

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة
Année 2008

Faculté des Sciences
Département de Chimie

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE BADJI MOKHTAR-ANNABA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité: Chimie Organique

Par

Fatiha BENAMIA

**ETUDE ET MODELISATION DE LA RELATION ENTRE
L'ACTIVITE ET L'ENANTIOSELECTIVITE DES LIPASES
ET LA NATURE DU SOLVANT ORGANIQUE PAR
UNE APPROCHE MULTIPARAMETRIQUE**

Directeur de thèse: Zeineddine DJEGHABA Professeur U. ANNABA

Soutenu devant la commission d'examen

Président : Abedlkrim GOUASMIA Professeur C. U. TEBESSA

Examineur: Sylvain LAMARE Professeur U. ROCHELLE

Abedelhafid DJEROUROU Professeur U. ANNABA

Ali TAHAR Professeur U. ANNABA

Fouad FERKOUS Professeur U. ANNABA

RESUME

Les biotransformations font partie actuellement des méthodologies auxquelles fait appel le chimiste pour accéder à de nombreux composés relevant de domaines divers et variés. Parmi les biocatalyseurs, les lipases (EC 3.1.1.3) sont les plus largement utilisées et ce, en raison de leur faible coût, de leur facilité de manipulation et ne nécessite pas de co-facteur pour leur fonctionnement. Un autre avantage, est celui de leur compatibilité avec les solvants organique.

En effet, que ce soit dans les réactions d'hydrolyse ou de transestérification, la présence d'un solvant organique ne perturbe pas le pouvoir catalytique des lipases, il peut même présenter des avantages, en termes d'activité et de sélectivité.

Notre travail porte sur l'étude de l'influence de la présence des solvants organiques sur le fonctionnement des lipases. Nous avons cherché à établir des modèles permettant de décrire l'influence de la nature des solvants organiques sur le fonctionnement du biocatalyseur. Pour ce faire, nous avons décidé de faire appel aux méthodes statistiques d'analyse des données qui permettent de calculer des modèles mathématiques capables d'expliquer la relation entre la nature des solvants et le comportement de l'enzyme. A travers la littérature consacrée au sujet, nous avons constaté que le paramètre physico-chimique le plus employé est LogP. Cependant, à notre avis un seul paramètre ne peut à lui tout seul décrire l'ensemble des phénomènes qui pourraient apparaître dans un milieu réactionnel aussi complexe et non conventionnel pour le biocatalyseur.

C'est ainsi que nous avons abordé cette problématique par une approche multiparamétrique afin de corrélérer la nature du solvant avec l'activité et l'énantiosélectivité des lipases employées dans cette étude. Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été utilisés comme descripteurs et les équations des modèles auxquels nous avons abouti, intègrent, en majorité, deux de ces paramètres.

Mots clé : Lipase – Effet de solvant – Activité – Enantiosélectivité – Modélisation.

ABSTRACT

Biotransformations, has been actively studied as a way to produce several substances relevant to various domain. Among those enzymes, lipases (glycerol ester hydrolases E.C.3.1.1.3) are widely used as versatile biocatalysts, because they are not expensive and easy to manipulate. Another advantage is their compatibility with organic solvents. So the use of lipases either in hydrolysis or transesterification reactions, with the presence of organic solvent, do not disturb their catalytic process, in contrary they can presented a lot of advantages in term of activity and selectivity.

In this work we have studied, the influence of organic solvents on the functioning of lipases. Where, we have researched to established models to discrib the effect of solvents on the lipase behaviour. To calculate these models we have used the statistical processing of data obtained experimentally. Through the literature consecrated to this subject, it have been defined that, $\text{Log}P$ is the most frequently used parameter to describe quantitatively the influence of the nature of solvent on the enzymatic reaction. But, in such a complex system, only one physico- chemical parameter cannot with him alone describe the whole of the properties of solvent and effects which it can have on the progress of the reaction. Thus, for a better correlation between the nature of solvent and the enzymatic activity, a multi-parametric approach is necessary.

Our obectif is approched this problematical, in order to correlate the nature of solvent with activity and enantioselectivity of lipases employed in this study. So several physica-chemical parameters are used like descriptors and the equations of models which results integrate in majority to the two of these parameters.

Key word: Lipase – Solvent effect – Activity – Enantioselectivity – Modelling.

ملخص

تعتبر التحولات البيولوجية حاليا من بين المنهجيات المتعددة التي تستدعي تدخل الباحث الكيميائي للوصول إلى عدد كبير من مركبات مستمدة من عدة ميادين مختلفة في الكيمياء. بين البيولوجية الحفازة، الليباز (EC 3.1.1.3) هي الأكثر استخداما على نطاق واسع، وأنه بسبب تكلفتها المنخفضة، وسهولة التعامل ولا تتطلب المشارك عامل لتشغيلها في الواقع، سواء في ردود فعل التحلل أو tansestérification ، وجود المذيبات العضوية لا يزجج السلطة الحفاز الليباز، فإنه قد يكون من المزايا، من حيث النشاط والانتقائية.

يركز عملنا على دراسة تأثير وجود المذيبات العضوية على تشغيل الليباز. سعينا إلى تطوير نماذج لوصف تأثير طبيعة المذيبات العضوية على سير العمل في المتحفز الحيوي. للقيام بذلك، قررنا استخدام الأساليب الإحصائية لتحليل البيانات التي تقوم بحساب نماذج رياضية قادرة على شرح العلاقة بين طبيعة المذيبات وسلوك الانزيم. من خلال ما كتب حول هذا الموضوع، وجدنا أن الأكثر شيوعا المعلمة الفيزيائية والكيميائية هي LogP. ومع ذلك، في رأينا معلمة واحدة يستطيع وحده أن يصف كل الظواهر التي قد تظهر في وسط التفاعل المعقد وغير تقليدية لالمتحفز الحيوي. لذا تناولنا هذه المشكلة عن طريق نهج متعدد المعاملات لربط طبيعة المذيب مع النشاط و التماثلية لليباز المستخدمة في هذه الدراسة. واستخدمت العديد من المعلمات الفيزيائية كما واصفات والمعادلات من النماذج التي أشرنا صلت، دمج، في الغالب، كل من هذه المعلمات

الكلمات المفتاحية: الليباز -تأثير المذيبات -النشاط - التماثلية - التصميم.

Liste des schémas

Schéma	Titre	Page
01	Avantage de la catalyse enzymatique par rapport à la catalyse chimique	4
02	Stabilisation des différents états de transition intermédiaires lors de l'hydrolyse d'une liaison peptidique par l' α -chymotrypsine.	5
03	Structure tertiaire d'une protéine	6
04	Mécanisme d'intervention de la triade (Ser-Hist-Asp) lors de l'hydrolyse d'un ester	9
05	Biotransformations d'un ester en milieu organique	10
06	Représentation hyperbolique de Michaelis-Menten	12
07	Représentation de Lineweaver et Burke	13
08	Courbe de l'excès énantiomérique du substrat et celui du produit en fonction du taux de conversion	15
09	Courbe des énergies libres d'activation (énergie de Gibbs) $\Delta_{R,S}\Delta G^\ddagger$, dans une réaction de dédoublement enzymatique qui favorise l'énantiomère R	15
10	Hydrolyse régioselective du 1,2,3,5-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranose 1, en présence d'acide et catalysée par les lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa	19
11	Hydrolyse régioselective 1,2,3,4,6,-pent- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucoopyranose 4, en présence d'acide et catalysée par les lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa	20
12	Hydrolyse enzymatique du diacétate- α,α' -alcène	21
13	Hydrolyse enantioselective du (<i>R,S</i>)-2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene 1, catalysée par une série de lipases en présence du toluène.	22
14	Hydrolyse enzymatique du DL-menthyl acétate 1 en présence de la lipase de Burkholderia cepacia, en présence de co-solvants organiques.	23
15	Deacétylation du composé 1,3-di- <i>O</i> -propanoylresorcinols 1 en présence de la lipase de candida antartica B (CAL-B). Avec R= Et ; (CH ₃) ₃ CCH ₂ C (CH ₃) ₂ ; Bn ; Cl ; Br	24
16	Synthèse du mono ester de la pyridoxine 1, en présence de La lipase de candida antartica B (CAL - B)	25

Schéma	Titre	Page
17	Amidation régioselective des deux énantiomères du diesters d'acide glutamique avec la fonction amine bloquée (S- <u>1</u> et R- <u>1</u>), catalysé par la lipase de Candida antarctica B immobilisée	26
18	Amidation régioselective de la pyrimidine-3,5-diamino-2, 3,5-trideoxy nucleosides <u>1</u> , catalysé par la lipase de candida antarctica B immobilisée (CAL-B) et la lipase de Pseudomonas cepacia C (PSL-C).	27
19	Transesterification <i>R,S</i> -(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol <u>1a</u> et le <i>R,S</i> -(Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol <u>1b</u> , dans une série de solvants organiques	28
20	Estérification de l'acide (<i>RS</i>)-2-(4-chlorophenoxy) propionique <u>1</u> , catalysée par la lipase de Carica papaya (CPL) en présence de solvants organiques.	29
21	Transesterification du 2- <i>O</i> -benzylglycerol <u>1</u> , avec l'acétate de vinyle en testant la réaction dans une dizaine de solvants organique.	31
22	Transesterification du méthylacétoacétate <u>1</u> avec le n-butanol, en présence de solvant organique	32
23	Transesterification enantioselective du (<i>R,S</i>)-1-phenylethanol <u>1</u> en présence de solvants organique, catalysée par la lipase de Pseudomonas cepacia (PSL) immobilisée	33
24	Transestérification du méphénésine <u>1</u> et chlorphénésine <u>2</u>	34
25	Résolution du <i>S</i> -naproxène par la CPL	36

Liste des Tableaux (Partie I)

Tableau	Titre	Page
01	Classification des enzymes	7
02	Hydrolyse régioselective du 1,2,3,5-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranose 1 , catalysée par des lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa.	19
03	Hydrolyse Enzymatique du 1,2,3,5-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranose 1 , catalysée par la CRL et PFL immobilisées sur Octyl agarosa et Glutaraldehyde	20
04	Hydrolyse régioselective du diacétate- α,α' -alcène, en présence de lipases	21
05	Hydrolyse énantioselective du (<i>R,S</i>)-2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene (1), catalysée par des lipases en présence de toluène comme co-solvant.	23
06	Estérification de la pyridoxine dans diverses conditions	25
07	Transesterification <i>R,S</i> -(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol 1a et le <i>R,S</i> - (Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol 1b , dans une série de solvants organiques	29
08	Influence du solvant sur les performances de la lipase de <i>Carica papaya</i> (CPL), dans l'estérification du de l'acide (<i>R,S</i>)-2-(4-chlorophenoxy) propionique 1 .	30
09	L'influence du solvant sur l'activité de la lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CAL-B) lors de l'alcoolyse du méthylacétoacétate 1 avec le n-butanol, en présence de solvant organique.	32
10	Effet de solvant sur les performances catalytique de la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (PLS) immobilisée, dans la réaction de transesterification énantioselective du (<i>R,S</i>)-1-phenyléthanol 1 en présence de solvants organique.	33
11	Effet de solvant sur la régioselectivité de la lipase de <i>Candida antarctica</i> B immobilisée sur résine acrylique lors de l'alcoolyse du méphénésine 1 et chlorphénésine 2	35

Liste des Tableaux (Partie II)

Tableau	Titre	Page
01	Analyse de la variance d'une régression linéaire multiple avec un terme indépendant.	45
02	Solubilité dans l'eau des trois esters utilisés.	57
03	Valeurs des paramètres physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans les réactions d'hydrolyse enzymatique et les réactions de transésterification des trois esters étudiés.	58
04	Valeurs des activités enzymatiques (y) exprimées en mM/min/g.	59
05	Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés dans le cas de l'hydrolyse par la lipase CRL.	60
06	Matrice de corrélation calculée entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la lipase CRL	61
07	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité (y_{c1}) dans le cas de l'hydrolyse par la CRL du butyrate d'éthyle.	62
08	Modèles calculés pour l'activité y_{c2} dans le cas de l'hydrolyse par CRL de l'acrylate d'éthyle.	62
09	Modèles calculés pour l'activité y_{c2} dans le cas de l'hydrolyse par CRL de l'acrylate d'éthyle.	63
10	Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus pour l'activité y_{c2} dans le cas de l'hydrolyse par CRL.	64
11	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{c3} dans le cas de l'hydrolyse par CRL de l'acétoacetate d'éthyle.	65
12	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{c3} pour chaque groupe de solvants.	65
13	Paramètres statistiques de la validation croisée des meilleurs modèles obtenus pour l'activité y_{c3} dans chaque groupe des solvants dans le cas de l'hydrolyse par CRL.	66
14	Modèles calculés par la méthode de régression linéaire multiple (pas à pas) avec les trois esters dans le cas de la CRL.	67

Tableau	Titre	Page
15	Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables explicatives utilisés dans le cas de la LPP.	68
16	Matrice de corrélations calculées entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la LPP.	69
17	Modèles calculés par la méthode de régression linéaire multiple (pas à pas) avec les trois esters dans le cas de la LPP.	70
18	Valeurs des activités enzymatiques exprimées en mM/min/g.	74
19	Paramètres statistiques de base calculés pour les variables utilisés dans le cas de la CALB.	75
20	Matrice de corrélations calculées entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la CALB. Matrice de corrélations calculées entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la CALB.	76
21	Modèle calculé par la méthode de régression linéaire multiple (pas à pas) pour l'activité y_{SP1} après élimination de 7 solvants aberrants.	77
22	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CALB.	78
23	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CALB.	78
24	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans la transesterification par CALB.	79
25	Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CALB.	79
26	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP3} pour les vingt-cinq solvants dans le cas de la CALB.	81
27	Modèle sélectionné par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CALB, après suppression des quatre données aberrantes.	81
28	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CALB.	82
29	Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CALB.	83
30	Résumé des modèles calculés par la stepwise avec les trois esters pour la transesterification en présence de la CALB	84
31	Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés dans le cas de la transesterification par la lipase CRL.	85

Tableau	Titre	Page
32	Matrice de corrélation calculée entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la transestérification par la lipase CRL	86
33	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C1} dans la transestérification par la CRL.	87
34	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C1} pour chaque groupe de solvants dans la transestérification par la lipase CRL.	88
35	Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus par la stepwise pour l'activité y_{C1} dans la transestérification par la lipase CRL	88
36	Meilleurs modèles obtenus et paramètres statistiques correspondants calculés pour y_{C2} avec les vingt cinq solvants dans le cas de l'acrylate d'éthyle, catalysé par la CRL.	89
37	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C2} dans la transestérification de l'acrylate d'éthyle par la CRL.	90
38	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C2} dans la transestérification par la lipase CRL.	90
39	Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus par la méthode pas à pas de la régression linéaire multiple pour l'activité y_{C2}	91
40	Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C3} dans le cas de la transestérification par la lipase CRL	92
41	Modèles calculés par la stepwise pour chaque groupe solvants dans le cas de la transestérification par la lipase CRL.	92
42	Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus par la méthode pas à pas de la régression linéaire multiples pour l'activité y_{C3}	93
43	Modèles calculés par la stepwise pour chaque groupe solvants dans le cas de la transestérification par la lipase CRL.	93
44	Récapitulatif des modèles calculés pour les deux lipases CRL et CAL-B	94
45	Résolution cinétique du butyrate de sec-butyl par transestérification par la CAL-B. Valeurs du facteur d'énantiosélectivité E, des excès énantiomériques et du taux de conversion.	99

Tableau	Titre	Page
46	Paramètres physico-chimiques des solvants utilisés.	100
47	Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés.	101
48	Matrice de corrélations entre les cinq variables deux à deux pour les douze solvants.	101
49	Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés.	102
50	Matrice de corrélations calculées entre les cinq variables deux à deux pour les douze solvants.	103
51	Modèles calculés par la stepwise pour la réponse 1/E (y_1)	104
52	Modèles calculés par la validation croisée, pour la réponse 1/E (y_1).	104
53	Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus pour la réponse 1/E (y_1).	105
54	Modèle calculé et validé pour la réponse 1/E (y_1).	105

Liste des abréviations

Afin de faciliter la rédaction, nous avons adopté quelques abréviations pour désigner les enzymes et les produits utilisés au cours de ce travail :

CPL : lipase de *Carica papaya*

PSL-C : lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des particules de céramiques

PSL-D : lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des masses diatomique de terre

AL : lipase de *Candida rugosa* du type VII

CCL : lipase de *Candida cylindracea*

NOVOZYME 525 L : lipase de Microorganisme de *Aspergillus oryzae*

RML : lipase de *Rhizomucor miehei*.

PSL : lipase de *Pseudomonas cepacia*, Amano

PFL : lipase de *Pseudomonas fluorescens*

MML : lipase de *Mucor miehei*

HLL : lipase de *Humicola lanuginosa*

AOL : lipase d'*Aspergillus oryzae*

CAL-A : lipase de *Candida antartica* A.

CRL : lipase du *Candida rugosa*

LPP : lipase pancréatique de porc

CAL-B : lipase de *Candida antartica* B

DMFA : diméthyle sulfamide

CCl₄ : tétrachlorure de méthyle

THF : tétrahydrofuranne

t-BuOMe: tert-butyl méthyl ether

CH₂Cl₂ : chlorure de méthylène

D'autres abréviations ont été utilisées :

R, S : énantiomères Rectus et Sinister

$\Delta_{R-S}\Delta G^\#$: la différence des énergies libre de Gibbs pour les deux énantiomères R et S

$\Delta G_R^\#$: énergie libre de Gibbs pour l'énantiomère R

$\Delta G_S^\#$: énergie libre de Gibbs pour l'énantiomère S

n : nombre de mole

R : constante des gaz parfait (8,31 J.mol.K⁻¹)

T : température

E : facteur d'énantiosélectivité
 e_{es} : excès énantiomérique du substrat
 e_{ep} : excès énantiomérique du produit
 C : conversion
 LogP : coefficient de partage (eau/n-octanol) d'un solvant
 E_T^N : paramètre de Reichardt-Demroth normalisé (KJ/mol)
 δ : paramètre de solubilité de Hildebrand ($\text{Mpa}^{1/2}$)
 n_D : indice de réfraction
 b_0 : coefficient constant représente la valeur moyenne de la réponse
 b_i : coefficient exprimant l'effet de chaque facteur "i"
 y : la variable a expliquée ou réponse
 x : la variable qui explique y
 r : coefficient de corrélation
 R^2 : coefficient de détermination
 R_{adj}^2 : coefficient de détermination ajusté
 $R_{préd}^2$: coefficient de détermination de prédiction
 F : coefficient de Fisher
 P : valeur de la probabilité
 $S_{y,x}$: l'écart type résiduel
 PRESS : somme des carrés des erreurs de prédiction
 \bar{e}_q : moyenne quadratique des résidus
 \hat{y} : valeur de réponse estimée
 \bar{y} : moyenne arithmétique des valeurs estimées
 RMN^1H : résonance magnétique nucléaire
 CPG : chromatographie phase gazeuse
 K_M : constante de Michaelis-Menten
 K_{cat} : nombre de Turnover
 TS : état de transition
 ES\&EP : complexe de Michaelis-Menten

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Première partie	
CHAPITRE I. GENERALITE SUR LES ENZYMES.....	3
I- INTRODUCTION.....	4
II- STRUCTURE DES ENZYMES.....	6
III- CLASSIFICATION DES ENZYMES.....	7
IV- LES HYDROLASES – CAS DES LIPASES.....	8
IV-1- Mécanisme d’action des lipases.....	8
IV-2-Aspect cinétique.....	10
IV-2-1- Cinétique de Michaelis-Menten.....	10
IV-2-2- Modélisation de l’énantiosélectivité.....	13
CHAPITRE II. APPLICATIONS DES LIPASES EN SYNTHESSES ORGANIQUE.....	17
I- INTRODUCTION.....	18
II- REACTIONS EN MILIEU AQUEUX.....	18
II-1-Régiosélectivité.....	18
II-2-Stéréosélectivité.....	22
III- REACTIONS EN MILIEU ORGANIQUE.....	24
III-1-Régiosélectivité.....	24
III-2-Stéréosélectivité.....	27
IV- Effets des solvants.....	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
Deuxième partie	
CHAPITRE I. METHODES D’ANALYSES STATISTIQUES UTILISEES.....	40
I- ANALYSE STATISTIQUE UNIVARIEE.....	41
II- ANALYSE STATISTIQUE BIVARIEE.....	41
III- ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE.....	42
III-1- Base théorique de la régression linéaire multiple.....	42
III-2- Méthodes de sélection des variables explicatives.....	46
III-3- Calcul des modèles.....	47
a) Le coefficient de détermination R^2	47
b) Le coefficient de détermination ajusté R^2_{adj}	48

c) La valeur de Fobs de Fisher.....	48
d) La probabilité P.....	48
e) L'écart type résiduel ($s_{y,xi}$).....	49
III-4- Validation des modèles calculés.....	50
a) Introduction.....	50
b) Les sources d'erreur de prédiction.....	50
c) Les paramètres de mesure de l'erreur de prédiction.....	50
	50
CHAPITRE II. INFLUENCE DES CO-SOLVANTS ORGANIQUES SUR L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES REACTIONS D'HYDROLYSE.....	56
I- COLLECTE DES DONNEES.....	57
II- ANALYSES ET RESULTATS STATISTIQUE.....	60
II-1- Cas de la lipase CRL.....	60
II-1-1- L'analyse statistique univariée.....	60
II-1-2- Analyse statistique bivariée.....	60
II-1-3- Analyse statistique multivariée.....	61
II-2- Cas de la lipase LPP.....	67
II-2-1- Analyse statistique univariée.....	67
II-2-2- Analyse statistique bivariée.....	68
II-2-3- Analyse statistique multivariée.....	69
CHAPITRE III. INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES SUR L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION.....	72
I- COLLECTE DES DONNEES.....	75
II- ANALYSES ET RESULTATS STATISTIQUE.....	75
II-1-Cas de la lipase CAL-B.....	75
II-1-1- Analyse statistique univariée.....	76
II-1-2- Analyse statistique bivariée.....	77
II-1-3- Analyse statistique multivariée.....	85
II-2- Cas de la lipase CRL.....	85
II-2-1- Analyse statistique univariée.....	85
II-2-2- Analyse statistique bivariée.....	86
II-2-3- Analyse statistique multivariée.....	96
CHAPITRE IV. INFLUENCE DES SOLVANTS SUR L'ENANTIOSELECTIVITE.....	98

I- COLLECTE DES DONNEES.....	100
II- ANALYSE ET RESULTATS STATISTIQUES.....	100
II-1- Analyse statistique univariée.....	101
II-2-Analyse statistique bivariée.....	102
II-3-Analyse statistique multivariée.....	102
II-4- Recherche de modèles avec la variable dépendante 1/E.....	102
II-4-1- Analyse statistique univariée.....	103
II-4-2-Analyse statistique bivariée.....	103
II-4-3-Analyse statistique multivariée.....	107
CONCLUSION.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	112
Partie expérimentale.....	113
I- Techniques générales.....	113
1-Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹ H).....	113
2-Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	113
3-PH-metrie.....	113
II- Produits chimiques et enzymes.....	114
A)Synthèse.....	115
B) Enzyme.....	115
III- Réactions enzymatiques.....	115
1) Hydrolyse.....	115
2) Transesterification.....	115

INTRODUCTION

L'utilisation des enzymes en chimie organique est maintenant bien établie et les biotransformations sont devenues actuellement parmi les méthodologies auxquelles fait appel le chimiste pour accéder à de nombreux composés relevant de domaines aussi variés que ceux de la chimie fine, des médicaments, de la cosmétologie et de l'industrie agroalimentaire.

Parmi ces enzymes, les lipases (EC 3.1.1.3) sont largement employées aussi bien en milieu aqueux pour l'hydrolyse d'esters, qu'en milieu organique dans des réactions d'alcoolyse et d'aminolyse par exemple.

L'action des lipases intervient au niveau de l'interface phase organique (contenant le substrat)/phase aqueuse (contenant l'enzyme). Il a été montré que c'est à ce niveau que la lipase est plus active et que l'acte catalytique se produit. Cette activation interfaciale de l'enzyme est expliquée par des arrangements structuraux de la protéine au contact de l'interface facilitant alors l'accès du substrat au site catalytique.

Cette interface, qui est inévitablement affectée par la nature de la phase organique, a une grande influence sur les performances catalytiques de l'enzyme. Cependant, si de nombreux travaux, ayant trait aussi bien aux réactions en milieu aqueux que celles se déroulant en milieu organique, montrent que la présence d'un solvant organique dans le milieu réactionnel influe sur l'activité et sur la sélectivité des lipases, peu d'entre eux se sont intéressés à la nature de celle-ci, bien que ces dernières années, des recherches dans ce sens commencent à se développer. Par ailleurs, dans la description de la relation « solvant-activité (sélectivité) enzymatique », il est fait appel à quasiment un seul paramètre physico-chimique des solvants, à savoir $\text{Log}P$.

L'action d'un solvant dans un milieu réactionnel est le résultat de différents types d'interactions entre ce dernier et les entités présentes dans le milieu réactionnel. A fortiori, dans les réactions biocatalysées où ces interactions concernent en même temps le substrat et le biocatalyseur. Par conséquent, sachant qu'un seul paramètre physico-chimique ne peut à lui tout seul décrire l'ensemble des propriétés d'un solvant, surtout dans un système aussi complexe, il nous a semblé qu'il était plus judicieux de faire appels à d'autres descripteurs des solvants pour une meilleure compréhension de la relation « solvant-enzyme-substrat ».

C'est ainsi que nous avons décidé d'aborder cette problématique par une approche multiparamétrique quant à la nature des solvants.

Pour ce faire, nous avons fait appel aux méthodes statistiques d'analyse des données et aux moyens informatiques de calcul.

Nous avons choisi d'étudier l'influence des solvants dans le cas des réactions d'hydrolyse et dans celui des réactions de transestérification. Nous avons cherché à modéliser la relation de la nature du solvant avec l'activité et l'énantiosélectivité des lipases suivantes : lipase pancréatique de porc, lipase de *Candida rugosa* et la lipase immobilisée de *Candida antarctica* B.

Après avoir rappelé quelques propriétés générales des enzymes, les principales utilisations des lipases en synthèse organique et l'intérêt que peut avoir la présence d'un solvant dans les réactions biocatalysées, nous décrirons les méthodes statistiques de traitement des données utilisées et exposerons les résultats que nous avons obtenus.

Le plan de notre travail sera le suivant :

Première partie

Chapitre I : Généralités sur les enzymes

Chapitre II : Applications des lipases en synthèse organique

Deuxième partie

Chapitre I : Méthodes d'analyses statistiques utilisées

Chapitre II: Influence des co-solvants organiques sur l'activité lipasique dans les réactions d'hydrolyse.

Chapitre III: Influence des solvants organiques sur l'activité lipasique dans les réactions de transestérification.

Chapitre IV: Influence des solvants sur l'énantiosélectivité

CHAPITRE I
GENERALITES SUR LES ENZYMES

I- INTRODUCTION

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique remarquablement efficaces et douées d'une grande spécificité fonctionnelle. In vivo, elles interviennent dans tous les processus métaboliques de synthèse, de régulation, de reproduction et de dégradation et permettent à toutes ces réactions de se dérouler dans des conditions de température, de pression, de concentration, de pH et de milieu, remarquablement « douces ». Comme les catalyseurs chimiques, les enzymes n'interviennent que dans les réactions métaboliques thermodynamiquement possibles qu'elles accélèrent en diminuant l'énergie d'activation de la réaction, c'est-à-dire en stabilisant l'état de transition par rapport à l'état fondamental (schéma 1).

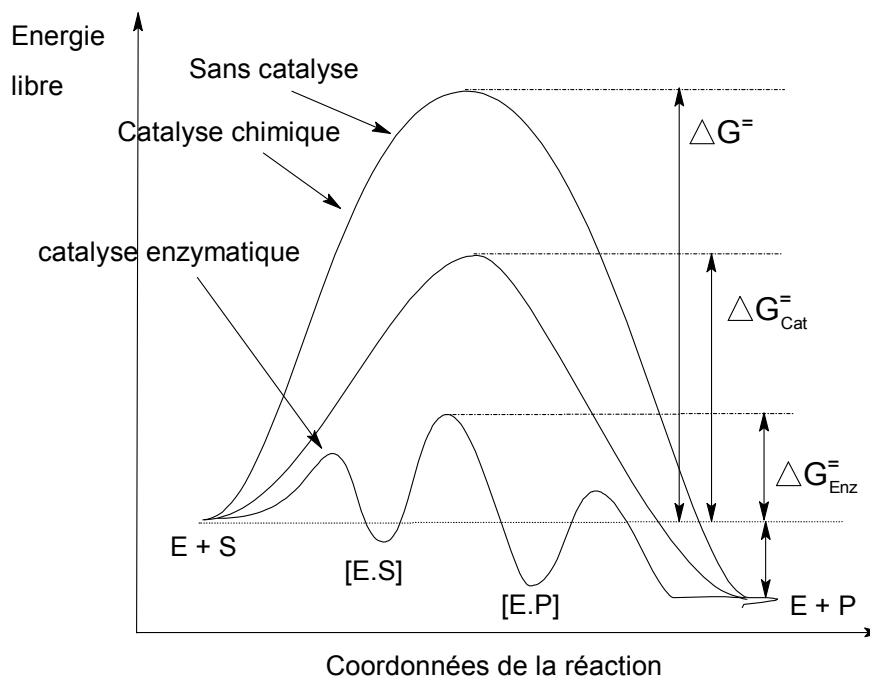


Schéma 1 : Avantage de la catalyse enzymatique par rapport à la catalyse chimique.

Différents types d'interactions sont utilisés par les enzymes afin d'augmenter leur affinité pour le substrat et stabiliser l'état de transition :

- Liaison covalente (stabilisation de 40 à 110 kcal/mole)
- Interactions électrostatiques (stabilisation d'environ 5 kcal/mole)
- Interactions ion-dipôle et dipôle-dipôle (stabilisation de 1 kcal/mole)
- Liaisons hydrogènes (stabilisation de 3-10 kcal/mole)

- Complexes de transfert de charge (implique les électrons π des anneaux aromatiques) (stabilisation < 3 kcal/mole)
- Interactions hydrophobes (stabilisation de 0,5 kcal/mole)
- Forces de Van der Waals (stabilisation de 0,5 kcal/mole)

L'exemple ci-dessous montre l'intervention de ces différentes interactions pour la stabilisation des différents états de transitions intermédiaires menant à la formation du produit.

