



## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Chimie**

**Option:** Synthèse et Développement de Molécules Bioactives

### THEME

Synthèse asymétrique de composés organiques  
par catalyse et modélisation de la réactivité  
des réactions enzymatiques.

Présentée par : **Sofiane ALI RACHEDI**

Devant le jury :

M <sup>r</sup> Messaoud LIACHA	Pr. Université Badji-Mokhtar-Annaba	Président
M <sup>r</sup> Abdelhafid DJEROUROU	Pr. Université Badji-Mokhtar-Annaba	Directeur de thèse
M <sup>r</sup> Rabah OUMEDOUR	Pr. Université Guelma	Examineur
M <sup>r</sup> farhi HALAIMIA	Pr. Université Badji-Mokhtar-Annaba	Examineur
M <sup>r</sup> Abdelmalek KHORIEF NACEREDDINE	MCA. ENSET de Skikda	Examineur

---

Synthèse asymétrique de composés organiques par  
catalyse et modélisation de la réactivité des réactions  
enzymatiques.

---

**sofiame ali rachedi**

© *date d'édition 15 juin 2017*

15 juin 2017

## Dédicaces

A :

mes Parents.

ma belle-mère.

mon frère

ma femme.

mes collègues de laboratoire.

mes amis.

Tous ceux qui m'ont soutenue pendant ces années

**Je dédie ce travail**

## *Remerciements*

*Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à l'Université Badji Mokhtar Annaba, au sein du Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique du département de Chimie.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur DJEROUROU Abdelhafid pour m'avoir tant apporté durant cette aventure. Je le remercie de m'avoir encadré et soutenu pendant ces trois années. Merci de la confiance que tu m'as accordé, de m'avoir fait partager ta passion pour la chimie, de ta grande disponibilité, de ta patience et de tous les conseils que tu as pu me donner.*

*Je remercie vivement le Pr. Messaoud LIACHA pour sa participation à ce jury en tant que président. J'exprime également ma reconnaissance aux Dr. Abdelmalek KHORIEF NACEREDDINE, Pr. Rabah OUMEDOUR et le Pr. Farhi HALAIMIA pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie vivement monsieur Didier BUISSON, professeur à l'université Paris V, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de chimie des produits naturels et fongiques durant mon stage en France.*

*Un grand Merci à tous mes amis, AISSAOUI Mohamed, DOGHSMIA Habiba, mostafa MOKHNANE, zahra LACHTAR, LAKHAL imane, houria BEN TOUMI, nawel CHETTIBI, ZEGHAD Farida. Je leur souhaite à tous bon courage pour la suite.*

*J'adresse mes vifs remerciements à tous mes collègues du Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique. Nombreuses sont les personnes qui m'ont aidé à l'élaboration de ce travail. C'est aussi à elles que s'adressent mes remerciements et ma sympathie.*

*Et enfin un grand merci tout spécial à ma femme qui partage ma vie et qui endure au quotidien les difficultés et les incertitudes de la vie d'un doctorant chercheur notamment sa faible disponibilité et son humeur inégale.*

## Abreviations

<b>AcOEt</b>	acétate d'éthyle
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Ar</b>	Aryle
<b>BH<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>S</b>	le complexe de borane diméthyle sulfure
<b>B3LYP</b>	Becke 3 Lee-Yang-Parr
<b>CAL-B</b>	la lipase B de <i>Candida antarctica</i>
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>Conf</b>	Configuration
<b>Conv</b>	Conversion
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>CR</b>	le carbonyle réductase
<b>DFT</b>	théorie fonctionnelle de la densité
<b>DME</b>	Diméthoxyéthane
<b>dex<math>\beta</math>-ip</b>	$\beta$ -cyclodextrine-ip
<b>ee</b>	Excès énantiomériques
<b>ET</b>	état de transition
<b>FAD</b>	la flavine adénine dinucléotide
<b>FDA</b>	federal drug administration
<b>FMN</b>	La flavine mononucléotide
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HSiCl<sub>3</sub></b>	Trichlorosilane
<b>IR</b>	Infrarouge
<b>i-PrOH</b>	Isopropanol
<b>Me</b>	Méthyle
<b>MeOH</b>	méthanol
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Tétrahydruroborate de sodium
<b>NAD</b>	nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADPH</b>	Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	le phosphate de sodium
<b>ox</b>	oxydation

<b>Ph</b>	Phényle
<b>T-BuOH</b>	tert-butanol
$t_R$	Temps de rétention
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>t-BuOK</b>	tert-butanolate de potassium
<b>TXN</b>	Thiorédoxine
<b>pH</b>	Le potentiel hydrogène
<b>R</b>	Groupement général
<b>®</b>	Signe accompagnant les marques de commerce
<b>(R)-BINAP</b>	(R)-2,2-bis (diphényle phosphino)-1,1 -binaphthyle
<b>(R)-Me-CBS</b>	(R)-(+)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidine
$R_f$	facteur de rétention
<b>SgCR</b>	le carbonyle réductase de Streptomyces griseu
<b>VIH</b>	le virus de l'immunodéficience humaine
<b>YMS</b>	yeast maltsoy
<b>Z</b>	L'isomérisation Z
<b>SgCR</b>	le carbonyle réductase de Streptomyces griseu
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique

## ملخص

قد أصبح استخدام الجزيئات في شكل نقي بصريا ذو أهمية بالغة في جميع المجالات مثل المواد الغذائية (النكهات و المضافات)، الميدان الزراعي (المبيدات الفلاحية) وخاصة المواد الصيدلانية.

في هذه الأطروحة، ركزنا على تفاعل إرجاع مختلف الكيتونات الخطية والحلقية باستعمال الإنزيمات. قصد ذلك قمنا بتطوير منهجين في مجال الإرجاع الغير المتماثل.

في المنهج الأول، تفاعل إرجاع مختلف الكيتونات الخطية والحلقية باستعمال في الماء و الجلوسرين اظهر استهدافا مثاليا وممتازا باستعمال فضلات الخضر، أما في الطريقة الثانية استعملنا أسلوب التقييم السريع للخمائر في إرجاع مختلف الكيتونات حيث يتم تفعيل سلسلة من الخمائر بهدف معرفة الأكثر فعالية.

**الكلمات الدالة:** الإنزيمات، فضلات الطعام، النقل الغير المتماثل للهيدريد، الفحص المتعدد، الكيتونات الخطية، الكيتونات الحلقية، الخمائر.

---

## Résumé

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

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la réaction de réduction asymétrique de diverses cétones aliphatiques et aromatiques par transfert asymétrique d'hydrure avec des enzymes. Nous avons mis au point deux parties pour la réduction asymétrique.

Avec le premier procédé, la réduction des cétones prochirales dans l'eau et dans le glycérol avec divers déchets a conduit à des alcools avec une excellente énantiosélectivité, une étude sur une évaluation rapide des levures par criblage multi-substrats. Une série des cétones est réduite en un seul pot. Cette méthodologie nous a permis de connaître la meilleure enzyme pour la réduction asymétrique des cétones.

**Mots-Clés :** enzyme, déchets alimentaires, transfert asymétrique d'hydrure, criblage multi-substrats, cétones prochirales, levures.

---

## Abstract

The use of the optically pure molecules in form became a need for extreme importance in all the fields such as the agroalimentary one (aromas, additives), agronomy (pesticides) and particularly the pharmaceutical field (drugs).

In this work, we were interested in the asymmetrical reaction of reduction of various aliphatic and aromatic ketones by asymmetrical transfer of hydride with enzymes. We are developed two processes for the asymmetrical reduction.

In the first work, the reduction by asymmetrical transfer of hydride of ketones in water and glycerol with food waste shows an excellent enantioselectivity, the second process is a new fast method evaluation of yeasts by sifting multi-substrates. A series of ketones is reduced in only one pot. This methodology enabled us to know the active enzyme for the asymmetrical reduction of ketones.

**Keywords :** asymmetric synthesis, food waste, asymmetric transfer of hydride, sifting multi-substrates, aliphatic ketones, aromatic ketones, baker's yeasts.

# Table des figures

1	Exemple des molécules chirales dont les énantiomères ont des propriétés biologiques. . . . .	2
2	Intérêt de la catalyse enzymatique. . . . .	3
1.1	Synthèse de fluoxetine et tomoxetine. . . . .	7
1.2	Hydrosilylation et Hydroboration d'oléfines. . . . .	8
1.3	Epoxydation asymétrique des oléfines. . . . .	9
1.4	La réduction des cétones avec un complexe de $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ . . . . .	10
1.5	La réduction des cétones avec un complexe de ruthénium II. . . . .	11
1.6	Réduction de cétone prochirale par le borane. . . . .	11
1.7	Synthèse de (R)-4-phényl-but-3-en-2-ol. . . . .	13
1.8	Réduction asymétrique de l' $\alpha$ méthylène $\beta$ -cétocesters par <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	13
1.9	Réduction de cétone prochirale en présence de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . . . . .	14
1.10	Réduction de cétone prochirale en présence par <i>céleris-raves</i> . . . . .	14
1.11	Réduction asymétrique de cétone par la <i>daucus carota</i> . . . . .	15
1.12	L'hydrolyse dun ester avec les morceaux de pelures d'orange. . . . .	15
1.13	Synthèse des alcools chiraux avec le SgCR. . . . .	16
1.14	La réduction du 2-aminoacétophénone avec l' <i>Arthrobactersulfureus BW1010</i> . . . . .	16
1.15	Synthèse d'acides $\alpha$ -hydroxy-carboxyliques. . . . .	17
1.16	Structure des énantiomères du thalidomide. . . . .	18
1.17	Structure des énantiomères de la propranolol. . . . .	18
1.18	Structure des énantiomères de ladrénaline. . . . .	19
1.19	Structure des énantiomères les plus fréquents de la catéchine. . . . .	19
1.20	Structure des énantiomères de lacide ascorbique. . . . .	20
1.21	Structure de L'éphédrine. . . . .	20
1.22	Structure de menthol. . . . .	21
1.23	Structure de carbapénème. . . . .	21
2.1	Exemple d'un enzyme. . . . .	24
2.2	Structures des enzymes. . . . .	25
2.3	Modèle de complémentarité stérique. . . . .	26
2.4	Modèle de l'ajustement induit. . . . .	26
2.5	Mécanisme catalytique et libération du produit. . . . .	27
2.6	Synthèse d'agoniste du récepteur $\beta 3$ . . . . .	30
2.7	Synthèse d'inhibiteur de la protéase du VIH. . . . .	31

2.8	Synthèse d'un anticholestérol. . . . .	32
2.9	Synthèse d'un antimétabolite. . . . .	33
2.10	Synthèse d'un anti-dépression. . . . .	34
2.11	Synthèse de l'atazanavir. . . . .	35
2.12	Synthèse d'un bloc constitutif pour la synthèse de AG7088. . . . .	36
2.13	Synthèse d'un anti-Alzheimer. . . . .	37
2.14	Synthèse d'un anti-Alzheimer. . . . .	38
3.1	Cétones prochirales choisies. . . . .	44
3.2	Réduction des cétones en alcools racémiques. . . . .	45
3.3	Réduction des cétones avec la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	46
3.4	Les déchets alimentaires utilisés. . . . .	48
3.5	La réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau. . . . .	48
3.6	La réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol. . . . .	50
3.7	Réduction des cétones prochirales avec différents déchets dans l'eau et dans le glycérol. . . . .	53
3.8	Attaque d'hydrure sur re-face selon la règle de Prélog. . . . .	54
4.1	La réduction des cétones prochirales en utilisant la méthode combinatoire. . . . .	56
4.2	Organigramme expliquant les étapes de la méthode. . . . .	57
4.3	la réaction de stéréo-inversion enzymatique des alcools racémiques. . . . .	58
4.4	L'approche combinatoire, a) procédure classique, b) procédure à haut débit. . . . .	59
4.5	Le suivi des conditions de la réaction dans le fermenteur. . . . .	66
5.1	Mécanisme de la réaction de réduction de cétone avec le <b>NADPH</b> . . . . .	72
5.2	Illustration schématique du chemin d'une réaction élémentaire. . . . .	74
5.3	Structures optimisées des complexes de réaction des composés <b>1a</b> et <b>1b</b> avec le <b>NADPH</b> à B3LYP/6-31G (d). . . . .	75
5.4	Les états de transition impliqués dans la deuxième étape de la réaction. . . . .	77
5.5	Le profil énergétique relative des complexes [2a(S)- <b>2a-NADP</b> <sup>+</sup> ] et [2a(R)- <b>2a-NADP</b> <sup>+</sup> ] en phase gazeuse. . . . .	78
5.6	Les états de transition impliqués dans la deuxième étape de la réaction. . . . .	79
5.7	Le profil énergétique relative des complexes [ <b>2b</b> (S)- <b>2a-NADP</b> <sup>+</sup> ] et [ <b>2b</b> (R)- <b>2a-NADP</b> <sup>+</sup> ] en phase gazeuse. . . . .	80

# Liste des tableaux

3.1	Réduction des cétones avec <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	46
3.2	Réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau. . . . .	49
3.3	Réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol. . . . .	51
4.1	la liste des levures utilisées dans Le lot n°01. . . . .	60
4.2	la liste des levures utilisées dans Le lot n°02. . . . .	60
4.3	les mélanges des souches de Lot n°01. . . . .	62
4.4	l'avancement des réductions des cétones par le lot n°01. . . . .	63
4.5	l'avancement des réactions avec les souches <i>R. buffoni</i> et <i>C. macerans</i> . . . . .	64
4.6	l'avancement de la réaction avec la <i>R. buffoni</i> en fermenteur. . . . .	65
4.7	les mélanges des souches de Lot n°02. . . . .	67
4.8	l'avancement des réductions des cétones par le lot n°02. . . . .	68
4.9	l'avancement de la réduction du Phényl-éthyl-cétone avec <i>P. minuta</i> et <i>R. turuloides</i> . . .	68
5.1	Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés <b>[2a(S)- NADP<sup>+</sup>]</b> et <b>[2a(R)- NADP<sup>+</sup>]</b> optimisés en phase gazeuse . . . . .	76
5.2	Les Longueurs de certaines liaisons à l'état de transition des composés <b>[2b(S)-NADP<sup>+</sup>]</b> et <b>[2b(R)-NADP<sup>+</sup>]</b> optimisés en phase gazeuse . . . . .	77
5.3	Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés <b>[2b(S)-NADP<sup>+</sup>]</b> et <b>[2b(R)-NADP<sup>+</sup>]</b> optimisés en phase gazeuse . . . . .	79
5.4	Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés <b>[2b(S)-NADP<sup>+</sup>]</b> et <b>[2b(R)-NADP<sup>+</sup>]</b> optimisés en phase gazeuse . . . . .	81
5.5	Les fréquences de vibration (cm <sup>-1</sup> ) expérimentales et calculées de composé <b>2a</b> . . . . .	82
5.6	Les fréquences de vibration (cm <sup>-1</sup> ) expérimentales et calculées de composé <b>2b</b> . . . . .	82

# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>2</b>
<b>I Etude bibliographique</b>	<b>5</b>
<b>1 l'Accès aux alcools</b>	<b>6</b>
1.1 Introduction . . . . .	6
1.2 Synthèse d'alcools chiraux . . . . .	7
1.2.1 Synthèse d'alcools optiquement purs par voie chimique . . . . .	8
1.2.2 Synthèse d'alcools optiquement purs par catalyse enzymatique . . . . .	12
1.3 Molécules d'alcools chiraux à effets biologiques . . . . .	17
1.4 Conclusion . . . . .	22
<b>2 Rappels bibliographiques sur les enzymes et la catalyse enzymatique</b>	<b>23</b>
2.1 Introduction . . . . .	23
2.2 Structure des enzymes . . . . .	24
2.3 Mécanisme d'action des enzymes . . . . .	25
2.4 Classification des enzymes . . . . .	27
2.5 Les réductases . . . . .	28
2.6 Application des réductases en synthèse organique . . . . .	29
2.7 Exemples des molécules biologiquement actifs synthétisé par les réductases . . . . .	29
2.8 Propriétés des déchets alimentaires . . . . .	38
2.9 Conclusion . . . . .	40
<b>II Résultats et discussion</b>	<b>41</b>
<b>3 Réduction asymétrique des cétones avec des nouveaux biocatalyseurs</b>	<b>42</b>
3.1 Introduction . . . . .	42
3.2 Choix des cétones prochirales . . . . .	43
3.3 synthèse des alcools racémiques . . . . .	44
3.4 l'analyse des alcools racémiques par CPG chirale . . . . .	45
3.5 Effet du solvant . . . . .	45
3.6 Réduction de cétones avec la levure du boulanger dans l'eau et le glycérol . . . . .	45
3.7 Choix des biocatalyseurs . . . . .	47
3.8 Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau . . . . .	48

3.9	Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol . . . . .	50
3.10	Réactivité et Stéréosélectivité . . . . .	52
3.11	Conclusion . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Réduction asymétrique des cétones en utilisant la méthode combinatoire</b>	<b>55</b>
4.1	Introduction . . . . .	55
4.2	Approche combinatoire . . . . .	58
4.3	Sélection des micro-organismes . . . . .	59
4.4	Préparation des souches . . . . .	61
4.5	Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats par lot n°01 . . . . .	61
4.6	Réaction d'oxydo-réduction chez les souches <i>R. buffoni</i> et <i>C. macerans</i> . . . . .	63
4.7	Réaction de racémique avec <i>R. buffoni</i> en fermenteur . . . . .	64
4.8	Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats avec lot n°02 . . . . .	66
4.9	la réduction du Phényl-éthyl-cétone avec <i>P. minuta</i> et <i>R. turuloides</i> . . . . .	68
4.10	Conclusion . . . . .	69
<b>III</b>	<b>Étude de la réactivité par modélisation moléculaire(M.M.)des réactions enzymatiques</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>modélisation de la réactivité de la réduction enzymatique</b>	<b>71</b>
5.1	Introduction . . . . .	71
5.2	Méthodes de calculs théoriques . . . . .	72
5.3	Résultats et discussion . . . . .	74
5.4	conclusion . . . . .	83
	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>85</b>
	<b>partie expérimentale</b>	<b>88</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>95</b>
	<b>Annexe</b>	<b>106</b>
	<b>article</b>	<b>128</b>

# Introduction générale

Depuis plus d'un siècle, la synthèse asymétrique a évolué grâce aux efforts de nombreux scientifiques. En 1848, les travaux sur la résolution de l'acide tartrique, ont démontré pour la première fois l'existence de la chiralité et ont dévoilé une nouvelle dimension de la chimie organique : la chimie du chiral. Ces travaux désormais célèbres allaient stimuler la communauté scientifique et la mener vers d'importantes découvertes dans les années suivantes. En effet, des chercheurs de renom tels que Thomson, Fischer, MacKenzie, Barton et Prelog ont contribué à la compréhension et développement de la synthèse asymétrique et l'importance des molécules chirales. Grâce à leurs efforts, et ceux d'autres chercheurs, il est aujourd'hui possible de synthétiser majoritairement un énantiomère (ou diastéréoisomère) d'une molécule cible [1].

