 2nd edition. John Wiley & Sons.



Histogramme 4 : Influence de la nature de l'amine sur l'évolution de la déacylation de l'acétate **1a** sans et avec TMS4Å.

Les chromatogrammes suivants montrent les résultats les plus significatifs du tableau 8.





Série de chromatogrammes 4: Chromatogrammes de quelques résultats importants de l'aminolyse lipasique de l'acétate **1a**.

IV-4-2- Déacylation des acétates [1a-7a] en présence de la Et₃N: Impact de la quantité de CAL-B:

Les conditions optimisées de la réaction déacylation catalysée par la *CAL-B* en présence de la triéthylamine sont appliquées sur la série d'acétates benzyliques [**1a-7a**]. Etant donné que le taux catalytique de cette lipase affecte significativement la réactivité et la sélectivité lors du DC par acylation enzymatique des arylalkyl carbinols.¹⁶⁰ Nous avons étudié l'effet du taux catalytique de la lipase *CAL-B* sur le déroulement de la réaction de dédoublement cinétique.

La deacylation de 1 mmol d'acétate (**1a-7a**) est effectuée en additionnant 2 mmol de triéthylamine, en présence de 60 mg de tamis moléculaire 4Å, dans 2 mL de DIPE. Des quantités variables de la *CAL-B* ont été introduites (12-24-35-50mg). La réaction est menée sous agitation magnétique à 40°C durant 24 heures (*Schéma 67*). L'évolution des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince.

¹⁶⁰**Réf117:** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C.Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie*, **2011**, *14*,978–986.

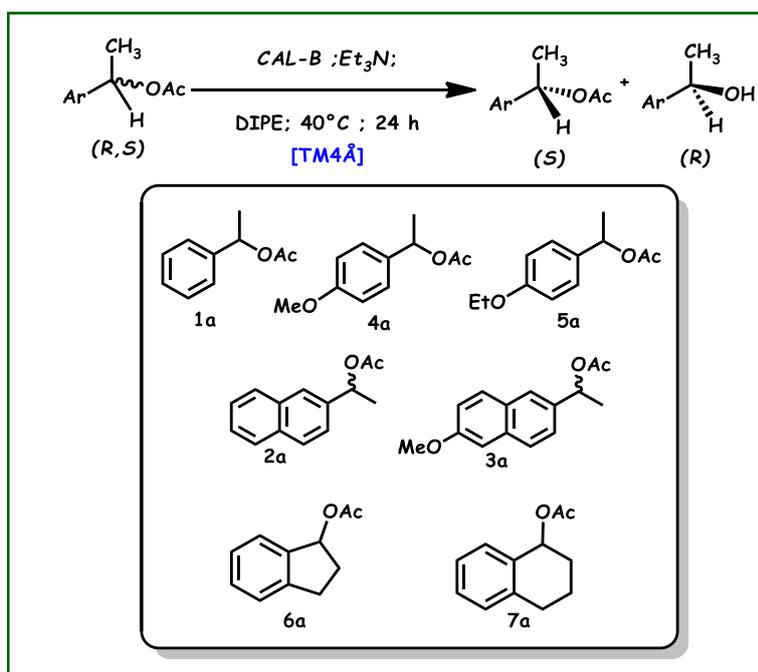
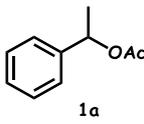
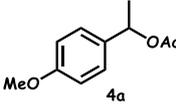
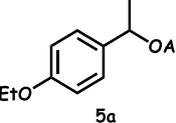
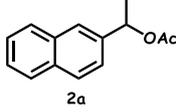
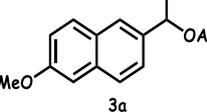
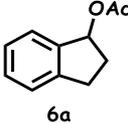
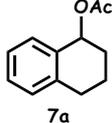


Schéma.67 : Déacylation lipasique des acétates [1a-7a] : impact du taux catalytique lipasique.

Le mélange réactionnel est filtré sur célite puis évaporé sous vide. La conversion et les excès énantiomériques des acétates résiduels et des alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale après séparation par chromatographie sur gel de silice. Les résultats sont réunis dans le **Tableau 9**.

Les résultats du tableau **9** montrent une influence considérable de l'augmentation de la quantité de la CAL-B de 12mg à 50mg sur la réactivité et la sélectivité de la déacylation selon la structure du substrat. Le taux catalytique optimal de la CAL-B pour tous les substrats étudiés est entre 24mg et 35mg (entrées 2, 7, 12, 17, 22, 27 et 32 *versus* 4, 14, 19 et 34). Une chute variable de la conversion est observée pour 50 mg de CAL-B dans tous les cas à l'exception de l'acétate **5a** où la meilleure conversion est enregistrée avec 50 mg de CAL-B (**Histogramme 5**) en conservant une sélectivité élevée (C = 37% et E = 92).

Tableau 9 : Deacylation lipasique des acétates [1a-7a] : impact du taux catalytique lipasique.

Entrée	Substrat	Qté CAL-B(mg)	ee _(S) (%) ^(c)	ee _(P) (%) ^(c)	C ^(d)	E ^(d)
1		12	43 (42) ^(e)	99.9 (14) ^(e)	30	>200
2		24 ^(a)	57	99.9	36	>200
3		24 ^(b)	6	99.9	6	>200
4		35	65	99.9	39.5	>200
5		50	55	98	36	179
6		12	22.5	99.9	18.4	>200
7		24 ^(a)	48 (42) ^(e)	99.9(41) ^(e)	33	>200
8		24 ^(b)	24	62	28	5
9		35	69	94	42	64
10		50	23	66	26	6
11		12	25	99.9	20	>200
12		24 ^(a)	40 (51) ^(e)	97 (21) ^(e)	29	108
13		24 ^(b)	37	75	33	10
14		35	33	99.9	25	>200
15		50	57	96	37	92
16		12	5	99.9	4	>200
17		24 ^(a)	49 (50) ^(e)	99.9(39) ^(e)	33	>200
18		24 ^(b)	7	99.9	7	>200
19		35	60	99.9	38	>200
20		50	33	99.9	25	>200
21		12	20.5	99.9	17	>200
22		24 ^(a)	39 (42) ^(e)	99.9(15) ^(e)	28	>200
23		24 ^(b)	10	99.9	9	>200
24		35	35	99.9	26	>200
25		50	16	96	15	20
26		12	11	99.9	9	>200
27		24 ^(a)	61 (19) ^(e)	88 (19) ^(e)	41	30
28		24 ^(b)	16	85	16	14.6
29		35	47	91	34	35
30		50	15	90	15	22
31		12	16	99.9	14	>200
32		24 ^(a)	29 (42) ^(e)	99.9(17) ^(e)	23	>200
33		24 ^(b)	-	-	NR	-
34		35	33	99.9	25	>200
35		50	24	99.9	19	>200

(a) 1 mmol acétate, 2 mmole amine, 24mg CAL-B, 60 mg TM 4Å, dans 2 ml DIPE à 40°C.

(b) 1 mmol acétate, 2 mmole amine, 24 mg CAL-B, 60 mg TM 4Å, dans 2 ml DIPE température ambiante.

(c) Excès énantiomérique des acétates résiduels et d'alcools produits sont évalués par GC chirale.

(d) Conversion : $C = ee_S / ee_P + ee_S$; Selectivity: $E = \ln [(1-C) (1-ee_S)] / \ln [(1-C) (1+ee_S)]$

(e) Rendement isolé.

L'augmentation de la quantité de la *CAL-B* a un effet important sur la sélectivité avec les substrats substitués en position para- du noyau aryl par un groupement électrodonneur. La présence d'un méthoxy ou d'un éthoxy- en position para du noyau aromatique dans les structures **4a**, **3a** et **5a** respectivement provoque une chute de la sélectivité. Cet effet est plus important avec la structure **4a** où le facteur de sélectivité passe de $E > 200$ en utilisant 12 mg de *CAL-B* à $E = 6$ avec 50 mg. Cet effet n'apparaît pas avec la structure **1a** (entrées 6-15 versus 1-5).

Un effet similaire est également enregistré avec **3a** substitué par un groupe méthoxy- sur le noyau naphthyle, la sélectivité chute de $E > 200$ à $E = 20$ en augmentant la quantité de *CAL-B* à 50 mg (entrées 21-25). Cet effet n'apparaît pas pour la déacylation du composé **2a** (entrées 13-16).

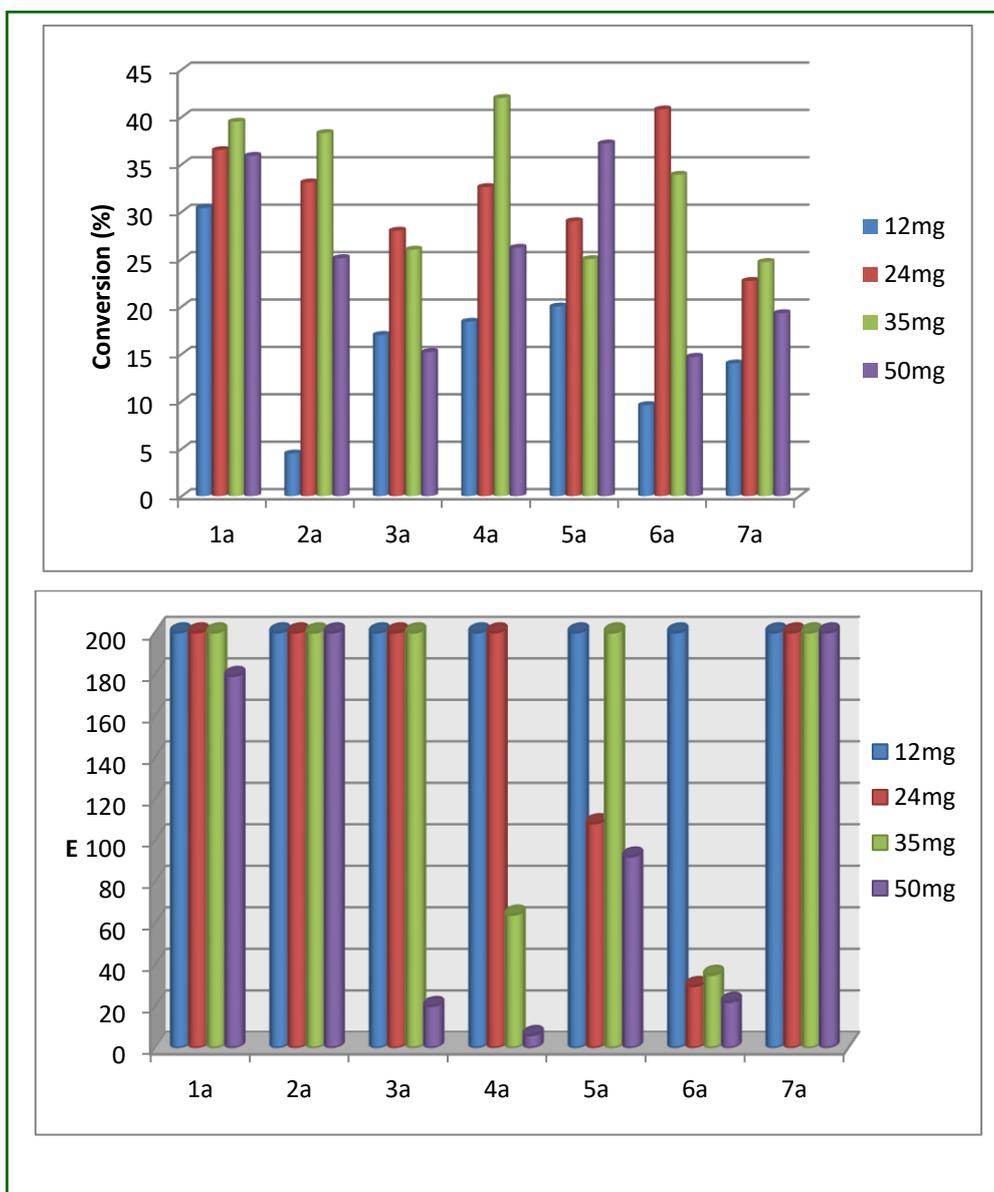
Avec les acétates **6a** et **7a**, l'extension du cycle adjacent au noyau aromatique joue en faveur de la sélectivité dans tous les cas (entrées 26-30 versus 31-35). Pour **7a**, la sélectivité reste élevée $E > 200$ avec une conversion $14\% < C < 25\%$ optimale à 35 mg de *CAL-B* alors que pour **6a** la sélectivité chute à $22 < E < 35$ dès que la quantité de *CAL-B* > 12 mg.

Avec un taux catalytique de *CAL-B* entre 24 mg et 35 mg, la conversion est bonne $C > 23\%$ mais à partir de 35 mg la sélectivité de la réaction diminue pour **4a** (entrée 9) et **5a** (entrée 29) ce qui implique que la quantité optimale de lipase sera $m = 24$ mg de *CAL-B* pour la suite du travail. L'histogramme **5** ci-dessous illustre et résume les résultats du Tableau 9.

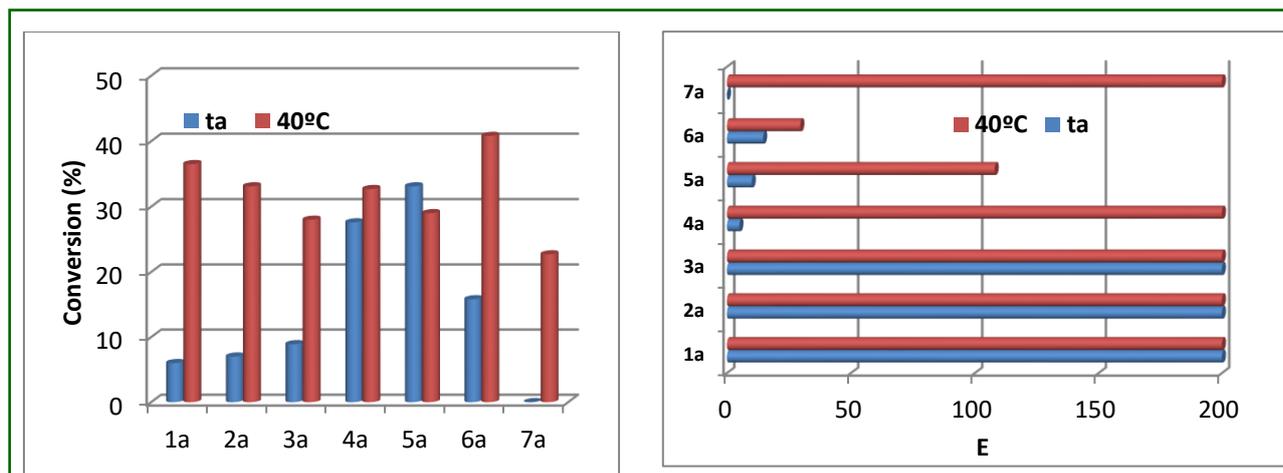
Les expériences de déacylation lipasique des acétates **1a-7a** sont réalisées avec la quantité de 24 mg de *CAL-B*. Les résultats obtenus montrent, que la température 40 °C, est la température idéale pour que la *CAL-B* montre sa performance en matière de réactivité et de sélectivité lors de la déacylation lipasique de toute la gamme des acétates.

Avec les acétates **1a**, **2a**, **3a**, **6a** et **7a** le chauffage joue considérablement en faveur de la réactivité de la *CAL-B*. Le taux de conversion est pratiquement multiplié par un facteur de 4 (entrées 2, 17, 22, 27 et 32 versus 3, 18, 23, 28 et 33).

Un effet surprenant a été détecté avec les acétates **4a** et **5a**, d'où le chauffage améliore la sélectivité de la *CAL-B* sans affecter sa réactivité, le facteur de sélectivité passe de $E < 10$ à $E > 100$ (entrées 7 et 12 versus 8 et 13). (*Histogramme 6*)



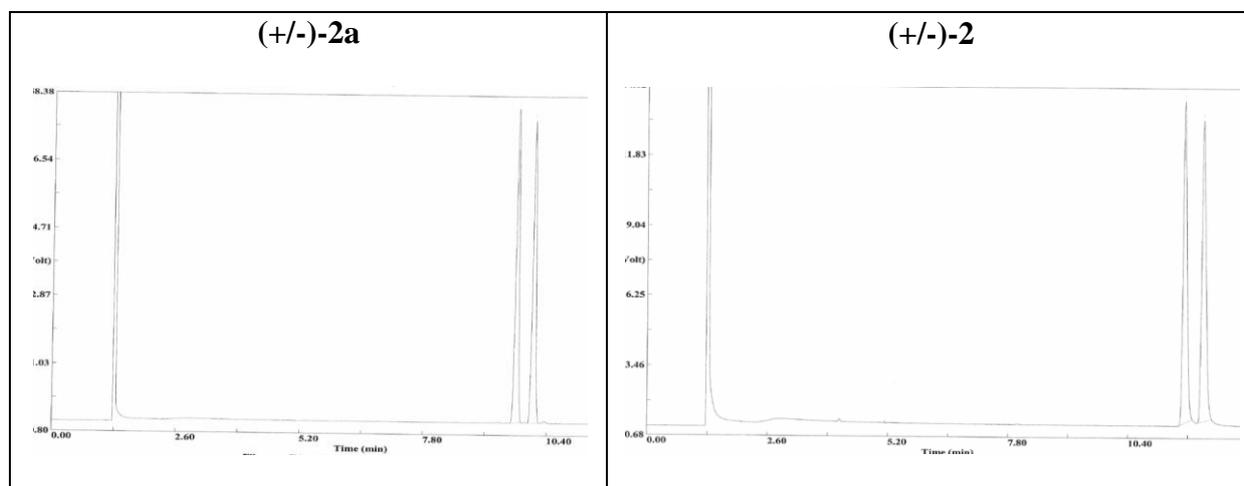
Histogramme 5 : Impact du taux catalytique de la CAL-B lors de la déacylation des acétates [1a-7a] en présence de la Et₃N.

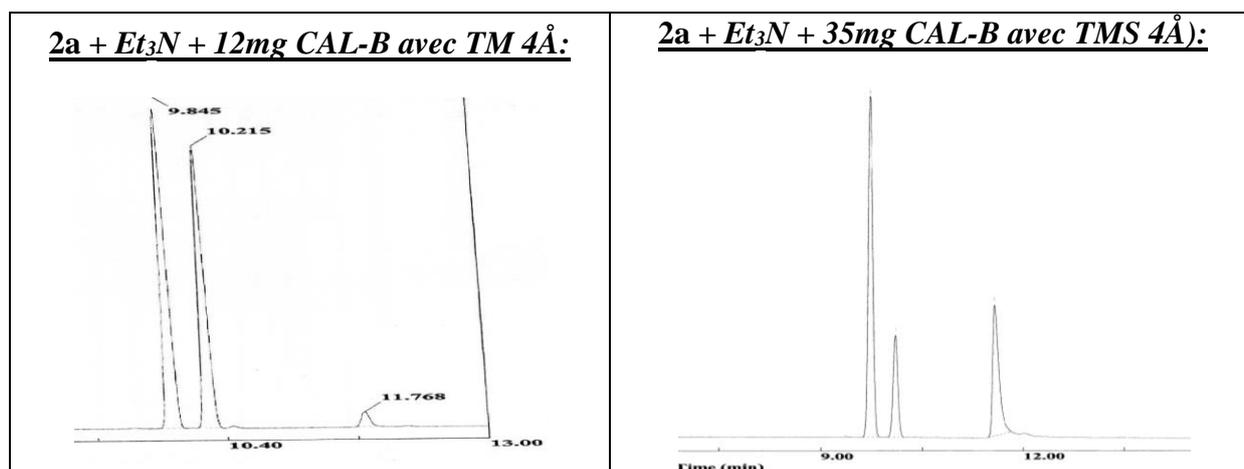


Histogramme 6 : Effet de la température lors de la déacylation des acétates [1a-7a] en présence de la Et_3N .

Les résultats montrent que le dédoublement cinétique en présence de la triéthylamine comme additif, catalysée par la *CAL-B*, est une voie performante pour la déacylation énantiosélective des (1a-5a) et (7a) avec $E > 200$ et des conversions $23\% \leq C \leq 33\%$ (Entrées 2, 7, 12, 22 et 32). Tandis qu'avec l'acétate (6a), la meilleure conversion a été aboutit $C = 41\%$, avec un facteur de sélectivité plus modeste $E = 30$ (entrée 27).

Les chromatogrammes suivants montrent les résultats obtenus avec l'acétate 2a.





Série de chromatogrammes 5: Chromatogrammes de quelques résultats obtenus lors de la déacylation de l'acétate **2a** en présence de la Et_3N .

IV-4-3- Explications et hypothèses :

L'étude de la réaction déacylation par aminolyse catalysée par la *CAL-B*, confirment des résultats antérieurs obtenus lors de l'acylation enzymatique des arylalkyl carbinols correspondants aux acétates [**1a-7a**] ou l'augmentation de la quantité de la *CAL-B* joue en défaveur de la sélectivité et de la réactivité.¹⁶¹ Ce phénomène a été expliqué par le fait que l'augmentation de la quantité d'enzyme conduit à une présence plus importante de « l'eau constitutive » de l'enzyme, qui se trouve en concentration d'autant plus importante que la quantité d'enzyme est grande. Cette eau est un élément nécessaire à l'enzyme afin de lui assurer sa structure active optimale, mais l'excès d'eau, donnerait lieu à des réactions d'hydrolyse compétitives, ces réactions génèrent de l'acide carboxylique dans le milieu réactionnel, causant ainsi, une perturbation de la performance lipasique et une dénaturation probable de l'enzyme.¹⁶²

Ces observations sont confortées par les résultats enregistrés lors de l'aminolyse, notamment en étudiant l'impact de la quantité de la *CAL-B*. L'augmentation de la quantité de lipase dans le DIPE, solvant organique a caractère peu hydrophile, provoque une dispersion non-homogène des molécules d'eau autour de l'enzyme, entraînant ainsi une diminution de l'énantioselectivité pour certaine structures étudiées. La présence du tamis moléculaire régule

¹⁶¹ **Réf117:** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C.Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie*, **2011**, *14*, 978–986.

¹⁶² (a) C. Paizs, M. Tosa, C. Majdik, P. Tahtinen, F. D. Irimie, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 619 ; (b) D. Rotticci, T. Norin, K. Hult, *Org. Lett.*, **2000**, *2(10)*, 1373 ; (c) H.K. Weber, H. Weber, R.J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2635–2638.

l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel sans l'épuisée. Cela argumente la présence d'une compétition entre les deux nucléophiles présents dans le milieu réactionnel, l'eau et l'amine, le dernier responsable de la réaction de d'aminolyse (benzylamine et l'aniline comme amine), et le premier assure l'hydrolyse.

Si on examine le bilan de l'avancement de la déacylation du modèle de l'étude l'acétate **1a** on constate que dans les mêmes conditions opératoires: avec 12 mg de *CAL-B* et sans addition d'amine la conversion est de 13% (tableau 8, entrée 5), mais lors de l'addition de la Et_3N au milieu la conversion est presque triplée, sans perturber la sélectivité lipasique (tableau 8, entrée 8). Cela n'est pas le cas lors de l'ajout d'aniline et de benzylamine où on note une chute importante de la sélectivité de $E = 67$ à $E = 1$ (tableau 8, entrées 6 et 7). Cela indique que la nature de la base, est un facteur déterminant qui peut gêner le rôle de l'eau, nucléophile interne, plus faible que les amines, qui est responsable d'une déacylation hautement énantioselective et qui influence directement la sélectivité de la réaction.

En gardant un taux fixe de la Et_3N et en augmentant la quantité de la *CAL-B*, on augmente par conséquent la quantité de molécules d'eau présentes dans le milieu, on constate une augmentation de la conversion de la réaction qui est proportionnelle, sans aucun impact direct sur la sélectivité. Cela indique que l'eau et l'amine agissent mutuellement, pour déacyler sélectivement l'énantiomère (*R*)-. (Tableau 9 : entrée 1 versus 2, 4, 5). Cet effet apparait sur toute la gamme des divers acétates dédoublés, mais, jusqu'à un seuil bien spécifique à chaque structure.

IV-4-4-Deacylation versus acylation du 1-phenyléthyléthanol : Profil Cinétique des deacylation de l'acétate 1a :

Ces investigations qui traitent diverses approches de réaction de deacylation par dédoublement cinétique catalysés par la *CAL-B* dans un milieu non-aqueux, sont significatives concernant leur déroulement et mettent en exergue la présence d'une réaction compétitive et/ou parallèle de l'hydrolyse de l'acyl-enzyme ainsi que son impact sur la réactivité et la sélectivité de cette lipase. Nous avons complété cette étude par un suivi du profil cinétique des diverses réactions étudiées (*Schéma 68*).

- ↪ La déacylation par alcoololyse lipasique.
- ↪ La déacylation par hydrolyse lipasique en présence du carbonate de sodium.
- ↪ La déacylation en présence de la triéthylamine comme additif.

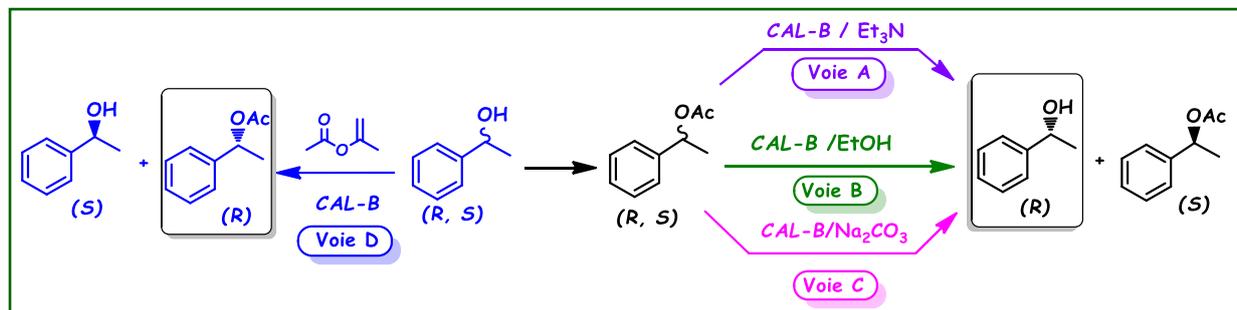


Schéma.68 : Déacylation versus acylation.

Nous avons étudié les différents paramètres pouvant intervenir sur le processus habituel d'un dédoublement cinétique enzymatique, en contrôlant le profil cinétique de la réaction, par la variation de la conversion et de la sélectivité en fonction du temps.

Pour ce faire, nous avons réalisé trois réactions de déacylation en milieu non aqueux :

Voie A : Aminolyse avec la triéthylamine, dans les conditions optimisées, qui sont pour 1 mmole d'acétate **1a**, et 2 mmole de Et_3N , avec 12 mg de *CAL-B* et 60 mg de MS 4Å dans 2ml de DIPE.

Voie B : Alcoololyse, en utilisant 2 mmole de l'EtOH comme nucléophile, avec 12 mg de *CAL-B* et 60 mg de MS 4Å dans 2ml de DIPE. Afin d'examiner l'impact de la force du nucléophile sur la réaction compétitive et/ou parallèle de l'hydrolyse assurée par les molécules d'eau apportées par le milieu réactionnel.

Voie C : Hydrolyse en milieu non aqueux assistée par le carbonate de sodium.¹⁶³ L'utilisation du THF, au lieu du toluène, le milieu dans lequel la réaction a été effectuée antérieurement, cela a permis une réduction du temps réactionnel pour la même conversion. Ces différentes voies de déacylation sont ensuite comparées au profil cinétique de la réaction d'acylation catalysée par la même lipase :

¹⁶³ Réf113 :M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, *23*, 823-833.

Voie D: Acylation du 1-phényléthanol par l'acétate d'isopropényle comme donneur d'acyle avec la CAL-B comme catalyseur dans l'éther).

Dans tous les cas, les réactions sont effectuées sur 4 mmoles de substrats racémiques de départ. L'évolution des réactions de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50 μ L du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur silice.

Les profils cinétiques des réactions de DCE sont représentés dans la **Figure 17**:

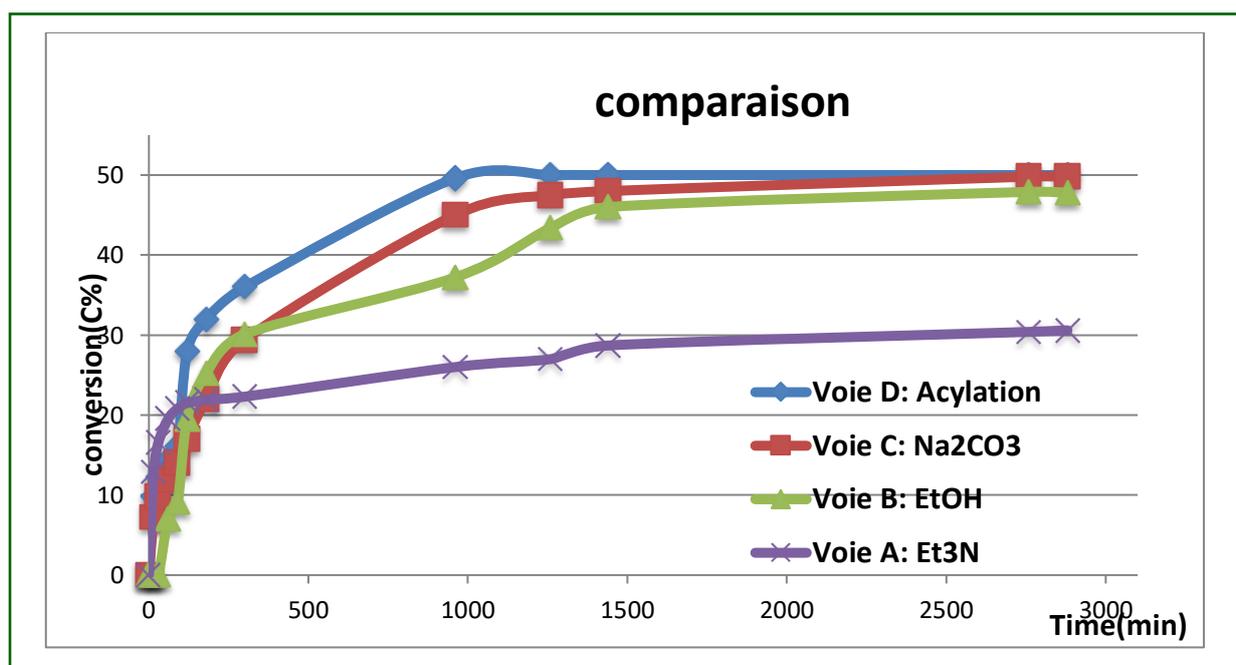


Figure 17 : Profile cinétique des différentes réactions de dédoublement cinétique lipasique étudiées.

Le profil de toutes ces réactions sont du type Michaelis-Menten, elles ont l'allure qui correspond à une réaction de DCE irréversible. La même vitesse initiale est observée pour les deux réactions de transestérification catalysée par la CAL-B : l'acylation, l'alcoolyse et l'hydrolyse, avec une conversion de 50% et une haute énantiosélectivité ($ee = 99\%$, et $E > 500$).

En présence de triéthylamine, nous enregistrons une vitesse initiale de la réaction de déacylation plus rapide comparée aux autres réactions. Cette effet peut être expliqué par une restriction de la compétition avec la réaction d'hydrolyse parallèle. Ainsi, c'est seulement avec l'amine, nucléophile le plus fort, que la réaction secondaire domine la déacylation de l'acétate

(**1a**) sans perturber l'énantiosélectivité de la *CAL-B*; et cela explique qu'en présence de la triéthylamine la déacylation bloque à 30% de conversion, avec un départ plus rapide.

Concernant les réactions d'hydrolyse alcaline (eau/ Na_2CO_3) et d'alcoolyse (eau/alcool), les deux nucléophiles coexistent et semblent fonctionner sans s'affecter l'un l'autre, ils assurent ainsi un fonctionnement de deux réactions parallèlement sans aucune interaction destructive d'un point de vue réactivité et sélectivité de la *CAL-B* aboutissant ainsi à 50% de conversion avec un facteur de sélectivité $E > 200$, en faveur de l'énantiomère (*R*).

Une parfaite énantiocomplémentarité est observée entre les réactions de transesterification : la déacylation par alcoolyse et acetylation, ou également entre l'hydrolyse alcaline / acetylation, d'où les quatre énantiomères alcools (**1**) et acétates (**1a**), sont obtenues énantiomériquement purs. Pour les deux réactions de trans-estérification, la déacylation par alcoolyse et l'acylation, une même vitesse initiale est observée pour parvenir à une conversion optimale du DCE $c = 50\%$ avec une sélectivité élevée ($ee = 99\%$, $E > 500$).

Les résultats de la conversion optimale pour chaque réaction sont représentés dans la **Figure 18**.

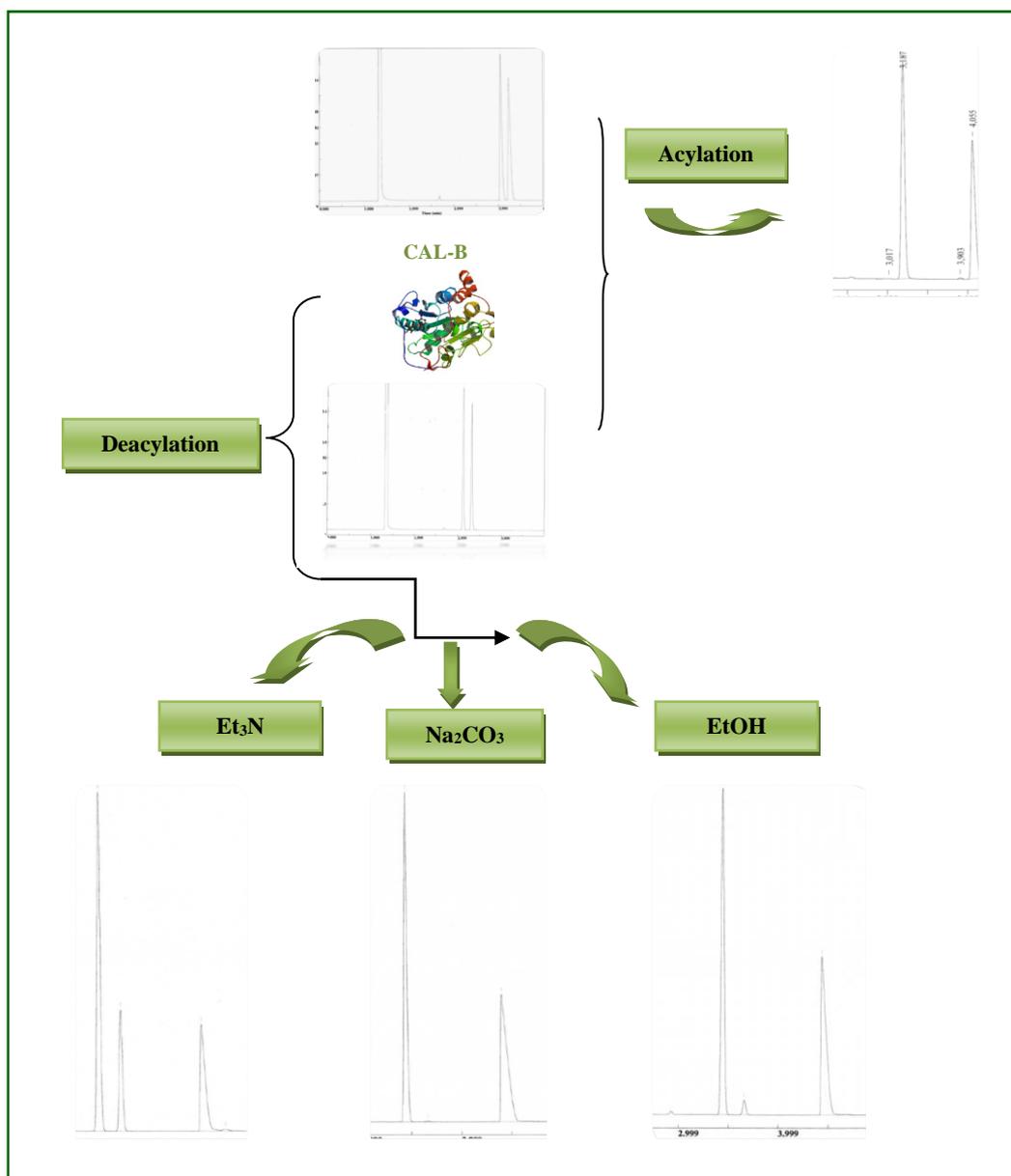


Figure 18 : Comparaison des approches de déacylation de **1a** avec l'acylation de l'alcool **1** catalysées par la CAL-B.

IV-5-Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons mis au point une nouvelle méthode de déacylation des acétates benzyliques dans un milieu non aqueux, en introduisant de la triéthylamine.

Nous avons étudié la réaction de déacetylation de l'acétate **1a** via une aminolyse catalysée par la CAL-B en milieu non aqueux avec trois amines. L'utilisation de la benzylamine et de l'aniline ne donne aucune sélectivité alors que l'ajout de triéthylamine permet la déacylation énantiosélective de l'acétate **1a**.

Nous avons examiné l'influence de la quantité de la *CAL-B* dans la réaction en introduisant de la triéthylamine comme additif au milieu réactionnel. L'étude de l'activité de l'eau est effectuée par l'introduction de tamis moléculaire lors de la déacylation des acétates benzyliques [**1a-7a**]. Les meilleurs résultats sont atteints pour des quantités de la *CAL-B* qui varie entre 24 mg et 35 mg selon la structure de l'acétate, et ce, dans 2 mL de DIPE. Le facteur de sélectivité enregistré est $E > 100$, en faveur de l'énantiomère (*R*)-alcool.

Des résultats surprenant sont obtenus en utilisant l'amine tertiaire Et_3N , cet additif offre une méthode de déacylation facile et efficace en milieu organique. Cette observation peut être corrélée avec le résultat obtenu lors de l'alcoolyse de la même série d'acétate en utilisant un alcool tertiaire : le tertibutanol, comme accepteur d'acyle.

Un suivi cinétique de cette réaction de déacylation en présence de la triéthylamine est réalisée et comparée aux profils cinétiques de deux autres réactions de déacylation en milieu non-aqueux : l'alcoolyse et l'hydrolyse assisté par le Na_2CO_3 . Le suivi cinétique permet de contrôler l'impact de la réaction d'hydrolyse compétitive et/ou parallèle qui est assuré par l'eau présente dans le milieu réactionnel. Cela nous conduit à suggérer que la réaction compétitive avance conjointement avec les réactions de déacylation avec une influence interactive sur la conversion et la sélectivité selon la force du nucléophile mise en jeu.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE V

AMINOLYSE LIPASIQUE DE QUELQUES ACIDES CARBOXYLIQUES ET DE LEURS DÉRIVÉS

V-1-Introduction:

La formation de la liaison amide est une transformation chimique très exploitée en chimie organique pour protéger la fonction amine. C'est ainsi que la liaison amide est omniprésente dans différentes molécules utilisées comme des intermédiaires clés pour la synthèse des composés d'intérêt potentiel dans différents domaines¹⁶⁴ tel que : thérapeutique, agroalimentaire et cosmétique. Les réactions de dédoublement cinétique lipasique des acides carboxyliques chiraux et achiraux par des amines chirales et achirales, avec les hydrolases sont très utilisées pour la séparation de leurs énantiomères.¹⁶⁵Ces biotransformations connaissent un vaste développement pour accéder à un grand nombre de molécules chirales d'intérêt potentiel¹⁶⁶ afin de réduire les enchaînements réactionnels, d'améliorer les rendements chimiques et d'optimiser la pureté énantiomérique des produits.

V-2-Objectifs de l'étude:

L'objectif de cette étude est la préparation d'amides énantiopures, présentant un intérêt potentiel en chimie thérapeutique ou en agrochimie par dédoublement cinétique lipasique. La mise en œuvre des procédés sélectifs permettant la préparation aisée de quantité substantielle de composés optiquement purs est particulièrement intéressante par le biais de processus biocatalytiques. Dans ce cadre, nous avons étudié deux voies de dédoublement cinétique enzymatique (*Schéma 69*):

✂ Formation de la liaison amide par aminolyse enzymatique directe d'acides carboxyliques et/ou de leurs esters correspondant racémique.

¹⁶⁴Réf96:(a) R. N. Patel; *Enzyme and Microbial Technology*,**2002**, 31,804–826; (b) A. Baldessari; C. P. Mangone,*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , **2001**,11, 335–341; (c) E. Brenner , R. Schneider , Y. Fort ,*Tetrahedron*, **2002**, 58 ,6913–6924 ; (d) J. A. Bender ,N. A. Meanwell, T. Wang,*Tetrahedron*, **2002**, 58 ,3111–3128;(e) T. Toyo'oka,*J. Biochem. Biophys. Methods*,**2002**,54,25–56.)

¹⁶⁵(a)Réf15(e) : C. Pilissao and M. da Graca Nascimento ,*Tetrahedron: Asymmetry* , **2006**,17 ,428–433.(b)Réf15(f) : A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**,46 ,4511–4514 ;(c)Réf15(g) : R. Irimescu and K. Kato ,*Tetrahedron Letters* ,**2004** , 45,523–525 ; (d)K. Faber, S.Riva. *Journal of Synthetic Organic Chemistry. Synthesis*. **October1992**, 895-910.

¹⁶⁶(a) B.Zhu & J.S. Panek, *Org. Lett.*, **2000**, 2(17),2575-2578;(b)Réf60(e) :T. Maugard, J. Tudella, D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*,**2000**,16, 358-362 ; (c) T. Maugard, M. D. Legoy, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **8**, **2000**, 275-280, (d)Réf60(f) :O. Mcconnell, A. bachii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. McDonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658–682.

✂ Amidification enzymatique des amines racémiques par divers donneurs d'acyle achiraux.

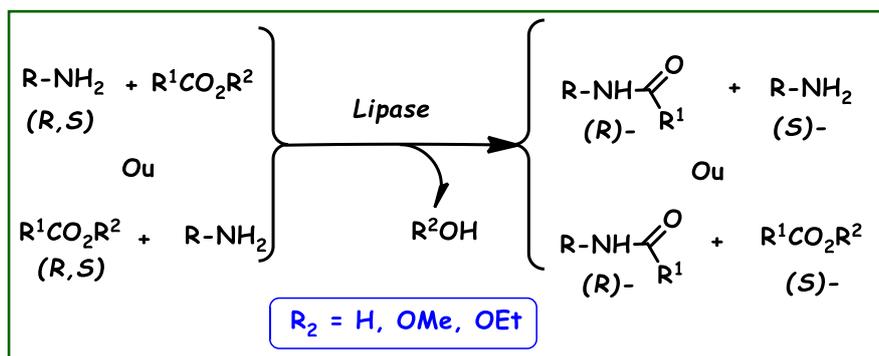


Schéma 69: Réactions d'investigation

V-3- DC par aminolyse lipasique d'acides carboxyliques racémiques et dérivés :

Cette étude s'articule autour la réaction de dédoublement cinétique par aminolyse enzymatique d'acides carboxyliques et de leurs dérivés esters en utilisant des amines primaires aromatiques. Le travail est axé sur l'étude des paramètres susceptibles d'influer d'une manière cruciale sur la réaction de DCE, la réactivité et la sélectivité enzymatiques. (Schéma70)

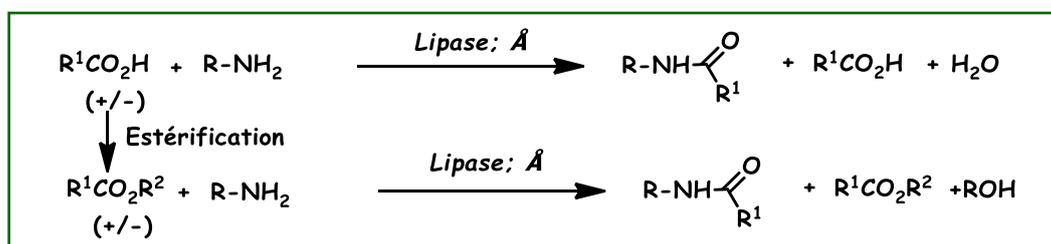


Schéma.70 : Aminolyse enzymatique des acides carboxyliques et de leurs dérivés.

Pour réaliser cette étude nous avons sélectionnée des acides carboxyliques appartenant à la famille des acides 2-arylpropioniques : **Profènes**.

Les Profènes appartiennent à la classe thérapeutique la plus utilisée à travers le monde, celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ils portent un carbone asymétrique C2, d'où

l'existence de deux énantiomères le (*R*)-(-)- et le (*S*)-(+)-. (*R*)-(-)-profène est quasiment inactif au plan thérapeutique contrairement au (*S*)-(+)-.

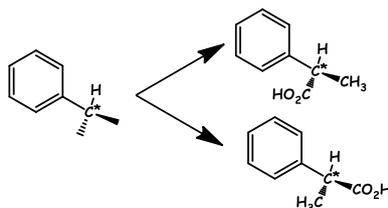


Schéma 71: Structure générale des profènes

Lors de leur mécanisme d'action, les molécules des profènes subissent une inversion chirale par voie métabolique, phénomène unidimensionnel qui voit la transformation métabolique du profène de configuration (*R*)-(-)- en son antipode optique le (*S*)-(+)-. On distingue une douzaine de profène commercialisés en union européenne sous forme racémique à l'exception du naproxène.¹⁶⁷(Schéma 72)

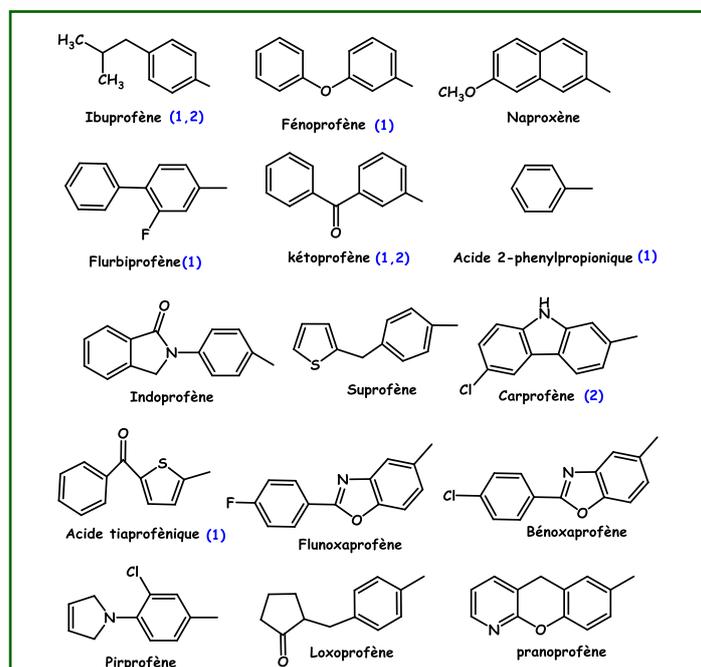


Schéma 72: Structure des différents profènes.

V-3-1-Aperçu bibliographique:

La recherche des méthodes biocatalytiques efficaces pour la conception des profènes énantiomériquement enrichis ne cesse à se progresser.¹⁶⁸L'essentiel des méthodes décrites exploitent des lipases et impliquent l'estérification et l'hydrolyse. (Schéma 73)

¹⁶⁷(a) J. M. Mayer ; *Acta pharmaceutica Nordica* ; **1990** ; 2 ; 197-216. (b) J. M. Mayer , M. Moy-DeVos, C. Audergon, B. Testa ,J. C. Etter, *International Journal of Tissue Reactions*, **1994**, 16, 59-72.

¹⁶⁸(a) Réf14(c) : F. van Rantwijk, M. A. Hacking, & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131(6), 549-569; (b) G. De Crescenzo, A. Ducret, M. Trani & R. Lortie, *Journal of Molecular*

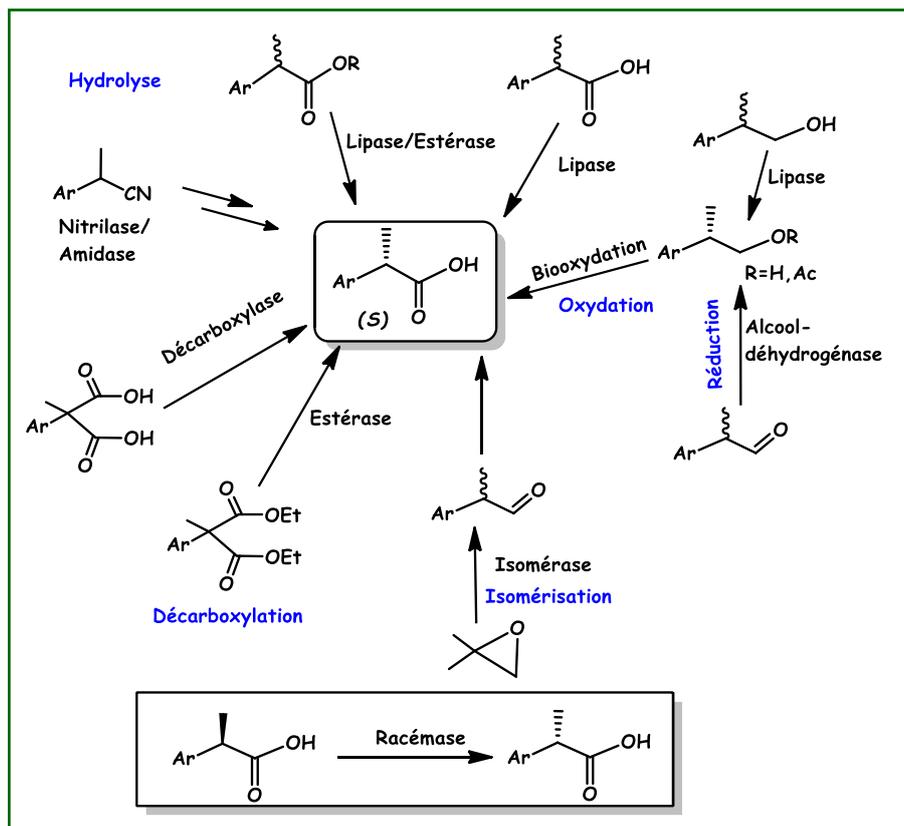


Schéma.73: Différentes voies biocatalytiques pour la conception des profènes

Nous citons ici quelques exemples de la littérature :

✂ L'influence de l'hydrophobicité du solvant se révèle nettement lors de l'estérification de l'ibuprofène par le méthanol en utilisant différents solvants ayant des Log P variables en présence de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL)¹⁶⁹ (**Schéma 74**).