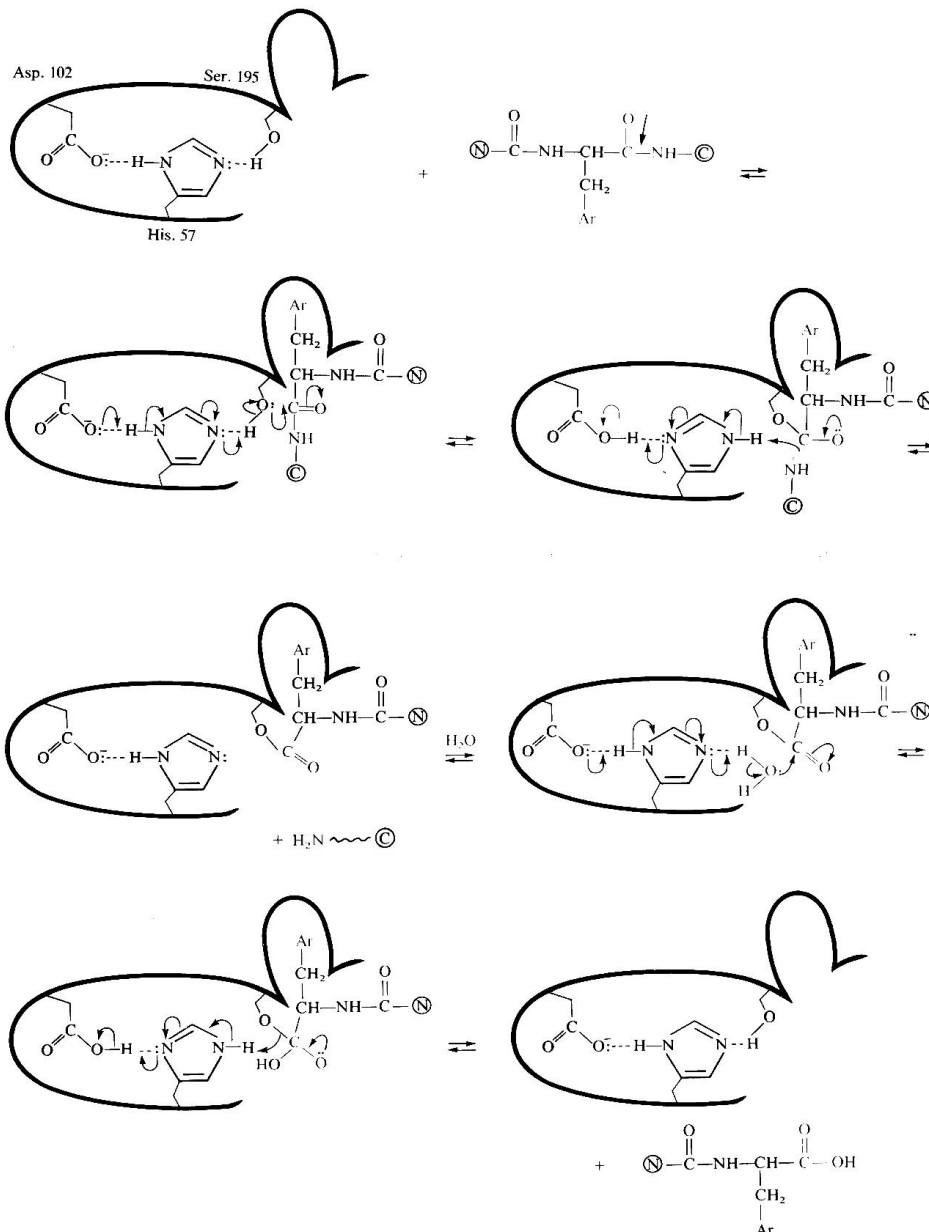


Schéma 2 : Stabilisation des différents états de transition intermédiaires lors de l'hydrolyse d'une liaison peptidique par l' α -chymotrypsine.

Cependant, le caractère fondamental des enzymes est leur spécificité pour une réaction ou un type de réaction et pour un ou un nombre limité de substrats et surtout, elles peuvent être chimio-, régio-, diastéréo- et énantiométriques. [1]

II- STRUCTURE DES ENZYMES

Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés, appelé séquence ou structure primaire de la protéine. Cette chaîne se replie et s'enroule sur elle-même pour finalement adopter une structure spatiale compacte qu'on appelle structure tertiaire. Diverses forces provenant toutes des chaînes latérales des acides aminés constituant la protéine, interviennent pour stabiliser cette grosse molécule : ponts disulfures, liaisons hydrogènes, attractions et répulsions électrostatiques :

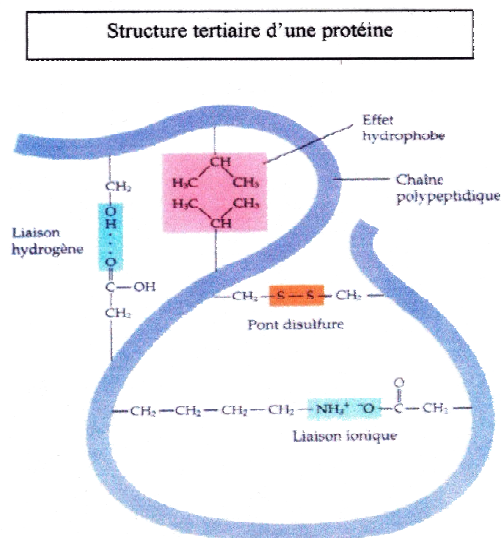


Schéma 3 : structure tertiaire d'une protéine

Cette structure tertiaire est importante car elle permet l'aménagement d'une poche, appelée site actif de l'enzyme, où a lieu la complexation du substrat et l'activation de la réaction. C'est également la géométrie de ce site qui détermine la sélectivité des enzymes. En effet, pour que la catalyse ait lieu, la géométrie du substrat et celle du site actif, doit être compatibles. Il en résulte la formation d'un complexe « enzyme-substrat » qui a lieu, soit par simple complémentarité stérique, soit par ajustement induit, facilité par la plasticité dont est dotée fondamentalement la protéine.

III- CLASSIFICATION DES ENZYMES

Une enzyme est en général spécifique à une réaction et à un substrat donné. Une classification a été adoptée et chaque enzyme complètement caractérisée reçoit un numéro de code de quatre chiffres précédé de E.C (Enzyme Classification) :

- 1^{er} chiffre : type de réaction catalysée (il existe 6 classes ou groupes).
- 2^{ème} chiffre : (sous classe) type de groupement chimique ou de liaisons.
- 3^{ème} chiffre : nature précise des groupes et les mécanismes réactionnels en jeu.
- 4^{ème} chiffre : numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe. Lorsqu'une enzyme

se termine par 99, cela signifie qu'elle est incomplètement caractérisée.

Tableau 1: Classification des enzymes

	Classes d'enzymes	Exemple d'enzyme	N° Code
EC 1.	OXYDO-REDUCTASES sur aldéhyde ou oxo sur liaison C-C sur liaison amine réductases diverses donneurs azotés oxygénases	Formiate déshydrogénase Fumarate réductase Glutamate déshydrogénase Nitrate réductase (plantes) Nitrate réductase (<i>E. Coli</i>) Catéchol 1,2-dioxygénase	1.2.1.2 1.3.1.6 1.4.1.2 1.6.6.2 1.7.99.4 1.13.11.1
EC 2.	TRANSFERASES de groupe monocarboné d'aldéhyde ou de cétone d'acyle de glycosyle de groupe azoté	Sérine hydroxyméthyl transférase Transaldolase Choline acétyltransférase Lévane sucrase Aspartate aminotransférase	2.1.2.1 2.2.1.2 2.3.1.6 2.4.1.10 2.6.1.1
EC 3.	HYDROLASES Hydrolyse d'esters Glycosylases Hydrolyse de peptide C-N autre que peptide Hydrolyse d'anhydride	Acétylcholine estérase Alpha-amylase Chymotripsine Uréase Pyrophosphatase	3.1.1.7 3.2.1.1 3.4.4.5 3.5.1.5 3.6.1.1
EC 4.	LYASES sur liaison C-C sur liaison C-O sur liaison C-N sur liaison P-O	Glutamate décarboxylase Citrate déshydrogénase Aspartate ammoniac lyase Adénylate cyclase	4.1.1.15 4.2.1.4 4.3.1.1 4.6.1.1
EC 5.	ISOMERASES Racémases, épimérase	UDP-glucose 4-épimérase	5.1.3..2
EC 6.	LIGASES (Enzymes effectuant des synthèses avec une source d'énergie) forment C-O forment C-S forment C-N forment C-C	Alanyl-ARNt-synthétase Acétyl-coenzyme A synthétase Glutamine synthétase Pyruvate carboxylase	6.1.1.7 6.2.1.1 6.3.1.2 6.4.1.3

IV- LES HYDROLASES - CAS DES LIPASES

Parmi les enzymes les plus utilisées par les chimistes, dans le domaine de la recherche ou celui de l'industrie, les hydrolases sont les plus importantes et ce, en raison de leur faible coût et de facilité de manipulation. Elles peuvent être utilisées sous forme de poudre lyophilisée ou immobilisée sur un support.

Dans cette classe d'enzymes, on trouve les lipases (EC 3.1.1.3) qui sont les plus employées par les chimistes organiciens [2,3] Comme pour tous les biocatalyseurs auxquels fait appel le chimiste, les lipases sont sollicitées pour leur sélectivité et particulièrement leur énantiosélectivité qui permet l'accès à des molécules chirales dont l'intérêt, en pharmacie par exemple, n'est plus à démontrer.

IV-1- Mécanisme d'action des lipases

Les lipases diffèrent entre elles par le nombre d'acides aminés constituant leur structure primaire. Par exemple, la lipase *Candida rugosa* contient plus de 500 acides aminés tandis que la lipase de *Candida antarctica* B en contient 317. Cependant, la caractéristique commune de toutes les lipases est que leurs sites actifs sont constitués de trois acides aminés, appelés la triade sérine, aspartate ou glutamate et histidine [3] Cette triade d'acides aminés, ajoutée à quelques autres résidus, constitue le site actif de l'enzyme. Celui-ci est protégé par un « couvercle » (en fait un segment hélicoïdal hydrophobe) qui en bloque l'accès et ne s'ouvre qu'au contact d'une phase hydrophobe pour permettre la complexation du substrat, lipide hydrophobe, et faciliter ainsi la catalyse de la réaction. Cette activation interfaciale du biocatalyseur constitue la caractéristique principale des lipases [4]

Par ailleurs, il a été montré que l'absence de ce « couvercle » abaisse l'activité de l'enzyme. Ainsi, en comparant l'activité de la lipase gastrique humaine (HGL) avec la même lipase obtenue par mutation génétique, dépourvue de ce « couvercle », Miled et *col.*, ont trouvé que l'activité de cette dernière s'en est trouvée diminuée (figure 1) [5] :

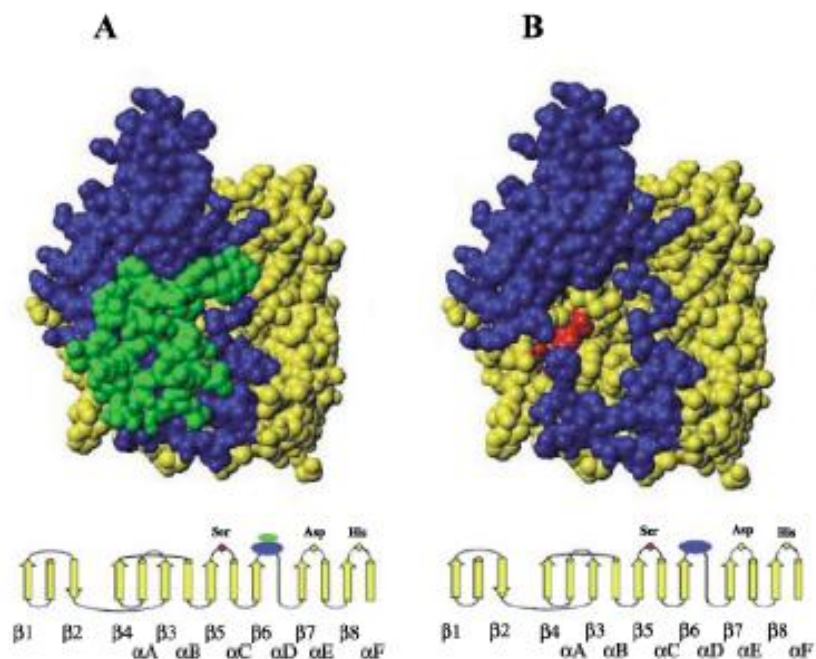


Figure 1 : A : la lipase HGL non mutée où le site actif est protégé par le « couvercle » (partie verte). B : l'enzyme obtenue par mutation génétique où cette protection n'existe plus et le site actif (en rouge sur la figure) est directement accessible.

Le mécanisme d'intervention de la triade (Ser, Hist et Asp) lors de l'hydrolyse d'un ester est donné par le schéma suivant [3] :

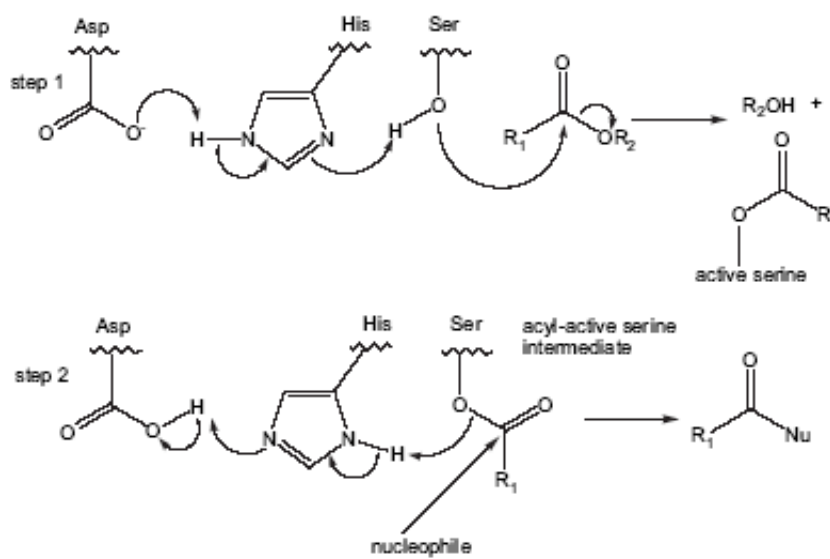


Schéma 4 : Mécanisme d'intervention de la triade (Ser-Hist-Asp) et formation de l'acyl-enzyme.

Comme le montre le schéma ci-dessus, la disposition particulière des 3 résidus formant la triade permet, dans une première étape, l'attaque nucléophile du substrat $R_1CO_2R_2$ pour donner un complexe appelé acyl-enzyme avec libération de l'alcool R_2OH .

Dans une seconde étape, cet intermédiaire acyl-enzyme subit une attaque nucléophile par l'eau présente dans le milieu, régénérant ainsi l'enzyme par expulsion de l'acide R_1CO_2H , produit de la réaction.

L'idée de l'utilisation des lipases en synthèse organique était basée sur l'hypothèse que d'autres nucléophiles que l'eau pourrait attaquer l'acyl-enzyme, en particulier dans un milieu pauvre en eau comme le milieu organique. C'est ainsi que depuis le début des années quatre vingt et les travaux de A.M. KLIBANOV (6), s'est développée toute une chimie autour de l'utilisation des lipases en synthèse organique qu'on peut résumer par le schéma suivant :

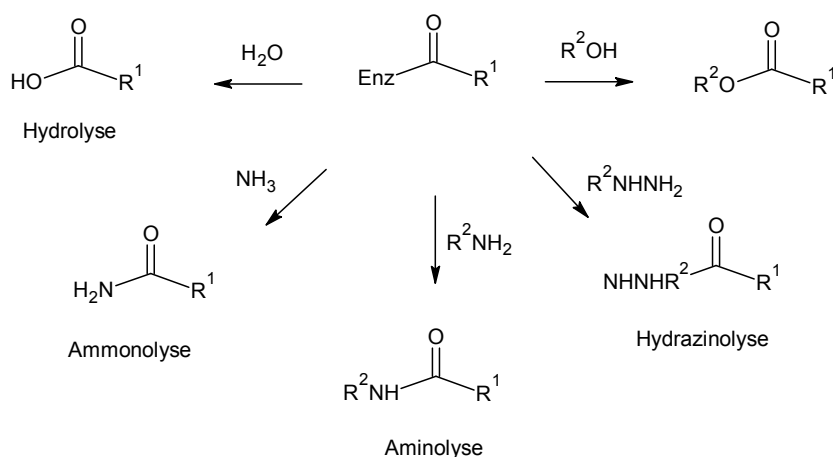


Schéma 5 : Biotransformations d'un ester en milieu organique

IV-2- Aspect cinétique

IV-2-1- Cinétique de Michaelis-Menten

La vitesse de réaction enzymatique est mesurée à partir de la quantité de produit formée en un temps donné. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par son K_m ou constante de Michaelis. Celle-ci est définie comme la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est la moitié de la vitesse de réaction maximale, elle a la même unité : mol.L^{-1} . De nombreux facteurs peuvent modifier la vitesse de réaction enzymatique tel que :

- Les concentrations en enzyme et en substrat
- Les caractéristiques physico-chimiques du milieu de réaction (température, pH, ...)

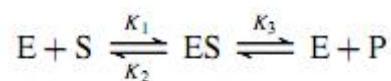
-La présence d'inhibiteurs de la réaction enzymatique. Un inhibiteur compétitif augmente la constante de Michaelis.

La constante de Michaelis est spécifique à chaque enzyme. C'est une constante cinétique caractérisant une réaction enzymatique. Elle est symbolisée par K_m et reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat :

- Plus sa valeur est élevée, plus l'affinité du substrat pour l'enzyme est faible ;
- Plus elle est faible, plus l'affinité du substrat pour l'enzyme est grande.

L'équation de Michaelis-Menten permet de calculer les caractéristiques d'une enzyme michaelienne, enzyme ne fixant qu'une molécule de substrat par molécule d'enzyme.

Le mécanisme de la réaction pour les enzymes à un seul substrat, ainsi que l'équation de la vitesse sont:



$$V = d [P]/dt = -d[S]/dt$$

a) Constante de Michaelis-Menten



$$K_m = (K'_1 + K_2)/K_1 \quad [K_m] = \text{mol.L}^{-1}$$

K_m représente l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

b) Équation de Michaelis-Menten

Cette équation est établie comme suit :

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Avec :

v : vitesse initiale (c'est à dire en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat $[S]$ (en $\mu\text{mol}/\text{min}$) ;

v_{max} : Vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat $[S]$ (en $\mu\text{mol}/\text{min}$) ;

$[S]$: Concentration en substrat (en mol/L) ;

K_m : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. C'est la concentration en substrat laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à $\frac{1}{2} v_{\text{max}}$ (en mol/L). Elle correspond à l'inverse de la constante d'affinité du substrat pour l'enzyme. Graphiquement, l'équation de Michaelis est une branche d'hyperbole.

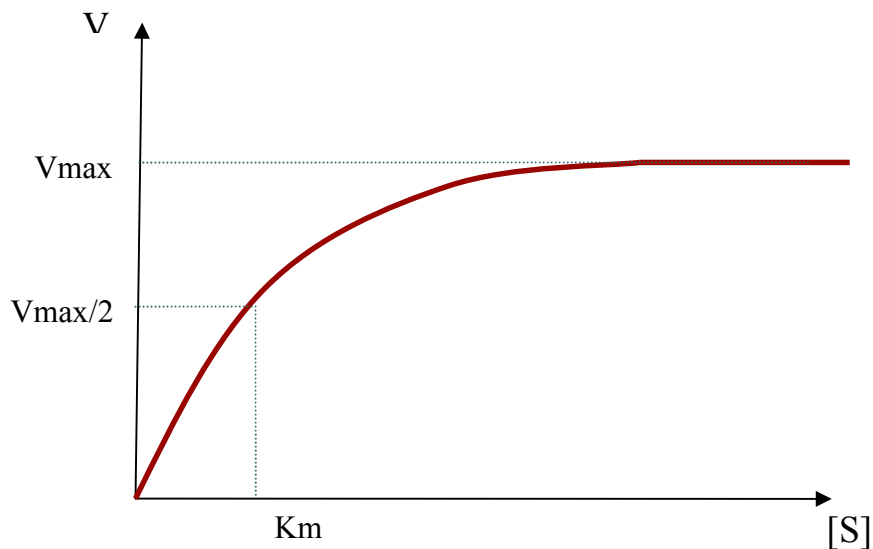


Schéma 6 : Représentation hyperbolique de Michaelis-Menten

En pratique, on détermine les constantes de l'enzyme K_m et v_{max} par la représentation des inverses (représentation de Lineweaver et Burke) qui est une droite d'équation

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{\text{max}} [S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (2)$$

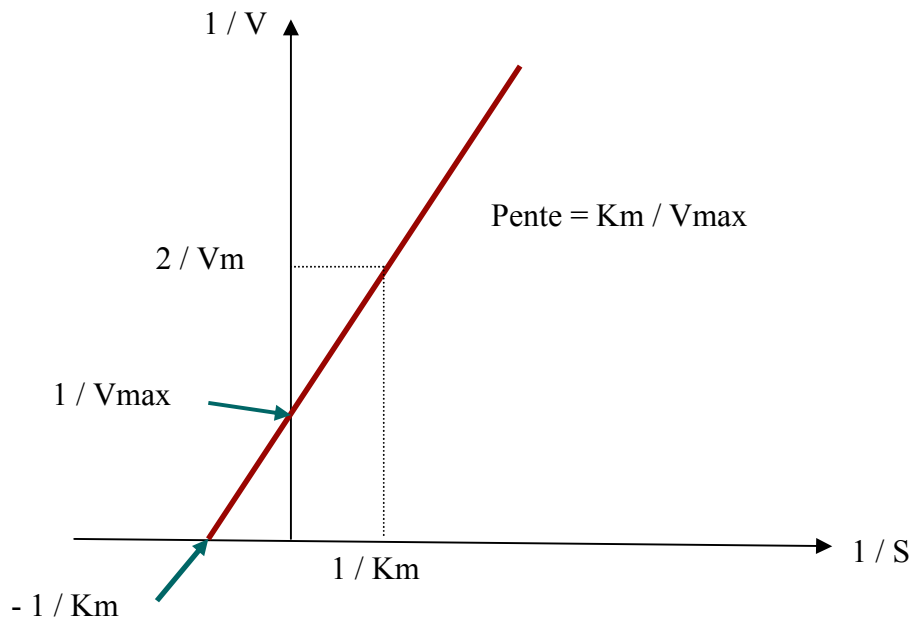
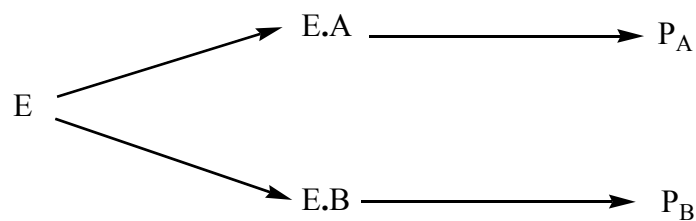


Schéma 7: Représentation de Lineweaver et Burke

IV-2-2- Modélisation de l'énantiosélectivité

Dans le cas du dédoublement enzymatique d'un mélange racémique, il a été proposé un mécanisme réactionnel s'appliquant aux réactions non réversibles [7]



Où,

E : l'enzyme

A : l'énantiomère R

B : l'énantiomère S

On peut donc exprimer les vitesses de disparition de A et B :

$$V_A = -d[A] / dt = [k_{cat} / k_m]_A [E][A] \quad (3)$$

$$V_B = -d[B] / dt = [k_{cat} / k_m]_B [E][B] \quad (4)$$

$$V_A / V_B = \frac{[k_{cat} / k_m]_A [A]}{[k_{cat} / k_m]_B [B]} \quad (5)$$

Le rapport V_A / V_B exprime la préférence que peut montrer l'enzyme vis-à-vis de l'un des substrats. Par intégration de ce rapport, SIH [8] établit une nouvelle équation qui définit un autre paramètre représentant la sélectivité de la réaction, le facteur d'énantiosélectivité E . Sa valeur est définie comme le rapport des constantes de spécificité pour les deux énantiomères (Eq.6)

$$E_{AB} = \frac{[k_{cat} / k_m]_A}{[k_{cat} / k_m]_B} \quad (6)$$

Il a été montré par CHEN et coll. [6], que ce facteur peut être exprimé par le taux d'avancement (C) de la réaction et respectivement (ee_S) l'excès énantiomérique du substrat n'ayant pas réagi et (ee_P) l'excès énantiomérique du produit formé (Eq.7, 8, 9)

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_S)]}{\ln[(1-C)(1+ee_S)]} = \frac{\ln[(1-C)(1+ee_P)]}{\ln[(1-C)(1-ee_P)]} \quad (7)$$

Où,

$$C = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \quad (8)$$

$$ee_S = \frac{[B] - [A]}{[B] + [A]} \quad ee_P = \frac{[P] - [Q]}{[P] + [Q]} \quad (9)$$

Lorsque les deux énantiomères A et B sont en compétition, il faut que le taux de conversion de la réaction ne dépassera pas 50%, afin d'éviter une décroissance rapide de la pureté optique du produit. On note qu'il est difficile de connaître avec exactitude le taux d'avancement de la réaction, indépendamment des méthodes expérimentales.

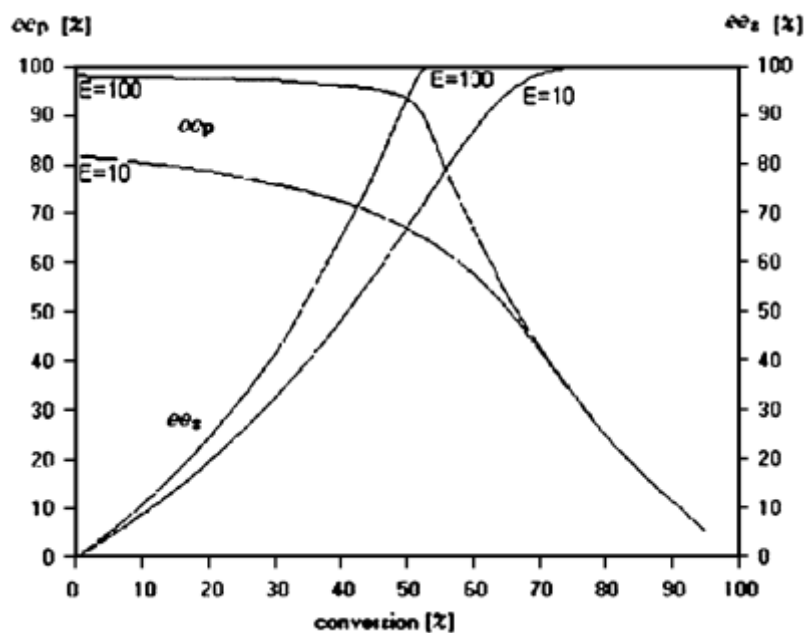


Schéma 8 : Courbe de l'excès énantiomérique du substrat et celui du produit en fonction du taux de conversion [3].

L'énantioselectivité est le résultat d'une différence d'énergie libre d'activation entre les deux énantiomères (*R* et *S*), notée $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$, qui est relié au facteur *E* par la relation donnée par l'équation 10 et le schéma 9 ci-dessous [3] :

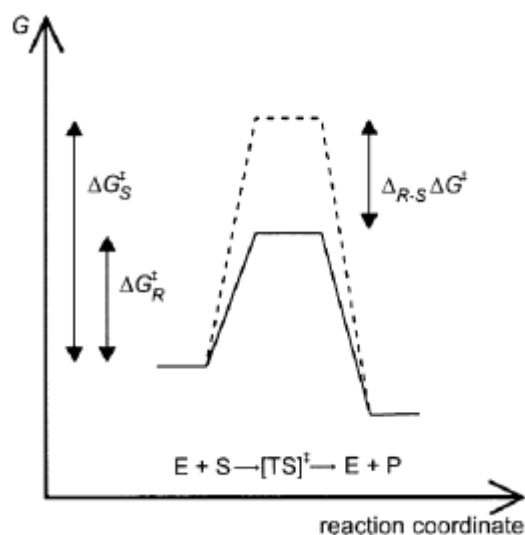


Schéma 9 : Courbe des énergies libres d'activation (énergie de Gibbs) $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$, dans une réaction de dédoublement enzymatique qui favorise l'énantiomère *R* [3].

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = \Delta G_R^\ddagger - \Delta G_S^\ddagger = -RT \ln E \quad (10)$$

Où,

$$E_{RS} = \frac{(K_{cat}/K_M)_R}{(K_{cat}/K_M)_S} \quad (11)$$

Ceci permet de déduire que lorsque la vitesse initiale v_R augmente, le facteur d'énantioselectivité E augmente également, entraînant ainsi une baisse au niveau de l'énergie libre d'activation $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ [9].

CHAPITRE II

APPLICATIONS DES LIPASES EN SYNTHÈSE ORGANIQUE

I- INTRODUCTION

Les enzymes d'une manière générale et les lipases en particulier, sont devenues des outils de choix pour le chimiste organicien. En raison de leur grande sélectivité et des conditions réactionnelles douces dans lesquelles elles opèrent, les enzymes sont maintenant incontournables, en particulier dans la synthèse de composés chiraux qui sont très demandés par l'industrie pharmaceutique. Par ailleurs, en raison principalement des restrictions de plus en plus fortes en matière de pollution et de protection de l'environnement, d'autres industries intègrent les biotechnologies dans leurs processus de production. Parmi les biocatalyseurs utilisés, les lipases constituent le groupe le plus important. Elles sont non seulement capable d'assurer leur fonction naturelle d'hydrolyse des esters, mais peuvent également catalyser des réactions de transestérification, d'estérification, d'interestérification et d'aminolyse, en milieu non aqueux. Ces propriétés, ajoutées au label « naturel » qu'elles confèrent aux produits issues des processus biotechnologiques, permettent de retrouver les lipases impliquées dans la synthèse de nombreux produits aussi variés que les médicaments, les biopolymères, le biodiesel, les arômes, etc. [10]

Afin de situer notre travail par rapport à la littérature, nous rapportons dans ce chapitre les résultats obtenus dans les réactions catalysées par les lipases, en milieu aqueux et non aqueux.

Pour ne pas alourdir l'exposé, nous nous contenterons de commenter les résultats qui nous paraissent les plus significatifs.

II- REACTIONS EN MILIEU AQUEUX

II-1- Régiosélectivité :

Parmi les nombreux travaux montrant la régiosélectivité des lipases [11-15], nous citerons ceux de Fernandez- Lorente et col. [16], décrivant l'hydrolyse de sucres peracétylés en présence de différentes lipases. Ces auteurs ont montré que parmi les différentes lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa, seule la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) ont pu montrer, par hydrolyse régiosélective du 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **1**, activités notable. (Schéma 10, Tableau 2) :

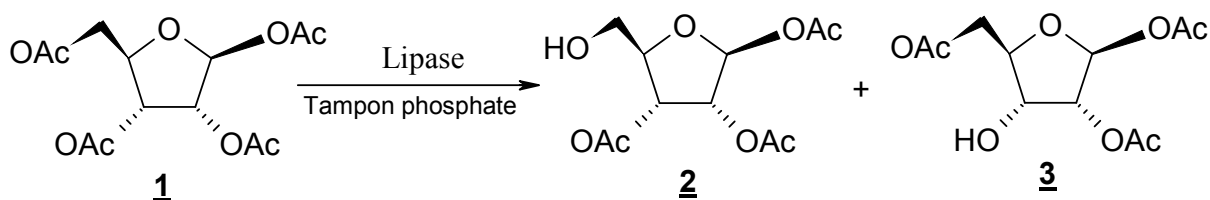


Schéma 10. Hydrolyse régioselective du 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose **1**, en présence de tampon phosphate et catalysée par les lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa

Tableau 2. Hydrolyse regioselective du 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose **1**, catalysée par des lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa .

Lipase	Activité enzymatique (μmol/mL)	Rendement %
CRL	3.07	47
PFL	0.1	40
MML	0.0075	33
HLL	0.0073	25
AOL	0.008	20
CAL-A	0.012	5
CAL-B	0.03	2

NB: CRL: lipase de *Candida rugosa* ; PFL: lipase de *Pseudomonas fluorescens* ; MML: lipase de *Mucor miehei* ; HLL: lipase de *Humicola lanuginosa* ; AOL: lipase de *Aspergillus oryzae* ; CAL-B: lipase de *Candida antartica B* ; CAL-A : lipase de *Candida antartica A*.

Dans le cas de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), cette dernière, hydrolyse principalement l'ester sur la position 3 en donnant un mélange de deux produits triacétate **2** et **3** avec un rendement de 40%. La lipase de *Candida rugosa* (CRL) quant à elle, hydrolyse sélectivement l'ester sur la position 5 en donnant le mono triacétate **2** avec un rendement de 47%. L'immobilisation de ces deux lipases sur le glutaraldehyde agarosa, montre que l'activité de la lipase de *Candida rugosa* (CRL), dans les mêmes conditions réactionnelles a baissé de plus de 100 fois par rapport à son immobilisation sur octyl agarosa. Le même comportement est également observé dans le cas de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), (tableau 3) :

Tableau 3. Hydrolyse Enzymatique du 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **1**, catalysée par la CRL et PFL immobilisées sur Octyl agarosa et Glutaraldehyde .