Ainsi, vu l'importance des alcools notamment comme intermédiaires de synthèse, l'accès à des entités stéréosélectives ou stéréospécifiques a pris un essor considérable au cours de la seconde partie du vingtième siècle. C'est au cours de cette période que la relation entre la pureté énantiomérique d'un composé et son activité biologique devient évidente : il y aurait formation d'un complexe diastéréoisomérique entre le composé chiral stéréospécifique et le récepteur biologique : généralement une enzyme contenant un site de réception constitué de résidus chiraux stéréospécifiques. Ainsi, deux énantiomères peuvent avoir des activités biologiques différentes ou identiques selon le complexe Enz-Substrat puis Enz-produit formé. Ci-dessous sont représentées quelques molécules dont l'activité est liée à un de leur énantiomère respectif : le chloramphénicol <sup>®</sup> **1** un antibiotique [2], le dénopamine <sup>®</sup> **2** et le Bévantalol <sup>®</sup> **3** sont très efficaces dans le traitement de maladies du cœur (antihypertenseur) [3, 4, 5], (Figure 1).

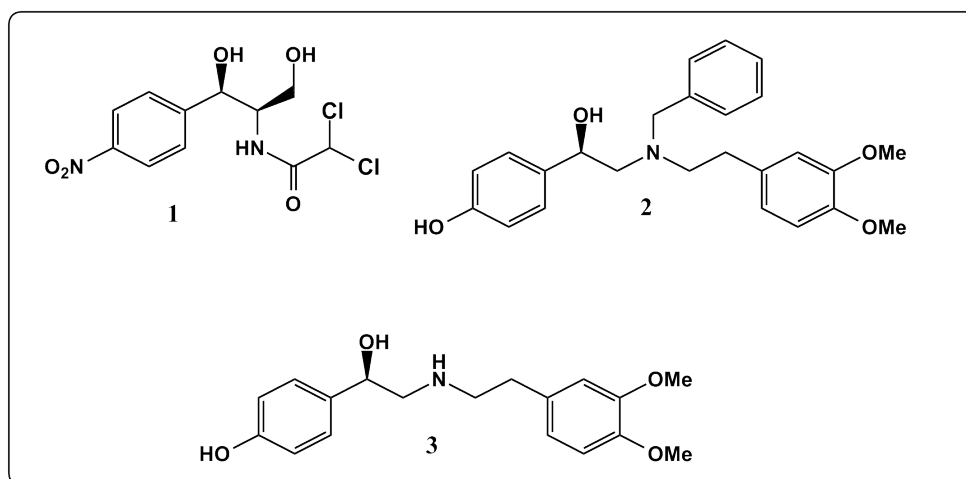


FIGURE 1 – Exemple des molécules chirales dont les énantiomères ont des propriétés biologiques.

L'accès aux molécules optiquement pures peut être réalisé, par **catalyse homogène**

si le catalyseur fait partie de la même phase que le système réactionnel. Dans le cas contraire, on parle de **la catalyse hétérogène** qui présente 80% des procédés industriels ou par **la catalyse enzymatique** « biocatalyse » qui utilise des catalyseurs naturels représentés par des enzymes. Ce dernier type de catalyse est le plus utilisé ces deux dernières décennies, (figure2).

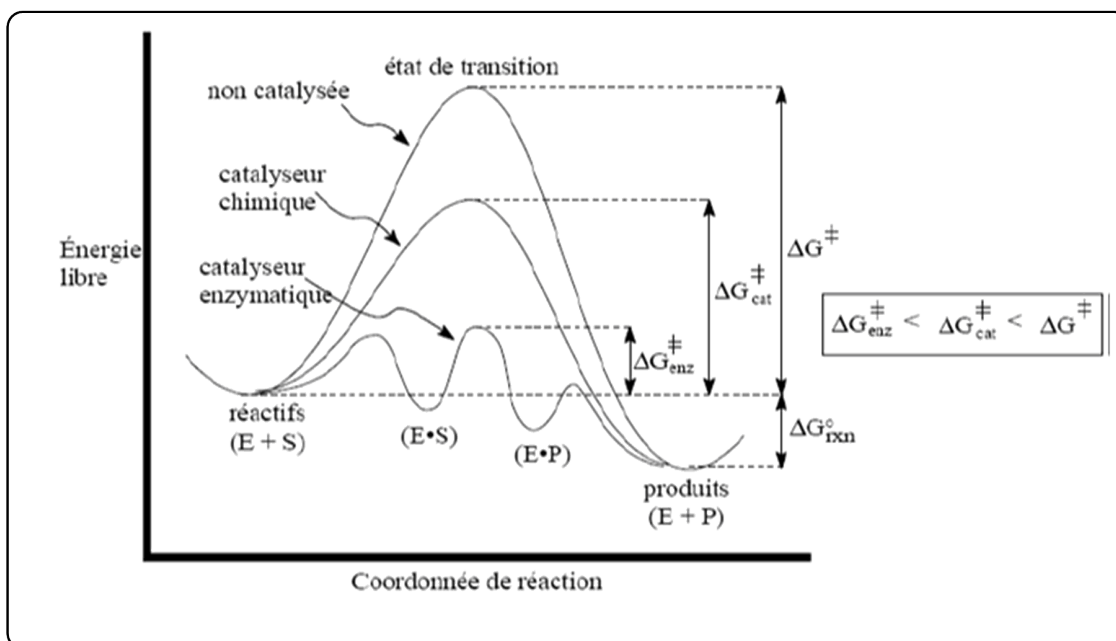


FIGURE 2 – Intérêt de la catalyse enzymatique.

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à la réduction énantiosélective d'une série des cétones prochirales par catalyse enzymatique. Le manuscrit de cette thèse est divisé en trois parties.

**La première partie** de cette thèse divisée en deux chapitres :

- Le premier montre les différentes méthodes d'obtention des alcools optiquement purs.
- le deuxième concerne des généralités sur les enzymes et les déchets alimentaires.

**La deuxième partie** comporte deux chapitres :

- Dans le premier chapitre, on présente les résultats de notre étude, concernant la réduction des cétones prochirales en alcools chiraux avec les déchets alimentaires naturelles.
- Dans le deuxième chapitre de la partie deux, on a exposé une validation d'une nouvelle méthode d'évaluation des microorganismes par la méthode combinatoire multi-substrats pour la réduction asymétrique des cétones prochirales.

Dans **la troisième partie**, on a élucidé et conforté théoriquement le mécanisme réactionnel ainsi que la sélectivité observée expérimentalement dans la réaction de la réduction enzymatique des cétones.

Première partie

Etude bibliographique

# Chapitre 1

## l'Accès aux alcools

### Sommaire

---

<b>1.1 Introduction</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Synthèse d'alcools chiraux</b>	<b>7</b>
1.2.1 Synthèse d'alcools optiquement purs par voie chimique	8
1.2.2 Synthèse d'alcools optiquement purs par catalyse enzymatique	12
<b>1.3 Molécules d'alcools chiraux à effets biologiques</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Conclusion</b>	<b>22</b>

---

### 1.1 Introduction

La chimie organique connaît depuis quelques années, une avancée remarquable dans le domaine de la synthèse des molécules chirales optiquement pures telle que la synthèse asymétrique d'alcools chiraux.

L'accès à des molécules énantiomériquement pures et plus particulièrement les alcools est une préoccupation majeure dans beaucoup de domaines : pharmacie, agrochimie, arôme-etc [6], Les alcools chiraux fonctionnalisés et surtout les alcools secondaires comptent parmi les grands intermédiaires clé en synthèse de nombreuses molécules cibles, notamment pour l'industrie pharmaceutique. G. Yang et coll. ont pu accéder à un alcool secondaire énantiomériquement pure, précurseur des antidépresseurs : (fluoxetine<sup>®</sup>)**4** (la tomoxétine<sup>®</sup>)**5** et [7] par l'intermédiaire de la réduction enzymatique énantioselective du 3-chloropropiophénone en présence de la *Saccharomyces cerevisiae*, (figure1.1).

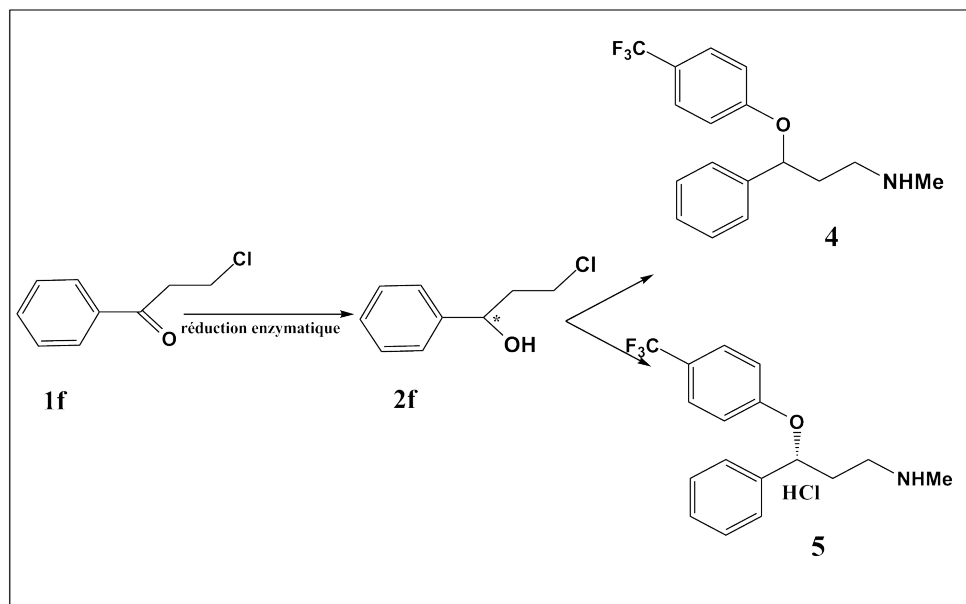


FIGURE 1.1 – Synthèse de fluoxétine et tomoxétine.

## 1.2 Synthèse d'alcools chiraux

La voie royale pour obtenir des composés chiraux purs est la synthèse directe de l'énantiomère (synthèse asymétrique) sans passer par l'intermédiaire d'un racémique et par l'élimination de l'une des deux formes. En 1904, Marckwald a donné une définition des synthèses asymétriques qui reste d'actualité : « Les synthèses asymétriques sont celles qui à partir d'un corps de structure symétrique et en utilisant intermédiairement des substances optiquement actives sans faire intervenir aucun processus analytique conduisent à des produits optiquement actifs » [8]. Ainsi, la synthèse asymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale. Cette transformation nécessite l'aide d'un auxiliaire chiral qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur. L'auxiliaire chiral, employé en quantité stœchiométrique par rapport au substrat, transforme directement le substrat achiral en l'énantiomère désiré [9].

La synthèse asymétrique catalytique est de plus en plus utilisée sur le plan académique lors de l'élaboration des molécules complexes. Elle rend aussi de réels services dans l'industrie pharmaceutique pour la préparation rapide d'échantillons des deux énantiomères nécessaires aux premiers essais biologiques [10].

### 1.2.1 Synthèse d'alcools optiquement purs par voie chimique

L'importance des alcools chiraux à l'échelle industrielle a contribué au développement de plusieurs protocoles de synthèse, l'obtention de ces composés peut être réalisée par différents modes d'accès chimiques. La synthèse chimique des alcools optiquement purs reste la méthode la plus utilisée et présente plusieurs avantages, dont les principaux résident dans le fait que cette méthode est économique, rapide (<24h) avec un bon rendement et réalisable avec de nombreuses molécules. D'autre part, la voie chimique présente plusieurs inconvénients tels l'obtention de sous-produits (provoquant une coloration), la toxicité des solvants utilisés et la faible sélectivité car ce type de synthèse ne permet pas de contrôler ni le site de la réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles [11, 12, 13].

— Ils existent plusieurs méthodes de synthèses chimiques des alcools optiquement purs<sup>1</sup> :

Les alcools chiraux peuvent être obtenus par hydrosilylation ou hydroboration d'oléfines suivie d'une oxydation. L'hydrosilylation du norbornène **6**, catalysée par un complexe du palladium [14] ou l'hydroboration du styrène **10**, catalysée par un complexe du rhodium **11** [15] sont deux exemples conduisant à d'excellentes énantiosélectivités, (figure 1.2).

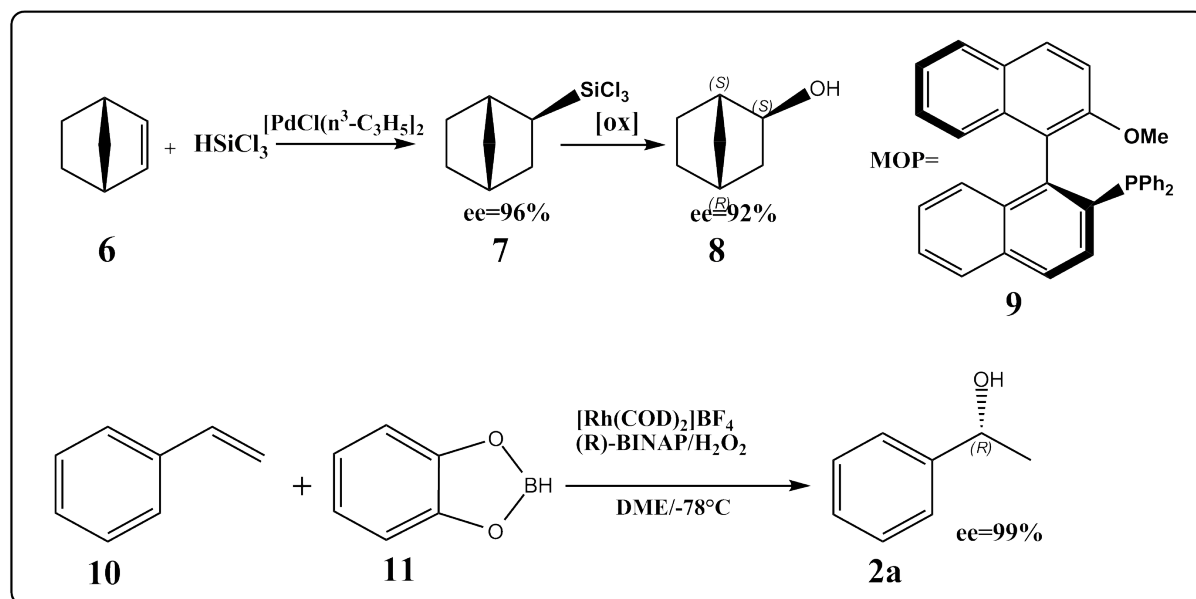


FIGURE 1.2 – Hydrosilylation et Hydroboration d'oléfines.

D'autres voies de synthèse ont été aussi utilisées pour la synthèse d'alcools chiraux.

1. On parle de pureté stéréosélective ou spécifique.

Citons l'époxydation asymétrique des oléfines suivie de l'ouverture du cycle par un nucléophile, et la dihydroxylation asymétrique et la carbométhoxylation régio et énantio-sélective d'oléfines, (figure1.3). [16]

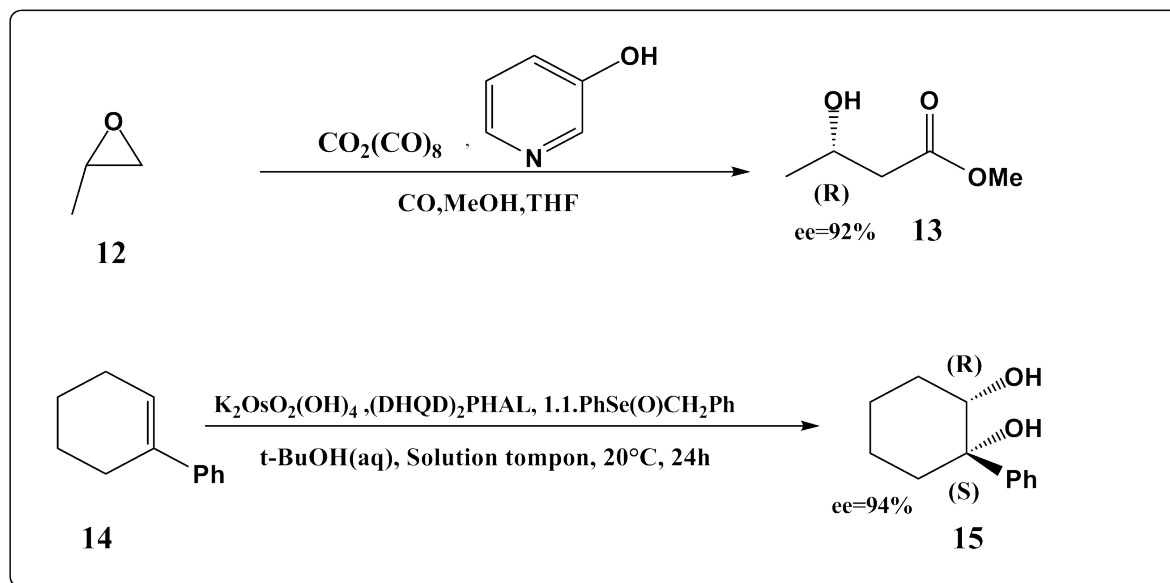
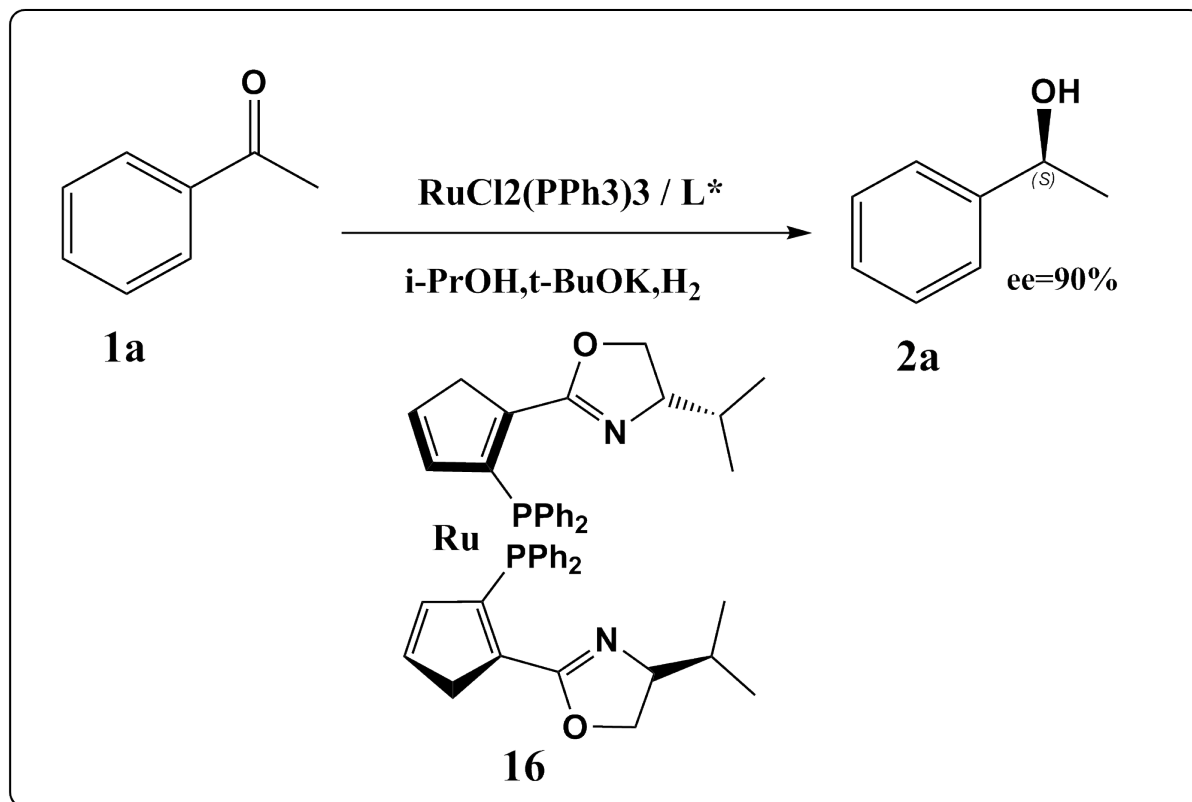


FIGURE 1.3 – Epoxydation asymétrique des oléfines.