Les résultats obtenus ont montré que la sélectivité et la réactivité de la CCL augmentent lorsque le caractère hydrophobe est plus prononcé. La lipase est hautement performante dans l'heptane C=46.5% et E>500.

Catalysis B: Enzymatic, **2000**,9(1), 49-56;(c)Réf89(c) : R.Kourist, P. D.de María, & K. Miyamoto,*Green Chemistry*, **2011**,13(10), 2607-2618.

¹⁶⁹Réf106 : M. G. Kim & S. B. Lee, *journal of Fermentation and Bioengineering*,**1996**,81, 269-271.

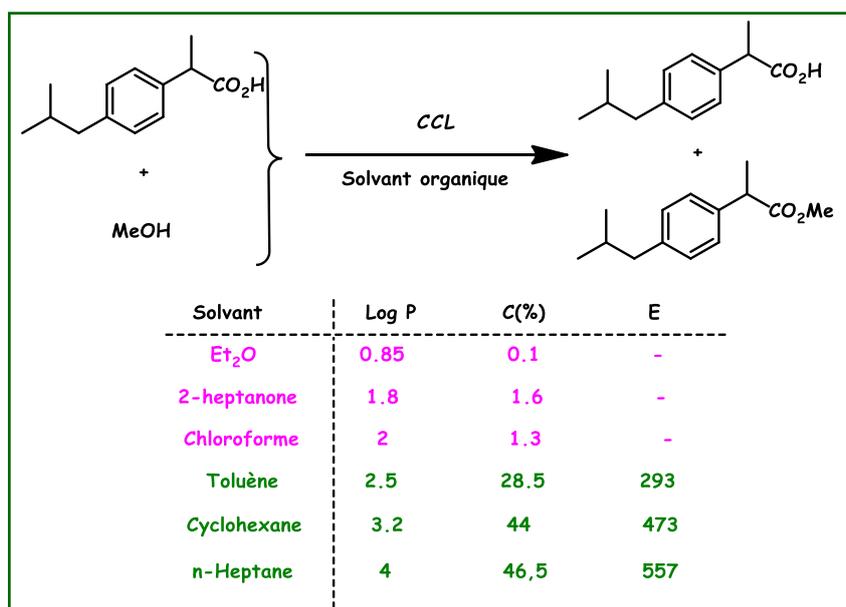


Schéma 74: Estérification lipasique de l'ibuprofène par le méthanol dans différents solvants.

✂ Une étude de l'alkoolyse enzymatique de dérivés de l'ibuprofène, a montré un effet significatif de la nature du substrat sur la réactivité de la *CAL-B* ainsi que le temps réactionnel de cette biotransformation. Cela, se révèle bien, en présence de la liaison vinylique du substrat ester sur la conversion et la durée de la réaction¹⁷⁰(Schéma.75)

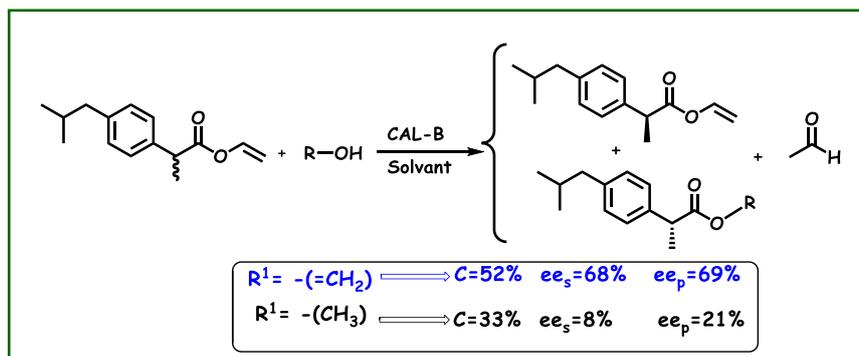


Schéma.75: Influence de la structure du substrat lors de l'alkoolyse lipasique.

D'après les travaux décrits dans la littérature, l'aminolyse des acides 2-arylpropionique est peu étudiée.

V-3-2- Les modèles de l'étude :

Pour mener l'étude nous avons choisis quatre acides carboxyliques racémiques : l'acide 2-(4-isobutylphényl) propionique (*Ibuprofène*) **10**, l'acide 2-(2-fluorobiphényl-4-yl) propionique

¹⁷⁰Réf100 :E.Henke, Schuster, H.Yang, U.T.Bornscheuer, *Monstsheftfürchimie*, **2000**, 131, 633-638.

(*Fluribuprofène*) **11**, l'acide 2-(3-benzoylphényl) propionique (*Ketoprofène*) **12** et l'acide 2-phenoxypropionique **13**. Ainsi que leurs esters correspondants (*Schéma 76*).

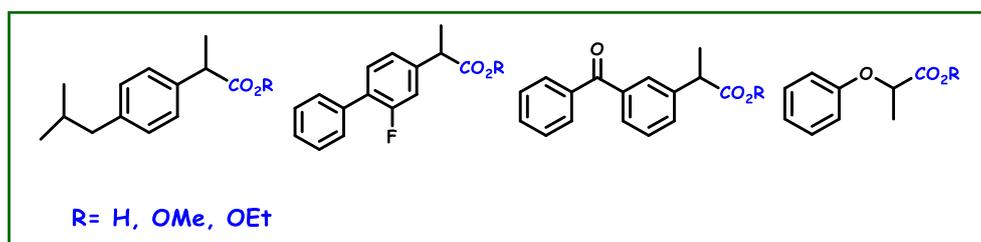


Schéma.76 :Acides carboxyliques et leurs dérivés esters choisis.

L'étude préliminaire est réalisée sur l'ibuprofène, en présence de la *CAL-B* comme lipase, et en utilisant l'aniline comme amine primaire.

V-3-3-Synthèse des racémiques :

Les acides carboxyliques choisis sont commerciaux, à l'exception de l'ibuprofène, acheté sous forme sel, l'acide est récupéré propre, sous forme de cristaux blancs, avec un rendement chimique de 91% après une simple acidification (*Schéma 77*).

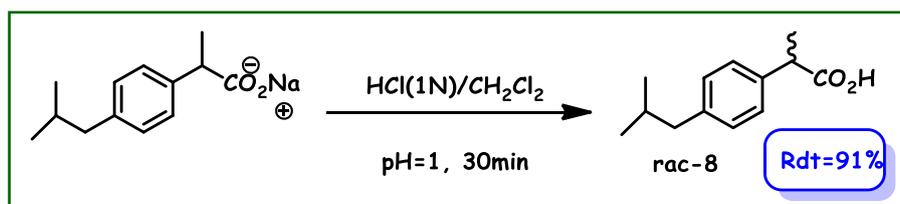


Schéma.77 :Acidification des sels de l'ibuprofène.

V-3-3-a-Synthèse des esters d'Ibuprofène racémiques (Estérification de Fischer) :

L'ester d'ibuprofène racémique a été obtenu par une estérification de Fischer, par couplage de l'acide racémique avec l'éthanol, ou le Méthanol, dans un milieu acide. Une portion du tamis moléculaire est ajoutée afin de déplacer l'équilibre chimique vers la formation de l'ester (*Schéma 78*). Les esters sont récupérés sous forme d'une huile incolore avec un bon rendement chimique.

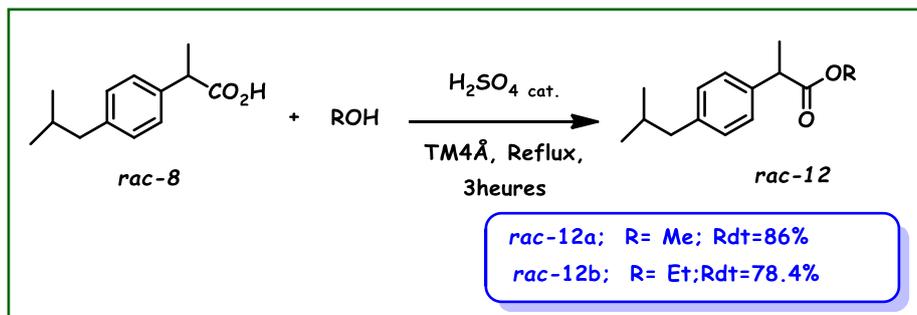


Schéma.78: Synthèse des esters d'ibuprofène racémiques.

V-3-3-b-Synthèse des amidoprofènes racémiques :

Les amides racémiques, qui servent comme références pour les analyses chirales, sont synthétisés par couplage direct entre l'acide carboxylique et l'amine primaire, en présence d'un agent de couplage, le DDC, dans le dichlorométhane (*schéma 79*).

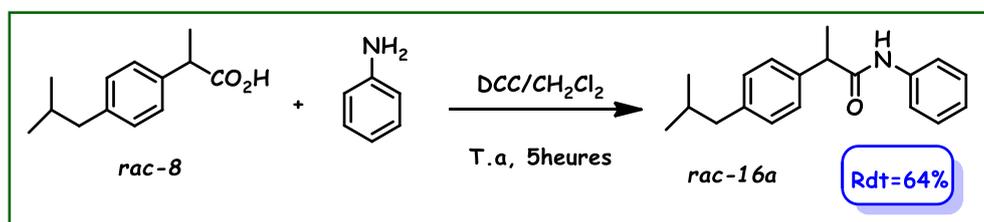


Schéma.79: Synthèse de l'amidoprofène racémique 12a

L'amide a été récupéré sous forme de cristaux blancs après une cristallisation dans l'hexane à froid, avec un modeste rendement chimique.

✂ Amélioration des rendements chimiques :

Afin d'optimiser le rendement chimique de l'amide **16a**, nous avons remplacé le dichlorométhane par le chloroforme. Cela, nous a permis d'obtenir l'amide désiré avec de meilleur rendement chimique, quantitativement, Rdt>90%, et ce après une simple cristallisation. Par la suite, nous avons réalisé le reste des synthèses d'amides dans le chloroforme. Nous avons réalisé le couplage par différentes amines : l'aniline, le p-toluidine, le 4-trifluoroaniline et la benzylamine (*schéma 80*).

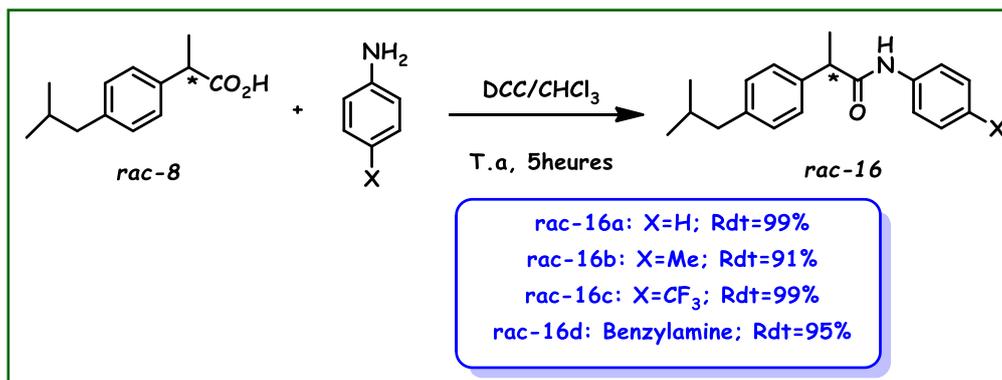


Schéma.80 : Optimisation des rendements chimiques des amidoprofènes synthétisés.

Les amidoprofènes synthétisés sont obtenus sous forme solide blancs après recristallisation dans l'hexane.

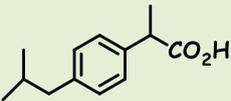
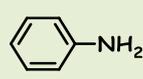
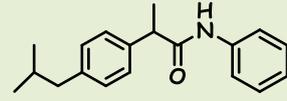
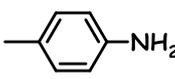
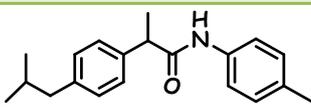
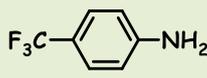
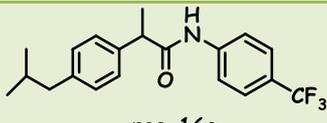
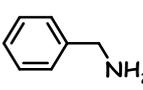
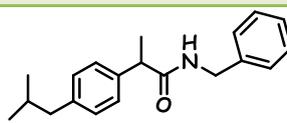
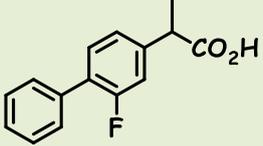
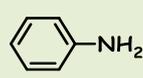
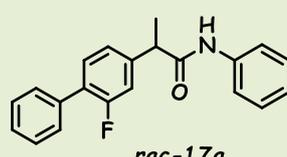
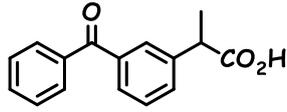
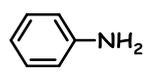
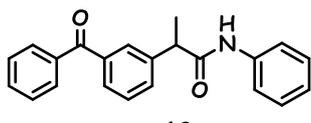
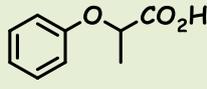
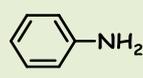
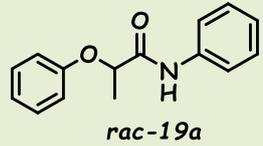
Les amidoprofènes synthétisés sont obtenus avec des rendements qui varient entre 99% et 70%, selon la substitution en position *para*- du noyau aromatique de l'amine utilisée. Les rendements obtenus sont mentionnés dans le **Tableau 10**.

Une revue de la littérature et une recherche sur les bases de données spécialisée nous a permis de constater que la structure **16c** est originale.

Les structures de tous les racémiques synthétisés sont confirmées par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C.

Les énantiomères des racémiques synthétisés sont séparés par HPLC chirale.

Tableau 10: Structures et rendement chimiques des amidoprophènes synthétisés

Entrée	Acide carboxylique chiral	Amine achirale	Amide	Rdt (%)
1	 <i>rac-8</i>		 <i>rac-16a</i>	99
2			 <i>rac-16b</i>	91
3			 <i>rac-16c</i>	70
4			 <i>rac-16d</i>	95
5	 <i>rac-9</i>		 <i>rac-17a</i>	99
6	 <i>rac-10</i>		 <i>rac-18a</i>	98
7	 <i>rac-11</i>		 <i>rac-19a</i>	93

V-3-4- Mise au point de la réaction de DC par aminolyse lipasique des acides chiraux :

La recherche des conditions optimales de la réaction d'aminolyse des acides carboxyliques a été effectuée sur l'ibuprofène comme substrat modèle. Nous avons étudié trois paramètres ayant une influence cruciale sur la réaction de DCE :

- ↪ Effet de la quantité d'eau (Tamis moléculaire)
- ↪ Effet de la quantité de la CAL-B.

- ↪ Influence de la concentration du milieu réactionnel.
- ↪ Effet de l'introduction des additifs.

La réaction d'aminolyse d'ibuprofène par l'aniline est menée sur 1mmole d'acide d'ibuprofène, 2mmoles d'aniline, en présence d'une quantité catalytique de *CAL-B* dans 1mL de solvant organique hydrophobe ayant un LogP=4, qui est l'heptane. Le mélange réactionnel est thermostaté à 80°C, durant 72 heures (*schéma 81*).

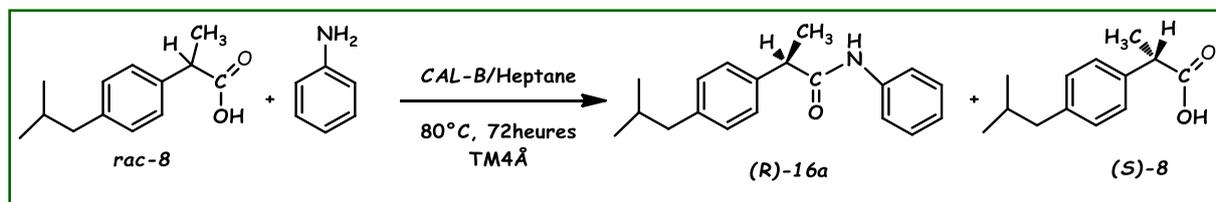


Schéma.81 : Aminolyse lipasique de l'ibuprofène par l'aniline.

Après 72heures d'agitation, la lipase est filtrée, l'amide formé et l'acide résiduel sont récupérés par une simple extraction liquide-liquide (Acido-basique). Les rendements chimiques sont évalués après séchage est évaporation sous vide. Les excès énantiomériques des amides formés et des acides résiduels sont évalués par HPLC chirale après la dérivation de ce dernier en son amide correspondant.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **Tableau 11** :

Tableau 11: Etude de la réaction d'aminolyse de l'ibuprofène par l'aniline.

Entrée	Qté TM 4Å (mg)	Qté CAL-B (mg)	ee _p (%) ^(h) Rdt(%) ^(c)		ee _s (%) ^(h) Rdt(%) ^(c)		C (%) ⁽ⁱ⁾	E ⁽ⁱ⁾
1	sans ^(a)	sans	-	19	-	77.5	-	-
2	sans ^(a)	12,5	0.9	29	1.4	68	60	1
3	sans ^(b)	50	1	31	0.4	38.3	29	1
4	sans ^(a)	50	0.7	44	0.4	39.3	38	1
5	200 ^(a)	50	36.7	9	1.7	39.3	5	2
6	100 ^(a)	50	0.4	18	0.3	21.8	60	1
7	50 ^(a)	50	1	35	1	52.4	47	1
8	50 ^{(a), (d)}	50	0.4	7.5	0.5	36	49.4	1
9	50 ^{(a), (e)}	50	0.6	28	4	35.5	86.8	1
10	50 ^{(a), (f)}	50	2.8	38	5.223		64.8	1
11	50 ^{(a), (g)}	50	3	21	2.442		45	1

(a) 1mmole d'acide avec 2mmoles d'aniline dans 1mL d'heptane à 80°C durant 72heures.

(b) 1mmole d'acide avec 2mmoles d'aniline dans 0,5mL d'heptane à 80°C durant 72heures.

(c) Rendements chimiques isolés après extraction liquide-liquide.

(d) 5mol % Cinchonidine

(e) 5mol% β-Cyclodextrine

(f) 10mol% β-Cyclodextrine

(g) 30mol% β-Cyclodextrine

(h) Excès énantiomérique des acétates résiduels et d'alcools produits sont évalués par HPLC chirale

(i) Conversion : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivity: $E = \ln [(1-C) (1-ee_s)] / \ln [(1-C) (1+ee_s)]$

Les résultats du **Tableau 11** montrent que la CAL-B n'est pas sélective sous les conditions appliquées lors de l'aminolyse lipasique de l'ibuprofène. L'avancement de la réaction dépend à la fois de la quantité de la lipase et du tamis moléculaire, ainsi que de la quantité et de la nature de l'additif introduit dans le milieu réactionnel.

Sans introduction du tamis moléculaire, avec un taux de 12,5mg/1ml (CAL-B/Heptane), une chute de la conversion est notée (entrée 2 vs. 4). En introduisant 200 mg de tamis moléculaire, avec un taux de 50 mg/1ml (CAL-B/Heptane) la conversion chute avec une importante augmentation de l'excès énantiomérique de l'amide formé, ce qui montre l'effet bénéfique de la présence du tamis moléculaire pour la régulation de quantité d'eau dans le milieu réactionnel (entrée 2 vs. 5).

La diminution de la quantité du tamis moléculaire de 200 mg à 50 mg améliore nettement à la fois la conversion et les rendements chimiques isolés (entrées 5, 6 et 7).

On constate que les meilleures conditions opératoires sont pour une quantité de lipase et de tamis moléculaire en proportion équivalentes (50/50 mg) dans de 1mL de solvant pour dédoubler 1mmole d'acide.

Par ailleurs, l'introduction des additifs influence significativement la réactivité lipasique sans intervenir sur l'énantiosélectivité. L'addition de 5mol% de cinchonidine montre aucun effet sur la sélectivité ou la réactivité (entrée 7 vs. 8). Par contre, l'addition de 5mol% de la β -cyclodextrine améliore beaucoup la conversion $c = 86.6\%$ (entrée 9). L'augmentation du pourcentage de cet additif à 30mol% joue en défaveur de la conversion, son effet s'estompe (entrées 9,10 et 11).

V-3-5- Scope de la réaction d'aminolyse sur quelques acides et dérivés esters :

Nous avons appliqué les conditions optimisées de la réaction sur quelques acides carboxyliques choisis et leurs esters correspondants (*Schéma 82*). La réaction d'aminolyse est menée sur 1mmole d'acide ou d'ester, 2mmoles d'aniline, en présence de 50mg de CAL-B dans 1mL d'heptane. Le mélange réactionnel est thermostaté à 80°C, durant 72 heures.

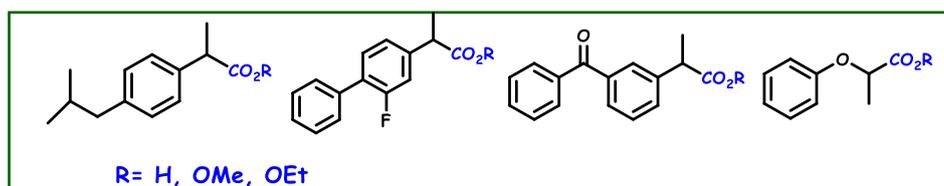
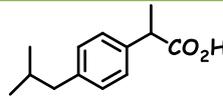
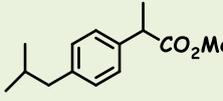
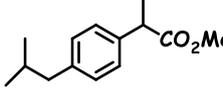
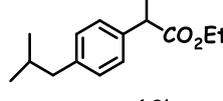
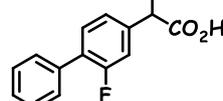
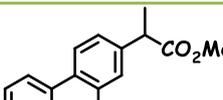
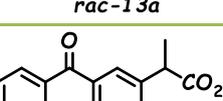
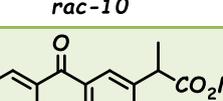
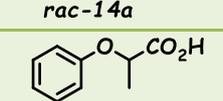
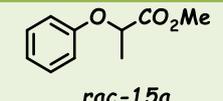


Schéma.82 : Acides et esters carboxyliques choisis.

Après trois jours d'agitation, la lipase est filtrée, l'amide formé et l'acide résiduel sont récupérés par une simple extraction liquide-liquide (acido-basique). L'amide formé et l'ester résiduel sont récupérés après une chromatographie sur gel de silice, en utilisant comme éluant : Ether de pétrole/ AcOEt (80/20). Les rendements chimiques sont évalués après séchage est évaporation sous vide. Les excès énantiomériques des amides formés et des acides (esters) résiduels sont évalués par HPLC chirale après la dérivation de ce dernier en son amide correspondant. Les résultats obtenus sont réunis dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Application des conditions optimales de la réaction d'aminolyse d'acides et d'esters carboxyliques par l'aniline.

Entrée	Substrat	ee _p (%)(^c)	Rdt(%)(^d)	ee _s (%)(^c)	Rdt(%)(^d)	C (%) ^(e)	E ^(e)
1 ^(a)	 <i>rac-8</i>	1	35	1	52.4	47	1
2 ^(a)	 <i>rac-12a</i>	7.6	50	2.8	9	72.7	1
3 ^(b)	 <i>rac-12a</i>	19.1	22	5.4	40	22	1
4 ^(a)	 <i>rac-12b</i>	NR	-	NR	-	NR	-
5 ^(a)	 <i>rac-9</i>	2.7	-	1.1	-	28.5	1
6 ^(a)	 <i>rac-13a</i>	NR	-	NR	-	NR	-
7 ^(a)	 <i>rac-10</i>	5.8	-	4.3	-	42.4	1
8 ^(a)	 <i>rac-14a</i>	2.7	20	6.2	32	70	1
9 ^(a)	 <i>rac-11</i>	-	-	-	-	100	-
10 ^(a)	 <i>rac-15a</i>	8.2	90	99	4	92	5

(a) 1mmole d'acide (ester) avec 2mmoles d'aniline dans 1ml d'heptane à 80°C durant 72heures.

(b) 1mmole d'acide avec 2mmoles d'aniline dans un mélange heptane/acétonitrile (0.8/0.2) à 80°C durant 72heures.

(c) Excès énantiomérique des acétates résiduels et d'alcools produits sont évalués par HPLC chirale

(d) Rendements chimiques isolés après extraction liquide-liquide, ou chromatographie sur gel de silice.

(e) Conversion : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Sélectivité: $E = \ln [(1-C) (1-ee_s)] / \ln [(1-C) (1+ee_s)]$

Les résultats du **Tableau 12** montrent une influence importante de la structure de l'acide sur l'avancement de l'aminolyse lipasique, avec toujours, une faible sélectivité. D'autre part la réactivité de la *CAL-B* lors l'aminolyse des esters est plus importante que celle enregistrée avec les acides.

Pour les acides : Avec le ketoprofène **10**, nous enregistrons la même conversion que celle obtenue avec l'ibuprofène **8**, C=42.4% et C=47% avec E=1 (entrées 1 et 7). Avec le fluribuprofène **9**, une modeste conversion est notée C= 28.5% (entrée 5), tandis qu'avec la structure **11**, nous obtenons une conversion totale de l'acide amide correspondante (entrée 9). Cela est peut être attribué au motif lié au noyau aromatique : des aryles pour les structures **8, 9** et **10**, et aryloxy- pour la structure **11**.

Pour les esters : Avec l'ester **12b**, aucun avancement n'a été observé après 72 heures d'agitation, tandis qu'avec l'ester **12a**, une conversion de 72.7 % est enregistrée (entrée 4 vs. 2). En additionnant un pourcentage d'acétonitrile (0.8/0.2 mL) la conversion chute à 22% (entrée 3 vs.1). Avec la structure **12a**, on obtient une conversion de 70%, alors qu'avec l'ester **15a** on obtient une conversion de 92% (entrée 5).

En effet, la réactivité est identique vis-à-vis l'acide et de son ester correspondant lors de l'aminolyse catalysée par la *CAL-B*.

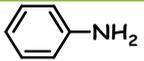
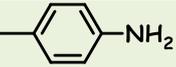
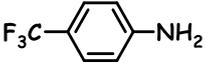
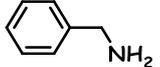
A notre connaissance, il est à mentionné que le résultat de l'aminolyse directe de l'acide 2-phenoxypropionique **13**, avec une amine aromatique catalysée par la *CAL-B*, n'a jamais été mentionnée auparavant. Il en est de même avec tous les esters : **12a, 13a, 14a** et **15a**, où la conversion en amide correspondant est consistante.

On peut dire que la réaction d'aminolyse catalysée par la *CAL-B* est une voie aisée et économe en atome pour la génération d'une liaison amide directement à partir d'un couplage acide-amine ou ester-acide dans un solvant classé comme vert. Ce résultat ouvre de nouvelles investigations pour la synthèse des amides via un couplage directe acide-amine, dans des conditions respectueuses de l'environnement.

V-3-6- Aminolyse de l'ibuprofène par différentes amines :

Afin d'optimiser la sélectivité lipasique, nous avons envisagé d'examiner l'effet de la structure de l'amine. Pour ce faire, nous appliquée les mêmes conditions opératoires, optimisées précédemment, et nous avons sélectionné des anilines avec différentes substitutions ainsi que la benzylamine. Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 13**:

Tableau 13: Aminolyse lipasique de l'Ibuprofène par différentes amines.

Entrée	Amine ^(a)	ee _p (%) ^(b)	ee _s (%) ^(b)	C (%) ^(c)	E ^(c)
1		1	1	47	1
2		5.3	0.2	96	1
3		1.4	4.1	75	1
4		99.9	2.4	2.3	> 200

(a) 1mmole d'acide (ester) avec 2mmoles d'aniline dans 1mL d'heptane à 80°C durant 72heures.

(b) Excès énantiomérique des acétates résiduels et d'alcools produits sont évalués par HPLC chirale

(c) Conversion : $C = ee_s / ee_p + ee_s$; Selectivité: $E = \ln [(1-C) (1-ee_s)] / \ln [(1-C) (1+ee_s)]$

L'utilisation d'anilines avec des substituants électrodonneurs en position *para*- du noyau aromatique joue considérablement en faveur de la formation de la liaison amide, mais sans au détriment de la sélectivité de la **CAL-B** (entrées 2 et 3 Vs. 1). Les amides **16a**, **17a**, **19a** sont obtenus avec des rendements qui varient entre 47% et 96%.

D'autre part l'utilisation d'une amine benzylique, offre l'amide enantiomériquement pure mais avec une très faible conversion $c = 2,3\%$ (entrée 4).

Suite à ces résultats nous avons poursuivi l'étude du dédoublement d'amines benzyliques racémiques en utilisant des acides carboxyliques aliphatique et benzylique achiraux, et ce, afin de comprendre l'influence structurale du donneur d'acyle et de la molécule à dédoubler, sur la performance catalytique de la CAL-B.

V-4- DC par amidification lipasique d'amines chirales:

Nous avons étudié la réaction de dédoublement cinétique par amidification enzymatique de deux amines primaires, une benzylique : *1-phényléthanamine***20**, et une aliphatique : *pentan-2-amine***22**, et ce, en examinant l'impact de la modulation de quelques paramètres susceptibles d'influer d'une manière cruciale sur le déroulement de la réaction de DCE et sur la sélectivité lipasique, tel que : la nature de l'enzyme, la nature du donneur d'acyle, l'hydrophobicité du solvant organique et même la structure de l'amine elle-même. (*Schéma 83*)

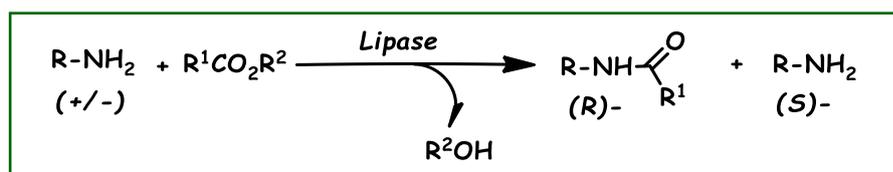


Schéma.83 : Réaction de DC par amidification enzymatique à étudier.

V-4-1- Aperçu bibliographique :

Nous citons quelques exemples de la littérature, qui montrent l'influence de quelques paramètres pouvant moduler la réaction de dédoublement cinétique lipasique.

V-4-1- a- Influence de la nature de l'enzyme :

L'activité et l'énantiosélectivité varient d'une enzyme à une autre et grâce à leur stéréospécificité, les enzymes ne peuvent pas donner des résultats identiques avec le même substrat.

L'exemple suivant, montre l'influence de la nature de l'enzyme lors du DCE d'une amine primaire avec l'acétate d'éthyle¹⁷¹. (*Schéma 84*)

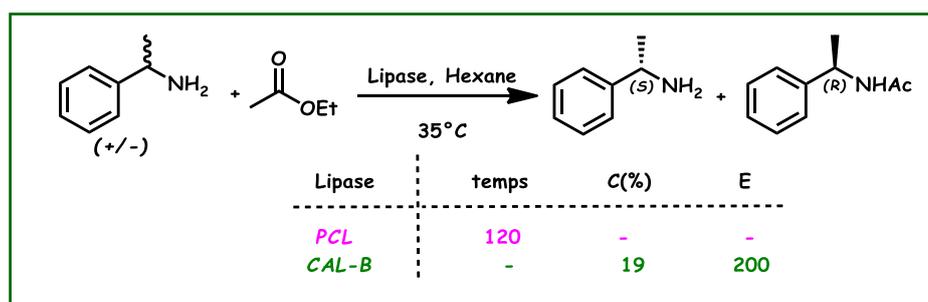


Schéma 84: DCE du Phényléthanamine par l'AcOEt.

¹⁷¹Ref85: C. Pilissao, *Process Biochemistry*, **2009**, *44*, 1352–1357.

La *CAL-B* donne un avancement de 19%, en faveur de l'énantiomère acétamide (*R*)-, tandis que la *PCL* reste totalement inactive, et ce, après cinq jours de réaction.

V-4-1- b- Influence de la nature du solvant :

Le solvant joue un rôle important dans les réactions de DCE. Plusieurs travaux ont montré l'utilité de choisir des solvants qui contiennent un minimum d'eau pour que l'enzyme fonctionne dans les milieux organiques¹⁷². Des tests préalables doivent être effectués sur une gamme de solvants pour chaque réaction de dédoublement enzymatique.

L'exemple suivant, montre clairement l'effet de l'hydrophobicité du solvant organique, sur la sélectivité et la réactivité de la *CAL-B* lors du dédoublement cinétique du 2-méthylindoline par le biais du diallyl carbonate¹⁷³. (*Schéma 85*)

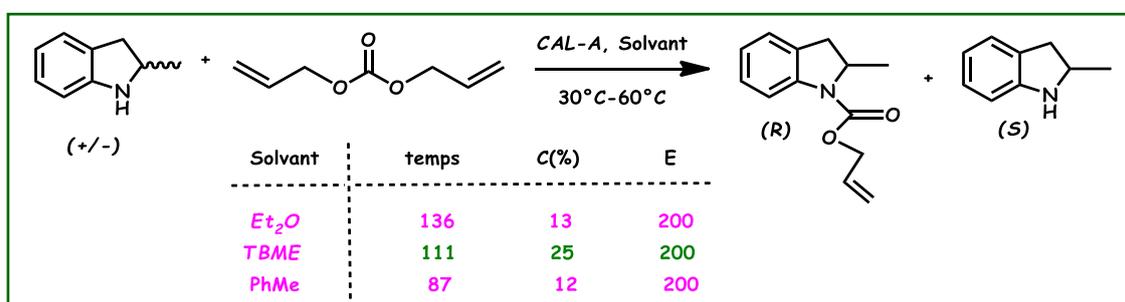


Schéma 85: DCE du 2-méthylindoline dans différents solvants.

Les meilleurs résultats, en matière de réactivité, ont été obtenus avec le *tertio*-butylméthyl éther comme solvant organique après presque 5 jours d'agitation à 45°C. Ce solvant est moins hydrophile que l'éther, où la réaction prend plus du temps pour aboutir seulement le seuil de 13% de conversion. Tandis qu'avec le toluène qui est plus hydrophobe que les deux solvants éthers, une conversion de 12% est atteinte en une durée plus courte.

¹⁷²(a) A. M. Klivanov, *chem.Tech.*, **1986**, 16, 354-359; (b) A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768.

¹⁷³ V. Gotor-Fernandez, P. Fernandez-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 2558-2564

V-4-1- c- Influence de la nature du substrat :

Lors de l'amidification de quelques amines benzyliques primaires par l'acide 4-pentenoïque catalysée par la CAL-B, un effet important de l'éloignement de la fonction amine primaire du centre stéréogène a été remarquée.¹⁷⁴ (**Schéma 86**)

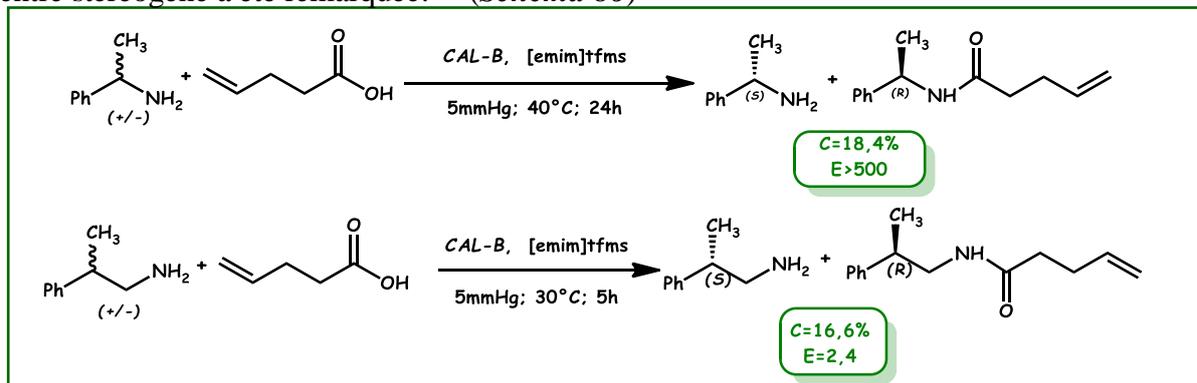


Schéma 86: Amidification d'amines primaires par l'acide 4-pentenoïque.

Une excellente énantiosélectivité a été obtenue avec le 1-phényl-2-aminopropane avec un E > 500. Cette dernière chute, considérablement, lors du DCE du 2-phénylpropan-1-amine, et ce, pour le même taux d'avancement.

V-4-1- d- Influence de la nature du donneur d'acyle :

L'influence de la nature du donneur d'acyle, est liée à d'autres paramètres combinés, tels que : la nature du substrat et celle du solvant.

L'exemple suivant montre une influence significative de l'allongement de la chaîne du radical -R du donneur d'acyle sur le DCE du 4-phényl-2-butanamine¹⁷⁵. (**Schéma 87**)

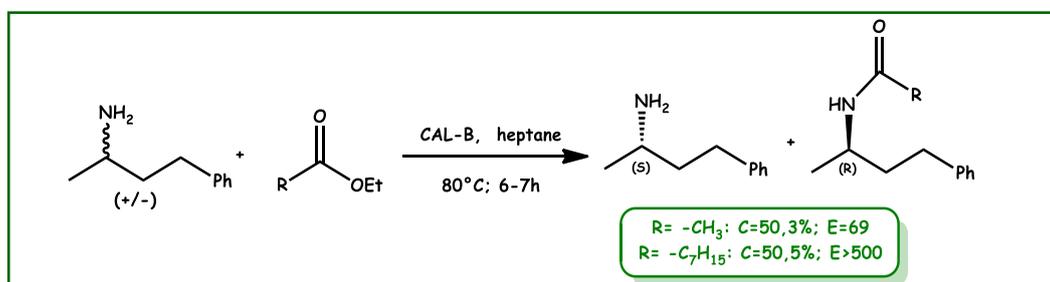


Schéma 87: DCE du 4-phényl-2-butanamine.

Les auteurs ont noté que plus le radical est allongé, plus la sélectivité s'accroît, et cela est probablement dû à la possibilité de rapprochement vers le site actif lipasique de la CAL-B. Cela explique que pour les chaînes plus longues, la sélectivité de la lipase est meilleure.

¹⁷⁴ Réf 97 : R. Irimescu, K. Kato; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 30, 189–194.

¹⁷⁵ Nechab ; *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6918-6923.

Un autre exemple, montre que l'utilisation de l'isopropylméthoxyacétate comme donneur d'acyle lors de l'amidation du 1-phényléthanamine catalysée par la CAL-B, donne les meilleurs résultats en matière de réactivité et de sélectivité.¹⁷⁶ (Schéma 88)

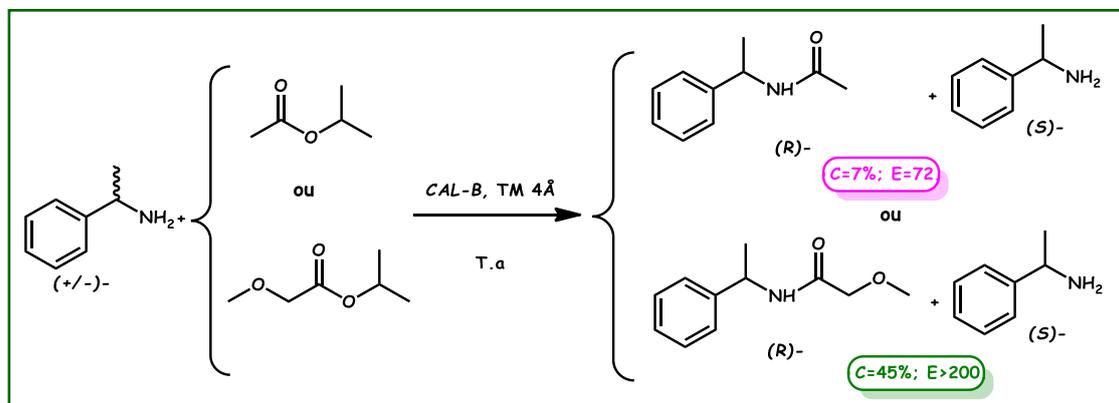


Schéma 88: DCE du 1-phényléthanamine par le biais de la CAL-B.

Les auteurs remarquent une nette optimisation de la réactivité et de la sélectivité, en utilisant l'isopropylméthoxyacétate de C=7% et E=72 à C=45% et E> 500. Cela est dû probablement au fait que le l'isopropylméthoxyacétate est un agent acétylant plus réactif que l'acétate d'isopropyle, et ce, par la présence d'un groupement $-OMe$.

V-4-2- Choix des modèles de l'étude :

● Choix des amines :

Pour réaliser cette étude, deux amines primaires sont choisies, une benzylique et une aliphatique ayant une fonction amine primaire en position α - du centre stéréogène. (Schéma 89):

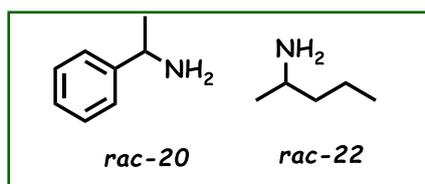
↪ **Le 1-phényléthanamine 20** : utilisée comme auxiliaire très puissant dans les synthèses asymétriques industrielles, et également, en tant qu'additif chiral.¹⁷⁷

↪ **Le pentan-2-amine 22**: précurseur de synthèse des composés biologiquement actifs.¹⁷⁸

¹⁷⁶ Réf142: M. Päiviö, P. Perkiö, L. T. Kanerva, *Tetrahedron Asymmetry*, **2012**, 23, 230-236.

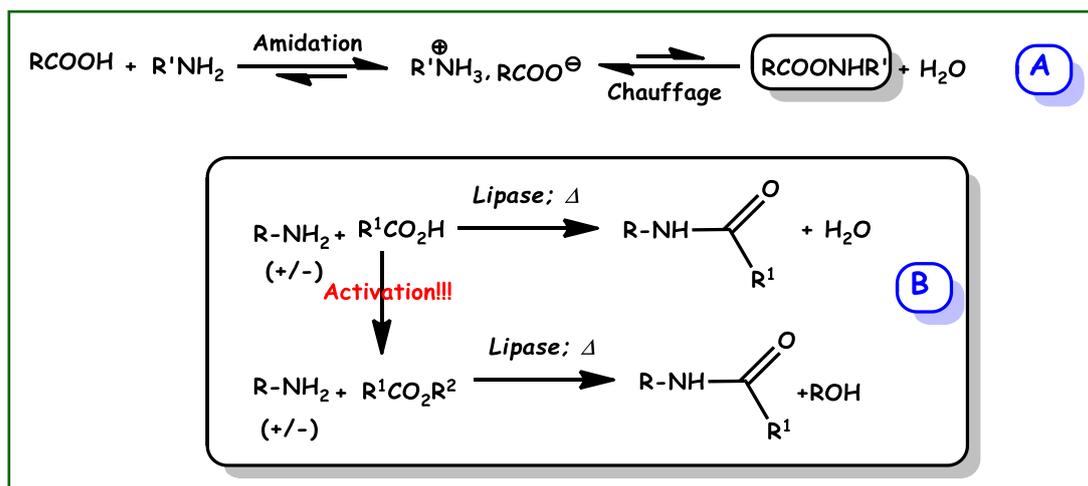
¹⁷⁷ (a) E. Juaristi, J. L. León-Romo, A. Reyes, J. Escalante, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 2441-2495; (b) A. Torres-Gavillan, J. Escalante, I. Regla, A. Munguia-Lopez, E. Castillo, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 2621-2624.

¹⁷⁸ M. Leroux, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 1817-1823.

**Schéma 89:** Amines choisies

● Choix des donneurs d'acyle :

Nous avons choisi tout d'abord l'**acétate d'éthyle** comme donneur d'acyle. Ensuite, nous avons élargi nos investigations, vers l'utilisation des acides carboxyliques (agents acylants non-activés) pour réaliser un couplage direct amine-acide, afin de générer une liaison amide. Il est à noter que l'amidation directe des amines par des acides carboxyliques, présente l'avantage de l'élimination d'une étape d'activation de l'agent acylant en ester correspondant (**Schéma 90A**). Néanmoins, cette réaction conduit spontanément à la formation de sels stables (**Schéma 90B**), ce qui gêne le rapprochement du site actif de la lipase, ainsi, un chauffage est nécessaire pour effectuer cette réaction.

**Schéma 90:** Réaction d'investigation.

Il est à noter, également, que le nombre de travaux portant sur l'amidation enzymatique directe des amines primaires par des acides carboxyliques reste modeste.¹⁷⁹

¹⁷⁹(a)Réf15(f): A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 4511–4514; (b)Réf15(g): R. Irimescu and K. Kato, *Tetrahedron Letters*, **2004**, *45*, 523–525.

Pour ce travail nous avons sélectionnés trois acides carboxyliques ayant des structures différentes: l'acide acétique, l'acide laurique et l'acide benzoïque, et ce afin d'étudier l'influence des effets stériques de la structure des donneurs d'acyle sur la réactivité et la sélectivité lipasique.(Schéma 91)

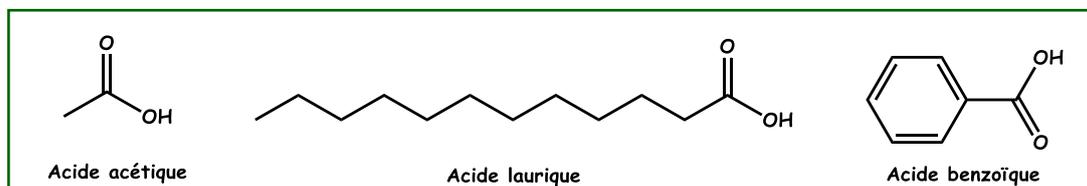


Schéma 91:Acides carboxyliques choisis.

● Choix des lipases :

La sélection des biocatalyseurs utilisés lors de cette étude est basée sur des travaux publiés traitant la réaction d'amidation¹⁸⁰ et qui sont tous des levures«*Candida*». Nous avons sélectionné trois lipases commerciales : la lipase de *Candida Cylindracea* (*CCL*), achetée de chez *Fluka*, présentant une activité enzymatique de 3,85 Unités par mg ; la lipase de *Candida Rugosa* (*CRL*), achetée de chez *Sigma* d'une activité de 1170 Unités par mg, La lipase de *Candida Antarctica A* (*CAL-A*) immobilisée sur un lit de 150 recombinant de *Aspergillus oryzae*, achetée de chez *Sigma-Aldrich* d'une activité: ≥ 500 Unités par g, et la lipase de *Candida Antarctica B* (*CAL-B*), achetée de chez *Sigma-Aldrich* d'une activité de 10000 Unités par g.

✂ **La lipase de *Candida Cylindracea* (*CCL*)** est issue de levures de *Candidalipolitica*, utilisée en synthèse organique et est commercialisée sous formes plus ou moins pure.

C'est une protéine composés de 534 aminoacides dont une importante proportion de sérine et possède une masse M_r approximative de 60000. L'élucidation de sa structure brute¹⁸¹ a montré qu'elle est composée de deux isoenzymes A (vert) et B (bleu) (**Figure 19**). La *CCL-A* possède un caractère estérase et la *CCL-B* un caractère lipase.

¹⁸⁰(a) V. Gotor-Fernandez, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal*, **2006**, 348, 797-812; (b) V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Curr. Org. Chem*, **2006**, 10, 1125-1143; (c) F.van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 501-519.

¹⁸¹(a) Y. Kawaguchi, H. Honda, J. T. Morimura, S. Iwasaki, *Letters of Nature*, **1989**, 341, 164-166; (b) A. Gentili, M. Repetto, G. D'Ascenzo, R. Curini, S. Materazzi, *ThermochimicaActa*, **1998**, 320, 69-74; (c) J. Vakhlu, A. Kour, *Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458*, **2006**, 9(1), 69-85; (d) B. S. Kim, C. T. Hou, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **2006**, 29, 59-64.

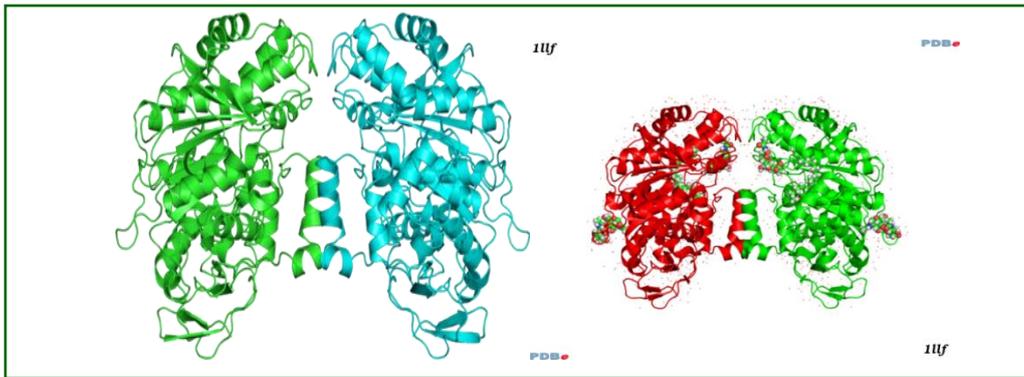


Figure 19: Structure 3D de la CCL.

✂ **La lipase de *Candida Rugosa* (CRL type VII)** est synonyme de la lipase de *Candida Cylindracea* (CCL type VII). Elle appartient à la même famille que les lipases de *Geotrichum Candidanium* (GCL) et de l'estérase *d'acétyl choline*. Elle est commercialisée sous une forme plus ou moins brute, composée de 2 à 11% protéines, 30% lactose comme unité d'extension, et le reste consiste en un support inerte. Elle possède une masse M_r approximative de 60000 Daltons, sa structure brute a été élucidée par Cygler et al¹⁸² (**Figure 20**). Elle est composée de 534 amino-acides dont une importante proportion de sérine (250 molécules de sérine). 317 molécules d'eau sont présentes à l'interface de la poche catalytique. Son site actif est composé des résidus de Ser209, His449 et Glu341, qui forme une triade catalytique similaire à celle de sérine protéases.

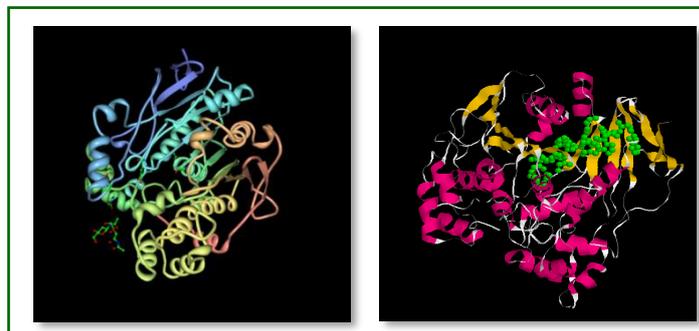


Figure 20 : Structure 3D de la CRL.