Lipase	Support d'immobilisation	Activité enzymatique ($\mu\text{mol/mL}$)	Rendement %
CRL	Octyl agarosa	3.07	47
PFL	Glutaraldehyde agarosa	0.03	33
CRL	Octyl agarosa	0.1	40
PFL	Glutaraldehyde agarosa	0.007	30

De même, il a été démontré, que la nature des deux supports mentionnés précédemment à aussi une influence sur l'activité hydrolytique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) dans le cas de l'hydrolyse régioselective du 1,2,3,4,6,-pent-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose **4**. Cette influence dépend du pH du milieu. Lorsque, le pH est acide, les deux lipases immobilisées, permettent l'hydrolyse en position 1 et 6. (Schéma 11)

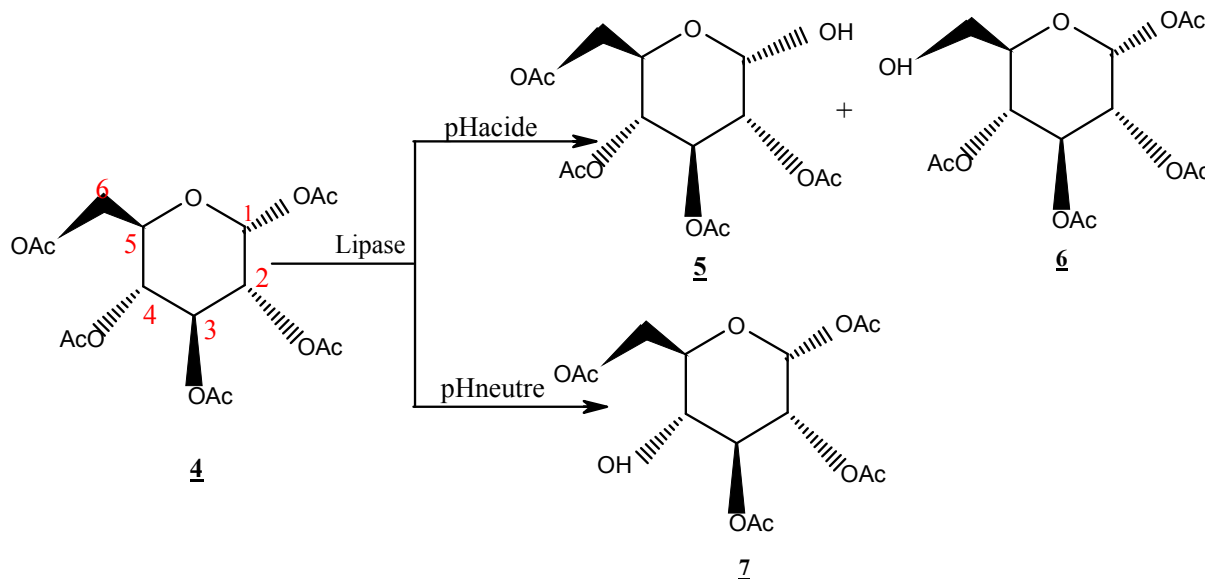


Schéma 11. Hydrolyse régioselective 1,2,3,4,6,-pent-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose **4**, en présence d'acide et catalysée par les lipases immobilisées sur un support d'octyl agarosa

Il a été aussi démontré lorsque cette réaction est menée dans un milieu aqueux, avec un pH neutre, l'hydrolyse a lieu en position 4 (composé **7**). [12,16]

Toujours dans le souci d'étudier la régiosélectivité des lipases, Hisano et col. [17], ont décrit l'hydrolyse du composé **1** (diacétate- α,α' -alcène), catalysée par les lipases dans un milieu tampon. (Schéma 12, Tableau 4)

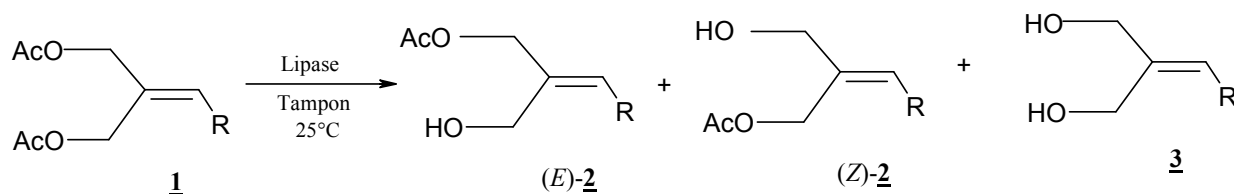


Schéma 12. Hydrolyse enzymatique du diacétate- α,α' -alcène.

Tableau 4. Hydrolyse régiosélective du diacétate- α,α' -alcène, en présence de lipases.

Lipase	Groupement R de 1	Temps (h)	Rdt de 2 (%)	Rapport <i>E/Z</i>	Rdt de 3 (%)
CRL	-CH ₃	33	24	28:72	18
CRL	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	72	51	21:79	28
CRL	-CH=CH-CH=CH-C ₆ H ₅	44	41	15:85	6
PSL-D	-(CH ₂) ₂ -C(CH ₃)=CH-CH ₂ (OBn)	24	49	9:91	26
PFL	-CH=CH-C ₆ H ₅	28	52	4:96	7
PSL-D	-C ₆ H ₅ -O-CH ₃	26	50	4:96	7

NB: CRL: lipase de *Candida rugosa* ; PSL-D: lipase de *Pseudomonas cepacia D*.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que l'hydrolyse avance lentement pour donner le monoester (**2**), avec une meilleure régiosélectivité. On constate que le rendement des produits de cette réaction est faible dans tout les cas des lipases et de dérivés du composé (**1**), testés. Le plus intéressant dans ces réactions est que le régioisomère (*Z*) est obtenu comme produit majoritaire, en comparaison avec l'acétylation du composé **3** dans les mêmes conditions réactionnelles où, le régioisomère (*E*) qui en quantité majoritaire.

II-2- Stéréosélectivité

La stéréosélectivité des lipases a été utilisée soit pour effectuer des dédoublements de mélanges racémiques par résolution cinétique essentiellement, soit pour accéder à des composés optiquement actifs à partir de composés prochiraux [3,18].

Ghanem et col. [19], ont étudié l'hydrolyse énantioselective du (*R,S*)-2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene **1**, catalysée par une série de lipases en présence de toluène.(schéma 13)

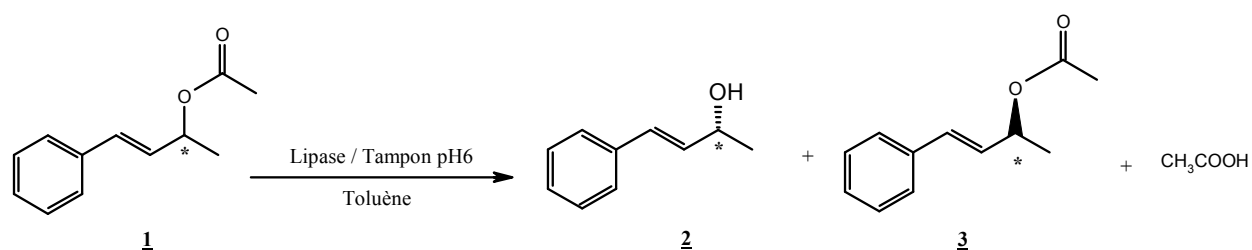


Schéma 13. L'hydrolyse énantioselective du (*R,S*)-2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene **1**, catalysée par une série de lipases en présence du toluène.

Le tableau ci-dessous, montre que parmi les lipases utilisées, c'est la lipase de *Candida antartica* B, qui donne les meilleurs résultats tant en activité qu'en énantioselectivité. La présence du toluène favorise la réaction en solubilisant le substrat.

Tableau 5. Hydrolyse énantioselective du (*R,S*)-2-acetoxy-4-phenyl-but-3-ene (**1**), catalysée par des lipases en présence de toluène comme co-solvant.

Lipase	Temps de réaction (jours)	ee _S %	ee _P %	C %	<i>E</i>
PSL	2	57	99	36	>150
PSL-C	4	30	99	23	>150
PSL-D	2	27	99	21	>150
PFL	4	56	99	36	>150
AL	2	41	99	29	>150
CCL	4	40	54	43	5
CRL	4	33	99	25	>150
CAL-B	1	80	99	45	>150
NOVOZYME 525 L	4	59	99	37	>150
RML	4	39	99	28	>150

NB : Log *P* : coefficient d'hydrophobicité du solvant ; ee_P% et ee_S% : les excès énantiomérique du produit et du substrat ; *E* : facteur d'énantioselectivité. PSL: lipase de *Pseudomonas cepacia*; PSL-C: lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des particules de céramiques ; PSL-D: lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des masses diatomique de terre; PFL : lipase de *Pseudomonas fluorescens* ; AL: lipase de *Candida rugosa* du type VII ; CCL : lipase de *Candida cylindracea* ; CRL: lipase de *Candida rugosa*; CAL-B : lipase de *Candida antarctica* B; NOVOZYME 525 L : lipase de Microorganisme de *Aspergillus oryzae* ; RML : lipase de *Rhizomucor miehei*

La présence d'un solvant organique peut également favoriser la sélectivité de l'enzyme. Lors de l'hydrolyse enzymatique de l'acétate de menthyle racémique **1**, Lijuan Yu et col. [20], ont montré que la présence de co-solvants organiques permet de multiplier par trois le facteur d'énantioselectivité par rapport à la réaction sans co-solvant. (Schéma 14). Les solvants utilisés dans cette réaction sont : DMF; DMSO; Acétonitrile et Acétone.

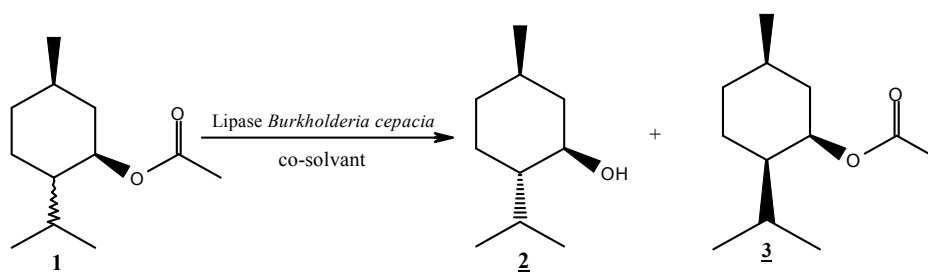


Schéma 14. L'hydrolyse enzymatique du DL-menthyl acétate **1** en présence de la lipase de *Burkholderia cepacia*, en présence de co-solvants organiques.

III- REACTIONS EN MILIEU ORGANIQUE

Initialement les lipases ont été employées pour hydrolyser des esters en milieu aqueux, l'eau étant l'environnement naturel des enzymes. Cependant, l'utilisation de l'eau limitait le champ d'action des lipases en synthèse organique. En plus des problèmes de solubilités des substrats, elle doit être éliminée pour que l'équilibre thermodynamique soit en faveur de la formation des produits. Toutefois, une quantité minimale d'eau est nécessaire pour le maintien de la conformation active de l'enzyme.

Parmi les avantages du travail en milieu organique, citons la récupération de l'enzyme pour de nouvelles utilisations et l'isolation aisée des produits réactionnels par simple filtration.

Notons enfin que la nature du solvant peut également influencer autant sur l'activité que sur la sélectivité du biocatalyseur [21-26].

III-1- Régiosélectivité :

Parmi les hydrolases, la lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) possède une grande régiosélectivité dans les réactions de biotransformations. Elle a été mise à profit pour désacyler des dérivés du 1,3-di-*O*-propanoylresorcinols substitué en position 4 (**1**) [27]. L'alcoolyse du composé **1**, donne régiospecifiquement le produit **2**. La deuxième fonction ester n'est pas touchée en raison de certainement de l'encombrement stérique créé par le groupement *R* adjacent. (Schéma 15)

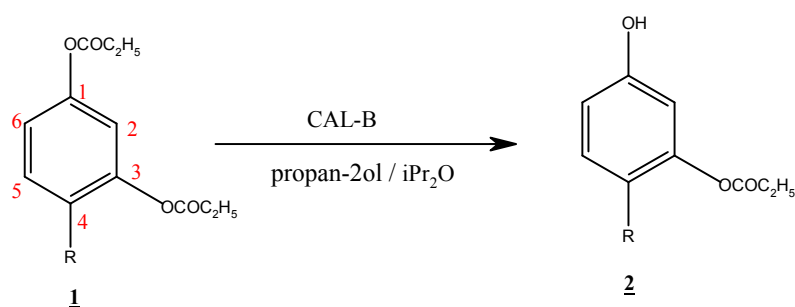


Schéma 15. La deacétylation du composé 1,3-di-*O*-propanoylresorcinols **1** en présence de la lipase de *candida antarctica* B (CAL-B). Avec R = Et ; (CH₃)₃CCH₂C (CH₃)₂ ; Bn ; Cl ; Br

Comme nous l'avons souligné plus haut, et à travers les exemples que nous allons citer, le milieu réactionnel a une influence non seulement sur l'élargissement de la palette des substrats, mais également, et surtout, sur la régio- et l'énantioselectivité des lipases.

Ainsi, Zhang et col. [11], ont montré lors de la synthèse de la pyridoxine par transestérification du 4,5-bis (hydroxyméthyl)-2-méthylpyridin-3-ol **1** (schéma 16), catalysée par la lipase CAL-B, le comportement de l'enzyme est influencé par la nature du solvant employé, l'acétonitrile étant celui qui donne les meilleurs résultats en terme d'activité et de régiosélectivité (Tableau 6).

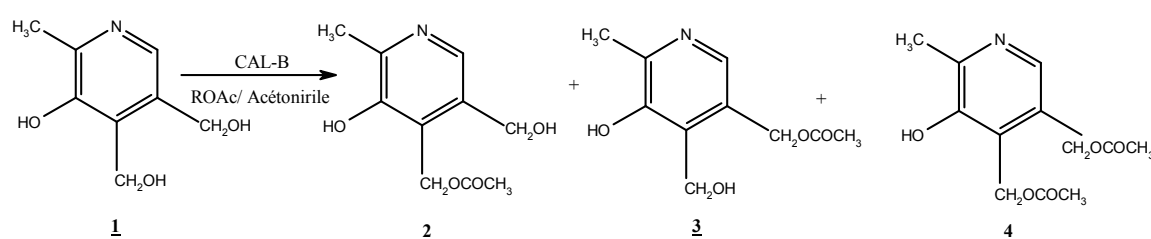


Schéma 16. Synthèse du mono ester de la pyridoxine **1**, en présence de La lipase de *Candida antartica B* (CAL - B)

Tableau 6. Estérification de la pyridoxine dans diverses conditions.

Lipase	solvant	Donneur d'acyle	Temps de réaction (h)	Conversion (%)	2 : 3 : 4
CAL-B	MeCN	Anhydride acétique	2	98,9	0 : 64 : 36
	MeCN	Acétate de vinyle	2	99,1	0 : 96 : 4
	MeCN	Acétate d'éthyle	6	26,9	0 : 96 : 4
	[Bmim]PF ₆	Anhydride acétique	2	63,5	82 : 4 : 14
	[Bmim]PF ₆	Acétate de vinyle	6	36,4	4 : 83 : 13
	[Bmim]PF ₆	Acétate d'éthyle	6	27,5	14 : 74 : 12

NB : CAL-B : La lipase de *Candida antartica B* ; MeCN : acétonitrile ; **2** : 4-O-acétylpyridoxine (4-AcPN) ; **3** : 5-O-acétylpyridoxine (5-AcPN) ; **4** : 4,5-di-O-acétylpyridoxine.

L'utilisation des lipases a également joué un rôle important dans les réactions d'aminolyse. Dotées d'une structure tridimensionnelle complexe, les enzymes peuvent distinguer des groupements fonctionnels identiques portés par la même molécule. Conde et col. [28], ont décrit

la régiosélectivité de la lipase CAL-B dans la réaction d'amidation des deux énantiomères *R* et *S* du 2-aminopentanedioate de diéthyle avec la fonction amine bloquée **1** (schéma 17). Le comportement de l'enzyme diffère selon l'énantiomère. L'amidation du composé *R* est régiospécifique et donne uniquement le produit **2** et celle du composé *S* aboutit à la formation de deux produits où les deux fonctions esters sont touchées.

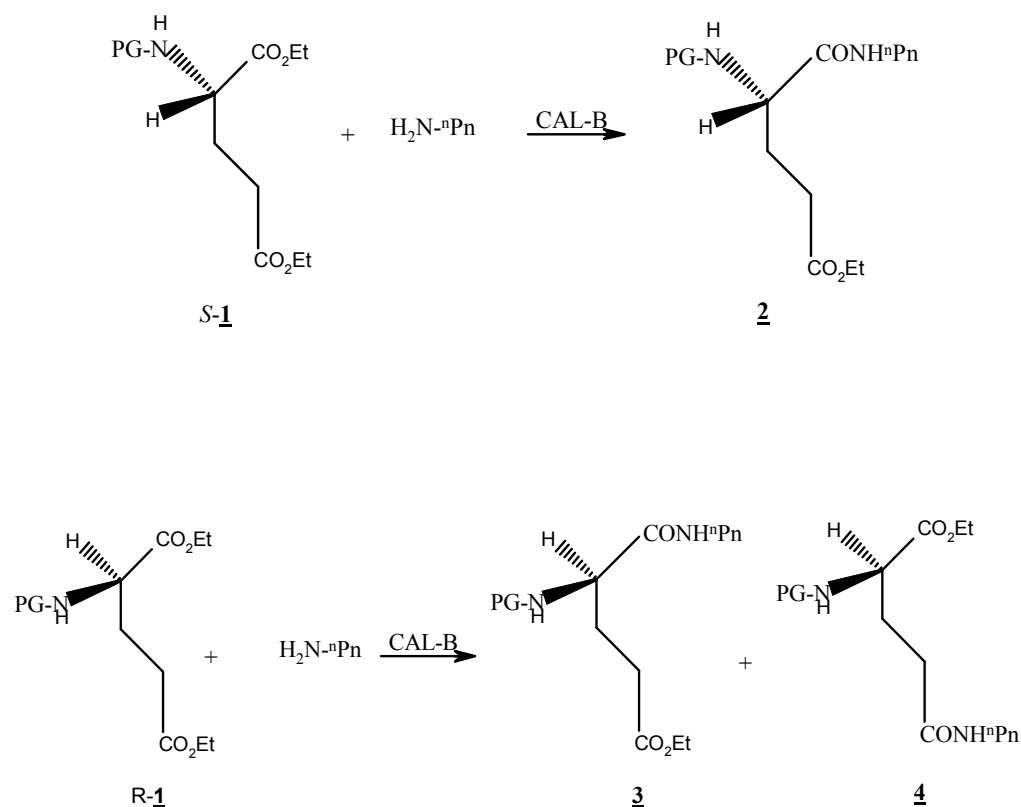


Schéma 17. Amidation régiosélective des deux énantiomères du diesters d'acide glutamique avec la fonction amine bloquée (*S*-**1** et *R*-**1**), catalysé par la lipase de *Candida antarctica* B immobilisée.

Deux lipases différentes peuvent avoir une régiosélectivité complémentaire. Ainsi, lors de l'amidation de la diamine **1** (pyrimidine-3,5-diamino-2, 3,5-trideoxynucleosides) la lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) favorise l'attaque de la fonction amine primaire, donnant le composé **2**, alors qu'avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* C (PSL-C) c'est la fonction secondaire qui réagit pour aboutir au composé **3**. (Schéma 18). [3]

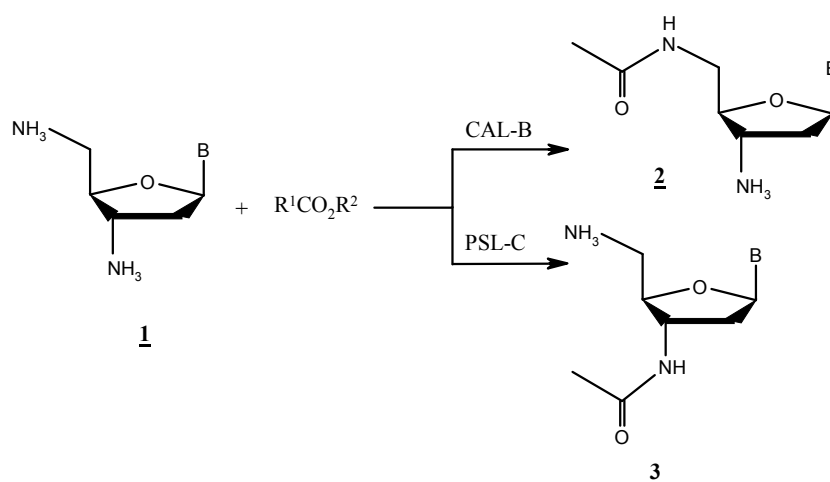


Schéma 18. Amidation régioselective de la pyrimidine-3,5-diamino-2, 3,5-trideoxy nucleosides **1**, catalysé par la lipase de *candida antartica B immobilisée* (CAL-B) et la lipase de *Pseudomonas cepacia C* (PSL-C).

III-2- Stéréosélectivité

Une des plus importantes caractéristiques des biocatalyseurs est leur aptitude à différencier des énantiomères. Cette propriété des enzymes les place parmi les outils de choix tant en synthèse organique que dans le domaine de la biotechnologie [10,29-33]. Dans ce contexte, de nombreux auteurs, ont montré que le comportement des enzymes, en terme, d'activité et de sélectivité, pouvait être modifié par de nombreux facteurs [34,35]. Parmi ceux-ci, le milieu réactionnel joue un rôle très important, comme nous allons le voir à travers les exemples ci-dessous.

Il est très important de noter que la variation des solvants dans le cas de la résolution des racémiques, en présence des lipases peut avoir une influence sur la vitesse de la réaction mais aussi sur la sélectivité de l'enzyme [36-44].

C'est dans ce contexte, que Pochelka et col.[45], ont décrit l'acétylation du R,S-(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol **1a** et le R,S-(Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol **1b**, avec l'acétate de vinyle en présence de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). La réaction a été testée sur plusieurs solvants organiques afin d'établir une corrélation entre l'énantiosélectivité et les propriétés physico-chimique du solvant. Le but étant de choisir le solvant approprié pour une meilleure sélectivité. (Schéma 19, tableau 7).

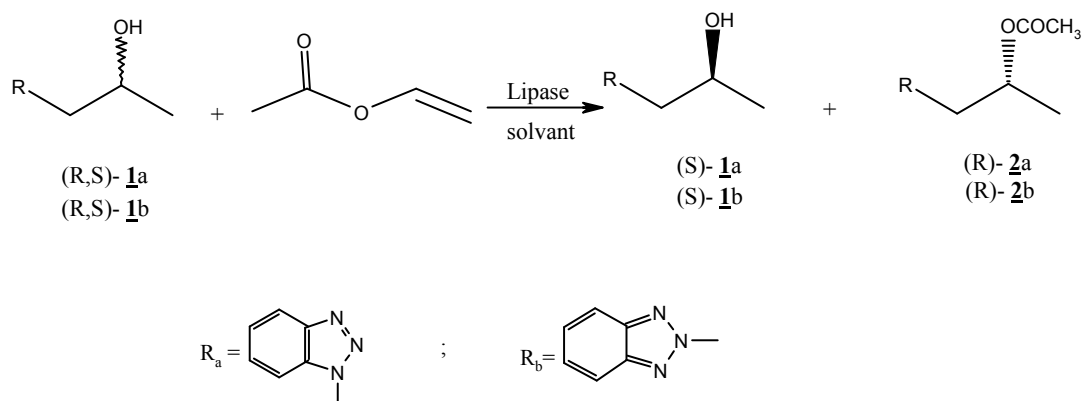


Schéma 19. Transesterification *R,S*-(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol **1a** et le *R,S*-(Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol **1b**, dans une série de solvants organiques

L'analyse du Tableau 7 montre que l'activité et l'énantiosélectivité de la PFL dans la réaction de transesterification du composé *R,S*-(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol **1a** et le *R,S*-(Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol **1b**, sont corrélées négativement avec la polarité des solvants. Les solvants appropriés dans cette transesterification sont ceux qui possèdent un coefficient d'hydrophobicité ($\text{Log}P$) compris entre 1,3 et 3,5. Parallèlement, il a été constaté aussi que le donneur d'acyle n'a aucune influence ni sur l'activité de la lipase ni sur sa sélectivité.

Tableau 7. Transesterification *R,S*-(Benzotriazol-1-yl)-propan-2-ol **1a** et le *R,S*-(Benzotriazol-2-yl)-propan-2-ol **1b**, dans une série de solvants organiques.

Substrat	Solvant	Temps (h)	LogP	Conversion %	ee _s %	ee _p %	<i>E</i>
1a	Sans solvant	22	-	53	78	69	13
1a	n-Hexane	18	3,5	52	83	76	19
1a	Toluene	43	2,5	51	90	85	38
1b	Toluene	47	2,5	50	83	84	30
1a	Benzene	51	2,0	48	82	89	43
1b	Benzene	51	2,0	48	80	86	33
1a	t-BuOMe	20	1,3	52	92	86	43
1b	t-BuOMe	21	1,3	52	91	85	39
1a	CH ₂ Cl ₂	100	0,6	30	36	83	15
1a	THF	98	0,49	54	89	76	21
1a	Acetone	150	-0,23	50	71	70	12
1a	Acetonitrile	96	-0,33	28	28	72	8
1a	Dioxane	130	-1,1	35	47	86	21

De même, Cheng et col. [46], ont décrit la sélectivité des lipases lors de l'estérification de l'acide (*R,S*)-2-(4-chlorophenoxy) propionique **1**, catalysée par la lipase de *Carica papaya* (CPL) en présence de solvants organiques. Cette réaction a été choisie comme modèle afin d'étudier l'influence de l'alcool, la température et les solvants organiques sur la performance de la lipase (Schéma 20).

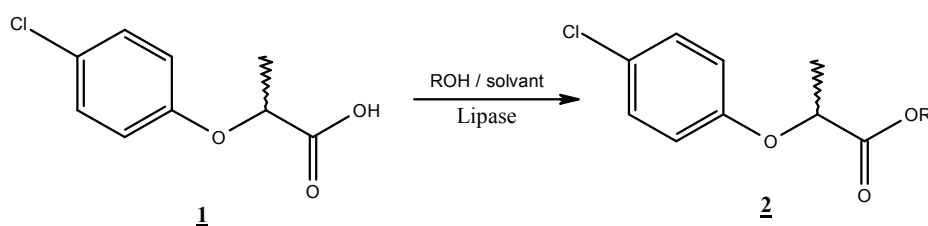


Schéma 20. Estérification de l'acide (*R,S*)-2-(4-chlorophenoxy) propionique **1**, catalysée par la lipase de *Carica papaya* (CPL) en présence de solvants organiques.

Il a été montré que seule la nature de l'alcool et du solvant organique possèdent une influence sur l'activité enzymatique et l'énantioselectivité de la lipase de *Carica papaya* (CPL). Pour les alcools R-OH, l'activité et la sélectivité de l'enzyme évoluent positivement avec l'encombrement stérique du groupement *R* de l'alcool. La nature du solvant, exprimée à travers le coefficient d'hydrophobicité $\text{Log } P$, a une influence sur le facteur d'énantioselectivité E qui passe de 57, dans le cas du cyclohexane, à 87 lorsque c'est l'hexane ou l'isooctane qui sont employés comme solvant (Tableau 8). Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre $\text{Log } P$ et le facteur d'énantioselectivité E .

Tableau 8. Influence du solvant sur les performances de la lipase de *Carica papaya* (CPL), dans l'estérification du de l'acide (*RS*)-2-(4-chlorophenoxy) propionique **1**.

Solvant	$\text{Log } P$	ee _P %	V_R	V_S	E
Tétrachlorure de carbone	3	94.5	15.7	2.1	74
Cyclohexane	3.2	94.4	17.5	3.4	57
Hexane	3.5	89.1	10.3	1.2	87
Isooctane	4.5	77.5	2.6	0.3	87
Décane	5.6	91	4.3	0.7	63

NB : $\text{Log } P$: coefficient d'hydrophobicité du solvant ; ee_P% : l'excès énantiomérique du produit ; V_R et V_S : les vitesses initiales des substrats énantiomères ($\times 10^2 \text{mM h}^{-1}$) ; E : facteur d'énantioselectivité.

IV- EFFETS DES SOLVANTS

A travers les exemples cités précédemment, nous avons vu que de nombreux facteurs pouvaient influencer sur le comportement des lipases, que ce soit dans les réactions d'hydrolyse ou de transestérification.

Parmi ces facteurs, les solvants organiques, présents dans les réactions d'hydrolyse afin de solubiliser les substrats ou dans les réactions de transestérifications pour les avantages déjà cités, peuvent modifier autant l'activité que la sélectivité du biocatalyseur. De ce fait, la recherche de moyens pouvant aider au choix du solvant approprié pour une réaction donnée, est devenue une des préoccupations des chercheurs dans le domaine de la biocatalyse [3,47-51].

Afin de rationaliser la relation entre la nature du solvant et le fonctionnement de l'enzyme, le paramètre physico-chimique caractérisant les solvants le plus employé est le coefficient d'hydrophobicité $\text{Log}P$ (P = coefficient de partage entre l'eau et l'octanol).

Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, à l'heure actuelle de règles ou de modèles satisfaisants dans le choix du solvant dans les réactions catalysées par les enzymes [26,28].

De ce fait, la recherche de moyens pouvant aider au choix du milieu réactionnel approprié pour les réactions biocatalysées, est devenue une des préoccupations des chercheurs dans le domaine de la biocatalyse [52,53].

Ainsi, Hazarika et col. [54], ont évoqué le principe de l'effet de solvant sur les lipases, en faisant la transesterification du 2-*O*-benzylglycerol **1**, avec l'acétate de vinyle. La réaction a été réalisée dans une dizaine de solvants organiques différents. (Schéma 21)

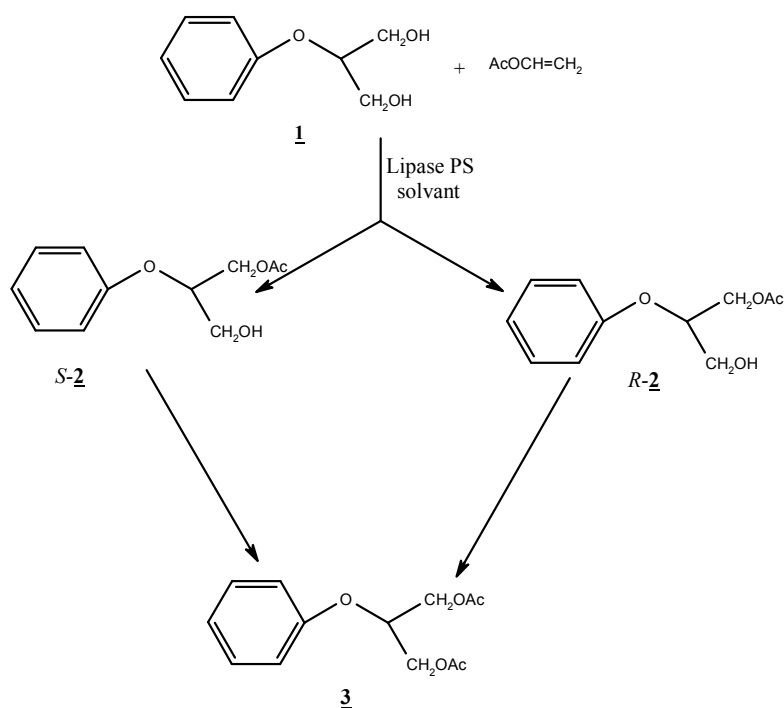


Schéma 21. Transesterification du 2-*O*-benzylglycérol **1**, avec l'acétate de vinyle en testant la réaction dans une dizaine de solvants organique.

L'étude, basée sur la recherche d'une corrélation entre la vitesse initiale de la réaction d'une part et l'excès énantiomérique d'autre part, avec chacun des paramètres physico-chimique du solvant suivants : l'hydrophobicité ($\text{Log}P$), la solubilité dans l'eau ($\text{Log}S_w$), paire d'électron

accepteur donneur ($E_T^N + D_N^N$), la polarisabilité et la constante diélectrique. Pour la vitesse initiale, celle-ci est corrélée négativement avec $\text{Log}P$, alors que cette corrélation est positive avec le reste des paramètres. De même pour l'excès énantiomérique. En conclusion, l'étude montre que d'une manière générale, la réaction, en termes de vitesse initiale et d'excès énantiomérique, est favorisée par les solvants polaires.