La synthèse des alcools chiraux par réduction asymétrique des cétones correspondantes peut être réalisée selon trois principales méthodes utilisées avec succès.

- En 2012, l'équipe de Zhang [17] a décrit la réduction asymétrique de cétones aromatique avec un complexe de  $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$  coordonné à un ligand de type ruthénocényl phosphinooxazoline **16** à chiralité planaire, les alcools correspondants ont été isolés avec des rendements et des excès énantiomériques élevés, (figure1.4).

FIGURE 1.4 – La réduction des cétones avec un complexe de  $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ .

- Un autre exemple illustre l'hydrogénation asymétrique des aryles pyridyles cétones avec un complexe de ruthénium (**II**) [18] coordonné au ligand de type SunPhos **17**. La sélectivité du catalyseur dépend essentiellement de la nature et la position du groupement R de la cétone, le pyridin-3-yl (o-tolyl) méthanol **18** est récupéré avec un excès énantiomérique supérieur à 98%, tandis que ses analogues **19**, **20** et **21** sont obtenus avec des excès modérés (ee = 30,4%, 61,5% et 92% respectivement), (figure 1.5).

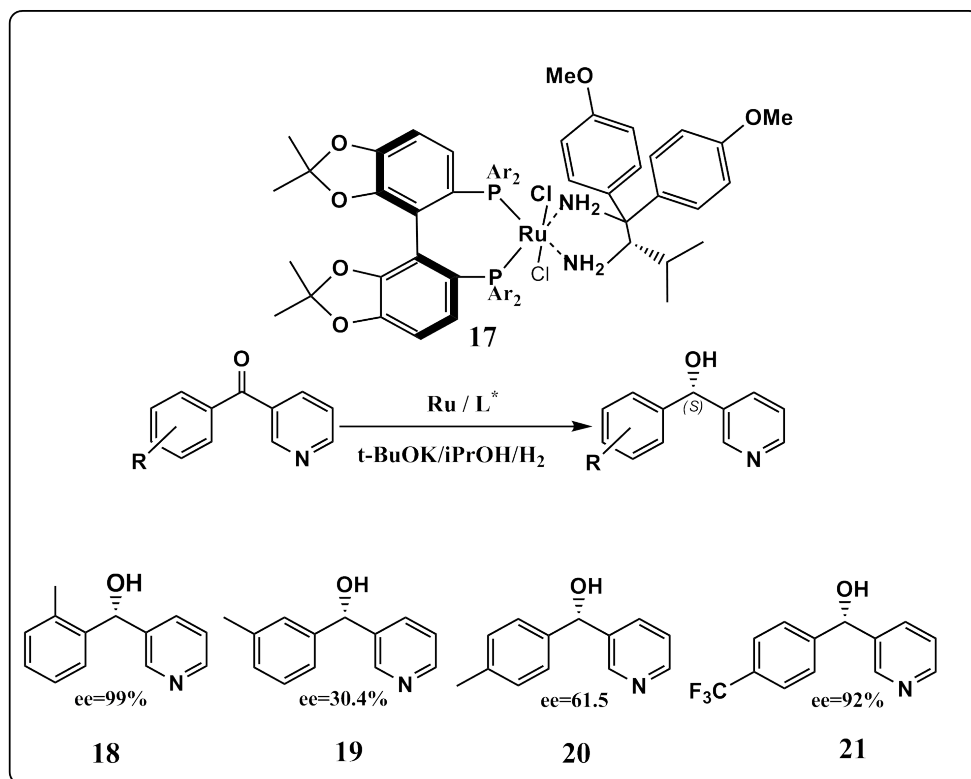


FIGURE 1.5 – La réduction des cétones avec un complexe de ruthénium II.

— La réduction asymétrique des cétones prochirales utilisant le BH<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>S et (R)-Me-CBS est illustrée ci-dessous. On remarque que le catalyseur donne un meilleur résultat aussi bien pour l'excès énantiomérique (jusqu'à de 97%) que pour le rendement (60-96%) [19], (figure1.6).

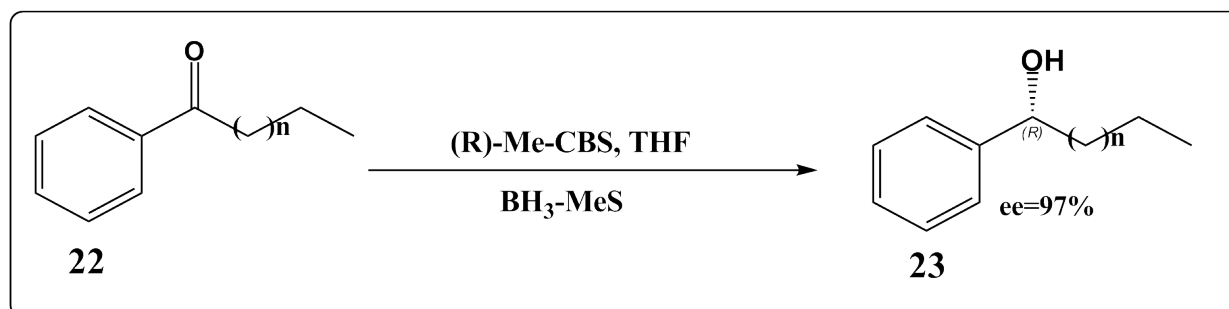


FIGURE 1.6 – Réduction de cétone prochirale par le borane.

### 1.2.2 Synthèse d'alcools optiquement purs par catalyse enzymatique

Depuis plusieurs années, une alternative a été trouvée par de nombreux groupes de recherche à travers l'utilisation d'enzymes dans la synthèse organique [20].

Elles constituent un groupe particulièrement important de catalyseurs chiraux. L'atout majeur de la catalyse enzymatique est son extrême sélectivité dans certains cas. En effet, quelques molécules sont de bons substrats pour certaines enzymes qui conduisent à une énantioselectivité élevée pouvant résoudre un mélange racémique. Les enzymes disponibles et les plus utilisées sont celles qui catalysent l'hydrolyse des esters et des amides (estérases, lipases, peptidases, acylases) et celles qui favorisent la réduction de cétones ou aldéhydes en alcools (hydrogénases). Dans certains cas, la réaction se déroule dans un incubateur, contenant un micro-organisme qui produit l'enzyme appropriée durant une fermentation [21].

#### 1.2.2.1 Les avantages de la catalyse enzymatique

Les méthodes de catalyse enzymatique ont des avantages [22] par rapport aux méthodes chimiques, tels que :

- Asymétrie intrinsèque.
- Absence des réactions secondaires, telles que la condensation d'aldol.
- Fonctionnant dans des conditions essentiellement douces de réaction.

#### 1.2.2.2 Les inconvénients de la catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique se distingue des autres méthodes de catalyse par plusieurs avantages, mais cela n'empêche pas qu'elle présente des inconvénients [23] à savoir :

- Synthèse coûteuse au niveau industriel.
- Problèmes de solubilité des substrats.
- Rendements variables.
- Temps de réaction souvent longs (>24h).

-Le dédoublement cinétique des acétates allyliques :

Kim et coll [24] ont amélioré le dédoublement cinétique dynamique des acétates allyliques linéaires **24** en présence d'un catalyseur de racémisation, le complexe de palladium (0)-dppf [dppf : 1,1'-bis (diphénylphosphino)ferrocène] et le 2-propanol comme accepteur d'acyle. Parmi les différents substrats, le (R)-4-phénylbut-3-en-2-ol **25** est obtenu avec un rendement de 83% et un excès énantiomérique supérieur à 99% en 36 heures de réaction, (figure1.7).

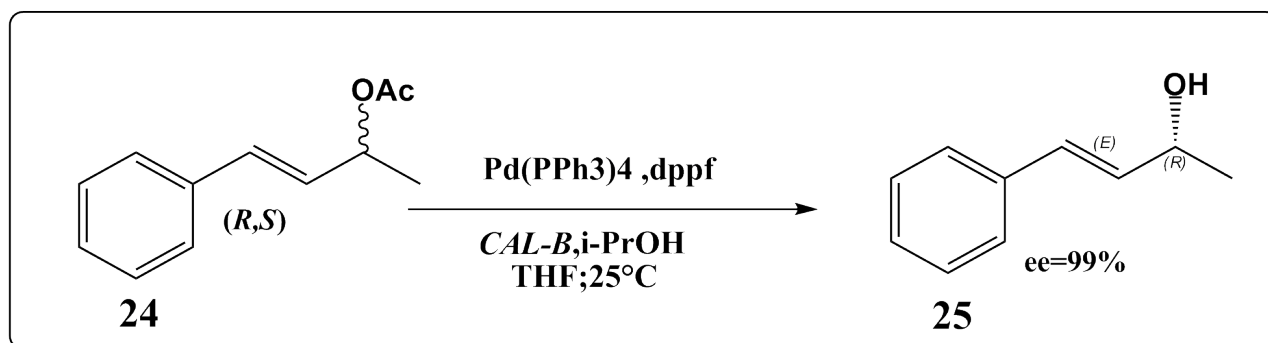


FIGURE 1.7 – Synthèse de (R)-4-phényl-but-3-en-2-ol.

-Réduction par l'enzyme *Saccharomyces cerevisiae* :

C'est le microorganisme le plus utilisé et le meilleur pour la réduction enzymatique [25] grâce à sa disponibilité. Ci-dessous est représentée l'exemple de la réduction de l'améthylène  $\beta$ -cétoesters **26** par l'enzyme *Saccharomyces cerevisiae* [26] donnant d'excellents excès énantiomériques et un bon résultat au niveau du rendement, (figure1.8).

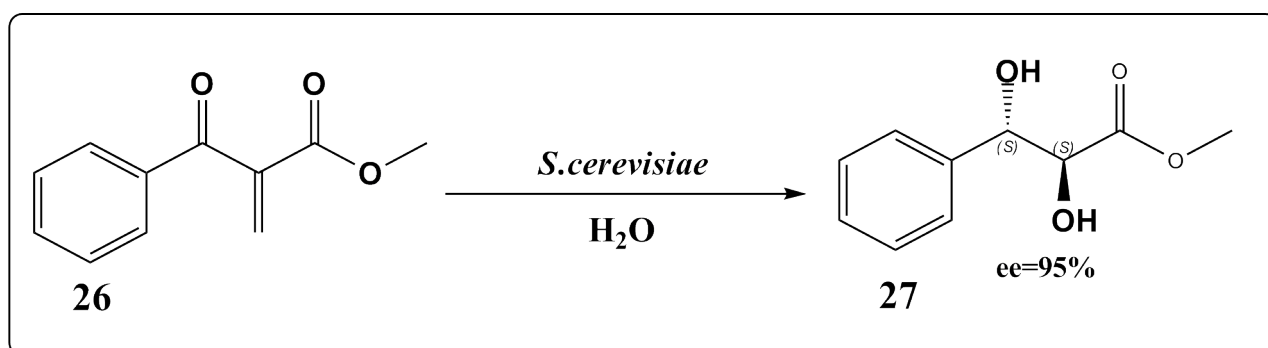


FIGURE 1.8 – Réduction asymétrique de l'améthylène  $\beta$ -cétoesters par *S. cerevisiae*.

-Réduction avec *Lasiodiolodia theobromae* :

La réduction stéréosélective du 1-(3-méthoxy-4-nitrophényl)éthanone **28** prochirale catalysée par des cellules de *Lasiodiolodia theobromae* se fait dans un milieu de pomme de

terre dans le dextrose, la réaction se déroule à une température de 28 °C avec un excellent excès énantiomérique [27], (figure 1.9).

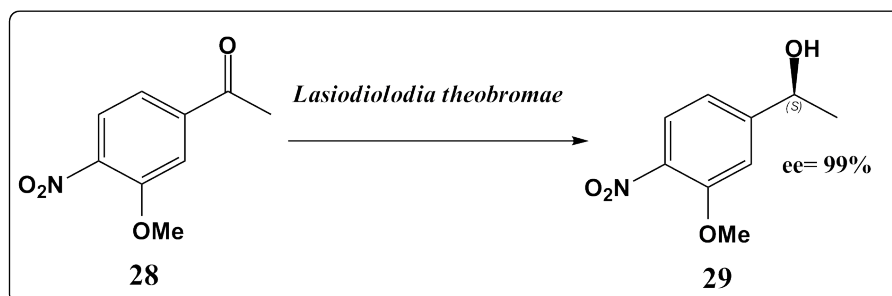


FIGURE 1.9 – Réduction de cétone prochirale en présence de *Lasiodiplodia theobromae*.

- Réduction par l'enzyme de *céleris-raves* :

Dans une solution tampon le Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> La réduction énantioselective 1-(4-méthoxyphényl)éthanone **30** catalysée par les *céleris-raves* a été effectuée à température ambiante avec des bons rendements et des excellents excès énantiomériques [28], (figure 1.10).

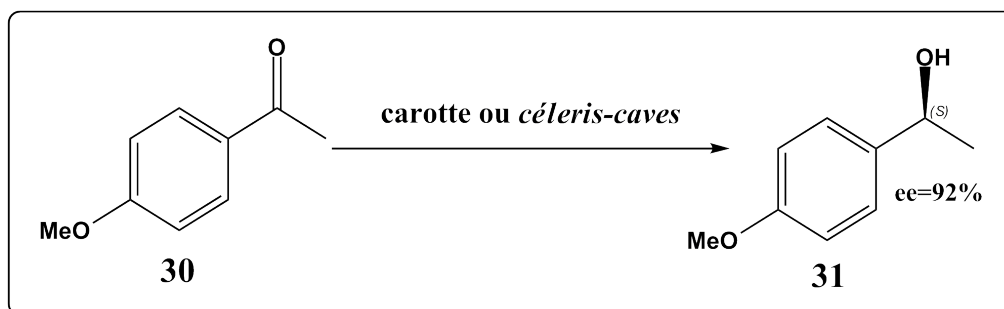
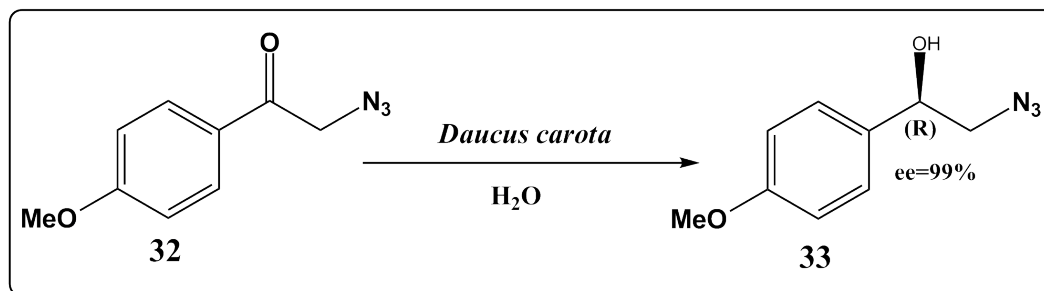


FIGURE 1.10 – Réduction de cétone prochirale en présence par *céleris-raves*.

- Réduction par l'enzyme *Daucus Carota* :

La préparation des azido-alcools chiraux **32** se fait par la réduction enzymatique des azido-cétones **33** par les racines de la carotte. Ces azido alcools optiquement purs sont également produits dans des conditions plus modérées dans une solution tampon à pH neutre (pH = 7) à température ambiante avec des excellents rendements [29], (figure 1.11).

FIGURE 1.11 – Réduction asymétrique de cétone par la *daucus carota*.

- Hydrolyse d'un ester avec Morceaux de pelures d'orange :

La figure suivante montre que l'utilisation des morceaux de pelures d'orange comme catalyseur dans l'hydrolyse des esters **34** est apte à conduire à la production d'alcools chiraux. Cette réaction, réalisée en milieu aqueux, a permis d'obtenir le produit désiré avec des bons rendements et de meilleurs excès énantiomériques [30], (figure1.12).

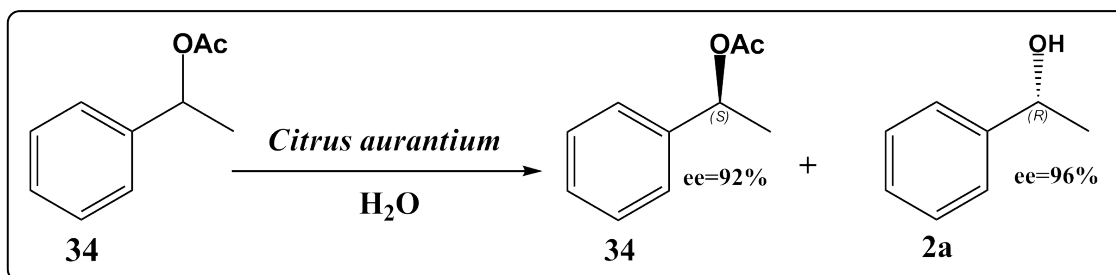


FIGURE 1.12 – L'hydrolyse d'un ester avec les morceaux de pelures d'orange.

- Biosynthèse d'alcools chiraux optiquement purs par système biphasique :

Parmi les CR (carbonyle réductase) de *Streptomyces* découvertes par l'extraction de bases de données génomiques, le SgCR (le carbonyle réductase de *Streptomyces griseus*) a présenté une meilleure activité enzymatique et a été ensuite sélectionné pour une autre caractérisation. L'équipe de Zhuotao Tan a montré que le SgCR a des performances biochimiques excellentes, une activité biocatalytique élevée et une hyper-régiosélectivité excellente dans la réduction des cétones. En outre, après l'utilisation des stratégies d'immobilisation cellulaire ou de réacteur à membrane, le SgCR est considéré comme un catalyseur distingué pour la synthèse asymétrique de divers alcools chiraux importants industriellement [31], (figure1.13).