✂ **La Lipase de *Candida Antarctica*** immobilisée sur résine acrylique, fraction B (**SP435**, appelée encore, **Novozym**, ou **CAL-B**), contient 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 33 kDa. Le site actif de cette enzyme est constitué de la triade

¹⁸²P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthilier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *Journal of biological chemistry*, **1993**, 268(17), 12843-12847.

catalytique suivante : la *sérine 105*, agissant comme nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique ; l'*histidine 224* et l'*acide aspartique 187* qui stabilise ce dernier. La *CAL-B* est thermostable en milieu organique et peut être utilisée à 60-80 °C pour de longues durées sans perte d'activité¹⁸³.

V-4-3-Synthèse des amides racémiques :

L'obtention des amides racémiques correspondants est indispensable car ils servent comme références pour les analyses chromatographiques et chirales. Pour ce faire nous les avons obtenus *via* une méthode *éco-compatible*, mise au point récemment au sein du laboratoire de *Catalyse Asymétrique éco-compatible*, et qui consiste en l'utilisation des esters d'énol comme donneurs d'acyle, sans solvant et sans aucune activation préalable¹⁸⁴. Les esters d'énol choisis sont : l'acétate d'isopropényle (AI), le vinyl benzoate (VB) et le vinyl laurate (VL) (*schéma 92*).

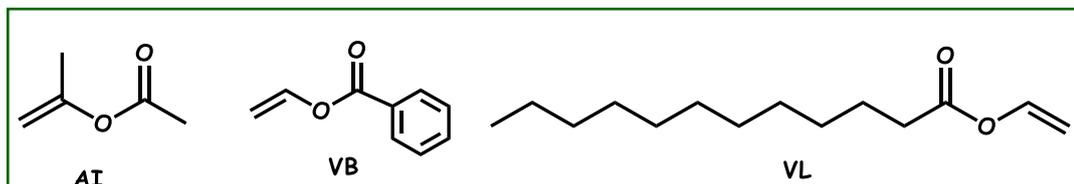


Schéma 92: Les esters d'énol utilisés.

Le choix de ces donneurs d'acyle est basé sur le bien de plusieurs avantages, tels que:

- ↪ Ils possèdent un bon groupement partant.
- ↪ Les sous-produits obtenus lors des réactions d'acylation : sont soit l'acétaldéhyde avec les carboxylates vinyliques le **VB** et le **VL**, soit l'acétone avec le **AI**, qu'on peut les éliminer facilement.
- ↪ Ainsi, qu'on peut éliminer l'excès du donneur d'acyle par une simple évaporation sous pression réduite.

Les acétamides racémiques [**21a-23a**] ont été obtenus par un simple couplage entre 1 équivalent de l'amine racémique et 3 équivalents de l'acétate d'isopropényle, le mélange est soumis sous agitation magnétique à température ambiante, jusqu'à la consommation totale de l'amine, généralement durant une nuit. L'amide pure est obtenu par simple cristallisation dans

¹⁸³Réf140: N. Zhang, W. C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, *Protein Engineering*, **2003**, 16, 599-605.

¹⁸⁴A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouèche, O. Riant, *Synthetic Communications*, **2014**, 44(16), 2364-2376.

l'hexane pour les solides, et après lavage acide pour les huiles. La même procédure est utilisée pour l'obtention des amides [21b-23b], avec comme donneur d'acyle le vinyle laurate. Enfin, pour les benzamides [21c-23c], on utilise le benzoate de vinyle. (*Schéma 93*)

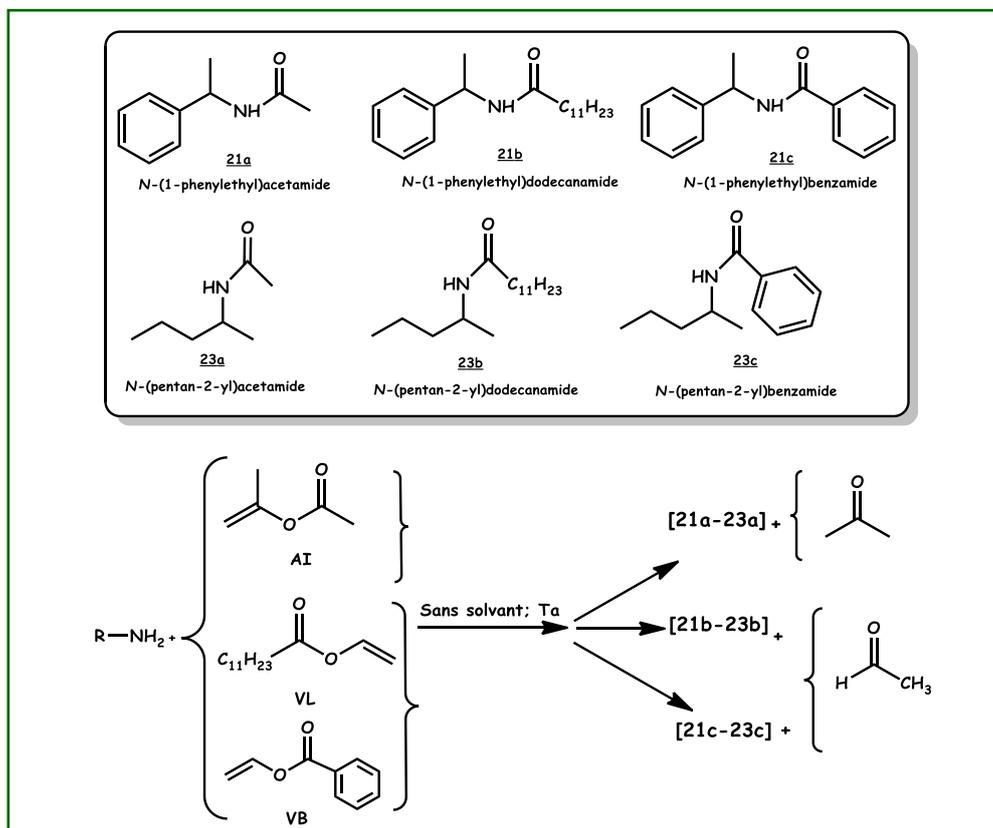


Schéma 93: Synthèse d'amides racémiques.

Les rendements chimiques des amides racémiques sont réunis dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Rendements chimiques isolés des amides racémiques

Entrée	Agent acylant	Amides	Rdt (%)
1	AI	21a	88.7
2		23a	75
4	VL	21b	83
5		23b	80
7	VB	21c	72.4
8		23c	80

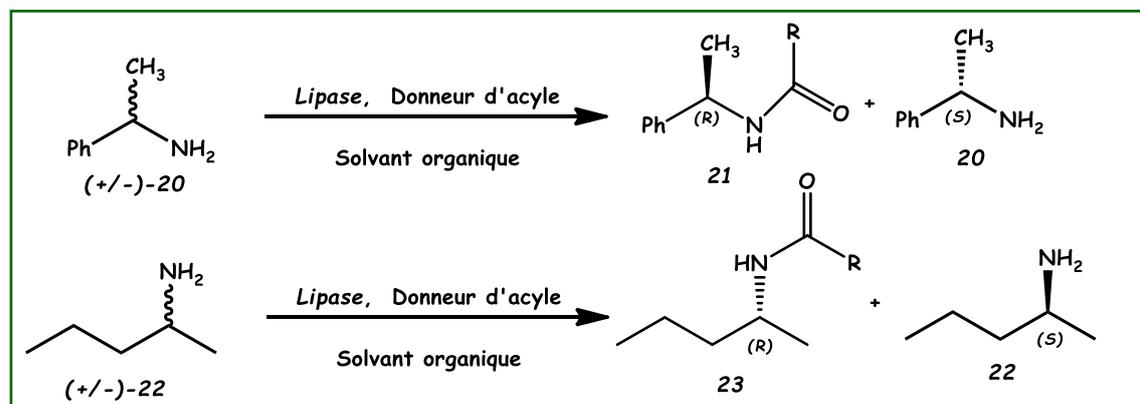
Les références racémiques sont obtenues avec de bons rendements chimiques isolés qui varient entre **72%** et **89%**. Il est à noter que l'utilisation d'un donneur d'acyle ayant une

longue chaîne carbonée n'affecte pas l'efficacité de cette réaction de couplage chimique. Les structures des amides racémiques synthétisés ont été confirmées par les analyses spectrales usuelles : RMN¹H, RMN¹³C et IR.

V-4-4-Dédoublément par amidification lipasique d'amines primaires :

Nous avons étudié l'effet de la nature de la lipase lors de l'amidification lipasique des amines primaires **20** et **22**, et ce en fonction de l'hydrophobicité du solvant organique et la nature du donneur d'acyle. Nous avons également étudié l'effet de la concentration du milieu réactionnel en donneur d'acyle.

Pour ce faire, nous avons fait réagir un équivalent de l'amine racémique avec 2 équivalents de du donneur d'acyle (sauf indication contraire), dans 1 mL de deux solvants différents, l'**heptane (log P= 4)** et le **DIPE (log P=1.9)**, en présence d'une quantité catalytique adéquate de différentes lipases (*Schéma 94*).

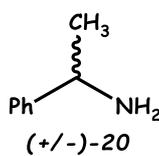
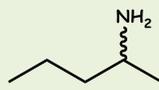


*Schéma 94: DC des amines **22** et **24** par amidification lipasique avec différents donneurs d'acyle.*

Le mélange réactionnel est mis sous agitation magnétique, à température ambiante durant 24 heures. Ensuite la lipase est filtrée, et l'amide obtenu et l'amine résiduelle ont été séparés par une extraction acido-basique. Les excès énantiomériques sont déterminés par chromatographie chirale : la structure **21a** et **21b** par HPLC et la **23a** par GC chirale, et ce, après la dérivation des amines en acétamides correspondants avec l'acétate d'isopropényle.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **Tableau 15** :

Tableau 15 : DC des amines **20** et **22** par amidification lipasique.

Entrée	Substrat	Donneur d'acyle	Lipase (mg)	ee _P (%) ^(d)	ee _S (%) ^(d)	C ^(e)	E ^(e)
1 ^(a)	 (+/-)- 20	AcOEt (2éq)	<i>CCL</i> (80)	-	-	NR	-
2 ^(a)		AcOEt (2éq)	<i>RGL</i> (80)	-	-	NR	-
3 ^(a)		AcOEt (2éq)	<i>CAL-A</i> (50)	-	-	NR	-
4 ^(a)		AcOEt (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	92	79.7	46.5	58
5 ^(b)		AcOEt (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	-	-	NR	-
6 ^(a)		AcOEt (2éq)	<i>CAL-B</i> (20)	92.7	60.6	39.5	49
7 ^(a)		AcOEt (4éq)	<i>CAL-B</i> (50)	92.2	17.2	23	16
8 ^(a)		AcOEt (6éq)	<i>CAL-B</i> (50)	96.2	3.4	3.4	54
9 ^(a)		AcOEt (excès)	<i>CAL-B</i> (50)	4.3	5.1	54	1
10 ^(c)		AA (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	23.6	2.4	9.3	2
11 ^(c)		AL (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	96.4	91.2	48.6	173
12 ^(c)		AB (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	-	-	NR	-
13 ^(a)	 (+/-)- 22	AcOEt (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	93.8	86.6	48	87
14 ^(b)		AcOEt (2éq)	<i>CAL-B</i> (50)	95	88	48	114

(a) Immoles amine racémique, Xéq AcOEt, 1mL de DIPE à température ambiante.

(b) Immoles amine racémique, Xéq AcOEt, 1mL d'heptane à température ambiante.

(c) Immoles amine racémique, Xéq d'acides (AA : acide acétique ; AL : Acide laurique ; AB : Acide benzoïque), 50 mg du TM 4Å, 1mL d'heptane à 80°C.

(d) Les excès énantiomériques des amides obtenus et des amines résiduelles sont mesurés, soit par GC chirale ou par HPLC chirale, et ce après une dérivation de l'amine en acétamide correspondant.

(e) La conversion et la sélectivité conversion: C=ees/ee_P+ee_S; E =Ln [(1-C) (1-ee_S)]/ Ln [(1-C) (1+ee_S)] .

Les résultats du **Tableau 15**, révèlent que parmi les lipases utilisées, seule, la *CAL-Best* active et sélective lors du dédoublement des amines primaires, et ce, en fonction de l'hydrophobicité du solvant organique utilisé (*entrées 4 et 10 versus 5 et 11*).

Avec l'amine benzylique **20**, nous avons pu obtenir l'énantiomère (**R**)-**21a** avec un excès énantiomérique de **ee = 92%**, à une conversion de **C = 46.5%** en utilisant 50 mg de *CAL-B* et 2 équivalents de l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle dans le diisopropyléther (*entrée 4*). La même réaction effectuée dans l'heptane, solvant organique à caractère hydrophobe, montre une inhibition complète du pouvoir catalytique de la *CAL-B* lors de l'amidification de cette amine primaire (*entrée 5*).

Nous observons, également, que l'augmentation du taux catalytique lipasique de la *CAL-B* joue en faveur de la réactivité lipasique, on passe de **39%** de conversion avec 20 mg de lipase à **C = 46.5%** avec 50mg et la sélectivité varie de $49 < E < 58$ (*entrée 6 versus 4*).

L'utilisation d'un excès de l'acétate d'éthyle inhibe proportionnellement la réactivité de la *CAL-B*, avec une chute de conversion de **C = 46.5%** avec 2 équivalents à **C = 3%** en utilisant 6 équivalents, et ce dans le DIPE comme solvant organique (*entrée 4 versus 8*).

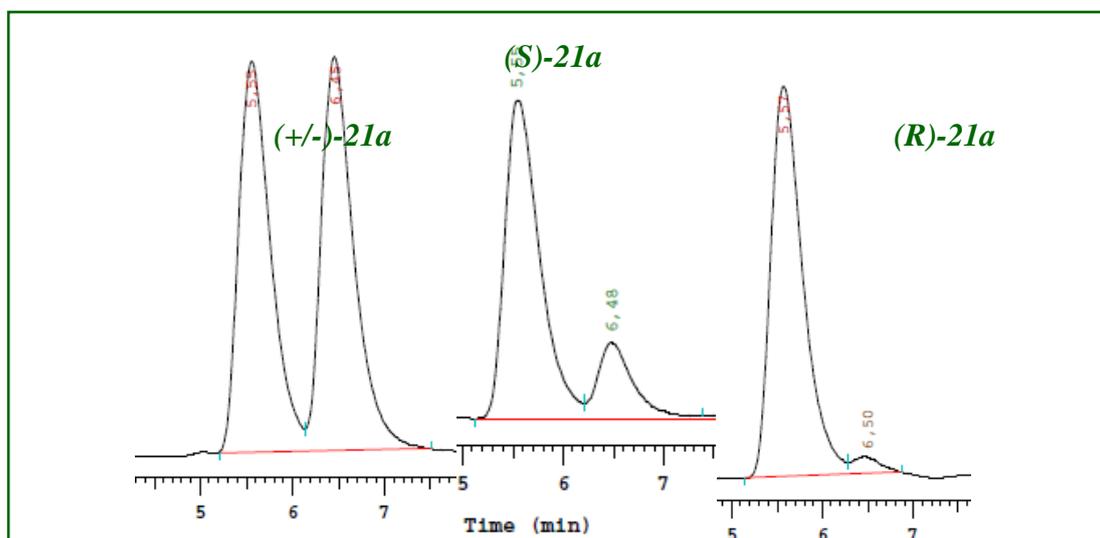
L'utilisation de l'acétate d'éthyle ($\log p = 0.90$) à la fois comme donneur d'acyle et comme solvant à caractère hydrophile joue en défaveur de la sélectivité lors de l'amidification lipasique de l'amine benzylique **20**, le facteur de sélectivité chute de **E = 58** avec le DIPE, $\log p = 1.9$ à **E = 1** avec l'acétate d'éthyle ($\log p = 0.90$) (*entrée 4 versus 9*), et ce, sans affecter la réactivité **C = 54%**.

Cette étude préliminaire avec l'amine benzylique primaire, nous révèle les meilleures conditions pour la réaction de dédoublement cinétique lipasique d'amines primaires (*entrée 4*). Nous avons appliqué ces conditions pour le DC de l'amine aliphatique **22**.

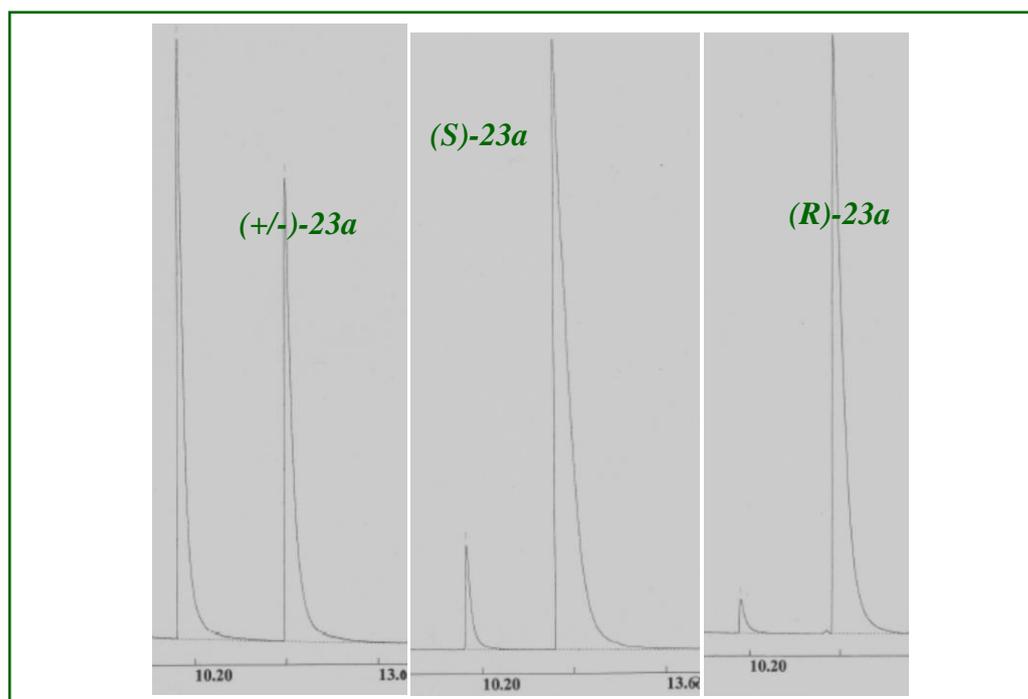
Les résultats obtenus lors de l'amidification lipasique de cette amine aliphatique montrent une bonne sélectivité **87 < E < 114** avec un excès énantiomérique de l'amide (**R**)-**23a** entre **93.8% < ee_p < 95%** à une conversion de **c = 48%**, et ce, dans les deux solvants organiques utilisés (*entrées 13 et 14*). On peut dire, dans ce cas, que l'hydrophobicité du solvant organique n'affecte ni la sélectivité ni la réactivité de la *CAL-B* lors de l'amidification de cette amine primaire aliphatique.

En outre, on note qu'il y a une meilleure sélectivité de la CAL-B pour l'amine aliphatique **22**, par rapport à l'amine benzylique **20**.

Les séries de chromatogrammes 6 et 7 illustrent les résultats de l'amidification lipasique de l'amine benzylique **20** (entrée 4) et celle de l'amine aliphatique **22** (entrée 13) respectivement.



Série de chromatogrammes 6 :DC par amidation lipasique de l'amine benzylique **20**.

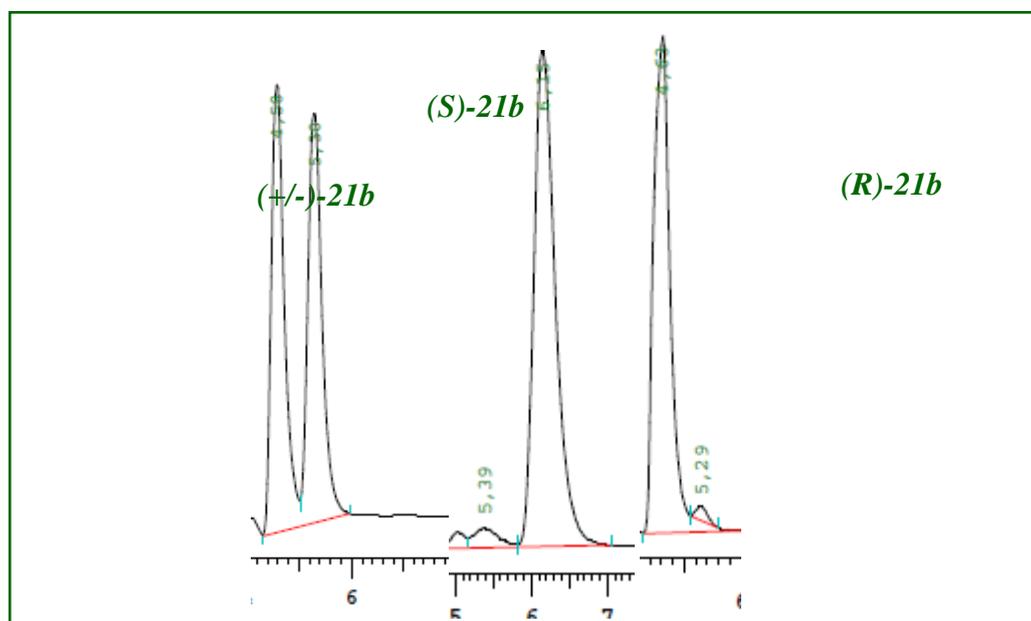


Série de chromatogrammes 7 :DC par amidation lipasique de l'amine aliphatique **22**

Par ailleurs, l'utilisation des acides comme donneur d'acyle lors de l'amidification de l'amine benzylique **20** montre un effet significatif de la longueur et de l'encombrement du radical alkyle R du groupement partant du donneur d'acyle sur la réactivité et la sélectivité de la CAL-B.

Nous remarquons que la longue chaîne du radical alkyle du groupement partant de l'acide laurique, joue en faveur de la réactivité et de la sélectivité de la CAL-B lors de l'amidification de cette amine. L'amide (**R**)-**21b** est récupérée avec une excellente pureté énantiomérique de **96.4%**, à une conversion de **48.6%** (entrée 11). L'utilisation d'acide acétique, possédant un petit groupement partant n'est pas efficace en terme de réactivité et de sélectivité lipasique pour cette réaction (entrée 10). En comparant ce résultat avec, celui obtenu en utilisant l'acétate d'éthyle, nous observons que cet effet s'incline complètement, ou au moins il n'est pas aussi un facteur destructif, vis-à-vis, cette réaction d'amidification, où nous avons récupéré l'acétamide (**R**)-**21a** avec **ee =92%** et un facteur de sélectivité de **E=58** en utilisant l'acétate d'éthyle face à un enrichissement énantiomérique en faveur du même acétamide de **23.6%** avec un facteur de sélectivité de **E=2** en utilisant l'acide acétique comme donneur d'acyle (entrée 4 versus entrée 10). D'autre part, l'encombrement du groupement partant, comme dans le cas de l'acide benzoïque, bloque complètement la formation de l'amide **21c** (entrée 12).

La série de chromatogrammes **8** illustre les résultats de l'amidification lipasique de l'amine benzylique **20**, en utilisant l'acide laurique comme donneur d'acyle (entrée 11).



Série de chromatogrammes 8 : DC par amidation lipasique de l'amine benzylique **20** avec l'AL.

V-5-Conclusion :

Ce chapitre concerne l'étude de formation d'amides chirales par dédoublement cinétique lipasique en utilisant deux approches qui mettent en œuvre, soit le dédoublement d'acides racémiques, soit celui d'amines racémiques:

(1) l'aminolyse d'acide-2-arylpropionique (profens) et de leurs dérivés esters par des amines aromatiques achirales.

(2) l'amidification de deux amines primaires, une benzylique et l'autre aliphatique par divers donneurs d'acyles achiraux.

L'effet de la nature de la lipase, la structure du nucléophile, l'hydrophobicité du solvant organique et la nature du donneur d'acyle sont examinés.

Les amidoprofènes racémiques sont obtenus avec des rendements chimiques élevés Rdt > 90% qui ont été optimisés en remplaçant le dichlorométhane par le chloroforme. Parmi les amides synthétisés la structure **16c** est originale.

L'aminolyse des acides 2-arylpropionique par l'aniline avec la *CAL-B* n'est pas sélective et cela malgré la modulation des conditions et des paramètres de réaction, tels que la quantité de lipase, l'activité de l'eau, l'introduction des additifs, la structure de l'acide carboxylique ainsi que l'amine utilisée. On constate malgré pourtant un avancement notable de la réaction d'aminolyse. Malgré les résultats décevants en matière de sélectivité, cette étude permet de développer une voie aisée d'aminolyse catalysée par les lipases et économe en atome pour la génération d'une liaison amide directement à partir d'un couplage acide-amide qui peut être une alternative des réactions de couplages utilisant des agents de couplage.

Dans le cas de la réaction d'amidification des deux amines benzylique et aliphatique par divers donneurs d'acyles achiraux, nous montrons que la *CAL-B* est la lipase la plus adaptée pour la reconnaissance chirale des amines primaires. On observe un effet significatif de l'hydrophobicité du solvant organique qui dépend cruciallement de la structure de l'amine. La *CAL-B* est totalement inactive dans l'heptane, milieu hydrophobe, lors de l'amidation de l'amine benzylique **20** avec 2eq AcOEt. Cet effet disparaît lors de l'amidification de l'amine aliphatique **22** dans les mêmes conditions.

Nous avons également montré, dans ce chapitre, un effet significatif de la nature du donneur d'acyle utilisé. L'utilisation de l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle, en présence de 50 mg de *CAL-B* dans DIPE comme solvant, on obtient une bonne sélectivité **E = 58** avec l'amine **20**. L'acétamide correspondant (**R**)-**21a** est retrouvé avec un **ee = 92%** à une conversion de **c = 46.5%**. Dans les mêmes conditions, pour l'amidification de l'amine aliphatique **22**, l'acétamide (**R**)-**23a** est obtenu avec un **ee > 93%** à une conversion de **48%** et cela, quelque soit l'hydrophobicité du solvant organique.

On constate que l'utilisation des acides carboxyliques comme donneurs d'acyles lors de l'amidification des amines **20** et **22** catalysée par la *CAL-B* montrent des résultats très variables qui dépendent essentiellement de la structure de leur groupement partant. Le meilleur résultat est obtenu avec l'acide laurique comme donneur d'acyle, lors de l'amidification lipasique de l'amine benzylique **20**. L'amide (**R**)-**21b** est récupérée avec un bon enrichissement énantiomérique **ee = 96.4%**, à une conversion **c = 48.6%**.

Ces résultats sont des éléments importants dans le cadre de la préparation d'amide enantiopure par catalyse avec la *CAL-B*. L'étude réalisée montre que le DC des amines avec la *CAL-B* est sélectif avec certains agents acylants et dans des conditions d'hydrophobicité de solvant liées à la structure de l'amine. Des travaux complémentaires d'investigation sont en cours.



CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale :

Au cours de ces travaux de thèse nous sommes intéressées à mise en œuvre de nouvelles voies simples, efficaces et durables pour la conception de molécules chirales dont l'accès constitue un impératif majeur de la chimie. Une méthode très attrayante pour y parvenir est le dédoublement cinétique de racémiques avec les lipases comme biocatalyseurs puissants qui intègrent désormais les nouveaux outils d'une chimie douce et performante.

Ces travaux s'orientent vers le développement de la synthèse énantiosélective de briques moléculaires d'intérêt pharmacologique bien connus, les arylalkylesters et des acides 2-arylpropioniques. Nous avons étudié des nouvelles approches réactionnelles et mis en œuvre des conditions adéquates afin de moduler la réactivité et la sélectivité des lipases lors des réactions de dédoublement cinétique. Ce travail est réparti sur deux volets avec le même objectif.

Dans le **premier volet**, deux nouvelles approches réactionnelles sont mise en œuvre. La **première** est une méthode de déacylation par alcoololyse catalysée par la *lipase de candida antarctica* (*CAL-B*) d'une série d'acétate benzylique [**1a-7a**] en milieu organique. Nous avons montré que la nature du nucléophile et l'hydrophobicité du milieu réactionnel sont deux paramètres essentiels qui ont une influence sur le processus catalytique de déprotection énantiosélective de ces acétates. Dans tous les cas, nous obtenons une (*R*)-énantiopréférence avec un facteur de sélectivité **E > 500**. La réactivité de la *CAL-B* dépend de la nature du nucléophile (ROH) mis en jeu, et ce, quelque soit le solvant utilisé. Les alcools primaires et secondaires donnent les meilleurs résultats avec des conversions **C > 40%** et une sélectivité **E > 500** lors du dédoublement cinétique par alcoololyse enzymatique des acétates étudiés dans les deux solvants utilisés. L'addition de tamis moléculaire favorise la réactivité lipasique en diminuant la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel. Le meilleur résultat est obtenu avec l'éthanol, dans le DIPE, en présence de tamis moléculaire. On constate que l'alcoololyse enzymatique de cette série d'acétates benzyliques est énantiocomplémentaire avec la réaction de transésétrification enzymatique.

La seconde approche réactionnelle étudiée est une réaction de déacylation *via* l'aminolyse du 1-phenylethylacétate **1a** catalysée par la *CAL-B* en milieu non aqueux et en présence de trois amines: la benzylamine, l'aniline et la triéthylamine.

L'utilisation de la benzylamine et l'aniline ne donne aucune sélectivité dans les conditions d'aminolyse avec la *CAL-B* pourtant l'ajout de la triéthylamine comme additif permet la déacylation énantiosélective de l'acétate **1a**. Ce résultat original nous a conduit à examiner la déacylation d'une série d'acétates benzyliques [**1a-7a**] en tenant compte de l'effet de la quantité de la *CAL-B*, de l'activité de l'eau par l'introduction du tamis moléculaire et en introduisant la triéthylamine au milieu réactionnel. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un taux catalytique de la *CAL-B* qui varie entre **24 mg/ 2 ml** et **35 mg/ 2 ml** selon la structure de l'acétate, et ce, dans le DIPE. Le facteur de sélectivité est élevé **E > 100** en faveur de l'énantiomère (*R*)-alcool.

Un suivi cinétique de différentes réactions en milieu non aqueux et catalysées avec la *CAL-B* est entrepris. Ainsi, la réaction de déacylation en présence de la triéthylamine est comparée aux profils cinétiques de deux autres réactions de déacylation en milieu non-aqueux; l'alcoolyse et l'hydrolyse assisté par le Na₂CO₃. L'objectif étant d'examiner l'impact de la réaction d'hydrolyse compétitive et/ou parallèle assurée par "l'eau interne" apportée par les différents composants du milieu réactionnel lors de la catalyse avec la *CAL-B*. Les résultats nous permettent de conclure que cette réaction compétitive avance conjointement avec les réactions de déacylation en les perturbant ou non selon la force du nucléophile mise en jeu.

Dans le **second volet de ces travaux de thèse**, nous avons abordé la formation d'une liaison amide par le dédoublement cinétique lipasique d'acides et d'amines racémiques. La réaction d'aminolyse de quelques acide-2-arylpropionique (Profènes) et de leurs dérivés esters catalysée par la *CAL-B* est étudiée. Ensuite, l'amidification de deux amines primaires : une benzylique et l'autre aliphatique est entreprise avec des lipases. Nous avons examiné l'effet de quelques paramètres pouvant intervenir d'une manière cruciale sur le déroulement de cette réaction tels que : la nature de la lipase, la structure du nucléophile, l'hydrophobicité du solvant organique et la nature du donneur d'acyle.

Après avoir optimisé la synthèse des amidopofènes racémiques en remplaçant le dichlorométhane par le chloroforme, les paramètres de réactions sont mis aux points (quantité de *CAL - B*, activité de l'eau, introduction d'additifs, nature du substrat et de l'amine utilisée). Malgré un avancement notable de la réaction d'aminolyse qu'aucune sélectivité n'est obtenue. Cette étude nous a permis de développer une voie d'aminolyse catalysée par les lipases aisée et économe en atome pour la génération d'une liaison amide directement à partir d'un couplage acide-amide et ester-amide dans un solvant classé comme vert, qui peut être une

alternative des réactions de couplages utilisant des agents de couplage, avec de bons rendements.

Dans le cas de la réaction d'amidification des deux amines benzylique et aliphatique par divers donneurs d'acyles achiraux, nous montrons que la *CAL-B* est la lipase la plus adaptée pour la reconnaissance chirale des amines primaires. On observe un effet significatif de l'hydrophobicité du solvant organique qui dépend crucialement de la structure de l'amine. La *CAL-B* est totalement inactive dans l'heptane, milieu hydrophobe, lors de l'amidation de l'amine benzylique avec AcOEt. Cet effet disparaît lors de l'amidification de l'amine aliphatique dans les mêmes conditions. On constate aussi un effet significatif de la nature du donneur d'acyle utilisé et de l'hydrophobicité du solvant de réaction sur la *CAL-B*, selon que le substrat soit une amine benzylique ou aliphatique.

On constate que l'utilisation des acides carboxyliques comme donneurs d'acyles lors de l'amidification des amines catalysée par la *CAL-B* montrent des résultats très variables qui dépendent essentiellement de la structure de leur groupement partant. Le meilleur résultat est obtenu avec l'acide laurique comme donneur d'acyle, lors de l'amidification lipasique de l'amine benzylique $c = 49\%$ et $E = 170$ et de l'amine aliphatique $c = 48\%$ et $E = 110$.

L'étude réalisée montre que le DC des amines avec la *CAL-B* est sélectif avec certains agents acylant et dans des conditions d'hydrophobicité de solvant liées à la structure de l'amine. Ces résultats sont des éléments importants dans le cadre de la préparation d'amides énantiopures par catalyse avec la *CAL-B*.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce chapitre, sont en cours d'optimisation et de validation.



PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités

■ Appareillages et Analyses :

Les caractéristiques des produits synthétisés utilisés dans des nouvelles réactions comme réactif ou bien les produits trouvés après un dédoublement cinétique enzymatique ont été identifiés par des méthodes d'analyse suivantes :

■ Méthodes spectrales :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN¹H) et de carbone (RMN¹³C) : Les spectres RMN¹H ont été enregistrés sur des spectromètres Varian GEMINI-300 BB, Brüker-300 dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl₃) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard, sauf indication contraire. Les déplacements chimiques "δ" sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne (δ = 7,24 ppm pour CDCl₃). Les abréviations suivantes ont été utilisées : **s** = singulet, **sl** = singulet large, **d** = doublet, **dd** = doublet de doublet, **t** = triplet, **q** = quadruplet, **m** = multiplet et **ma** = massif. Les constantes de couplage (**J**) (valeurs absolues) sont mentionnées en Hertz (Hz).

Les spectres Infrarouges (IR) : ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu FTIR-8400S. Les nombres d'onde "ν" sont exprimés en cm⁻¹. Les produits ont été analysés sous forme de films sur l'ATR soit purs, soit en solution dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂).

■ Méthodes chromatographiques :

Les analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été effectuées sur un chromatographe avec contrôleur et une pompe Water 600, équipé d'un détecteur UV-VIS Water 996 muni d'une barrette de diode. Les colonnes chirales utilisées sont mentionnées pour les analyses concernées.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse chirale (CPG) ont été réalisées sur un appareil HRGC 5300 avec Intégrateur chromato D-2500 ou un appareil ThermoFinnigan Trace GC utilisant une colonne de type CHIRALSIL-DEX CB (25m ; 0,25mm, 25mm). Le détecteur de type FID est chauffé à 300°C et l'injecteur est à 250°C. Les pressions des gaz sont : He : 100kPa ; H₂ : 50kPa et l'air sec à 100kPa.

Les chromatographies liquides sur colonne faites sur gel de silice Merck 230-400 Mesh (0,04-0,063 mm) ; les phases mobiles constituées par des mélanges différents selon la polarité des produits séparés, tel que les solvants qui composent les mélanges de la phase mobile sont des solvants technique mais distillés avant l'usage pour confirmer la pureté de ses solvants.

Les chromatographies analytiques sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice commerciales de type MERCK 5179, 250 mesh en aluminium, avec un indicateur fluorescent 60 PF254 ; 0,25 mm d'épaisseur et révélées à l'UV ($\lambda = 254$ nm) ou à l'aide d'un révélateur chimique l'iode.

- **Les pouvoirs rotatoires** : ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241 MC et les concentrations sont données en g/100mL.
- **Les points de fusion** ont été déterminés au moyen d'une fusion mètre BÜCHI MELTING POINT B-545.

■ **Réactifs et solvants :**

Produits : les produits commerciaux utilisés dans les synthèses ou dans les dédoublements cinétiques sont fournis par les firmes Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, et STREM.

Lipases : les enzymes utilisés dans les dédoublements cinétiques des mélanges racémiques sont commerciales et sont achetées de chez les Sigma-Aldrich, Fluka et Amano.

Les solvants : les solvants utilisés sont de qualité p.a. ou distillés avant emploi. Les solvants utilisés en HPLC sont de qualité HPLC, filtrés et dégazés avant usage.

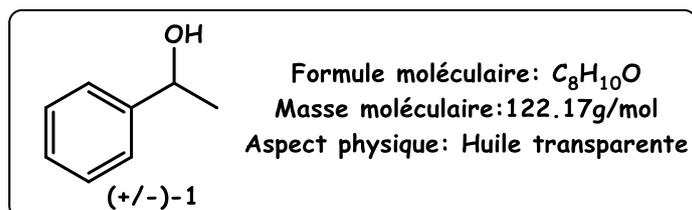
Chapitre III & IV

Déacylation des acétates benzyliques par alcoolysé et aminolysé lipasique.

■ **Procédure générale de réduction des cétones :**

Dans un ballon tricol contenant 2 éq. d'hydrure de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) dans 10 ml d'éther anhydre, plongé dans un bain de glace, 1 éq. de cétone commerciale correspondante dans 5 ml d'éther anhydre sont rajoutés goutte à goutte à 0°C et ce à l'aide d'une seringue. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince CCM. Après la consommation totale de la cétone, on hydrolyse avec une solution de soude (NaOH , 2N) lentement à 0°C , jusqu'à la formation d'un précipité blanc et la solution devient limpide. La solution filtrée est lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl) et extraite à l'éther. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous pression réduite.

■ **Le 1-phényléthanol (+/-)-1 :**



Cet alcool est commercial.

✂ **Caractéristiques chromatographiques :**

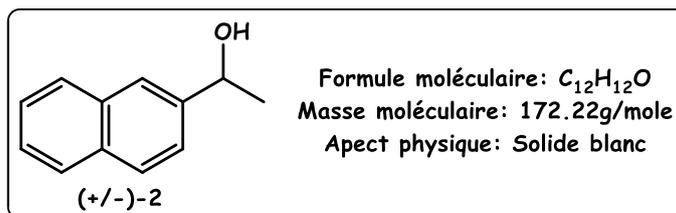
☞ **Rapport frontale :** $R_f = 0.52$. *Eluant* (ν, ν): Ether de pétrole / Acétone (90/10).

☞ **CPG chirale :** Isotherme 140°C . Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_R = 4.39$ min,

$t_S = 4.59$ min.

■ Le 1-(naphthalén-1-yl)éthanol (+/-)-2 :



Pour 5g 1-(naphthalen-1-yl)éthanone, l'alcool désiré est obtenu sous forme solide blanc et d'une masse $m_{\text{alcool}} = 3.91\text{g}$, soit un rendement chimique $Rdt = 78.3\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 828 ; 1244 ; 1512 ; 1613 ; 2935 ; 2983$.

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl_3): δ (ppm)** = 1,659 et 1,685 (d, $J = 6,35\text{Hz}$; 3H, H₃C-CH) ; 2,095 (sl, 1H, OH) ; 5,628-5,704 (q, $J = 6,32\text{Hz}$, 1H, H₃C-CH-OH) ; 7,454-7,855 (m, 3H, aromatiques) ; 7,869 et 7,88 (d, $J = 2,75\text{Hz}$; 1H aromatique) ; 7,893 et 7,907 (d, $J = 3,5\text{Hz}$; 1H aromatique) ; 8,099 et 8,126 (d, $J = 6,75\text{Hz}$; 1H aromatique) ; 8,135 et 8,152 (d, $J = 4,25\text{Hz}$; 1H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl_3): δ (ppm)** = 21,39; 21,75; 28,51; 30,38; 69,489; 123,21; 123,24; 125,41; 125,72; 126,36; 128,5; 136,44; 140,57; 144,37; 176,75.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

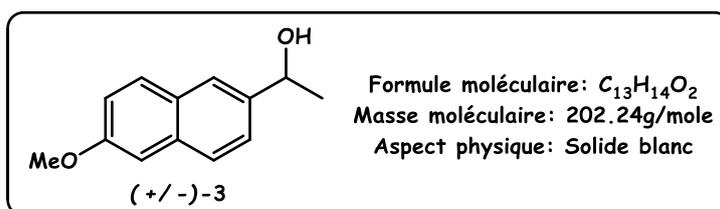
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.29$. **Eluant** (ν, ν): cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 170°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_R = 11.51$ min,

$t_S = 11.9$ min .

■ Le 1-(6-méthoxynaphthalén-2-yl)éthanol (+/-)-3:



Pour 5g 1-(6-méthoxynaphthalén-2-yl)éthanone, l'alcool désiré est obtenu sous forme d'un solide blanc d'une masse $m_{\text{alcool}} = 4.25\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt = 85.5\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 670 ; 740 ; 810 ; 960 ; 1020 ; 1210 ; 1250 ; 1380 ; 1450 ; 1475 ; 1595 ; 1620 ; 3250$.

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1.57-1.59 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H, HO-*CH-CH₃) ; 1.89 (sl, 1H -OH) ; 3.93 (s, 3H, -OCH₃) ; 5-5.08 (q, $J=6.4\text{Hz}$; 1H, HO-*CH-CH₃) ; 7.14-7.17 (m_a, 2H aromatiques); 7.47-7.5 (m_a, 1H aromatique); 7.72-7.76 (m_a, 3H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 24; 55; 72; 107; 119 ; 123 ; 124; 127; 128; 129; 134; 142.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

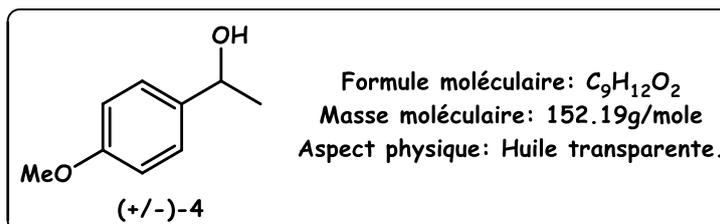
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.15$. **Eluant** (v, v): Ether de pétrole / Acétone (90/10).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 135°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_R = 12.69$ min,

$t_S = 14.27$ min.

■ Le 1-(4-méthoxyphényl)éthanol (+/-)-4:



Pour 5g de 1-(4-méthoxyphényl) éthanone. Le produit est obtenu sous forme d'une huile transparente d'une masse $m_{\text{alcool}} = 4.2\text{g}$ soit un rendement chimique $R_{\text{dt}} = 85\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1.47-1.49 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H, HO-*CH-CH₃); 1.87 (sl, 1H, OH) ; 3.81 (s, 3H, -OCH₃) ; 4.82-4.89 (q, $J=7.4\text{Hz}$, 1H, HO-*CH-CH₃) ; 6.86-6.9 (m_a, 2H aromatique); 7.27-7.32 (m_a, 2H aromatique) .

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 25.19; 55.46; 70.13; 113.9; 126.8; 138.1; 159.12.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

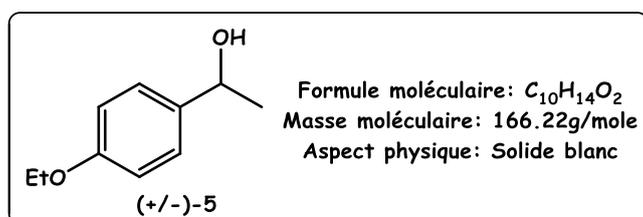
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.2$. **Eluant** (v, v): cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 135°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_R = 12.69$ min

$t_S = 14.27$ min.

■ Le1-(4-éthoxyphényl) éthanol (+/-)-5:



Pour 5g de 1-(4-éthoxyphényl) éthanone . Le produit trouvé sous forme des cristaux blancs d'une masse $m_{alcohol} = 4.05g$ soit un rendement chimique $Rdt = 82\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 813,9 ; 833,2 ; 895,8 ; 1515,9 ; 1612,4 ; 2970,2 ; 3386,8$.

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) = 1.39-1.44 (t, $J=6.99$ Hz, 3H, CH₃-CH₂-O); 1.47-1.49 (d, $J=6.47$, 3H, HO-*CH-CH₃); 1.85 (sl, 1H -OH) ; 4-4.07 (q, $J=7.08$ Hz, 2H, CH₃-CH₂-O) ; 4.81-4.88 (q, $J=6.42$ Hz; 1H, HO-*CH-CH₃) ; 6.86-6.9 (m_a, 2H aromatique); 7.26-7.3 (m_a, 2H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) = 15.02; 25.16; 63.63; 70.16; 114.57 ; 126.81; 138.0 ; 158.50.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

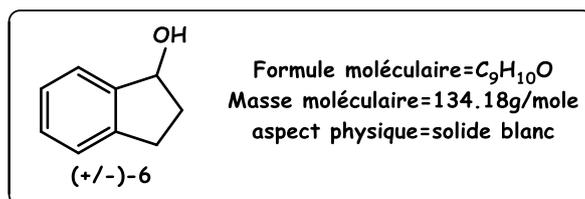
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.19$. **Eluant** (v, v): cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 155°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_R = 7.58$ min,

$t_S = 7.91$ min.

■ Le 2,3-dihydro-1H-indan-1-ol (+/-)-6:

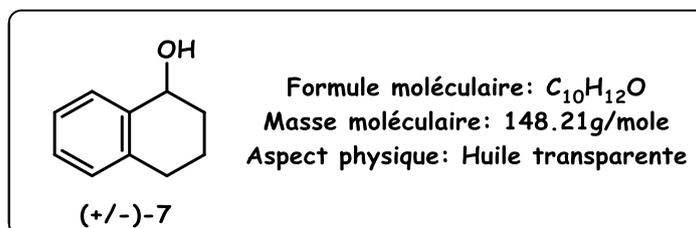


Cet alcool est commercial.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.13$.*Eluant* (v,v): cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20).
- ☞ **CPG chirale**: Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5 minutes.
 Débit : 1,2 mL/min. Temps de rétention : $t_R = 53.89$ min,
 $t_S = 54.57$ min.

■ Le 1,2,3,4-tetrahydronaphthalén-1-ol (+/-)-7:



Pour 5g 3,4-dihydronaphthalén-1(2H)-one, l'alcool désiré sous forme de huile transparente et d'une masse $m_{\text{alcool}} = 3\text{g}$ et un rendement chimique $R_{dt} = 68\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

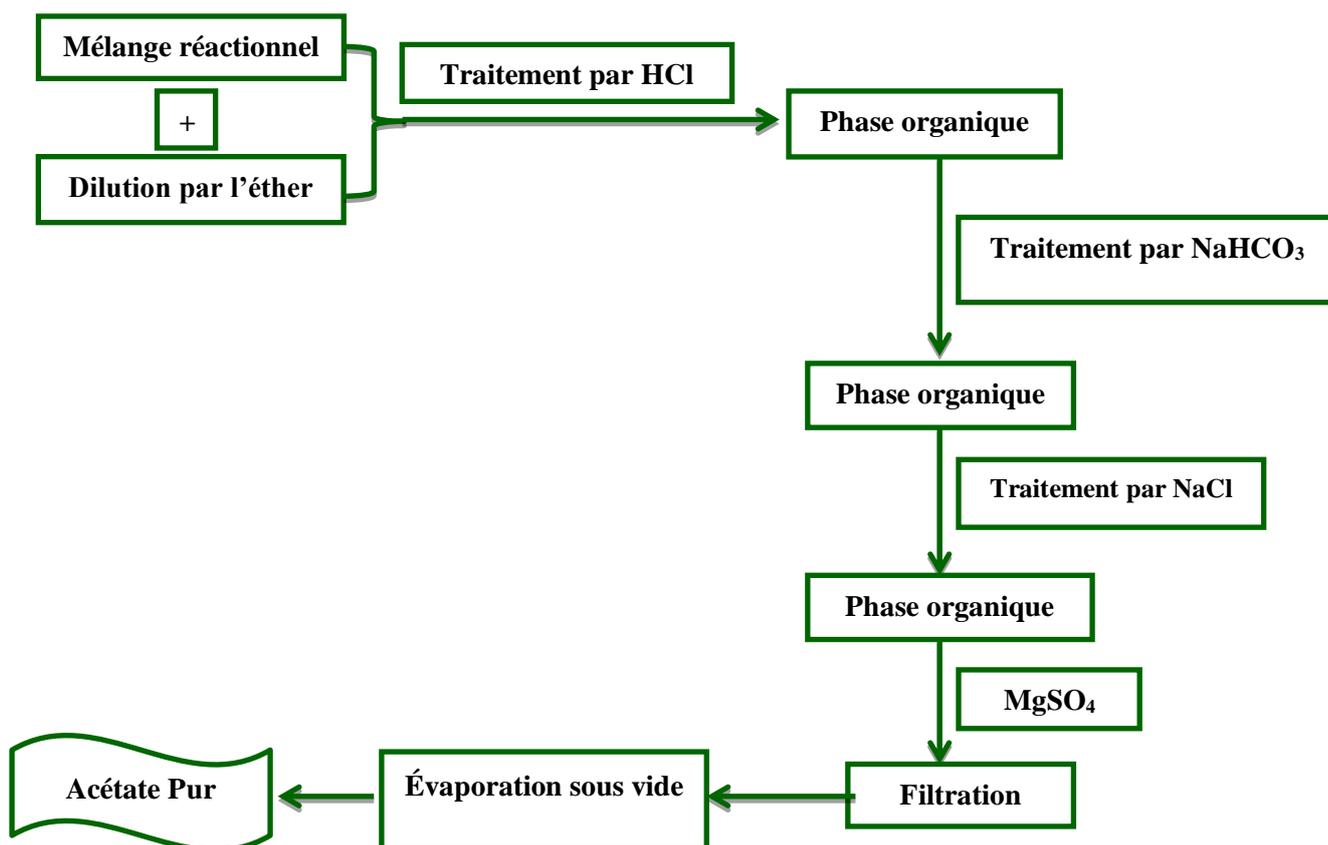
- ☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 800 ; 910,34 ; 1000,99 ; 1064,63 ; 1116,71 ; 1151,42 ; 1164,92 ; 1234,36 ; 1271 ; 1325 ; 1338,51 ; 1049,87 ; 1429,15 ; 1452,3 ; 1488,94 ; 1604,66 ; 2839,09 ; 3018,39 ; 3323,12$.
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1.78-2.03 (2m_a, 4H cyclique + 1H -OH); 2.68-2.89 (m, 2H cyclique); 4.76-4.79 (t, $J = 4.09$ Hz; 1H, HO-*CH-CH₂); 7.10-7.26 (m_a, 3H aromatique); 7.43-7.46 (m_a, 1H aromatique).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 18.99; 2942; 32,25; 32.43; 68.29; 126.33; 127.73 ; 128.84 ; 129.17; 137.28 ; 138.98.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

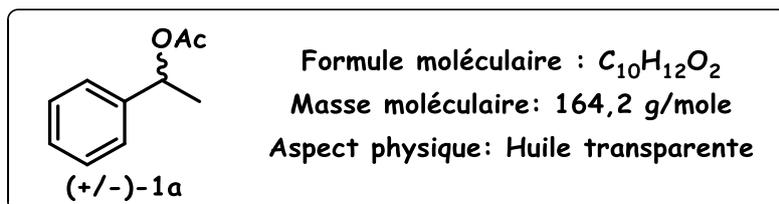
- ☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.21$. **Eluant** (v, v): cyclohexane/acétate d'éthyle (80/20).
- ☞ **CPG chirale**: Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5 minutes.
Débit : 1,2 ml/min. Temps de rétention : $t_R = 64.68$ min,
 $t_S = 66.2$ min.