Dans le cas de la transesterification du l'acétoacétate de méthyle **1** avec le n-butanol, Yadav et col. [55], on étudié l'influence de la présence d'un solvant organique sur l'activité de la lipase de *Candida antarctica B* (CAL-B). (Schéma 22)

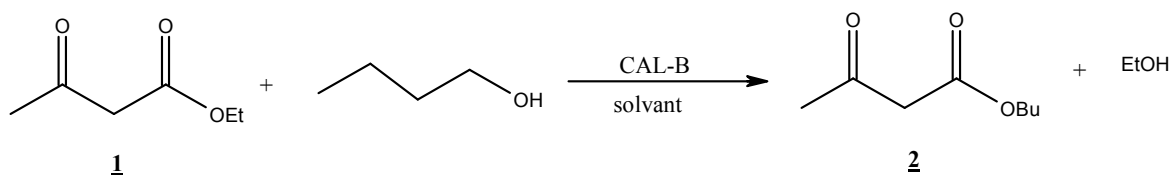


Schéma 22. Transesterification du méthylacétoacétate **1** avec le n-butanol, en présence de solvant organique

Comme le montre les résultats (Tableau 9), à l'exception du 1,4-dioxane, ce sont les solvants les plus hydrophobes qui favorisent la réaction :

Tableau 9. L'influence du solvant sur l'activité de la lipase de *candida antarctica B* (CAL-B) lors de l'alcoolyse du méthylacétoacétate **1** avec le n-butanol, en présence de solvant organique.

Solvant	LogP	Vitesse initiale (mol/L.min.g)
Toluène	2.5	0.21
Benzène	2.0	0.18
1,4-Dioxane	-1.1	0.20
Acétonitrile	-0.33	0.078
Tetrahydrofurane	0.49	0.08

En fait, les autres solvants plus polaires, vont avoir tendance à accaparer l'eau présente autour de la protéine. Celle-ci étant indispensable au maintien de la conformation active de l'enzyme, l'activité catalytique s'en trouve diminuée.

Un autre exemple [21] montrant l'influence du solvant sur le fonctionnement de l'enzyme est

donné par la transestérification énantioselective du (*R,S*)-1-phenylethanol **1** par l'acétate de vinyle, catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL), immobilisée. (Schéma 23) :

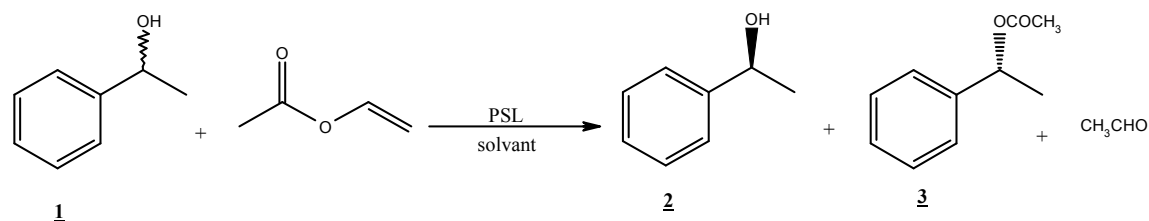


Schéma 23. Transesterification énantioselective du (*R,S*)-1-phenylethanol **1** en présence de solvants organique, catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL), immobilisée.

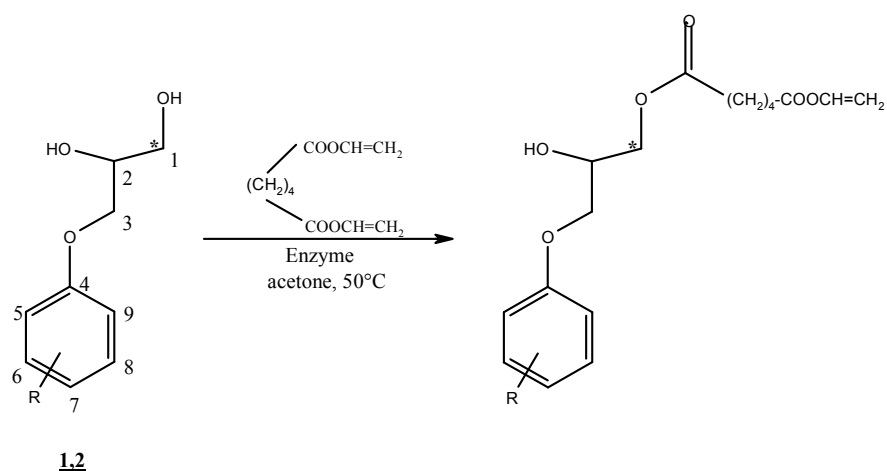
Les résultats de cette étude montrent que s'il y a une certaine corrélation entre la conversion et $\text{Log } P$, celle-ci est totalement absente avec le facteur d'énantioselectivité E . (Tableau 10)

Tableau 10. Effet de solvant sur les performances catalytique de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PLS) immobilisée, dans la réaction de transesterification énantioselective du (*R,S*)-1-phenyléthanol **1** en présence de solvants organique.

Solvant	$\text{Log } P$	$ee_S\%$	$ee_P\%$	C%	E
Acétate d'éthyle	0.68	40	99	28.6	294
Benzène	2.0	60	99	37.5	365
Toluène	2.5	99	99	50.0	1060
Hexane	3.5	99	96	50.8	256
Heptane	4.0	99	96	50.8	256

NB : $\text{Log } P$: coefficient d'hydrophobicité du solvant ; $ee_P\%$ et $ee_S\%$: les excès énantiomérique du produit et du substrat; E : facteur d'énantioselectivité.

Une autre étude plus complète en termes de nombre de solvants employés, concerne la transestérification régiosélective du méphénésin **1** et du chlorphénésin **2**, précurseurs de prodrogues [55] (Schéma 24) :



R= ortho-CH₃ (méphénésine 1) ; para-Cl (chlorphénésine 2)

Schéma 24 : Transestérification du méphénésine 1 et chlorphénésine 2

Dans le but d'optimiser les conditions réactionnelles, les auteurs ont étudié l'influence du solvant sur le rendement de la réaction. Il a été montré que les meilleurs solvants sont ceux dont les valeurs de $\text{Log}P$ varient entre -1,3 et 1,2, et ce, pour les deux substrats 1 et 2 (Tableau 11). Cependant, il n'y a pas de corrélation nette entre les valeurs de $\text{Log}P$ et celles des rendements réactionnels permettant de conclure sur la relation entre la nature des solvants et le comportement du biocatalyseur en terme, d'activité enzymatique.

Tableau 11. Effet de solvant sur la régiosélectivité de la lipase de *Candida antartica* B immobilisée sur résine acrylique lors de l'alcoololyse du méphénésine **1** et chlorphénésine **2**

Solvant	Log <i>P</i>	Produit (%)	
		1b	2b
DMSO	-1.3	63.9	41.1
DMF	-1.0	61.2	50.6
Dioxane	-0.5	64.5	52.3
Acétonitrile	-0.39	65.2	48.4
Acétone	-0.23	78.5	72.5
Tétrahydrofurane	0.46	58.4	40.2
Dichlorométhane	0.6	59.0	44.8
Pyridine	0.65	66.7	27.8
2-Méthyl-2-propane	0.79	58.2	27.1
1,2-Dichloroéthane	1.2	49.8	46.2
Isopropyl éther	1.9	12.5	14.9
Toluène	2.2	24.1	10.8
Tetrachlorométhane	2.9	45.3	22.6
Cyclohexane	3.4	5.7	3.2
Hexane	3.9	3.8	4.1
Octane	4.9	4.4	5.2

Un autre exemple intéressant concerne l'influence du co-solvant sur le facteur d'énantiosélectivité *E* lors de l'hydrolyse par la lipase de *Carica papaya* (CPL) du (*R,S*)-naproxène 2,2,2, trifluoroéthyl **1** qui permet l'accès à l'énantiomère *S* du naproxène **2**, un important anti-inflammatoire non stéroïdien (schéma 25) [57]. Les auteurs de cette étude montrent que, d'une manière générale, les co-solvants avec un coefficient d'hydrophobicité élevé, donnent de meilleurs résultats en terme de vitesse initiale et d'énantiosélectivité.

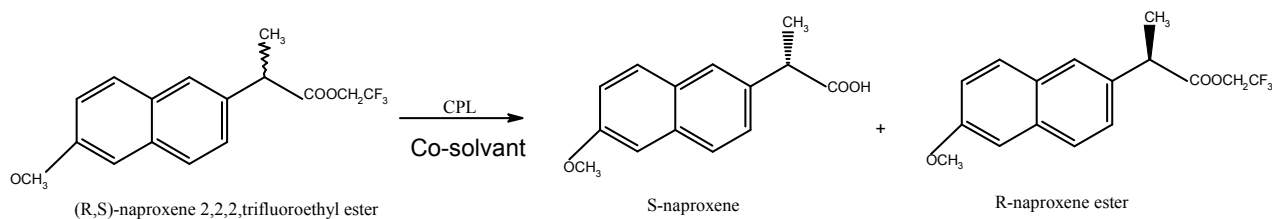


Schéma 25. Résolution du *S*-naproxène par la CPL

A travers de ce qui précède et des différents travaux que nous avons passé en revue, nous avons pu constater l'intérêt que peut avoir la présence d'un solvant organique sur le fonctionnement des lipases et l'apport qu'a ce dernier autant sur l'activité que la régiosélectivité ou l'énantiosélectivité du biocatalyseur. Le choix du solvant dans les réactions biocatalysées est donc très important.

Dans la plupart des travaux ayant abordé ce sujet, nous avons remarqué que le seul paramètre auquel il est fait appel pour décrire la relation « solvant-enzyme » est le coefficient d'hydrophobicité $\text{Log}P$. Il est clair, cependant, qu'un paramètre à lui tout seul ne peut décrire l'ensemble des diverses interactions que peut avoir le solvant avec les différents acteurs présents dans un milieu réactionnel aussi complexe que celui de la biocatalyse. L'apport d'autres descripteurs et paramètres physico-chimiques des solvants est nécessaire pour une meilleure compréhension des phénomènes observés et delà à un meilleur choix du solvant.

BIBLIOGRAPHIE PARTIE I

- [1] Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edition., Ed.; Springer-Verlag Berlin New York, 2000; p 5.
- [2] V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor., *J. Mol. Catal B : Enzymatic* 40 (2006) 111-120.
- [3] A. Ghanem. *Tetrahedron*, 63 (2007) 1721-1754.
- [4] R.D. Schmid et R. Verger. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 (1998) 1608-1633.
- [5] N. Miled, C. Bussetta, A. De Caro, M. Rivière, L. Berti, S. Canaan. *Comparative Biochem. Physiol. Part B* 136, (2003), 131-138.
- [6] A. Zacks, A.M. Klibanov. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 3192-3196.
- [7] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas and C. J. Sih. *J. Amer. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294-7299.
- [8] C. J. Sih, S.Wu, and Y. Fujimoto, *Nato Asi Sir. J. Amer. Chem. Soc.* 128 (1987) 43.
- [9] J. Ottosson, J.C. Rotticci-Mulder, D. Rotticci, K. Hult. *Protein Sci.* 10 (2001) 1769-1774.
- [10] F. Hassan, A. A. Shah, A. Hameed. *Enz. Microb. Technol* 39 (2006) 235-251.
- [11] D. H. Zhang, S. Bai, Y. Sun. *Food Chem* 102 (2007) 1012-1019.
- [12] M. Terreni, R. Salvetti, L. Linati, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, A. Bastida, J. M. Guisan. *Carbohydrate Research* 337 (2002) 1615–1621].
- [13] T. Miyazawa, M. Hamada, R. Morimoto, T. Murashima, T. Yamada. *Tetrahedron Letters* 49 (2008) 175-178.
- [14] I. Perez-Victoria and J. C. Morales. *Tetrahedron* 62 (2006) 878-886.
- [15] X. Zhao, X. Tao, D. Wei, Q.Song. *Eur. J. Med. Chem* 41 (2006) 1352-1358.
- [16] G. Fernandez-Lorente, J. M. Palomo, J. Cocca, C. Mateo, P. Moro, M. Terreni, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan. *Tetrahedron* 59 (2003) 5705-5711.
- [17] T. Hisano, K. Onodera, Y. Toyabe, N. Mase, H. Yoda and K. Takabe. *Tetrahedron Letters* 46 (2005) 6293-6295.
- [18] A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein. *Tetrahedron Asymetry* 15 (2004) 3331-3351.
- [19] A. Ghanem, V. Shurig. *Tetrahedron Asymmetry* 14 (2003) 57-62.
- [20] L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X.Yu. *J. Mol. Catal B: Enzymatic* 47 (2007) 149-154.
- [21] P. Xue, X. H. Yan, Z.Wang., *Chin. Chem. Lett.* 18 (2007) 929 – 932.

- [22] P. Ciuffreda, L. Alessandrini, G. Terraneo and E. Santaniello. *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 3197-3201.
- [23] L. M. Levy, G. De Gonzalo and V. Gotor. *Tetrahedron : Asymmetry* 15 (2004) 2051-2056.
- [24] A. Mezzetti, C. Keith and R. J. Kazlauskas. *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 3917-3924.
- [25] F. Secundo and G. Carrea. *Chem. Eur. J.*, 9 (2003) 3194-3199.
- [26] L.S. Chua and M.R. Sarmidi. *Enzyme. Microb. Technol* 38 (2006) 551-556.
- [27] Toshifumi Miyazawa, Manabu Hamada, Ryohei Morimoto, Takashi Murashima and Takashi Yamada. *Tetrahedron Letters* 48 (2007) 8334 -8337.
- [28] S. Conde, P. Lopez-Serrano, A. Martinez. *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000) 2537-2545.
- [29] A. Zaks. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 130-136.
- [30] P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. Graille, M. J. Haas. *J. Mol. Catal., B Enzymatic* 9 (2000) 113-148.
- [31] S. Benjamin, A. Pandey. *Yeast* 14 (1998) 1069-1087.
- [32] V. M. Balcao, A. L. Paiva, F. X. Malcata. *Enzyme. Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [33] G. Yadav, K. M. Devi. *Biochem. Eng. Journal* 17 (2004) 57-63.
- [34] S. K. Khare, M. Nakajima. *Food Chemistry* 68 (200) 153-157.
- [35] P. D. Desai, A. M. Dave, and S. Devi. *J. Mol. Cat B: Enzymatic* 31 (2004) 143-150.
- [36] T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russell, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), 7236.
- [37] Y.-F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter, C. H. Wong. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7200.
- [38] K. Nakamura, Y. Takebe, T. Kitayama, A. Ohno. *Tetrahedron Lett.* 32 (1991) 4941.
- [39] F. Secundo, S. Riva, G. Carrea. *Tetrahedron: Asymmetry* 3 (1992) 267.
- [40] S. Parida, J. S. Dordick. *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2253.
- [41] T. Anthonsen, J. A. Jongejan. *Methods Enzymol.* 286 (1997) 473.
- [42] T. Anthonsen, B. H. Ho. *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 199.
- [43] L. Kvittingen, *Tetrahedron* 50 (1994) 8253.
- [44] E. Rubio, F. M. Alfonso, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 695.

- [45] B. Pchelka, A. Loupy and A. Petit. *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 2516-2530.
- [46] Y-C. Cheng, S-W. Tsai. *Tetrahedron Asymmetry* 15 (2004) 2917-2920.
- [47] A. Zaks, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2767.
- [48] E. Rubio, M. A. Fernandez, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1991) 2767.
- [49] D. E. Stevenson, A. C. Storer. *Biotech. Bioeng.* 37 (1991) 519.
- [50] A. Zaks, A.M. Klivanov. *enzymatic reactions in organic media*, Eds. Blackie, London (1996)
- [51] A. Fishman and U. Cogan. *J. Mol. Catal B : Enzymatic* 22 (2003) 193-202.
- [52] S. C. Stinson. *Chem. Eng. News.* 79 (2001) 45.
- [53] A. Schmid, J.S.Dordick, B. Hauer, A.Kiener, M. Wubbolts. *Nature* 409 (2001) 258.
- [54] S. Hazarika, P. Goswami, N. N. Dutta. *Chem. Eng. Journal* 94 (2003) 1-10.
- [55] G.D. Yadav, P.S. Lathi. *J. Mol. Catal B : Enzymatic* 32 (2004) 107-113.
- [56] J. Quan, Z. Chen, C. Han and X. Lin. *Bioorg. Med. Chem.*15 (2007)1741-1748.
- [57] C.-C. Chen, S.-W. Tsai. *Enzyme. Microb. Technol* 36 (2005) 127-132.

CHAPITRE I

METHODES D'ANALYSES STATISTIQUES UTILISEES

I- ANALYSE STATISTIQUE UNIVARIEE

Le but de cette analyse est de caractériser les solvants utilisés en décrivant les différentes caractéristiques ou variables mesurées à l'aide de certains paramètres statistiques de base tels que la moyenne arithmétique (\bar{x} ou \bar{y}), qui est un paramètre de position et de tendance centrale, l'écart-type (s) qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne, les valeurs minimales (x_{\min}) et maximales (x_{\max}) qui donnent toutes les deux une idée sur l'étendue des données et enfin, l'effectif (n) qui nous renseigne sur l'importance des données traitées [1].

Ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données [2], sur les valeurs des caractéristiques physico-chimiques des solvants et sur les valeurs des activités enzymatiques aussi bien pour les réactions d'hydrolyse enzymatique que pour celles de transesterification. Ces calculs ont été également effectués sur les valeurs du facteur d'énantioselectivité (E) et sur celles l'énergie libre de Gibbs de transition $\Delta\Delta G^\ddagger$ obtenues dans le cas de l'étude de l'influence des différents solvants sur l'énantioselectivité.

II- ANALYSE STATISTIQUE BIVARIEE

Cette analyse nous permet de voir le degré de la liaison entre les variables prises deux à deux. Nous avons calculé le coefficient de corrélation de « Bravais Pearson » qui est obtenu à l'aide de la formule suivante [1].

$$r = \frac{\text{COV}(x,y)}{s_x s_y} \quad (1)$$

Où,

Cov(x,y) : covariance par exemple, des variables x et y

s_x et s_y : les écart-types de x et de y.

Ce coefficient est compris entre -1 et +1. Il est en valeur absolue d'autant plus proche de 1 que la liaison entre les deux séries d'observations est nette, pour autant que cette relation soit linéaire ou approximativement linéaire. Au contraire, si le coefficient de corrélation est nul ou presque nul, les deux variables ne sont pas alors corrélées entre elles. D'autre part, le signe du coefficient de corrélation indique si la relation est croissante ou décroissante. En effet, lorsque le coefficient de corrélation est positif, les valeurs élevées d'une variable correspondent dans

l'ensemble aux valeurs élevées de l'autre variable, et les valeurs faibles d'une variable correspondent aux valeurs faibles de l'autre variable. Par contre, lorsque la corrélation est négative, les valeurs élevées d'une variable correspondent dans l'ensemble aux valeurs faibles de l'autre variable et vis versa. Les corrélations ont été calculées pour les réactions d'hydrolyse, pour les réactions de transesterifications et pour l'énantioselectivité avec le logiciel MINITAB (X, 2000).

III- ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE

III-1- Base théorique de la régression linéaire multiple

L'analyse statistique multivariée a trait essentiellement au calcul de modèles à l'aide de la régression linéaire multiple. C'est une méthode statistique dont les principes sont bien connus et se retrouvent exposés dans la plus part des ouvrages classiques relatifs à la régression [3 ,4] ou à la chimiométrie [5,6]. Aussi nous nous contentons d'une représentation relativement succincte de la méthode afin de faciliter sa compréhension.

La régression linéaire repose sur un modèle qui suppose que les données de la variable à expliquer sont fonction linéaire des données des variables explicatives :

$$\mathbf{y} = b_0 \mathbf{1} + \mathbf{x} \mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (2)$$

où, \mathbf{y} est le vecteur colonne $n \times 1$ des données de la variables à expliquer avec n correspond au nombre d'observations (nombre de solvants), b_0 est l'ordonnée à l'origine de l'hyperplan de régression, $\mathbf{1}$ est un vecteur colonne $n \times 1$ des valeurs unité, \mathbf{x} est la matrice $n \times p$ des données des variables explicatives avec p correspondant au nombre de variables explicatives prises en considération, \mathbf{b} est le vecteur colonne $p \times 1$ des coefficients de régression et \mathbf{e} est le vecteur colonne $n \times 1$ des résidus ou erreurs. Une simplification de notation couramment adoptée consiste à inclure l'ordonnée à l'origine b_0 en première position du vecteur \mathbf{b} et à augmenter la matrice \mathbf{x} à gauche d'une colonne de 1. Le modèle s'écrit alors :

$$\mathbf{y} = \mathbf{x} \mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (3)$$

Où, \mathbf{x} est désormais une matrice de dimension $n \times (p+1)$ et \mathbf{b} un vecteur colonne de dimension

$(p+1) \times 1$. L'estimation \hat{b} du vecteur des paramètres b s'obtient par la méthode des moindres carrés. Si l'on désigne par \hat{y} le vecteur des valeurs estimées de la variable dépendante (ou variable à expliquer) à l'aide du modèle, on a :

$$\hat{y} = X \hat{b} \quad (4)$$

et le vecteur colonne \hat{e} des résidus observés s'obtient par :

$$\hat{e} = y - \hat{y} = y - X \hat{b} \quad (5)$$

L'estimation de b au sens des moindres carrés consiste à calculer les éléments du vecteur \hat{b} de façon à minimiser la somme des carrés des résidus,

$$\hat{e}'\hat{e} = \sum_{i=1}^n \hat{e}_i^2 \quad (6)$$

Où, \hat{e}' est la transposée de \hat{e} .

La solution est donnée par :

$$\hat{b} = (X'X)^{-1}X'y \quad (7)$$

Pour autant que l'inverse de la matrice $X'X$ existe [7]. La transposée de la matrice X est notée X' et son inverse X^{-1} . Sous la condition d'existence citée précédemment, la matrice de variances-covariances du vecteur \hat{b} vaut:

$$\Sigma_{\hat{b}} = \hat{\sigma}^2 (X'X)^{-1} \quad (8)$$

[8], où la variance résiduelle estimée appelée également erreur standard, $\hat{\sigma}^2$ se calcule par :

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\hat{e}'\hat{e}}{n-p-1} \quad (9)$$

La somme des carrés des écarts des résidus, $\hat{e}'\hat{e}$, peut encore s'écrire :

$$\hat{e}'\hat{e} = y'y - \hat{b}'x'y \quad (10)$$

soit la différence entre la somme des carrés des observations de la variable dépendante et la somme des carrés expliqués par la régression. Cette dernière somme des carrés est habituellement décomposée en une somme des carrés liée à la présence du terme indépendant dans le modèle,

$$\frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{n} \quad (11)$$

et en une somme des carrés liée à la présence des autres paramètres,

$$\frac{\hat{b}'x'y - \sum_{i=1}^n y_i^2}{n} \quad (12)$$

On peut ainsi construire un tableau d'analyse de la variance (tableau 1)

Tableau 1. Tableau d'analyse de la variance d'une régression linéaire multiple avec un terme indépendant

Source de variation	ddl	SCE	CM
Expliquée par la régression	p	$\frac{\hat{\mathbf{b}}' \mathbf{X}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2}{n}$	$\text{CM}_{\text{régr}}$
Résidus	n-p	$\hat{\mathbf{e}}' \hat{\mathbf{e}}$	$\hat{\sigma}^2$
Variation totale	n-1	$\frac{\mathbf{y}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2}{n}$	-

Cette décomposition de la somme des carrés totale permet d'aboutir à la définition du coefficient de détermination R^2 , qui représente la part de la variance de la variable dépendante expliquée par la régression :

$$R^2 = \frac{\hat{\mathbf{b}}' \mathbf{X}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2 / n}{\mathbf{y}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2 / n} = 1 - \frac{\hat{\mathbf{e}}' \hat{\mathbf{e}}}{\mathbf{y}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2 / n} \quad (13)$$

Ce coefficient de détermination R^2 est une estimation biaisée du coefficient théorique correspondant. Une estimation moins biaisée est formé par le coefficient de détermination ajusté, R^2_{adj} , dans la définition du quel on tient compte des nombres de degrés de liberté associés aux différentes sommes des carrés des écarts :

$$R^2_{\text{adj}} = 1 - \frac{\hat{\mathbf{e}}' \hat{\mathbf{e}} / (n-p)}{\left[\mathbf{y}' \mathbf{y} - \sum_{i=1}^n y_i^2 / n \right] / (n-1)} = 1 - (1-R^2) \left(\frac{n-1}{n-p} \right) \quad (14)$$

La recherche de modèle exprimant l'activité enzymatique en fonction des paramètres physico-chimiques des solvants organiques a été effectuée dans le cas des réactions d'hydrolyse

enzymatique et dans le cas des réactions de transesterifications. Tandis que pour l'énantioselectivité le calcul des modèles a été fait en exprimant le facteur d'énantioselectivité E et l'énergie libre de Gibbs de transition $\Delta\Delta G^\ddagger$, en fonction des paramètres physico-chimiques des solvants organiques. Tous les calculs ont été réalisés avec le logiciel MINITAB (version 14.31).

III-2- Méthodes de sélection des variables explicatives

Différentes stratégies visant à identifier les variables explicatives à conserver ou à éliminer du modèle ont été proposées afin de ne conserver comme prédicteurs que les variables peu ou pas corrélées entre elles mais corrélées aux variables dépendantes. Ces méthodes sont les suivantes :

1- La méthode de toutes les combinaisons possibles, qui consiste à calculer toutes les équations de régression possibles, puis à choisir parmi elles celles qui sont les plus significatives. Cette méthode n'est utilisable, en pratique, que pour un nombre relativement faible de variables explicatives. Pour un grand nombre de variables explicatives, cette méthode nécessite, en effet, un temps de calcul trop important [1].

Lorsque le nombre de variables explicatives est très élevé, on utilise généralement l'une des trois techniques suivantes : la sélection progressive, la sélection régressive et la sélection mixte ou régression mixte ou pas à pas « stepwise » [1].

2- La sélection progressive des variables explicatives consiste à choisir les variables de proche en proche, en assurant chaque fois le minimum de la variance résiduelle jusqu'au moment où l'introduction d'une nouvelle variable ne provoque plus de réduction significative de la variance résiduelle.

3- La sélection régressive des variables explicatives a pour principe de partir de l'équation de régression la plus complexe, dans laquelle figurent toutes les variables explicatives, et de procéder à des éliminations successives jusqu'au moment où tous les coefficients de régression partiels sont significatifs pour un niveau de signification α préalablement fixé.

4- La sélection mixte ou régression pas à pas « stepwise », qui est considérée comme une combinaison des deux précédentes techniques, procède par introductions successives des

variables explicatives, mais de telle sorte, qu'avant l'introduction d'une variable supplémentaire, la signification des variables explicatives déjà présentes dans l'équation soit testée. Dans le cas échéant, les variables qui n'apporteraient pas une contribution significative à la régression sont éliminées. C'est la méthode que nous avons utilisé dans le calcul des modèles, (avec $\alpha = 5\%$, tant à l'entrée qu'à la sortie des variables du modèle), du fait que c'est un bon compromis entre les deux techniques précédentes.

III-3- Calcul des modèles

Nous avons vu précédemment que la construction des modèles qui constitue la phase ajustement de la régression linéaire est effectuée par la méthode des moindres carrés. Cependant, cette méthode donne parfois pour la même variable dépendante et pour les mêmes observations plusieurs modèles plus au moins équivalents et ceci pour la même valeur du niveau de signification α .

Aussi pour, d'une part, sélectionner et d'autre part, comparer les modèles entre eux, il faut calculer pour chaque équation de régression, des paramètres statistiques. Ces paramètres sont, en majorité, données automatiquement par le logiciel MINITAB et d'autres sont facilement calculés. Ils sont subdivisés en deux groupes. Le premier groupe est relatif aux paramètres concernant la qualité de l'ajustement du modèle et sera étudié dans cette partie alors que le deuxième groupe a trait aux paramètres concernant la qualité de la validation du modèle par la méthode du jackknife, et sera étudié plus en détails, par la suite dans la phase validation. Les paramètres caractérisant l'ajustement du modèle sont :

- le coefficient de détermination R^2 ,
- le coefficient de détermination ajusté R^2_{adj} ,
- la valeur de la variable F_{obs} de FISHER,
- la valeur de la probabilité P ,
- la valeur de l'écart -type résiduel $S_{y,x}$.

a) Le coefficient de détermination R^2

Afin de se faire une idée sur la qualité de l'ajustement réalisé par la méthode des moindres carrés, on utilise le coefficient de détermination R^2 , cité précédemment. Ce paramètre correspond au carré du coefficient de corrélation. Il est compris entre 0 et 1 et s'exprime toujours en %.

Si la valeur de R^2 est proche de 1 ou 100%, l'ajustement est alors d'excellente qualité. Par contre, si la valeur de R^2 est faible et tend, plus particulièrement vers 0 ou 0%, l'ajustement est mauvais.

b) Le coefficient de détermination ajusté R^2_{adj}

Le R^2_{adj} est utilisé pour comparer des modèles comportant des nombres de termes différents. C'est la valeur de R^2 ajusté en fonction du nombre de degrés de liberté. Si une variable est ajoutée à l'équation, R^2 augmente même si cette variable n'a pas de valeur réelle. Pour compenser cet effet, MINITAB imprime également R^2 ajusté, qui constitue une estimation approximative sans biais de R^2 pour la population. Ce paramètre qui a été défini précédemment est donné par la formule suivante:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{n-1(1-R^2)}{n-p} \text{ convertie en \%} \quad (15)$$

Dans cette formule, p est le nombre de coefficients ajustés dans l'équation de régression et n représente le nombre d'observations (ou solvants) utilisées [9-11].

c) La valeur de F_{obs} de FISHER

La valeur de F_{obs} est donnée par le test de signification des coefficients de régression du modèle. Ce test est réalisé par l'analyse de la variance citée ci-dessus. La valeur de F_{obs} est comparée avec une valeur théorique $F_{1-\alpha}$ tirée à partir des tables de FISHER pour un niveau de signification α donné et pour k_1 et k_2 degrés de liberté. Si la valeur de $F_{obs} \geq F_{1-\alpha}$, alors les coefficients de régression sont significativement différents de zéro. Dans le cas contraire, si $F_{obs} < F_{1-\alpha}$, alors le modèle n'est pas significatif et par conséquent il est mauvais.

d) La probabilité P

Une autre façon de tester la signification du modèle est de calculer la probabilité P de mettre en évidence des différences significatives entre les valeurs des coefficients de régression partiels et la valeur zéro. Ensuite, on compare la valeur de cette probabilité P avec le niveau de

signification $\alpha = 0,05$. Si la valeur de $P \leq \alpha = 0,05$, alors on dit qu'il existe des différences significatives entre zéro et les valeurs des coefficients de régression, et par conséquent le modèle calculé est significatif. Dans le cas contraire, si $P > \alpha = 0,05$, alors les différences entre zéro et les valeurs des coefficients de régression partiels ne sont pas significatives, et le modèle n'est pas significatif (modèle de mauvaise qualité).

e) L'écart type résiduel ($s_{y.x_i}$)

C'est la racine carrée de la variance résiduelle. Ce paramètre est également appelé **l'erreur d'estimation** ou **erreur de prédiction**, c'est l'erreur que l'on commettrait en utilisant l'équation de régression pour faire des estimations ou des prévisions ou des prédictions.

Ce paramètre constitue une mesure de la dispersion des points observés autour de la droite de régression de y en x . Il correspond à la part de la variance totale de y qui n'est pas "expliquée" ou "justifiée" par la régression. Pour « p » variables explicatives, l'écart type estimé s'écrit :

$$s_{y.x_i} = \sqrt{\frac{1}{n-p-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}(x_i))^2} \quad (16)$$

Où :

- n nombre total d'individus ou de composés,
- p nombre de variables explicatives intervenant dans le calcul de $\hat{y}(x_i)$.

Si l'écart résiduel est très faible et tend vers zéro, il s'agit d'une bonne équation de régression qui prédit des valeurs qui se rapprochent des vraies valeurs (réelles). Si, par contre, la valeur de l'écart type résiduel est grande, nous avons alors une très mauvaise équation de régression qui prédit des valeurs fortes différentes des vraies valeurs observées.