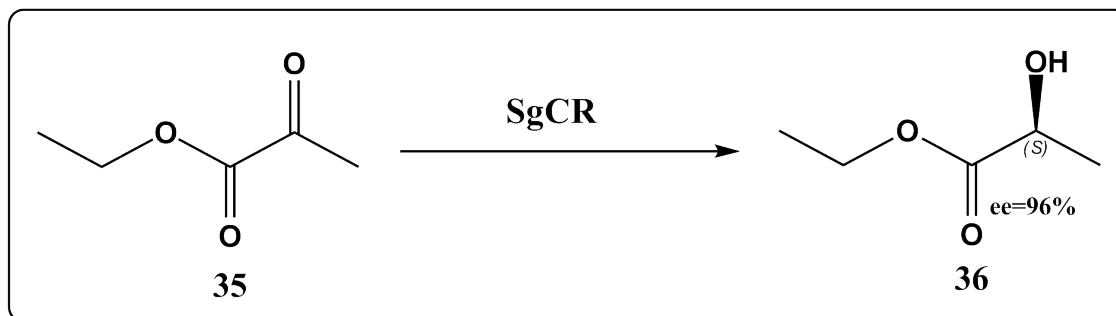
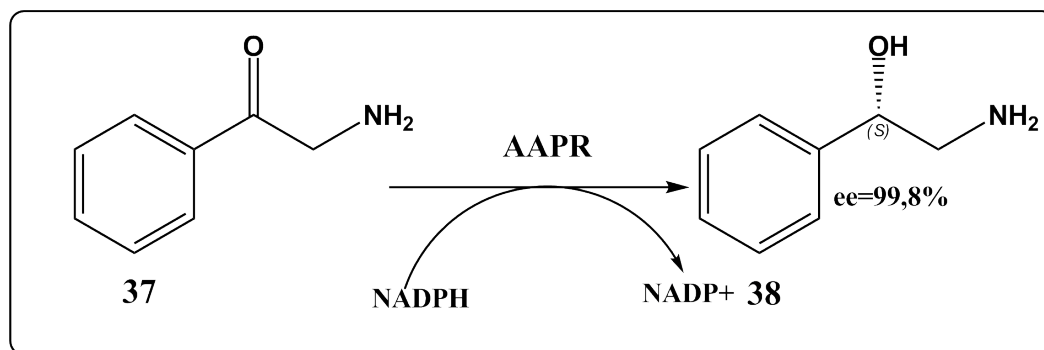
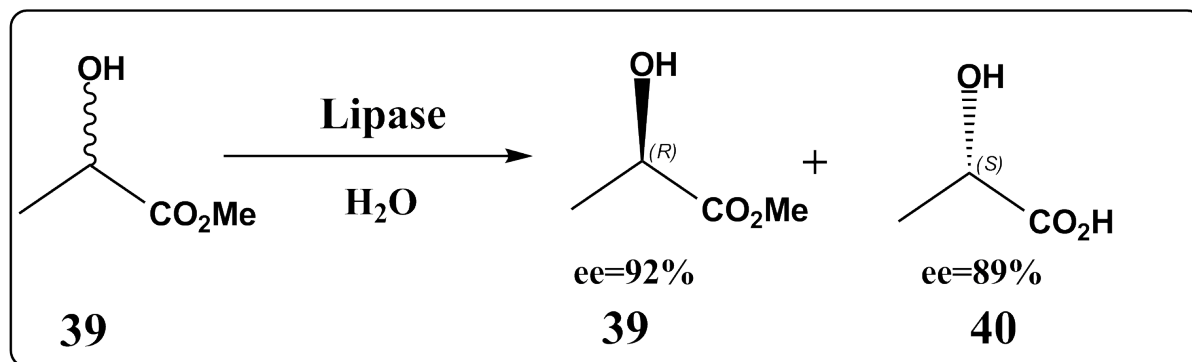


FIGURE 1.13 – Synthèse des alcools chiraux avec le SgCR.

- La réduction de 2-aminoacétophénone avec un enzyme extrait d' *Arthrobactersulfureus* : Un nouvel agent réductase a été purifié à partir d' *Arthrobactersulfureus* (AAPR). L'enzyme est un monomère ayant un poids moléculaire d'environ 60 kDa. En utilisant le **NADPH** comme coenzyme, il catalyse la réduction des cétones en particulier les aminophényl cétones, et réduit stéréospécifiquement le 2-aminoacétophénone **37** en (S) -2-Amino-1-phényléthanol **38** avec un excellent excès énantiomérique a pH optimal 7,5 [32], (figure1.14).

FIGURE 1.14 – La réduction du 2-aminoacétophénone avec l' *Arthrobactersulfureus* BW1010.

-Synthèse enzymatique des acides 2-hydroxy-carboxyliques chiraux : Un certain nombre de voies biocatalytiques ont été développées pour la préparation des acides 2-hydroxy-carboxyliques chiraux, y compris la résolution cinétique (dynamique) et la synthèse asymétrique. La résolution cinétique a été obtenue par hydrolyse ou estérification, et l'introduction de la racémisation chimique ou enzymatique in-situ a abouti à la résolution cinétique dynamique. La réduction biocatalytique d'acide céto-carboxylique **39** fournit une approche plus directe pour accéder aux acide  $\alpha$ -hydroxy-carboxylique optiquement pur **40**, en particulier lorsque les "cellules conçues" offrent une régénération efficace du cofacteur in-situ [33], (figure1.15).

FIGURE 1.15 – Synthèse d'acides  $\alpha$ -hydroxy-carboxyliques.

### 1.3 Molécules d'alcools chiraux à effets biologiques

Sur le plan thérapeutique, étant donné que la majorité des médicaments mis sur le marché possèdent au moins un centre de chiralité, il n'est donc pas étonnant d'observer des effets différents des énantiomères d'un médicament administré sous forme d'un mélange d'énantiomères. De nombreux énantiomères présentent des propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, une toxicité et une capacité de liaison liés à la stéréochimie. Pour cette raison, il faut considérer les énantiomères comme des substances distinctes [34].

L'exemple le plus dramatique est celui du thalidomide, qui a été synthétisé en 1954 par la firme pharmaceutique allemande Grünenthal, et commercialisé comme sédatif antiémétique et hypnotique non barbiturique, en Europe en octobre 1957, sous forme d'un mélange racémique nommé Contergan<sup>®</sup> [35]. Ce médicament a été administré aux femmes enceintes en raison de son action rapide et montrait une faible toxicité à haute dose dans les études pharmacologiques, réalisées chez le rat [36].

Après quelques années de commercialisation, en 1961, les épidémiologistes ont noté un effet tératogène sur le développement fœtal créant une amélie ou une phocomélie induite par la capacité du médicament à inhiber l'angiogénèse, c'est-à-dire, à interférer avec le développement des vaisseaux sanguins du fœtus [37]. La molécule fut alors retirée du marché en 1965.

Des travaux ultérieurs ont permis de séparer les deux énantiomères de cette molécule [38] et d'étudier leurs propriétés biologiques. Ces études ont montré que l'activité tératogène néfaste était essentiellement due à l'énantiomère (S) 42 [39], (figure 1.16).

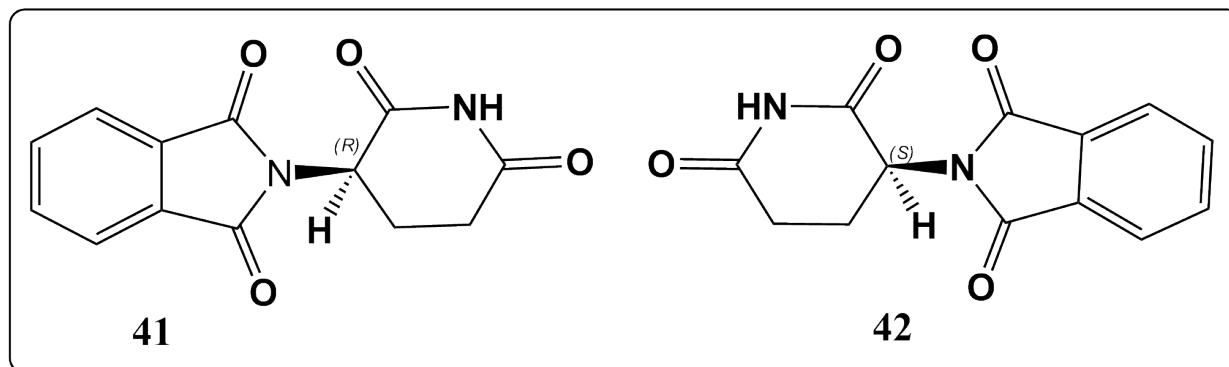


FIGURE 1.16 – Structure des énantiomères du thalidomide.

Nous allons citer quelques exemples des molécules étant un alcool chiral et qui présente une activité biologique.

-Propranolol :

Il est synthétisé en 1960 par le pharmacien James W. Black, et commercialisé comme  $\beta$ -bloquant non sélectif et sympatholytique, c'est-à-dire, qu'il bloque le système sympathique. Il est l'un des antihypertenseurs les plus commercialisés grâce à action bloquante des récepteurs adrénergiques bêta [40]. Le propranolol est un mélange racémique des deux énantiomères, R (+) et S(-) qui possèdent des propriétés différentes, l'activité contraceptif étant essentiellement due à l'énantiomère (R) 44, (figure 1.17).

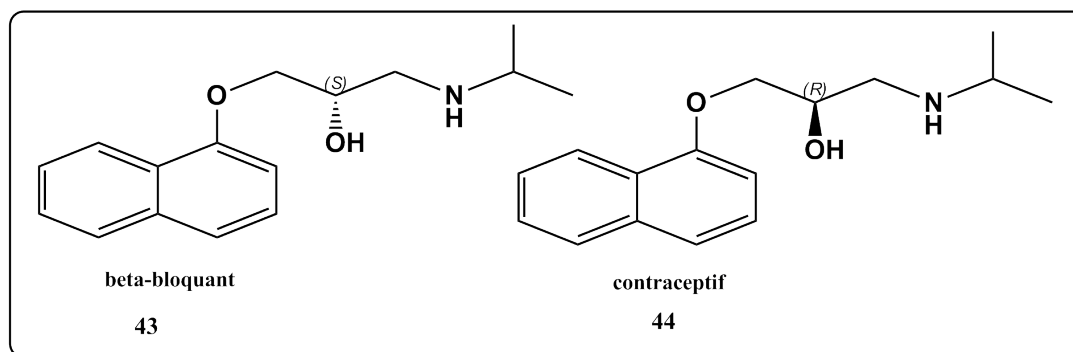


FIGURE 1.17 – Structure des énantiomères de la propranolol.

-Épinéphrine :

L'Épinéphrine est une hormone, plus connue sous le nom d'adrénaline [41], c'est une molécule qui est incontestablement à l'origine de la plupart des arrêts cardiaques [42]. Elle est également utilisée dans les chocs anaphylactiques (d'origine allergique), et en réanimation, lors de certains états de choc graves [43]. Ce médicament est un mélange de deux énantiomères qui possèdent la même activité biologique mais d'intensité différente,

le composé le plus actif est l'énantiomère (R) **45** de l'adrénaline qui a un effet vasoconstricteur plus important que l'isomère (S) **46**. Cette différence d'activité entre les deux énantiomères a été expliquée par la théorie d'Easson et Stedman [44],(figure1.18).

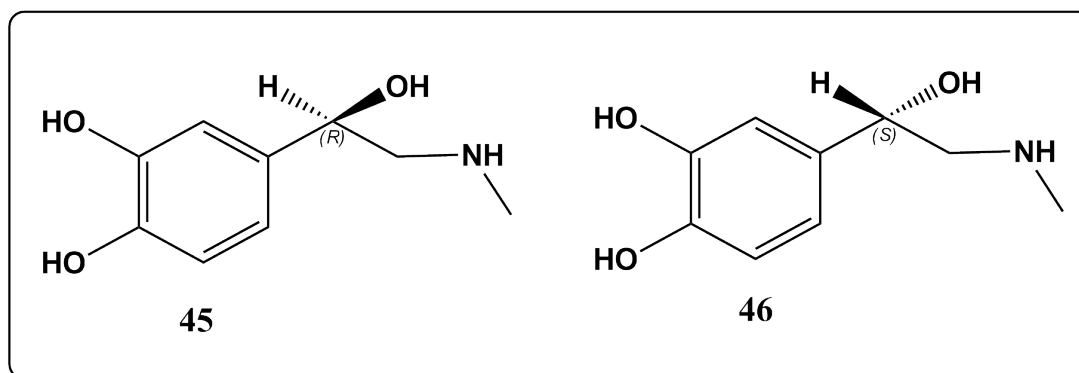


FIGURE 1.18 – Structure des énantiomères de l'adrénaline.

-Catéchine :

La catéchine connue aussi sous le nom de catéchol est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols, utilisée comme antioxydants, il existe plusieurs stéréoisomères de cette molécule ( quatre énantiomères) [45]. Dans la nature, les isomères les plus fréquents sont la (-)-épicatéchine **47** et la (+)-catéchine **48**. Les deux autres énantiomères la (-)-catéchine et la (+)-épicatéchine sont beaucoup plus rares et leur présence semble être liée à des réactions enzymatiques ou à des traitements thermiques [46],(figure1.19).

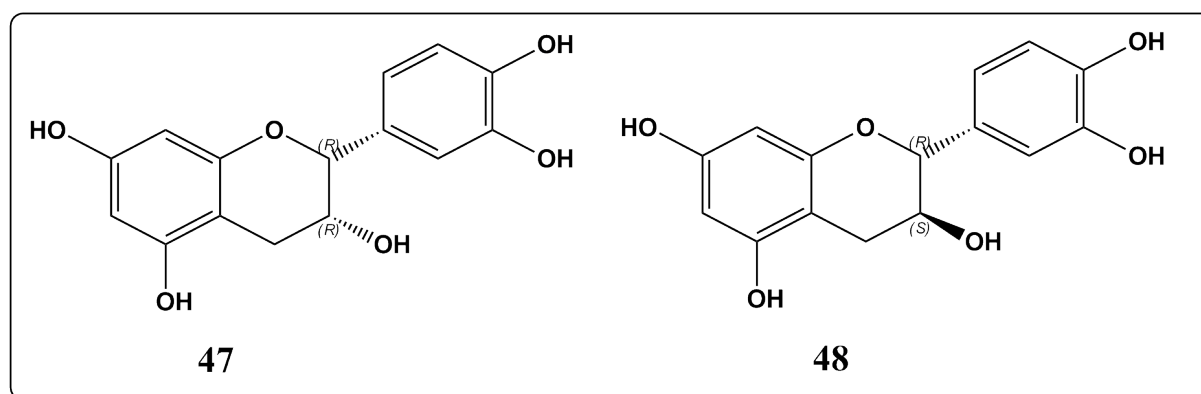


FIGURE 1.19 – Structure des énantiomères les plus fréquents de la catéchine.

-La vitamine C :

L'Acide ascorbique est un cofacteur enzymatique [47], utilisé comme antianémique pour son rôle dans la synthèse des globules rouges et son effet à faciliter l'absorption du fer. Il

présente aussi une activité antioxydant et antifatique [48]. Seul l'énantiomère (R,S) **50** est actif, l'autre énantiomère (S,R) **49** ne présente aucune activité biologique, (figure 1.20).

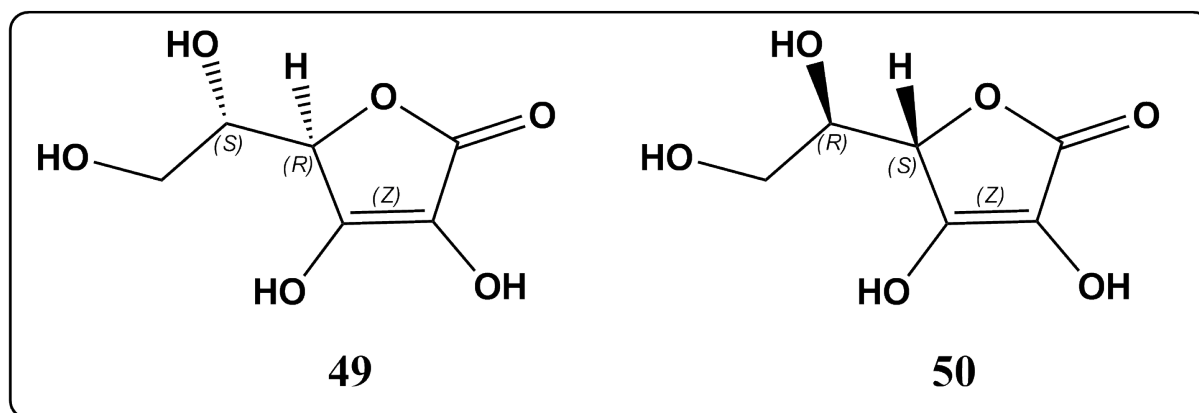


FIGURE 1.20 – Structure des énantiomères de l'acide ascorbique.

-L'éphédrine :

Il est synthétisé par Kanao en 1920 [49], ce médicament est une amine sympathicomimétique c'est-à-dire que son mécanisme d'action principal est lié à son action indirecte sur le système des adrénérgiques. Il est fréquemment utilisé comme décongestionnant [50], l'éphédrine utilisé comme antiasthmatique et vasoconstricteur [51]. Il présente une isomérisie optique et possède deux centres de chiralité qui donne quatre énantiomères, les énantiomères (1R,2R) et (1S,2S) qui sont appelés pseudo éphédrine, alors que les énantiomères (1R,2S) et (1S,2R) sont appelés éphédrine, L'isomère mis initialement sur le marché est la (-)-(1R,2S)-éphédrine **51**, (figure 1.21).

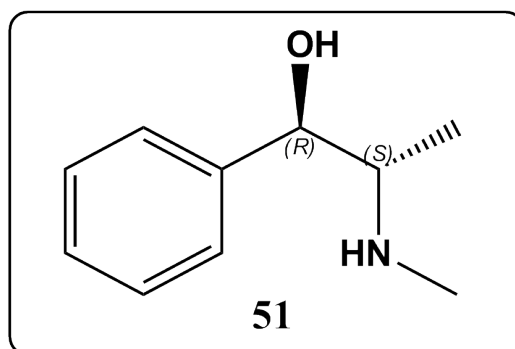


FIGURE 1.21 – Structure de L'éphédrine.

-Le menthol :

Le menthol est une molécule obtenue synthétiquement ou par extraction des huiles essentielles de menthe, particulièrement de menthe poivrée. Le stéréo-isomère le plus courant

du menthol est le (-)-menthol **52**, de configuration (1S,2R,5R). Il appartient à la famille des monoterpénols. Le menthol a des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Il est d'ailleurs utilisé pour soulager les irritations mineures de la gorge. C'est également un anesthésique local [52],(figure1.22).

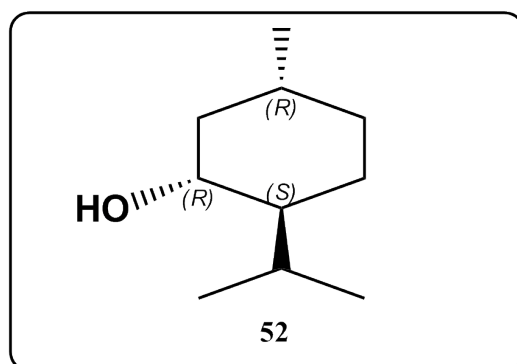


FIGURE 1.22 – Structure de menthol.

-Le carbapénème :

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques obtenus à partir de *Streptomyces catleya*. Ils font partie de la famille des bêta-lactamines. Ils agissent en liant les peptidases bactériennes, les penicillin binding proteins (PBP) et plus spécifiquement la PBP-2 et la PBP-3, des bacilles Gram négatif. Ces PBP sont des peptidoglycanes responsables du maintien de la paroi cellulaire. En court-circuitant ce mécanisme, on entraîne un défaut de la paroi cellulaire ; s'ensuit une lyse bactérienne [53],(figure1.23).

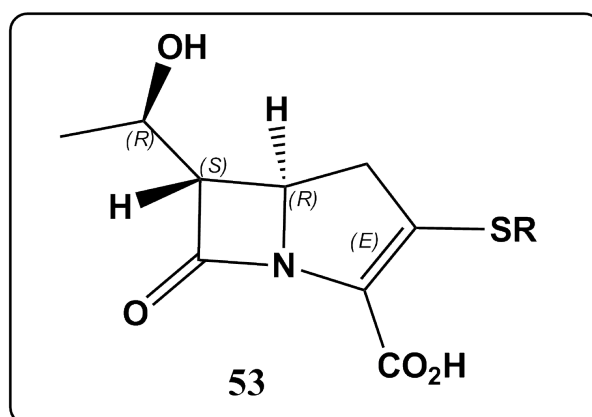


FIGURE 1.23 – Structure de carbapénème.