■ Procédure générale d'acylation chimique des alcools racémiques :

Dans un ballon muni d'un barreau aimanté, on dispose 5mmoles d'alcool racémique, 0.5éq de DMAP (soit 0.061g) et 6éq. de Et_3N (soit 0.6g) dissout dans 30mL d'éther anhydre ; on y ajoute goutte à goutte 7.5éq. d'anhydride acétique (soit 0.76g). La réaction se déroule sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince CCM. Après la consommation complète de l'alcool initial, on dilue la solution dans l'éther sec, en lavant successivement avec une solution d'HCl 1N (3x40ml) pour éliminer l'excès de l'amine, puis avec une solution saturée de $NaHCO_3$ (3x40ml) et à la fin avec une solution saturée de $NaCl$ (3x40ml). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur célite et évaporée sous vide. L'organigramme suivant explique les étapes de traitement.



■ Le 1-phényléthyl acétate(+/-)-1a :



Pour 0.61g de 1-phényléthanol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile transparente d'une masse $m_{\text{acétate}}=0.8\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt=95\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 698,2 ; 759,9 ; 945,1 ; 1242,1 ; 1373,2 ; 1739,7$ ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 2981,7.
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) = 1.54-1.56 (d, $J=6.58 \text{ Hz}$, 3H, CH_3 -*CH-OAc) ; 2.08 (s, 3H, $-\text{OC}-\text{CH}_3$) ; 5.87–5.93 (q, $J=6,6\text{Hz}$, 1H, CH_3 -* CH -OAc) ; 7.26-7.37 (m_a , 5H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) = 21.45 ; 22.31; 72.40 ; 126.18 ; 127.96 ; 128.59 ; 142.77; 170.39.

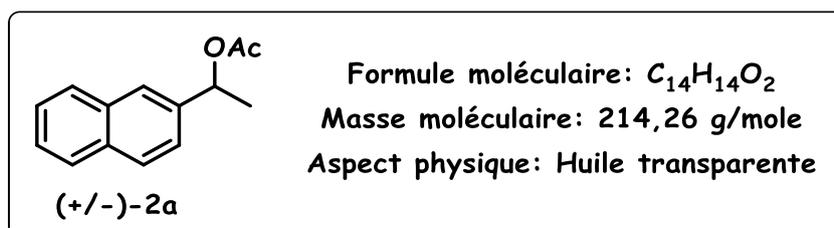
✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.6$. **Eluant** (v,v): Ether de pétrole / Acétone (90/10).
- ☞ **CPG chirale**: Isotherme 140°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_s = 3.41 \text{ min}$,

$$t_R = 3.62 \text{ min.}$$

■ Le 1-(naphthalén-2-yl)éthyl acétate (+/-)-2a:



Pour 0.86g de 1-(naphthalén-1-yl) éthanol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune d'une masse $m_{\text{acétate}}=0.97\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt=93\%$.

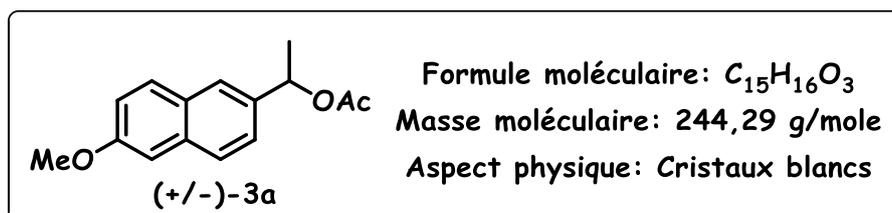
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 773,4 ; 796,55 ; 939,27 ; 1016,42 ; 1043,42 ; 1066,56 ; 1170,71 ; 1232,43 ; 1367,44 ; 1444,58 ; 1512,09 ; 1596,95 ; 1720,39 ; 2935,46 ; 2981,74 ; 3049,25$.
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** 1.65-1.67 (d, $J=6.75\text{Hz}$, 3H, CH₃-*CH-OAc); 2.13 (s, 3H, -₂OC-CH₃) ; 6.06-6.13 (q, $J=6,75\text{Hz}$, 1H, CH₃-*CH-OAc) ; 7.30-7.52 (m_a, **3H**aromatique); 7.85-7.88 (m_a, **4H**aromatique).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 21.48; 22.28; 72.52; 124.18 ; 125.10 ; 126.14; 126.31 ; 127.75 ; 128.11 ; 128.45 ; 133.10 ; 133.26 ; 139.09 ; 170.41.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal:** $R_f = 0.7$. **Eluant (ν, ν):** Ether de pétrole / Acétone (90/10).
- ☞ **CPG chirale:** Isotherme 170°C. Débit : 1.2 ml/min.
Temps de rétention : $t_S = 9.73$ min,
 $t_R = 10.08$ min.

■ Le 1-(6-méthoxynaphthalén-2-yl)éthyl acétate (+/-)-3a:



Pour 1.01gde 1-(6-méthoxynaphthalén-2-yl) éthanol.Le produit est obtenu sous forme de cristaux blancs d'une masse $m_{\text{acétate}}=0.90\text{g}$ soit un rendement chimique $R_{dt}=75\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 670 ; 920 ; 1020 ; 1170 ; 1230 ; 1470 ; 1590 ; 1720$.
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** 1.60-1.63 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H, CH₃-*CH-OAc) ; 2.09 (s, 3H, , -₂OC-CH₃) ; 3.92 (s, 3H, H₃C-O-) ; 6.00-6.06 (q, $J=6.32\text{Hz}$, 1H, CH₃-*CH-OAc) ; 7.12-7.17 (m_a, **2H**aromatique); 7.43-7.47 (dd, $J=1.5\text{Hz}$, **1H**aromatique); 7.72-7.75 (m_a, **3H**aromatique).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 21.57; 22.23; 55.45; 72.60; 105.76; 119.19; 124.86; 125.13; 127.29; 128.73; 129.64; 134.34; 136.82; 157.97; 170.54.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

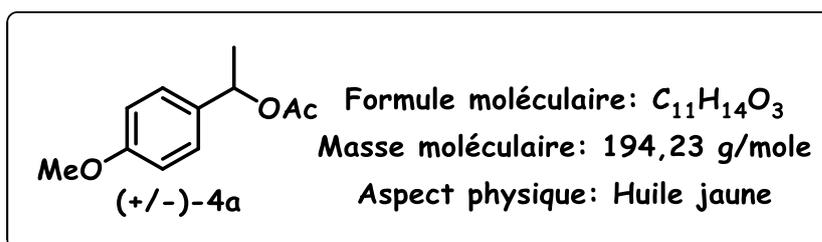
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.72$. *Eluant* (v,v): Ether de pétrole / Acétone (90/10).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 180°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_S = 18.31$ min,

$t_R = 18.83$ min.

■ Le 1-(4-méthoxyphényl)éthylacétate(+/-)-4a :



Pour 0.76g de 1-(4-méthoxyphényl) éthanol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune d'une masse $m_{\text{acétate}} = 0.6\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt = 82\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 828 ; 1244 ; 1512 ; 1613 ; 1736 (\nu_{\text{C=O}}) ; 2935 ; 2983$.

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) = 1.51-1.53 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH_3 -*CH-OAc); 2.04 (s, 3H, $-\text{OC}-\text{CH}_3$) ; 3.79 (s, 3H, CH_3 -O-) ; 5.81-5.88 (q, $J=7.5$ Hz, 1H, CH_3 -*CH-OAc) ; 6.85-6.90 (m_a , 2H aromatique) ; 7.25-7.32 (m_a , 2H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) = 21.49; 22.04; 55.34; 72.09; 113.91; 127.68 ; 133.82; 159.35; 170.45.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

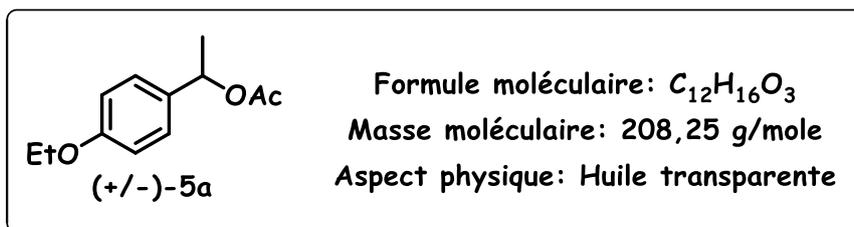
☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.53$. *Eluant* (v,v): Ether de pétrole / Acétone (90/10).

☞ **CPG chirale**: Isotherme 135°C. Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_S = 15.51$ min,

$t_R = 16.51$ min .

■ Le 1-(4-éthoxyphenyl)éthyl acétate (+/-)-5a



Pour 0.83g de 1-(4-éthoxyphenyl) éthanol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile transparente d'une masse $m_{\text{acétate}} = 0.85\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt = 75\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **IR (film, cm^{-1})** : $\nu = 828 ; 1242 ; 1512 ; 1586 ; 1613 ; 1737 (\nu_{\text{C=O}}) ; 2983$.
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 1.39-1.43 (t, $J=7\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 1.52-1.54 (d, $J=6.58\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-*CH-OAc}$) ; 2.056 (s, 3H, $\text{-}_2\text{OC-CH}_3$) ; 3.99-4.06 (q, $J=6.98\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 5.82-5.89 (q, $J=5.58\text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_3\text{-*CH-OAc}$) ; 6.68-6.90 (ma, 2H aromatique) ; 7.26-7.30 (ma, 2H aromatique).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) = 15.00; 21.58; 22.09; 63.59; 72.19; 114.52 ; 127.74 ; 133.70 ; 158.80; 170.53.

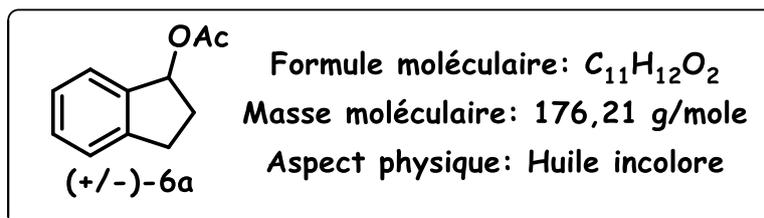
✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.49$. **Eluant** (ν, ν): Ether de pétrole / Acétone (90/10).
- ☞ **CPG chirale**: Isotherme 155°C . Débit : 1.2 ml/min.

Temps de rétention : $t_S = 7.41\text{ min}$,

$t_R = 7.87\text{ min}$.

■ Le 2-3-dihydro-1H-indén-1-yl acétate (+/-)-6a



Pour 0.67g de 2,3-dihydro-1H-indan-1-ol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile incolore d'une masse $m_{\text{acétate}} = 0.83\text{g}$ soit un rendement chimique $Rdt = 90\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1}):** $\nu = 764,4; 892,98; 956,63; 1016,42; 1220,86; 1271,29; 1431; 1461,94; 1479,3; 1720,39; 2852,52; 2941,24; 3028,03.$

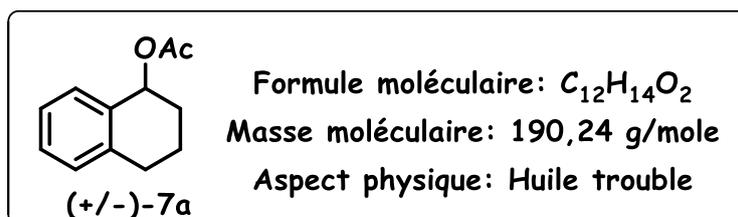
☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 2,08 (s, 3H, -2OC-CH₃) ; 2.09-2.18 (m_a, 1H cyclique) ; 2.45-2,57 (m_a, 1H cyclique) ; 2.84-2.94 (m_a, 1H cyclique) ; 3.08-3.18 (m_a, 1H cyclique) ; 6.19-6.23 (q, $J=4,75\text{Hz}$, 1H, -CH₂-*CH-OAc) ; 7.23-7.31 (m_a, 3H aromatique) ; 7.41-7.44 (m_a, 3H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 21.51; 30.37; 32.46; 78.51; 124.98; 125.71 ; 126.87 ; 129.11; 141.21 ; 144.59; 171.27.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.86.$ **Eluant (ν, ν):** Ether de pétrole / Acétone (90/10).

☞ **CPG chirale :** Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5 minutes.
Débit : 1,2 ml/min. Temps de rétention : $t_S = 48.75$ min,
 $t_R = 49.60$ min.

■ Le 1,2,3,4-tetrahydronaphthalén-1-yl acétate(+/-)-7a :

Pour 0.74g de 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-ol. Le produit est obtenu sous forme d'une huile trouble d'une masse $m_{\text{acétate}} = 0.87\text{g}$ soit un rendement chimique $R_{dt} = 92\%$.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **IR (film, cm^{-1}):** $\nu = 760 ; 1238,2 ; 1485 ; 1732,0; 2800.$

☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1.80-1.83 (m_a, 1H cyclique) ; 1.93-2.08 (m_a, 3H cyclique) ; 2.08 (s, 3H, -2OC-CH₃) ; 2.68-2.90 (m_a, 2H cyclique) ; 5.98-6.01 (t, $J=4.09\text{Hz}$; 1H, HO-*CH-CH₂) ; 7.10-7.29 (m_a, 4H aromatique).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 18.99; 21.16; 29.16; 29.27; 70.15; 126.26; 128.27; 129.63; 134.73; 138.10; 170.94.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontale** : $R_f = 0.71$. **Eluant** (*v,v*): Ether de pétrole / Acétone (90/10).
- ☞ **CPG chirale** : Graduant : 80°C pendant 7 minutes, puis 135°C pendant 5 minutes.
Débit : 1,2 ml/min. Temps de rétention : $t_S = 60.11$ min,
 $t_R = 61.42$ min.

■ Procédure générale de l'alcoolyse enzymatique des acétates racémiques 1a-7a:

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté, sont disposés 1 équivalent d'acétate racémique, 2 équivalents de l'alcool sélectionné, en présence de 12 mg de *CAL-B*, dans 2 ml de solvant organique (DIPE ou Toluène). La réaction est menée sous agitation magnétique à 40°C durant 24 heures. Pour les réactions avec tamis moléculaire 4Å, on ajoute 60 mg de ce dernier. Ensuite, les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. L'avancement des réactions et les excès énantiomériques des acétates résiduels et des alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les rendements chimiques isolés sont évalués après séparation sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : Ether de pétrole/acétate d'éthyle (90/10).

■ Procédure générale de l'aminolyse enzymatique des acétates racémiques 1a-7a:

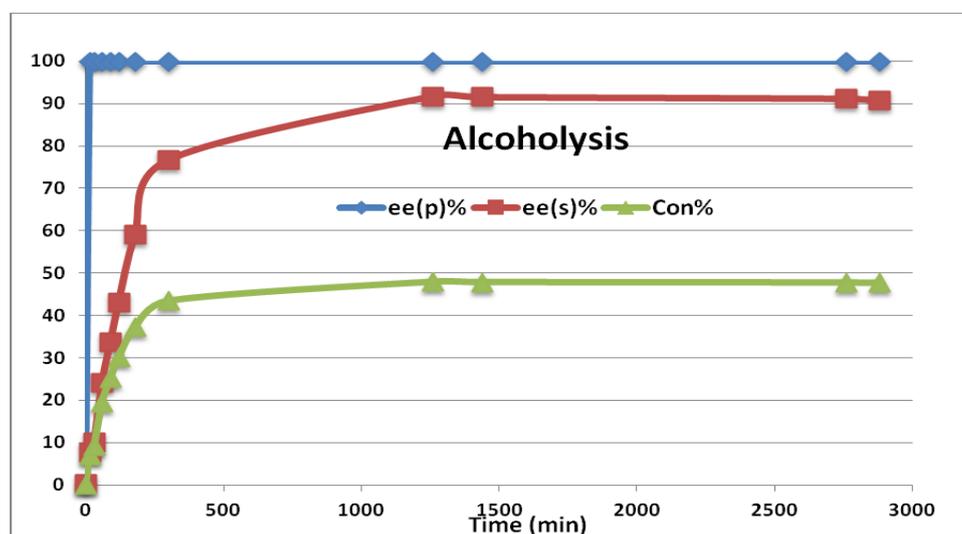
Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté, sont disposés 1 équivalent d'acétate racémique, 2 équivalents de l'amine sélectionnée, en présence de la quantité appropriée de *CAL-B* (12 mg- 24 mg- 35 mg- 50 mg), dans 2 ml de solvant organique (DIPE ou Toluène). La réaction est menée sous agitation magnétique à 40°C durant 24 heures. Pour les réactions avec tamis moléculaire 4Å, on ajoute 60 mg de ce dernier. Ensuite, les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporés sous vide. Un lavage acide est effectué pour les réactions avec l'aniline et la benzylamine. L'avancement des réactions et les excès énantiomériques des acétates résiduels et des alcools obtenus sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse chirale. Les rendements chimiques isolés sont évalués après séparation sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : Ether de pétrole/acétate d'éthyle (90/10).

■ Profil cinétique de la deacylation par alcoolyse lipasique de 1a:

Dans un petit ballon, on introduit 4 mmoles du 1-phényléthyl acétate **1a**, en utilisant 8 mmole d'EtOH, avec 50 mg de *CAL-B* et 240 mg de MS 4Å dans 8ml de DIPE. L'évolution de la réaction de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50µL du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur silice. Les résultats du suivi sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Entrée	Temps (min)	ee _(p) %	ee _(s) %	C%	E
1	0	0	0.2	0	>200
2	15	99.9	7.5	7	>200
3	30	99.9	10	9.1	>200
4	60	99.9	24.2	19.5	>200
5	90	99.9	33.7	25.2	>200
6	120	99.9	43.1	30.1	>200
7	180	99.9	59.1	37.2	>200
8	300	99.9	76.7	43.4	>200
9	1260	99.9	91.7	47.9	>200
10	1440	99.9	91.5	47.8	>200
11	2760	99.9	91.1	47.7	>200
12	2880	99.9	90.7	47.6	>200

Le profil cinétique de la réaction est présenté dans l'historgramme ci-dessous :

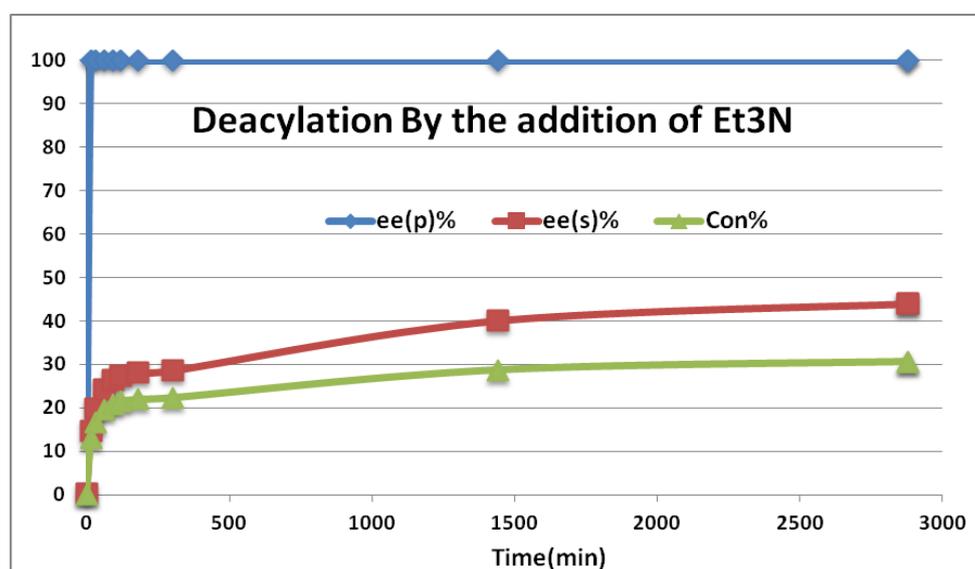


■ Profil cinétique de la deacylation lipasique de 1a par l'introduction de la Et₃N:

Dans un petit ballon, on introduit 4 mmoles du 1-phényléthyl acétate **1a**, en utilisant 8 mmole de Et₃N, avec 50 mg de CAL-B et 240 mg de MS 4Å dans 8ml de DIPE. L'évolution de la réaction de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50µL du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur silice. Les résultats du suivi sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Entrée	Temps (min)	ee(s)(%)	ee(R) (%)	C (%)	E
1	0	0	0.2	0	>200
2	15	99.9	14.7	12.9	>200
3	30	99.9	19.9	16.6	>200
4	60	99.9	24.2	19.5	>200
5	90	99.9	26.3	20.8	>200
6	120	99.9	27.3	21.5	>200
7	180	99.9	28	21.9	>200
8	300	99.9	28.6	22.3	>200
9	1440	99.9	40.1	28.7	>200
10	2880	99.9	44	30.6	>200
11	2880	99.9	44	30.6	>200

Le profil cinétique de la réaction est présenté dans l'historgramme ci-dessous :

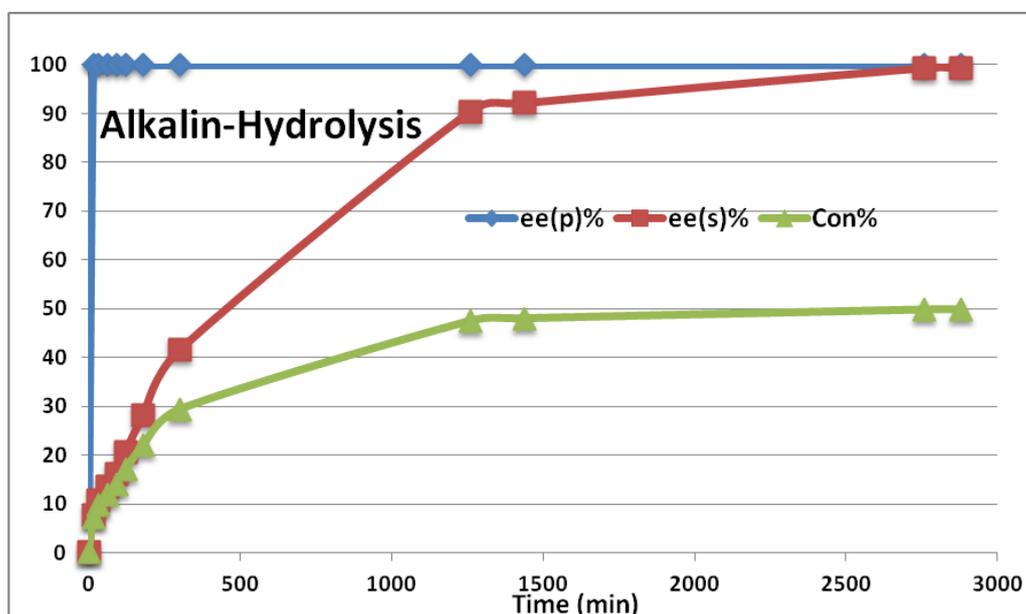


■ **Profil cinétique de la deacylation lipasique de 1a par hydrolyse alcaline:**

Dans un petit ballon, on introduit 4 mmoles du 1-phényléthyl acétate **1a**, en utilisant 4 mmoles de carbonate de sodium, avec 200 mg de CAL-B dans 8ml de THF. L'évolution de la réaction de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50 μ L du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur silice. Les résultats du suivi sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Entrée	Temps (min)	ee _(p) %	ee _(s) %	C%	E
1	0	0	0.2	0	>200
2	15	99.9	7.7	7.2	>200
3	30	99.9	10.8	9.8	>200
4	60	99.9	13.5	11.9	>200
5	90	99.9	16.2	14	>200
6	120	99.9	20.5	17	>200
7	180	99.9	28.1	22	>200
8	300	99.9	41.5	29.4	>200
9	1260	99.9	90.4	47.5	>200
10	1440	99.9	92.1	48	>200
11	2760	99.9	99.3	49.8	>200
12	2880	99.9	99.3	49.8	>200

Le profil cinétique de la réaction est présenté dans l'historgramme ci-dessous :

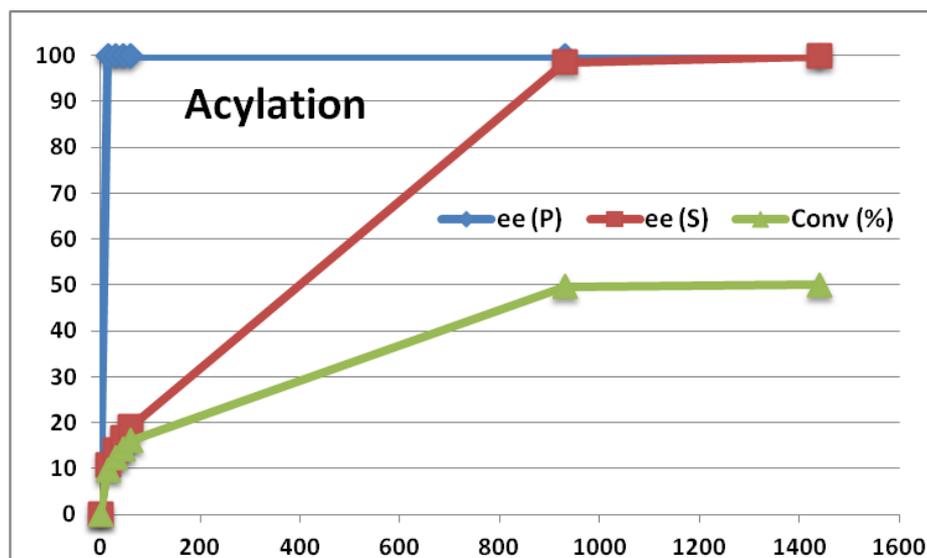


■ Profil cinétique de l'acylation lipasique du 1-phényléthanol 1:

Dans un petit ballon, on introduit 4 mmoles du 1-phényléthanol1, en utilisant 12 mmoles d'acétate d'isopropényle avec 200 mg de CAL-B dans 20 ml d'éther. L'évolution de la réaction de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50 μ L du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur silice. Les résultats du suivi sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

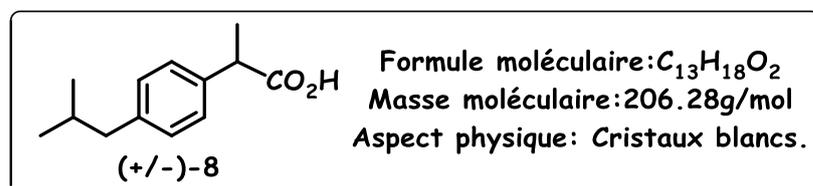
Entrée	Temps (min)	ee _(S) (%)	ee _(R) (%)	C (%)	E
1	0	0	0	0	0
2	15	10.9	99.9	9.8	>200
3	30	14	99.9	12.3	>200
4	45	16.8	99.9	14.4	>200
5	60	19.1	99.9	16.1	>200
6	930	98.5	99.9	49.6	>200
7	1440	99.9	99.9	50	>200

Le profil cinétique de la réaction est présenté dans l'historgramme ci-dessous :



Chapitre V

Aminolyse lipasique de quelques acides carboxyliques et de leurs dérivés

■ Les acides racémiques (profènes):↳ Acidification des sels d'ibuprofène:

Dans un erlenmeyer muni d'un barreau aimanté, 5g des sels d'ibuprofène sodiques sont dissoutes dans un mélange de 50ml d'acide chlorhydrique (HCl : 1N) et 100ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2). La solution est soumise sous agitation magnétique durant une demi-heure. Une extraction liquide-liquide est faite et la phase organique est séchée avec un avec du Na_2SO_4 puis filtrée et évaporée sous vide.

L'acide 2-(4-isobutylphényl) propionique (+/-)-8 « **Ibuprofène** » est obtenu sous forme de cristaux fins et blancs d'une masse 4.13g soit un rendement chimique 91%.

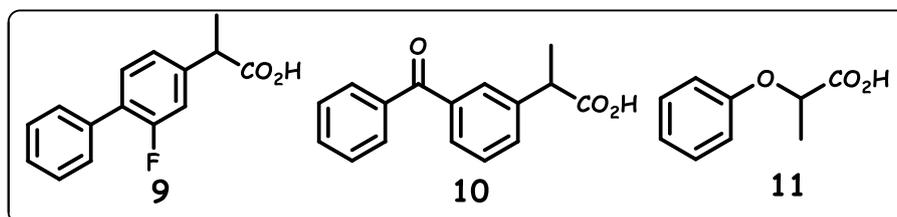
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **RMN¹H (250MHz, $CDCl_3$):** δ (ppm) = 0.9 (d, 6H, $-CH-(CH_3)_2$) ; 1.5 (d, 3H, $-^*CH-CH_3$) ; 1.85-2 (m_a, 1H, $-CH-(CH_3)_2$) ; 2.5 (d, 2H, $-CH_2-CH(CH_3)_2$) ; 3.75-3.95 (q, 1H, $-^*CH-CH_3$) ; 7.1 (d, 2H aromatiques) ; 7.4 (d, 2H aromatiques) ; 11.5 (sl, 1H de OH acide).

✂ Caractéristiques chromatographiques :

☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.32$. **Eluant:** CH_2Cl_2 .

Le reste des acides carboxyliques sont commerciaux.

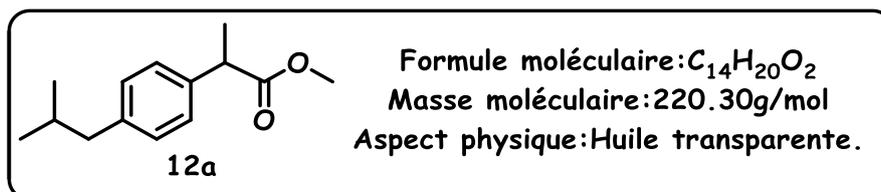


✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ Rapport frontal de l'acide 2-(2-fluorobiphényl-4-yl) propionique « Flurbiprofène »(+/-)-**9**: $R_f = 0.28$. *Eluant*: CH_2Cl_2 .
- ☞ Rapport frontal de l'acide 2-(3-benzoylphényl) propionique « Kétoprofène »(+/-)-**10**: $R_f = 0.28$. *Eluant*: CH_2Cl_2 .
- ☞ Rapport frontal de l'acide 2-phénoxy propionique(+/-)-**11**: $R_f = 0.41$. *Eluant*: CH_2Cl_2 .

■ Procédure générale de la synthèse des esters racémiques:

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant sont disposés 4g d'acide, 1g de tamis moléculaire 4Å et 2ml d' H_2SO_4 dans 50ml d'alcool (MeOH ou EtOH). Le mélange est soumis sous agitation magnétique à reflux. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM), dès consommation totale de l'acide, le solvant est évaporé et une extraction liquide-liquide avec du NaOH 1N (3 x 40ml) est effectuée. Les phases organiques sont réunies séchées sur MgSO_4 , filtrée et est évaporé sous vide.

■ Le méthyl 2-(4-isobutylphényl) propanoate (+/-)-**12a** :

Masse obtenue est de 3.14g soit un rendement de 78.3%.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$) ; 1.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) ; 1.90 (ma, 1H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}-(\text{CH}_3)_2$) ; 2.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$) ; 3.69 (s, 3H, O- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) ; 3.74 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-\text{CH}_3$) ; 7.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H aromatiques) ; 7.25 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 18.64 ; 22.41 ; 30.2 ; 45.04 ; 45.07 ; 51.92 ; 127.15 ; 129.36 ; 137.8 ; 140.53 ; 175.16.

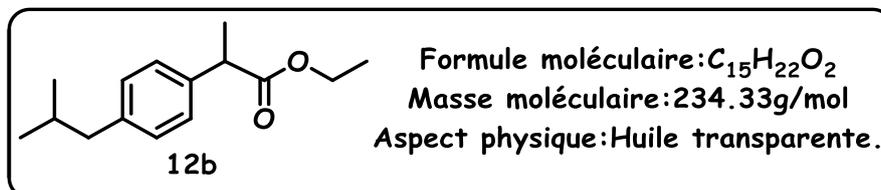
✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ Rapport frontal : $R_f = 0.74$. *Eluant*: CH_2Cl_2 .

☞ **HPLC chirale**: Colonne : Chiralpak IC. Eluant : Isohexane / Isopropanol (98/2) avec un débit de 0.7ml / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 7.188$ minutes.

$t_{R2} = 7.431$ minutes.

■ **Le Ethyl 2-(4-isobutylphényl) propanoate (+/-)-12b :**



Masse obtenue est de 3.44g soit un rendement de 86%.

✂ **Caractéristiques spectroscopiques :**

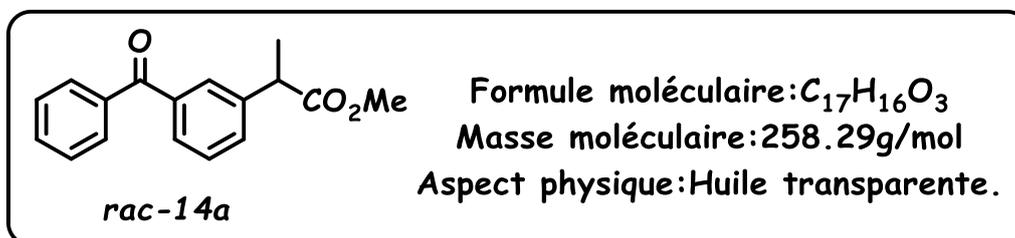
✂ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂) ; 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, -CH₂-CH₃) ; 1.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, -^{*}CH-CH₃) ; 1.90 (ma, 1H, -CH-(CH₃)₂) ; 2.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, -CH₂-CH(CH₃)₂) ; 3.73 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, -^{*}CH-CH₃) ; 4.34 – 3.95 (ma, 2H, -CH₂-CH₃) ; 7.14 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H aromatiques) ; 7.25 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H aromatiques).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 14.13 ; 18.64 ; 22.41 ; 30.2 ; 45.09 ; 45.18 ; 60.58 ; 127.15 ; 129.3 ; 129.64 ; 137.96 ; 140.39 ; 174.68.

✂ **Caractéristiques chromatographiques :**

☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.69$. **Eluant:** CH₂Cl₂.

■ **Le méthyl 2-(3-benzoylphényl) propanoate(+/-)-14a :**



Pour 1g. Masse obtenue est de 0.76 g soit un rendement de 76.3%.

✂ **Caractéristiques spectroscopiques :**

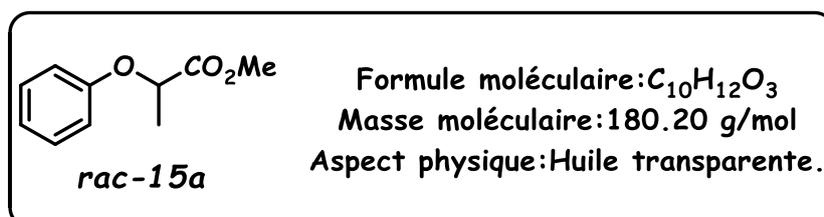
☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, -^{*}CH-CH₃) ; 3.69 (s, 3H, -O-CH₃) ; 3.82 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, -^{*}CH-CH₃) ; 7.34-7.64 (ma, 5H aromatiques) ; 7.67-7.71 (ma, 1H aromatiques) ; 7.77-7.83 (ma, 3H aromatiques).

- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 18.52 ; 45.27 ; 52.18 ; 128.3 ; 128.5 ; 129 ; 128.56 ; 128.3 ; 128.5 ; 129 ; 129.2 ; 130 ; 131.5 ; 132.5 ; 137.47 ; 137.9 ; 140.8 ; 174.53 ; 196.48.

✂ **Caractéristiques chromatographiques :**

- ☞ **Rapport frontal :R_f = 0.9. Eluant:** CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (90/10) avec un débit de 0.5ml / min. Temps de rétention : t_{R1} = 9.00 minutes.
t_{R2} = 9.92 minutes.

■ **Le méthyl 2-phénoxypropanoate (+/-)-15a :**



Pour 1g. Masse obtenue est de 0.93 g soit un rendement de 93.5%.

✂ **Caractéristiques spectroscopiques :**

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):δ (ppm)** = 1.63 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, -^{*}CH-CH₃) ; 3.76 (s, 3H, -O-CH₃) ; 4.78(q, *J* = 6.8 Hz, 1H, -^{*}CH-CH₃) ; 6.87-6.9(m_a, 2H aromatiques) ; 6.98 (t, *J* = 7.4 Hz 1H aromatiques) ; 7.27-7.31 (m_a, 2H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 18.62 ; 52.34 ; 72.51 ; 115.03 ; 121.61 ; 129.58 ; 157.51 ; 172.76.

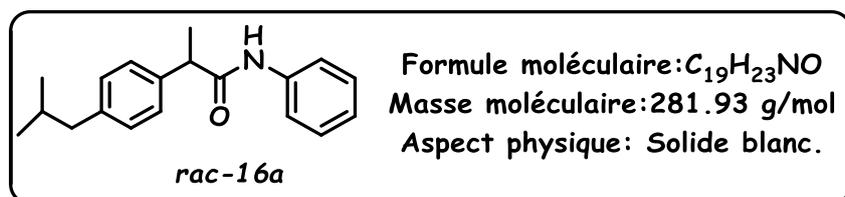
✂ **Caractéristiques chromatographiques :**

- ☞ **Rapport frontal :R_f = 0.81. Eluant:** CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chirapak OD-H. Eluant : Isohexane / Ethanol (98/2) avec un débit de 1ml / min. Temps de rétention : t_{R1} = 5.99 minutes.
t_{R2} = 11.132 minutes.

■ Procédure générale de la synthèse des amidoprofènes racémiques:

Dans un petit ballon, on dispose 1mmole d'acide racémique, 1.2équivalent d'amine et 1.1équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans 20ml de chloroforme (CH₃Cl). Le mélange réactionnel est soumis sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie chromatographie sur couche mince (CCM) jusqu'à la consommation totale de l'acide de départ. Le produit amide est obtenu pur suite à une filtration suivi d'une évaporation sous vide, puis une recristallisation dans l'hexane. Une purification sur colonne de gel de silice est effectuée si nécessaire.

■ Le 2-(4-isobutylphényl)-N-phénylpropanamide(+/-)-16a :



Pour 1mmole d'acide (0.206 g). Masse obtenue est de 0.278g g soit un rendement de 99%.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

☞ **RMN¹H (250MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.9 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H, -CH-(**CH**₃)₂) ; 1.6 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, -^{*}CH-**CH**₃) ; 1.7-1.8 (m_a, 1H, -**CH**-(CH₃)₂) ; 2.5 (d, 2H, -**CH**₂-CH(CH₃)₂) ; 3.75-3.95 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz, -^{*}CH-CH₃) ; 7.1-7.15 (m_a, 4H aromatiques) ; 7.2-7.26 (m_a, 3H aromatiques + 1**NH**) ; 7.3-7.4 (m_a, 4H aromatiques).

☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 18.48 ; 22.39 ; 24.95 ; 25.61 ; 33.96 ; 45 ; 47.49 ; 49.17 ; 119.56 ; 124.15 ; 126.89 ; 127.44 ; 128.9 ; 129.89 ; 137.89 ; 138 ; 141.13 ; 156.71 ; 172.52.

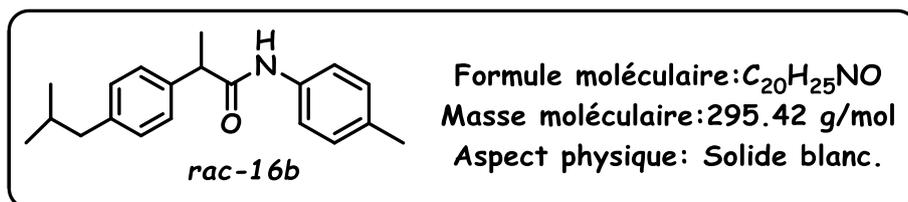
✂ Caractéristiques chromatographiques :

☞ **Rapport frontal :** R_f = 0.72. **Eluant:** CH₂Cl₂.

☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : t_{R1} = 7.551 minutes.

t_{R2} = 8.66 minutes.

■ Le2-(4-isobutylphényl)-N-(p-tolyl)propanamide(+/-)-16b :



Pour 1 mmole d'acide (0.206 g). Masse obtenue est de 0.264g g soit un rendement de 91%.

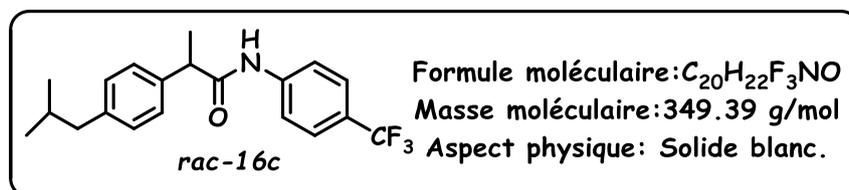
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.90 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$) ; 1.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $CH_3-CH-CO$); 1.90-1.81 (m_a , 1H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$); 2.27 (s, 3H, CH_3 de la toluidine); 2.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$) ; 3.67 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H du C*); 7.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H aromatiques + 1H aromatique de la toluidine) ; 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz 1H aromatiques de la toluidine + 1H amide) ; 7.30-7.24 (m_a , 2H aromatiques adjacents du C*+ 2H aromatiques de la toluidine).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 18.53 ; 20.82 ; 24.95 ; 25.6 ; 30.19 ; 33.93 ; 5-45.02 ; 47.69 ; 127.44 ; 129.36 ; 129.83 ; 133.75 ; 138.17 ; 141.03 ; 172.45.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.72$. **Eluant:** CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 mL / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 7.551$ minutes.
 $t_{R2} = 8.66$ minutes.

■ Le2-(4-isobutylphényl)-N-(4-(trifluorométhyl)phényl)propanamide(+/-)-16c :



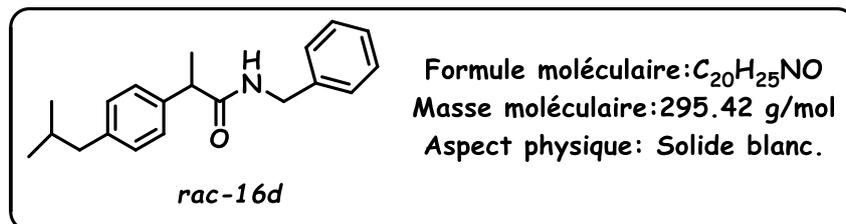
Pour 1 mmole d'acide (0.206 g). Masse obtenue est de 0.245g g soit un rendement de 70 %.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.81$. **Eluant:** CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 6.68$ minutes.

$t_{R2} = 8.19$ minutes.

■ **Le N-benzyl-2-(4-isobutylphényl)propanamide(+/-)-16d :**



Pour 1 mmole d'acide (0.206 g). Masse obtenue est de 0.306g g soit un rendement de 98%.

✂ **Caractéristiques spectroscopiques :**

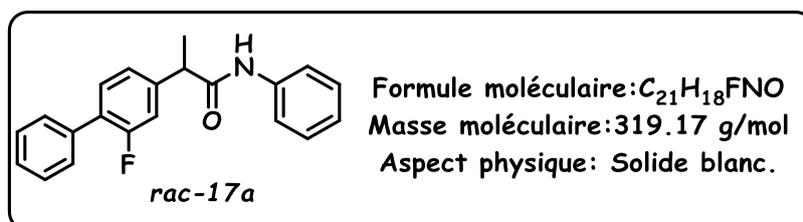
- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.91 (d, $J = 5.8$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$) ; 1.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CO}$) ; 1.91-1.82 (ma, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$) ; 2.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$) ; 3.6 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H du C*) ; 4.44 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Bn}$), 5.73 (bs, 1H amide) ; 7.28-7.12 (ma, 9H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 18.44 ; 20.99 ; 22.37 ; 24.7 ; 24.95 ; 25.62 ; 30.19 ; 31 ; 32.76 ; 33.92 ; 43.5 ; 45 ; 46.79 ; 49.11 ; 126.9 ; 124.15 ; 127.3 ; 127.36 ; 128.589 ; 129.66 ; 138.35 ; 138.44 ; 140.79 ; 174.4.

✂ **Caractéristiques chromatographiques :**

- ☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.48$. **Eluant:** CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 15.77$ minutes.

$t_{R2} = 20.9$ minutes.

■ **Le N2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-phenylpropanamide(+/-)-17a:**



✂ **Caractéristiques spectroscopiques :**

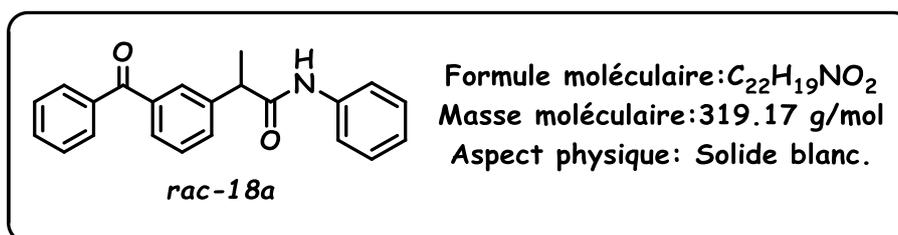
- ☞ **RMN¹H (250MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1.62 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CO}$) ; 3.73 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H du C*) ; 7.55-7.06 (ma, 14H, 13H aromatiques+ 1H amide).

- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 18.66 ; 47.63 ; 115.21 ; 115.52 ; 119.58 ; 123.59 ; 123.64 ; 124.49 ; 127.8 ; 128.13 ; 128.31 ; 128.51 ; 128.91 ; 128.99 ; 131.32 ; 135.28 ; 137.69 ; 142.21 ; 158.24 ; 161.54 ; 171.58.**

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :R_f = 0.8. Eluant: CH₂Cl₂.**
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 ml/ min. Temps de rétention : t_{R1} = 12.46 minutes.
t_{R2} = 21.67 minutes.

■ Le 2-(3-benzoylphényl)-N-phénylpropanamide(+/-)-18a :



Pour 2 mmole. Masse obtenue est de 0.644 g soit un rendement de 97%.

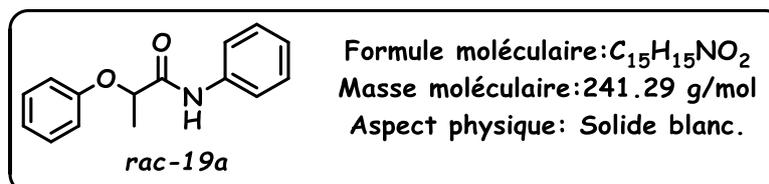
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.60 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃-CH-CO) ; 3.78(q, J = 7.1 Hz, 1H du C*) ; 7.82-7.06 (m_a, 15H, 14H aromatiques+ 1H amide).**

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :R_f = 0.68. Eluant: CH₂Cl₂.**
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/5) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : t_{R1} = 21.04 minutes.
t_{R2} = 24.2 minutes.

■ Le 2-phénoxy-N-phénylpropanamide(+/-)-19a :



Pour 2 mmole. Masse obtenue est de 0.45 g soit un rendement de 93%.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1.66 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, **CH₃**-CH-CO) ; 4.79 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H du C*) ; 7.33 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H aromatiques, 2H aniline +2H phenoxy) ; 7.54 (dd, $J = 8.6$, 2H aromatiques de l'aniline) ; 8.2 (bs, 1H, **NH** amide)
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 18.75 ; 75.5 ; 115.75 ; 119.96 ; 122.47 ; 124.7 ; 129.05 ; 129.93 ; 137.04 ; 156.73 ; 170.28.