III-4- Validation des modèles calculés

a) Introduction

Après avoir calculé les paramètres d'une équation de régression linéaire simple ou multiple, il est indispensable de vérifier que la solution obtenue répond au problème posé, c'est-à-dire permet de prédire de façon suffisamment précise la valeur prise par la variable dépendante y pour des valeurs données des variables explicatives x . A cette fin, on recourt à diverses techniques de validation. Ces techniques aboutissent au calcul de paramètres statistiques qui mesurent l'exactitude des estimations obtenues à l'aide de l'équation. Ces mêmes paramètres peuvent servir de critères de choix de plusieurs équations ont été calculées pour résoudre un problème donné.

b) Les sources d'erreur de prédiction

La qualité des prédictions réalisées à l'aide d'une équation de régression est influencée par de nombreux phénomènes, qui donnent lieu à plusieurs sources d'erreur. Dans un monde idéal, une équation de régression correctement développée devrait permettre d'estimer sans erreur les valeurs de la variable dépendante y en fonction des valeurs prises par les variables explicatives x et ce, pour l'ensemble de la population concernée.

En pratique, cependant, plusieurs sources d'erreur entrent en jeu et donnent naissance à des écarts entre les valeurs observées et les valeurs prédites de la variable dépendante pour les mêmes objets. Ces sources d'erreur se répartissent en quatre catégories : les erreurs liées à l'équation de régression, les erreurs liées au manque de représentativité du jeu de données de l'ajustement, le bruit aléatoire entachant ces mêmes données et le bruit aléatoire entachant les données du jeu de validation.

c) Les paramètres de mesure de l'erreur de prédiction

Lorsqu'on utilise une équation de régression linéaire pour prédire la valeur de la variable dépendante y , on souhaite que la valeur prédite \hat{y} s'écarte le moins possible de la valeur réelle y pour l'objet en question; c'est-à-dire que la différence $y - \hat{y}$ soit proche de zéro. Cette différence constitue une mesure naturelle de l'aptitude à la prédiction de l'équation de régression pour l'objet considéré.

En pratique, on souhaite chiffrer l'exactitude des prédictions obtenues à l'aide d'une équation de régression pour l'ensemble de la population des objets à laquelle elle est susceptible d'être appliquée.

Le paramètre le plus couramment employé à cette fin est **l'erreur quadratique moyenne** (Mean Square Error, MSE), ou espérance mathématique des carrés des écarts entre les valeurs réelles de y_i et les valeurs prédites \hat{y}_i correspondantes pour l'ensemble des objets.

$$\text{MSE} = E\left(y_i - \hat{y}_i\right)^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{y}_i\right)^2 \quad (17)$$

Afin de disposer d'un paramètre exprimé dans les mêmes unités que la variables dépendante, on considère souvent sa racine carrée, notée RMSE (Root Mean Square Error).

Faute de pouvoir mesurer la valeur de la variable dépendante pour l'ensemble des individus de la population, ce qui rendrait d'ailleurs inutile l'établissement d'une équation de régression, l'erreur quadratique moyenne doit être estimée. Dans les situations les plus simples, il est possible de calculer une situation de ce paramètre à partir des formules issues de la théorie des modèles linéaires et d'informations concernant la distribution théorique des erreurs [3].

Cependant, dans la plupart des cas il n'est pas toujours possible de suivre cette approche et on estime alors, l'erreur quadratique moyenne à partir d'un nombre limité d'objets appartenant à un jeu de données de validation réservées spécialement à cet usage (validation externe) ou au jeu de données d'ajustement lui-même (validation interne).

- La validation externe

La validation externe permet d'estimer l'erreur quadratique moyenne à partir d'un échantillon d'objets prélevés dans la population à laquelle l'équation de régression s'applique mais différents des objets faisant partie de l'échantillon d'ajustement. Soit n_v , l'effectif de l'échantillon de validation.

L'erreur quadratique moyenne calculée à partir de cet échantillon porte le nom **d'erreur**

quadratique moyenne de prédiction (Mean Square Error of Prediction : MSEP) et se calcule simplement par:

$$\text{MSEP} = \frac{1}{n_v} \sum_{i=1}^{n_v} (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (18)$$

Sa racine carrée se note RMSEP ou parfois RMSP (Root Mean Square Error of Prediction). A partir des mêmes individus, on peut estimer la variance de prédiction pour toute la population :

$$\hat{\sigma}_p^2 = \frac{1}{n_v - 1} \sum_{i=1}^{n_v} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (19)$$

Où,
$$\bar{y} = \frac{1}{n_v} \sum_{i=1}^{n_v} \hat{y}_i$$

Sa racine carrée est l'**écart-type de prédiction** (SEP), appelée aussi fréquemment **écart-type de validation (externe)** (SEV).

Pour autant qu'elle s'appuie sur un échantillon de validation d'effectif élevé et constitué d'objets représentatifs de l'ensemble de la population, la validation externe fournit une estimation fiable de l'erreur quadratique moyenne.

- La validation interne

Par opposition à la validation externe, la validation interne emploie les données du jeu d'ajustement pour procéder à la validation.

Une première façon de procéder consiste à estimer l'erreur quadratique moyenne à l'aide de l'ensemble des données du jeu d'ajustement. On définit ainsi l'**erreur quadratique moyenne d'ajustement**, aussi appelée **erreur quadratique moyenne d'estimation** par :

$$\text{MSEE} = \frac{1}{n_a - dl} \sum_{i=1}^{n_a} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (20)$$

Dans cette expression, n_a représente l'effectif de l'échantillon d'ajustement et dl le nombre de degrés de liberté du modèle. Ce nombre de degrés de liberté est tout simplement le nombre de coefficients estimés lors du calcul de l'équation de régression.

Dans le cas de la régression linéaire multiple cette erreur quadratique moyenne d'ajustement est un estimateur de la variance résiduelle du modèle. Cependant, l'erreur quadratique moyenne d'ajustement sous estime l'erreur quadratique moyenne du modèle, puisqu'elle ne prend en compte que la variance résiduelle, négligeant complètement la variance des coefficients de régression. Dès lors, il n'est pas recommandable d'employer ce paramètre ou sa racine carrée pour la validation d'un modèle.

- Une seconde façon de valider une équation de régression linéaire à partir des données du jeu d'ajustement repose sur le mécanisme de la validation croisée [12]. Cette méthode de validation permet de valider le modèle d'ajustement à l'aide d'un jeu de données indépendant de celui ayant servi à estimer les coefficients du modèle, tout comme la validation externe, mais contrairement à celle-ci, elle évite de devoir sacrifier une part non négligeable des données disponibles à la seule validation.

Cette méthode appelée **validation croisée complète** (full cross-validation) ou méthode du jackknife consiste à estimer les coefficients de l'équation d'ajustement à partir du jeu de données d'ajustement dont on enlève l'observation i et à calculer, pour cette observation, le résidu de prédiction $y_i - \hat{y}_i$. Ce résidu n'est rien d'autre que la différence observée entre la valeur de la variable dépendante pour l'observation i (y_i) et la valeur prédite, pour cette même observation, à l'aide de l'équation d'ajustement établie en enlevant l'observation i du jeu de données d'ajustement (\hat{y}_i). On répète cette démarche pour chaque observation du jeu de données d'ajustement et on calcule ensuite **la somme des carrés des erreurs de prédiction** (Predicted Residual Error Sum of Squares, Press) [13].

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^{n_a} (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (21)$$

En divisant cette quantité par l'effectif n_a du jeu de données d'ajustement, on aboutit à l'**erreur quadratique moyenne de validation croisée** (Mean Square Error of cross-validation, MSECv) :

$$\text{MSECv} = \frac{1}{n_a} \text{PRESS} \quad (22)$$

qui est une estimation de l'erreur quadratique moyenne théorique définie précédemment. On considère souvent sa racine carrée afin de disposer d'un paramètre de validation exprimé dans les mêmes unités que la variable dépendante, et qu'on note :

$$\text{RMSECv} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n_a}} = \left(\frac{\text{PRESS}}{n_a}\right)^{1/2} \quad (23)$$

- Enfin, la validation de l'équation de régression peut aussi reposer sur la technique du **bootstrap** [14]. Cette technique, consiste à simuler m (généralement supérieur à 30) échantillons de même taille n que l'échantillon initial. Ils sont obtenus par tirage au hasard avec remise parmi les n individus observés au départ, ceux-ci ayant tous la même probabilité $1/n$ d'être choisis. Certains individus auront de ce fait un poids élevé (2,3,...) alors que d'autres seront absents (poids nul).

Le bootstrap n'est rien d'autre qu'une technique de simulation particulière, fondée sur la distribution empirique de l'échantillon de base.

Cette méthode est employée pour analyser la variabilité de paramètres statistiques simples en produisant des intervalles de confiance de ces paramètres.

Elle donne dans la plupart des cas une bonne image de la précision statistique de l'estimation de l'échantillon [15].

En ce qui nous concerne, nous avons pris en considération comme paramètres statistiques pour juger de la qualité de la validation interne des modèles :

- le PRESS statistique,
- l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (méthode jeckknife) (RMSECV),
- et le coefficient de détermination de prédiction $R^2_{\text{préd}}$ obtenu simplement par :

$$R^2_{\text{préd}} = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum_{i=1}^{n_a} (y_i - \bar{y})^2} \quad (24)$$

Les valeurs de ces paramètres sont fournies automatiquement par le logiciel MINITAB [2].

CHAPITRE II

INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES SUR L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES REACTIONS D'HYDROLYSE

Ce chapitre est consacré à la recherche de la rationalisation de la relation solvant-activité enzymatique dans les réactions d'hydrolyse où un solvant organique est rajouté.

Dans une première phase il s'agit d'effectuer les réactions nécessaires et de mesurer l'activité enzymatique dans chacun des solvants utilisés, puis, dans une deuxième phase, de procéder à l'analyse statistique des données collectées dans le but de modéliser la relation « activité enzymatique-nature du solvant organique ».

I- COLLECTE DES DONNEES

Les réactions ont été effectuées sur trois substrats : un ester non fonctionnalisé, le butyrate d'éthyle, et deux esters fonctionnalisés, l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle. Ces trois esters possèdent des structures et des polarités qui leur confèrent des solubilités dans l'eau différentes (Tableau 2).

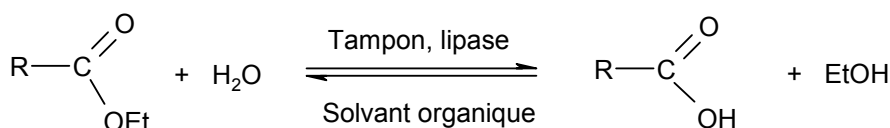
Tableau 2. Solubilité dans l'eau des trois esters utilisés.

	Substrat	Solubilité dans l'eau (% masse)*
1	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	0,49
2	CH ₂ =CH- COO- C ₂ H ₅	1,5
3	CH ₃ -CO-CH ₂ - COO- C ₂ H ₅	12

* masse de substrat en gramme par 100g d'eau.

Les enzymes employées dans cette étude sont des lipases commerciales : la lipase pancréatique de porc (LPP) et la lipase de *Candida rugosa* (CRL).

Les réactions sont effectuées dans une solution tampon, en présence du biocatalyseur et d'un solvant organique :



Les 25 solvants employés sont répertoriés dans le tableau 3, dans lequel sont également spécifiés les paramètres physico-chimiques utilisés dans notre étude, à savoir, le logarithme du coefficient de partage eau/n-octanol ($\text{Log}P$), le paramètre de Reichardt-Demroth normalisé (E_T^N), le paramètre de solubilité de Hildebrand (δ) et l'indice de réfraction (n_D) [16-18].

Tableau 3. Valeurs des paramètres physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans les réactions d'hydrolyse enzymatique et les réactions de transésterification des trois esters étudiés.

N°	Solvant	Log <i>P</i>	E _T ^N	δ	n _D
1	DMF	-1,01	0,355040	24,0	1,4305
2	Acetonitrile	-0,34	0,279220	24,2	1,3441
3	Dioxane	-0,27	0,177900	20,5	1,4224
4	Acetone	-0,24	0,293220	19,7	1,3587
5	Butan-2-one	0,29	0,280480	19,0	1,3788
6	THF	0,46	0,280480	19,0	1,4072
7	Pyridine	0,65	0,331360	15,4	1,5102
8	Diethyl ether	0,89	0,187024	20,3	1,3524
9	Dichloromethane	1,25	0,254480	18,9	1,4242
10	Chloroforme	1,97	0,185840	18,8	1,4459
11	Benzène	2,13	0,118420	18,5	1,5011
12	Fluorobenzène	2,27	0,180340	17,2	1,4684
13	Chlorobutane	2,64	0,225500	18,2	1,4023
14	Toluène	2,73	0,111460	17,6	1,4969
15	Tétrachlorométhane	2,83	0,087120	19,4	1,4602
16	Chlorobenzène	2,84	0,222720	20,0	1,5248
17	Bromobenzène	2,99	0,223800	18,0	1,5568
18	Ethylbenzène	3,15	0,109560	15,8	1,4959
19	Dibutylether	3,21	0,018500	19,0	1,3992
20	Tétrachloroéthylène	3,40	0,241980	16,8	1,5057
21	Cyclohexane	3,44	0,044100	14,9	1,4262
22	Hexane	3,98	0,018500	15,2	1,3749
23	Heptane	4,57	0,026080	15,5	1,3876
24	Nonane	5,81	0,035520	15,6	1,4054
25	Décane	6,78	0,046360	15,8	1,4119

L'activité enzymatique est mesurée à partir de la neutralisation de l'acide formé au cours de la réaction d'hydrolyse de l'ester étudié. Ce suivi est effectué automatiquement à l'aide d'un pH stat piloté par ordinateur.

La collecte des données a donc porté sur les valeurs des paramètres physico-chimiques des solvants organiques utilisés, ainsi que sur les valeurs de l'activité enzymatique exprimées en

terme de vitesse initiale. Le tableau 4 ci-dessous, donne les valeurs de l'activité enzymatique (y) exprimée en terme, de vitesse initiale (mM/min/g), obtenues pour chacun des trois esters étudiés (E_1 , E_2 , E_3) et pour les vingt cinq solvants organiques testés dans la réaction d'hydrolyse pour les deux lipases, LPP et CRL.

Tableau 4. Valeurs des activités enzymatiques (y) exprimées en mM/min/g.

N°	Solvant	LPP			CRL		
		E_1	E_2	E_3	E_1	E_2	E_3
		Y_{L1}	Y_{L2}	Y_{L3}	Y_{C1}	Y_{C2}	Y_{C3}
1	DMF	0,158	0,374	0,168	0,076	0,045	0,365
2	Acetonitrile	0,159	0,033	0,046	0,054	0,044	0,047
3	Dioxane	0,260	0,052	0,046	0,081	0,058	0,052
4	Acétone	0,238	0,060	0,442	0,074	0,049	0,674
5	Butan-2-one	0,030	*	0,035	0,072	0,053	0,064
6	THF	1,097	0,046	0,037	0,070	0,061	0,076
7	Diéthyléther	0,239	0,051	0,059	0,039	0,056	0,229
8	Dichloromethane	0,029	0,035	0,035	0,025	0,035	0,030
9	Chloroforme	0,032	0,032	0,701	0,027	0,032	0,701
10	Benzène	0,096	0,028	0,321	0,092	0,050	0,044
11	Fluorobenzène	0,022	0,016	0,264	0,093	0,044	0,060
12	Chlorobutane	0,373	0,037	0,049	0,026	0,037	0,063
13	Toluène	0,101	0,019	0,044	0,059	0,040	0,066
14	Tétrachlorométhane	0,144	0,020	0,052	0,054	0,048	0,060
15	Chlorobenzène	0,094	0,023	0,032	0,105	0,048	0,042
16	Bromobenzène	0,081	0,017	0,027	0,102	0,026	0,027
17	Ethylbenzène	0,106	0,019	0,047	0,076	0,045	0,062
18	Dibutyléther	0,123	0,029	0,235	0,074	0,041	0,061
19	Tétrachloroéthylène	0,116	0,015	0,035	0,415	0,015	0,035
20	Cyclohexane	0,209	0,024	0,061	0,069	0,040	0,040
21	Hexane	0,163	0,032	0,476	0,066	0,039	0,053
22	Heptane	0,265	0,027	0,005	0,059	0,030	0,642
23	Octane	0,165	0,029	0,059	0,050	0,021	0,045
24	Nonane	0,171	0,025	0,049	0,171	0,020	0,061
25	Décane	0,023	0,019	0,057	0,059	0,041	0,055

NB: LPP : Lipase de Pancréas de Porc. CRL: Lipase de *Candida rugosa*. E_1 : Butyrate d'éthyle. E_2 : Acrylate d'éthyle. E_3 : Acétoacétate d'éthyle

II- ANALYSE ET RESULTATS STATISTIQUES

II-1- Cas de la lipase CRL

II-1-1- L'analyse statistique univariée

Les résultats de cette analyse, obtenus pour la CRL, sont donnés par le tableau 5.

Tableau 5. Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés dans le cas de l'hydrolyse par la lipase CRL.

Variables	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$x_{\min} \sim x_{\max}$
$\text{Log}P(x_1)$	25	2,438	1,992	-1,010 ~ 6,780
La polarité $E_T^N(x_2)$	25	0,1616	0,1033	0,0185 ~ 0,3550
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	25	18,292	2,463	14,900 ~ 24,200
Indice de réfraction $n_D(x_4)$	25	1,4312	0,0568	1,3441 ~ 1,5568
Activité enzymatique (y_{C1})	25	0,0835	0,0753	0,0250 ~ 0,4150
Activité enzymatique (y_{C2})	25	0,04072	0,01182	0,01500 ~ 0,06100
Activité enzymatique (y_{C3})	25	0,1462	0,2109	0,0270 ~ 0,7010

L'examen de ce tableau montre, qu'on moyenne, l'activité enzymatique (y_C) de la CRL varie selon le substrat de la manière suivante : l'acétoacétate d'éthyle est plus rapidement hydrolysé que le butyrate d'éthyle, lui-même plus rapidement hydrolysé que l'acrylate d'éthyle.

II-1-2- L'analyse statistique bivariée

A partir des matrices de données de dimensions 25 x 7 (25 solvants organiques testés et 7 variables quantitatives dont 4 sont des paramètres physico-chimiques des solvants et les 3 autres, sont les activités enzymatiques obtenues pour chacun des trois esters cités précédemment), nous avons calculé les corrélations deux à deux entre les sept variables. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 6.

Tableau 6. Matrice de corrélation calculée entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la lipase CRL.

	y_{C1}	y_{C2}	y_{C3}	$x_1(\text{Log}P)$	$x_2(E^N_T)$	$x_3(\delta)$
x_1 ($\text{Log}P$)	0,180 (0,388)	-0,618 (0,001) ***	-0,208 (0,319)			
x_2 (E^N_T)	0,090 (0,668)	0,309 (0,132)	0,152 (0,467)	-0,804 (0,000) ***		
x_3 (δ)	0,046 (0,826)	0,248 (0,232)	0,045 (0,830)	-0,752 (0,000) ***	0,810 (0,000) ***	
x_4 (n_D)	0,367 (0,071)	-0,215 (0,301)	-0,280 (0,176)	0,182 (0,384)	0,028 (0,894)	0,113 (0,592)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. * : corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. **: corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'analyse de la matrice de corrélation du tableau 6, montre une très forte corrélation négative entre l'activité enzymatique (y_{C2}) obtenue avec l'acrylate d'éthyle et $\text{Log}P$ (x_1). On remarque également que $\text{Log}P$ (x_1) est très fortement corrélée négativement avec la polarité E^N_T (x_2) et avec le paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3). Cette dernière caractéristique est également très fortement corrélée positivement avec la polarité E^N_T (x_2).

II-1-3- L'analyse statistique multivariée

Cette partie porte essentiellement sur le calcul de modèles exprimant l'activité enzymatique de la CRL, utilisée dans l'hydrolyse, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des solvants organiques. La régression linéaire multiple au sens des moindres carrés a été utilisée. La sélection des variables explicatives faisant partie du modèle a été effectuée à l'aide de la procédure stepwise du logiciel MINITAB (version 14.31), en prenant comme niveau de signification $\alpha = 0,05$ tant que pour l'entrée que pour la sortie des variables.

a) Calculs des modèles dans le cas du butyrate d'éthyle (y_{C1})

La recherche de modèles exprimant l'activité hydrolytique y_{C1} en fonction des variables explicatives (paramètres physico-chimiques), ne donne aucun modèle significatif.

Cependant, après élimination des « données anormales » (solvants présentant des valeurs résiduelles élevées) qui sont : tétrachloroéthylène, bromobenzène, dichlorométhane, chloroforme, chlorobutane et nonane, la stepwise permet l'obtention d'un modèle significatif mais de mauvaise qualité pour y_{C1} (Tableau 7).

Tableau 7. Modèle calculé par la stepwise pour l'activité (y_{C1}) dans le cas de l'hydrolyse par la CRL du butyrate d'éthyle.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	19	$y_{C1} = 0,188 - 0,181 n_D$	36,8	33,1	9,92	0,006**	0,0132	16,89	0,00392	$1,75 \cdot 10^{-4}$

NB : * : Modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : Modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : Modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

Il semble donc que les descripteurs utilisés ne sont pas appropriés pour décrire le phénomène étudié. En d'autres termes, les paramètres de polarité des solvants utilisés sont de mauvais descripteurs de l'influence du solvant sur l'activité enzymatique de la CRL dans la réaction d'hydrolyse du butyrate d'éthyle.

b) Calculs des modèles dans le cas de l'acrylate d'éthyle (y_{C2})

La recherche de modèles exprimant l'activité hydrolytique y_{C2} en fonction des variables explicatives (paramètres physico-chimiques), ne donne non plus aucun modèle significatif pour l'ensemble des 25 solvants. Cependant, après élimination de six « données anormales » qui sont celles relatives aux solvants suivants : décane, DMF, acétonitrile, acétone, chloroforme et dibutylether, la stepwise permet l'obtention d'un très bon modèle (Tableau 8).

Tableau 8. Modèles calculés pour l'activité y_{C2} dans le cas de l'hydrolyse par la CRL de l'acrylate d'éthyle.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	19	$y_{C2} = 0,0605 - 0,00636 \text{ Log}P$	88,7	88	133,22	0,000***	0,00381	84,95	0,000328	$1,453 \cdot 10^{-5}$

NB : * : Modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : Modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : Modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

• Validation croisée

La validation croisée a consisté à partager aléatoirement les dix neuf données utilisées pour l'obtention de deux groupes de dix et neuf solvants chacun.

Pour chacun des deux groupes de solvants, la stepwise a donné un modèle linéaire simple très hautement significatif. Ces modèles sont résumés avec leurs paramètres statistiques dans le tableau 9.

Tableau 9. Modèles calculés pour l'activité y_{C2} dans le cas de l'hydrolyse par la CRL de l'acrylate d'éthyle.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y.x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	10	$y_{C2} = 0,0663 - 0,00795 \text{ Log}P$	96,2	95,8	204,58	0,000***	0,00276	93,85	0,000099	$7,61 \cdot 10^{-6}$
2	9	$y_{C2} = 0,0556 - 0,00487 \text{ Log}P$	91,7	90,5	77,20	0,000***	0,00257	85,94	0,000078	$6,59 \cdot 10^{-6}$

NB : *: modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. **: modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

La comparaison des deux modèles ci-dessus, montre que celui obtenu pour la première série de solvants est meilleur du point de vue ajustement mais de moindre qualité dans la validation interne que le modèle calculé sur la deuxième série où, la somme des carrés des erreurs de prédiction (PRESS) a diminué d'environ 0,099 % à 0,078 %. De même, la moyenne quadratique des résidus prédits (MSE) est passée $7,61 \times 10^{-6}$ à $6,59 \times 10^{-6}$. Les deux modèles se rapprochent, cependant, du modèle n°1 (Tableau 8) calculé pour la totalité des 19 solvants.

Par la suite, chacun des deux modèles a été validé sur la série de variables explicatives n'ayant pas servi à son obtention. Les paramètres statistiques de cette validation croisée sont donnés dans le tableau 10.

Tableau 10. Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus pour l'activité y_{C2} dans le cas de l'hydrolyse par la CRL.

Effectifs des solvants (n)	Modèle M	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
10	M ₁ calculé sur 10 et validé sur 9	$\hat{y}_{M1} = -0,01859 + 1,498 y_{ob}$	91,7	0,0442	0,0476	0,003422	0,00629
9	M ₂ calculé sur 9 et validé sur 10	$\hat{y}_{M2} = 0,01598 + 0,5892 y_{ob}$	96,2	0,0429	0,0412	0,001647	0,005677

Les résultats de la validation croisée (tableau 10) montrent que le modèle n°2 (tableau 9) est meilleur que le modèle n°1 (tableau 9) car il présente la plus forte valeur de R² et les plus faibles valeurs des paramètres calculés sur les résidus.

Le meilleur modèle validé est donc : $y_{C2} = 0,0556 - 0,00487 \text{ Log}P$.

Il montre que l'activité enzymatique augmente avec la polarité des solvants, exprimée en terme de LogP.

Cette relation pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation de la polarité du solvant va accroître sa capacité d'extraction du substrat dissout dans la phase aqueuse. La concentration de celui-ci va donc augmenter, non seulement dans le solvant, mais également à l'interface « eau-phase organique », lieu d'action des lipases [19].

Cette explication est confortée par les résultats précédents relatifs à l'hydrolyse du butyrate d'éthyle. Celui-ci étant quasiment insoluble dans l'eau et soluble dans la majorité des solvants organiques utilisés, le modèle calculé n'exprimait que très faiblement cette relation entre l'activité enzymatique et la polarité des solvants.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'étudier l'hydrolyse d'un ester plus soluble dans l'eau que les deux précédents, à savoir l'acétoacétate d'éthyle.

c) Calculs des modèles dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle (y_{C3})

Pour l'acétoacétate d'éthyle, l'application de la méthode stepwise sur les dix-neuf solvants après élimination de six données anormales (heptane, diéthyléther, acétone, DMF, acétonitrile et dichlorométhane), donne deux modèles significatifs au niveau $\alpha = 0,05$, tant pour l'entrée que pour la sortie des variables. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C3} dans le cas de l'hydrolyse par la CRL de l'acétoacétate d'éthyle

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	19	$y_{C3} = 0,0456 - 0,0826 E^N_T$	50,7	47,8	17,46	0,001**	0,00766	38,82	0,00124	$5,9 \cdot 10^{-5}$
2	19	$y_{C3} = 0,0300 + 0,00327 \text{Log}P + 0,125 E^N_T$	66,2	62,0	15,69	0,000***	0,00654	53,73	0,00094	$4,25 \cdot 10^{-5}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 11 montre que le modèle n°2 est meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction. La valeur du coefficient de détermination (R^2) qui exprime le pourcentage d'explication des variables explicatives pour la réponse (y), passe de 50,7% à 66,2%, de même pour la valeur du coefficient de détermination ajusté (R^2_{adj}) qui croit de 47,8% à 62,0%. Une nette amélioration est remarquée dans la valeur de F_{obs} . Ce modèle est aussi jugé meilleur par ses paramètres statistiques de prédiction qui sont nettement meilleurs que ceux du modèle n°1.

• Validation croisée

L'effectif des dix neuf solvants a été partagé aléatoirement en deux groupes. Le premier en comprend dix et le second neuf. La stepwise donne deux modèles pour le premier groupe de solvants et deux modèles pour le second (Tableau 12).

Tableau 12. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C3} pour chaque groupe de solvants.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	10	$y_{C3} = 0,0507 + 0,0788 E^N_T$	60,6	55,7	12,31	0,008**	0,0064	39,37	$5,02 \cdot 10^{-4}$	$4,06 \cdot 10^{-5}$
2	10	$y_{C3} = 0,0363 + 0,00287 \text{Log}P + 0,122 E^N_T$	82,6	77,6	16,6	0,002**	0,0045	55,83	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,57 \cdot 10^{-5}$
3	9	$y_{C3} = 0,0354 + 0,114 E^N_T$	84,5	82,3	38,23	0,000***	0,0046	74	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$
4	9	$y_{C3} = 0,0166 + 0,00431 \text{Log}P + 0,159 E^N_T$	97	96	94,6	0,000***	0,00223	93,48	$0,6 \cdot 10^{-4}$	$4,74 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen des deux modèles calculés sur la série des dix solvants, montre que le modèle 2 (y_{C32}) est meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction que le modèle 1. La valeur du coefficient de détermination (R^2), qui exprime le pourcentage d'explication des variables explicatives pour la réponse (y), passe de 60,6% à 82,6%. De même pour la valeur du coefficient de détermination ajusté (R^2_{adj}) qui croit de 55,7% à 77,6%. Une nette amélioration est remarquée dans la valeur de F_{obs} qui passe 12,31 à 16,6. La valeur de (R^2_{pred}) augmente de 39,37% à 55,83% et celle du PRESS varie de $5,02 \times 10^{-4}$ à $3,6 \times 10^{-4}$ et l'erreur quadratique des résidus diminue $4,07 \times 10^{-5}$ à $1,57 \times 10^{-5}$. Ce modèle est jugé meilleur que le modèle 1 (y_{C31}).

De même pour la série des neuf solvants, le tableau 12 montre que le modèle 4 (y_{C34}) est meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction que le modèle 3 (y_{C33}).

Ainsi, les meilleurs modèles s'expriment à travers deux descripteurs (E^N_T et $\text{Log}P$) contrairement aux modèles, 1 et 3 où l'activité est fonction de E^N_T uniquement (tableau 12). L'association de deux paramètres physico-chimique a donc permis une meilleure corrélation entre l'activité et la nature du solvant organique.

Par la suite, chacun des deux modèles 2 et 4 (y_{C32} et y_{C34}) a subi une validation croisée. Les paramètres statistiques de validation croisée sont donnés dans le Tableau 13.

Tableau 13. Paramètres statistiques de la validation croisée des meilleurs modèles obtenus pour l'activité y_{C3} dans chaque groupe des solvants, dans le cas de l'hydrolyse par la CRL.

Effectifs des solvants (n)	Modèle M	Equation	R^2 %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
10	M_1 calculé sur 10 et validé sur 9	$\hat{y}_{M1} = 0,0225 + 0,76y_{ob}$	96,6	0,053	0,051	0,0024	0,0137
9	M_2 calculé sur 9 et validé sur 10	$\hat{y}_{M2} = -0,0137 + 1,05y_{ob}$	81,6	0,06	0,05	0,0107	0,0116

L'analyse des résultats du tableau 13, montre que le meilleur modèle est celui obtenu sur les neuf solvants, à savoir $y_{C3} = 0,0166 + 0,00431 \text{Log}P + 0,159 E^N_T$

Etant donné la faible valeur du coefficient de régression de $\text{Log}P$, ce modèle montre que

l'activité enzymatique est favorisée par des solvants polaires (E_T^N élevée). Ceci permet une meilleure solubilisation du substrat et donc une augmentation de sa concentration au niveau de l'interface phase aqueuse-phase organique.

Le comportement de l'acétoacétate d'éthyle est donc identique à celui de l'acrylate d'éthyle et conforte ainsi les interprétations émises plus haut. Le tableau 14 ci-dessous, résume les meilleurs modèles obtenus pour chacun des 3 substrats de l'étude.

Tableau 14 : Modèles calculés par la stepwise avec les trois esters dans le cas de la CRL.