## 1.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté l'importance des alcools chiraux sur le plan pharmacologique, en présentant quelques exemples de médicaments utilisés pour traiter diverses maladies. Nous avons aussi rapporté quelques méthodes de synthèse d'alcools avec l'explication des deux voies chimiques et enzymatiques, et nous avons passé en revue les différents modes d'accès aux alcools optiquement purs par réduction asymétrique de cétones prochirales avec les catalyseurs enzymatiques, cette méthode connaît un essor considérable depuis la découverte de nouveaux systèmes catalytiques actifs et énantiosélectifs.

## Chapitre 2

# Rappels bibliographiques sur les enzymes et la catalyse enzymatique

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Structure des enzymes</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Mécanisme d'action des enzymes</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Classification des enzymes</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Les réductases</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Application des réductases en synthèse organique</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>Exemples des molécules biologiquement actifs synthétisé par les réductases</b>	<b>29</b>
<b>2.8</b>	<b>Propriétés des déchets alimentaires</b>	<b>38</b>
<b>2.9</b>	<b>Conclusion</b>	<b>40</b>

---

### 2.1 Introduction

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseurs dans les réactions chimiques du métabolisme, avec une efficacité et une spécificité notables. Elles sont synthétisées par les cellules biologiques dans tous les organismes [54].

La première enzyme fut découverte par « Anselme Payen et Jean-François Persoz » en 1833. Après avoir traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol, ils ont précipité une substance sensible à la chaleur. Cette substance était capable d'hydrolyser l'amidon : ils l'ont nommée diastase (diastasis = séparation) car elle sépare le sucre soluble de l'amidon [55], (figure2.1).

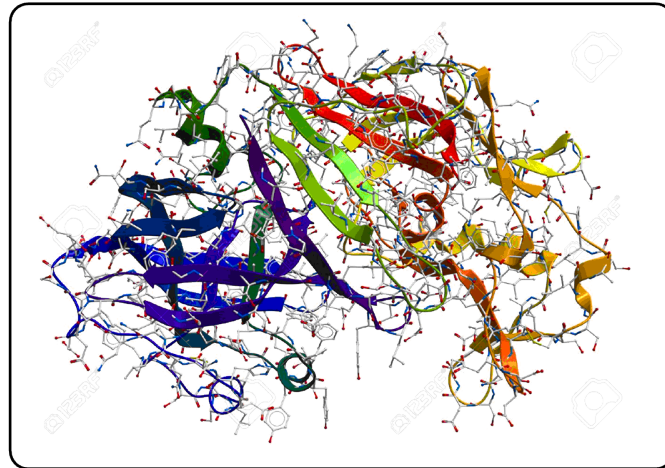


FIGURE 2.1 – Exemple d'un enzyme.

Par la suite, l'emploi des enzymes a connu un succès remarquable et a entrouvert des perspectives étonnantes.

Actuellement, les procédés industriels faisant appel aux enzymes pour différentes synthèses sont nombreux, appliqués dans plusieurs secteurs, à savoir pharmaceutique, alimentaire, agrochimique, ou des parfums, ce nombre ne cesse d'augmenter.

## 2.2 Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires qui sont elles-mêmes des enchaînements d'acides aminés. L'enchaînement linéaire des acides aminés définit la structure primaire [56] et lui confère sa fonction. Cette cohérente des acides aminés, en s'accommodant et en s'enroulant sur elle-même désigne une structure secondaire.

Les polypeptides n'adoptent pas tous uniquement ces structures un peu idéalisées, mais d'autres arrangements plus désordonnés peuvent apparaître tels que les plissements, l'enroulement et d'autres agrégations permettent d'obtenir une structure spatiale tertiaire et d'aménager une poche appelée « site actif » pour l'acte catalytique. Enfin, la structure quaternaire [57], dans laquelle deux chaînes ou plus, ayant chacune sa propre structure tertiaire, se combinent entre elles pour former un assemblage plus volumineux.

Par conséquent l'enzyme se présente comme un objet de configuration tridimensionnelle, (figure 2.2).

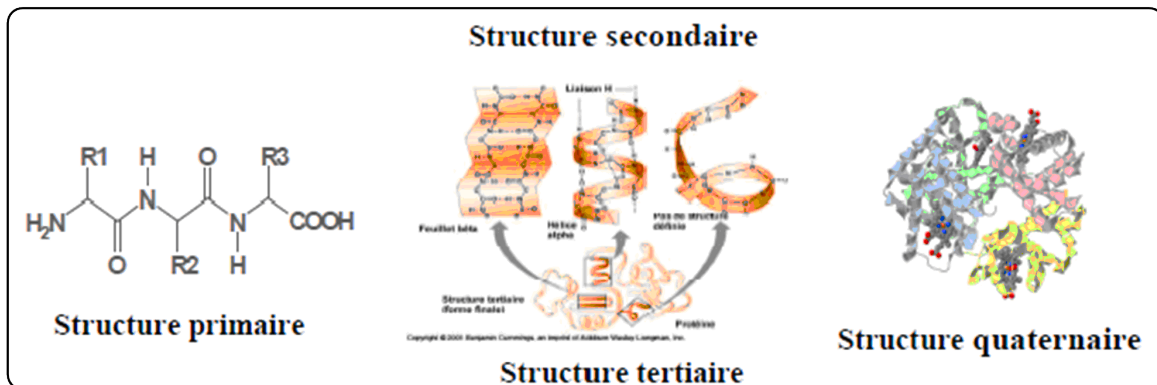


FIGURE 2.2 – Structures des enzymes.

## 2.3 Mécanisme d'action des enzymes

La catalyse enzymatique [58] peut se réaliser dans le milieu aqueux (hydrolyse) comme dans les milieux organiques. Le cycle catalytique enzymatique d'une réaction catalysée se déroule en quatre étapes successives :

**2.3.1- Diffusion :** en général, les réactions sont exécutées dans des conditions telles que ces phénomènes ne constituent pas une étape limitante de la vitesse de la réaction.

**2.3.2- Reconnaissance enzyme-substrat :** la formation du complexe E-S peut s'expliquer soit par le prototype de simple complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit.

- Complémentarité stérique : elle indique le haut degré de spécificité de la reconnaissance d'un substrat par le site actif d'une enzyme. Pour l'expliquer, Emile Fischer suggéra en 1894 que cette reconnaissance résulte d'une très forte complémentarité des structures (mais aussi de la nature chimique des groupements fonctionnels) du substrat et de l'enzyme qui se fixe à lui, comme le sont la clé et la serrure, (figure 2.3).

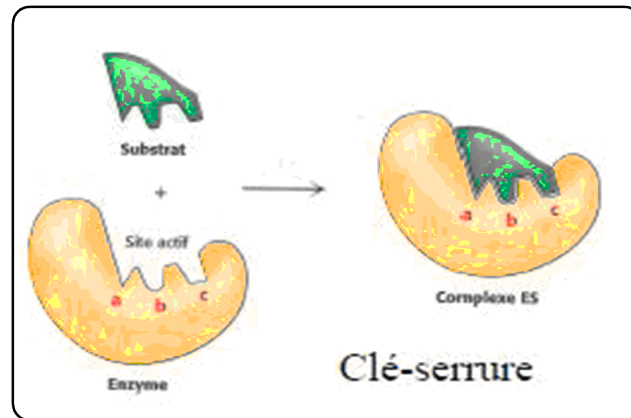


FIGURE 2.3 – Modèle de complémentarité stérique.

- Ajustement induit : en 1958, Daniel Koshland a proposé ce modèle ; le substrat induit un changement conformationnel du site actif de l'enzyme. Les orbitales des groupements catalytiques et des groupements réactionnels du substrat sont alignées de manière optimale pour permettre l'acte catalytique. A l'inverse, des molécules qui ont une structure analogue à celle du substrat peuvent se fixer mais l'orientation spatiale des groupements ne permet pas l'acte catalytique, (figure 2.4).

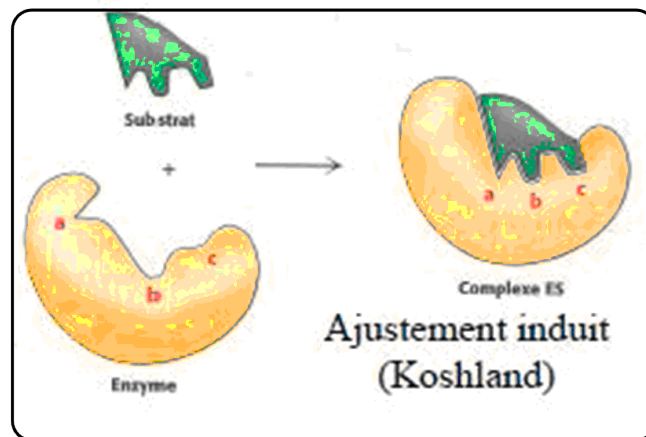


FIGURE 2.4 – Modèle de l'ajustement induit.

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

**2.3.2- Mécanisme catalytique :** l'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction. Ils constituent alors un ou plusieurs interactions réactionnelles fragiles qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation du produit. C'est la reconnaissance Enzyme-Substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels de l'enzyme et du substrat et facilite la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat.

**2.3.2- Expulsion des produits :** une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste temporairement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est ensuite libéré avec une vitesse variable selon la réaction, (figure 2.5).

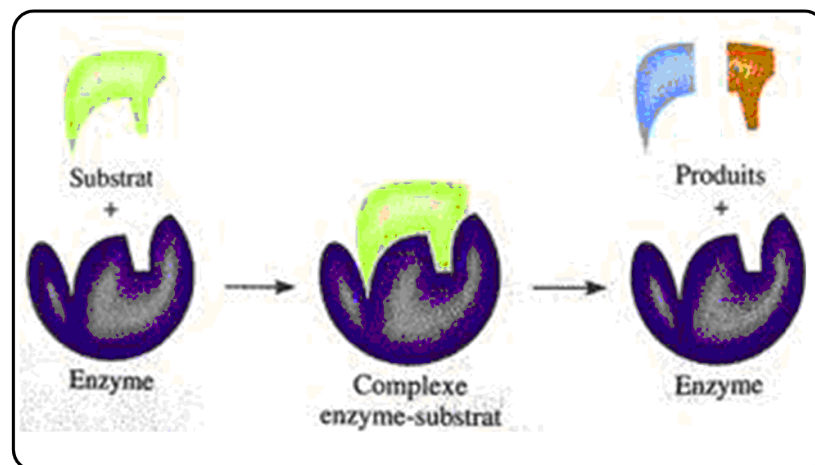


FIGURE 2.5 – Mécanisme catalytique et libération du produit.

## 2.4 Classification des enzymes

En 1961 [59], l'Union Internationale de la Biochimie (U.I.B) donne la classification suivante des enzymes, qui sont divisées en six groupes selon leurs activités catalytiques, ceci étant le caractère essentiel de toute enzyme sachant, qu'en général, qu'une enzyme ne peut catalyser qu'un seul type de réaction.

**2.4.1- les lyases :** Catalysent la cassure de liaisons covalentes, grâce à d'autres moyens que l'hydrolyse ou l'oxydation. Elles forment ainsi souvent des doubles liaisons ou des molécules cycliques. Il existe de nombreux types de lyases en fonction du type de liaison qu'elles catalysent et du substrat qu'elles ciblent et possèdent donc des rôles dans de nombreux processus cellulaires. L'une des plus connues est l'adénylate cyclase, l'enzyme qui forme l'AMP cyclique à partir d'ATP.

**2.4.2- Les transférases :** Ce sont des enzymes dont le rôle est de catalyser le transfert d'un groupe fonctionnel ou des radicaux (par exemple un groupe éthyle ou phosphate) d'une molécule (substrat donneur) à une autre (substrat accepteur).

**2.4.3- Les isomérases :** Catalysent généralement des réarrangements des groupes fonctionnels sur une même molécule. Il existe de nombreux types d'isomérases en fonction du type de réaction qu'elles catalysent (des racémases, des cis-trans isomérases, des lyases, des transférases ou des oxydo-réductases intramoléculaires...).

**2.4.4- les ligases :** Il existe de nombreux types de ligases en fonction du type de liaison covalente qu'elles catalysent (liaison carbone-carbone, liaison carbone-azote, liaison carbone-soufre...). Elles utilisent généralement l'énergie d'une molécule d'ATP (ou GTP) pour catalyser la réaction.

**2.4.5- Les oxydo-réductases :** Enzymes catalysant une réaction d'oxydoréduction. Cette famille d'enzymes est constituée de nombreuses déshydrogénases nécessitant une coenzyme, tels le NAD, le NADP, le FAD ou le FMN. Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une lactate-déshydrogénase nécessitent le NAD.

**2.4.6- Les hydrolases :** Les hydrolases sont des protéines qui possèdent un site actif permettant la réaction enzymatique, et un site de reconnaissance des molécules cibles, assurant la spécificité de la réaction. Il existe de nombreux types d'hydrolases en fonction du type de liaison covalente qu'elles hydrolysent. Elles utilisent toutes une molécule d'eau pour leur réaction et portent généralement le nom du substrat par exemple : les estérases, les nucléases, les protéases,...

## 2.5 Les réductases

En générale, les réductases sont des enzymes qui diminuent l'énergie d'activation d'une réaction d'oxydo-réduction. Elles sont très utilisées en chimie organique à cause de leur stabilité, disponibilité et facilité de manipulation. On cite comme exemple des réductases :

- **5 $\alpha$ -réductases :** aussi connus sous le nom de 3-oxo-5 $\alpha$ -stéroïd-4-dehydrogenases, elles sont des enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes. Elles participent à 3 sentiers du métabolisme : biosynthèse des acides biliaires, des androgènes et le métabolisme d'œstrogène et cancer de prostate.

- **La dihydrofolate réductase** : DHFR, dont le rôle est de régénérer l'acide folique sous forme réduite, seule forme apte à céder un groupe méthyle, est nécessaire à la fois aux bactéries, au Plasmodium et aux cellules humaines normales et cancéreuses.
- **Ribonucleotide réductase** : Ces enzymes, qui utilisent du fer ou du cobalt comme cofacteurs, interviennent dans la production de désoxyribonucléotides di- ou triphosphates à partir de ribonucléotides di- ou triphosphates, processus essentiel à la biosynthèse de l'ADN et à sa réparation [60]. Elles catalysent l'étape limitante de la synthèse des désoxyribonucléotides phosphates et elles contrôlent de ce fait la concentration cellulaire. Elles sont par conséquent l'objet d'un ensemble complexes de régulations afin de préserver le rapport ADN / masse cellulaire constant au cours de la division cellulaire et de la réparation de l'ADN [61].
- **Une thiorédoxine** : est une enzyme d'oxydoréduction dont on trouve plusieurs variantes dans pratiquement toutes les cellules vivantes, où elle joue un rôle important à plusieurs niveaux du métabolisme. Chez l'homme, elle est codée par le gène TXN situé sur le chromosome 9 humain [62].

## 2.6 Application des réductases en synthèse organique

Les réductases sont de loin l'un des groupes les plus importants en chimie organique. Outre leur sélectivité, les réductases ont de nombreuses applications en synthèse du fait de leurs conditions douces de réaction (pH entre 5 et 9, température entre 10 et 40 °C, capacité à travailler dans l'eau et en milieu organique), leur faible coût pour la majorité, la possibilité de les récupérer par immobilisation sur différents supports et de les préparer (par fermentation par exemple), de plus, elles génèrent des économies d'énergie, sont biodégradables et catalyseurs à faible doses.

Leurs inconvénients sont représentés essentiellement par le prix important et la nécessité des co-facteurs chers à obtenir pour certains, leur dénaturation, et la nécessité de contrôler le pH et la température.

## 2.7 Exemples des molécules biologiquement actifs synthétisé par les réductases

La production des énantiomères d'intermédiaires chiraux est devenue de plus en plus importante, pouvant être produits soit par méthodes purement chimiques ou par synthèse biocatalytique, utilisant entre autres des réductases comme les biocatalyseurs. Les avantages des réductases sont souvent très énantio- et régiosélective. Elles peuvent être

transportées à température ambiante et à pression atmosphérique, évitant l'utilisation des conditions plus extrêmes. Un certain nombre d'articles ont été publiés sur l'utilisation des réductases pour la synthèse d'énantiomères uniques d'intermédiaires clés utilisés dans le développement des produits pharmaceutiques. On peut citer comme exemples :

**- Les agonistes des récepteurs- $\beta_3$  :**

Plusieurs méthodes de synthèse des agonistes sélectifs des récepteurs  $\beta_3$  pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, du diabète de type II et de l'obésité ont été obtenus [63, 64], parmi eux la réduction microbienne avec le *Spingomonas paucimobilis* SC 16113 de la 4-benzyloxy-3-méthanesulfonylamino-2'-bromoacétophénone **54** pour obtenir l'intermédiaire chiral (R)-N-(2-(benzyloxy)-5-(2-bromo-1-hydroxyéthyl)phényl)méthane sulfonamide **55** est l'une des étapes nécessaire dans la synthèse totale de l'agoniste du récepteur  $\beta_3$  **56** [65], (figure 2.6).

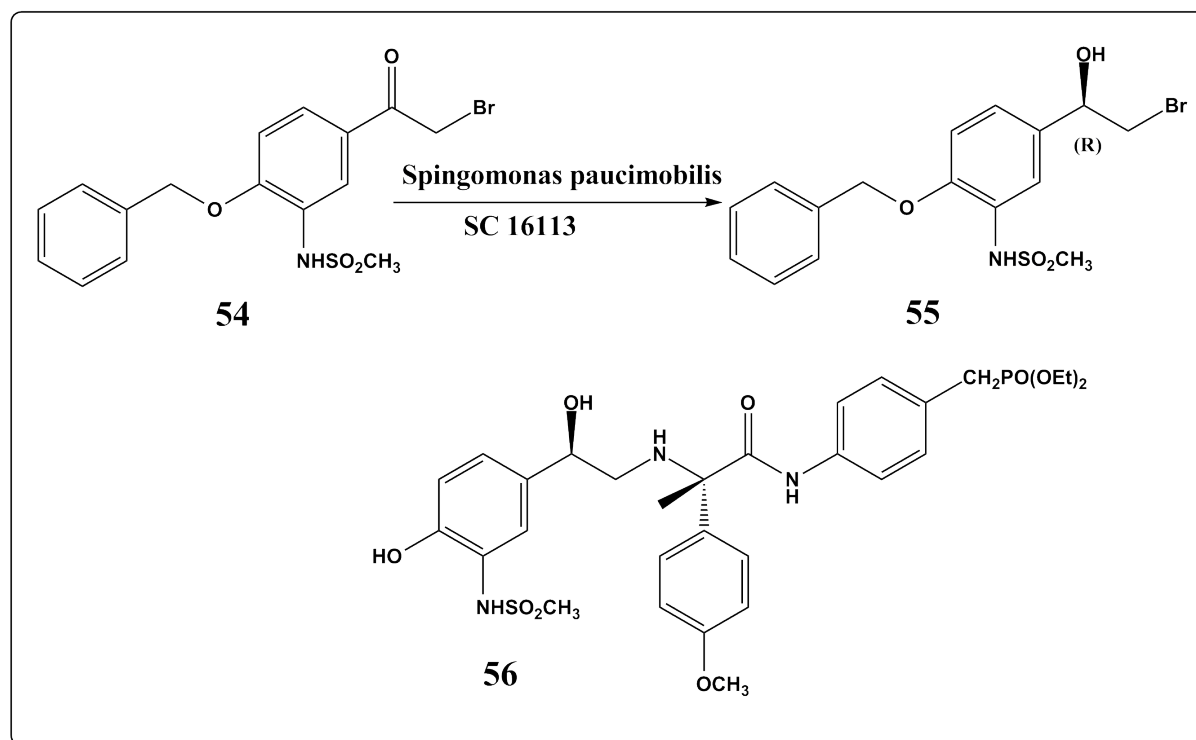


FIGURE 2.6 – Synthèse d'agoniste du récepteur  $\beta_3$ .