☞

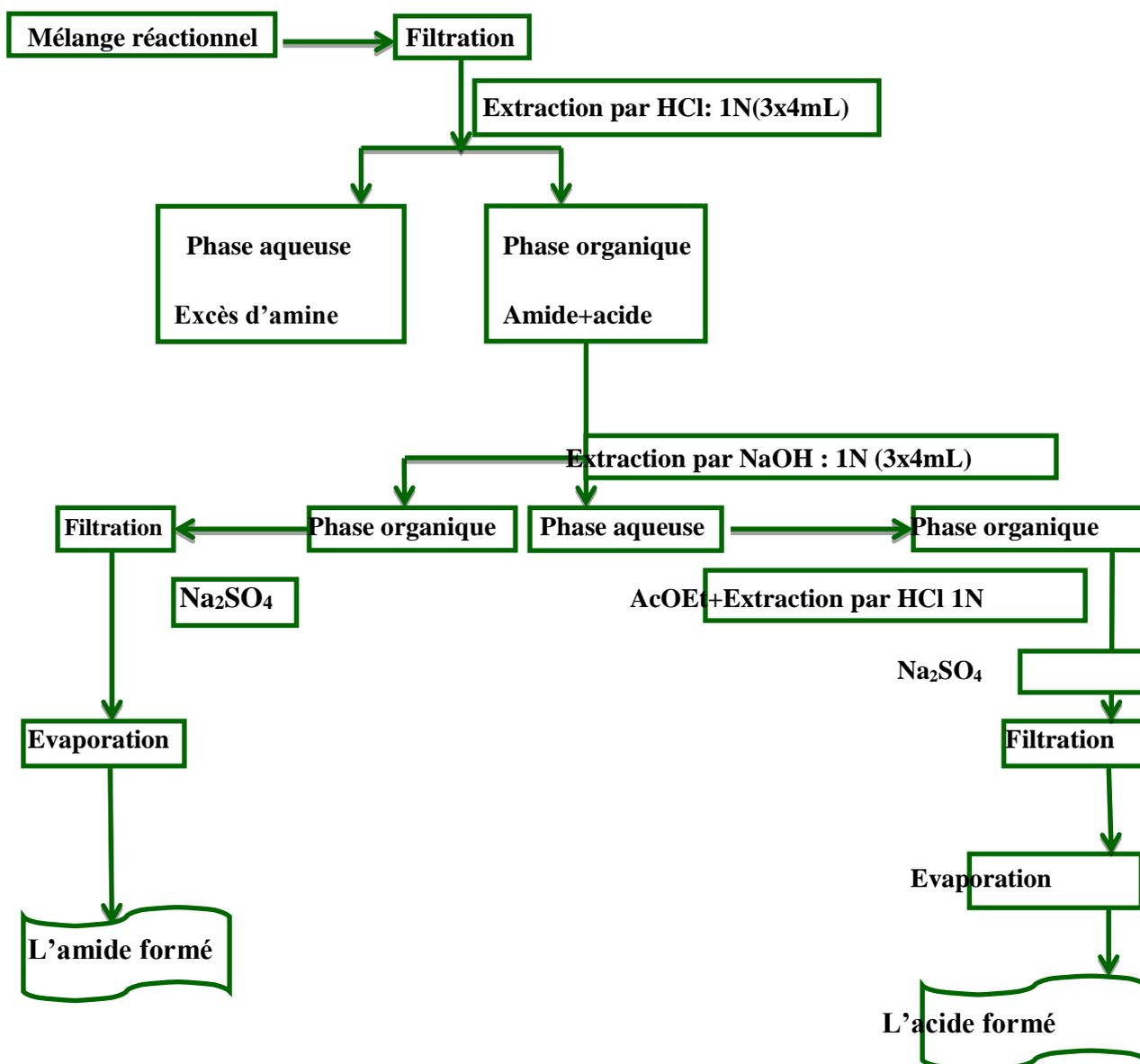
✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal** : $R_f = 0.63$. **Eluant**: CH₂Cl₂.
- ☞ **HPLC chirale**: Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (95/52) avec un débit de 1ml / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 8.83$ minutes.

$$t_{R2} = 10.5 \text{ minutes.}$$

■ Procédure générale de l'aminolyse lipasique des acides carboxyliques racémiques:

Dans un schlenk muni d'un barreau aimanté, 1mmole d'acide, 2mmoles d'amine en présence de 50 mg de CAL-B, sont dissoutes dans 2 mL d'heptane. 50 mg de TM 4Å sont ajoutées. Le mélange réactionnel est thermostaté à 80°C, durant 72 heures. Après 72 heures d'agitation, la lipase est filtrée sur célite ; suivi d'une extraction liquide-liquide (acido-basique). L'amide est récupéré directement dans la phase organique et l'acide dans la phase NaOH aqueuse. Le processus du traitement est simplifié par l'oganigramme ci-dessous :



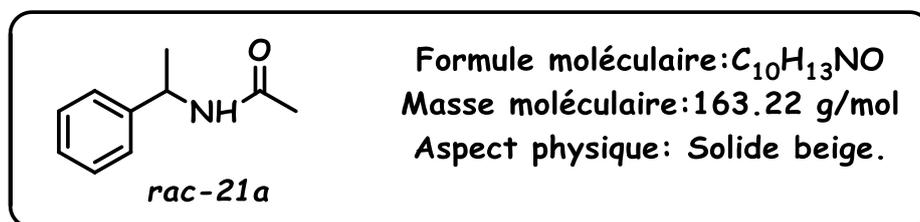
■ Procédure générale de l'aminolyse lipasique des esters carboxyliques racémiques:

Dans un schlenk muni d'un barreau aimanté, 1mmole d'acide, 2mmoles d'amine en présence de 50 mg de *CAL-B*, sont dissoutes dans 2 ml d'heptane. Le mélange réactionnel est thermostaté à 80°C, durant 72 heures. Après 72heures d'agitation, la lipase est filtrée sur célite. L'ester résiduel et l'amide formé sont séparés par chromatographie sur gel de silice.

■ Procédure générale de l'amidification des amines primaires racémiques:

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté, on dispose 1 équivalent d'amine avec 3 équivalents d'ester d'énol (AI, BV, VL). La réaction est soumise sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). Lorsque l'acylation est totale, on fait une extraction avec une solution de HCl (1N). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄, puis évaporées sous pression réduite. Une cristallisation dans l'hexane est effectuée si nécessaire.

■ Le N-(1-phényléthyl)acétamide (+/-)-21a :



1 millimole du 1-phényléthanamine **20** (soit : 0.121g) avec 3 millimole de l'acétate d'isopropényle (soit : 0.3g). L'acétamide obtenu est sous forme de solide beige, avec un rendement chimique de **Rdt=88.75%**.

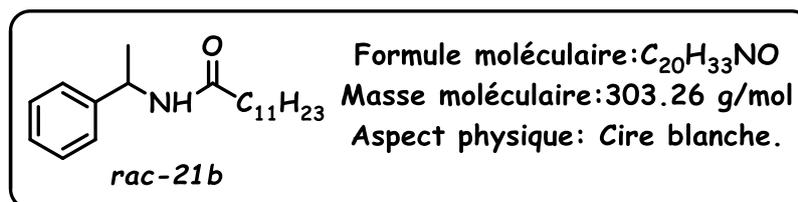
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.47-1.49 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃CH-); 1.96 (s, 3H, -NHCOCH₃); 5.06 – 5.16 (m, 1H, -CHNHCO); 6.29 (s, 1H, -NH); 7.43 – 7.09 (m_a, 5H aromatiques).**
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 21.78 ; 23.28 ; 48.84 ; 126.19 ; 127.3 ; 128.62 ; 143.26 ; 169.33.**

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :R_f = 0.12. Eluant : CH₂Cl₂ /MeOH (9/1).**
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (90/10) avec un débit de 1 mL / min. Temps de rétention : t_{R1} = 5.41 minutes.
t_{R2} = 6.21 minutes.

■ Le N-(1-phényléthyl)dodécaneamide (+/-)-21b :



1 millimole du 1-phényléthylamine **20** (soit : 0.121g) avec 3 millimole vinyl laurate (soit : 0.678g). L'amide obtenu est sous forme d'une cire blanche, avec un rendement chimique de **Rdt=83%**.

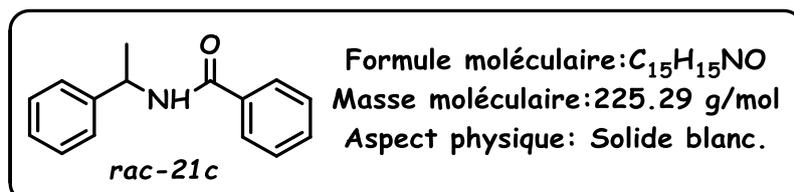
✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, -CH₂-CH₃) ; 1.27 (s, 15H, -CH₂-CH₂-) ; 1.52-1.50 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃-CH-) ; 1.80 – 1.56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-) ; 2.22 – 2.17 (m, 2H, OC-CH₂-CH₂-) ; 5.14 – 4.19 (m, 1H, -CHNHCO) ; 5.75 (s, 1H, -NH) ; 7.39 – 7.27 (m, 5H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 14.12 ; 21.69 ; 22.69 ; 25.78 ; 29.43 ; 31.91 ; 36.88 ; 48.62 ; 126.18 ; 127.35 ; 128.66 ; 143.22 ; 172.26.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :** $R_f = 0.59$. **Eluant :** CH₂Cl₂ / MeOH (9/1).
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (90/10) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : $t_{R1} = 4.58$ minutes.
 $t_{R2} = 5.3$ minutes.

■ Le N-(1-phényléthyl)benzamide(+/-)-21c :



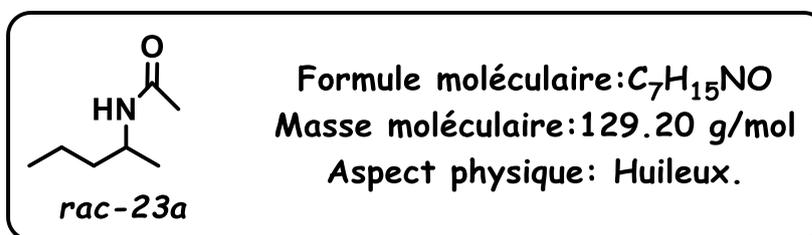
1 millimole du 1-phényléthylamine **20** (soit : 0.121g) avec 3 millimole vinyl benzoate (soit : 0.444g). Le benzamide obtenu est sous forme d'un solide blanc, avec un rendement chimique isolé de **Rdt = 72.4%**.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1.63 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃CH-NH-); 5.36 (d, J = 7.0 Hz, 1H, CH₃CH-NH-); 6.41 (d, J = 6.1 Hz, 1H, -NH); 7.66 – 7.06 (m_a, 8H aromatiques); 7.79 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 2H aromatiques).
- ☞ **RMN¹³C (75MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 21.73 ; 49.23 ; 126.26 ; 126.93 ; 127.47 ; 128.66 ; 131.47 ; 134.59 ; 143.12 ; 166.58.

✂ Caractéristiques chromatographiques :

- ☞ **Rapport frontal :** R_f = 0.82. **Eluant :** CH₂Cl₂ / MeOH (9/1).
- ☞ **HPLC chirale:** Colonne : Chiralpak IA. Eluant : Isohexane / Ethanol (90/10) avec un débit de 1 ml / min. Temps de rétention : t_{R1} = 14.89 minutes.
 t_{R2} = 18.71 minutes.

■ Le N-(pentan-2-yl) acétamide 23a:

1 millimole du pentan-2-amine **21** (soit : 0.087g) avec 3 millimole de l'acétate d'isopropényle (soit : 0.3g). L'acétamide obtenu est sous forme d'une huile marron, avec un rendement chimique de **Rdt=75%**.

✂ Caractéristiques spectroscopiques :

- ☞ **RMN¹H (300MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 0.8-0.9 (t, 3H, J = 7,22 Hz, CH₃CH₂CH₂); 0.93 - 0.90 (t, 3H, J = 7,08 Hz, CH₃CH₂CH₂-); 1.2-1.5 (m_a, 4H, CH₃CH₂CH₂); 1.08-1.1 (d, 3H, J = 6,6 Hz, CH₃CH); 1.91 (s, 3H, CH₃CONH-); 3.75-3.9 (m_a, 1H, CH₃CHNH-); 6.1-6.2 (sl, 1H, -NH).

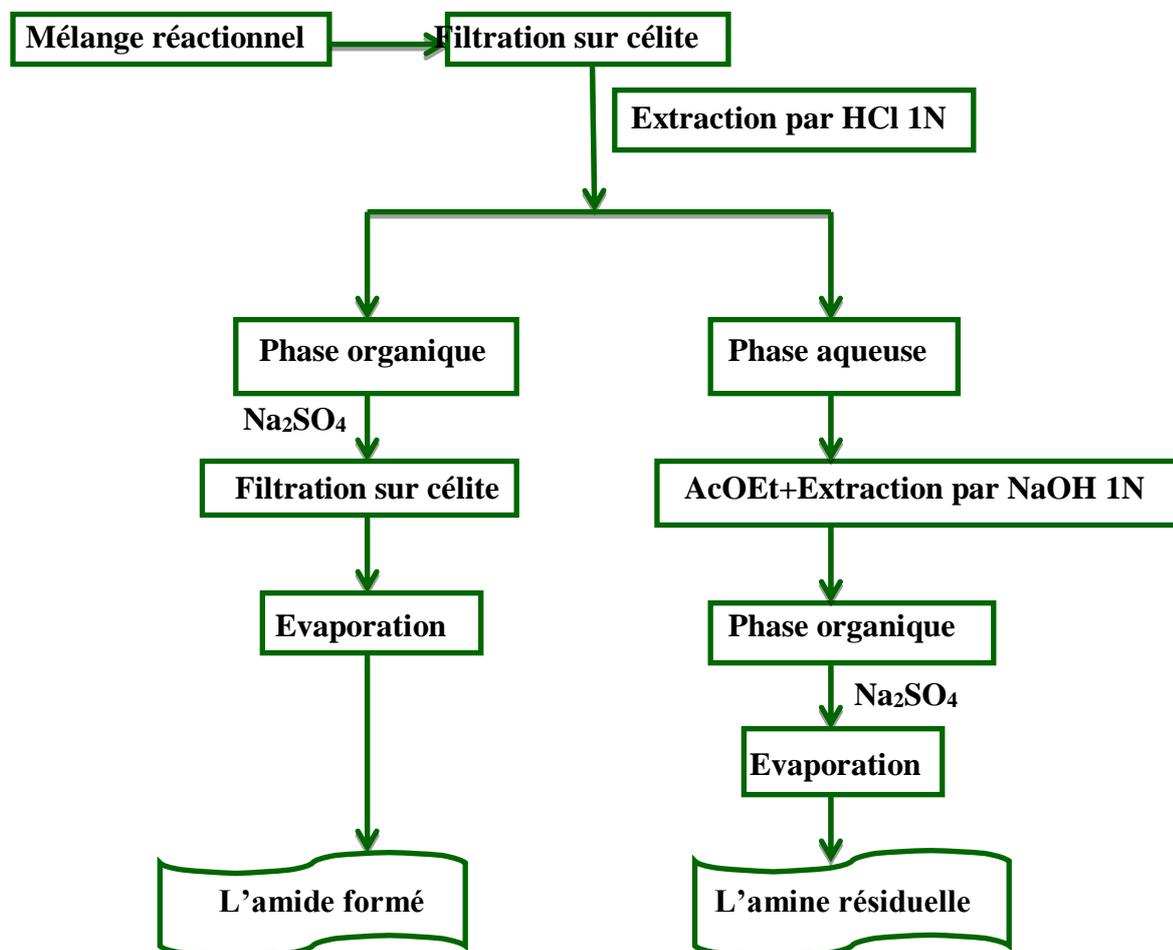
✂ Caractéristiques chromatographiques :

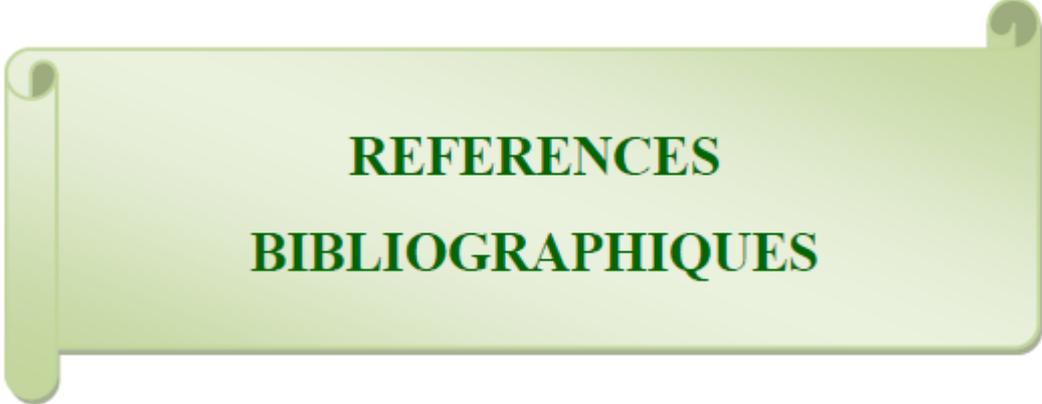
- ☞ **Rapport frontal :** R_f = 0.18. **Eluant :** CH₂Cl₂ / MeOH (9/1).
- ☞ **CPG chirale:** Isotherme 100°C. Débit de 1.2 mL / min.
Temps de rétention : t_{R1} = 9.912 minutes.

$t_{R2} = 11.900$ minutes.

■ Procédure générale de dédoublement cinétique par amidation enzymatique :

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté, on dispose 1 équivalent d'amine racémique avec 2 équivalents du donneur d'acyle ; dilué dans 2mL de solvant organique. On ajoute ensuite une quantité adéquate de la lipase. La réaction est soumise sous agitation magnétiques à température ambiante. Après 24 heures de réaction, l'enzyme est filtrée. La phase organique est traitée avec une solution de HCl (1N) afin de séparer l'amine résiduelle dans la phase acide et l'amide dans la phase organique. La phase acide est reprise par la suite avec une solution de NaOH (1N) et diluée dans quelques millilitres d'acétate d'éthyle pour récupérer l'amine résiduelle. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , puis évaporées sous pression réduite. Les excès énantiomériques sont évalués par chromatographie chirale. L'organigramme suivant illustre les étapes du traitement.





REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. P. Kraft, G. Frater, *Chirality*, **2001**, 13, 388-394.
2. C. Gros, G. Boni., *L'actualité chimique*, **Mars 1995**, 9-15.
3. T. J. Leitereg, D. G. Guadagni, J. Harris, T. R. Mon, R. Teranishi, *Nature*, **1971**, 230, 455-456.
4. (a) H. B. Kagan, *L'actualité chimique* ; **2003**, 11, 10-14 ; (b) H. Kagan, M. Tabart, *L'Act. Chim.*, **2015**, 393-394, 31-38
5. (a) J. Seyden-Penne, "*Synthèse et Catalyse Asymétriques*". , **1994**, Inter Edition / CNRS ;(b) HU. Blaser, *Fis. Rend. Acc. Lincei*. **2013**; 24: 213-216
6. (a) K-E. Jaeger, M.T. Reetz., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 68-73; (b) C & EN, "Cover Story", **2003**, Vol.81, N°7, .55-73.
7. (a) A. Berthod., « *Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications* », Ed. A. Berthod, *Springer*, **2010**, pp. 1-32;(b) A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News*, **14 June 2004**, 47-62;(c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.
8. (a) I. Agranat, H. Caner, & J. Caldwell, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**,1(10), 753-768;(b) A. J. Hutt , & J. Valentová., *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana*, **2003**,50(7) , 23. (c) A. Somogyi, F. Bochner, D. Foster, *Australian Prescriber*, **2004**, 27(2), 47-49. (d) *Pharma-Flash*, ISSN 0378-7958, **2006**, Volume 33, N°3,7-10. (e) A. G. Nerkar, K. S. Lade, N. A. Gadhav, & S. D. Sawant, *Journal of Pharmacy Research*, **2011**, 4(4), 1300-1303; (f) M. J. Sweet, *Berkeley Technology Law Journal*, **2009**,24(1), 129-147.
9. C. Rabiller, « *Stéréochimie et Chiralité en Chimie Organique* », De Boeck & Larcier, s.a, **1999**.
10. L. Pasteur, *Ann. Chim. et Phys.*, **1848**, 24, 442.
11. Récompenses de la catalyse par l'attribution des prix Nobel : **2001**: Noyori, Knowles et Sharpless pour leurs travaux sur la catalyse énantiosélective. **2005**: parmi les trois chercheurs récomposés, Yves Chauvin, pour la Métathèse des oléfines.
12. (a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York. **1998**; (b) P. T. Anastas, P. T. Li, *Water as a Green Solvent* (John Wiley & Sons Eds). **2010**; (c) P. T. Anastas,; N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; (d) B. M. Trost, *Science* **1991**, 1471-1477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 107, 285-307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 259-281.

13. (a) F. Hasan, A. Ali Shah, A. Hameed, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39, 235-251; (b) C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Research & Development*, **4**, **2000**, 286-290; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied Biochemistry & Biotechnology*, **2004**, 118, 155-170 ; (d) J. Venkata Prasad, M. Prabhakar, K. Manjulatha, D. Rambabu, K. Anand Solomon, G. Gopi Krishna, K. Anil Kumar, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 3109–3111; (e) I. Chiarotto, M. M. M. Feeney, M. Feroci, A. Inesi, *Electrochimica Acta*, **2009**, 54, 1638–1644.
14. (a) V. Gotor, “Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis reactions” in “Enzymes in Action”, pp. 117-132, B. Zwanenburg et al. (eds.), ©2000, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands; (b) V. Gotor, *BioOrg & Med. Chem*, **1999**, 7, 2189-2197; (c) F. van Rantwijk, M. A. Hacking, , & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**,131(6), 549-569.
15. (a) N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 627-630 ; (b) N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron : Asymmetry.*, **2006**, 17, 797-800; (c) R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14; (d) R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252 , 659–701 ; (e) C. Pilissao and M. da Graca Nascimento , *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**,17,428–433 ; (f) A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46,4511–4514. (g) R. Irimescu and K. Kato ; *Tetrahedron Letters* ,**2004**, 45,523–525.
16. R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, 68, 381-388.
17. C. Bruneau, lettre des sciences chimiques du CNRS, *L'actualité chimique*, novembre **1999**, pp 127-129.
18. (a) Global Markets for Catalysts: Focus on Catalyst Regeneration **Jun 2015** By BCC Research ; (b) Market Report GlobalCatalystMarket. ThirdEdition. Updated: **March 2015** Publisher: Acmite Market Intelligence.
19. R. Sheldon, Introduction to green chemistry, organic synthesis and pharmaceuticals. In *Green chemistry in the pharmaceutical industry*, **2010**, 1-20. Edited by Peter J. Dunn, Andrew S. Wells, and Michael T. Williams©2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
20. H. U. Blaser, *Catalysis Today*, **2000**, 60, 161-165.
21. A. Payen, J. F. Persoz, *Ann, Chim, Phys*, **1833**,53, 73–92.
22. (a) W. P. Stemmer, *Nature*, **1994**, 370, 389-391 ; (b) B. Badet, *L'actualite chimique*, **Aout-Septembre 2002**, pp 4.

23. http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/cnrs_10_juillet_paris_laurence_hecquet.pdf
24. G. Rothenberg, *Catalysis : Concepts and Green application*, Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.
25. (a) E. Brown, J.F. Biellmann, © *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, Doc. J 1 240-2*, PP 1-13 ; (b) H. D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle, *Food Chemistry*, **2009** ; (c) C. Vollhardt, "Traité de chimie organique", DeBoeck université, Traduit par P. Depovere, 2^{ème} édition, Bruxelles, **1994** ; (d) L. Graham Patrick, *Chimie pharmaceutique*, 2^{ème} édition, de Boeck supérieur, **2002**.
26. B. Augère, "*Les enzymes biocatalyseurs protéiques*". Ell. Edi. Mark, **2001**.
27. H. Debbeche, *Réactivité de quelques anhydrides cycliques dans la réaction d'acylation enzymatique d'alcools chiraux* (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba), **2011**, pp 27.
28. (a) J. E. Puskas, K. S. Seo, M. Y. Sen, *European Polymer Journal*, **2011**, 47, 524-534; (b) S. Sen, & J. E. Puskas, *Molecules*, 2015, 20(5), 9358-9379.
29. **Réf23** : http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/cnrs_10_juillet_paris_laurence_hecquet.pdf
30. (a) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology*, **2002**, 13(6), 548-556; (b) K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry (5th ed.)*, Springer-Verlag, New York, **2004**; (c) M. Schober, K. Faber, *Trends in biotechnology*, **2013**, 31, 468-478.
31. R. Dicosimo, J. Mcauliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6437-6474.
32. (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7072-7076; (b) A. M. Klibanov, *Chemtech.* , **1986**, 16, 354-359 ; (c) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768.
33. (a) C. C. de Carvalho, *Biotechnology advances*, **2011**, 29(1), 75-83 ; (b) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, & M. W. Fraaije, Recent developments in the application of Baeyer–Villiger monooxygenases as biocatalysts. *ChemBioChem*, **2010**, 11(16), 2208-2231.
34. P. Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6406-6436.
35. A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, **1985**, 82, 3192-3196.
36. J. Tao, & R. J. Kazlauskas, (Eds.), **2011**, *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
37. R. A. Copland, *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Chapter1: A Brief history of enzymology*. **2000**, Wiley-VCH.

38. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Juin 2014 By BCC Research.
39. (a)**Réf30(a)**: A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology*, **2002**, 13(6), 548-556 ; (b) B. J. Demuner, N.P. Junior, A.M.S. Antunes, *J. Technol. Manag Innov.* **2011**, 6, 148-157;(c) J-M. Choi, S-S Han, H-S Kim, *Biotechnology Advances*, **2015**, 33 ,1443–1454; (d) B.M Nestl, B. A Nebel, B. Hauer, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**,15,187–193; (e) N. J.Turner, & M. D. Truppo, Biocatalytic routes to nonracemic chiral amines. *Chiral Amine Synthesis*, **2010**,431-459.
40. (a) H. U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Appl Cata A: General*, **2001**,221, 119-143;(b)**Réf13(b)**: C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Research & Development*, **2000**, 4, 286-290; (c)**Réf40(c)**: A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied Biochemistry & Biotechnology*, **2004**,118,155-170. (d) C. Bensoussan, *l'actualite chimique*, **aout-septembre, 2002**, 48-51.
41. K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. H. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed*, **2001**, 40, 3948.
42. J. P. Rasor, E. Voss, *Applied Catalysis A : General*, **2001**, 221, 145-158.
43. (a) W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J.Destain, H.Ghalfi, C. Blecker, J. P. Wathelet, & P. Thonart, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2008**,12(1),57-68 ; (b)**Réf13(c)**: A. Houde, A. Kademi, & D. Leblanc, *Applied biochemistry and biotechnology*, **2004**,118, 155-170 ; (c) A. R. Macrae, & R. C. Hammond, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **1985** ,3(1), 193-218.
44. (a)**Réf35**: A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, **1985**, 82, 3192-3196. (b) R. Azerad, *l'actualite chimique*, **septembre-aout 2002**, 31-36.
45. A. Hsu, K. Jones, T. A. Foglia, W. N. Marmer, *Biotechnol. Appl. Biochem.* , **2002**, 36, 181-186.
46. M.Bakke, M. Takizawa, T. Sugai, H. Ohta, *J. Org. Chem.* , **1998**, 63, 6929-6938.
47. B. Morgan, A. Zaks, D. R. Dodds, J. Liu, R. Lain, S. Megati, F. G. Njoroge, V. M. Girijavallabhan, *J. Org. Chem.* , **2000**, 65. N°18, 5451-5459.
48. **Réf32((a)**: G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7072-7076; (b) (b):A. M. Klivanov, *Chemtech.* , **1986**, 16, 354-359 ; (c): A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768).
49. (a) R. A. Sheldon , R. M. Lau, M. J.Sorgedraeger, F. van Rantwijk, & K. R. Seddon, *Green Chemistry*, **2002**, 4(2), 147-151; (b) P. Domínguez de María, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008,47(37), 6960-6968.

50. Réf7(c):K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.
51. Réf34 : P. Adlercreutz, *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42(15), 6406-6436.
52. (a) C.S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , **1989**, 28, 695 ; (b)Réf7(c): K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.
53. (a) A. M. Klivanov, *Nature*, **2001**, 409, 241-246 ; (b) R. A. Sheldon, Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic reactions in organic media*, Springer Netherlands **1996**,266-307; (c) N. Doukyu, & H. Ogino, Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, **2010**,48(3), 270-282.
54. (a) A. Ghanem, *Tetrahedron* , **2007**, 63, 1721-1754; (b) R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Current Opinion in Chemical Biology*, **1998**, 2, 121-126; (c) G. Carrea; S. Riva; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; (d) L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* , **1997**, 8, 3719-3733.
55. V. Prélog, *Pure Applied Chem.*, **1964**, 9, 119.
56. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656-2665.
57. (a) G.Carrea, & S. Riva, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, John Wiley & Sons, (Eds.) **2008**; (b) V. Gotor, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **1999** ,7(10), 2189-2197; (c) E.Busto, V.Gotor-Fernández, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2011**,111(7), 3998-4035; (d) E. Forró, & F. Fulop, *Current medicinal chemistry*, **2012**,19(36), 6178-6187; (e) G. Grogan, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B*, **2011**, 107, 199–225 ; (f) C. M. Clouthier, & J. N. Pelletier, *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(4), 1585-1605; (g)Réf28(b) : S. Sen, & J. E. Puskas, *Molecules*, 2015, 20(5), 9358-9379 ; (h) J. H. Schrittwieser, & V. Resch, The role of biocatalysis in the asymmetric synthesis of alkaloids. *RSC advances*, **2013**, 3(39), 17602-17632.
58. (a) J.C. Fiaud, R. Gil, J-Y. Legros, L. Aribi-Zouioueche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, Vol 33, 6967-6970; (b) H. B. Kagan, M. Tahar, J.C. Fiaud, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1994**, 2, 15-21; (c) J-Y. Legros, M. Toffano, S.K. Drayton, M. Rivard, J.C. Fiaud, *Tetrahedron. Lett.*, **1997**. Vol 38, 1915-1918; (d) L. Aribi-Zouioueche & J.C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088; (e) J. A. Pesti, J. Yin, L. Zhang, L. Anzalone, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 11075-11076.

59. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Wong & Whitesides. *Tetrahedron. Org. Chem. Series.*, Vol 12 ; (K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.
60. (a) R.N. Pavel, *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, **2003**, 6, 902-920; (b) K. Faber, S. Riva, *Journal of Synthetic Organic Chemistry*, **1992**, 895-910; (c) B. Zhu & J.S. Panek, *Org. Lett.*, **2000**, 2(17), 2575-2578; (d) T. Maugard, J. Tudella, D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 358-362; (e) T. Maugard, M. D. Legoy, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 8, 275-280, (f) O. Mcconnell, A. bachii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. Mcdonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658–682.
61. X. G. Li, M. Lähtie, M. Päiviö, & L. T. Kanerva, Enantioselective acylation of alcohols with fluorinated β -phenyl- β -lactams in the presence of Burkholderia cepacia lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18(13), 1567-1573.
62. (a) H. Stercher, K. Faber, *Synthesis*, **Janvier 1997**, 1-16; (b) U. T. Strauss, U. F. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 107-117; (c) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 5005-5010; (d) N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 401-406; (e) A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeeza, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 569-592.
63. (a) L. Ou, D. Ludwig, J. Pan, J. H. Xu, *Organic Process Research & Development*, **2008**, 12, 192-195; (b) R. Azerad, *Current Opinion in Biotechnology*, **2000**, 11, 565-571; (c) J. H. Lee, K. Han, M. J. Kim, , & J. Park, *European Journal of Organic Chemistry*, **2010**, 6, 999-1015.
64. O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1967**, 40, 2380.
65. (a) E. Vanttinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1779-1786; (b) H. L. Liu, T. Anthonsen, *Chirality*, **2002**, 14, 25-27.
66. N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, & L. Aribi-Zouiouche, *Catalysts*, **2014**, 4(3), 215-225.
67. Réf15(b) : N. Bouzemi, L. Aribi-Zouiouche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17(5), 797-800.
68. Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, & L. Aribi-Zouiouche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24(5), 290-296.

69. (a) R. S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1475-1490; (b) O. Pamies, J. E. Backvall, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 3247-3261; (c) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 8291-8327; (d) B. M. Matute, J. E. Backvall, *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**, 11, 226-232; (e) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 1563-1601. (f) Verho, Oscar, and Jan-E. Bäckvall. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137.12 3996-4009; (g) de Miranda, S. Amanda, Leandro SM Miranda, and Rodrigo OMA de Souza. *Biotechnology advances* ,**2015**, 33.5 372-393.
70. (a) M. T. El Gihani, J. M. Williams, *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**, 3, 11-15; (b) M. J. Kim, Y. Ahn, J. Park, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 578-587; (c) O. Pamies, J. E. Backvall, *Trends in biotechnology*, **2004**, 22, 130-135; (d) B. M. Matute, J. E. Backvall, *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**, 11, 226-332
71. M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouioueche, , & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011,22(18), 1790-1796.
72. (a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2005**,105(1), 313-354; (b) P. Davoli, E.Caselli, M. Bucciarelli, A. Forni, G. Torre, , & F. Prati, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2002**, 1 (17), 1948-1953.
73. C.Manzuna Sapu, J. E. Bäckvall, & J. Deska, *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**,50(41), 9731-9734.
74. A. C. L. D. M. Carvalho, T. D. S. Fonseca, M. C. D. Mattos, , M. D. C. F. D. Oliveira, T. L. G. D. Lemos, F. Molinari, , ... & I. Serra, *International journal of molecular sciences*, **2015**,16(12), 29682-29716.
75. J. J. Cui, M. Tran-Dubé, , H. Shen, M. Nambu, , P. P. Kung, , M. Pairish, , ... & M. McTigue, *Journal of medicinal chemistry*, **2011**,54(18), 6342-6363.
76. P. P. Kung, C. Martinez, & J. Tao, **2008**, *U.S. Patent No. 7,465,842*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
77. Marszałł, M. P., & Siódmiak, T. *Catalysis Communications*, **2012**, 24, 80-84.
78. J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández & V. Gotor, Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes. *The Journal of organic chemistry*, **2009**,74(15), 5304-5310.
79. (a) T. de Sousa Fonseca, M. R.da Silva, M. D. C. F. de Oliveira, T. L. G.de Lemos, R. de Araújo Marques, & M. C. de Mattos, *Applied Catalysis A: General*, **2015**,492, 76-82.

80. **Réf9** : C. Rabiller, « *stéréochimie et chiralité en chimie organique* », De Boeck & Larcier, s.a., **1999**.
81. **Réf10** : L. Pasteur, *Ann. Chim. et Phys.*, **1848**, 24, 442.
82. (a) C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* , **1982**, 104, 7294-7299. (b) 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.
83. **(a)Réf52(a)**:C.S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , **1989**, 28, 695 ; **(b)Réf54(a)**: A. Ghanem, *Tetrahedron* , **2007**, 63, 1721-1754; **(c)** R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Current Opinion in Chemical Biology*, **1998**, 2, 121-126; **(d)Réf54(c)**: G. Carrea; S. Riva; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; **(e)Réf54(d)** L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* , **1997**, 8, 3719-3733.
84. Zhou, X., Zheng, D., Cui, B., Han, W., & Chen, Y. *Tetrahedron*, **2015**,71(29), 4738-4744.
85. C. Pilissao ,*Process Biochemistry* ,**2009**, 44, 1352–1357.
86. A. Radu, M. E. Moisă, M. I.Toşa, N. Dima, V. Zaharia, & F. D. Irimie, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2014**,107, 114-119.
87. (a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656-2665. (b) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality*, **2008**, 20, 724-735; (c) Tsai, S. W. (2016). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 127, 98-116.
88. F. Felluga, G.Pitacco, E. Valentin, & C. D. Venneri, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**,19(8), 945-955.
89. **(a)** E.Busto, V. Gotor-Fernández, & V. Gotor, *Chemical reviews*, **2011**,111(7), 3998-4035; **(b)Réf28(b)** S. Sen, & J. E. Puskas, *Molecules*, **2015**,20(5), 9358-9379; **(c)** R. Kourist, P. D. de María, & K. Miyamoto, *Green Chemistry*, **2011**,13(10), 2607-2618; **(d)** F. van Rantwijk, M. A. Hacking, & R. A. Sheldon,. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**,131(6), 549-569 ; **(e)Réf57(d)**: E. Forró, & F. Fulop, *Current medicinal chemistry*,**2012**,19(36),6178-6187; **(f)** B. Skrobo, J. D. Rolfes, &J. Deska, *Tetrahedron*, **2016**, 72(10),1257-1275.
90. O. V. Kucher, A. O. Kolodyazhnaya, O. B.Smolii, A. I. Boiko, V. S. Kubyshkin, P. K. Mykhailiuk, & A. A. Tolmachev, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2014** , 25(6), 563-567.
91. K. Burgess, L. D. Jennings, *J. Am.Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7434-7436.
92. P. Chen, & X. Zhu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**,97, 184-188.

93. Li, W., Lin, Z., Chen, L., Tian, X., Wang, Y., Huang, S. H., & Hong, R. (2016). *Tetrahedron Letters*, 57(5), 603-606.
94. Réf15(e) : C. Pilissao and M. da Graca Nascimento ; *Tetrahedron: Asymmetry* , (2006), 17 ,428–433.
95. (a)Réf15(f) : A. K. Prasad; M. Husain; B. K. Singh; R. K. Gupta; V. K. Manchanda; C. E. Olsen; V. S. Parmar; *Tetrahedron Letters*, 2005 , 46 ,4511–4514; (b)Réf15(g): R. Irimescu and K. Kato ; *Tetrahedron Letters* , 2004 , 45 523–525.
96. (a) R. N. Patel, *Enzyme and Microbial Technology*,2002, 31, 804–826; (b) A. Baldessari, C. P. Mangone; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* ,2001,11,335–341; (c)E. Brenner , R. Schneider , Y. Fort , *Tetrahedron*, 2002, 58 , 6913–6924 ; (d) J. A. Bender , N. A. Meanwell, T. Wang, *Tetrahedron*, 58 , 2002, 3111–3128 ; (e) T. Toyo’oka; *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, 54,25–56.
97. R. Irimescu, K. Kato; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* ,(2004), 30 ,189–194.
98. González-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2002). *Tetrahedron: Asymmetry*, 13(12), 1315-1320.
99. R. A. Sheldon, *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press. 1993.
- 100.E. Henke, Schuster,H. Yang, U. T. Bornscheuer, *Monstshefte für chimie*, 2000,131,633-638.
- 101.S. Gandomkar, Z. Habibi, M. Mohammadi, M. Yousefi, & S. Salimi, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(4), 550-554.
- 102.H. Hanefeld, *Org. Biomol. Chem*, 2003, 1, 2405-2415.
- 103.S. Takayama, S. T. Lee, S-C. Hung, C-H. Wong, *Chem. Commun.*, 1999, 127-128.
- 104.M. Tosa, S. Pilbak, P Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szatzkcs, L. Novak, F-D. Irimie, L. Poppe, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2008,19,18844-1852
- 105.(a)Réf53(a): A. M. Klibanov, *Nature*, January 2001, 409, 241-246; (b) R. N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis*, 2000, Dekker, New York; (c) P. Berglund, *Biomol. Engineering*, 2001, 18, 13-22; (d) V. Gotor-Fernandez; R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Cata B. Enz*, 2006, 40, 111-120.
- 106.M. G. Kim & S. B. Lee, *journal of Fermentation and Bioengineering*; 1996, 81,269-271.
- 107.P.Borowiecki, M.Fabisiak, & Z. Ochal, *Tetrahedron*, 2013,69(23), 4597-4602.

- 108.(a)** H. Noritomi, O. Almarsson, G. L. Barietta, A. M. Klibanov, *Biotech & Bioengineering*, **1996**, 51, 95-99 ; **(b)** E. Holmberg, K. Hult, *Biotechnology Lett.*, **1991**, 13, 323-326.
- 109.**T. Ema, M. Kageyama, T. Korenaya, T. Sakai, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 3934-3947.
- 110.Réf. 58(a)** J.C. Fiaud, R. Gil, J-Y. Legros, L. Aribi-Zouieueche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, Vol 33, 6967-6970.
- 111.**M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**,19(20), 2378-2384.
- 112.**M. Merabet-Khellassi, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**,20(12), 1371-1377.
- 113.**M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23(11), 828-833.
- 114.(a)Réf15(a):** N. Bouzemi, H. Debbeche, L.Aribi-Zouieueche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron letters*, **2004**, 45(3), 627-630 ; **(b)Réf58(d):** L. Aribi-Zouieueche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2000**,41(21), 4085-4088 ; **(c)** H.Debbeche, M. Toffano, J. C. Fiaud, & L. Aribi-Zouieueche, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010** ,66(3), 319-324. ; **(d)** C. Bidjou, & L. Aribi-Zouieueche, *J. Soc. Alger. Chim*, **1999** ,9,261-268 ; **(e)** C. Bidjou, L. Aribi-Zouieueche, & J. C. Fiaud, *Tetrahedron letters*, **2002**,43(16), 3025-3027; **(f)** N. Melais, M. Boukachabia, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Bioprocess and biosystems engineering*, **2015**, 38(8), 1579-1588; **(g)** M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, L. Zouieueche-Aribi, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, 17(2), 185-194.
- 115.Réf71 :** M. Merabet-Khelassi, N.Vriamont, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**,22(18), 1790-1796.
- 116.(a)Réf15(b) :** N. Bouzemi, L. Aribi-Zouieueche, & J. C. Fiaud , *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17(5), 797-800; **(b)Réf66 :** N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene & L. Aribi-Zouieueche, *Catalysts*, **2014**,4(3), 215-225 ; **(c)Réf68 :** Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant & L.Aribi-Zouieueche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**,24(5), 290-296.
- 117.**M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C. Fiaud, O. Riant, & L. Aribi-Zouieueche, *Comptes Rendus Chimie*, **2011**,14(11), 978-986.
- 118.Réf113 :** M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouieueche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**,23(11), 828-833.

- 119.(a)Réf58(a):** J.C. Fiaud, R. Gil, J-Y. Legros, L. Aribi-Zouioueche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, Vol 33, 6967-6970; **(b)Réf114(d) :** C. Bidjou, L. Aribi-Zouioueche, J. Y. Legros, J.C. Fiaud, *J. Soc. Alger. Chim.* , **1999**, 9(2), 261-268; **(c)Réf58(c) :** L. Aribi-Zouioueche & J.C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088; **(d)Réf114(e) :** C. Bidjou, L. Aribi-Zouioueche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43 , 3025–3027.
- 120.Réf12:** ((a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York. **1998**; (b) P. T. Anastas , P. T. Li, P. T. *Water as a Green Solvent* (John Wiley & Sons Eds). **2010**; (c) P. T. Anastas , N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; (d) B. M. Trost, *Science* **1991**, 1471-1477, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 107, 285-307).
- 121.(a)Réf54(c) :** G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; **(b)Réf43(a)** W. A. M. Alloue, J. Destain, H. Ghalfi, P. Thonart, M. Aguedo, J-P. Wathélet, C. Blecker, *Base*, **2008**, 12(1), 57-68; **(c)Réf7(c):** K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2011**.
- 122. (a)Réf60(a) :** R.N. Pavel, *Curr. Opin.Drug.Disc.Dev.* **2003**, 6, 902-920 ; **(b)Réf60(f) :** O. Mcconnell, A. bach ii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. Mcdonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658–682).
- 123. (a)Réf62(a) :** H. Stercher, K. Faber, *Synthesis*, **Janvier 1997**, 1-16; **(b)Réf62(d) :** N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 401-406; **(c)Réf62(e) :** A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeeza, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 569-592; **(d)Réf71:** M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22 , 1790–1796.
- 124. (a) Réf114(g):** M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, L. Zouioueche-Aribi, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, 17(2), 185-194 ; **(b) Réf111:** M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry*,**2008**, 19, 2378-2384; **(c)** M. Merabet-khelassi, thèse de doctorat, Soutenu le 10 Mai **2009**. Université Badji Mokhtar -Annaba-. « *Étude de l'effet de quelques additifs sur l'énantiosélectivité dans la réaction de dédoublement cinétique enzymatique : accès à quelques alcools ferrocéniques chiraux* » ; **(d)Réf117 :** M. Merabet-Khelassi, N.Bouzemi, J.C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978–986.

- 125.(a)Réf15(c)** : R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14; **(b)Réf15(d)**: R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252 , 659–701; **(c)** E. J. Corey, C-J. Helal, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1986-2012 ; **(d)** Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Kessler M, Sturmer R, Zelinski T. *Angew Chemie Int Ed* **2004**;43:788–824.
- 126.(a)Réf54(a)**:A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721-1754. **(b)** J. Pan, H. L. Yu, J. H. Xu, & G. Q. Lin, *Advances in biocatalysis: Enzymatic reactions and their applications*. In *Asymmetric catalysis from a Chinese perspective*, Springer Berlin Heidelberg,v**2011**, 67-103; **(c)** A. S. M. Shafioul, C. S. Cheong; *journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , **2012**, 74, 199-203.
- 127.(a)Réf58(d)** : L. Aribi-Zouioueche & J.C. Fiaud. *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088; **(b)Réf114(e)**: C. Bidjou, L. Aribi-Zouioueche, J-C. Fiaud, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 3025–3027; **(c)** P. P. Bora, G. Bez, J. M. H. Anal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, 72, 270-275; **(d)** G. Reddipalli, M. Venkataiah, N. W. Fadnavis. *Tetrahedron: Asymmetry*,**2010**, 21, 320-324; **(e)** S-K. Kang, J-H. Jeon, T. Yamaguchi, J-S. Kim, B-S. Ko. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1995**, 6, 2139-2142. **(f)** T. Kumaragura, N. W. Fadnavis, *Tetrahedron:Asymmetry* **2012**,23, 775-779.
- 128.(a)Réf15(a)**: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron lett*, **2004**, 45, 627-630; **(b)Réf117**: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J_C.Fiaud; O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie* ,**2011**,14,978–986;**(c)Réf111**: M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry.*,**2008**, 19, 2378-2384; **(d)Réf112**: M. Merabet-Khellasi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry* , **2009**, 20, 1371-2377.
- 129.Réf117**: M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J.C. Fiaud, O. Riant.; L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie* , **2011**, 14,978–986.
- 130.** J.L.L. Rakels, A.J.J. Straathof, J.J. Heijneii; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994** , Vol 5, N 1, 93-100.
- 131.(a)Réf113**: M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23,823-833 , **(b)Réf68**: Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 290-296.
- 132. (a)** A .Baldessari, L.E. Iglesias, *Methods in molecular biology*, **2012**, 861, 457-69; **(b)** J. Zhang, J. Wu, L. Yang, *J. Mol. Cata B: Enz*, **2004**, 31, 67-72; **(c)Réf104**: M. Tosa, S. Pilbak, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szakacs, L. Novak, F-D. Irimie, L.

- Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1844-1852; (d) M. Kawasaki, K. Nakamura, S. Kawabata, *J. Mol. Catal B: Enz*, **1999**,6, 447-451; (e) R. Zhou, J-H. Xu, *Biochemical Engineering Journal*, 23, **2005**, 11–15; (f) K. Kato, Y. Gong, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, *Biotechnology Letters*, **2002**, 24, 1623–1630; (g) Frank Schieweck and Hans-Josef Altenbach, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 403–406; (h) L. C. Bencze, C. Paizs, M. I. Tos, M. Trif, F. Dan Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 1999–2004; (i) J. Brem, S. Pilbak, C. Paizs, G. Banoczi, F. Dan Irimie, M-I. Tos, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 916–923; (j) F. Faigl, E. Kovacs, D. Balogh, T. Holczbauer, M. Czugler, B. Simandi, *Central European Journal of Chemistry*, **2014**, 12(1), 25-32.
- 133.Réf132(b)** : J. Zhang, J. Wu, L. Yang, *J. Mol. Catal B: Enz*, **2004**, 31, 67-72.
- 134.Réf104**: M. Tosa, S. Pilbak, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szakacs, L. Novak, F-D. Irimie, L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1844-1852.
- 135.Réf132(d)** : M. Kawasaki, K. Nakamura, S. Kawabata, *J. Mol. Catal B: Enz*, **1999**,6,447-451.
- 136.**T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe, *tetrahedron letters*, **1994**, 35, 7997-8000
- 137.**S-C. Stinson, *Chemical and engineering News*, **1992**, 46.
- 138.(a)** X. Lin, X. Dai, Z. Mao, Y. Wang, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 65, 1763-1766;
(b) M. Assie, J-Y. Legros, J-C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 1183-1187;
(c) J-Y. Legros, M. Toffano, J-C. Fiaud, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 3235-3246.
- 139.**<http://www.rcsb.org/pdb/>
- 140.**N. Zhang, W.-C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks ; *Protein Engineering*, **2003**,16, 599-605.
- 141.**E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal Biotransformation* , **1998**,16(3) , 181–204.
- 142.**M. Päiviö, P. Perkiö, L.T. Kenerva, *Tetrahedron Asymmetry*, **2012**, 23, 230-236.
- 143.**A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnology Advances*, **2012**, 30, 550-563.
- 144.**G.J. Lye, O.P. Pavlou, M. Rosjidi, D.C. Stuckey, *Biotechnology and Bioengineering* , **1996**,51(1),69-78.
- 145.(a)** M.C.R. Franssen, E.L.V. Goetheer, H. Jongejan, A. de Groot, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 8345-8348 ; **(b)** H. Kitaguchi, P.A. Fitzpatrick, J.E Huber, A.M Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**,111, 3094-3095; **(c)** M. Woudenberg-van Oosterom, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**,49: 328-333.
- 146.**Y. Fan, Z. Xie, H. Zhang, J. Qian, *Kinetic and Catalysis* **2011**, 52(5), 686-690.

- 147.(a) Réf15(c):**R. A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **1996**, 67, 1-14; **(b)Réf15(d):** R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**, 252 , 659–701.
- 148.**Q-M. Gu, C-S. Chen, C. J. Sih, *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, 1763-1766.
- 149.A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, & L. Aribi-Zouioueche** , *Catalysis Letters*, **2015**, 145(4), 1054-1061.
- 150.(a)Réf117:** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J._C.Fiaud, O .Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie*, **2011**,14 978–986; **(b)Réf111:** M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron Asymmetry*,**2008**, 19, 2378-2384; **(c)Réf112:** M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry* , **2009**, 20, 1371-2377; **(d)Réf114(g):** M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, , & L. Zouioueche-Aribi, *journal-societe algerienne de chimie*, **2007**,17(2), 185.
- 151.(a)Réf113:** M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche; O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**,23(11),823-833 ; **(b)Réf68:** Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 290-296.
- 152.**V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, « use of lipases in organic synthesis » chapter 18, in « Industrial enzymes », J. Polaina & A. P. MacCabe (eds.), pp 301-3015, ©**2007** Springer.
- 153.Réf149 :** A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche. *Catalysis Letters*, **2015**, 145(4), 1054-1061.
- 154. Réf14((a):** V. Gotor, “Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis reactions” in “Enzymes in Action”, pp. 117-132, B. Zwanenburg et al. (eds.), ©**2000**, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands; **(b)**V. Gotor, *BioOrg & Med. Chem*, **1999**, 7, 2189-2197; **(c)** F. van Rantwijk, , M. A. Hacking, , & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**,131(6), 549-569).
- 155.**Per Manson, *Tetrahedron Lett*, **1982**, 23, 1845-1846
- 156.(a)** B. Wang, L. Jiang, J. Wang, J. Ma, M. Liu, H. Yu; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 980-985; **(b)** A. Prechter, H. Groger, M. R. Heinrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 3384-3387; **(c)** E. Garcia-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343, 646-654; **(d)** E. Garcia-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**,11, 1459-1463.
- 157.**A.Prechter, H.Gröger, & M. R.. Heinrich, *Organic & biomolecular chemistry*, **2012**,10(17),3384-3387.