Substrat	Modèle	Paramètres statistiques							
		De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
		R ² %	R ² adj %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² pred %	Press	\bar{e}_q
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	$y_{C1} = -0,188 + 0,181 n_D$	36,8	33,1	9,92	0,006**	0,0132	16,89	0,00392	$1,75 \cdot 10^{-4}$
CH ₂ =CH- COO-C ₂ H ₅	$y_{C2} = 0,0556 - 0,00487 \text{Log}P$	91,7	90,5	77,20	0,000***	0,00257	85,94	0,000078	$6,59 \cdot 10^{-6}$
CH ₃ -CO-CH ₂ - COO-C ₂ H ₅	$y_{C3} = 0,0166 + 0,00431 \text{Log}P + 0,159 E_T^N$	97	96	94,6	0,000***	0,00223	93,48	$0,6 \cdot 10^{-4}$	$4,74 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

Afin de renforcer nos résultats et vérifier que l'activité de l'enzyme dépend bien de la nature du solvant organique présent dans le milieu réactionnel, nous avons décidé de réaliser les réactions précédentes dans les mêmes conditions en changeant uniquement la lipase. Pour ce faire, nous avons fait appel à la LPP qui est également activée au contact de l'interface « phase aqueuse-phase organique ».

II-2- Cas de la lipase LPP

La démarche de calcul des modèles étant la même que dans le cas de la CRL, les résultats sont donnés sans les détails de calcul précédents.

II-2-1- L'analyse statistique univariée

Les résultats de cette analyse, obtenus pour la LPP, sont donnés par le tableau 15.

Tableau 15. Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables explicatives utilisés dans le cas de la LPP

Variabes	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$x_{\min} \sim x_{\max}$
Log P(x_1)	25	2,438	1,992	-1,010 ~ 6,780
La polarité $E^N_T(x_2)$	25	0,1616	0,1033	0,0185 ~ 0,3550
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	25	18,292	2,463	14,900 ~ 24,200
Indice de réfraction $n_D(x_4)$	25	1,4312	0,0568	1,3441 ~ 1,5568
Activité enzymatique (y_{L1})	25	0,1798	0,2104	0,0220 ~ 1,0970
Activité enzymatique (y_{L2})	25	0,0443	0,0713	0,0150 ~ 0,3740
Activité enzymatique (y_{L3})	25	0,1353	0,1766	0,00500 ~ 0,7010

L'examen du tableau 15 montre, qu'en moyenne, les résultats de l'activité enzymatique en présence de la LPP se classent de façon décroissante comme suit: (y_{L1}) > (y_{L3}) > (y_{L2}).

II-2-2- L'analyse statistique bivariée

De la même manière que pour la CRL, à partir des matrices de données de dimensions 25 x 7, nous avons calculée les corrélations deux à deux entre les sept variables. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 16.

Tableau 16. Matrice de corrélation calculée entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la LPP

	y_{L1}	y_{L2}	y_{L3}	$x_1(\text{Log}P)$	$x_2(E^N_T)$	$x_3(\delta)$
x_1 ($\text{Log}P$)	-0,232 (0,264)	- 0,476 (0,019) *	-0,127 (0,547)			
x_2 (E^N_T)	0,194 (0,354)	0,468 (0,021) *	-0,024 (0,910)	-0,804 (0,000) ***		
x_3 (δ)	-0,016 (0,938)	0,500 (0,013) *	-0,020 (0,923)	-0,752 (0,000) ***	0,810 (0,000) ***	
x_4 (n_D)	-0,257 (0,214)	-0,120 (0,577)	-0,106 (0,612)	0,182 (0,384)	0,028 (0,894)	0,165 (0,431)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. *: corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. **: corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'analyse de la matrice de corrélation du tableau 16, montre que seule l'activité enzymatique (y_{L2}) obtenue pour l'acrylate d'éthyle est juste corrélée négativement avec $\text{Log}P$ (x_1), et positivement avec la polarité E^N_T (x_2) et la solubilité de Hildebrand δ (x_3). Il est bien évident que les trois corrélations obtenues entre les trois paramètres physico-chimiques $\text{Log}P$ (x_1), E^N_T (x_2) et δ (x_3) sont les mêmes que celles obtenues dans le cas de la CRL (tableau 6).

II-2-3- L'analyse statistique multivariée

Cette partie porte essentiellement sur le calcul de modèles exprimant l'activité enzymatique de la lipase pancréatique de porc utilisée dans l'hydrolyse, en fonction des paramètres physico-chimiques des solvants organiques.

La régression linéaire multiple au sens des moindres carrés a été utilisée. La sélection des variables explicatives faisant partie du modèle a été effectuée à l'aide de la procédure stepwise du logiciel MINITAB (version 14.31), en prenant comme niveau de signification $\alpha = 0,05$ tant que pour l'entrée que pour la sortie des variables.

• Calculs des modèles

La recherche de modèles exprimant y_{L1} , y_{L2} et y_{L3} , ne donne aucun modèle significatif. Cependant, après recherche et élimination des données anormales, pour y_{L1} (bromobenzène,

THF, 1-chlorobutane), pour y_{L2} (DMF, acétonitrile, fluorobenzène) et pour y_{L3} (chloroforme, acétone, hexane, benzène, fluorobenzène, dibutyléther, DMF), la méthode stepwise a donné un modèle significatif pour chacune des activités enzymatiques (y_{L1} , y_{L2} et y_{L3}). Les modèles obtenus figurent dans le tableau 17.

Tableau 17. Modèles calculés par la stepwise avec les trois esters dans le cas de la LPP.

Substrat	Modèle	Paramètres statistiques							
		De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
		R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	$y_{L1} = 1,02 - 0,620n_D$	18,1	14	4,43	0,048*	0,072	5,36	0,12	$5,610^{-3}$
CH ₂ =CH- COO-C ₂ H ₅	$y_{L2} = 0,239 - 0,0046 \text{Log}P - 0,134n_D$	98,9	98,6	314,33	0,000***	0,00174	98,01	0,00004	$3,03 \cdot 10^{-6}$
CH ₃ -CO-CH ₂ - COO-C ₂ H ₅	$y_{L3} = 0,355 - 0,00707\delta - 0,121 n_D$	99,5	99,4	539,83	0,000***	0,00107	98,82	0,0000147	$1,15 \cdot 10^{-6}$

NB : *: modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05$ ($P \leq 0,05$). **: modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01$ ($P \leq 0,01$). *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001$ ($P \leq 0,001$).

L'analyse du tableau ci-dessus montre que la valeur du coefficient de détermination R^2 la plus faible est obtenue pour le butyrate d'éthyle (18,1%). Pour les deux autres esters, elle est respectivement de 98,9 % et de 99,65% pour l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle. De même pour les autres valeurs, nous observons les variations suivantes : R^2_{adjust} passe de 14% à 98,6% et 99,4%, la valeur de F_{obs} du test de signification du modèle croit de 4,43 à 314,33 et 626,41, l'écart type résiduel ($s_{y,x}$) décroît de 0,072 à 0,00174 et 0,00099, la somme des carrés des erreurs de prédiction (PRESS) a aussi diminué d'environ 12% à 0,04‰ et 0,02‰. De même, la moyenne quadratique des résidus prédits (MSE) est passée 0,0056 à $3,03 \cdot 10^{-6}$ et $9,94 \cdot 10^{-7}$ et le coefficient de détermination de prédiction R^2_{pred} a augmenté de 5,36 % à 98,01% et 93,38%.

Ces résultats montrent donc, que de la même manière que pour la CRL, la qualité des modèles est meilleure pour l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle. Ce comportement de la LPP confirme ainsi les interprétations proposées dans le cas de la CRL.

Il faut également noter que comme dans le cas de la CRL avec l'acétoacétate d'éthyle, les deux modèles obtenus dans ce cas avec l'acétoacétate d'éthyle et l'acrylate d'éthyle, sont exprimés par deux descripteurs des solvants.

En résumé, les modèles calculés dans le cas des deux lipases CRL et LPP, montrent que l'effet des solvants, lors de réactions d'hydrolyse d'esters, ne se situent pas au niveau des biocatalyseurs en tant que tels, mais agit sur l'interface « eau-phase organique », lieu d'action des lipases, en y augmentant la concentration en substrat. Pour les trois substrats utilisés dans cette étude, seules les activités enzymatiques relatives à l'hydrolyse des deux esters les plus polaires, à savoir l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle, sont nettement corrélées aux paramètres physico-chimiques des solvants étudiés. Il semble donc, que l'addition d'un solvant organique va extraire ces esters, partiellement soluble dans l'eau, de la phase aqueuse et les placer au niveau de l'interface eau/solvant organique. Ce passage du substrat de la phase aqueuse vers la phase organique sera d'autant plus aisé que le solvant est plus polaire. Sachant que l'action catalytique des lipases se situe au niveau de cette interface, il en résulte une augmentation de l'activité enzymatique.

Cette explication est confirmée par le comportement du butyrate d'éthyle, ester le moins polaire des trois utilisés, dont la vitesse d'hydrolyse n'est corrélée avec aucun des descripteurs des solvants utilisés quel que soit le biocatalyseur.

Ces résultats, qui sont confortés par ceux de la littérature [20, 21], montrent que l'association de plusieurs paramètres physico-chimique peut aboutir à une meilleure corrélation entre l'activité de l'enzyme et la nature du solvant organique.

Chapitre III

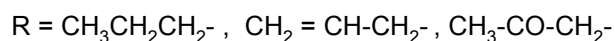
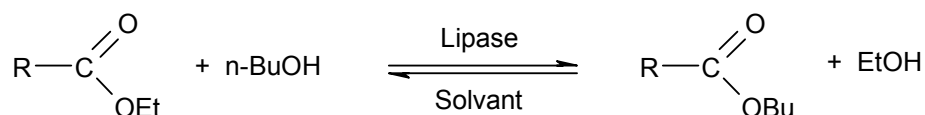
INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES SUR L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION

De la même manière que le chapitre précédent, celui-ci sera également consacré à la recherche de modèles permettant de relier l'activité enzymatique à la nature des solvants organiques. Cependant, dans ce cas, l'enzyme agit dans un milieu non conventionnel que constitue le solvant organique.

Pour mener notre étude, nous avons fait appel aux mêmes esters et aux mêmes lipases que précédemment.

I- COLLECTE DES DONNEES

La réaction de transestérification est effectuée selon le schéma suivant :



L'étude porte sur le comportement des lipases dans un milieu organique. La réaction modèle utilisée est l'alkoolyse des esters. Afin de pouvoir éventuellement comparer l'influence sur la protéine d'un milieu non conventionnel que constituent les solvants organiques pour les enzymes, à celle du milieu aqueux qui est leur milieu naturel, nous avons utilisé les mêmes esters (butyrate d'éthyle, acrylate d'éthyle et acétoacétate d'éthyle) testés dans le cas de l'hydrolyse.

L'alcool employé comme accepteur d'acyle est le n-butanol. Les lipases testées sont : la lipase pancréatique de porc (LPP), la lipase de *Candida rugosa* (CRL) et la lipase *Candida antartica* B (CAL-B) immobilisée sur résine acrylique. Cependant, suite aux résultats préliminaires médiocres obtenus avec la LPP en termes d'activité enzymatique, celle-ci a été abandonnée et seules les deux autres lipases ont été utilisées dans nos travaux.

Les réactions, dont le suivi a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse, ont été testées sur vingt six solvants organiques et l'activité enzymatique, exprimée en terme de vitesse initiale (mM/min/g), a été mesurée pour chacun d'eux au moins trois fois. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18. Valeurs des activités enzymatiques exprimées en mM/min/g.

N°	Solvant	CAL-B			CRL		
		E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃
		YSP1	YSP2	YSP3	YC1	YC2	YC3
1	DMF	0,02832	0,00768	0,21646	0,02841	0,50120	0,05521
2	Acétonitrile	0,22624	0,71714	0,22871	0,01377	0,00089	0,04633
3	Dioxane	0,42673	0,02677	0,22668	0,27548	0,00464	0,05219
4	Acétone	0,21745	0,06149	0,22377	0,03357	0,00132	0,03643
5	Butan-2-one	0,22873	0,53136	0,22254	*	0,00434	0,05493
6	THF	0,14970	0,13634	0,22079	0,03530	0,00614	0,05413
7	Pyridine	0,12241	0,26069	0,22570	0,76102	0,00749	0,05452
8	Diethylether	0,49156	0,09588	0,22402	0,24793	0,00400	0,05382
9	Dichloromethane	0,03882	0,37375	0,21094	0,07490	0,00005	0,05455
10	Chloroforme	0,04429	0,28076	0,22224	2,10055	0,03280	0,05430
11	Benzène	0,22262	0,31782	0,22426	1,11398	0,02315	0,04806
12	Fluorobenzène	0,24879	0,00689	0,21061	0,06457	0,00032	0,05362
13	1-Chlorbutane	0,18078	0,80703	0,22225	0,10933	0,11986	0,05340
14	Toluène	0,18448	0,29265	0,22592	0,01980	0,01798	0,05379
15	Tétrachlorométhane	0,16236	0,07750	0,22246	0,42183	0,02529	0,05460
16	Chlorobenzène	0,16064	0,12245	0,21941	0,17132	0,00100	0,05554
17	Bromobenzène	0,20118	0,02477	0,21501	0,09986	0,00054	0,05458
18	Ethylbenzène	0,47486	0,44646	0,22503	0,37448	0,00298	0,05143
19	Dibutyléther	0,25215	0,29265	0,11145	*	1,30109	0,05210
20	Tétrachloroéthylène	0,25215	0,22873	0,22413	0,06112	0,00294	0,05407
21	Cyclohexane	0,20049	0,70216	0,10899	0,12827	0,09988	0,05368
22	Hexane	0,26790	0,04910	0,01467	0,13258	0,17978	0,07046
23	Heptane	0,23682	0,91530	0,00410	0,57593	0,13983	0,05655
24	Octane	*	*	0,00537	*	*	0,08671
25	Nonane	0,25249	1,44327	*	0,45799	0,23971	*
26	Décane	0,18973	1,39832	0,00599	0,68182	0,27966	0,08796

NB: CAL-B: Lipase de *Candida antarctica* B. CRL: Lipase de *Candida rugosa*. E₁: Butyrate d'éthyle. E₂: Acrylate d'éthyle. E₃: Acétoacétate d'éthyle. * : Pas de réaction. y: Activité enzymatique exprimée en terme de vitesse initiale (mM/min/g).

II- ANALYSES ET RESULTATS STATISTIQUES

II-1-Cas de la lipase CAL-B

L'influence du solvant organique sur le déroulement de la réaction est exprimée à travers ses paramètres physico-chimiques. La contribution de chaque paramètre sera exprimée dans ce cas aussi par des équations mathématiques $y = f(x_i)$ où y est toujours la variable à expliquer exprimée en terme d'activité enzymatique (mM/min/g d'enzyme), et x_i sont les variables qui expliquent y ; ce sont les paramètres physico-chimiques des solvants organiques. Pour ce faire, nous avons suivi la même démarche utilisée dans le cas de l'hydrolyse.

II-1-1- L'analyse statistique univariée

Les résultats de cette analyse, obtenus dans le cas de la lipase CAL-B, sont représentés par le tableau 19 :

Tableau 19. Paramètres statistiques de base calculés pour les variables utilisés dans le cas de la CAL-B.

Variables	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$x_{\min} \sim x_{\max}$
Log P(x_1)	25	2,109	0,373	-1,010 ~ 6,780
La polarité $E_T^N(x_2)$	25	0,1791	0,0211	0,0185 ~ 0,3550
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	25	18,292	2,463	14,900 ~ 24,200
Indice de réfraction $n_D(x_4)$	25	1,4369	0,0121	1,3441 ~ 1,5568
Activité enzymatique (y_{SP1}) (butyrate d'éthyle)	25	0,2171	0,0238	0,0283 ~ 0,4916
Activité enzymatique (y_{SP2}) (acrylate d'éthyle)	25	0,3406	0,0714	0,00689 ~ 1,3983
Activité enzymatique (y_{SP3}) (acétoacétate d'éthyle)	25	0,1857	0,0154	0,00410 ~ 0,2287

L'examen de ces résultats montre que les valeurs de l'activité de la CAL-B, dans le cas du butyrate d'éthyle (y_{SP1}) sont les plus élevées et que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour l'acrylate d'éthyle (y_{SP2}), tandis que l'acétoacétate d'éthyle montre une faible valeur pour l'activité (y_{SP3}).

Les valeurs données par ce tableau, en particulier les écarts de valeurs des vitesses initiales observés pour les solvants employés, montrent que la nature du solvant a une influence certaine sur le fonctionnement de l'enzyme pour les trois substrats utilisés.

II-1-2- L'analyse statistique bivariée

Nous avons calculé les corrélations deux à deux des différentes variables. Celles-ci sont rassemblées dans le tableau 20 ci-dessous :

Tableau 20. Matrice des corrélations calculées entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la lipase CAL-B.

	y_{SP1}	y_{SP2}	y_{SP3}	$x_1(\text{Log}P)$	$x_2(E^N_T)$	$x_3(\delta)$
x_1 ($\text{Log}P$)	0,102 (0,629)	0,927 (0,000) ***	0,737 (0,000) ***			
x_2 (E^N_T)	-0,325 (0,113)	-0,730 (0,000) ***	-0,732 (0,000) ***	-0,807 (0,000) ***		
x_3 (δ)	-0,373 (0,066)	-0,663 (0,000) ***	-0,654 (0,000) ***	-0,760 (0,000) ***	0,823 (0,000) ***	
x_4 (n_D)	-0,161 (0,441)	-0,031 (0,881)	-0,345 (0,091)	0,125 (0,543)	0,109 (0,595)	0,222 (0,275)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. *: corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. **: corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. ***: corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'examen de cette matrice de corrélations, montre que l'activité enzymatique dans le cas du butyrate d'éthyle (y_{SP1}) n'est corrélée avec aucun paramètre physico-chimique des solvants. Par contre, lorsque le donneur d'acyle est l'acrylate d'éthyle, l'activité enzymatique y_{SP2} est corrélée positivement avec $\text{Log}P$ et négativement avec la polarité E^N_T (x_2) et le paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3). Dans le cas de l'acétoacetate d'éthyle (y_{SP3}) est corrélée positivement avec $\text{Log}P$ (x_1) et négativement avec la polarité E^N_T (x_2) et le paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3). Ces corrélations sont très hautement significatives.

On constate aussi qu'il y'a une forte corrélation entre la majorité des variables explicatives. Il existe une corrélation très hautement significative entre $x_1(\text{Log}P)$, $x_2(E^N_T)$ et $x_3(\delta)$. Tandis que l'indice de réfraction n_D (x_4) n'est corrélé avec aucune variable de la matrice.

II-1-3- L'analyse statistique multivariée

Nous avons utilisé la stepwise de la régression linéaire multiple pour calculer les modèles.

a) Calculs des modèles dans le cas du butyrate d'éthyle (y_{SP1})

La recherche de modèles exprimant y_{SP1} par la stepwise a donné un modèle significatif de mauvaise qualité pour les vingt-cinq solvants testés. La suppression de sept données aberrantes (éthylbenzène, dioxane, diéthyléther, chloroforme, acétonitrile, dichlorométhane, DMF), n'a pas permis une grande amélioration du modèle (tableau 21).

Tableau 21. Modèle calculé par la stepwise pour l'activité y_{SP1} après élimination de 7 solvants aberrants.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y.x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	18	$y_{SP1} = 0,0488 - 0,00138\delta$	29,0	24,6	6,55	0,021*	0,0042	10,69	0,000355	$1,76 \cdot 10^{-5}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$

L'influence de la nature du solvant organique sur l'alcoolyse enzymatique du butyrate d'éthyle par la CAL-B, n'est donc pas expliquée de manière nette par les descripteurs utilisés. Il n'y a pas de corrélation entre l'activité enzymatique et la polarité des solvants. Il faut cependant noter, qu'à travers les valeurs d'activités enzymatiques enregistrées (tableau 18), le butyrate d'éthyle apparaît comme le meilleur substrat pour la CAL-B.

b) Calculs des modèles dans le cas de l'acrylate d'éthyle (y_{SP2})

Pour la réponse y_{SP2} , la stepwise, a pu sélectionner trois modèles significatifs après élimination de la pyridine. Le premier modèle est exprimé en fonction de $\text{Log}P (x_1)$, le second est exprimé en fonction de $\text{Log}P (x_1)$ et de l'indice de réfraction $n_D (x_4)$ et enfin le troisième modèle est exprimé en fonction du $\text{Log}P (x_1)$, de l'indice de réfraction $n_D(x_4)$ et du paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta (x_3)$. Le tableau 22 montre que la qualité des modèles s'améliore avec le nombre de descripteurs contenus dans l'équation. Ces modèles ainsi que leurs paramètres statistiques figurent dans le tableau 22.

Tableau 22. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CAL-B.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	24	$y_{SP2} = 0,0088 + 0,0130 \text{ Log}P$	37,2	34,3	13,01	0,002**	0,0337	20,34	0,0317	$1,13 \times 10^{-3}$
2	24	$y_{SP2} = 0,464 + 0,0152 \text{ Log}P - 0,322n_D$	56	51,8	13,36	0,000***	0,0288	39,35	0,0241	$8,33 \times 10^{-4}$
3	24	$y_{SP2} = 0,454 + 0,0264 \text{ Log}P - 0,474n_D + 0,0110\delta$	71	66,6	16,30	0,000***	0,0240	60,28	0,0158	$5,77 \times 10^{-4}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$

Afin d'améliorer la qualité des modèles obtenus, deux autres données aberrantes (hexane et acétonitrile) ont été éliminées et la stepwise a donné trois modèles très hautement significatifs au niveau $\alpha = 0,001$. Ces modèles sont résumés dans le tableau 23 :

Tableau 23. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CAL-B après élimination de l'hexane et de l'acétonitrile.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	22	$y_{SP2} = -0,00005 + 0,0165 \text{ Log}P$	56,3	54,2	25,81	0,000***	0,0286	45,51	0,0204	$8,19 \times 10^{-4}$
2	22	$y_{SP2} = 0,508 + 0,0186 \text{ Log}P - 0,357n_D$	77,2	74,8	32,25	0,000***	0,021	69,65	0,0114	$4,96 \times 10^{-4}$
3	22	$y_{SP2} = 0,563 + 0,0267 \text{ Log}P - 0,527n_D + 0,0094\delta$	83,3	80,5	29,86	0,000***	0,0188	75,56	0,0088	$3,48 \times 10^{-4}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$ ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$ *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$

La comparaison des trois modèles dans le tableau 23, montre que le modèle 3 est de meilleure qualité d'ajustement et de validation interne que les modèles 1 et 2. On constate que la valeur du coefficient de détermination R^2 augmente de 56,3% à 83,3% et celle de R^2_{adj} passe de 54,2% à 80,5%. L'écart type résiduel ($S_{y,x}$) diminue de 0,0286 à 0,0188. La somme des carrés des erreurs de prédiction appelée également PRESS, a baissée d'environ 2% à 9%. De même la moyenne quadratique des résidus prédits $\bar{\epsilon}_q$ est passée de $8,19 \times 10^{-4}$ à $3,48 \times 10^{-4}$ et le coefficient de détermination de prédiction R^2_{pred} a augmenté de 45,51% à 76,56%.

• **Validation croisée**

Pour la validation croisée, nous avons partagé aléatoirement les vingt deux données utilisées dans l'effectif total, en deux groupes composé chacun de onze solvants.

L'application de la procédure de la stepwise sur les deux groupes de solvants, a pu sélectionner un seul modèle très hautement significatif pour chacune des deux séries et qui exprime la réponse y_{SP2} en fonction en fonction de deux indicateurs : l'hydrophobicité $\text{Log}P(x_1)$ et de l'indice de réfraction $n_D(x_4)$. Ces modèles sont résumés avec leurs paramètres statistiques dans le tableau 24 ci-dessous :

Tableau 24. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP2} dans la transesterification par la CAL-B.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	11	$y_{SP2}=0,694+0,0205 \text{Log}P -0,478n_D$	94	92,3	61,33	0,000***	0,011	88,92	$1,84 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-4}$
2	11	$y_{SP2}=0,437+0,0230 \text{Log}P - 0,326n_D$	91	88,3	38,84	0,000***	0,016	82	4×10^{-3}	$2,4 \times 10^{-4}$

NB: * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 24, montre que les deux modèles 1 et 2, obtenus pour chacune des deux séries, sont de meilleure qualité tant dans l'ajustement que dans la prédiction. Les deux modèles se rapprochent du modèle 2 du tableau 23, calculé pour l'effectif total.

Chacun de ces deux modèles a été validé avec la série de solvants n'ayant pas servie à son calcul. Les paramètres statistiques de cette validation croisée sont donnés dans le tableau 25.

Tableau 25. Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus pour l'activité y_{SP2} dans le cas de la CAL-B.

Effectifs des solvants (n)	Modèle de transesterification	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
11	M ₁ calculé sur 11 et validé sur 11	$\hat{y}_{M1} = 0,035 + 0,896y_{ob}$	84	0,036	0,066	0,0308	0,0355
11	M ₂ calculé sur 11 et validé sur 11	$\hat{y}_{M2} = -0,034 + 0,993y_{ob}$	90,1	0,042	0,0084	0,0339	0,0363

L'analyse des résultats du tableau 25, montre que le meilleur modèle de (y_{SP2}) est celui obtenu sur la première série des solvants car il est de meilleure qualité et possède les plus faibles valeurs des paramètres calculés sur les résidus. C'est ce modèle qui est choisi pour exprimer l'activité (y_{SP2}) en fonction des paramètres physico-chimique des solvants organiques dans le cas de la transestérification de l'acrylate d'éthyle par le n-butanol, soit : $y_{SP2}=0,694+0,0205 \text{ Log}P - 0,478n_D$

Comme le montre cette équation, le modèle s'exprime en fonction de deux descripteurs des solvants, $\text{Log}P$, paramètre physico-chimique mesurant l'hydrophobicité du solvant et qui est le plus cité pour décrire les effets du milieu réactionnel dans les réactions biocatalysées, et l'indice de réfraction n_D .

Une analyse monoparamétrique basée sur les mêmes données ayant servies au calcul du modèle ci-dessus, donne respectivement pour $\text{Log}P$ et n_D , des valeurs du coefficient de détermination R^2 de 70% et de 8%. L'association de ces deux descripteurs a donc permis l'obtention d'un modèle de très bonne qualité ($R^2 = 94\%$), contrairement à une analyse monoparamétrique.

Ce modèle montre que l'activité enzymatique diminue avec l'augmentation de la polarité du solvant (valeurs de $\text{Log}P$ faibles et valeurs de n_D élevées).

c) Calculs des modèles dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle (y_{SP3})

Dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle, nous avons obtenus deux modèles mathématiques très hautement significatifs. Le premier modèle exprime la réponse y_{SP3} en fonction de $\text{Log}P$ (x_1) et le second en fonction de deux descripteurs, $\text{Log}P$ (x_1), n_D (x_4). Ces modèles sont résumés dans le tableau 26

Tableau 26. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP3} pour les vingt-cinq solvants dans le cas de la CAL-B.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	25	$y_{SP3} = -0,0325 + 0,00416 \text{ Log}P$	54,2	52,3	27,27	0,000***	0,00739	45,66	0,00149	$4,46 \cdot 10^{-5}$
2	25	$y_{SP3} = 0,0939 + 0,00464 \text{ Log}P - 0,089 n_D$	77,3	75,2	37,44	0,000***	0,0053	70,46	0,0008	$2,83 \cdot 10^{-5}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 26, montre qu'il y'a une nette amélioration au niveau des paramètres statistiques lorsque l'on passe du modèle 1 au modèle 2. On constate, ainsi, que la valeur du coefficient de détermination R^2 augmente de 54,2% à 77,3% et celle de R^2_{adj} passe de 52,3% à 75,2%. L'écart-type résiduel ($S_{y,x}$) diminue d'environ 7% à 5%. La somme des carrés des erreurs de prédiction appelée également PRESS, a baissée d'environ 1% à 0,8%. De même la moyenne quadratique des résidus prédits $\bar{\epsilon}_q$ est passée de $4,46 \cdot 10^{-5}$ à $2,83 \cdot 10^{-5}$ et le coefficient de détermination de prédiction R^2_{pred} a augmenté de 45,66% à 70,46%.

Ces résultats permettent de déduire que le modèle 2 est le meilleur des points de vue qualité d'ajustement et qualité de prédiction. Par ailleurs, après élimination de quatre données aberrantes (pyridine, DMF, 1-chlorobutane, diéthyléther), on a obtenu, à l'aide de la stepwise, trois modèles très hautement significatifs (Tableau 27).

Tableau 27. Modèle sélectionné par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CAL-B, après suppression des quatre données aberrantes.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
1	21	$y_{SP3} = 0,0531 - 0,0041\delta$	62,0	60,0	31,03	0,000***	0,0072	36,93	0,0016	$5,18 \cdot 10^{-5}$
2	21	$y_{SP3} = 0,147 - 0,00395\delta - 0,0671 n_D$	73,9	71,0	25,53	0,000***	0,00612	50,92	0,0013	$3,75 \cdot 10^{-5}$
3	21	$y_{SP3} = 0,130 + 0,00536 \text{ Log}P - 0,115 n_D$	90,7	89,6	87,55	0,000***	0,00366	86,19	0,00036	$1,34 \cdot 10^{-5}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

La comparaison des trois modèles résumés ci-dessus, montre que le modèle 3 est le meilleur de point de vue qualité d'ajustement et de validation interne. On constate que la valeur du coefficient de détermination R^2 augmente de 62% à 90,7% et celle de R^2_{adj} passe de 60% à 89,6%. L'écart-type résiduel ($S_{y,x}$) diminue de 0,0072 à 0,0037. La somme des carrés des erreurs de prédiction appelée également PRESS, a baissée d'environ 1,6% à 0,36%. De même la moyenne quadratique des résidus prédits \bar{e}_q est passée de $5,18 \cdot 10^{-5}$ à $1,34 \cdot 10^{-5}$ et le coefficient de détermination de prédiction R^2_{pred} a augmenté de 36,93% à 86,19%.

Ce modèle, exprimé en fonction des deux paramètres $\text{Log}P$ et n_D , indique clairement que l'activité du biocatalyseur est inversement proportionnelle à la polarité du solvant organique.

• Validation croisée

Nous avons partagé aléatoirement les vingt et une données utilisées pour l'ajustement en deux groupes. Un groupe de dix solvants et l'autre groupe de onze solvants. La stepwise appliquée sur les données de chacun des groupes a permis l'obtention, chaque fois, de deux modèles (le tableau 28).

Tableau 28. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CAL-B.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			$R^2\%$	$R^2_{adj} \%$	F_{obs}	P	$S_{y,x}$	$R^2_{pred} \%$	Press	\bar{e}_q
1	10	$y_{SP3} = 0,0649 + 0,00476 \delta$	73,2	69,8	21,83	0,002**	0,00541	50,82	0,00043	$2,9310^{-5}$
2	10	$y_{SP3} = 0,100 + 0,00431 \text{Log}P - 0,092 n_D$	96,1	95	86,32	0,000 ***	0,00205	92,36	0,000066	$4,86 \cdot 10^{-6}$
3	11	$y_{SP3} = 0,141 - 0,102 E^N_T - 0,103 n_D$	82,2	77,7	18,46	0,001**	0,00615	63,75	0,000617	$3,79 \cdot 10^{-5}$
4	11	$y_{SP3} = 0,196 + 0,00685 \text{Log}P - 0,165 n_D$	98,1	97,6	203,25	0,000 ***	0,00203	96,67	0,000056	$4,11 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$

Dans chaque couple de modèles obtenus ci-dessus, nous avons choisi le modèle qui possède les meilleurs paramètres statistiques d'ajustement et de prédiction interne. Ces modèles, c'est-à-dire les modèles 2 et 4, sont évalués par la validation croisée.

Chacun des deux modèles 2 et 4 calculés par la régression a été validé sur la série de données n'ayant pas servi à son calcul. Les paramètres de validation sont résumés dans le tableau 29.

Tableau29. Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus par la stepwise pour l'activité y_{SP3} dans le cas de la CAL-B.