**- Inhibiteur de la protéase du VIH :**

Récemment, Barrish et coll [66] ont rapporté la découverte d'une nouvelle classe d'inhibiteurs sélectifs de la protéase du VIH. Les membres de cette classe, en particulier le

composé **57**, présentent une puissante activité anti-VIH en culture cellulaire. La réduction microbienne diastéréosélective de l'ester **58** à **59**, une clé intermédiaire dans la synthèse chimique totale du composé **57**, a été démontrée [67]. Parmi 100 microorganismes sélectionnés pour la réduction, *Streptomyces nodosus* SC 13149 et *Mortierella ramanniana* SC 13850 se sont avérés les plus efficaces et ont été utilisés pour convertir la cétone **58** en l'alcool chiral **59**, (figure 2.7).

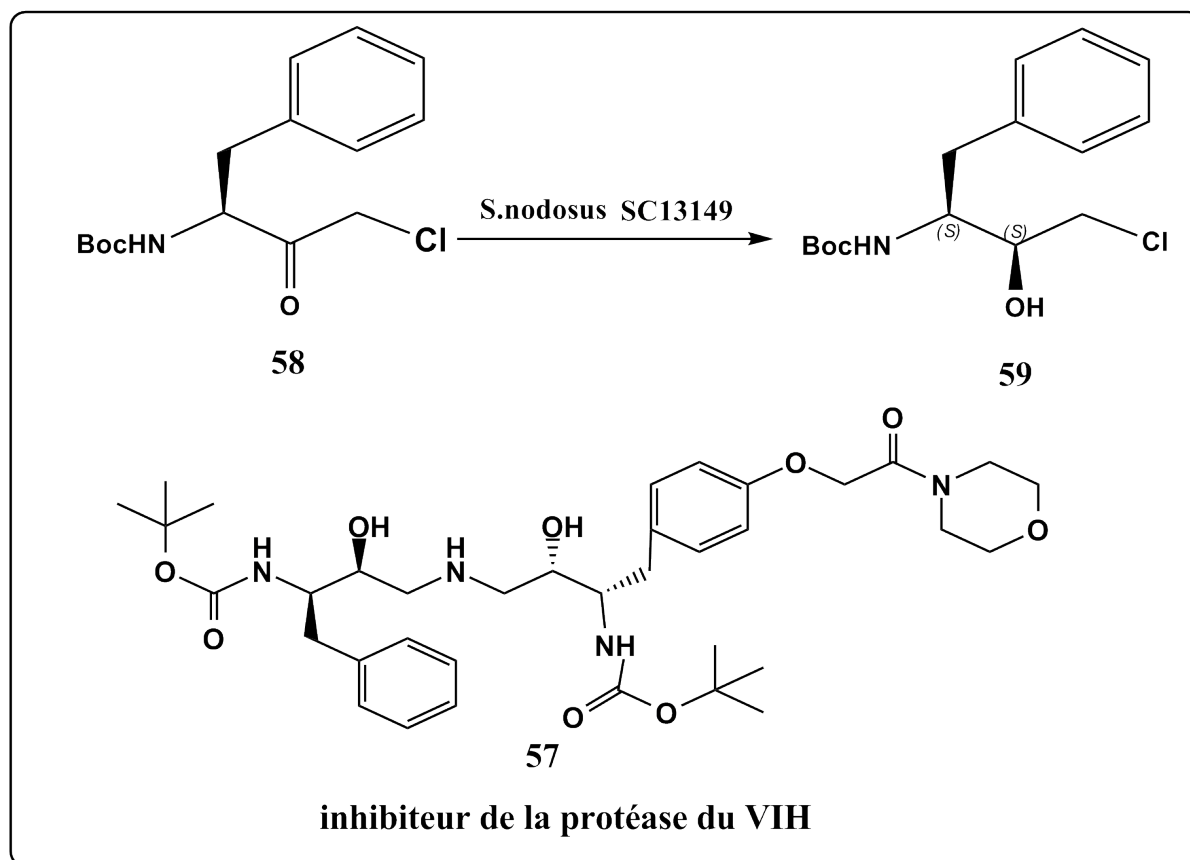


FIGURE 2.7 – Synthèse d'inhibiteur de la protéase du VIH.

#### - Anticholestérol :

Le diol **61** est un intermédiaire clé dans la synthèse de **62**, un nouveau médicament anticholestérol potentiel qui agit par inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase [68]. La réduction enzymatique du dicétone **60** au diol **61** a été démontrée [69]. Parmi diverses cultures microbiennes évaluées, Patel R.N. et coll ont montré que des suspensions cellulaires de *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13876 cultivées au glycérol donnaient un rendement de 85% et un excès énantiomérique de 97%, (figure 2.8).

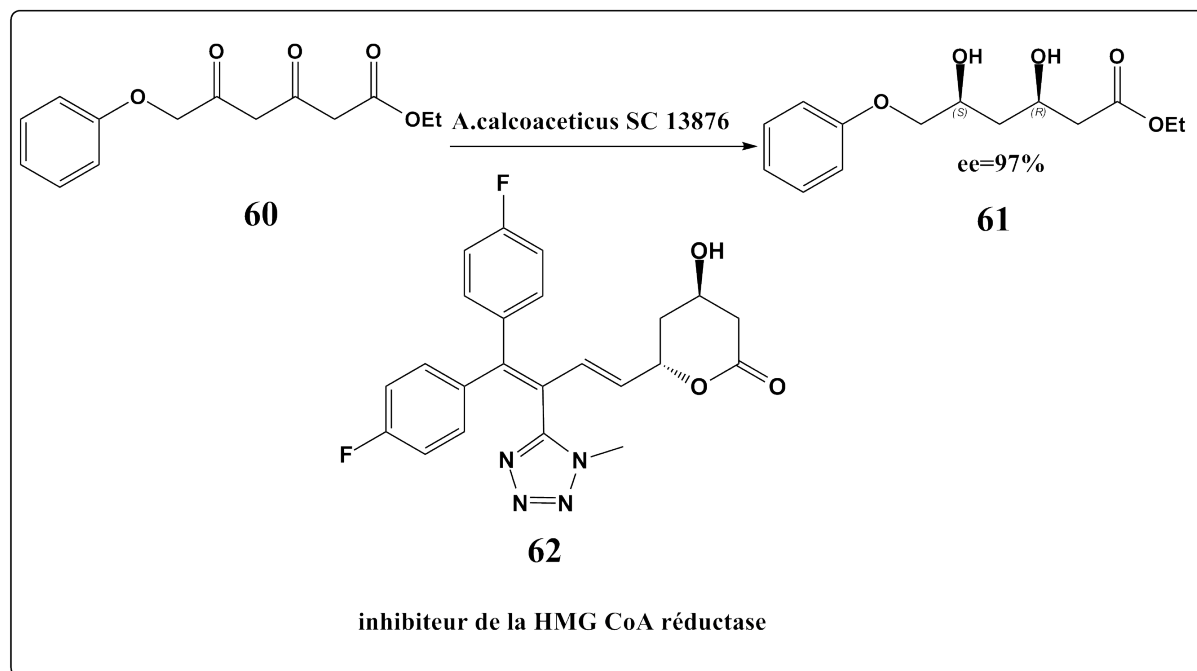


FIGURE 2.8 – Synthèse d'un anticholestérol.

### - Paclitaxel :

Parmi les agents antimitotiques, le paclitaxel (taxol<sup>®</sup>) **65**, un diterpène polycyclique complexe, présente un mode d'action unique sur les protéines des microtubules responsables pour la formation de l'axe pendant de la division cellulaire. Un processus enzymatique stéréosélectif a été développé pour la préparation du synthon chiral C13 de la chaîne latérale du paclitaxel. Une réduction microbienne de **63** en **62** était démontrée [70, 71] en utilisant des suspensions cellulaires de *Hansenula polymorpha* SC 13865 et *Hansenula fabianii* SC 13894, (figure 2.9).

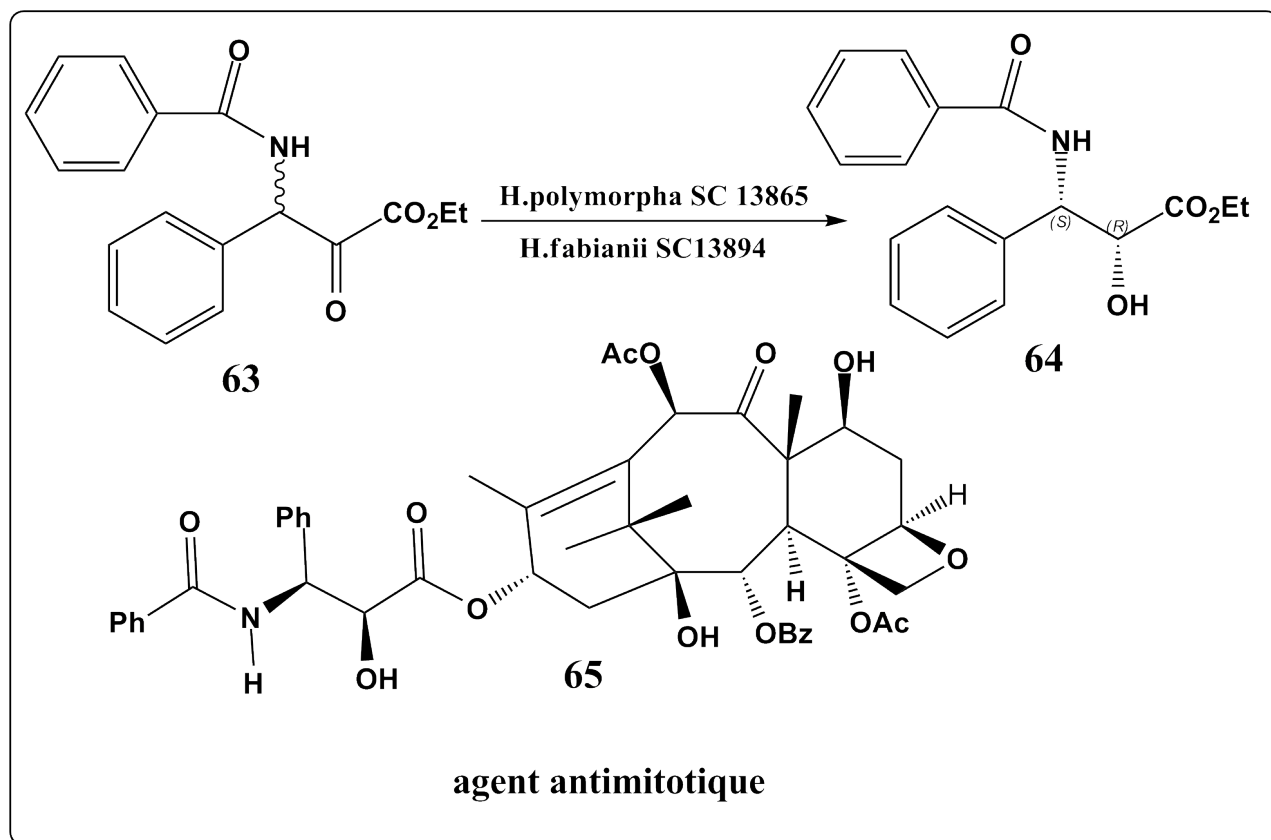


FIGURE 2.9 – Synthèse d'un antimitotique.

- Buspar :

Buspirone (Buspar<sup>®</sup>) **68** est un médicament utilisé pour le traitement [72, 73, 74, 75]. de l'anxiété et de la dépression. Une réduction microbienne énantiosélective de la 6-oxobuspirone **66** à la (R) - ou (S) -6-hydroxybuspyrone **67** a été développée. Environ 150 microorganismes ont été criblés pour la réduction énantiosélective de **66**. La R réductase NADPH-dépendante (RHBR), qui catalyse la réduction de la 6-oxobuspirone à (R) -6-hydroxybuspyrone **67**, a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir d'extraits cellulaires de *Hansenulapolymorpha SC 13845*, (figure 2.10).

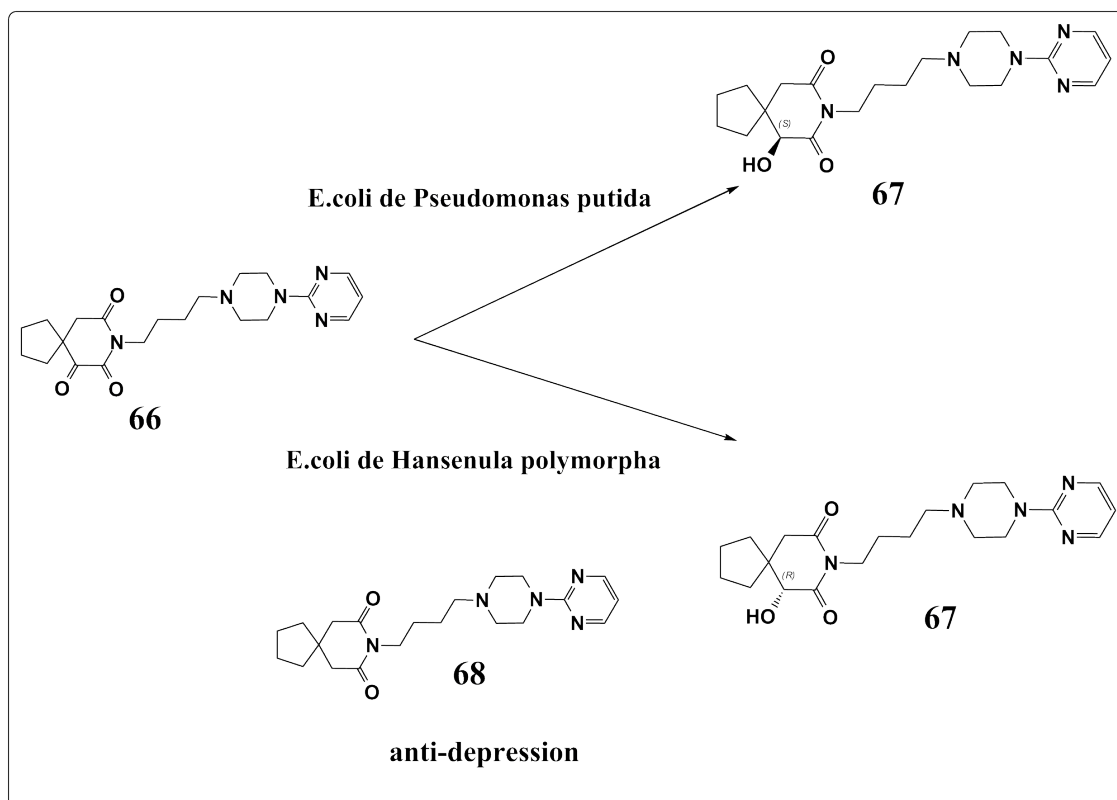


FIGURE 2.10 – Synthèse d'un anti-dépression.

### - L'atazanavir :

L'atazanavir **71** est un aza-peptidomimétique acyclique, un inhibiteur de la protéase du VIH 125126 approuvé par la FDA pour le traitement du sida. Un processus enzymatique a été développé pour la préparation du (1S, 2R) - [3-chloro-2-hydroxy-1-(phénylméthyl) propyl] - carbamique, ester 1,1-diméthyléthyle **70** une clé Intermédiaire chiral requis pour la synthèse totale de l'inhibiteur de la protéase atazanavir. La réduction diastéréosélective d'acide (1S) - [3-chloro-2-oxo-1-(phénylméthyl) propyl] carbamique, 1,1-diméthyléthyle ester **69**, a été réalisée en utilisant du *Rhodococcus erythropolis* SC 13845 pour fournir **70** [76, 77, 78, 79], (figure 2.11)

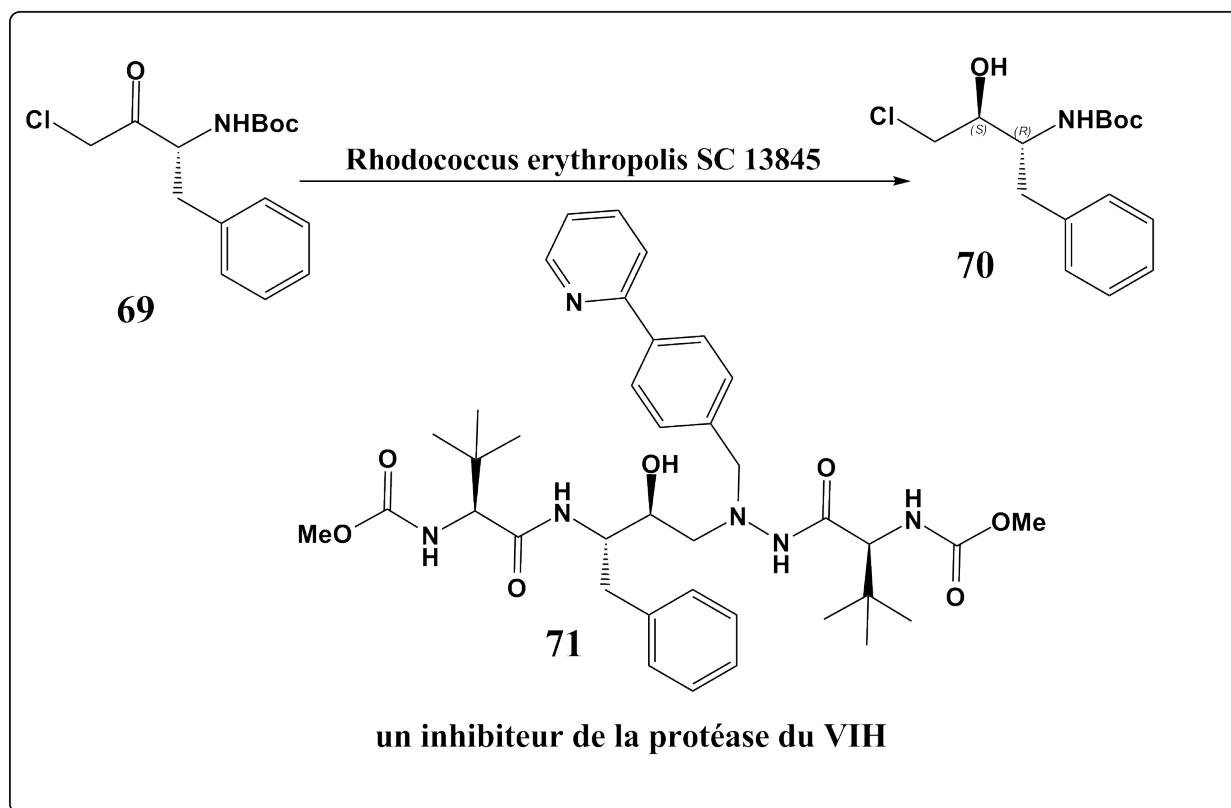


FIGURE 2.11 – Synthèse de l'atazanavir.

**- Inhibiteur de la protéase du rhinovirus :**

(R)-3-(4-fluorophényl)-2-hydroxy propionique **74** est un bloc constitutif pour la synthèse de AG7088, une protéase inhibitrice du rhinovirus [80, 81]. L'étape principale de la synthèse de **73** était une réduction enzymatique aqueuse utilisant la D-lactate déshydrogénase (D-LDH) et la formiate déshydrogénase (FDH). Mécaniquement, le composé **72** est réduit stéréosélectivement en (R)-hydroxy-acide correspondant **73** en présence de D-lactate déshydrogénase par le NADH [82],(figure2.12).