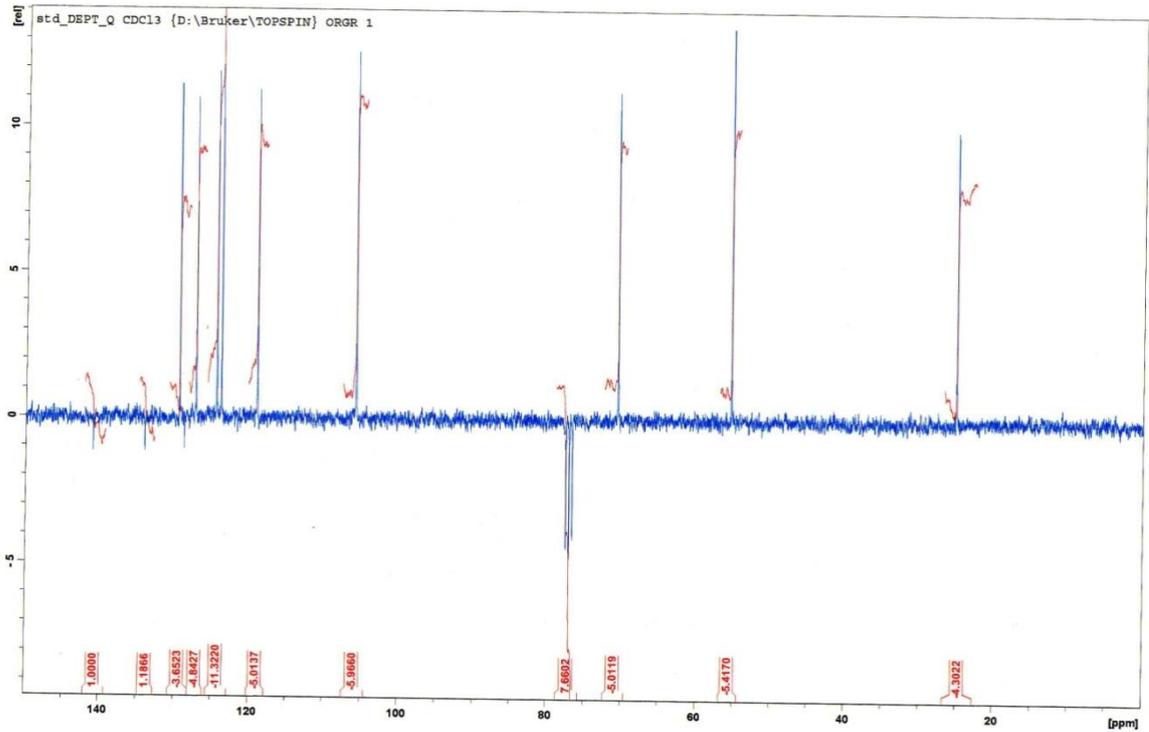
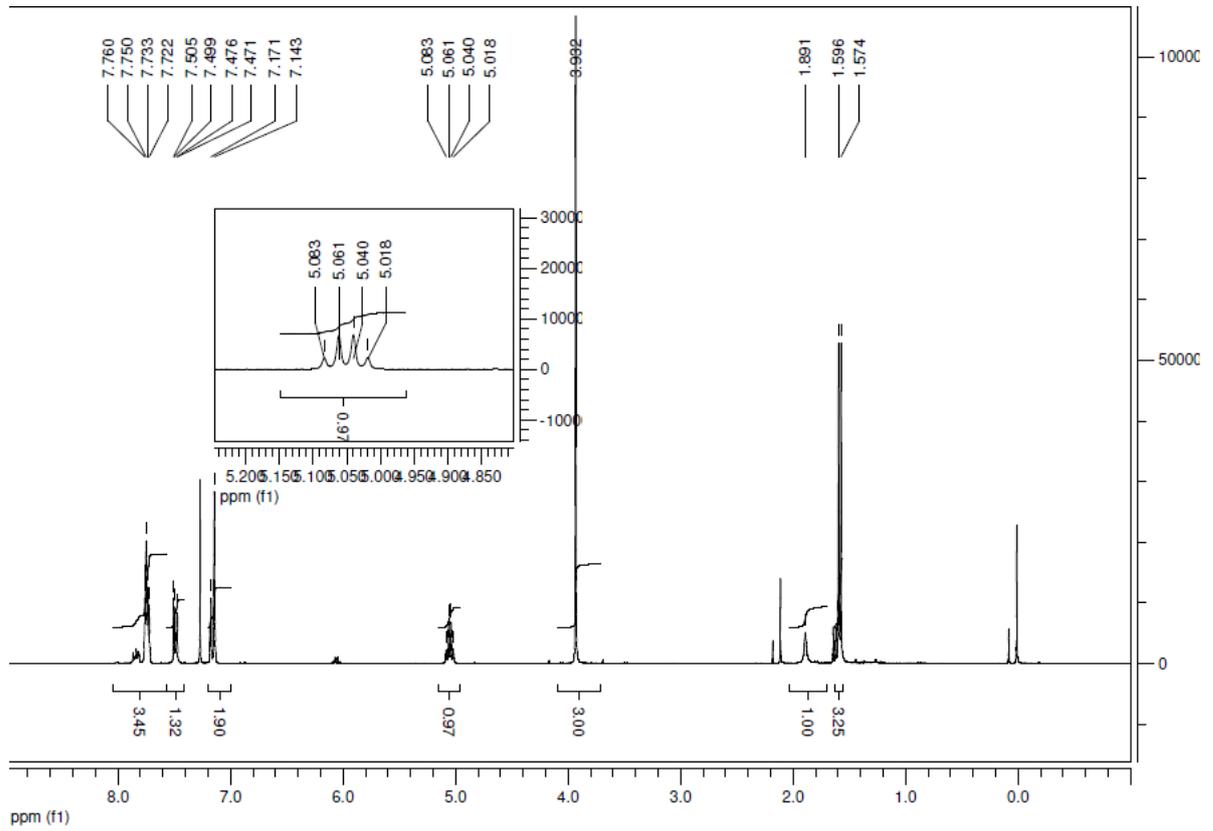
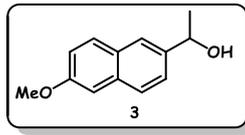
- 158.Réf149:** A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche. *Catalysis Letters*, **2015**,145(4), 1054-1061.
- 159.(a)Réf53(a):** A. M. Klibanov, *Nature*, **January 2001**, 409, 241-246; **(b)Réf105(b):** R. N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis*, **2000**, Dekker, New York ; **(c)Réf105(c):** P. Berglund, *Biomol. Engineering*, **2001**, 18, 13-22; **(d)Réf105(d):** V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Cata B. Enz*, **2006**,40,111-120. **(d)** L. T. Kanerva, & A. Liljeblad, **(2010)**. Transesterification-Biological in Encyclopedia of Catalysis. 2nd edition. John Wiley & Sons.
- 160.Réf117:** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C.Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche , *C. R. Chimie* ,**2011**, 14,978–986.
- 161.Réf117:** M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C.Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, *C. R. Chimie* ,**2011**,14 ,978–986.
- 162.(a)** C. Paizs, M. Tosa, C. Majdik, P. Tahtinen, F.D. Irimie, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**,14,619 ; **(b)** D. Rotticci, T. Norin, K. Hult, *Org. Lett.* ,**2000**, 2 (10),1373; **(c)** H.K. Weber, H. Weber, R.J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* , **1999** ,10, 2635–2638.
- 163.Réf113 :**M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012** , 23(11), 823-833.
- 164.Réf96:** ((a)R. N. Patel; *Enzyme and Microbial Technology*,**2002**, 31, 804–826; **(b)** A. Baldessari, C. P. Mangone, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , **2001**, 11, 335–341; **(c)** E. Brenner , R. Schneider, Y. Fort ,*Tetrahedron*, **2002**,58 ,6913–6924 ;**(d)** J. A. Bender ,N. A. Meanwell, T. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, 58 ,3111–3128; **(e)** T. Toyo’oka, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2002**, 54,25–56).
- 165.(a)Réf15(e):** C. Pilissao and M. da Graca Nascimento , *Tetrahedron: Asymmetry* , **2006**, 17 ,428–433; **(b)Réf15(f) :** A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**,46,4511–4514; **(c)Réf15(g):** R. Irimescu and K. Kato , *Tetrahedron Letters*,**2004**,45,523–525 ; **(d)** K. Faber, S.Riva. *Journal of Synthetic Organic Chemistry. Synthesis*. **October 1992**, 895-910.
- 166. (a)** B.Zhu & J.S. Panek, *Org. Lett.*, **2000**, 2(17), 2575-2578 ; **(b)Réf60(e) :**T. Maugard, J. Tudella, D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 358-362. **(c)** T. Maugard, M. D. Legoy, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 8., **2000**, 275-280, **(d)Réf60(f) :** O. Mcconnell, A. bachii, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C.

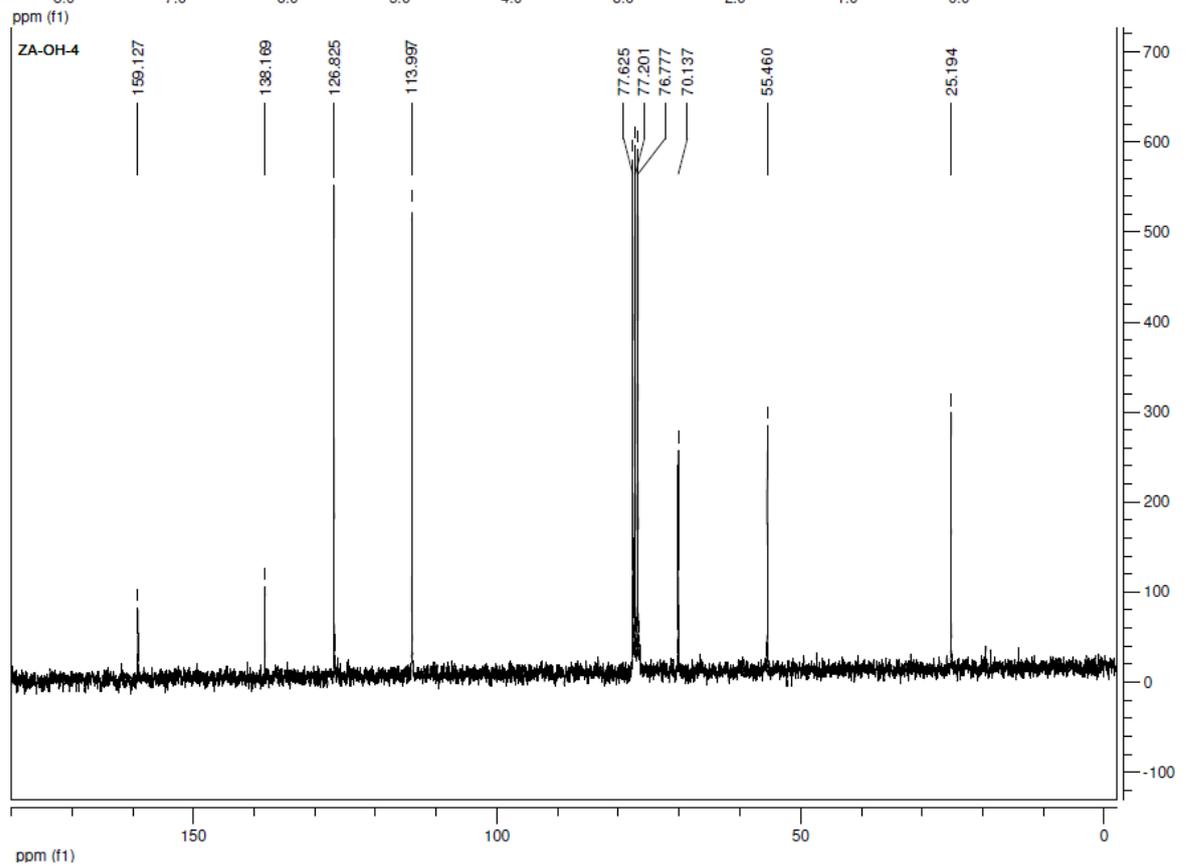
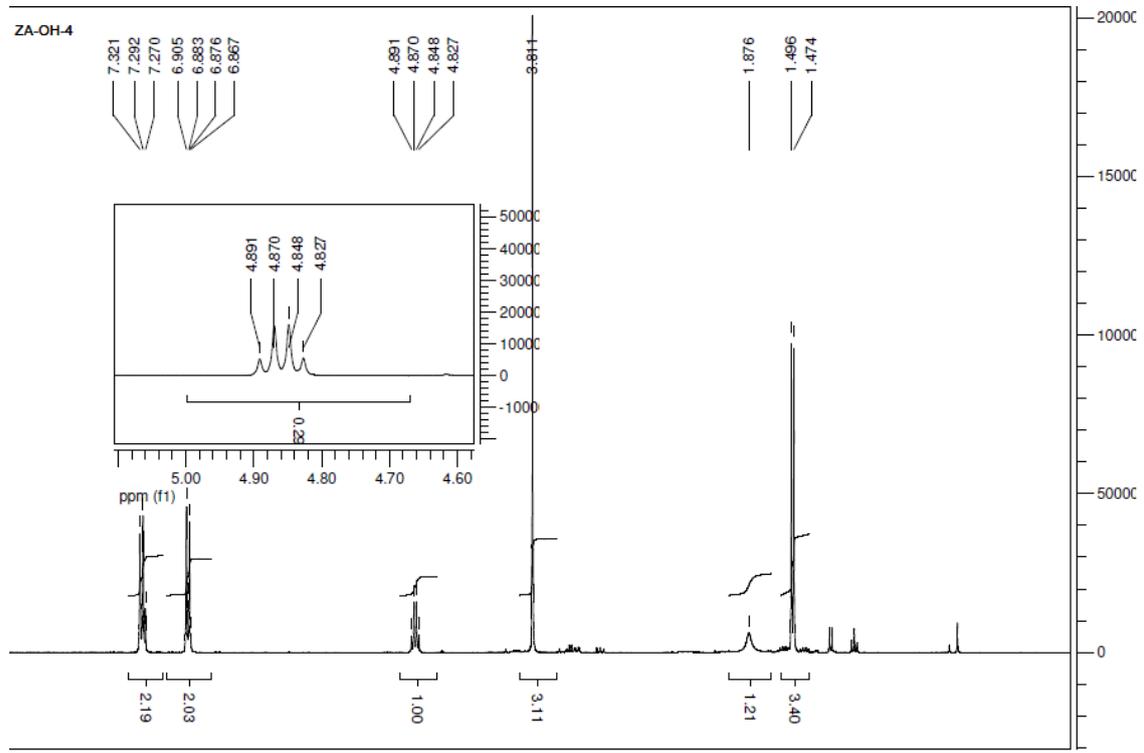
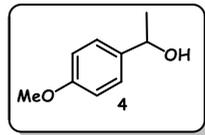
- Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. McDonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R. T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. D. young, M. Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality*, **2007**, 19, 658–682.
- 167.(a)** J. M. Mayer, *Acta pharmaceutica Nordica*, **1990**, 2, 197-216; **(b)** J. M. Mayer ; M. Moy-DeVos ; C. Audergon ; B. Testa ; J. C. Etter; *International Journal of Tissue Reactions* ; **1994**, 16; 59-72.
- 168.(a)Réf14(c)**: F. van Rantwijk, M. A. Hacking, & R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131(6), 549-569 ; **(b)** G. De Crescenzo, A. Ducret, M. Trani, & R. Lortie, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 9(1), 49-56; **(c)Réf89(c)** : R. Kourist, P. D. de María, & K. Miyamoto, *Green Chemistry*, **2011**, 13(10), 2607-2618.
- 169. Réf106**: M. G. Kim & S. B. Lee, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 81, 269-271.
- 170. Réf100**: E. Henke, Schuster, H. Yang, U. T. Bornscheuer, *Monatshefte für Chemie*, **2000**, 131, 633-638.
- 171. Réf85** : C. Pilissao ; *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 1352–1357.
- 172.(a)**. A. M. Klivanov; *chem. Tech.*, **1986**, 16, 354-359; **(b)** A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767-2768.
- 173.** V. Gotor-Fernandez, P. Fernandez-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 2558-2564
- 174. Réf97** : R. Irimescu, K. Kato; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 30, 189–194.
- 175.** Nechab ; *J. Org. Chem*, **2007**, 72, 6918-6923.
- 176. Réf142** : M. Pääviö, P. Perkiö, L. T. Kanerva, *Tetrahedron Asymmetry*, **2012**, 23, 230-236.
- 177.(a)** E. Juaristi, J. L. León-Romo, A. Reyes, J. Escalante, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 2441–2495 ; **(b)** A. Torres-Gavillan ; J. Escalante ; I. Regla ; A. Munguia-Lopez ; E. Castillo ; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2007**, 18, 2621-2624.
- 178.** M. Leroux, T. Le Gall, C. Mioskowski, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 1817–1823.
- 179.(a) Réf15(f)** : A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh; R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 4511–4514; **(b) Réf15(g)**: R. Irimescu and K. Kato; *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 523–525.

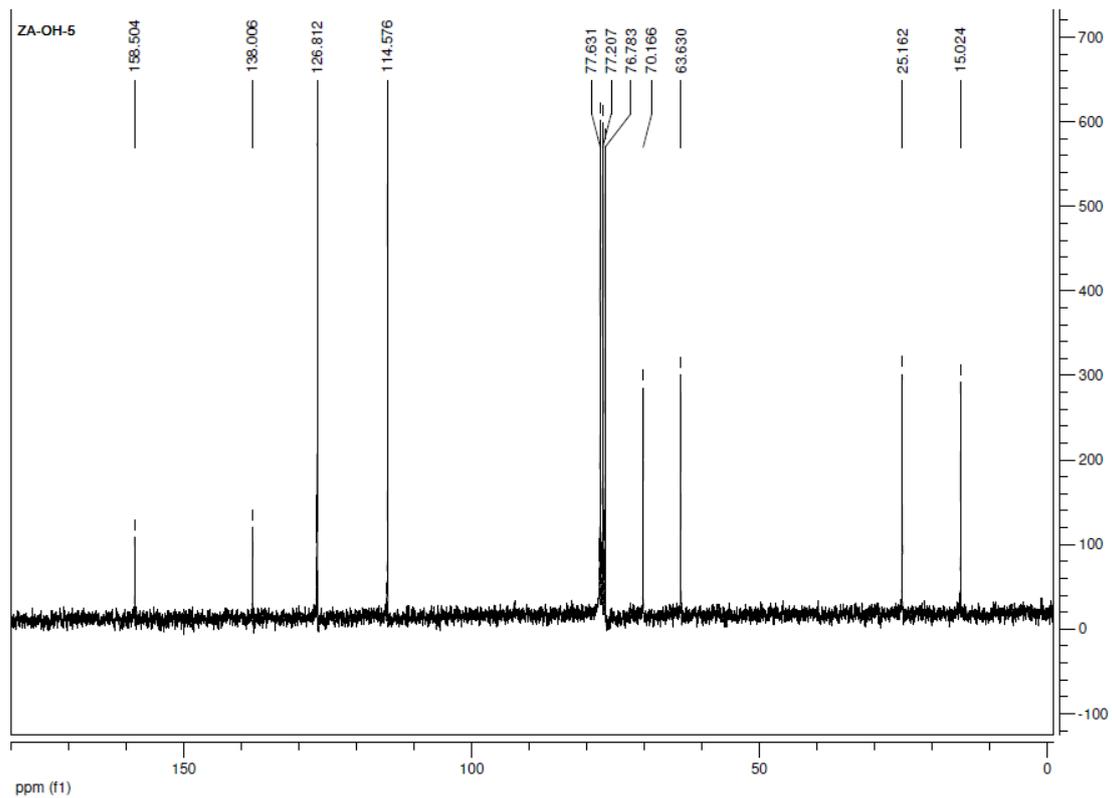
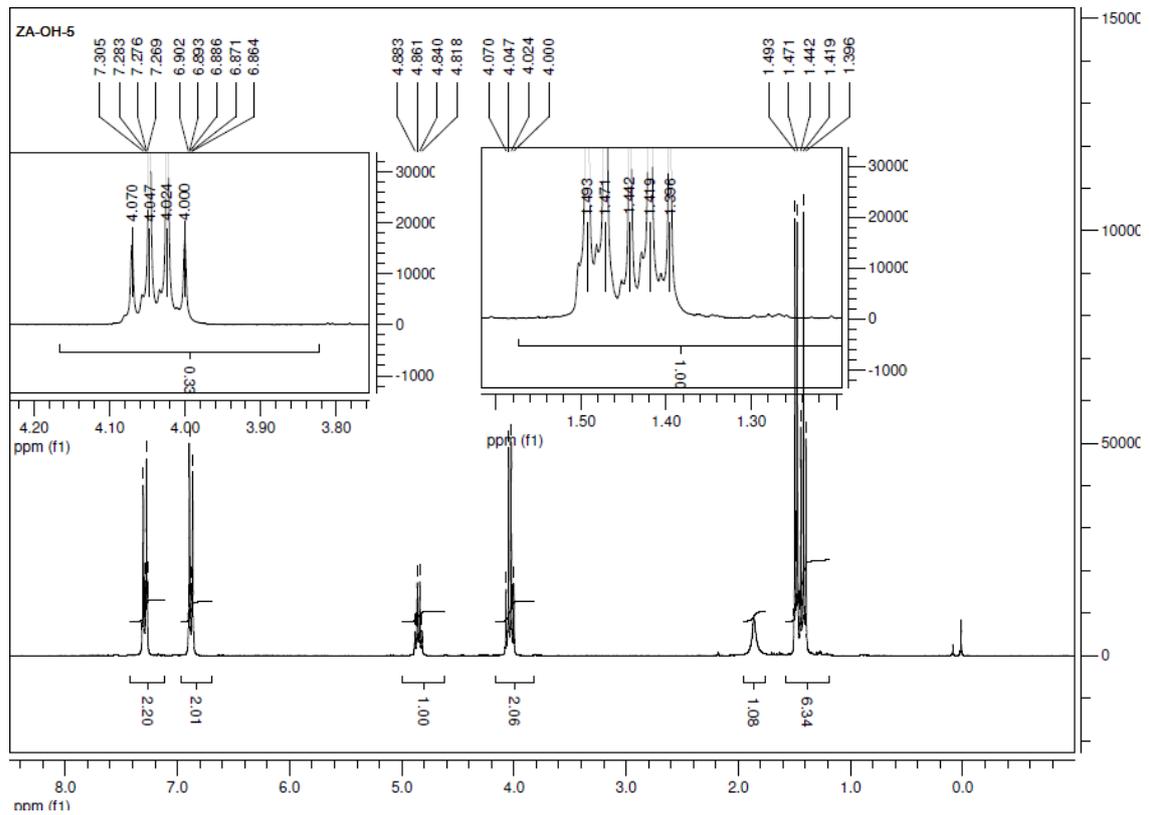
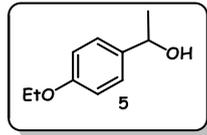
- 180.**(a) V. Gotor-Fernandez, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal*, **2006**, 348, 797-812; (b) V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Curr. Org. Chem*, **2006**, 10, 1125-1143; (c) F.van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 501-519.
- 181.**(a) Y. Kawaguchi, H. Honda, J. T. Morimura, S. Iwasaki, *Letters of Nature*, **1989**, 341, 164-166; (b) A. Gentili, M. Repetto, G. D'Ascenzo, R. Curini, S. Materazzi, *Thermochimica Acta*, **1998**, 320, 69-74; (c) J. Vakhlu, A. Kour, *Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458*, **2006**, 9(1), 69-85; (d) B. S. Kim, C. T. Hou, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **2006**, 29, 59-64.
- 182.** P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthilier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *Journal of biological chemistry*, **1993**, 268(17), 12843-12847.
- 183.** Réf140: N. Zhang, W.-C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks ; *Protein Engineering*, **2003**, 16, 599-605.
- 184.** A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Synthetic Communications*, **2014**, 44(16), 2364-2376.

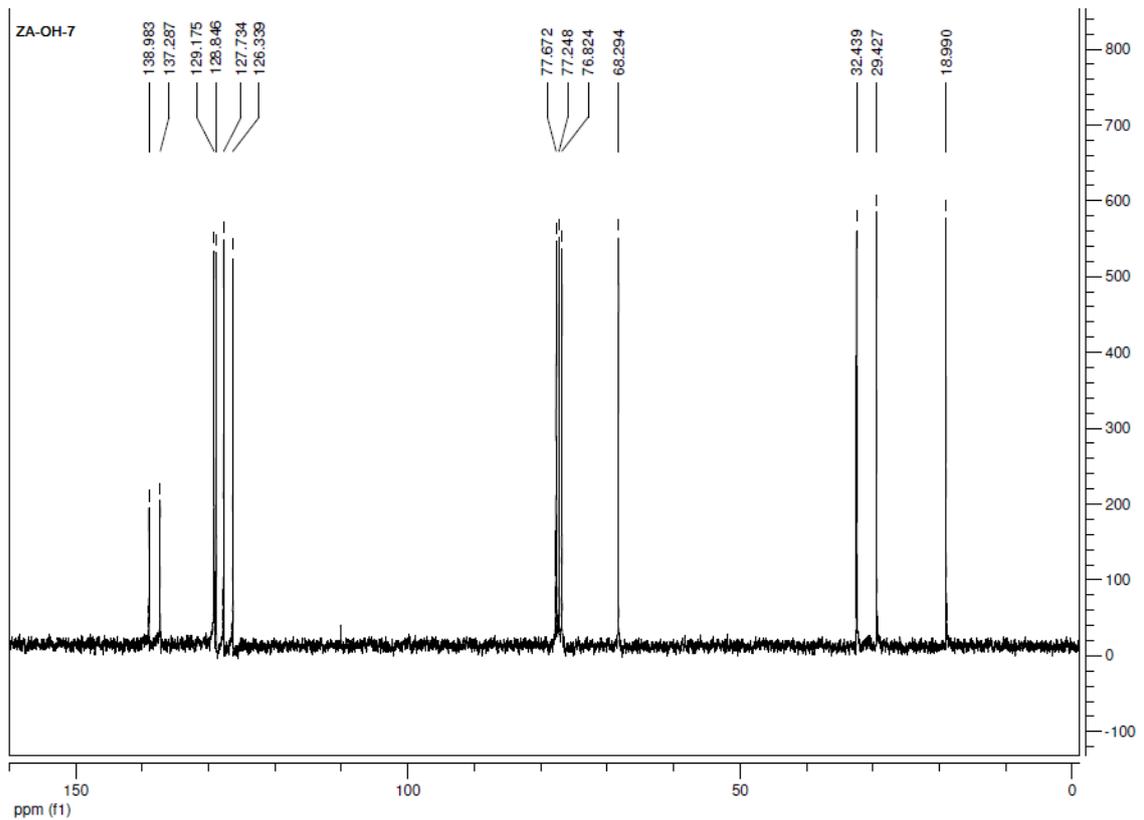
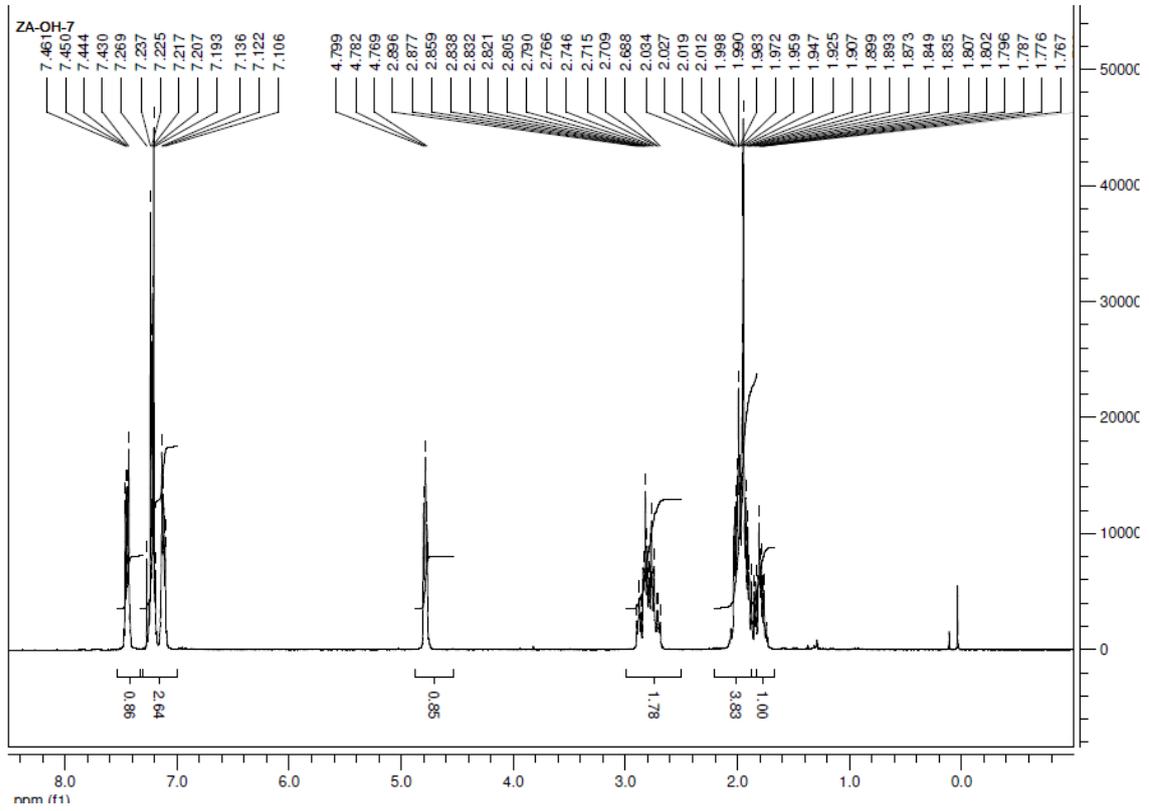
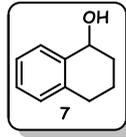


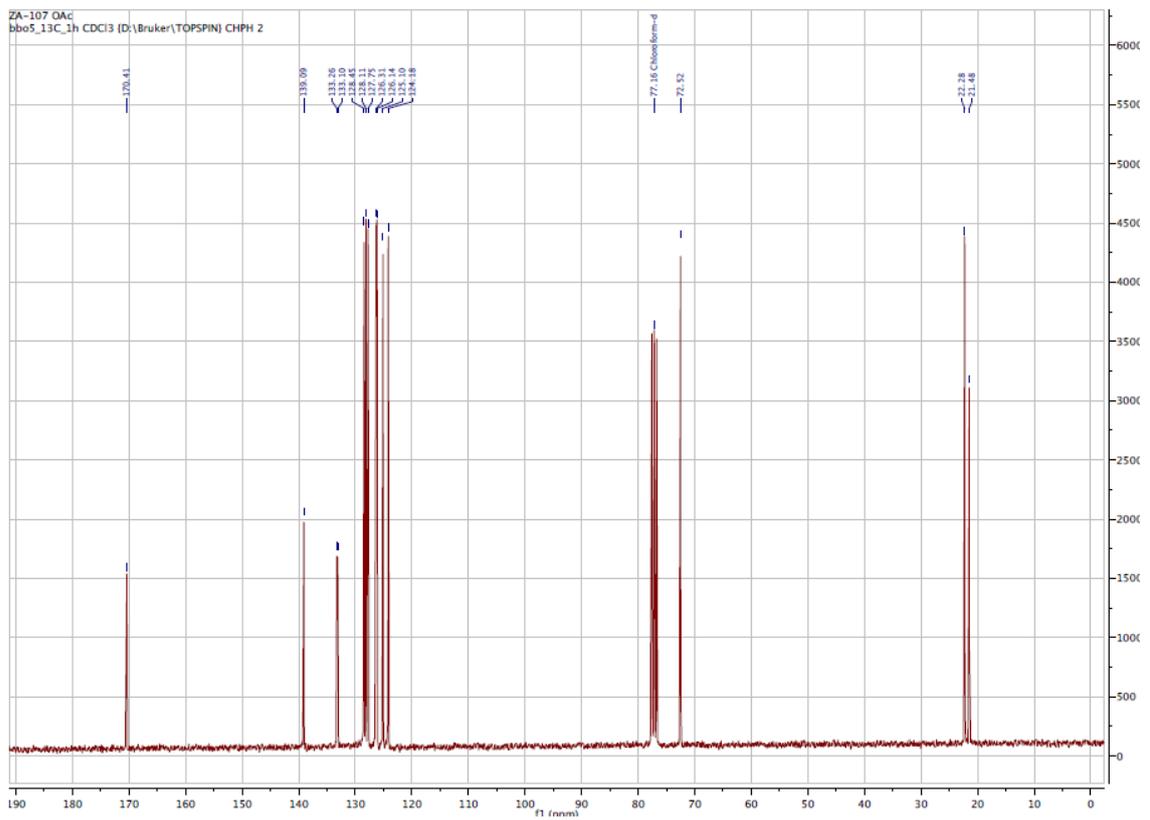
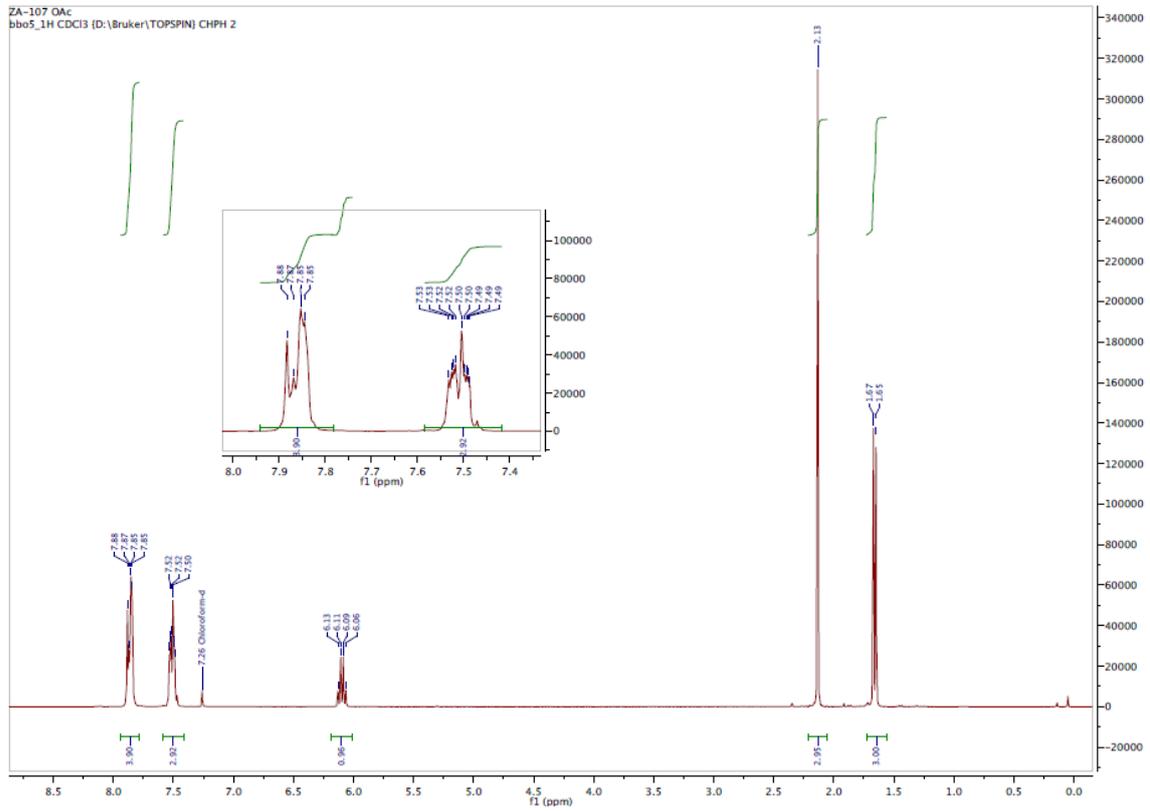
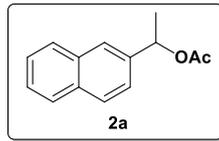
ANNEXES

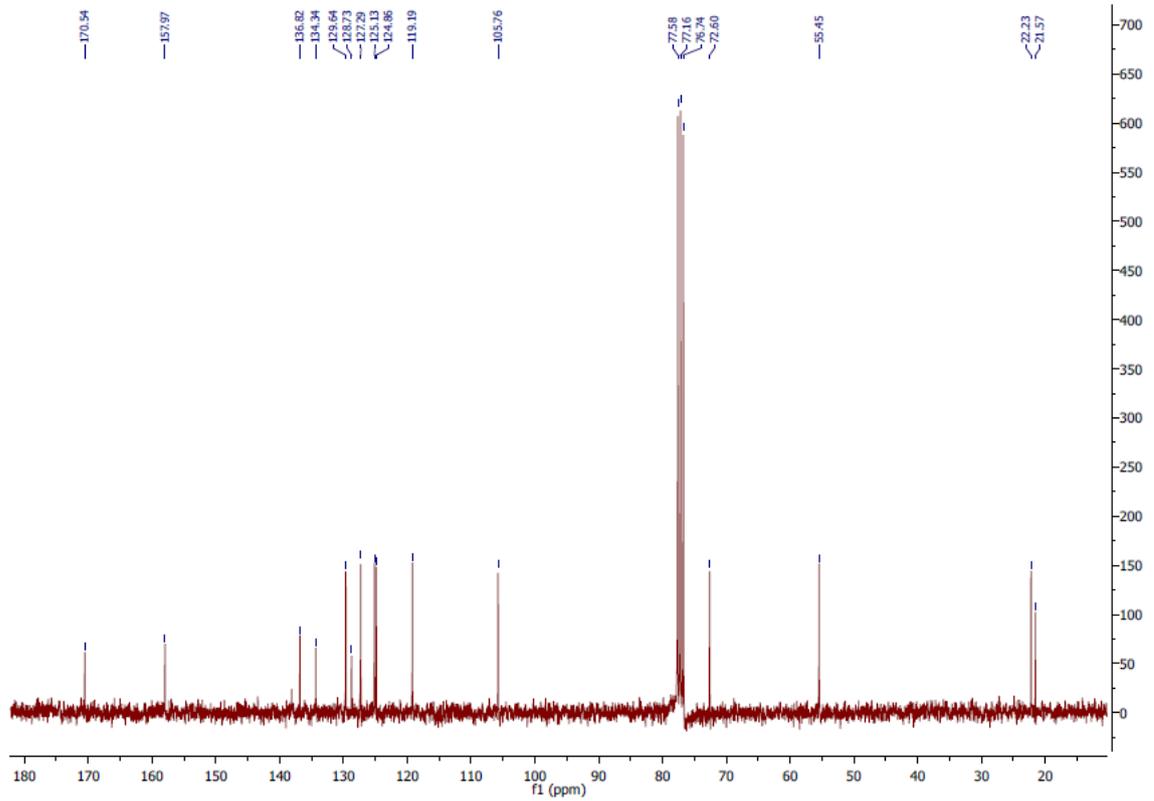
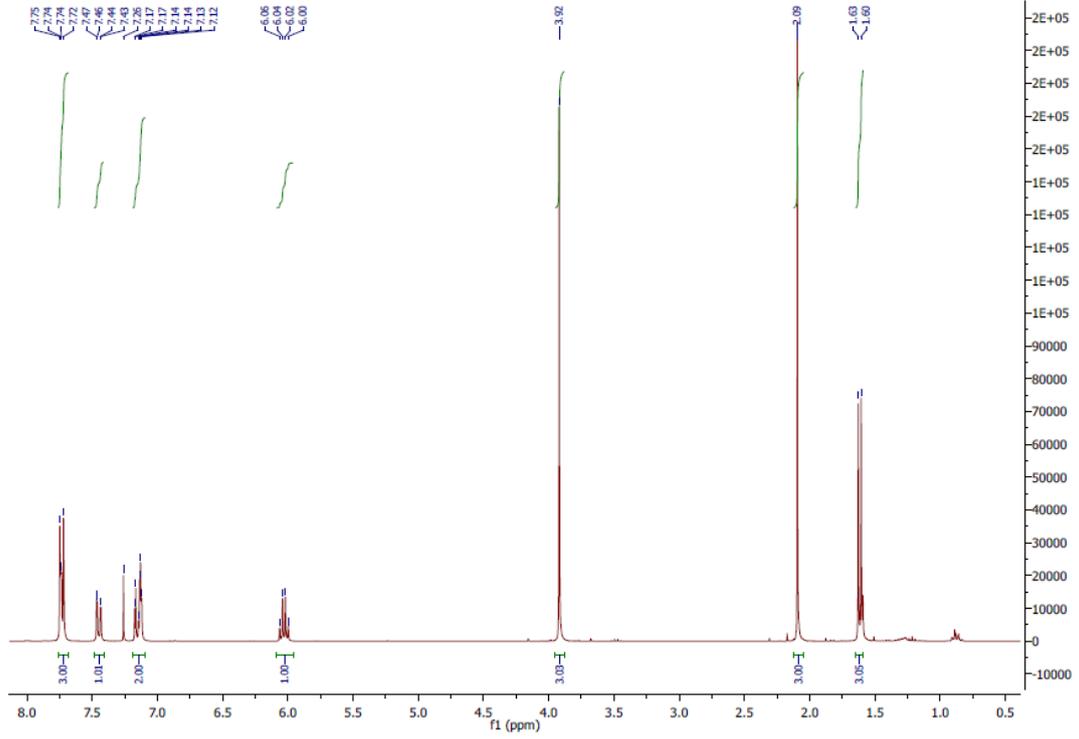
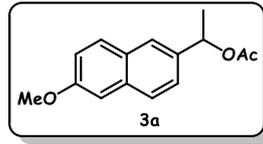


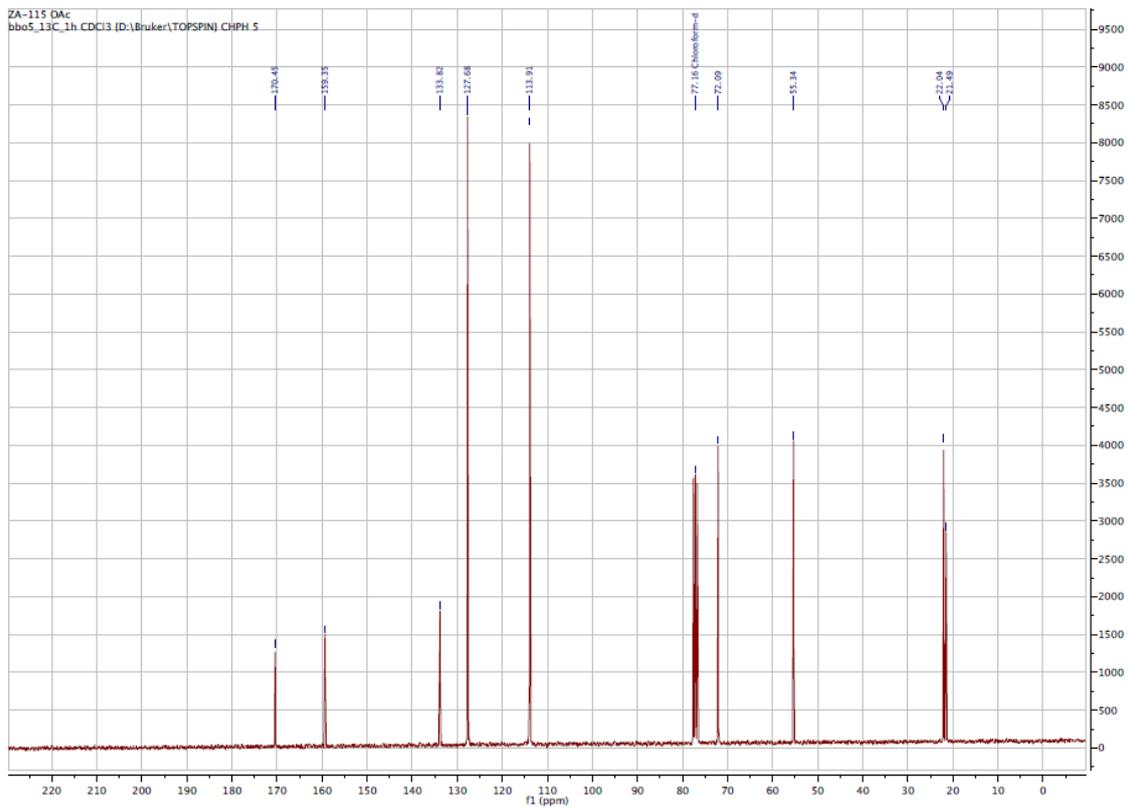
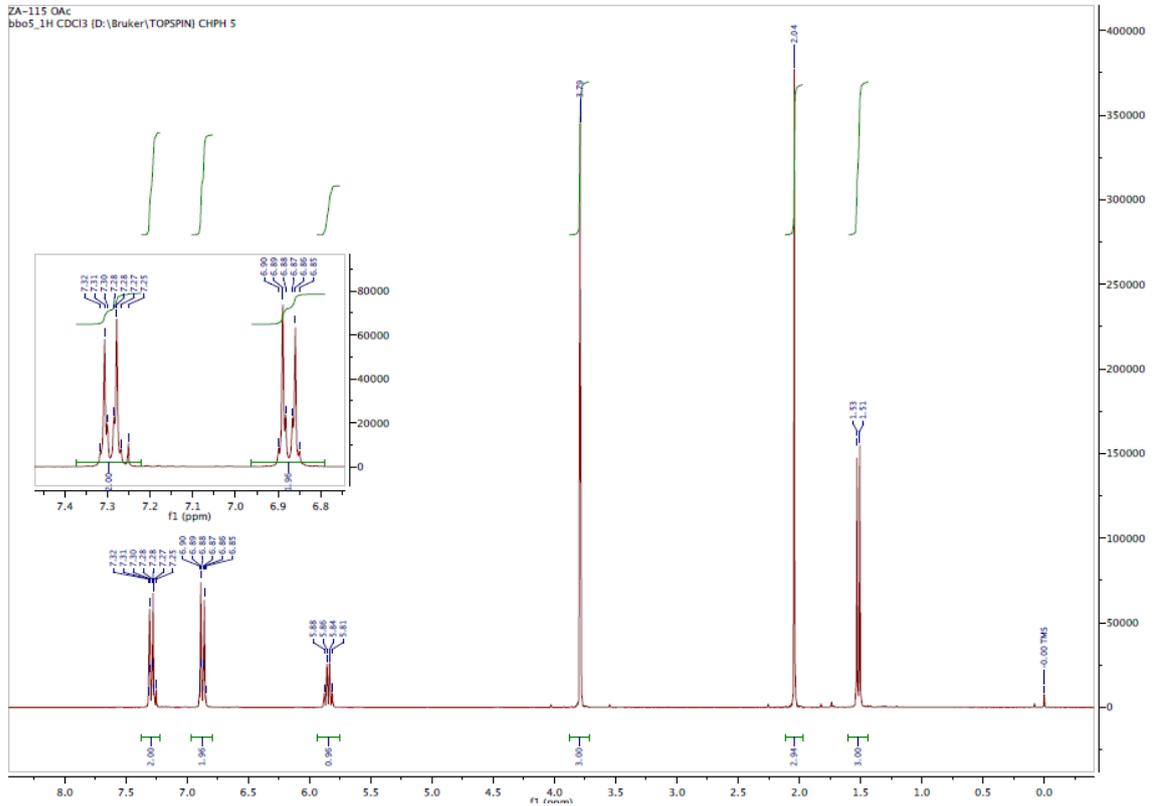
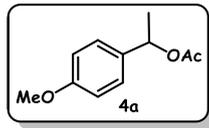