Effectifs des solvants (n)	Modèle	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
11	M ₁ calculé sur 10 et validé sur 11	$\hat{y}_{M1} = -0,00723 + 0,599 y_{ob}$	97,5	0,0213	0,0200	0,00132	0,0053
10	M ₂ calculé sur 11 et validé sur 10	$\hat{y}_{M2} = 0,00951 + 1,581 y_{ob}$	95,8	0,02303	0,02690	0,00388	0,0074

L'examen des résultats du tableau 29, montre que le modèle 2 de la première série de solvants est le meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction. C'est ce modèle qui est choisi pour exprimer l'activité (y_{SP3}) en fonction des propriétés physico-chimique des solvants organiques : $y_{SP3} = 0,100 + 0,00431 \text{Log}P - 0,092n_D$

Comme on peut le constater, ce modèle est similaire à celui obtenu dans le cas de la transestérification de l'acrylate d'éthyle. Il s'exprime avec les deux mêmes paramètres physico-chimiques et confirme la diminution de l'activité enzymatique avec l'augmentation de la polarité du solvant organique

Dans le tableau 30 ci-dessous, nous avons regroupé les 3 meilleurs modèles obtenus pour chacun des trois esters employés pour étudier l'effet des solvants organiques sur l'activité de la CAL-B lors de leur transestérification par le n-butanol.

Tableau 30: Résumé des modèles calculés par la stepwise avec les trois esters pour la transésterification en présence de la CAL-B.

Substrat	Modèle	Paramètres statistiques							
		De l'ajustement du modèle				validation interne du modèle			
		R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	$\bar{\epsilon}_q$
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	y _{SP1} = 0,0488- 0,00138δ	29,0	24,6	6,55	0,021*	0,0042	10,69	0,000355	1,76 10 ⁻⁵
CH ₂ =CH- COO-C ₂ H ₅	y _{SP2} =0,694+0,0205 LogP-0,478n _D	94	92,3	61,33	0,000***	0,011	88,92	1,84 x10 ⁻³	1,3 10 ⁻⁴
CH ₃ -CO-CH ₂ - COO-C ₂ H ₅	y _{SP3} = 0,100+ 0,00431LogP- 0,092n _D	96,1	95	86,32	0,000 ***	0,00205	92,36	0,000066	4,86 10 ⁻⁶

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05$ ($P \leq 0,05$). ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01$ ($P \leq 0,01$). *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001$ ($P \leq 0,001$)

En dehors du butyrate d'éthyle, pour lequel le modèle calculé est de mauvaise qualité, pour les deux autres esters les modèles calculés sont excellents. Ces modèles montrent que l'activité enzymatique diminue avec l'augmentation de la polarité des solvants.

D'une manière générale, il est connu que les solvants peuvent affecter le fonctionnement des enzymes de plusieurs manières possibles [22]:

- Changement de la conformation et/ou la flexibilité de la protéine par diffusion de l'eau constitutive, au cœur de la protéine, provoquant l'inactivation de l'enzyme. Cette diffusion est évidemment d'autant plus prononcée que le solvant est hydrophile (LogP faibles)

- Changement de la solvation et de la désolvation des différents acteurs de la réaction. La solvation du substrat par exemple, augmenterait l'énergie d'activation et diminuerait par conséquent l'activité enzymatique [19].

- Inhibition compétitive du solvant par sa liaison au niveau du site actif.

En ce qui nous concerne, la seule différence entre les trois systèmes réactionnels étudiés, réside dans la différence de polarité entre les 3 esters.

Ainsi, au vu des résultats obtenus, en particulier la mauvaise corrélation observée avec le butyrate d'éthyle, contrairement aux deux autres esters, plus polaires, l'explication la plus plausible résiderait dans la solvation des substrats. En effet, sachant que les entités polaires sont plus fortement solvatées que celle moins polaires, et que ce pouvoir de solvation augmente avec la polarité des solvants, les états fondamentaux relatifs à l'acrylate d'éthyle et à l'acétoacétate d'éthyle, seront d'autant stabilisés, provoquant ainsi la diminution de l'activité enzymatique par élévation de l'énergie d'activation [23-25].

II-2- Cas de la lipase CRL

II-2-1- Analyse statistique univariée

Les résultats obtenus par la lipase CRL sont représentés dans le tableau 31.

Tableau 31. Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés dans le cas de la transestérification par la lipase CRL

Variabes	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$x_{\min} \sim x_{\max}$
Log P(x_1)	25	2,369	1,983	-1,010 ~ 6,780
La polarité E_T^N (x_2)	25	0,1681	0,1066	0,0185 ~ 0,3550
Paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3)	25	18,536	2,494	14,900 ~ 24,200
Indice de réfraction n_D (x_4)	25	1,4342	0,0578	1,3441 ~ 1,5568
Activité enzymatique (y_{C1}) (butyrate d'éthyle)	25	0,3236	0,4602	0,0138 ~ 2,1006
Activité enzymatique (y_{C2}) (acrylate d'éthyle)	25	0,1199	0,2738	0,0000499 ~ 1,3011
Activité enzymatique (y_{C3}) (acétoacétate d'éthyle)	25	0,05612	0,01082	0,03644 ~ 0,08797

L'examen de ces résultats montre que l'activité la plus faible est obtenue dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle et ceci en ce qui concerne la valeur maximale. Pour la valeur minimale on constate que la valeur la plus faible est obtenue dans le cas de l'acrylate d'éthyle pour l'activité (y_{SP2}).

II-2-2- Analyse statistique bivariée

Les corrélations calculées, deux à deux, entre les différentes variables figurent dans le tableau 32.

Tableau 32. Matrice de corrélation calculée entre les sept variables deux à deux pour les vingt-cinq solvants et pour les trois esters dans le cas de la transésterification par la lipase CRL

	y_{C1}	y_{C2}	y_{C3}	$x_1(\text{Log}P)$	$x_2(E^N_T)$	$x_3(\delta)$
x_1 ($\text{Log}P$)	0,176 (0,411)	0,195 (0,351)	0,699 (0,000) ***			
x_2 (E^N_T)	-0,202 (0,344)	-0,341 (0,096)	-0,488 (0,013) *	-0,807 (0,000) ***		
x_3 (δ)	-0,136 (0,526)	-0,229 (0,271)	-0,476 (0,016) *	-0,760 (0,000) ***	0,823 (0,000) ***	
x_4 (n_D)	0,131 (0,541)	-0,215 (0,301)	-0,088 (0,675)	0,125 (0,543)	0,109 (0,595)	0,222 (0,275)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. * : corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

Dans le cas de la CRL la matrice de corrélations montre que l'activité enzymatique y_{C3} , présente une corrélation positive très hautement significative, avec $\text{Log}P$ (x_1) et une corrélation négative juste significative avec la polarité exprimée par E^N_T (x_2) et le paramètre de solvation de Hildebrand δ (x_3). Cette activité ne présente aucune corrélation avec l'indice de réfraction n_D (x_4). Les activités y_{C1} et y_{C2} ne présentent aucune corrélation avec les variables explicatives (x_i).

Il existe toujours une corrélation très hautement significative entre $x_1(\text{Log}P)$, $x_2(E^N_T)$ et $x_3(\delta)$. Tandis que l'indice de réfraction n_D (x_4) n'est corrélé avec aucune variable de la matrice. Les résultats de la matrice de corrélations nous permettent de déduire de façon préliminaire l'existence de modèles mathématiques plus au moins significatifs.

II-2-3- Analyse statistique multivariée

a) Calculs des modèles dans le cas du butyrate d'éthyle (y_{C1})

La recherche de modèles mathématiques expliquant l'activité enzymatique (y_{C1}) en fonction des variables explicatives (paramètres physico-chimiques), par la stepwise a donné deux modèles significatifs au niveau $\alpha = 0,05$, tant pour l'entrée que pour la sortie des variables et avec un intervalle de confiance égale à 95%. Le premier exprime la réponse (y_{C1}) en fonction de la polarité E^N_T (x_2) et le second exprime (y_{C1}) en fonction de deux variables explicatives ($\text{Log}P$ et E^N_T) et ceci après détection et suppression de données anormales présentant de grandes

valeurs résiduelles qui sont les solvants suivants: chloroforme, benzène, décane, hexane, cyclohexane, toluène, fluorobenzène, DMF, dibutyléther et nonane. Ces modèles sont résumés dans le tableau 33 avec leurs paramètres statistiques d'ajustement et de prédiction.

Tableau 33. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{Cl} dans la transesterification du butyrate d'éthyle par la CRL

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	13	$y_{Cl} = 0,0720 - 0,248 E_T^N$	97,5	97,2	422,8	0,000***	0,0034	96,7	0,000165	$1,15 \cdot 10^{-5}$
2	13	$y_{Cl} = 0,0796 - 0,269 E_T^N - 0,0018 \text{Log}P$	98,6	98,3	348	0,000***	0,0027	97,6	0,00012	$7,106 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05$ ($P \leq 0,05$). ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01$ ($P \leq 0,01$). *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001$ ($P \leq 0,001$).

La comparaison des deux modèles dans le tableau 33, montre que le modèle 2 est de meilleure qualité d'ajustement et de validation interne que le modèle 1. On constate que la valeur du coefficient de détermination R^2 augmente de 97,5% à 98,6% et celle de R^2_{adj} passe de 97,2% à 98,3%. L'écart-type résiduel ($S_{y,x}$) diminue de 0,0034 à 0,0027. La somme des carrés des erreurs de prédiction appelée également PRESS, a baissée d'environ 0,16% à 0,12%. De même la moyenne quadratique des résidus prédits \bar{e}_q est passée de $1,15 \cdot 10^{-5}$ à $7,11 \cdot 10^{-6}$ et le coefficient de détermination de prédiction R^2_{pred} a augmenté de 96,7% à 97,6%.

• Validation croisée

L'application de la procédure de la stepwise sur les deux groupes de solvants, a donné un modèle linéaire simple très hautement significatif, pour chaque groupe. Ce modèle se rapproche du modèle 1 calculé sur l'effectif global. Ce modèle est résumé avec les paramètres statistiques dans le tableau 34.

Tableau 34. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C1} pour chaque groupe de solvants dans la transestérification par la lipase CRL.

Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
		De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
		R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
7	$y_{C1} = 0,0757 - 0,258 E_T^N$	94,4	93,3	84,66	0,000***	0,0032	89,15	$0,99 \times 10^{-4}$	$1,027 \times 10^{-5}$
6	$y_{C1} = 0,0729 - 0,263 E_T^N$	98,4	98,1	253,46	0,000***	0,0033	96,74	$0,92 \times 10^{-4}$	$1,094 \times 10^{-5}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 34 montre que chaque modèle obtenu possède une très bonne qualité d'ajustement et de prédiction. Afin d'évaluer les procédures d'ajustement, chacun des modèles obtenus par la sélection pas à pas a été validé sur l'autre série de données qui n'a pas servi à son calcul. Les paramètres statistiques de cette validation sont résumés dans le tableau 35.

Tableau 35. Paramètres statistiques de la validation croisée des modèles obtenus par la stepwise pour l'activité y_{C1} dans la transestérification par la lipase CRL.

Effectifs des solvants (n)	Modèle de transestérification	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
7	M ₁ calculé sur 7 et validé sur 6	$\hat{y}_{M1} = -0,0046 + 0,9663 y_{ob}$	98,4	0,033	0,0036	0,0035	0,00445
6	M ₂ calculé sur 6 et validé sur 7	$\hat{y}_{M2} = -0,0035 + 0,9618 y_{ob}$	94,4	0,013	0,0091	0,0040	0,00484

Les résultats de la validation croisée montrent que le modèle 1 (tableau 33) calculé sur l'effectif total est le meilleur du point de vue qualité de prédiction.

De ce fait, ce modèle sera choisi pour exprimer l'activité enzymatique (y_{C1}) en fonction des variables physico-chimique des solvants organiques dans la transestérification du butyrate d'éthyle par la CRL: $y_{C1} = 0,0720 - 0,248 E_T^N$.

Contrairement au cas de la lipase CAL-B où aucune corrélation n'a été trouvée avec les différents descripteurs des solvants utilisés, l'activité de la CRL dans la transestérification du butyrate d'éthyle est très bien corrélée avec la polarité des solvants

b) Calculs des modèles dans le cas de l'acrylate d'éthyle (y_{C2})

Dans le cas de l'acrylate d'éthyle, l'application de la méthode de la stepwise sur l'effectif global n'a pas sélectionné de modèles significatifs par conséquent nous avons essayé la procédure de toutes les combinaisons possibles. Cette méthode a pu sélectionner les modèles suivants (tableau 36):

Tableau 36 : Meilleurs modèles obtenus et paramètres statistiques correspondants calculés pour y_{C2} avec les vingt cinq solvants dans le cas de l'acrylate d'éthyle catalysé par la CRL.

Nombre de variables dans le modèle	$R^2\%$	$R^2_{adj}\%$	$S_{y,x}$	Variables explicatives dans le modèle (noté par *)			
				$x_1(\text{Log}P)$	$x_2(E^N_T)$	$x_3(\delta)$	$x_4(n_D)$
1	11,6	7,8	0,026328		*		
1	5,2	1,1	0,027262			*	
2	15,2	7,5	0,026371		*		*
2	13,1	5,2	0,026688	*	*		
3	16,9	5,0	0,026721		*	*	*
3	15,5	3,4	0,026944	*	*		*
4	16,9	0,2	0,027381	*	*	*	*

L'examen du tableau 36 montre que le meilleur modèle de toute la sélection est celui qui exprime la réponse y_{C2} en fonction de la polarité $E^N_T(x_2)$. Ce modèle est choisi car il possède la plus grande valeur du coefficient de détermination ajusté et il a la plus faible valeur de l'écart type résiduel. Le calcul des paramètres statistiques d'ajustement et de prédiction montre qu'il est non significatif et présente des données aberrantes qui sont les solvants suivants : dibutyléther et DMF. La suppression de ces deux observations aberrantes permet l'obtention de deux modèles significatifs : le premier exprime l'activité (y_{C2}) en fonction de $\text{Log}P(x_1)$ et le second exprime (y_{C2}) en fonction de deux variables explicatives, $\text{Log}P(x_1)$ et l'indice de réfraction $n_D(x_4)$. Ces deux modèles présentent d'autres valeurs aberrantes qui sont la pyridine et le dioxane. Après élimination de ces données aberrantes, la sélection pas à pas donne un seul modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,05$. Ce modèle est résumé dans le tableau 37 avec ces paramètres statistiques.

Tableau 37. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C2} dans la transestérification de l'acrylate d'éthyle par la CRL.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	21	$y_{C2}=0,105+0,00442\text{Log}P-0,077n_D$	92,4	91,5	109,1	0,000***	0,0025	89,59	0,00015	$6,28 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'examen des résultats du tableau 37, montre que le modèle 1 est de très bonne qualité tant des points de vue ajustement que de validation interne.

• Validation croisée

Pour la validation croisée on a partagé aléatoirement les vingt une données utilisées en deux groupes de dix et onze solvants.

L'application de la procédure de la stepwise sur les deux groupes de solvants a permis pour le groupe de dix solvants, d'obtenir un modèle identique sélectionné comme pour l'effectif global (tableau 38) et pour le groupe de onze solvants deux modèles significatifs le premier exprime la réponse (y_{C2}) en fonction du coefficient de partage $\text{Log}P(x_1)$ et le second exprime y_{C2} en fonction de $\text{Log}P(x_1)$ et de l'indice de réfraction $n_D(x_4)$. Nous avons choisi les modèles 2 et 3 car ils sont meilleurs du point de vue qualité d'ajustement et de validation interne. Ces modèles sont résumés avec leurs paramètres statistiques dans le tableau 38.

Tableau 38. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C2} dans la transesterification par la lipase CRL.

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	11	$y_{C2} = -0,0104 + 0,00535 \text{Log}P$	70,6	67,3	21,58	0,001**	0,0048	52,05	0,000344	$2,34 \cdot 10^{-5}$
2	11	$y_{C2}=0,0773+0,00483\text{Log}P-0,059n_D$	91,8	89,8	44,98	0,000***	0,0027	84,07	0,000114	$7,31 \cdot 10^{-6}$
3	10	$y_{C2}=0,157+0,00482\text{Log}P - 0,114n_D$	98	97,3	163,13	0,000***	0,0015	96	0,000031	$2,28 \cdot 10^{-6}$

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 38, montre que les deux modèles 2 et 3, obtenus pour chacune des deux séries, sont de meilleure qualité tant dans l'ajustement que dans la prédiction. Les deux modèles se rapprochent du modèle 1 calculé pour l'effectif total.

Chaque modèle a été validé sur l'autre série et pour lequel nous avons calculés les paramètres statistiques de validation croisée défini dans le tableau 39.

Tableau 39. Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus par la méthode pas à pas de la régression linéaire multiples pour l'activité y_{C2}

N°	Modèle de transesterification	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
11	M ₁ calculé sur 11 et validé sur 10	$\hat{y}_{M1} = -0,001753 + 0,9795y_{ob}$	90,2	0,00516	0,00330	0,00186	0,0034
10	M ₂ calculé sur 10 et validé sur 11	$\hat{y}_{M2} = -0,001140 + 1,178y_{ob}$	85,4	0,00607	0,00601	0,00006	0,0042

Les résultats de la validation croisée montrent que le modèle 1 (tableau 37) calculé sur l'effectif total, est le meilleur du point de vue qualité de prédiction. Ce modèle sera choisi pour exprimer l'activité enzymatique (y_{C2}) en fonction des variables physico-chimique des solvants organiques dans la transestérification de l'acrylate d'éthyle par la CRL : $y_{C2} = 0,105 + 0,00442 \text{Log}P - 0,077n_D$

c) Calculs des modèles dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle (y_{C3})

Dans le cas de l'acétoacétate d'éthyle, l'application de la méthode stepwise sur les dix-neuf solvants sélectionnés après élimination des solvants suivants : pyridine, cyclohexane, acétonitrile, dibutyléther, diéthyléther, 1-chlorobutane, donne deux modèles significatifs. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau 40.

Tableau 40. Modèles calculés par la stepwise pour l'activité y_{C3} dans le cas de la transestérification par la lipase CRL

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	19	$y_{C3} = 0,08 - 0,00188 \delta - 0,0484 n_D$	73,3	70	22	0,000***	0,0035	54,74	0,00033	$1,28 \cdot 10^{-5}$
2	19	$y_{C3} = 0,0825 + 0,00236 \text{Log}P - 0,0783 n_D$	89,8	88,5	70,45	0,000***	0,00215	85,21	0,00011	$4,65 \cdot 10^{-6}$

NB : *: modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. **: modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen des modèles du tableau 40, montre que le modèle 2 est le meilleur du point de vue qualité ajustement et prédiction. La valeur du coefficient de détermination (R^2) passe de 73,3% à 89,8% de même pour la valeur du coefficient de détermination ajusté (R^2_{adj}) qui croit de 70% à 88,5. Une nette amélioration est remarquée dans la valeur de F_{obs} . Ce modèle est aussi jugé meilleur par ces paramètres statistiques de prédiction qui sont nettement meilleurs par rapport au deux modèles précédents. Donc ce modèle est choisi pour prédire l'influence des paramètres physico-chimique des solvants organiques.

• Validation croisée

Pour la validation croisée on a partagé les solvants en deux groupes de dix et de neuf solvants. Nous avons obtenu deux modèles significatifs pour chaque groupe de solvant. Ces modèles sont résumés avec leurs paramètres statistiques dans le tableau 41.

Tableau 41. Modèles calculés par la stepwise pour chaque groupe solvants dans le cas de la transestérification par la lipase CRL.

N°	Effectif des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	10	$y_{C3} = 0,106 - 0,00164 \delta - 0,0688 n_D$	83	78,2	17,11	0,002**	0,0031	57,09	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$9,62 \cdot 10^{-6}$
2	10	$y_{C3} = 0,106 - 0,0938 n_D + 0,00208 \text{Log}P$	97,5	96,7	134,19	0,000***	0,00120	95,56	$1,76 \cdot 10^{-5}$	$1,44 \cdot 10^{-6}$
3	9	$y_{C3} = 0,0333 - 0,00320 \delta$	79,7	76,8	27,41	0,001**	0,0031	66,01	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$9,67 \cdot 10^{-6}$
4	9	$y_{C3} = 0,0566 - 0,0620 n_D + 0,00310 \text{Log}P$	93	90,7	40,04	0,000***	0,0019	84	$5,36 \cdot 10^{-5}$	$3,87 \cdot 10^{-6}$

N.B : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

L'examen des résultats du tableau 41, montre que le modèle 2, calculé sur la série de dix solvants, est le meilleur tant dans l'ajustement que dans la prédiction, et pour la série des neuf solvants on constate que le modèle 4 est le meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de validation interne. Ces deux modèles ont été validés chacun sur la série de données ayant servies au calcul de l'autre (tableau 42).

Tableau 42. Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus par la méthode pas à pas de la régression linéaire multiples pour l'activité y_{C3}

N°	Modèle	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
10	M ₁ calculé sur 10 et validé sur 9	$\hat{y}_{M1} = -0,00204 + 0,8734y_{ob}$	78	0,0252	0,02405	0,00117	0,0031
9	M ₂ calculé sur 9 et validé sur 10	$\hat{y}_{M2} = -0,00125 + 0,996y_{ob}$	78,7	0,0248	0,02591	0,00114	0,0034

L'examen du tableau 42, montre que le modèle 2 (tableau 41) est le meilleur tant dans l'ajustement que dans la validation croisée et de ce fait, il est choisi pour expliquer la relation nature du solvant organique - activité enzymatique dans le cas de la transestérification de l'acétoacétate d'éthyle par la CRL : $y_{C3} = 0,106 + 0,00208 \text{ Log}P - 0,0938 n_D$.

Le tableau 43 ci-dessous, résume les trois meilleurs modèles calculés lors de l'estérification des trois esters étudiés :

Tableau 43: Modèles calculés par la stepwise avec les trois esters dans le cas de la transestérification par la lipase CRL

Substrat	Modèle	Paramètres statistiques							
		De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
		R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y.x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	$y_{C1} = 0,0720 - 0,248 E^{N_T}$	97,5	97,2	422,8	0,000***	0,0034	96,7	0,000165	1,15 10 ⁻⁵
CH ₂ =CH- COO-C ₂ H ₅	$y_{C2} = 0,105 + 0,00442 \text{Log}P - 0,077n_D$	92,4	91,5	109,1	0,000***	0,0025	89,59	0,00015	6,28 10 ⁻⁶
CH ₃ -CO-CH ₂ - COO-C ₂ H ₅	$y_{C3} = 0,106 + 0,00208 \text{Log}P - 0,0938 n_D$	97,5	96,7	134,2	0,000***	0,0012	95,56	1,76 x10 ⁻⁵	1,44 x10 ⁻⁶

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05 (P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01 (P \leq 0,01)$.

*** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001 (P \leq 0,001)$.

Ce tableau montre que contrairement à la lipase CAL-B, où la transestérification du butyrate d'éthyle n'était pas corrélée aux descripteurs des solvants utilisés, dans le cas de la CRL, les trois esters donnent tous d'excellents modèles.

Ces trois modèles indiquent nettement que l'activité enzymatique de la CRL est, d'une manière générale, inversement proportionnelle à l'hydrophilicité et à la polarité des solvants. Ce résultat va dans le même sens que celui trouvé avec la lipase CAL-B.

Par ailleurs, de la même manière que pour la CAL-B, nous observons que dans le cas de la CRL également, la modélisation monoparamétrique utilisant chacun de ces deux paramètres, donne des résultats médiocres, en termes de facteur de détermination par exemple, comme le montrent les résultats trouvés pour chacun des deux esters concernés avec les mêmes solvants ayant permis d'aboutir au calcul des modèles finals du tableau 44 :

Pour l'acrylate d'éthyle nous avons :

$$y_2 = 0,00578 + 0,00276 \text{ Log}P \quad \text{avec} \quad R^2 = 3,8\%$$

$$y_2 = 0,157 - 0,101 n_D \quad \text{avec} \quad R^2 = 4,6\%$$

et pour l'acétoacétate d'éthyle :

$$y_3 = -0,0287 + 0,00164 \text{ Log}P \quad \text{avec} \quad R^2 = 33,5\%$$

$$y_3 = 0,0878 - 0,078 n_D \quad \text{avec} \quad R^2 = 54,5\%$$

Pour résumer, les modèles trouvés pour les deux lipases sont récapitulés dans le tableau 44 suivant :

Tableau 44: Récapitulatif des modèles calculés pour les deux lipases CRL et CAL-B

Substrat	Modèle	
	CRL	CAL-B
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COO-C ₂ H ₅	$y_{C1} = 0,0720 - 0,248 E^N_T$	$y_{SP1} = 0,0488 - 0,00138 \delta$ (mauvaise qualité)
CH ₂ =CH- COO-C ₂ H ₅	$y_{C2} = 0,105 + 0,00442 \text{Log}P - 0,077 n_D$	$y_{SP2} = 0,694 + 0,0205 \text{Log}P - 0,478 n_D$
CH ₃ -CO-CH ₂ - COO-C ₂ H ₅	$y_{C3} = 0,106 + 0,00208 \text{Log}P - 0,0938 n_D$	$y_{SP3} = 0,100 + 0,00431 \text{Log}P - 0,092 n_D$

En dehors du butyrate d'éthyle, pour lequel les deux lipases se comportent différemment, ce tableau montre que les modèles relatifs à l'acrylate d'éthyle et à l'acétoacétate d'éthyle, sont exprimés par l'association des deux mêmes descripteurs (LogP et n_D) aussi bien pour la CRL que pour la CAL-B et permettent d'aboutir à une très bonne corrélation entre l'activité enzymatique

et la nature des solvants organiques, contrairement aux modèles intégrant uniquement un de ces descripteurs seul.

Cette association de deux descripteurs dans la même équation, si elle met en évidence la complexité des interactions des différents acteurs du système réactionnel, pourrait cependant aider à une meilleure compréhension de l'action des solvants organiques dans les réactions biocatalysées.

Ainsi, dans notre cas, il semble que l'action du solvant se situe à deux niveaux pour expliquer la réduction de l'activité du biocatalyseur :

- au niveau de l'enzyme, par diffusion de l'eau maintenant la conformation active de la protéine (solvants hydrophiles, faibles valeurs de $\log P$).
- au niveau du substrat, par sa stabilisation par solvation et augmentation de l'énergie d'activation (fortes valeurs de n_D).

Par ailleurs, les valeurs des coefficients de régression respectifs des deux descripteurs $\log P$ et n_D , montrent que le solvant intervient à travers sa polarité plus fortement qu'à travers son hydrophilicité, et ce serait donc la solvation qui guiderait globalement l'effet du solvant.

La modélisation multiparamétrique, c'est-à-dire l'association de plusieurs descripteurs des solvants dans un même modèle, permet, donc, de mieux décrire l'effet des solvants dans ce type de réaction et par conséquent de mieux prévoir les solvants idoines pour une activité enzymatique optimale.

CHAPITRE IV

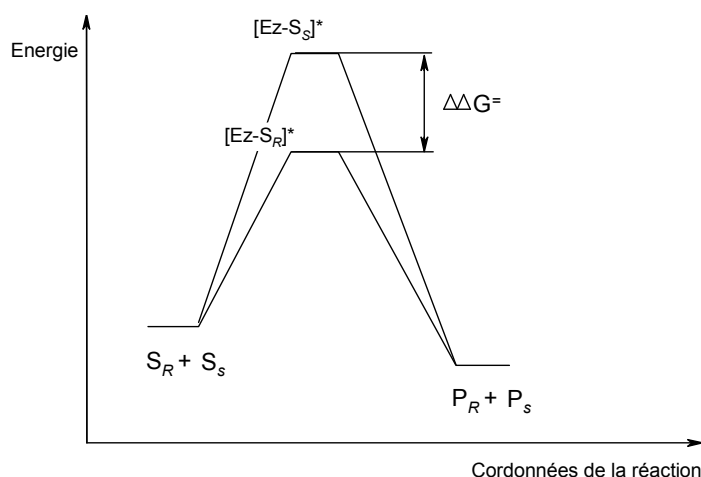
INFLUENCE DES SOLVANTS SUR L'ENANTIOSELECTIVITE

Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'influence du solvant sur l'énantiosélectivité lors de réactions de transestérification catalysées par une lipase.

Un substrat racémique S_{RS} est constitué de deux énantiomères S_R et S_S en quantité égale. La résolution cinétique enzymatique est un processus dans lequel l'un des énantiomères de ce mélange racémique réagit plus rapidement avec l'entité chirale, que constitue l'enzyme Ez , que l'autre énantiomère.

La différence dans les vitesses de réaction des deux énantiomères S_R et S_S , découle de la différence d'énergie libre des états de transition ($\Delta\Delta G^\ddagger$) des deux complexes enzyme-substrat, $[Ez-S_R]^*$ et $[Ez-S_S]^*$, comme le montre le schéma suivant :



Pour rappel, l'énantiosélectivité est quantifiée par le facteur d'énantiosélectivité E qui est le rapport des constantes de spécificité de chacun des deux énantiomères. Il est également lié à $\Delta\Delta G^\ddagger$ par la relation : $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \cdot \ln E$.

De nombreux travaux, consacrés à l'étude de l'effet de solvant sur l'énantiosélectivité des lipases, ont montré que celle-ci est affectée par le choix du solvant utilisé [26-28].

Parmi les hypothèses émises pour expliquer les mécanismes par lesquels les solvants influent sur l'énantiosélectivité de l'enzyme, citons : (i) la modification des interactions enzyme-substrat lorsque le solvant pénètre dans le site actif, (ii) la modification de la conformation de la protéine et de sa flexibilité, changeant ainsi le processus de reconnaissance moléculaire et (iii) orientation des substrats dans le site catalytique de l'enzyme [29].

Cependant, ces hypothèses ou ces explications, ne sont pas applicables de façon générale, et les recherches de corrélation entre l'énantiosélectivité des enzymes et la nature du solvant, à

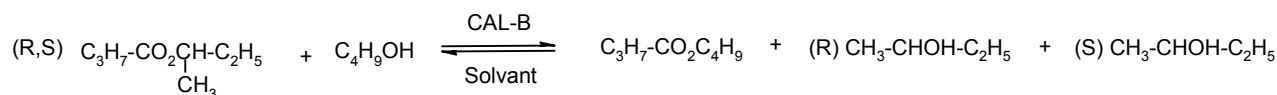
travers ses différents paramètres physico-chimiques, tels que $\text{Log}P$, la constante diélectrique, le moment dipolaire, le volume moléculaire, etc..., sont d'actualité [29-31].

A travers la littérature citée précédemment, il ressort que les recherches de corrélations entre l'énantiosélectivité et la nature du milieu réactionnel, ne prennent en compte qu'un seul paramètre physico-chimique du solvant à la fois, en général $\text{Log}P$, alors que l'association d'au moins un autre indicateur physico-chimique pourrait, dans certains cas, aboutir à une meilleure corrélation, comme l'ont montré Valivety et col. [32] dans leur étude sur les effets des solvants dans la biocatalyse en milieu organique. En associant $\text{Log}P$ et un autre indicateur de polarité des solvants, ils aboutissent à une meilleure corrélation entre l'activité de l'enzyme et la nature du solvant.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'étudier l'influence des solvants organiques sur l'énantiosélectivité, en cherchant à modéliser la relation « nature du solvant-énantiosélectivité » par une analyse statistique multivariée.

Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier la résolution cinétique du butyrate de sec-butyl par transestérification enzymatique par le n-butanol.

Cette réaction, catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B, est réalisée dans 14 solvants organiques différents :



Dans tous les solvants utilisés où une activité a été décelée, c'est l'ester de configuration absolue *R* qui est préférentiellement transestérifié par la CAL-B pour former le sec-butanol également de configuration *R*.

I- COLLECTE DES DONNEES

La collecte des données a consisté en la détermination des excès énantiomériques (*ee*) et le calcul du facteur d'énantiosélectivité *E* et du taux de conversion *c*, à partir des formules suivantes (voir chapitre I) :

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

Les excès énantiomériques du substrat (ee_s) (butyrate de sec-butyl) et du produit, butan-2-ol (ee_p), sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse utilisant une colonne chirale.

Le tableau 45 ci-dessous, résume l'ensemble de ces données pour chaque solvant utilisé :

Tableau 45. Résolution cinétique du butyrate de sec-butyl par transestérification par la CAL-B. Valeurs du facteur d'énantiosélectivité E , des excès énantiomériques et du taux de conversion.