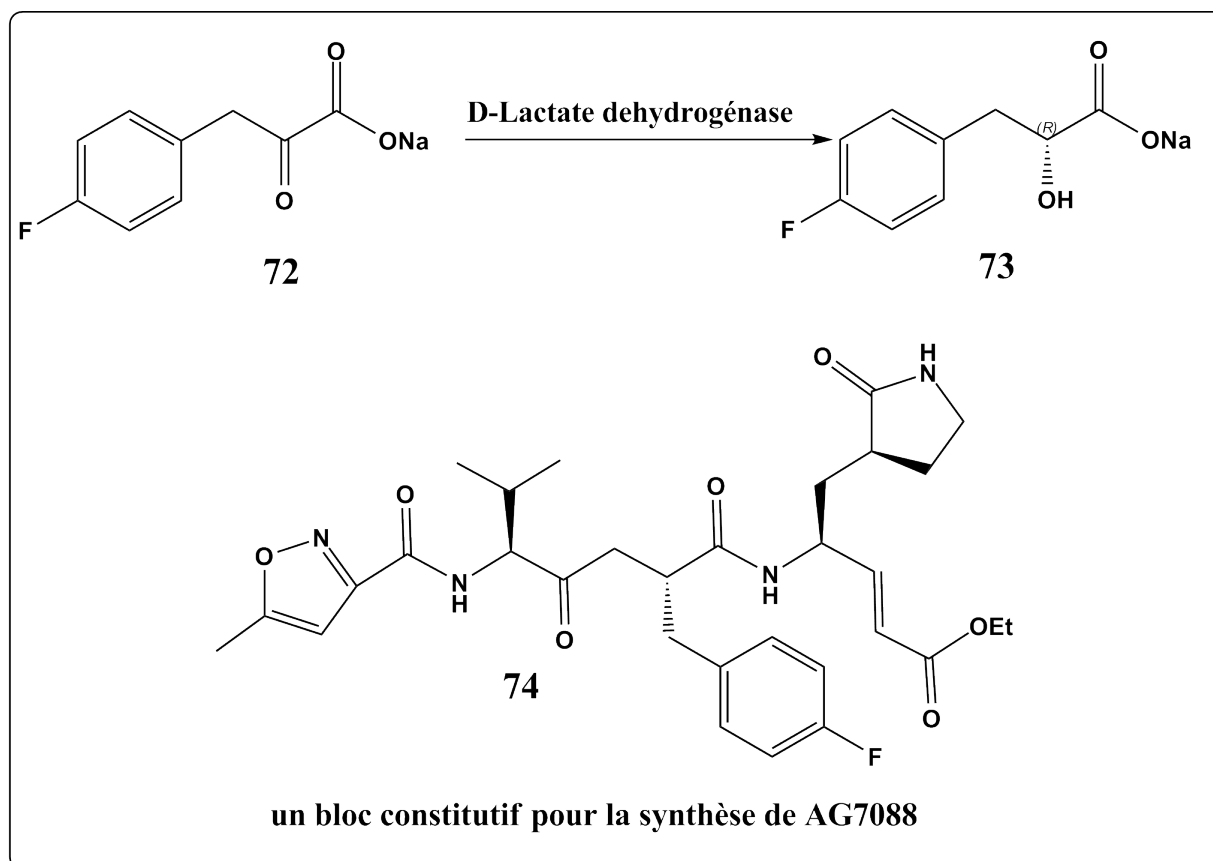


FIGURE 2.12 – Synthèse d'un bloc constitutif pour la synthèse de AG7088.

### - Réduction enzymatique du 5-oxohexanoate et le 5-oxohexanonitrile :

L'éthyl- (S) -5-hydroxyhexanoate **76** et le(S) -5-hydroxyhexanenitrile **78** sont des intermédiaires chiraux clés dans la synthèse d'un anti-Alzheimer **79** [83, 84]. Les deux composés chiraux ont été préparés par réduction énantiosélective de l'éthyl-5-oxohexanoate de méthyle **75** et du 5-oxohexanonitrile **77** par *Pichia methanolica* SC 16116, (figure 2.13).

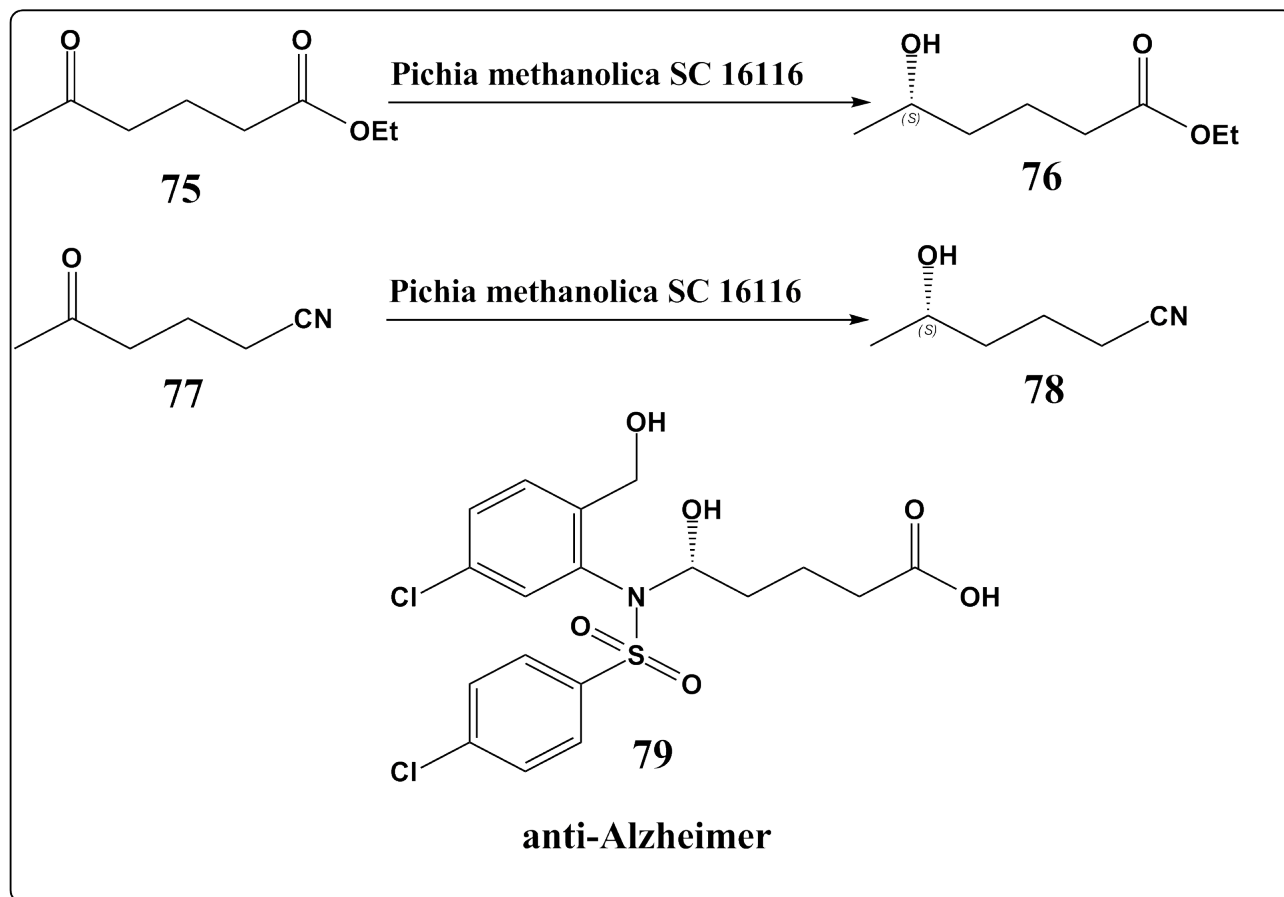


FIGURE 2.13 – Synthèse d'un anti-Alzheimer.

Dans une autre approche pour la synthèse d'un anti-Alzheimer **82**, la réduction du méthyl-4- (2 $\beta$ -acétyl-5 $\beta$ -fluorophényl)butanoates **80** a été démontrée en utilisant des souches de *Candida sp.* et *Pichia sp.* [85, 86]. Des rendements de la réaction allant de 40 à 53% et les excès énantiomériques variant entre 90 et 99% ont été obtenus pour les (S)-hydroxy esters **81**. La réductase qui a catalysé la réduction énantiosélective des cétoesters a été purifiée jusqu'à l'homogénéité à partir d'extraits cellulaires de *P. methanolica SC 13825*. Clonés et expédiés dans *E. coli*, les cultures recombinantes ont été utilisées pour la réduction énantiosélective de l'ester céto-méthylque **80** à l'ester (S)-hydroxy méthylque correspondant **81** [87], ce dernier conduit à la synthèse de **82**, (figure 2.14).

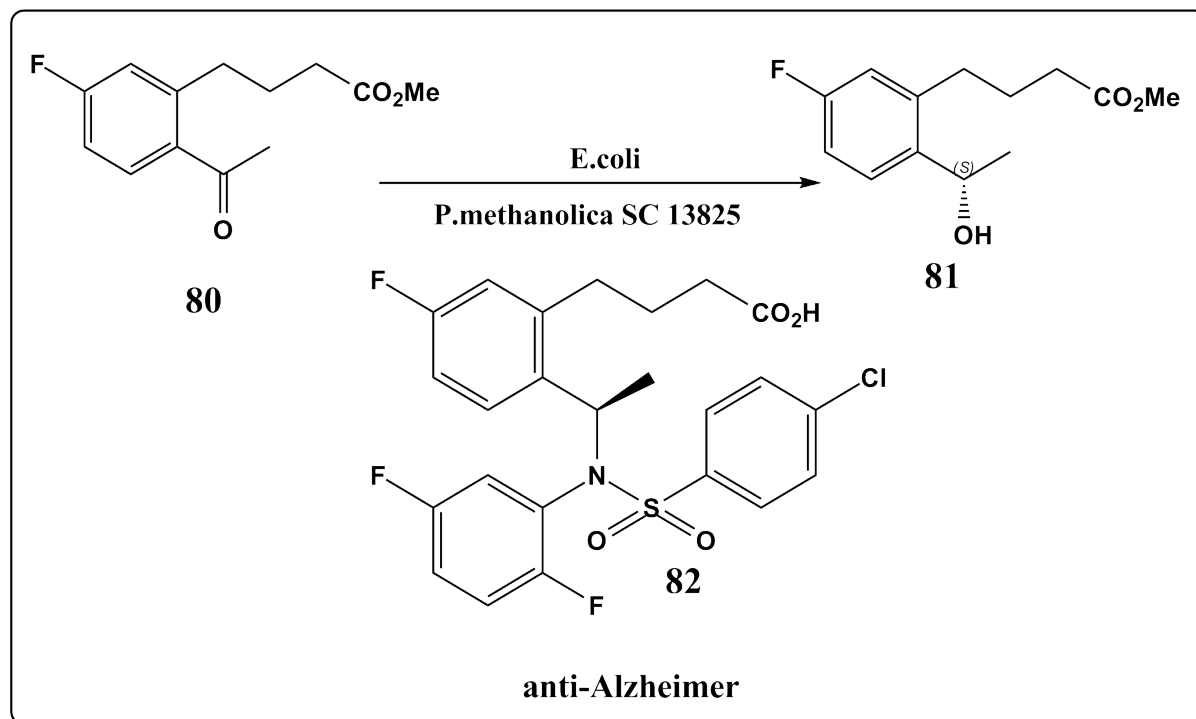


FIGURE 2.14 – Synthèse d'un anti-Alzheimer.

Parmi les enzymes utilisés pour la biotransformation on citera (les levures, les champignons, les bactéries, les légumes et les fruits ; ces derniers sont les plus récents dans leur efficacité. Parmi les fruits les plus actifs on trouve particulièrement la carotte, la pomme de terre, la tomate. Dans notre travail on utilisera les déchets alimentaires comme bioréducteur des cétones prochirales pour la première fois. Ce sont des composés qui possèdent plusieurs propriétés, dont nous citerons quelques éléments tirés de la littérature .

## 2.8 Propriétés des déchets alimentaires

### 2.8.1- Définition des déchets :

Selon la loi 01-19 du 12 décembre 2001, relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, le déchet est défini comme étant tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation de toute substance, matériaux ou de produit [88, 89]. Ce qui entraîne un coût individuel ou social. Mais tout autant que les ressources, le déchet est un concept relatif à un contexte technologique et, par là, culturel et historique. Si nous lui trouvons une valeur d'usage, par exemple comme matière première dans une production nouvelle, il cesse d'être un déchet pour devenir une ressource, une valeur d'échange potentielle et non plus un coût (PIERRE SAMUEL, 1976)

[90].

Les déchets au sens de la réglementation algérienne comprennent trois grandes catégories :

- **Les déchets ménagers et assimilés** : Ce sont tous les déchets issus des ménages, des activités industrielles, commerciales, artisanales, et autres, qui sont assimilables aux déchets ménagers par leur nature et leur composition, tel que, déchets de cuisine, emballages
- **Les déchets spéciaux** : Ce sont les déchets qui ne sont pas assimilés aux déchets ménagers, et qui nécessitent un mode spécifique de traitement en raison de leur nature et de leur composition. L'origine de ces déchets est l'activité industrielle, agricole, les soins, les services et toutes autres activités, qui ne peuvent être collectés, transportés et traités dans les mêmes conditions que les déchets ménagers et assimilés. Ce sont des déchets particuliers, qui sont susceptibles de nuire à la santé publique et à l'environnement via leurs constituants ou par leurs matières nocives.
- **Les déchets inertes** : Ce sont notamment, les déchets qui ne subissent aucune modification physique, chimique ou biologique lors de leur mise en décharge. Ces déchets proviennent de l'exploitation des mines, des carrières, des travaux de démolition, de construction ou de rénovation. Ils ne sont pas contaminés par des substances dangereuses ou autres éléments générateurs de nuisances, susceptibles de nuire à la santé et à l'environnement.

### 2.8.2-Les Caractéristiques des déchets alimentaires :

On caractérise les déchets par quatre paramètres essentiels : la densité, le degré d'humidité, le pouvoir calorifique, le rapport des teneurs en carbone et azote (C/N) [91].

- **La densité** : La connaissance de la densité est d'une grande importance pour le choix des moyens de collecte et de stockage. Toutefois, comme les déchets sont compressibles, la densité n'a un sens que si on définit les conditions dans lesquelles on la détermine. C'est pourquoi on peut avoir une densité en poubelle, une densité en benne, une densité en décharge, une densité en fosse, etc. La densité en poubelle est mesurée en remplissant les ordures fraîches dans un récipient de capacité connue sans tassement.
- **Le degré d'humidité** : Les ordures renferment une quantité remarquable d'eau variant en fonction des saisons et le milieu environnemental. Cette eau a une grande influence sur la rapidité de la décomposition des matières qui la renferment et sur le pouvoir calorifique des déchets.
- **Le pouvoir calorifique** : Le pouvoir calorifique est défini comme la quantité de chaleur dégagée par la combustion de l'unité de poids en ordures brutes. Il

s'exprime en millithermie par kilogramme d'ordures (mth/Kg).

- **Le rapport des teneurs en carbone et azote :** Le rapport C/N a été choisi comme critère de qualité des produits obtenus par le compostage des déchets. Il est d'une grande importance pour le traitement biologique des déchets, car l'évolution des déchets en fermentation peut être suivie par la détermination régulière de ce rapport.

### 2.8.3-Importance des déchets alimentaires :

En Algérie, une énorme quantité atteignant des millions de tonnes des aliments est cultivée chaque année. Après traitement, elle produit plus de 2 millions de tonnes de déchets. Ceux-ci constituent toutefois une excellente source de «neutraceutiques» et de suppléments alimentaires, dont un antioxydant important comme le lycopène.

Le lycopène appartient à la grande famille des caroténoïdes. C'est un pigment naturel qui donne sa couleur rouge aux tomates, aux pastèques, aux pamplemousses roses et aux papayes. Avec le  $\beta$ -carotène, il constitue l'un des caroténoïdes les plus abondants dans le sang et certains tissus humains. De récentes études épidémiologiques associent la consommation de lycopène et ses niveaux dans le sang à une diminution du risque de certaines maladies chroniques comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Le lycopène est aussi un antioxydant particulièrement efficace, capable de contrer l'action des radicaux libres [92, 93, 94].

## 2.9 Conclusion

L'application des enzymes en synthèse organique, particulièrement, la synthèse des composés optiquement purs s'est largement étendue ces deux dernières décennies [95]. Les enzymes de réduction telles que les réductases sont fréquemment utilisées à raison de leur compatibilité avec une large gamme de substrats et, souvent leur grande sélectivité [96] et plusieurs avantages, ce qui leur permet d'être exploitées dans différents domaines. Les réductases ont de nombreuses applications en synthèse organique en raison de leurs conditions douces, par exemple, en synthèse des molécules bioactives telle que le paclitaxel et L'atazanavir.

Deuxième partie

Résultats et discussion

## Chapitre 3

# Réduction asymétrique des cétones avec des nouveaux biocatalyseurs

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Choix des cétones prochirales</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>synthèse des alcools racémiques</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>l'analyse des alcools racémiques par CPG chirale</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Effet du solvant</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Réduction de cétones avec la levure du boulanger dans l'eau et le glycérol</b>	<b>45</b>
<b>3.7</b>	<b>Choix des biocatalyseurs</b>	<b>47</b>
<b>3.8</b>	<b>Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau</b>	<b>48</b>
<b>3.9</b>	<b>Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol</b>	<b>50</b>
<b>3.10</b>	<b>Réactivité et Stéréosélectivité</b>	<b>52</b>
<b>3.11</b>	<b>Conclusion</b>	<b>54</b>

---

### 3.1 Introduction

La conservation de l'environnement sans modification du sol et du milieu hybride pendant la production ou la fabrication devraient être une des préoccupations de l'administration publique dans la gestion des déchets [97]. À l'Est de l'Algérie, beaucoup d'usines de concentrés de tomate sont installées autour de la Vallée de la Seybouse et produisent beaucoup d'ordures ménagères ce qui conduit à la pollution de l'eau et du sol de cette plaine agricole très fertile. En plus de leur utilisation comme engrais naturel [98, 99, 100], ces ordures peuvent être recyclées et valorisées en produits biologiques avec beaucoup d'utilisation, notamment en chimie organique « verte » [101, 102]. C'est bien connu que les légumes, les fruits et leurs effluents sont composés typiquement de hautes

quantités de protéines, de sucres et des lipides [103, 104], pouvant être des sources d'activité enzymatique ; utilisés donc comme un produit biocatalytique dans les différentes réactions de chimie organiques [105, 106].

D'autre part, la synthèse chimique des molécules organiques chirales donne souvent un mélange racémique, difficile et cher à séparer, en présentant un obstacle majeur pour accéder à beaucoup de produits biologiquement actifs. Parmi les nombreux types de biocatalyseurs utilisés, les réductases sont utilisées pour préparer des alcools optiquement actifs à partir de différentes cétones prochirales [107, 108, 109, 110], manière énantioselective parmi d'autres qui pourraient être explorées dans cette valorisation [111, 112]. La recherche de nouveaux biocatalyseurs est un domaine d'actualité pour accéder à une grande variété de substrats énantio-purs. Les méthodes de sélection sont maintenant d'usage courant, elles consistent à préparer des bibliothèques de nouveaux enzymes, puis les engager dans des essais catalytiques.