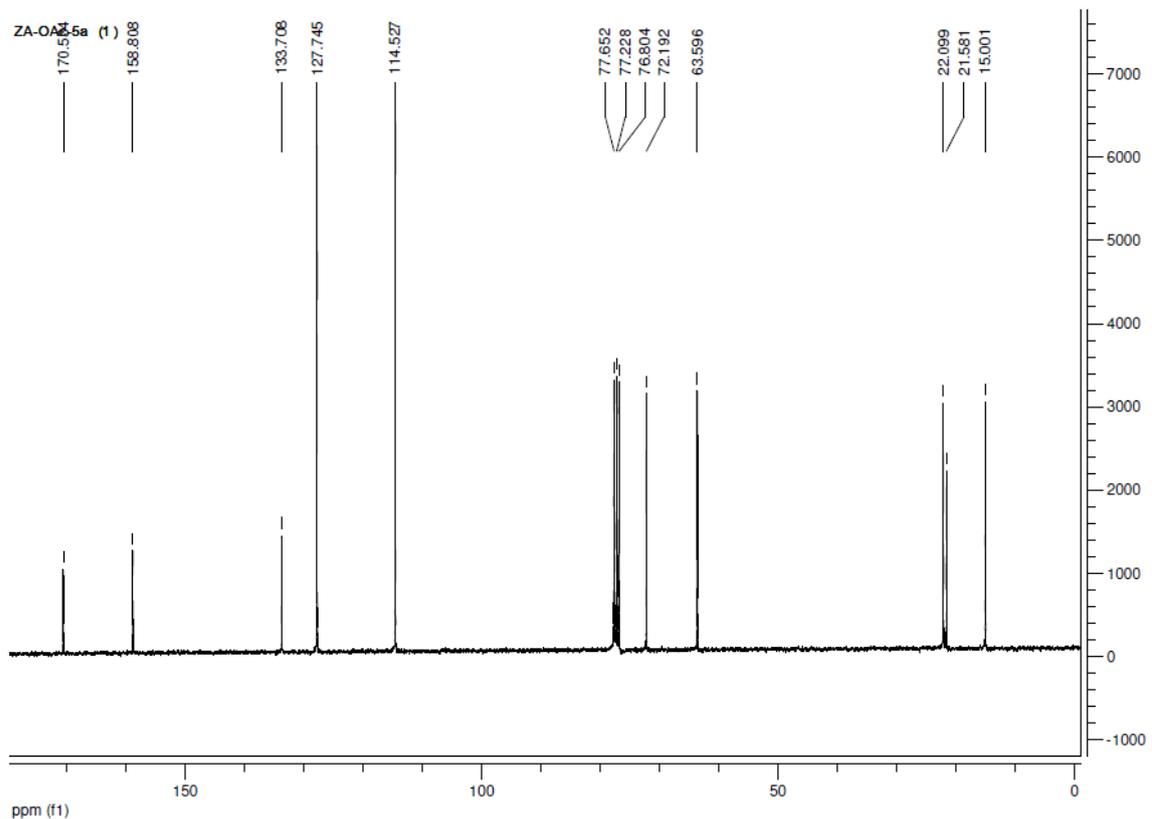
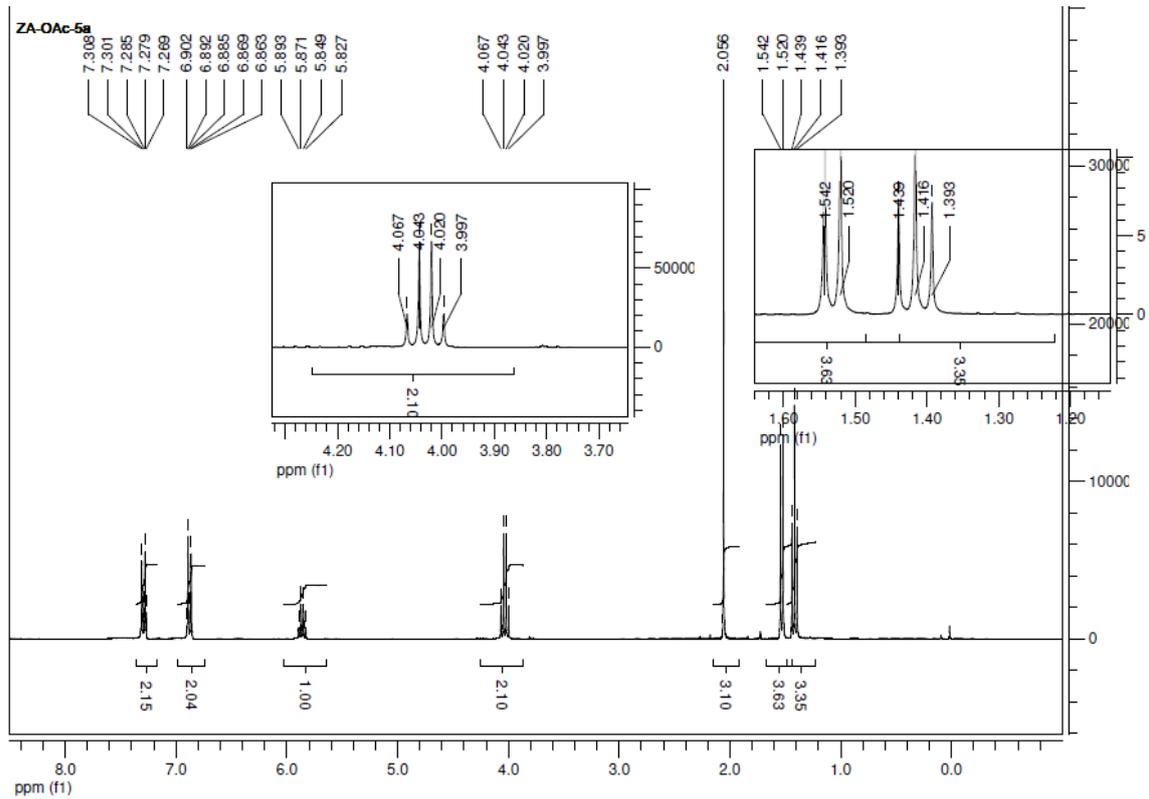
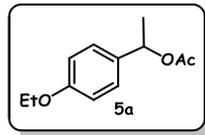


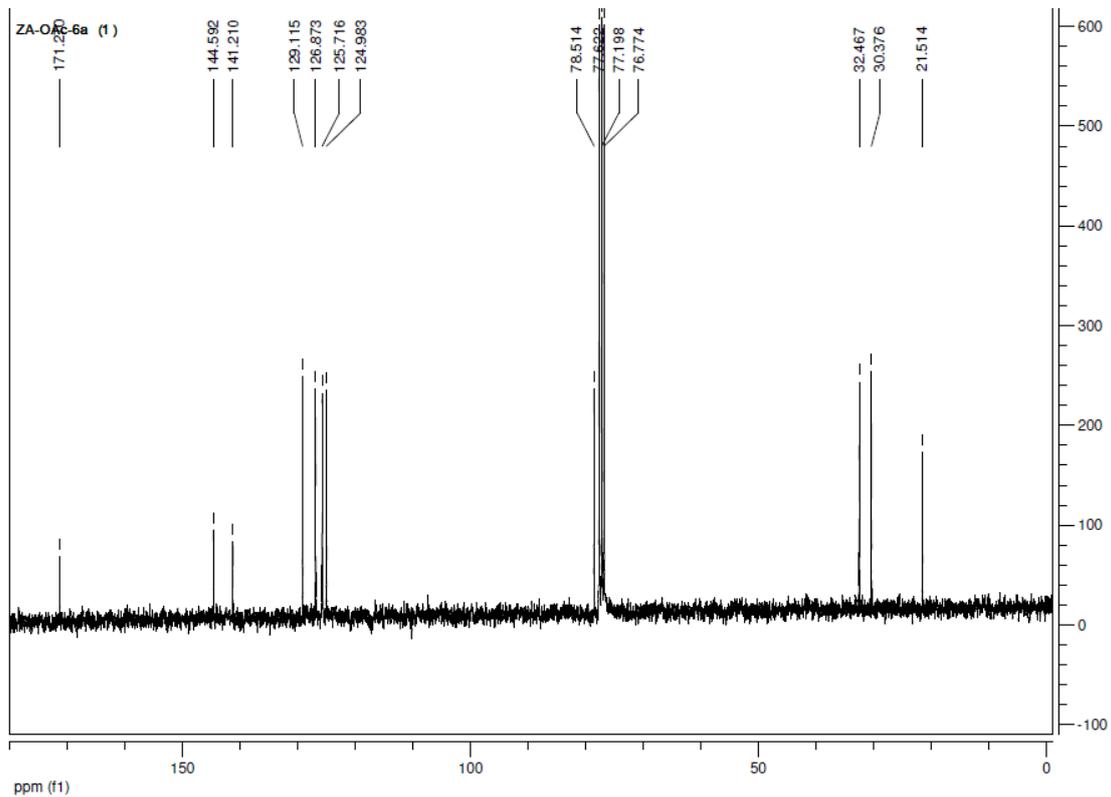
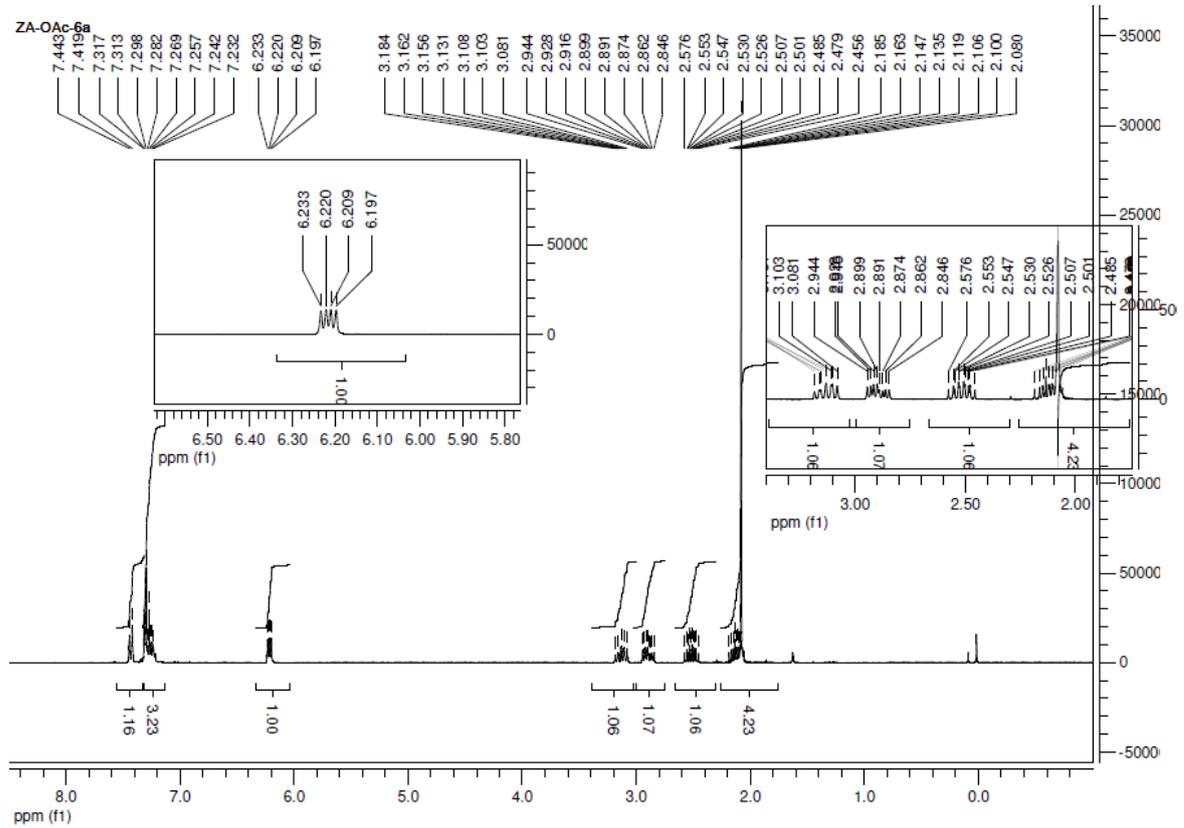
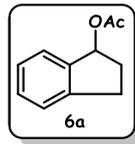


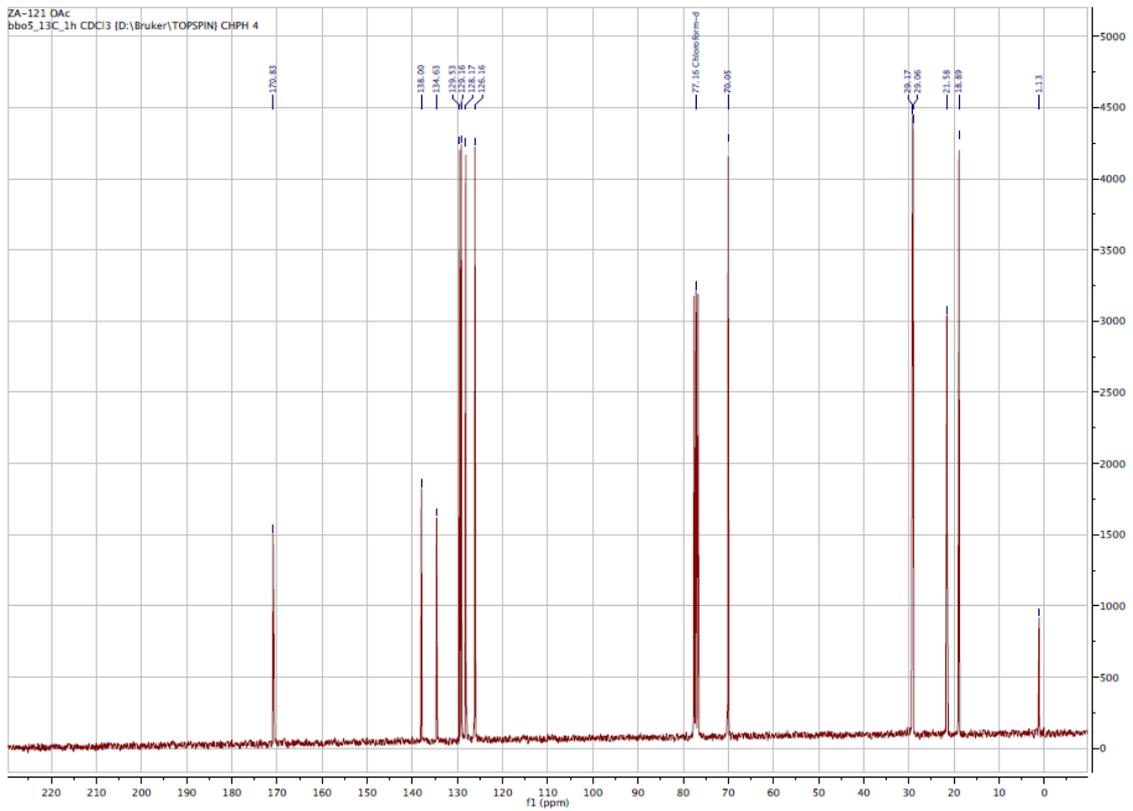
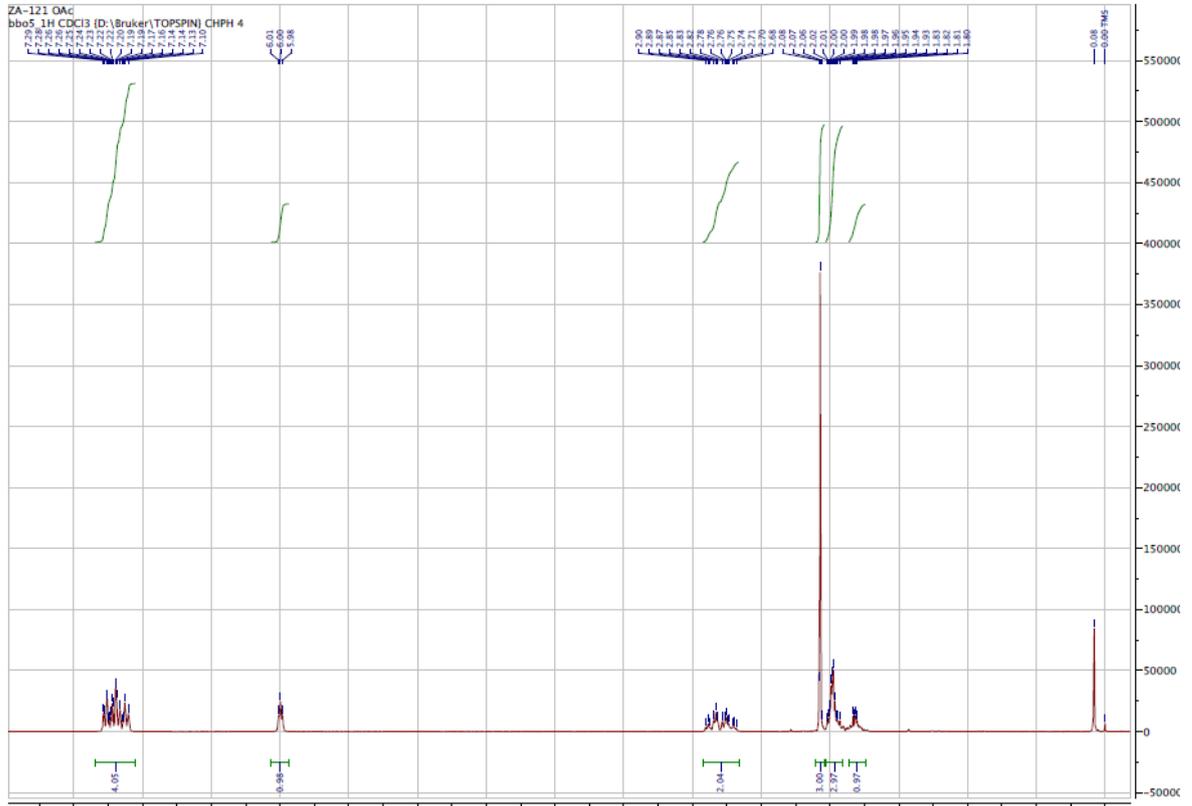
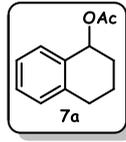


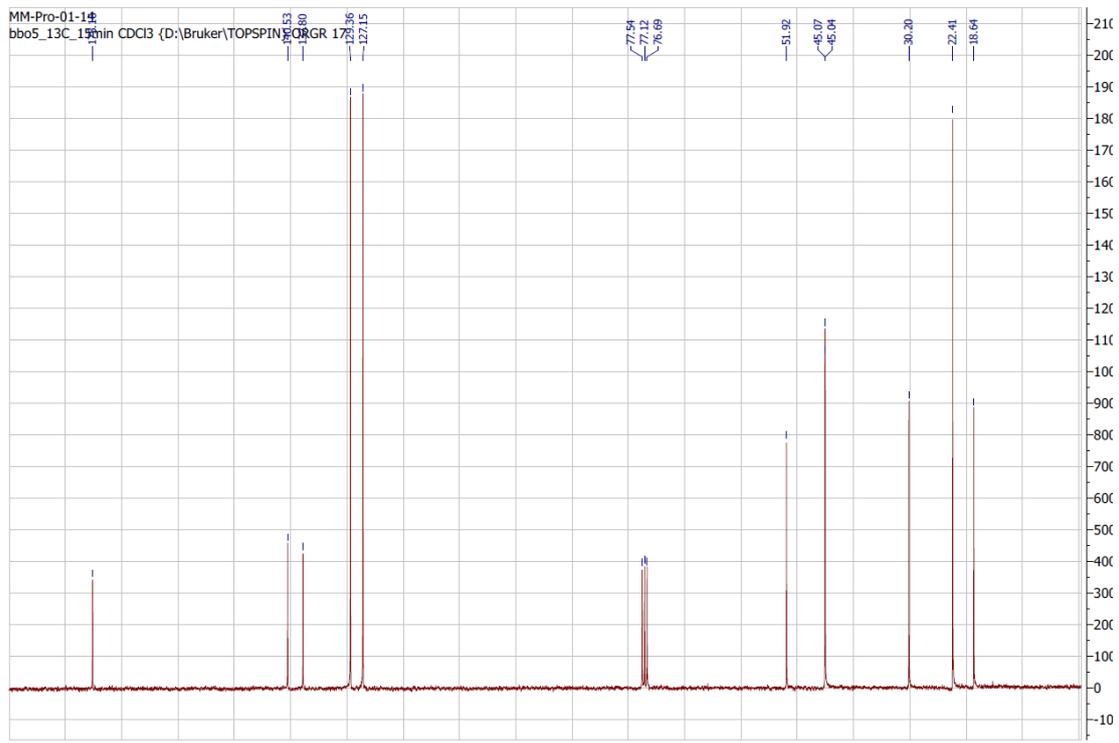
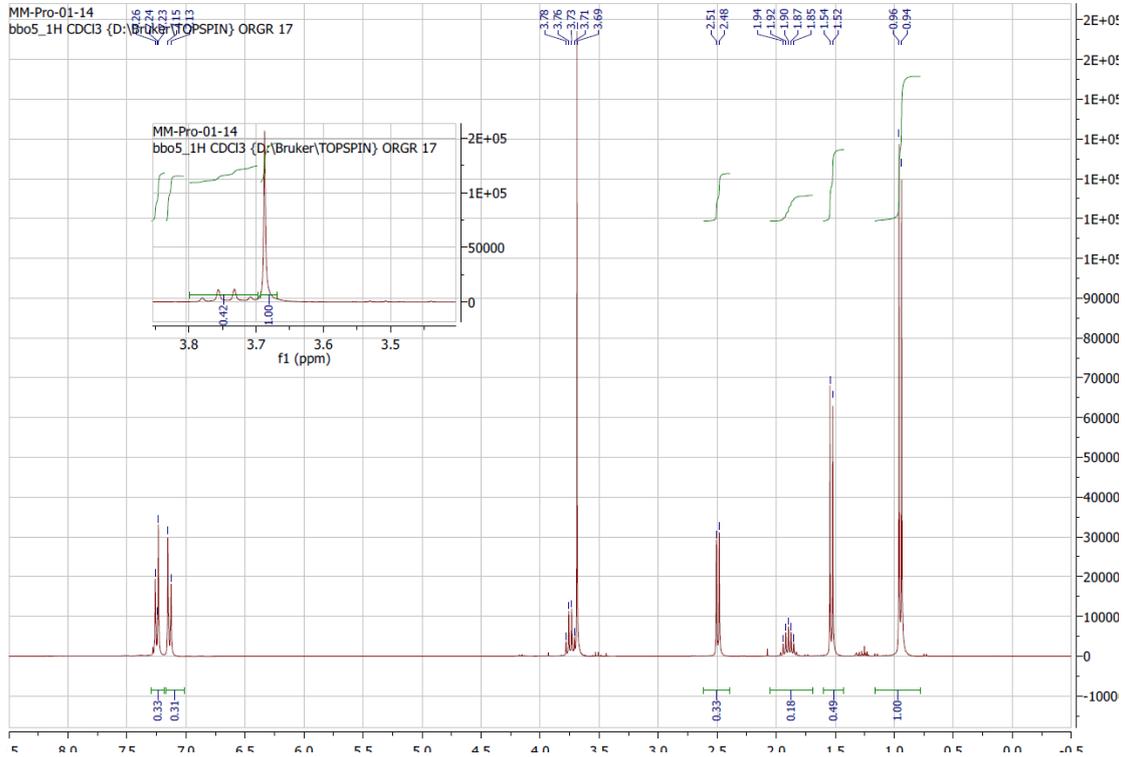
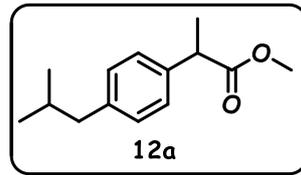


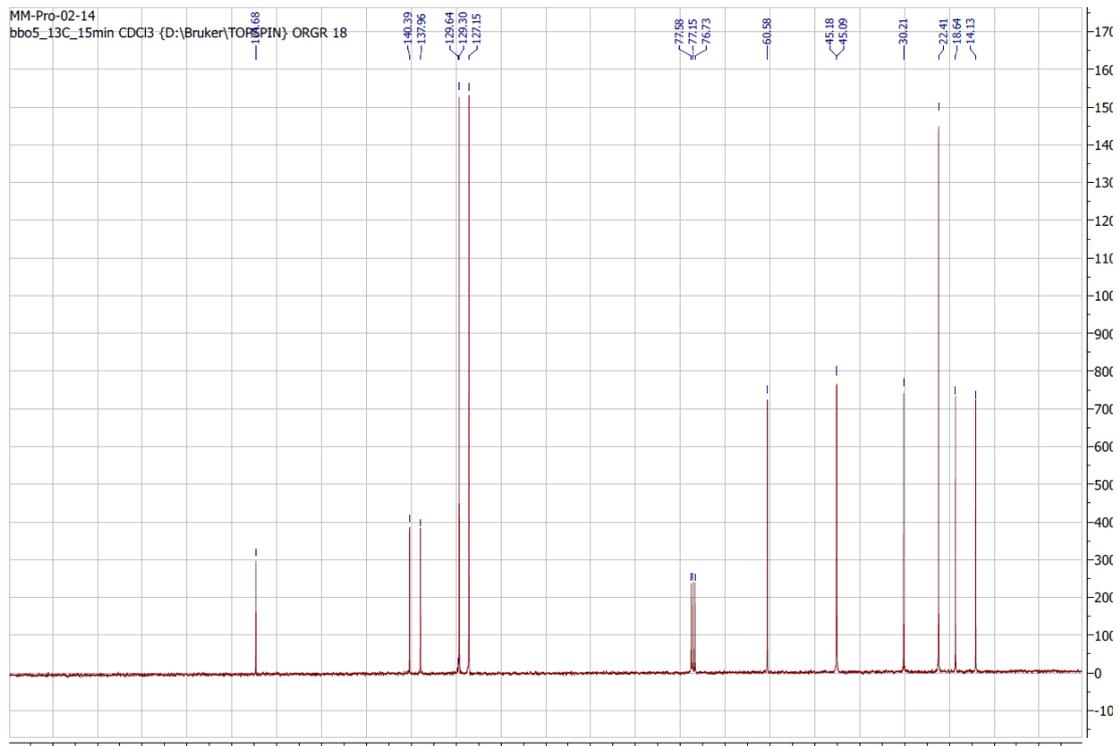
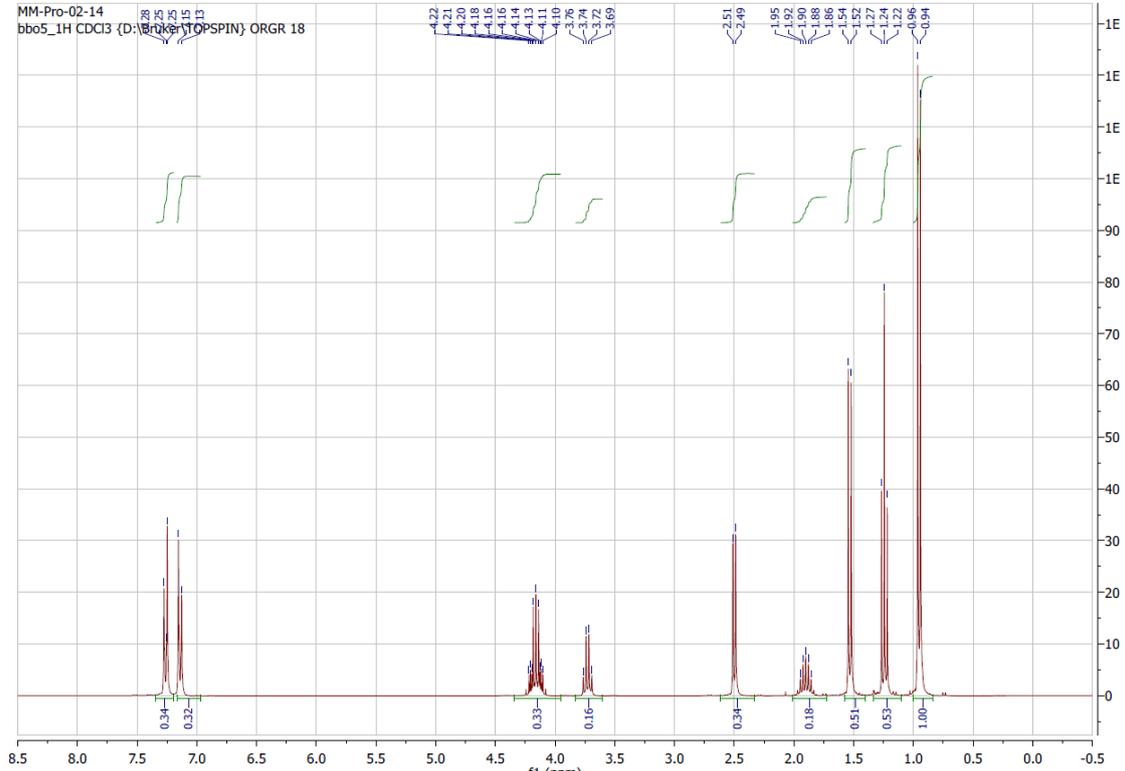
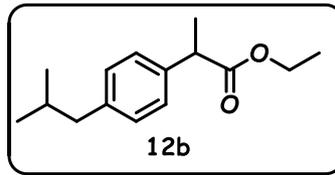


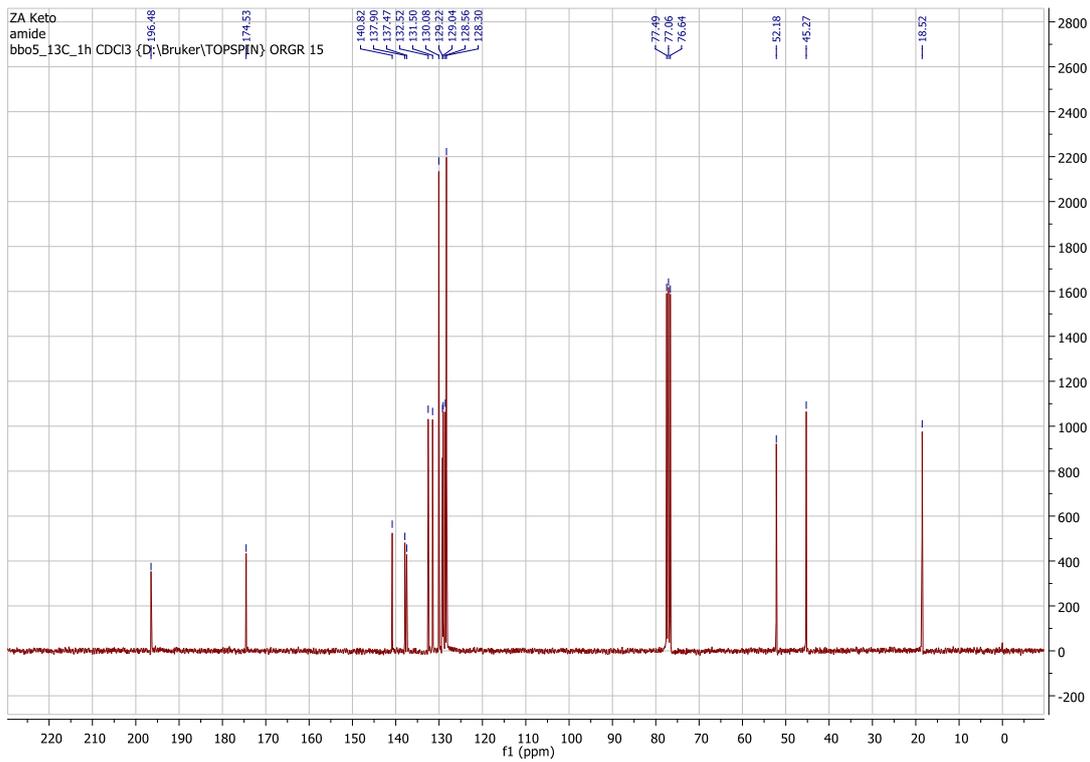
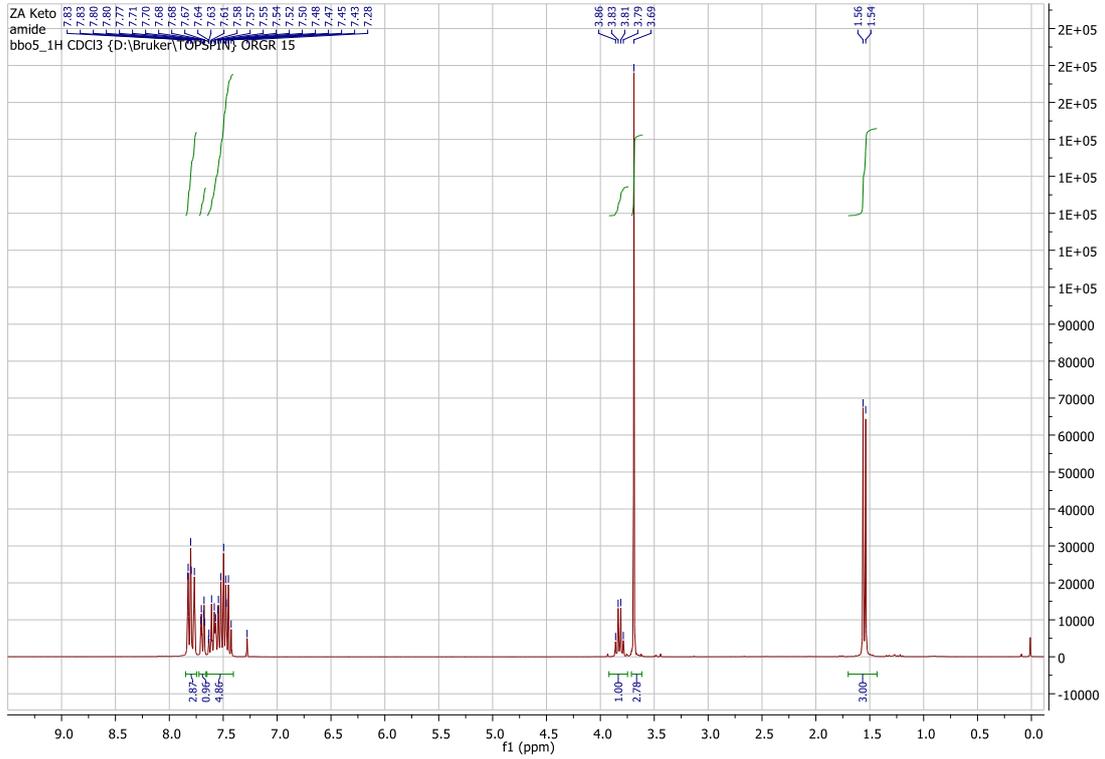
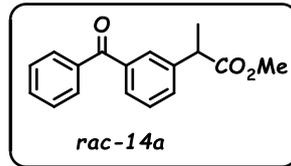


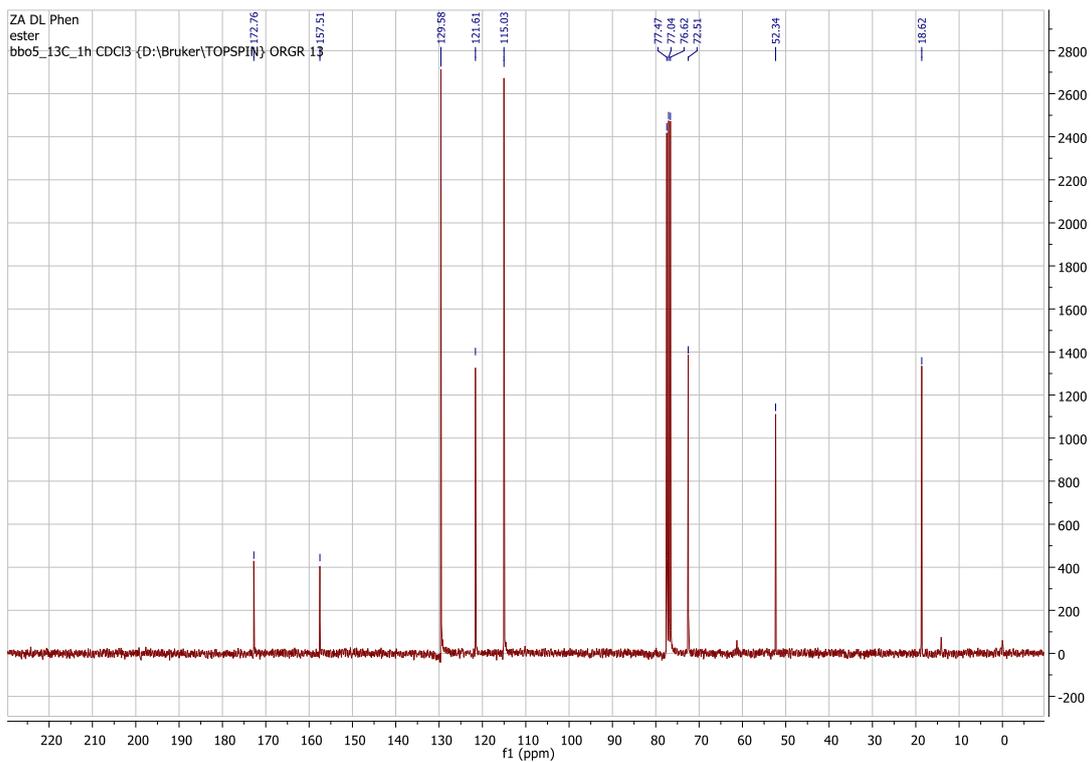
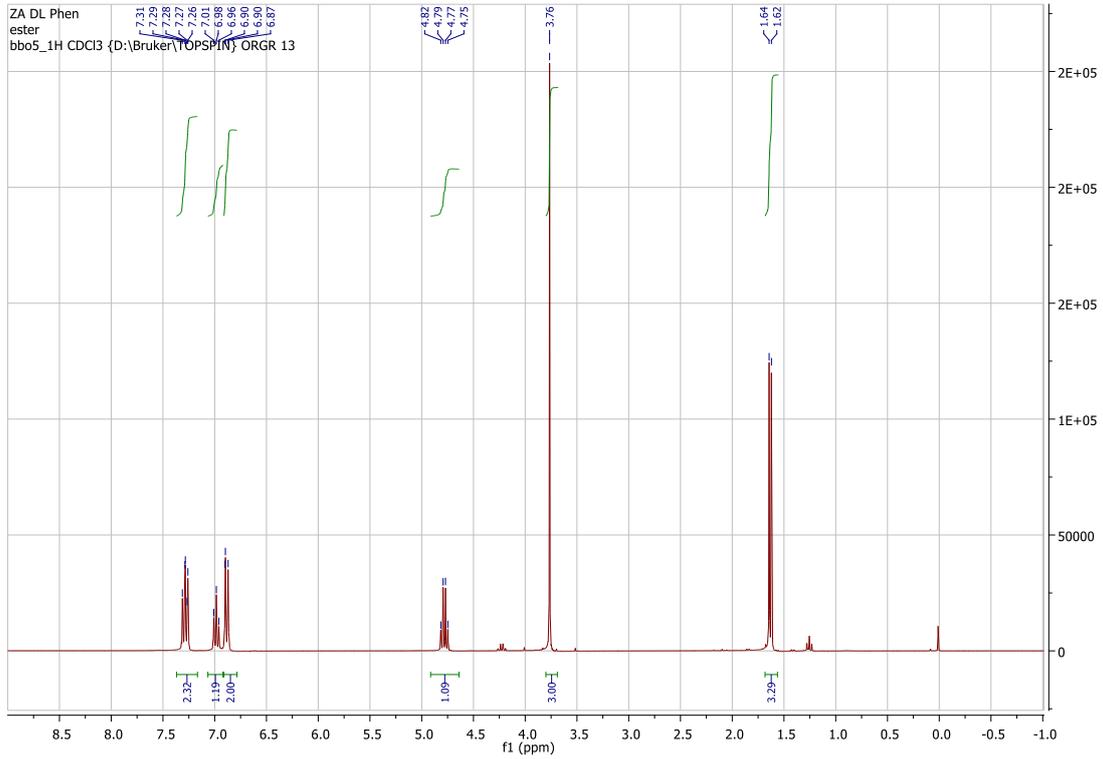
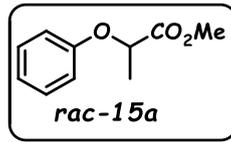


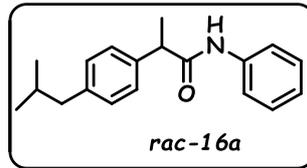




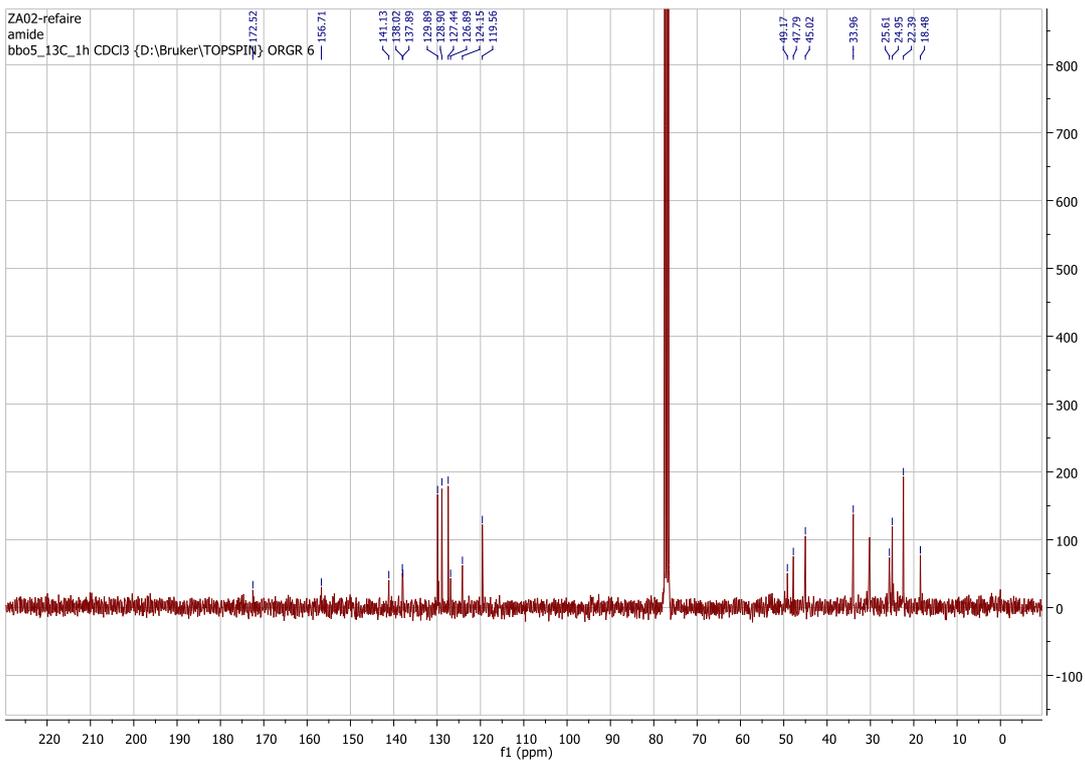
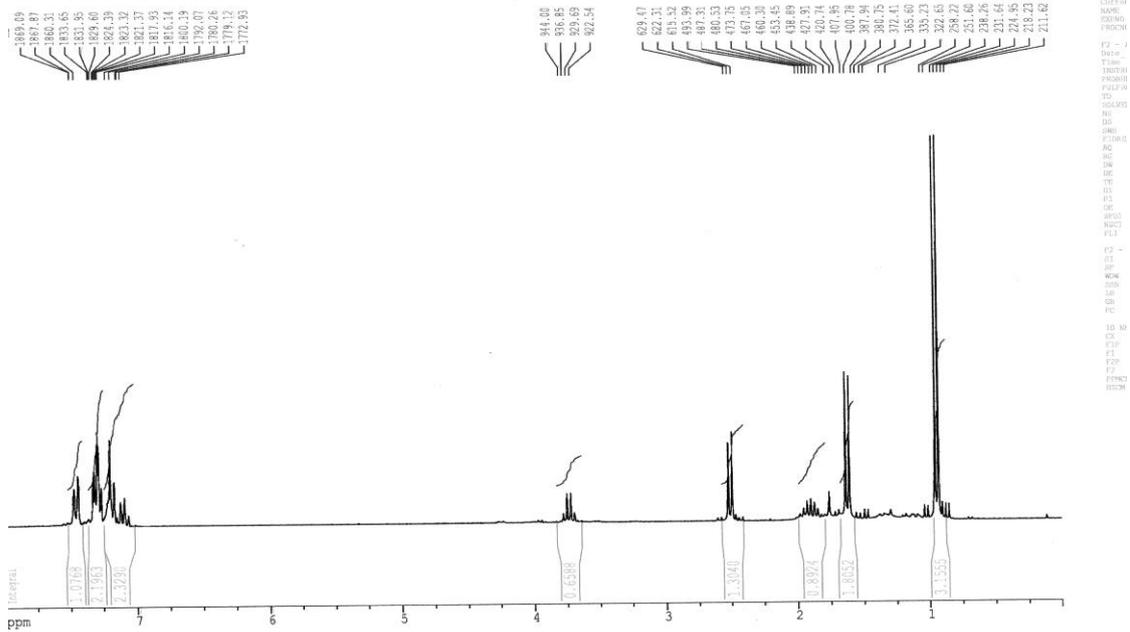


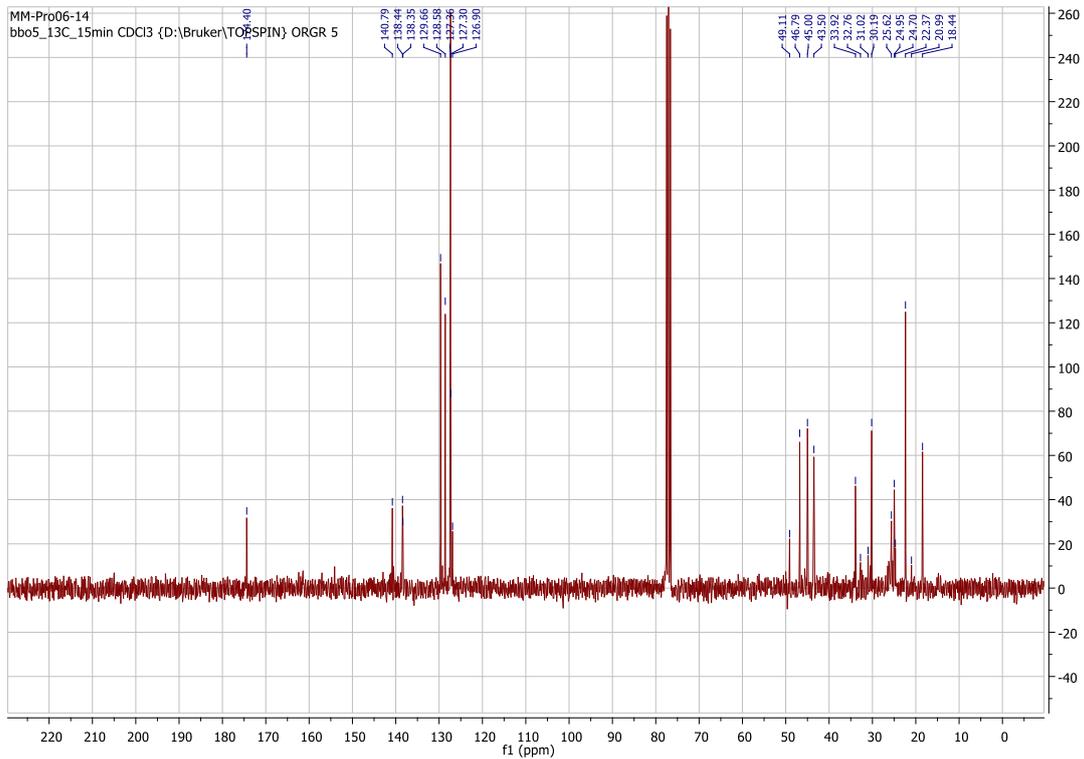
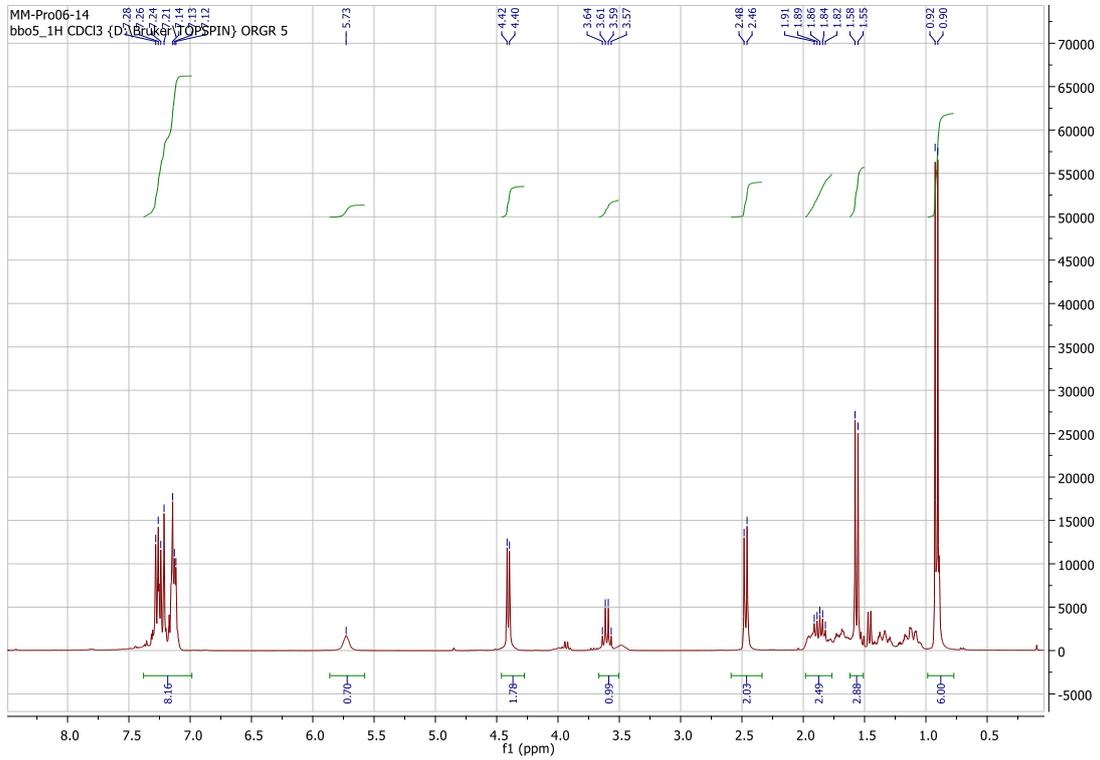
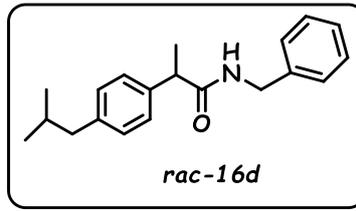