N°	Solvant	E	ee_s % (S -alcool)	ee_p % (R -alcool)	Conversion %
1	DMF	nd	nd	nd	nd
2	Acétonitrile	3,4	24,20	45,5	34,72
3	Acétophenone	2,5	50,50	23,2	68,53
4	Diéthylether	2,4	46,11	23,0	66,72
5	Dichlorométhane	3,5	8,62	52,5	14,10
6	Isopropyléther	3,0	54,32	30,2	64,25
7	1,2Dichloroéthane	nd	nd	nd	nd
8	Chloroforme	4103	4,43	100,0	4,24
9	1-Chlorobutane	32385	31,30	100,0	23,84
10	CCl_4	1341	4,02	100,0	3,86
11	Dibutyléther	4,6	42,96	50,5	45,97
12	Cyclopentane	7028	20,78	100,0	17,20
13	Hexane	567	17,91	100,0	15,19
14	Octane	3960	14,16	100,0	12,40

nd : pas de réaction

Les données concernant les paramètres physico-chimiques des solvants utilisés dans cette étude sont rassemblées dans le tableau 46. En plus des indicateurs de polarité utilisés précédemment, nous avons intégré le volume moléculaire des solvants dont la bonne corrélation avec l'énantiosélectivité de la lipase CAL-B a été décrite par Ottoson et col. [30].

Tableau 46. Paramètres physico-chimiques des solvants utilisés.

N°	Solvant	Paramètres physico-chimiques				
		Log $P(x_1)$	$E^N_T(x_2)$	$\delta(x_3)$	$n_D(x_4)$	$V(x_5)$
1	DMF	-1,01	0,355040	24,0	1,4305	77
2	Acetonitrile	-0,34	0,279220	24,2	1,3441	46
3	Acetophenone	0,54	0,306000	20,8	1,5342	119
4	Diethylether	0,89	0,187024	15,4	1,3524	88
5	Dichloromethane	1,25	0,254480	20,3	1,4242	56
6	Isopropyl ether	1,46	0,105000	14,5	1,3680	121
7	1,2Dichloroethane	1,55	0,327000	20,3	1,4448	73
8	Chloroforme	1,97	0,185840	18,9	1,4459	42
9	1-Chlorbutane	2,64	0,225500	17,2	1,4023	177
10	CCl_4	2,83	0,087120	17,6	1,4602	83
11	Dibutylether	3,21	0,018500	15,8	1,3992	155
12	Cyclopentane	3,34	0,044100	16,6	1,4262	85
13	Hexane	3,98	0,018500	14,9	1,3749	112
14	Octane	5,18	0,035520	15,5	1,3974	146

NB: Log P : coefficient de partage eau/octanol, E^N_T : polarité exprimée par le paramètre de Reichardt - Demroth normalisé (KJ/mol), δ : paramètre de solubilité de Hildebrand ($Mpa^{1/2}$), n_D : indice de réfraction, V : volume moléculaire (A^3).

II- ANALYSE ET RESULTATS STATISTIQUES

II-1- Analyse statistique univariée

Les résultats de cette analyse, obtenus dans le cas de la transesterification du butyrate de sec-butyl, en utilisant $E(y_1)$ et les cinq variables explicatives (tableau 45 et 46), sont donnés par le tableau 47.

Tableau 47. Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés.

Variables	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$X_{\min} \sim X_{\max}$
Log $P(x_1)$	12	2,246	1,577	-0,340 ~ 5,180
La polarité $E^N_T(x_2)$	12	0,1456	0,1066	0,0185 ~ 0,3060
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	12	17,642	2,912	14,500 ~ 24,200
Indice de réfraction $n_D(x_4)$	12	1,4108	0,0528	1,3441~1,5342
Volume moléculaire(x_5)	12	102,5	43,0	42,00 ~ 177,0
$E(y_1)$	12	4117	9192	2,38 ~ 32385

II-2-Analyse statistique bivariée

A partir des matrices de données de dimensions 12 x 6 (12 solvants organiques testés et 6 variables quantitatives dont 5 sont des paramètres physico-chimiques des solvants et une variable à expliquer qui sont : $E(y_1)$ obtenu pour l'ester racémique, nous avons calculé les corrélations deux à deux entre ces variables. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 48.

Tableau 48. Matrice de corrélations entre les cinq variables deux à deux pour les douze solvants.

	$E(y_1)$	Log $P(x_1)$	Polarité $E^N_T(x_2)$	Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	Indice de réfraction $n_D(x_4)$
Log $P(x_1)$	0,205 (0,523)				
Polarité $E^N_T(x_2)$	0,135 (0,676)	-0,834 (0,001)***			
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta(x_3)$	-0,090 (0,781)	-0,673 (0,017)*	0,776 (0,003)**		
Indice de réfraction $n_D(x_4)$	0,005 (0,987)	-0,020 (0,950)	0,250 (0,434)	0,255 (0,424)	
Volume moléculaire $V(x_5)$	0,499 (0,099)	0,503 (0,096)	-0,344 (0,273)	-0,555 (0,061)	-0,011 (0,972)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. * : corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

Le tableau 48 montre que $E (y_1)$ n'est corrélé avec aucune variable explicative. On constate aussi que le paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta (x_3)$ est corrélé négativement avec $\text{Log } P(x_1)$ et positivement avec la polarité $E^N_T(x_2)$. L'indice de réfraction $n_D (x_4)$ et le volume moléculaire $V (x_5)$ ne sont corrélés avec aucun paramètre de la matrice.

II-3-Analyse statistique multivariée

L'analyse statistique multivariée utilisant la régression stepwise n'a pas sélectionnée de modèle significatif. Nous avons également testé la méthode de régression de toutes les combinaisons possibles, et dans ce cas également, aucun modèle significatif n'a été trouvé.

Nous avons alors procédé à la transformation de la variable à expliquer (E). Pour cela, nous avons utilisé un logiciel fonctionnant sous Microsoft Excel[®] et développé par D.Steppan, J. Werner et B. Yeater [33]. Parmi les transformations possibles, celle ayant donné les meilleurs paramètres statistiques est la transformation $1/E$. C'est cette dernière qui sera utilisée comme variable dépendante pour la recherche de modèles liant l'énantiosélectivité aux paramètres physico-chimiques des solvants.

II-4- Recherche de modèles avec la variable dépendante $1/E$

II-4-1- Analyse statistique univariée

Les résultats de cette analyse, obtenus dans le cas de la transestérification du butyrate de sec-butyl, en utilisant $1/E (y_1)$ et les cinq variables explicatives, sont donnés par le tableau 49.

Tableau 49. Paramètres statistiques de base déterminés pour les variables utilisés.

Variables	Effectifs (n)	Moyennes (\bar{x} ou \bar{y})	Ecart type (s)	$X_{\min} \sim X_{\max}$
$\text{Log } P(x_1)$	12	2,246	1,577	-0,340 ~ 5,180
La polarité $E^N_T(x_2)$	12	0,1456	0,1066	0,0185 ~ 0,3060
Paramètre de solubilité de Hildebrand $\delta (x_3)$	12	17,642	2,912	14,500 ~ 24,200
Indice de réfraction $n_D (x_4)$	12	1,4108	0,0528	1,3441~1,5342
Volume moléculaire(x_5)	12	102,5	43,0	42,00 ~ 177,0
$1/E (y_1)$	12	0,1630	0,1771	0,0000309 ~ 0,4202

L'examen du tableau 49, montre que $1/E$ (y_1) se classe de façon croissante ainsi que les variables explicatives (paramètres physico-chimiques des solvants), varient aussi de façon progressive.

II-4-2-Analyse statistique bivariée

A partir des matrices de données de dimensions 12×6 (12 solvants organiques testés et 6 variables quantitatives dont 5 sont des paramètres physico-chimiques des solvants et une variable à expliquer qui est : $1/E$ (y_1) obtenu pour l'ester racémique, nous avons calculé les corrélations deux à deux entre ces variables. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 50.

Tableau 50 Matrice de corrélations calculées entre les cinq variables deux à deux pour les douze solvants

	$1/E$ (y_1)	$\text{Log } P(x_1)$	Polarité $E_T^N(x_2)$	Paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3)	Indice de réfraction n_D (x_4)
$\text{Log } P(x_1)$	-0,765 (0,004)**				
Polarité $E_T^N(x_2)$	0,535 (0,073)	-0,834 (0,001)***			
Paramètre de solubilité de Hildebrand δ (x_3)	0,281 (0,376)	-0,673 (0,017)*	0,776 (0,003)**		
Indice de réfraction n_D (x_4)	-0,076 (0,815)	-0,020 (0,950)	0,250 (0,434)	0,255 (0,424)	
Volume moléculaire V (x_5)	-0,142 (0,659)	0,503 (0,096)	-0,344 (0,273)	-0,555 (0,061)	-0,011 (0,972)

Les valeurs entre parenthèses représentent les probabilités du test de signification des coefficients de corrélation. * : corrélation significative au niveau $\alpha = 0,05$ ($P \leq 0,05$). **: corrélation hautement significative au niveau $\alpha = 0,01$ ($P \leq 0,01$). *** : corrélation très hautement significative au niveau $\alpha = 0,001$ ($P \leq 0,001$).

Comme le montre ce tableau, et contrairement aux résultats trouvés plus haut avec la variable dépendante E , la transformation de cette dernière en $1/E$ est corrélée avec une des variables indépendantes, à savoir $\text{Log } P$.

II-4-3-Analyse statistique multivariée

La stepwise a sélectionné deux modèles significatifs pour $1/E$ (y_1) (tableau 51), après suppression d'une valeur aberrante qui est le 1-chlorobutane.

Tableau 51. Modèles calculés par la stepwise pour la réponse 1/E (y_1)

N°	Effectifs des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	11	$y_1 = 0,363 - 0,0839 \text{ Log}P$	60,6	56,2	13,84	0,005**	0,117	43,65	0,177	0,0138
2	11	$y_1 = 0,165 - 0,122 \text{ Log}P + 0,003 V$	89	86,1	31,9	0,000***	0,066	80,81	0,061	0,0044

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

Comme le montre ce tableau, des deux modèles sélectionnés, celui dont l'expression associe les deux indicateurs $\text{Log}P$ et le volume moléculaire V (modèle n°2) est meilleur en terme de qualité d'ajustement et de prédiction, que celui exprimé uniquement avec $\text{Log}P$ (modèle n°1). L'apport du volume moléculaire V à l'amélioration du modèle n°1 exprimé uniquement à travers $\text{Log}P$ est donc non négligeable.

• Validation croisée du modèle n°2

La validation croisée du meilleur modèle calculé sur l'effectif total des solvants, à savoir le modèle n°2 ($y_1 = 0,165 - 0,122 \text{ Log}P + 0,003 V$), a consisté à partager aléatoirement les onze données utilisées pour l'ajustement en deux groupes, de six et cinq solvants.

L'application de la stepwise sur les deux groupes de solvants, a donné deux modèles significatifs pour la série des cinq solvants et un modèle pour la série des six solvants. Ces modèles sont résumés avec leurs paramètres statistiques dans le tableau 52.

Tableau 52. Modèles calculés par la validation croisée, pour la réponse 1/E (y_1).

N°	Effectif des solvants (n)	Modèle	Paramètres statistiques							
			De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
			R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1	5	$y_1 = 0,359 - 0,0756 \text{ Log}P$	77,4	70	10,3	0,049*	0,105	40,68	0,087	0,0109
2	5	$y_1 = 0,118 - 0,107 \text{ Log}P + 0,003 V$	99,7	99,4	316,61	0,003**	0,015	97,77	0,003	0,00023
3	6	$y_1 = 0,246 - 0,182 \text{ Log}P + 0,004 V$	93,1	88,6	20,37	0,018*	0,061	71,87	0,046	0,0037

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

L'examen du tableau 52 montre que des deux meilleurs modèles (n°2 et n°3), celui obtenu avec la série de cinq solvants (modèle n°2) est meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction.

Comme on peut le constater, ces deux modèles s'expriment avec les mêmes indicateurs de solvants que le meilleur modèle calculé avec l'effectif total des solvants (modèle n°2 du tableau 51).

Nous avons par la suite, procédé à la validation de ces deux modèles chacun sur la série de solvants ayant servi au calcul de l'autre.

Le tableau 53, ci-dessous, résume les paramètres statistiques de cette validation croisée.

Tableau 53. Paramètres statistiques de validation croisée des modèles obtenus pour la réponse 1/E (y_1).

N°	Modèle	Equation	R ² %	Moyennes arithmétiques de y_{est} et y_{obs}		Moyennes arithmétiques (\bar{e}_a) et quadratiques (\bar{e}_q) des résidus	
				\bar{y}	\bar{y}_{est}	\bar{e}_a	\bar{e}_q
1	M ₁ calculé sur 6 et validé sur 5	$\hat{y}_{M1} = -0,09 + 1,73y_{ob}$	97,7	0,205	0,267	0,062	0,147
2	M ₂ calculé sur 5 et validé sur 6	$\hat{y}_{M2} = 0,043 + 0,57 y_{ob}$	86,4	0,154	0,130	0,024	0,084

Les résultats de cette validation croisée confirment que le modèle n°2 du tableau 52, calculé sur l'effectif de cinq solvants, est le meilleur du point de vue qualité d'ajustement et de prédiction.

L'équation exprimant ce modèle ainsi que ses paramètres statistiques sont résumés dans le tableau 54 ci-dessous :

Tableau 54. Modèle calculé et validé pour la réponse 1/E (y_1).

Modèle	Paramètres statistiques							
	De l'ajustement du modèle					validation interne du modèle		
	R ² %	R ² _{adj} %	F _{obs}	P	S _{y,x}	R ² _{pred} %	Press	\bar{e}_q
1/E = 0,118 – 0,107 LogP + 0,003 V	99,7	99,4	316,61	0,003**	0,015	97,77	0,003	0,00023

NB : * : modèle significatif au niveau $\alpha = 0,05(P \leq 0,05)$. ** : modèle hautement significatif au niveau $\alpha = 0,01(P \leq 0,01)$. *** : modèle très hautement significatif au niveau $\alpha = 0,001(P \leq 0,001)$.

Comme on peut le constater, ce modèle possède d'excellents paramètres statistiques tant en ajustement qu'en prédiction, et s'exprime à travers deux paramètres physico-chimiques des solvants, $\text{Log}P$ et le volume moléculaire V .

Il montre que l'énantiosélectivité de la CAL-B dans la résolution du butyrate de sec-butyl, est effectivement influencée par la nature des solvants organiques. Le facteur d'énantiosélectivité E serait favorisé par des valeurs de $\text{Log}P$ croissantes et des volumes moléculaires décroissants. En d'autres termes, les solvants hydrophobes de faible volume moléculaire favoriseraient l'énantiosélectivité de la CAL-B lors de la résolution cinétique du butyrate de sec-butyl par la lipase CAL-B. Cependant, eu égard à la valeur du coefficient de régression de V par rapport à celle de $\text{Log}P$, il apparaît que l'apport de ce dernier paramètre soit plus important que celui du volume moléculaire.

Notons que la prise en compte d'un seul de ces indicateurs, c'est-à-dire $\text{Log}P$ seul ou V seul, dans la recherche de corrélation entre l'énantiosélectivité et la nature du solvant, aboutit pour le premier à un modèle de moindre qualité (voir tableau 51), tandis que le deuxième ne donne aucun modèle significatif.

C'est donc la conjugaison des deux variables explicatives, $\text{Log}P$ et V , qui permet une meilleure relation entre l'énantiosélectivité et la nature des solvants.

Cependant, cette association de deux variables explicatives dans le même modèle confirme également la complexité du phénomène étudié, déjà relevée par de nombreux auteurs (36-40).

Il n'en demeure pas moins que les solvants organiques restent des acteurs intéressants dans la recherche d'optimisation des réactions biocatalysées.

CONCLUSION

Ce travail a été consacré à la modélisation statistique de l'effet des solvants organiques dans les réactions catalysées par les lipases.

Nous avons abordé cette problématique par une approche multivariée, impliquant plusieurs indicateurs physico-chimiques des solvants organiques.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'ajout de co-solvant organique lors de l'hydrolyse enzymatique d'esters.

Pour cela, nous avons fait appel à trois esters différents, le butyrate d'éthyle, l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle, dont l'hydrolyse a été réalisée dans une vingtaine de solvants organiques différents et catalysée par deux lipases distinctes, la CRL et la LPP.

Lors de la recherche de modèles, seuls les deux esters les plus polaires, à savoir l'acrylate d'éthyle et l'acétoacétate d'éthyle, ont donné des modèles significatifs. Excepté le cas de la CRL avec l'acrylate d'éthyle, les modèles calculés sont exprimés en fonction de deux descripteurs des solvants. Ceci conforte notre hypothèse de départ, à savoir qu'un seul indicateur de solvant ne peut pas décrire l'ensemble des propriétés d'un solvant dans un milieu aussi complexe que celui des réactions biocatalysées.

Par ailleurs, les modèles calculés dans le cas des deux lipases utilisées, ainsi que le comportement différent des deux esters les plus polaires par rapport à celui du butyrate d'éthyle, montrent que l'effet des solvants, lors de réactions d'hydrolyse d'esters, ne se situent pas au niveau des biocatalyseurs en tant que tels, mais agit sur l'interface « eau-phase organique », lieu d'action des lipases, en y augmentant la concentration en substrat.

Par la suite, nous avons abordé le cas des réactions en milieu totalement organique où nous avons utilisé les mêmes esters précédents en faisant appel à deux lipases, la CAL-B et la CRL, et réalisé notre étude sur la base de 25 solvants organiques.

Pour les deux enzymes utilisées, les meilleurs modèles obtenus sont dans ce cas également exprimés en fonction de deux paramètres physico-chimiques des solvants.

En dehors du butyrate d'éthyle, pour lequel les deux lipases se comportent différemment, les modèles relatifs à l'acrylate d'éthyle et à l'acétoacétate d'éthyle, sont exprimés par l'association des deux mêmes descripteurs, $\text{Log}P$ et l'indice de réfraction n_D , aussi bien pour la CRL que pour la CAL-B.

Cette association de deux descripteurs dans la même équation, si elle met en évidence la complexité des interactions des différents acteurs du système réactionnel, pourrait cependant aider à une meilleure compréhension de l'action des solvants organiques dans les réactions biocatalysées.

Ainsi, dans notre cas, il semble que l'action du solvant se situe à deux niveaux pour expliquer la réduction de l'activité du biocatalyseur :

- au niveau de l'enzyme, par diffusion de l'eau maintenant la conformation active de la protéine (solvants hydrophiles, faibles valeurs de $\log P$).
- au niveau du substrat, par sa stabilisation par solvation et augmentation de l'énergie d'activation (fortes valeurs de n_D).

Par ailleurs, les valeurs des coefficients de régression respectifs des deux descripteurs $\log P$ et n_D , montrent que le solvant intervient à travers sa polarité plus fortement qu'à travers son hydrophilicité, et ce serait donc la solvation qui guiderait globalement l'effet du solvant.

Enfin, le dernier chapitre a été consacré à l'étude de l'action du solvant organique sur l'énantiosélectivité de la lipase CAL-B, lors de la résolution du butyrate de sec-butyl par transestérification.

Dans ce cas également, le modèle trouvé possède d'excellents paramètres statistiques et s'exprime à travers deux paramètres physico-chimiques des solvants, $\log P$ et le volume moléculaire V des solvants utilisés. La prise en compte d'un seul de ces deux paramètres pour la recherche de corrélation entre l'énantiosélectivité et la nature des solvants, ne donne pas de résultats significatifs. C'est encore une fois l'association de deux indicateurs de solvants qui permet d'aboutir à une meilleure relation « nature du solvant-fonctionnement de l'enzyme ».

En conclusion, l'association de deux variables explicatives dans la même équation, si elle permet d'aboutir à d'excellents modèles, confirme cependant, la complexité du phénomène étudié déjà signalé par de nombreux auteurs.

Il n'en demeure pas moins que l'utilisation des solvants en vue de moduler ou d'optimiser les réactions biocatalysées, reste une voie intéressante et prometteuse pour le chimiste organicien.

BIBLIOGRAPHIE PARTIE II

- [1] P. Dagnélie, *Statistique Théorique et Appliquée*, Tome 2, Edition : Université LARCIER et de BOECK., 1999 ; 650 p.
- [2] Minitab reference manual. Release 14.31 for windows. PA State College, Minitab, 1047 p.
- [3] N. R. Draper and H. Smith. *Applied regression analysis*. Chichester, Wiley and sons, 3rd edition, 1998, 706 p.
- [4] S. Weisberg. *Applied linear regression*. New York, Wiley, 1985, 324 p.
- [5] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman. *Chemometrics: a textbook*. Amsterdam, Elsevier, 1988, 488p.
- [6] M. Otto. *Chemometrics*. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [7] R. S. Searle. *Matrix algebra for the biological science*. New York, Wiley, 1966, 256 p.
- [8] R. Palm. *Les critères de validation des équations de régression linéaire*. Note de statistique et d'informatique. Faculté des Sciences Agronomiques (Gembloux)., 1988 ; 27p.
- [9] R. Tomassone, E. Lesquoy, et C. Miller. *La régression : nouveau regards sur une ancienne méthode statistique*, Masson, INRA., 1983 ; 180p.
- [10] P. Dagnélie. *Analyse statistique à plusieurs variables*. GEMBLoux. Presses Agronomiques., 1982 ; 362p.
- [11] Ph. Besse. *Pratique de la modélisation statistique*. Publications du laboratoire de statistique et probabilités, Université Paul Sabatier, France. 2001.
- [12] M. Stone. *Cross-validatory choice and assessment of statistical prediction*. Journal of the Royal Statistical Society, Serie B 36 (1974) 111-147.
- [13] D. M. Allen. The relationship between variable selection and data augmentation and a method for predictio. *Technometrics* 16 (1974) 125-127.
- [14] B. Efron and G. Gong, A Leisurely look at Bootstrap, the jackknife and cross-validation. *American Statistician.*, 37 (1983) 36-48.
- [15] R. Welsch, Leverage, S. Kotz, N. L Johnson. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. Wiley, New York, 1983.
- [16] C. Reichardt. *Solvents and Solvents Effects in Organic Chemistry*, Third, Updated and Enlargerd Edition, Wiley-VCH Weinheim, 2004.
- [17] R. Carlson. *Design and Optimization in Organic Synthesis*, Data Handling in Science and Technology., 2000; 8, 536 p.

- [18] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, Edited by DAVID R. LIDE, Former Director, Standard Reference Data, national institute of standards and technology, CRC press, Boca Raton New York., 1998.
- [19] G. Carrea, S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [20] A. Mezzetti, C. Keith, R. J. Kaslaukas. *Tetrahedron Asymmetry* 14 (2003) 3917-3924.
- [21] E. Cernia, C. Palocci, E. Ricchiuto, S.Soro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 33 (2004) 7-13.
- [22] M. Graber, R. Irague, E. Rosenfeld, S. Lamare, Linda Franson, K. Hult. *Biochim. Biophys. Acta*, 1774 (2007) 1052 - 1057.
- [23] A.R.M. Yahya, W.A.Anderson, M. Moo-Young. *Enzyme and Microb. Technol.* 23 (1998) 438-450.
- [24] M. Graber, M.P. Bousquet-Dubouch, S. Lamare, M.D. Legoy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1648 (2003) 24-32.
- [25] M. Nordblad, P. Adlercreutz. *J. Biotechnol.* 133 (2008) 127-133.
- [26] A. Ghanem, *Tetrahedron* 63 (2007) 1721-1754.
- [27] G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2226-2254.
- [28] Y. Wang, Q. Li, Z. Zhang, J. Ma, Y. Feng, *J. Mol. Catal.B : Enzym.* (2008), doi : 10.1016/j.molcatb.2008.01.010.
- [29] Y. Zhou, *Computational Study of Enzyme Enantioselectivity*, Doctoral Thesis, Delf University of Technology, (2006).
- [30] J. Ottosson, L. Fransson, J.W. King, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta* 1594 (2002) 325-334.
- [31] J. Lu, K. Nie, F. Wang, T. Tan, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 6070-6074.
- [32] R.H. Valivety, G.A. Johnston, C.J. Suckling, P.J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.*, 38 (1991) 1137-1143.
- [33] Logiciel disponible sur le site : <http://www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032>
- [34] Y. Zhang, C. Yuan, Z. Li, *Tetrahedron*, 58 (2002) 2973-2978.
- [35] A.L. Ong, A.H. Kamaruddin, S. Bhatia, W.S. Long, S.T. Lim, R. kumari, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 924-929.
- [36] S. Hazarika, P. Goswani, N.N. Dutta, *Chem. Eng. J.* 94 (2003) 1-10.

- [37] V. Léonard, S. Lamare, M.D. Legoy, M. Graber, *J. Mol. Catal.B : Enzym.* 32 (2004) 53-59.
- [38] P.A. Fitpatrick, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 3166 – 3171.
- [39] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Enzyme Microb. Technol.*, 22 (1998) 212-216.
- [40] M. Graber, V. Léonard, Z. Marton, C. Cusatis, S. Lamare *J. Mol. Catal.B : Enzym.* 52-53 (2008) 121-127.

PARTIE EXPERIMENTALE

I- Techniques générales

1-Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H)

Les spectres de RMN¹H ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de type (JEOL JNM-LA40) à (400MHz). Ils ont été réalisés en solution dans le tétrachlorure de carbones avec le tetraméthylsilane (TMS) comme référence. Les déplacements chimiques δ , sont exprimés en ppm et les constantes de couplages J en Hertz. Nous décrivons les spectres: s (singulet); d (doublet) ; t (triplets) ; q (quadruplet) ; quintuplet (qt) ; m (multiplet).

2-Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Nous avons employé cette technique d'analyse afin d'identifier les produits, vérifier leur pureté, suivre la cinétique des réactions, et calculer les paramètres d'énantioselectivité dans le cas des composés chiraux. Les caractéristiques des appareils utilisés sont les suivants :

- SHIMADZU GC 17A : détecteur à ionisation de flamme. Gaz vecteur : azote. Colonne capillaire semi polaire SE-30 : Longueur 25 m, diamètre intérieur 0,25 mm.
- HEWLETT PACKARD 5890 série II : détecteur à ionisation de flamme. Gaz vecteur : azote. Colonne capillaire chirale β -Dex 325 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m).

3- pH stat

Le suivi des réactions d'hydrolyse a été effectué automatiquement par l'intermédiaire d'un pH stat piloté par un micro-ordinateur (pH M290, Meter labTM, Abu 901 Auto Burette).

II- Produits chimiques et enzymes

En dehors du composé racémique (butyrate de sec-butyl) préparé au laboratoire et dont la synthèse est décrite ci-dessous, les autres produits et solvants utilisées sont d'origine commerciale (FLUKA, SIGMA ALDRICH).

A) Synthèse du (*R,S*) butyrate de *sec*-butyl

Dans un ballon de 100ml, surmonté d'un réfrigérant, on introduit 10ml (8,07g ; 0,11mole) de butan-2-ol, 20ml (27,94g ; 0,32mole) d'acide butyrique (1: 0,5 $V_{\text{acide}}/V_{\text{alcool}}$) et 2g (0,006mole) d'acide para toluène sulfonique. L'ensemble est agité magnétiquement pendant 5h à 80°C. La formation de l'ester est suivie par chromatographie en phase gazeuse jusqu'à disparition totale de l'alcool. Après refroidissement, le milieu est traité par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) pour revenir à la neutralisation puis le milieu est extrait avec 3x50ml d'éther. La phase organique est ensuite récupérée, lavée, séchée sur sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄). Une fois l'éther est évaporé, on récupère 23,8g du produit (85%).

Analyses

1- RMN ¹H (CDCl₃) :

δ (ppm) = 0,89 (t, 3H, CH₃-CH₂-CH₂, J= 2,94 Hz); 1,57 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH₂, J= 5,15 Hz); 2,25 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH₂, J=1,91Hz); 1,66 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH, J= 5,15 Hz); 0,93 (t, 3H, CH₃-CH₂-CH, J= 2,89 Hz); 4,85 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH, J= 1,00 Hz); 1,19 (d, 3H, CH₃-CH, J= 3,59 Hz).

2) CPG :

HEWLETT PACKARD 5890 série II à Colonne capillaire chirale β -Dex 325.

Les conditions d'analyse CPG suivantes ont été utilisée pour l'identification du produit (*R,S*) butyrate de *sec*-butyl et la séparation de ces énantiomères *S* et *R*.

- température initiale : 80°C
- temps initiale : 2min
- température finale : 150°C
- temps finale : 30min
- vitesse : 6°C/min

Les temps de rétention pour les deux énantiomères de l'ester racémique (*R,S*) butyrate de *sec*-butyl ainsi que ceux des deux énantiomères alcools, ont été déduites par rapport à des référence optiquement pures :

- (*S*) butyrate de *sec*-butyl, $t_R = 18,715$ min // -(*R*) butyrate de *sec*-butyl, $t_R = 19,769$ min
- (*S*) butan-2-ol, $t_R = 5,383$ min // -(*R*) butan-2-ol, $t_R = 5,239$ min

B) Enzymes

Les lipases utilisées sont d'origine commerciale (SIGMA ALDRICH):

- la lipase de pancréas de porc (LPP) 300 unités;
- la lipase de *Candida rugosa* (CRL) 706 unités ;
- la lipase immobilisée de *Candida antarctica* (CAL-B) ≥ 10000 unités

III- Réactions enzymatiques

1- Hydrolyse

L'enzyme (LPP (1g) ou CRL (0,5g)) est ajoutés à une solution d'ester étudier (10mM) dans 35 ml d'une solution tampon phosphate (0,2M) à pH = 8. Le pH est maintenu constant par addition de soude 1N à l'aide d'un pH stat. La cinétique et le calcul de l'activité enzymatique sont donnés automatiquement par l'appareil.

2- Transesterification

a-cas des esters achiraux

Dans un flacon fermant hermétiquement, une solution d'ester (10mM) et d'alcool (10mM) est agitée dans 7ml de solvant anhydre en présence de lipase (CRL (1g) ou CAL-B (0.5g)) et le tamis moléculaire. Le mélange réactionnel est ensuite porté en agitation à 40°C. La cinétique de la réaction est réalisée par des prélèvements de 1 μ l à des intervalles régulier du mélange et injecté dans un chromatographe a phase gazeuse pour analyse (SCHIMADZU série GC17A, équipé d'une colonne achirale semi polaire (SE 30). Le calcul des vitesses est obtenu par la pente de la régression linéaire du produit formé en fonction du temps.

Les conditions d'analyse utilisées dans le cas des esters achiraux (butyrate d'éthyle, acrylate d'éthyle et acétoacetate d'éthyle) sont :

- température initiale : 80°C
- temps initiale : 0min
- température finale : 250°C
- temps finale : 30min
- vitesse : 3°C/min

Les temps de rétention des trois esters sont :

- Butyrate d'éthyle, $t_R=2,90\text{min}$
- Acrylate d'éthyle, $t_R= 2,36\text{min}$
- Acétoacetate d'éthyle, $t_R=2,67\text{min}$

b- cas du butyrate de *sec*-butyl

Dans un flacon fermant hermétiquement, le butyrate de *sec*-butyl (10mM) et le butan-2-ol (10mM) sont agitée dans 7ml de solvant anhydre en présence de lipase (CRL (1g) ou CALB (0.5g)) et 0.5g de tamis moléculaire (3A°). Le mélange réactionnel est ensuite porté en agitation à 40°C. La cinétique de la réaction est suivie par chromatographie en phase gazeuse par injection à intervalle régulier de prélèvements de 1µl du mélange réactionnel.

Analyse CPG (HEWLETT PACKARD 5890 série II à Colonne capillaire chirale β-Dex 325) :

Les conditions d'analyse utilisées dans le cas dans le cas du (*R,S*) butyrate de *sec*-butyl sont :

- température initiale : 80°C
- temps initiale : 2 min
- température finale : 150°C
- temps finale : 30 min
- vitesse : 6°C/min

Les temps de rétention des deux énantiomères *R* et *S* du butyrate de *sec*-butyl, (*R*) butan-2-ol et (*S*) butan-2-ol, sont :

- (*R*) butan-2-ol, $t_R = 5,239 \text{ min}$
- (*S*) butan-2-ol, $t_R = 5,383 \text{ min}$
- (*S*) butyrate de *sec*-butyl, $t_R = 18,715 \text{ min}$
- (*R*) butyrate de *sec*-butyl, $t_R = 19,769 \text{ min}$