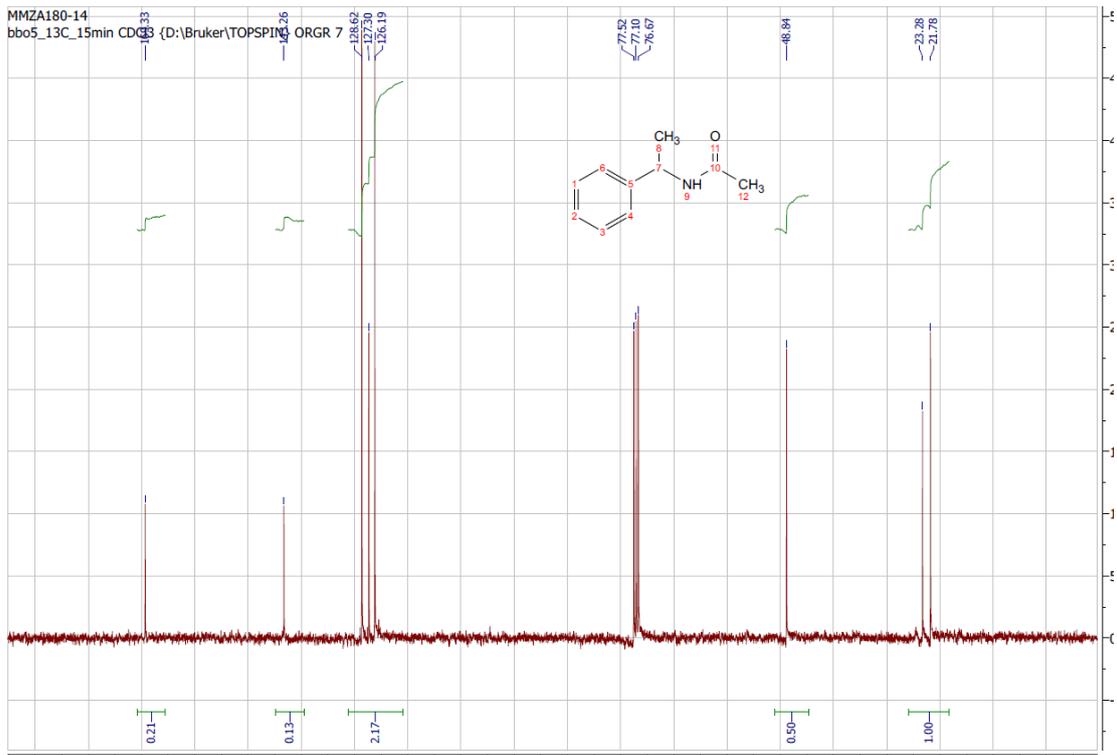
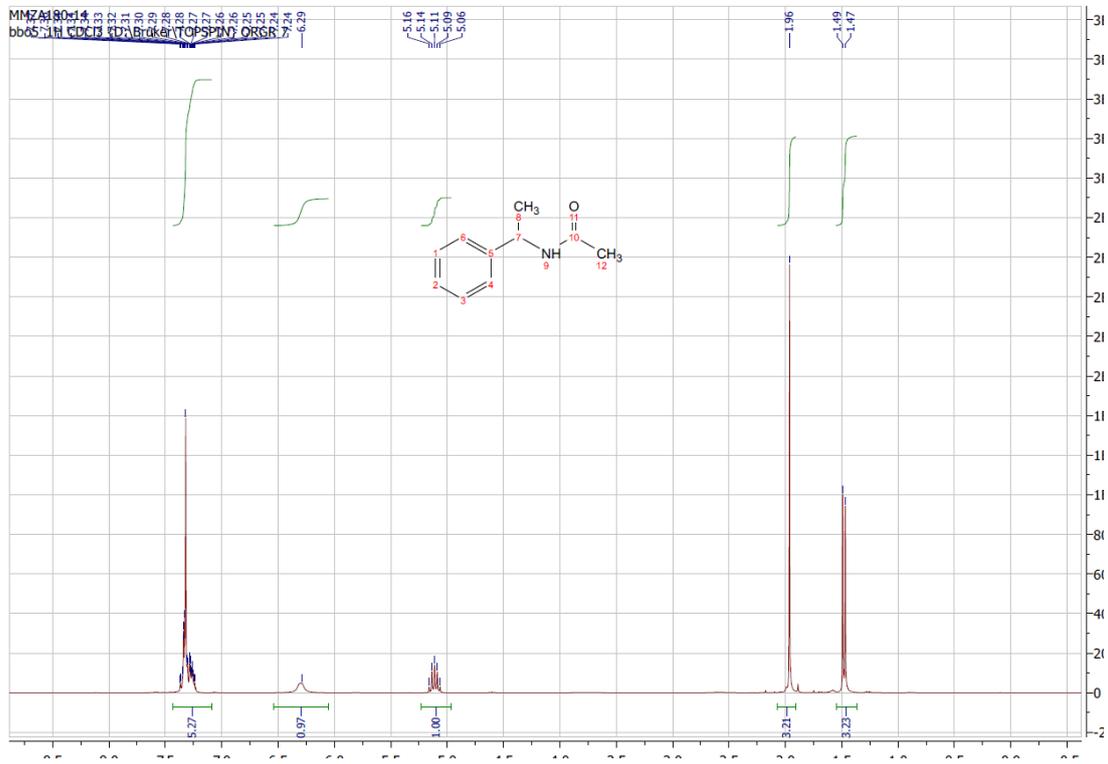
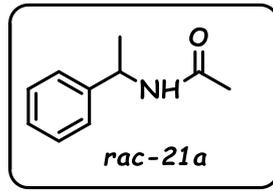


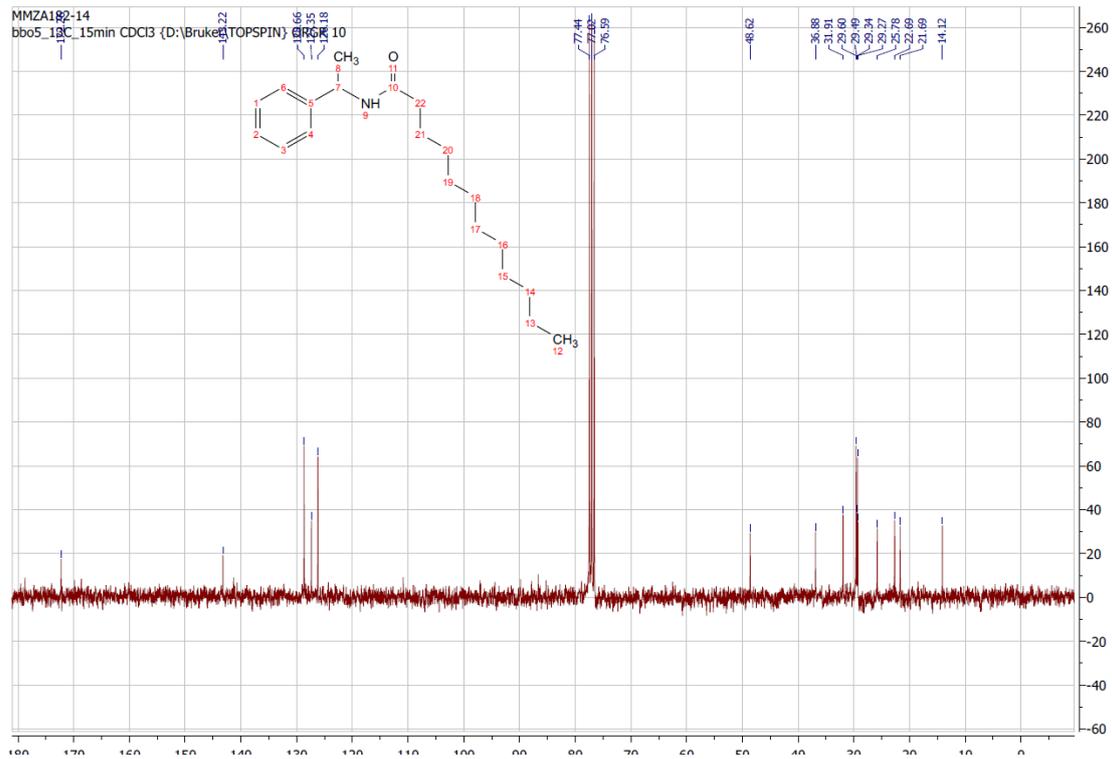
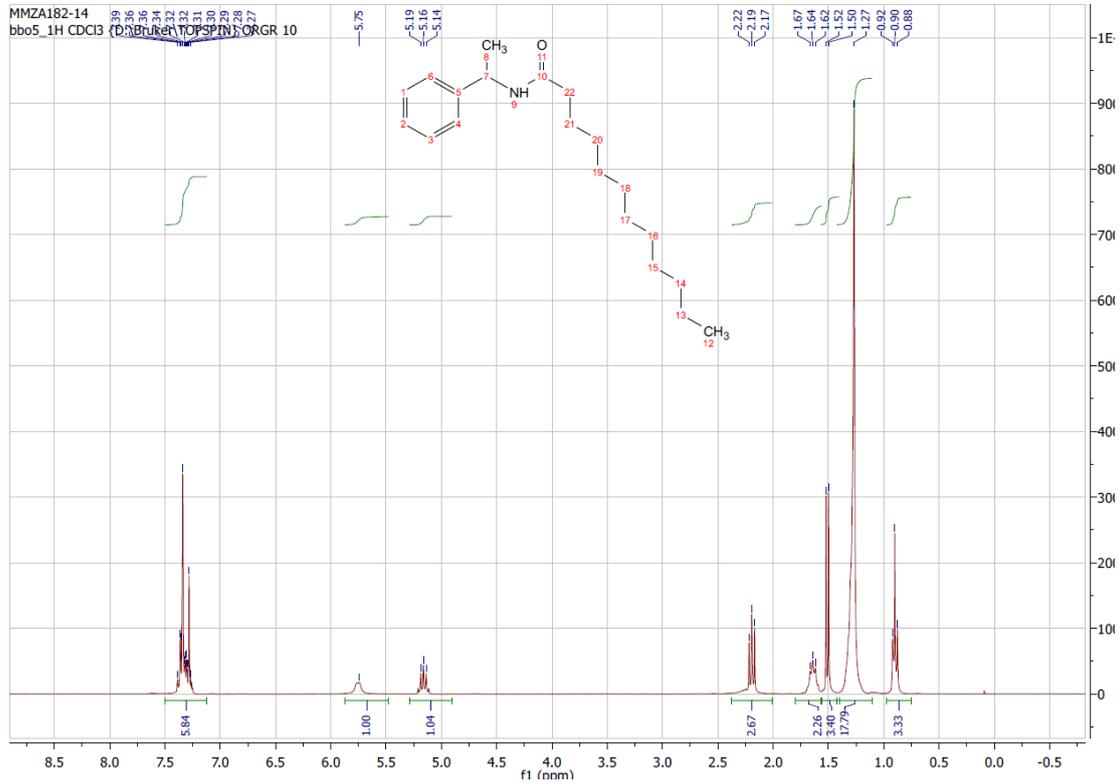
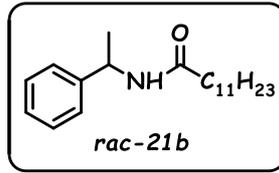


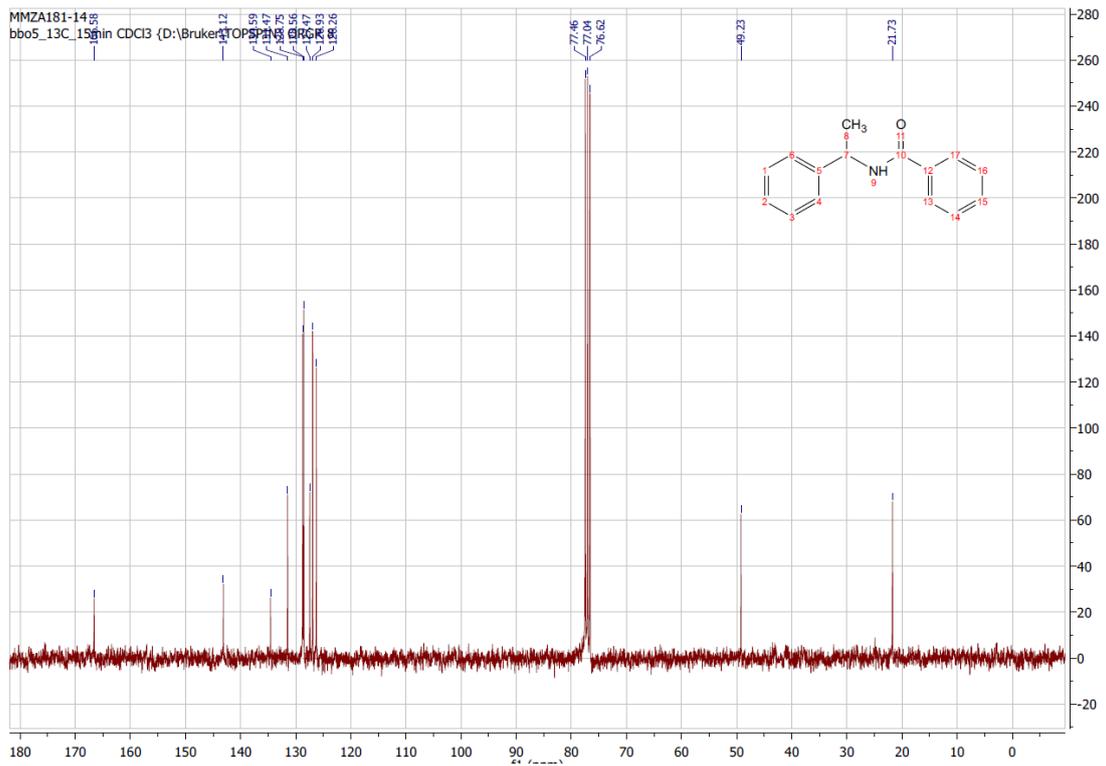
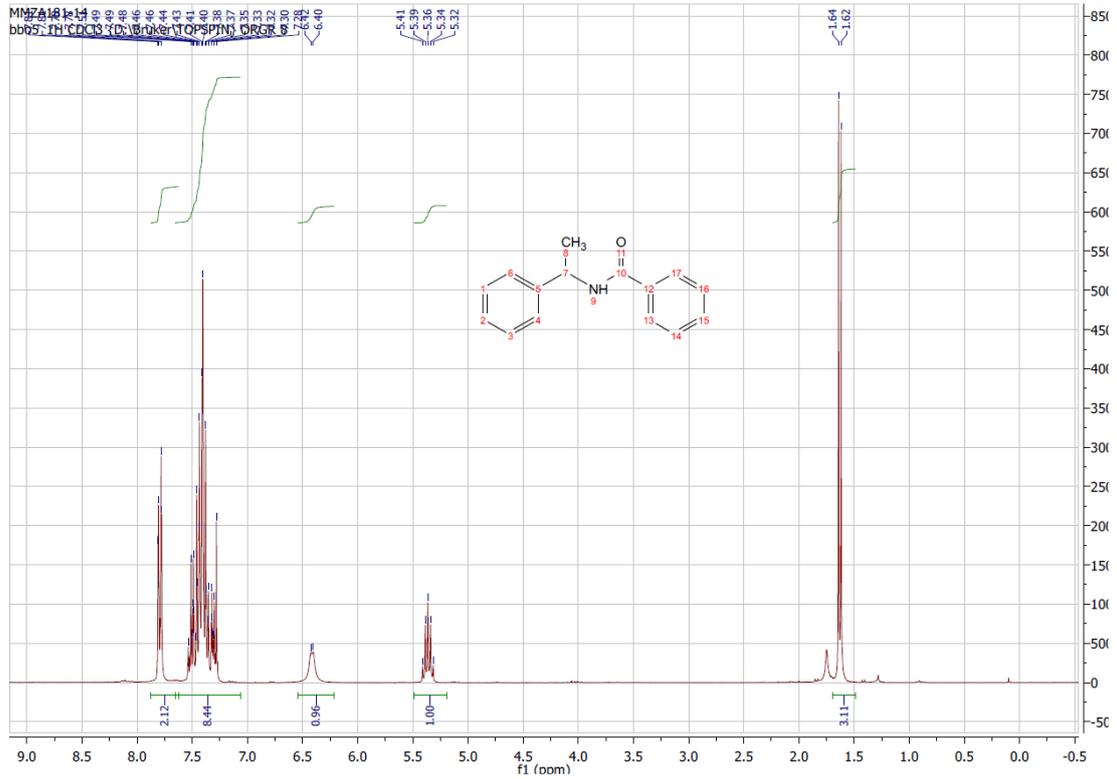
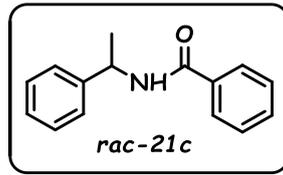
Spectre proton :ECH: ZA02-11











CAL-B-Catalyzed Enantioselective Deacetylation of Some Benzylic Acetate Derivatives Via Alcoholysis in Non- aqueous Media

**Amna Zaïdi, Mounia Merabet-Khelassi
& Louisa Aribi-Zouioueche**

Catalysis Letters

ISSN 1011-372X

Volume 145

Number 4

Catal Lett (2015) 145:1054-1061

DOI 10.1007/s10562-014-1470-7



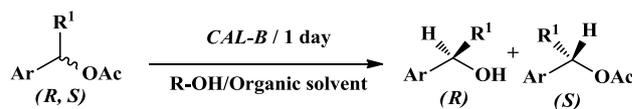
Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

CAL-B-Catalyzed Enantioselective Deacetylation of Some Benzylic Acetate Derivatives Via Alcoholysis in Non-aqueous Media

Amna Zaïdi · Mounia Merabet-Khelassi ·
Louisa Aribi-ZouiouècheReceived: 8 October 2014 / Accepted: 23 December 2014 / Published online: 21 January 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Enantioselective deacetylation of a set of benzylic acetates via alcoholysis catalyzed by *Lipase B* from *Candida antarctica* (CAL-B), under mild conditions is described. A systematic study allows to determine the appropriate combination nucleophile/organic solvent and also to explain the influence of these parameters on the enzymatic catalytic reaction. In all cases, (*R*)-alcohols are obtained with high ee (up to >99 %) at conversion 36 % < C < 48 %, the selectivity reaching E > 500. The enzymatic reactivity is influenced by the hydrophobicity of solvent and the structure/nature of the nucleophile. Furthermore, CAL-B allows enantio-complementary between transesterifications in non-aqueous media: alcoholysis and acetylation.

Graphical Abstract



ROH	Solvent	Conversion	Selectivity
2-BuOH	DIPE	42% < C < 45%	E > 500
MeOH	Toluene	42% < C < 45%	E > 500

Keywords Deacetylation · Alcoholysis · Lipases · Kinetic resolution · Benzylic acetates · Non-aqueous media

1 Introduction

The use of enzymes as effective catalysts tools in organic synthesis allows access to chiral molecules under mild and eco-compatible conditions [1–4]. The enzymatic kinetic resolution is commonly used to prepare a broad range of chiral building blocks, required in several domains, such as the manufacture of pharmaceuticals, cosmetics, flavors, agricultural and fine chemicals [5–7]. Especially benzylic alcohols are needed as key precursors for the generation of pharmaceuticals [8]. They can be obtained under enantio-pure or enantiomeric enriched form by transesterification in organic solvents (acetylation or alcoholysis) [9, 10], or by enzymatic hydrolysis in aqueous or biphasic media, although deacetylation was scarcely investigated [11–15]. This may be an interesting way to be inserted into de-racemization process, since efficient methods have been developed over the last decade and bring new pathways for

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10562-014-1470-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Zaïdi · M. Merabet-Khelassi · L. Aribi-Zouiouèche (✉)
Eco-compatible Asymmetric Catalysis Laboratory (L.C.A.E),
Badji Mokhtar Annaba-University, B.P 12, 23000 Annaba,
Algeria
e-mail: louisa.zouiouèche@univ-annaba.dz;
louisa.zouiouèche@gmail.com

A. Zaïdi
e-mail: zaidi.amna4@gmail.com

M. Merabet-Khelassi
e-mail: mounia.merabet@univ-annaba.dz

the production of enantioenriched molecules with high yields and selectivities [16–18].

Previously, we have shown that the control of several parameters such as the amount of enzyme and the nature of the acetylating agent dramatically affects both reactivity and selectivity of the *Candida antarctica lipase B* (CAL-B) catalyzed kinetic resolution through transesterification [19–22]. We have demonstrated that the efficiency of the enzymatic acetylation is multifactorial, several parameters interact simultaneously on both enzymatic reactivity and selectivity. We supposed that the decrease of selectivity caused by reducing the amount of enzyme was probably due to competitive hydrolysis reactions in non aqueous media by the water brought by enzyme [20]. Similarly, we have recently revealed that the use of carbonate salts in the enzymatic hydrolysis of racemic acetates with CAL-B, in non aqueous media, allows a significant enhancement of the reactivity and selectivity of this lipase. Due to the high enantioselectivity of this hydrolysis with large series of substrates, deracemization via Mitsunobu inversion protocol was investigated [23, 24].

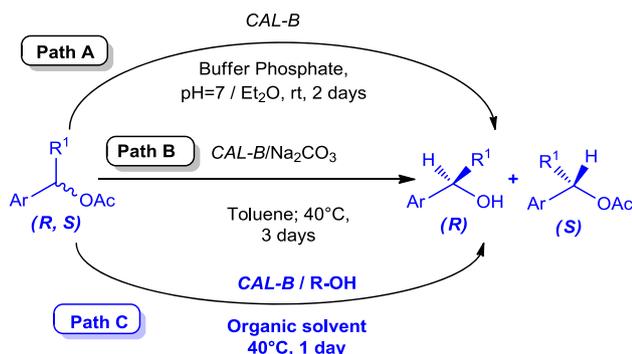
In the continuity of our investigations, with the aim to understand the mode of action of CAL-B and to clarify last observations related to hydrolysis competition, we have studied several possibilities to deacetylate acetates (Scheme 1).

In the present paper, we describe the enantioselective deacetylation of some benzylic acetates via alcoholysis catalyzed by CAL-B (Scheme 1, path C), a less studied path [27–36]. The influence of several parameters such as: the nature of the acetyl acceptor, the organic solvent and water on the progress of the enzymatic alcoholysis were examined in order to obtain optically pure alcohols.

2 Experimental Sections

2.1 Chemicals and Materials

All reagents and solvents were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich. The *Candida antarctica lipase* immobilized on acrylic resin CAL-B was purchased



Scheme 1 Possible pathways for enzymatic deacetylation of acetate

from Aldrich. Specific activity >10,000 U/g used without any pre-treatment. The monitoring of the reactions was conducted using TLC on Silica gel 60F₂₅₄ plates type MERCK 5179, 250 mesh. The separation of the resulting alcohols and the remaining acetates was performed by column chromatography using Silica gel 60 Å, 70–230 mesh 63–200 μm.

2.2 Instrumentations

The spectroscopic characterisation was performed with Brüker spectrometers (300 MHz for ¹H, 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts were reported in δ ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as internal standard for ¹H NMR and chloroform-d (δ 77.0 ppm) for ¹³C NMR. IR spectra were recorded on Shimadzu FTIR-8400S spectrometer. Melting points were measured using BÜCHI MELTING POINT B-545. The enantiomeric excesses were measured by gas chromatography on ThermoFinnigan Trace GC, equipped with an automatic autosampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 μm). Retention times are reported in minutes.

2.3 General Procedure for the Reduction of Ketones

The racemic alcohols were obtained after reduction of the corresponding ketones using an excess of LiAlH₄ diluted in anhydrous ether or with NaBH₄ in (THF/water; 4/1 v/v). The reaction mixture was stirred under at 0 °C. The evolution of the reactions was monitored by TLC. After total consumption of ketones, the resulting alcohols were obtained pure in good yields after standard work up. All spectroscopic analysis were detailed in the supplementary data.

2.4 General Procedure for the Chemical Acetylation of Racemic Alcohols (1–7)

The racemic acetates (**1a–7a**) were obtained by standard classical chemical acetylation of corresponding alcohols, according to the following procedure: to 1 equivalent of racemic alcohol (**1–7**), 1.2 equivalent of triethylamine and 0.1 equivalent of dimethylaminopyridine (DMAP) dissolved in 4 mL of ether, 1.5 equivalent acetic anhydride were added slowly. The evolution of the reactions was monitored by TLC. The acetates are obtained pure after standard work up, in good yields. All spectroscopic analysis were detailed in the supplementary data.

2.5 General Procedure for the Alcoholysis of Racemic Acetates (1a–7a) with *Candida antarctica*- B lipase

To 1 mmol of the racemic acetates (**1a–7a**) dissolved in 2 mL of organic solvent, 2 mmol of the appropriate alcohol

and 12 mg of *CAL-B*, are added. The suspension was stirred at 40 °C for 24 h. The reaction mixture is filtered on Celite and concentrated in vacuo. The remaining acetate and the producing alcohol were separated by chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) and analyzed by chiral GC. The same procedure was followed for the reactions in the presence of 60 mg of molecular sieves 4 Å.

3 Results and Discussion

The effect of both nucleophile and the organic solvent on the deacetylation via alcoholysis of phenylethyl acetate (**1a**), have been studied. These parameters should have strong influences on the selectivity of the *CAL-B* in catalyzed kinetic resolution. Thus seven alcohols with different structures were selected, methanol, ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol, 2-propanol, 2-butanol, *t*-butanol and two organic solvents with different hydrophobicities: di-isopropylether and toluene.

3.1 Influence of the Nature of Nucleophile on the Enzymatic Alcoholysis of 1-Phenylethyl Acetate (**1a**)

Alcoholysis of racemic phenylethyl acetate (**1a**) by the selected alcohols was performed in the presence of

catalytic amount of *CAL-B*, in the appropriate organic solvent (Scheme 2).

The conversion and selectivity of the kinetic resolution were quantified by chiral chromatography, and the results are collected in Table 1.

The data from Table 1 showed high selectivity of *CAL-B* catalyzed deacetylation of (**1a**) with selectivity factor values reaching $E > 500$ in favor of the (*R*)-alcohol enantiomer in all cases. It is to be reported that neither alcoholysis or hydrolysis was observed without enzyme, in both used solvents. On the other hand, a significant conversion rates (respectively 14.7 and 11.2 %, entries 1 and 9) of (**1a**) deacetylation was recorded without use of alcohols, which strengthens our hypothesis concerning the existence of competitive hydrolysis reactions in non aqueous media [23]. The reactivity was modulated by the nature of the nucleophile and the length of the carbon chain, whether in DIPE or in toluene, conversion vary between $14 \% < C < 44 \%$. Using primary alcohols in DIPE, the reaction rate increases with the length of the chain of the nucleophile. With *n*-propanol 40.9 % conversion is observed compared to 22.1 % in methanol (entry 4 vs. 2), but conversion decreases (15 %) in presence of *n*-butanol (entry 5). The best conversion was noted with 2-butanol in DIPE ($C = 43.5 \%$) and (*R*)-alcohol was obtained with enantiomeric excess $ee_p > 99 \%$ (entry 7).

Scheme 2 Enzymatic alcoholysis of 1-phenylethyl acetate (**1a**)

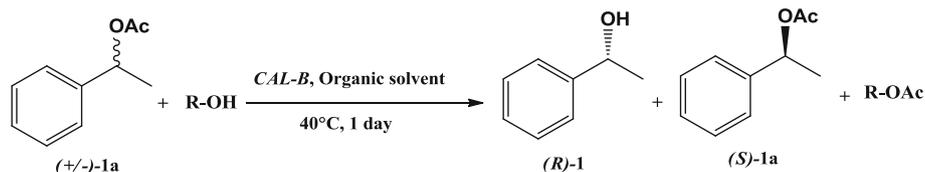


Table 1 Influence of the nature of the nucleophile on the enzymatic alcoholysis of 1-phenylethyl acetate (**1a**)

Entry	R-OH ^a	Solvent (logP)	Ee _(S) (%) ^b	Ee _(P) (%) ^b	C ^c	E ^c
1	–	DIPE	17.2	99.9	14.7	>500
2	MeOH	(1.9)	28.4	99.9	22.1	>500
3	EtOH		45.2	99.9	31.2	>500
4	<i>n</i> -PrOH		69.2	99.9	40.9	>500
5	<i>n</i> -BuOH		18.1	99.9	15.3	>500
6	2-PrOH		72.2	99.9	42.0	>500
7	2-BuOH		77	99.9	43.5	>500
8	<i>t</i> -BuOH		47.6	99.9	32.3	>500
9	Sans	PhMe	12.6	99.9	11.2	>500
10	MeOH	(2.5)	25.3	99.4	20.3	400
11	EtOH		45.8	96.9	32.1	99
12	<i>n</i> -PrOH		65.4	99.9	39.6	>500
13	<i>n</i> -BuOH		66.7	99.9	40.0	>500
14	2-PrOH		62.7	99.9	38.6	>500
15	2-BuOH		74.2	99.9	42.6	>500
16	<i>t</i> -BuOH		49.8	99.9	33.3	>500

^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 2 mmol of alcohol, 12 mg of *CAL-B*, in 2 mL of organic solvent at 40 °C

^b Enantiomeric excess of recovered alcohols and remaining acetates are measured by chiral GC ($ee = |R-S| / (R+S)$)

^c Conversion: $C = ee_S / (ee_P + ee_S)$; Selectivity: $E = \ln [(1-C) / (1-ee_S)] / \ln [(1-C) / (1+ee_S)]$ [25, 26]

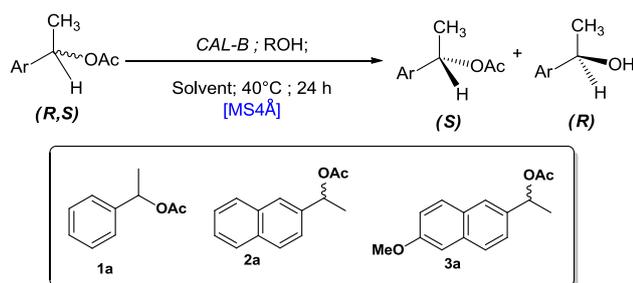
Likewise, with toluene as organic solvent, we observed a direct relationship between the deacetylation efficiency of the 1-phenylethyl acetate (**1a**) through *CAL-B* alcoholysis, and the length of the alcohol alkyl radical, without any exception (entries 10–13). Similar observations when using DIPE as organic medium were recorded during the alcoholysis of (**1a**) by secondary and tertiary alcohols (entries 6, 7 and 8 vs. 14, 15 and 16), and like with DIPE, the deacetylation using 2-butanol gave the highest reaction rate $C = 42.6\%$ with (*R*)-alcohol enantiopreference (entry 15). Furthermore, DIPE and toluene used as solvent gave similar results with the tertiary alcohol: *t*-BuOH (32.3 and 33.3 % for *C*, entries 8 and 16). This result should be appealing, since this nucleophile is usually employed as inert solvent in enzymatic catalysis [33, 37, 38] or as co-solvent in enzymatic hydrolysis of 1-phenylethyl acetate (**1a**) in biphasic systems [39]. These results suggest that this alcohol could perform secondary reactions in enzymatic reactions processes.

3.2 Effect of Molecular Sieves on the Enzymatic Alcoholysis of Benzylic Acetates (**1a–3a**)

In order to reduce the competition between the nucleophiles present in reaction media (Water/ROH), and regulate the enzymatic catalysis, we have added molecular sieves 4 Å, which have indeed shown an effect on both reactivity and selectivity of *Candida Rugosa Lipase* (*CRL*) in transesterification [21]. Thus the addition of the molecular sieves was investigated for the alcoholysis of the phenylethyl acetate [40, 41], the substrate model of our study, as well as for two other acetates [8, 42] (**1a–3a**).

Each enzymatic alcoholysis reaction was carried out according to Sect. 2.5 (Scheme 3). The progress and the selectivity of the kinetic resolution were analyzed by chiral chromatography, and the results are summarized in Table 2.

As shown in Table 2, the addition of molecular sieves with both solvents, strongly improves the alcoholysis rate of the deacetylation of acetate (**1a**) using the *CAL-B*. The deacetylation was extremely enantioselective ($E > 500$) in



Scheme 3 Enzymatic alcoholysis of acetates (**1a–3a**)

all cases. Indeed, either the nature of the nucleophile or the hydrophobicity of the solvent modulate the reactivity of *CAL-B* catalyzed deacetylation of (**1a**) ($18\% < C < 47.8\%$). This is probably due to the addition of molecular sieves which reduces the amount of water introduced by the solvent, the reagents or the immobilized enzyme. This limits the competition between nucleophiles present in the reaction suspension: alcohol and water. The highest conversion was achieved using ethanol in DIPE: $C = 47.8\%$ (entry 3). With the primary acetyl acceptor, *CAL-B* reactivity depends on the length of the alkyl radical. The same effect, was recently reported in the course of the enzymatic esterification of mandelic acid [43]. This effect is more important in toluene (entries 2–5 vs. 10–13). Using the tertiary alcohol, the reaction rate was markedly decreased (entries 8, 16), it must be underlined, that the best results were recorded with the primary and secondary alcohols.

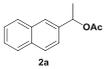
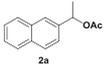
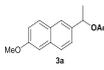
Furthermore, as shown in the results depicted in Table 2 the alcoholysis of acetates (**2a–3a**) presents similarities with those obtained with (**1a**). With acetates (**2a**) and (**3a**), the optimal conversions were obtained using 2-BuOH in DIPE and with MeOH in toluene [entries 22, 24 for (**2a**) and entries 36, 38 for (**3a**)]. These results indicate a significant dependence $\langle\langle$ acetyl acceptor/hydrophobicity of solvent $\rangle\rangle$ for the catalytic deacetylation catalyzed by *CAL-B* (Fig. 1).

3.3 Deacetylation via *CAL-B* Alcoholysis of Some Acetate Precursors of Drugs (**1a–7a**)

In order to examine if the promising results obtained with acetates (**1a–3a**) could be extended to a wider scope of substrate, we have decided to test the same experimental conditions with benzylic acetates of well-known pharmaceutical interest. With the suitable deacetylation conditions above described, we have performed a series of reactions on racemic acetates (**1a–7a**), with 2-BuOH in DIPE and methanol in toluene. The enantiomeric excesses of the recovered acetates and the produced alcohols were evaluated by chiral chromatography. The isolated chemical yields of products were measured after separation by chromatography on silica gel. The results are collected in Table 3.

The data from Table 3 show that *CAL-B* catalyzed alcoholysis of racemic acetate (**1a–7a**) in organic medium is highly enantioselective. The conversion rates vary between $40\% < C < 48\%$ and $E > 500$ under the tested reaction conditions. The *CAL-B* reactivity is modulated by the combination of two factors: the nature of alcohol (ROH) and the hydrophobicity of the solvent used for the enzymatic catalytic deacetylation. The lipase produced the (*R*)-alcohols enantiomerically pure in satisfying isolated chemical yields. These results validate the efficiency of our

Table 2 Enzymatic alcoholysis of acetates (**1a–3a**) with different nucleophiles in the presence of molecular sieves 4 Å

Entry	Substrate ^a	R-OH	Solvent (logP)	Ee _(S) (%) ^b	Ee _(P) (%) ^b	C ^c	E ^c
1		–	DIPE	14.6	99.9	12.7	>500
2		MeOH	(1.9)	83.4	99.9	45.5	>500
3		EtOH		91.6	99.9	47.8	>500
4		<i>n</i> -PrOH		84.8	99.9	45.9	>500
5		<i>n</i> -BuOH		58.5	99.9	36.9	>500
6		2-PrOH		84.8	99.9	45.9	>500
7		2-BuOH		78.7	99.9	44.1	>500
8		<i>t</i> -BuOH		23.5	99.9	19.0	>500
9		–	PhMe		11.4	99.9	10.2
10	MeOH	(2.5)	73.8	99.9	42.5	>500	
11	EtOH		70	99.9	41.2	>500	
12	<i>n</i> -PrOH		62.9	99.9	38.6	>500	
13	<i>n</i> -BuOH		22	99.9	18.0	>500	
14	2-PrOH		66.7	99.9	40.0	>500	
15	2-BuOH		68.2	99.9	40.6	>500	
16	<i>t</i> -BuOH		22.4	99.9	18.3	>500	
17		MeOH	DIPE	42	99.9	29.6	>500
18		EtOH	(1.9)	50.9	99.9	33.7	>500
19		<i>n</i> -PrOH		38.8	99.9	28.0	>500
20		<i>n</i> -BuOH		24.1	99.9	19.4	>500
21		2-PrOH		42.2	99.9	29.7	>500
22		2-BuOH		79.7	99.9	44.4	>500
23		<i>t</i> -BuOH		45.6	99.9	31.3	>500
24		MeOH	PhMe	65.9	99.9	39.7	>500
25		EtOH	(2.5)	31.5	99.9	24.0	>500
26		<i>n</i> -PrOH		19.8	99.9	16.5	>500
27		<i>n</i> -BuOH		25.9	99.9	20.6	>500
28		2-PrOH		37	99.9	27.0	>500
29	2-BuOH		62.4	99.9	38.4	>500	
30	<i>t</i> -BuOH		18.4	99.9	15.6	>500	
31		MeOH	DIPE	–	–	NR ^d	–
32		EtOH	(1.9)	17.1	99.9	14.6	>500
33		<i>n</i> -PrOH		20.8	99.9	17.2	>500
34		<i>n</i> -BuOH		25.8	99.9	20.5	>500
35		2-PrOH		63.6	99.9	38.9	>500
36		2-BuOH		83.4	99.9	45.5	>500
37		<i>t</i> -BuOH		49.8	99.9	33.3	>500
38		MeOH	PhMe	81.8	99.9	45.0	>500
39		EtOH	(2.5)	55	99.9	35.5	>500
40		<i>n</i> -PrOH		13	99.9	11.5	>500
41		<i>n</i> -BuOH		25.2	99.9	20.1	>500
42		2-PrOH		69.9	99.9	41.2	>500
43		2-BuOH		56.7	99.9	36.2	>500
44		<i>t</i> -BuOH		49.1	99.9	33.0	>500

^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 2 mmol of alcohol, 12 mg of *CAL-B*, 60 mg of MS 4 Å in 2 mL of organic solvent at 40 °C

^b Enantiomeric excess of recovered alcohols and remaining acetates are measured by chiral GC ($ee = |R-S| / |R+S|$)

^c Conversion: $C = ee_S / ee_P + ee_S$; Selectivity: $E = \ln [(1-C)(1-ee_S)] / \ln [(1-C)(1+ee_S)]$. [25, 26]

^d No reaction

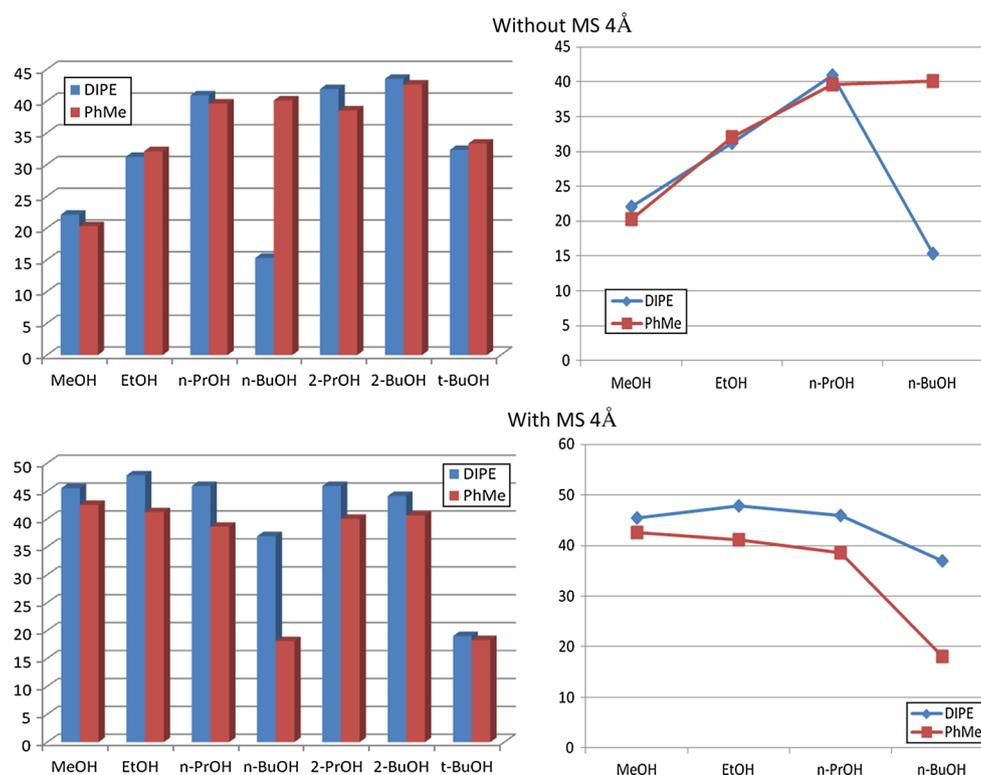
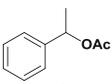
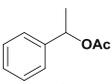
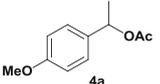
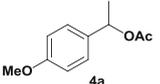
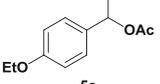
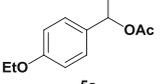
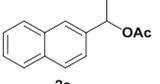
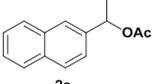
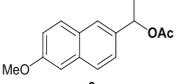
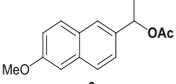


Fig. 1 Influence of the carbon chain length of the alcohol on conversion for the enzymatic alcoholysis of (**1a**)

Table 3 Scope of enzymatic alcoholysis of benzylic acetates (**1a–7a**)

Entry	Substrate ^a	ROH	Solvent (logP)	Ee _(S) (%) ^b Yield (%) ^d	ee _(P) (%) ^b	Yield (%) ^d	C ^c	E ^c
1		2-BuOH	DIPE (1.9)	78.7 (36.6)	99.9 (38.9)		44.1	>500
2		MeOH	PhMe (2.5)	73.8 (35.5)	99.9 (25.6)		42.5	>500
3		2-BuOH	DIPE (1.9)	76.9 (44.5)	99.9 (21.3)		43.5	>500
4		MeOH	PhMe (2.5)	82.3 (36.5)	99.9 (32.6)		45.2	>500
5		2-BuOH	DIPE (1.9)	78.9 (30.8)	99.9 (19.5)		44.1	>500
6		MeOH	PhMe (2.5)	90.5 (18.8)	99.9 (33.5)		47.5	>500
7		2-BuOH	DIPE (1.9)	79.7 (43.3)	99.9 (21.9)		44.4	>500
8		MeOH	PhMe (2.5)	65.9 (49.6)	99.9 (34)		39.8	>500
9		2-BuOH	DIPE (1.9)	83.4 (20.4)	99.9 (34.9)		45.5	>500
10		MeOH	PhMe (2.5)	81.8 (52.2)	99.9 (42.8)		45.0	>500
11		2-BuOH	DIPE (1.9)	75.8 (16.2)	99.9 (30.5)		43.1	>500
12		MeOH	PhMe (2.5)	77.3 (44.8)	99.9 (41.6)		43.6	>500
13		2-BuOH	DIPE (1.9)	73.7 (50.8)	99.9 (37.1)		42.5	>500
14		MeOH	PhMe (2.5)	57.3 (48.9)	99.9 (24.9)		36.5	>500

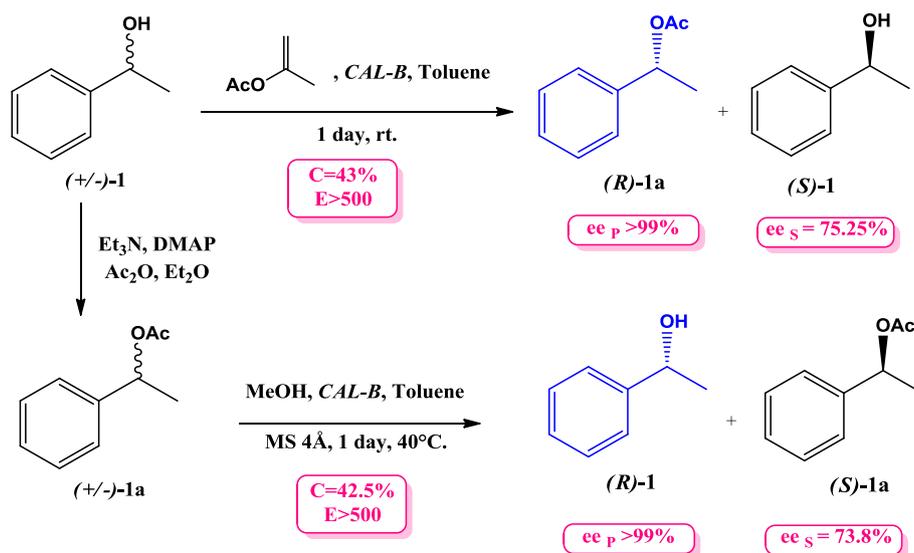
^a Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 2 mmol of alcohol, 12 mg of CAL-B, 60 mg of MS 4 Å in 2 mL of organic solvent at 40 °C

^b Enantiomeric excess of recovered alcohols and remaining acetates are measured by chiral GC (ee = |R–S|/|R + S|)

^c Conversion: C = ee_S/ee_P + ee_S; Selectivity: E = Ln [(1–C) (1–ee_(S))]/Ln [(1–C) (1 + ee_(S))]. [25, 26]

^d Isolated yields

Scheme 4 Enzymatic transesterification versus alcoholysis of (**1a**)



deacetylation conditions for enzymatic alcoholysis of 1-phenylethyl acetate (**1a**).

A comparison of the results using *CAL-B* as an efficient biocatalyst in both alcoholysis of phenylethyl acetate (**1a**) and transesterification of the corresponding alcohol (**1**) with isopropenyl acetate reveals a perfect enantio-complementary of those reactions in favor of the (*R*)-enantiomer (Scheme 4). Moreover, the alcoholysis reaction appears as an interesting alternative path, complementary to the hydrolysis for resolving acetates. This study contributes to the understanding of factors that significantly affect play a role in the *CAL-B* catalyzed alcoholysis.

4 Conclusions

We have examined the effect of two important parameters on the enzymatic alcoholysis of a set of benzylic acetates using *Candida antarctica* lipase (*CAL-B*): the nature of the nucleophile and the hydrophobicity of the solvent. We have optimized these parameters and achieved a highly selective enzymatic deacetylation reaction. In all cases, high selectivity factor values $E > 500$, with (*R*)-enantiopreference were recorded. *CAL-B* reactivity is dependent upon the nature of nucleophile (ROH) whatever the solvent employed. As expected, the primary and secondary alcohols exhibit the best conversion rates $C > 40\%$, and selectivities $E > 500$ in kinetic resolution via alcoholysis by the *CAL-B* lipase in both explored solvents. The addition of molecular sieves 4 \AA decreasing the amount of water, enhances the enzymatic reactivity. The best results were recorded using 2-BuOH in DIPE and MeOH in toluene, indicating dependence (acetyl acceptor/hydrophobicity of solvent). The novelty of this study is represented

by the results obtained by *t*-butanol used as nucleophile in the alcoholysis of acetates, which shows the influence of alcohol structure on conversion. The results of the alcoholysis catalyzed by *CAL-B* of a series of benzylic acetates show thus a perfect enantio-complementary with the enzymatic transesterification studied by our team.

Finally, the improved alcoholysis conditions described appear to be an efficient pathway for enzymatic deacetylation of acetates which offers many opportunities for development, particularly interesting to insert in deracemization processes.

Acknowledgments Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, FNR 2000) and ANDRU (PNR) are gratefully acknowledged for financial support of this work. Prof. Olivier Riant (IMCN/Louvain Catholic University -UCL- Louvain-La-Neuve, Belgium) is acknowledged for his help and the welcome of Amna ZAÏDI and Mounia MERABET to perform specific analyses.

References

- Anastas PT, Warner JC (1998) Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press, New York
- Anastas PT, Li PT (2010) In: Yukawa H, Blaschek H (eds) Water as a green solvent. Wiley, New York
- Anastas PT, Eghbali N (2010) Chem Soc Rev 39:301
- Trost BM (1995) Angew Chem Int Ed 107:285
- Carrea G, Riva S (2000) Angew Chem Int Ed 39:2226
- Faber K (2011) Biotransformations in organic chemistry, 6th edn. Springer, Berlin
- Patel RN (2003) Curr Opin Drug Discov Dev 6:902
- Patel RN (2008) Coord Chem Rev 252:659
- Ahmed M, Kelly T, Ghanem A (2012) Tetrahedron 68:6781
- Pan J, Yu HL, Xu JH, Lin GQ (2011) Advances in biocatalysis: enzymatic reactions and their applications. In: Ma S (ed) Asymmetric catalysis from a Chinese perspective. Springer, Berlin, pp 67–103
- Aribi-Zouieche L, Fiaud JC (2000) Tetrahedron Lett 41:4085

12. Bidjou C, Aribi-Zouioueche L, Fiaud JC (2002) *Tetrahedron Lett* 43:3025
13. Bora PP, Bez G, Anal JMH (2011) *J Mol Catal B* 72:270
14. Kumaragura T, Fadnavis NW (2012) *Tetrahedron* 23:775
15. Bouzemi N, Grib I, Houiene Z, Aribi-Zouioueche L (2014) *Catalysts* 4:215
16. Turner NJ (2003) *Curr Opin Biotechnol* 14:401
17. Kamal A, Azhar MA, Krishnaji T, Malik MH, Azeza S (2008) *Coord Chem Rev* 252:569
18. Merabet-Khelassi M, Vriamont N, Riant O, Aribi-Zouioueche L (2011) *Tetrahedron* 22:1790
19. Bouzemi N, Debbeche H, Aribi-Zouioueche L, Fiaud JC (2004) *Tetrahedron Lett* 45:627
20. Merabet-Khelassi M, Bouzemi N, Fiaud JC, Riant O, Aribi-Zouioueche L (2011) *C R Chim* 14:978
21. Merabet-Khelassi M, Aribi-Zouioueche L, Riant O (2008) *Tetrahedron* 19:2378
22. Merabet-Khelassi M, Aribi-Zouioueche L, Riant O (2009) *Tetrahedron* 20:1371
23. Merabet-Khelassi M, Houiene Z, Aribi-Zouioueche L, Riant O (2012) *Tetrahedron* 23:823
24. Houiene Z, Merabet-Khelassi M, Bouzemi N, Aribi-Zouioueche L, Riant O (2013) *Tetrahedron* 24:290
25. Chen CS, Fujimoto Y, Sih CJ (1982) *J Am Chem Soc* 104:7294
26. Kagan HB, Fiaud JC (1998) Kinetic resolution. In: Eliel EL, Wilen SH (eds) *Topics in stereochemistry*, vol 18. Wiley & Sons, New York, pp 249–330
27. Baldessari A, Iglesias LE (2012) *Methods Mol Biol* 861:457
28. Zhang J, Wu J, Yang L (2004) *J Mol Catal B* 31:67
29. Tosa M, Pilbak S, Moldovan P, Paizs C, Szatzker G, Szakacs G, Novak L, Irimie FD, Poppe L (2008) *Tetrahedron* 19:1844
30. Kawasaki M, Nakamura K, Kawabata S (1999) *J Mol Catal B* 6:447
31. Zhou R, Xu JH (2005) *Biochem Eng J* 23:11
32. Kato K, Gong Y, Irimescu R, Saito T, Yokogawa Y (2002) *Biotechnol Lett* 24:1623
33. Schieweck F, Altenbach HJ (1998) *Tetrahedron* 9:403
34. Bencze LC, Paizs C, Tos MI, Trif M, Irimie FD (2010) *Tetrahedron* 21:1999
35. Brem J, Pilbak S, Paizs C, Banoczi G, Irimie FD, Tos MI, Poppe L (2011) *Tetrahedron* 22:916
36. Faigl F, Kovacs E, Balogh D, Holczbauer T, Czugler M, Simandi B (2014) *Central Eur J Chem* 12(1):25
37. Kitaguchi H, Fitzpatrick PA, Huber JE, Klivanov AM (1989) *J Am Chem Soc* 111:3094
38. Woudenberg-van Oosterom M, van Rantwijk F, Sheldon RA (1996) *Biotechnol Bioeng* 49:328
39. Fan Y, Xie Z, Zhang H, Qian J (2011) *Kinet Catal* 52(5):686
40. Suan CL, Sarmidi MR (2004) *J Mol Catal B* 28:111
41. Zilbeyaz K, Taskin M, Kurbanoglu EB, Kurbanoglu NI, Kilic H (2010) *Chirality* 22:543
42. Sheldon RA (1996) *J Chem Tech Biotechnol* 67:1
43. Pan Y, Tang K-W, He C-Q, Yi W, Zhu W, Liu Y-N (2014) *Biotechnol Appl Biochem* 61:274