Notre intérêt pour les déchets alimentaires a été dicté par le manque d'études sérieuses et complètes dans ce domaine de l'activité d'enzyme, particulièrement comme réductases [113]. Ainsi que par la limitation en synthèse organique de l'utilisation de la levure de boulanger qu'en milieu aqueux dans la réduction des cétones [114, 115].

Le but de ce travail consiste :

- A faire plusieurs essais avec les déchets alimentaires sur différents cétones prochirales, pour connaître leur capacité de réduction, optimiser les conditions de la réaction et l'utilisation du solvant [116, 117].
- Dans ce travail, nous nous intéressons particulièrement à l'activité du quatre déchets : déchets des tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill), déchets de pomme de terre (*Solanum tuberosum*), les déchets du patate douce (*Ipomoea batatas* L) et déchets du carotte (*Daucus carota* L). Donc nous avons étudié l'activité de réduction des cétones dans les deux solvants (l'eau et le glycérol). Notre objectif est la recherche d'un processus catalytique fiable qui répond aux principes de chimie verte et qui permet d'aboutir aux molécules énantio-pures.

## 3.2 Choix des cétones prochirales

Dans notre travail, nous avons choisi huit cétones, avec différents substituants ( $R_1$  et  $R_2$ ) dont trois aliphatiques et cinq aromatiques, pouvant nous donner des indications sur la nature du substrat. (figure 3.1).

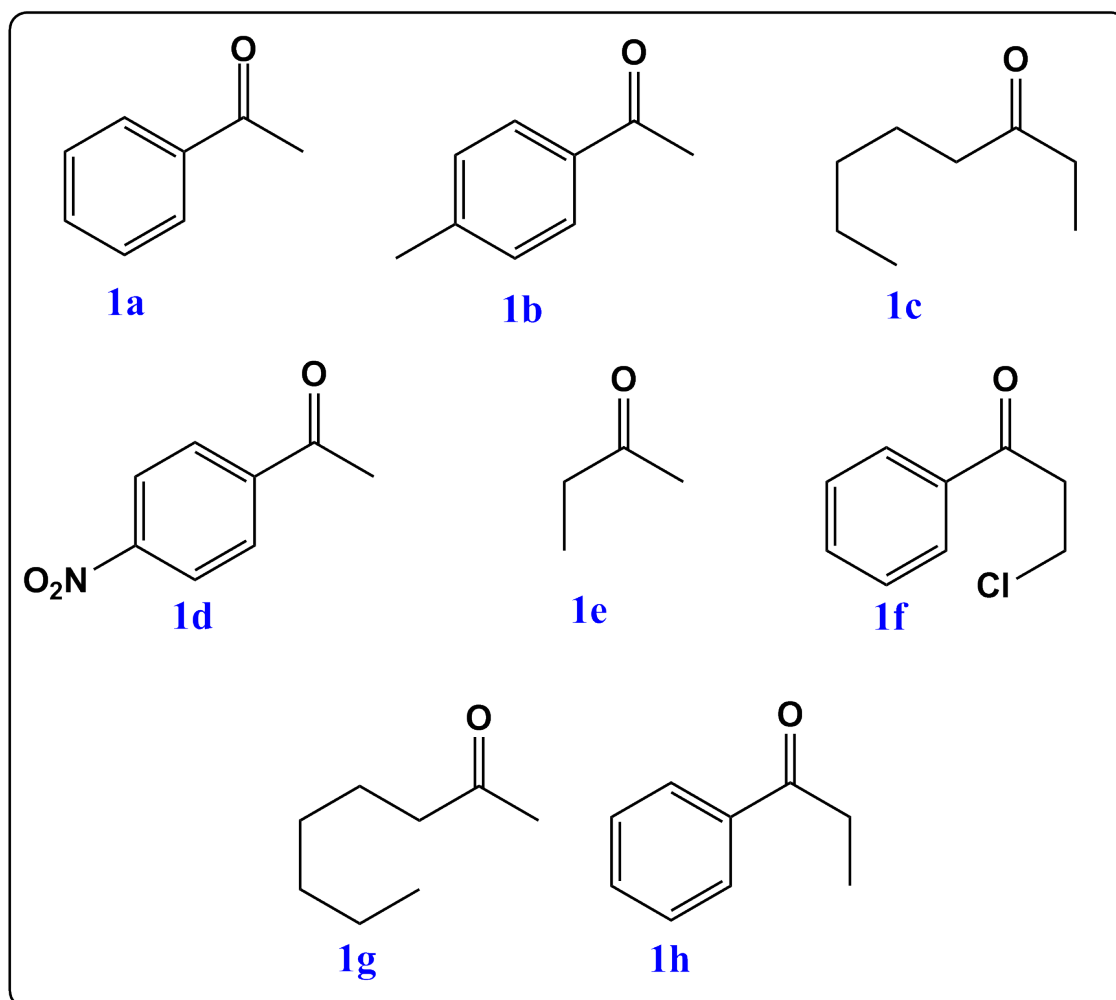


FIGURE 3.1 – Cétones prochirales choisis.

### 3.3 synthèse des alcools racémiques

Nous avons dans un premier temps entrepris la synthèse des alcools **2a-h** racémiques qui servent de référence afin de mettre au point les conditions optimales de séparation des énantiomères en CPG chirale<sup>1</sup>. Pour cela, chaque cétone a été réduite avec du NaBH<sub>4</sub> dans le méthanol (MeOH) [118]. Cet agent réducteur génère in-situ un anion hydrure qui réagit sur le carbonyle de la cétone pour la convertir en l'alcool correspondant, (figure 3.2).

1.  $\beta$ -cyclodextrine-ip

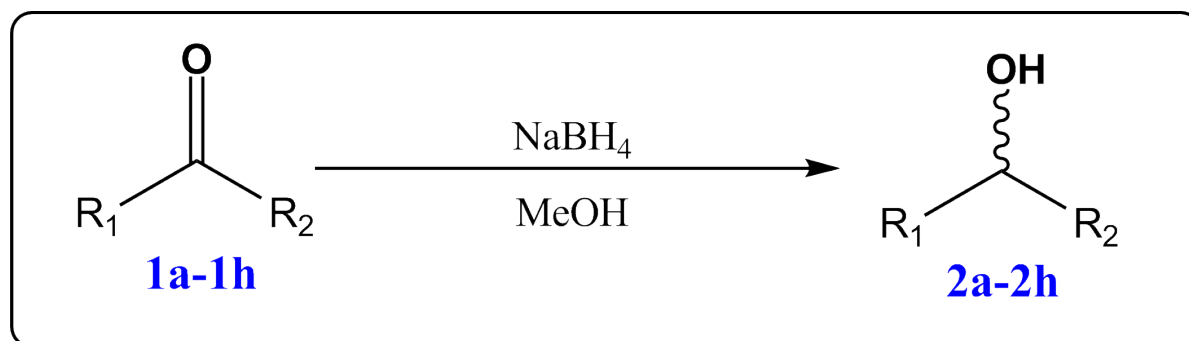


FIGURE 3.2 – Réduction des cétones en alcools racémiques.

### 3.4 l'analyse des alcools racémiques par CPG chirale

La réduction asymétrique des 6 cétones **1a-h** impose de trouver le programme qui permet d'obtenir les signaux des énantiomères des alcools racémiques bien séparés en une seule analyse sans aucun recouvrement des pics. Nous avons tenté de séparer les énantiomères d'un mélange d'alcools racémiques sur colonne chirale en utilisant un programme de température. Après plusieurs essais de séparation sur différents programmes, les chromatogrammes obtenus montrent que les pics de l'alcool **2e** sont recouvert par le pic du solvant (**AcOEt**), la séparation de l'alcool **2d** nécessite l'augmentation de la température de la colonne chirale jusqu'à **190°C**, tandis que les alcools **2a-h** donnent une bonne séparation dans les conditions suivantes : **60°C (20 min)**, **120 (35 min)**, **180°C(35 min)**.

### 3.5 Effet du solvant

D'une manière générale le choix des solvants lors de la réduction dépend de la corrélation entre les paramètres physico-chimiques (l'hydrophobicité et la constante diélectrique) du solvant utilisé et de la sélectivité de la réaction enzymatique, plus particulièrement la réduction enzymatique. Cependant dans notre cas nous avons utilisé l'eau et le glycérol qui ne diffèrent légèrement que par la constante diélectrique. [119, 120, 121]

### 3.6 Réduction de cétones avec la levure du boulanger dans l'eau et le glycérol

Au cours de notre travail - avant d'effectuer nos essais de réduction avec les différents déchets alimentaires- nous avons effectué une réduction avec la levure du boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) [122], afin de la comparer avec les résultats de ces essais. Cette

enzyme est très utilisée et d'une grande efficacité lors de la réduction enzymatique de la fonction carbonyle aussi bien dans l'eau que dans le glycérol [123],(figure 3.3).

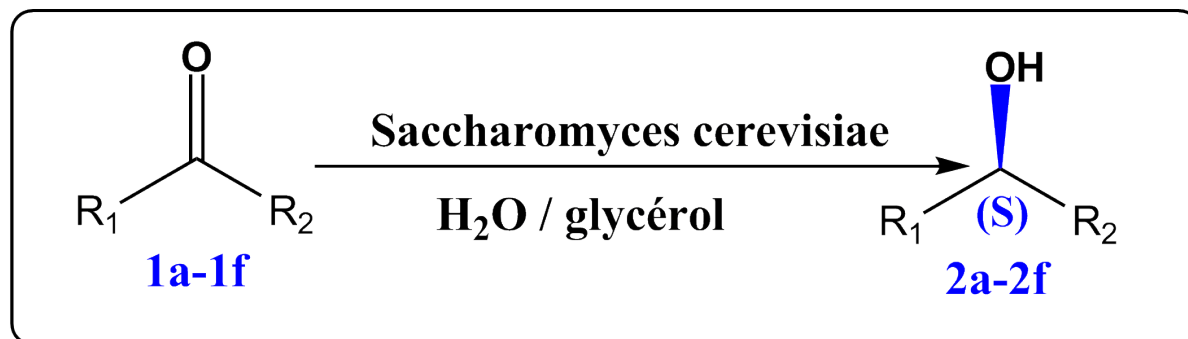


FIGURE 3.3 – Réduction des cétones avec la saccharomyces cerevisiae.

La levure est dissoute dans l'eau ou le glycérol. Après une heure d'agitation, la cétone est ajoutée à la solution. L'avancement de la réaction et les excès énantiomériques sont mesurés sur colonne chiral dex  $\beta$ -ip. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 3.1.

TABLE 3.1 – Réduction des cétones avec Saccharomyces cerevisiae.

produit	solvant	Temps (h)	conv (%)	e.e (%)	conf
2a	Eau	96	56	>99	S
2a	Glycérol	72	75	>99	S
2b	Eau	96	64	>99	S
2b	Glycérol	72	79	>99	S
2c	Eau	96	18	>99	S
2c	Glycérol	72	49	>99	S
2d	Eau	96	64	>99	S
2d	Glycérol	72	89	>99	S
2e	Eau	180	/	/	/
2e	Glycérol	180	/	/	/
2e	Eau	96	60	>99	S
2e	Glycérol	72	72	>99	S

Comme attendu, les résultats montrent que le système catalytique est d'une activité équivalente quel que soit le substrat et dans tous les cas les excès énantiomériques sont excellents. Les conversions varient selon la nature du substrat : les meilleures conversions ont été obtenues avec les alcools : **2a**, **2b**, **2d** et **2f**. Ces résultats montrent que c'est l'encombrement stérique des substrats qui influe sur la conversion. La réduction de la cétone **1c** donne une conversion faible : l'octan-3-ol **2c** a été isolé avec une conversion de 18% pour la réduction dans l'eau et elle augmente légèrement 49% pour la réduction dans le glycérol avec un excès de 99% pour les deux cas. Pour la **1e**, on observe une inactivité totale de l'enzyme dans l'eau et dans le glycérol. Ceci nous conduit à conclure que les substrats avec deux substituants aliphatiques réagissent lentement ou très lentement. Dans tous les cas nous avons identifié selon la littérature que l'énantiomère (**S**) est majoritaire à plus de 99% pour tous les alcools formés.

### 3.7 Choix des biocatalyseurs

Selon la littérature, nous avons sélectionnés 4 types de déchets : déchets des tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) [124], déchets des pommes de terre (*Solanum tuberosum*) [125], les déchets de la patate douce (*Ipomoea batatas* L) [126] et les déchets des carottes (*Daucus carota* L) [127], le choix des déchets a été fait selon les bons résultats cités dans la littérature concernant la réduction des cétones, (figure 3.4).



FIGURE 3.4 – Les déchets alimentaires utilisés.

### 3.8 Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau

Au cours du travail actuel, nous avons utilisé l'eau comme solvant pour la réduction des cétones avec des déchets alimentaires. L'avancement de la réaction est mesuré sur colonne Chiral dex  $\beta$ -ip, (figure3.5).

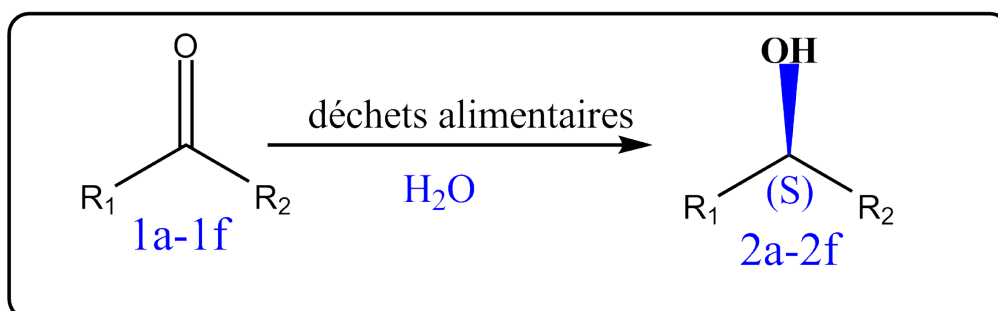


FIGURE 3.5 – La réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau.

Nous avons évalué les déchets alimentaires choisis pour la réduction énantiosélective de cétones par transfert d'hydrure dans l'eau. Tous les tests ont été effectués dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.2.

TABLE 3.2 – Réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans l'eau.

solvant		l'eau			
produit	le catalyseur	Temps (h)	conv (%)	e.e (%)	conf
<b>2a</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	96	40	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	72	50	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	72	79	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Daucus carota L</i>	72	76	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	96	40	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	180	/	/	/
<b>2b</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	180	/	/	/
<b>2b</b>	<i>Daucus carota L</i>	72	45	>99	<b>S</b>
<b>2c</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	180	< 2	/	/
<b>2c</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	180	15	>99	<b>S</b>
<b>2c</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	180	/	/	/
<b>2c</b>	<i>Daucus carota L</i>	180	15	/	/
<b>2d</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	96	36	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	29	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	96	54	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Daucus carota L</i>	96	32	>99	<b>S</b>
<b>2e</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	180	< 2	>/	/
<b>2e</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	180	/	/	/
<b>2e</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	180	/	/	/
<b>2e</b>	<i>Daucus carota L</i>	180	/	/	/
<b>2f</b>	<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>	72	100	>99	<b>S</b>
<b>2f</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	180	/	/	/
<b>2f</b>	<i>Ipomoea batatas L</i>	180	/	/	/
<b>2f</b>	<i>Daucus carota L</i>	72	54	>99	<b>S</b>

L'alcool **2a** a été isolé avec des conversions qui varient entre 40% < conv < 76% pour les quatre déchets, ces conversions sont légèrement supérieures à celles de **2d**. Une diminution de la conversion a été observée lors de la réduction de para-méthyl-acétophénone **1b** avec les enzymes *Lycopersicon esculentum Mill* et *Daucus carota L* comparé avec le substrat **1a**. Par contre, la réduction de **1f** avec *Lycopersicon esculentum Mill* montre une conversion totale. Les résultats de la réduction de **2c** et **2e** montrent que ces systèmes catalytiques ou enzymatiques ne sont pas efficaces pour la réduction de cétones aliphatiques dans l'eau. Au contraire, ces enzymes ont présenté d'excellents excès énantiomériques pour l'ensemble des substrats.

### 3.9 Réduction de cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol

Les résultats obtenus de la réduction dans l'eau nous encouragent pour tester ces enzymes pour la réduction des cétones dans le glycérol. Ce choix a été fait car il possède des propriétés physico-chimiques proches de celle de l'eau, (figure3.6).

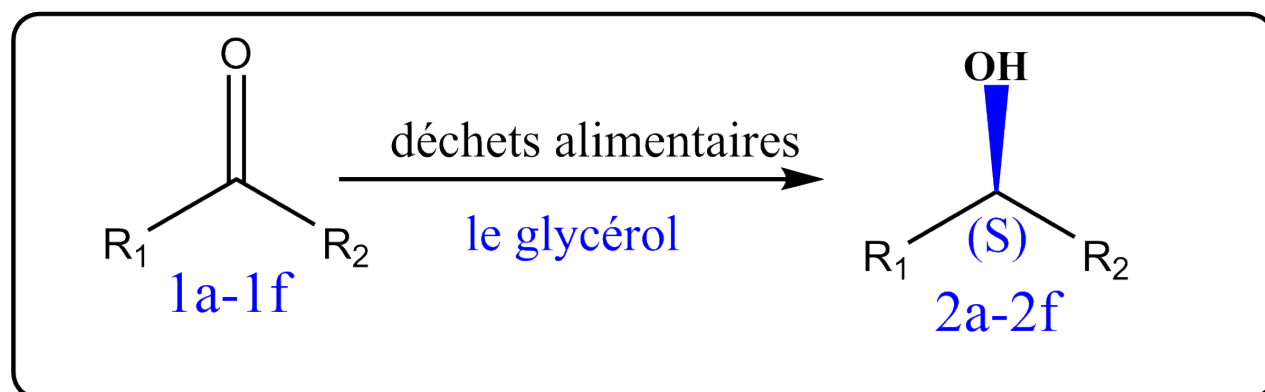


FIGURE 3.6 – La réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol.

Nous avons effectué la réduction de cétones, les excès énantiomériques et les conversions des alcools correspondants sont mesurés par CPG sur colonne chirale. Les résultats obtenus avec les déchets sélectionnés sont regroupés dans le tableau 3.3. .

TABLE 3.3 – Réduction des cétones avec les déchets alimentaires dans le glycérol.

solvant		Le glycérol			
produit	le catalyseur	Temps (h)	conv (%)	e.e (%)	conf
<b>2a</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	96	89	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	86	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	96	87	>99	<b>S</b>
<b>2a</b>	<i>Daucus carota</i> L	96	88	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	96	87	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	62	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	96	79	>99	<b>S</b>
<b>2b</b>	<i>Daucus carota</i> L	96	85	>99	<b>S</b>
<b>2c</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	96	12	>99	<b>S</b>
<b>2c</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	/	/	/
<b>2c</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	96	35	>99	<b>S</b>
<b>2c</b>	<i>Daucus carota</i> L	96	/	/	/
<b>2d</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	96	59	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	56	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	96	67	>99	<b>S</b>
<b>2d</b>	<i>Daucus carota</i> L	96	73	>99	<b>S</b>
<b>2e</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	180	/	>/	/
<b>2e</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	180	/	/	/
<b>2e</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	180	/	/	/
<b>2e</b>	<i>Daucus carota</i> L	180	/	/	/
<b>2f</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	180	< 1	/	/
<b>2f</b>	<i>Soanum tuberosum</i>	96	53	>99	<b>S</b>
<b>2f</b>	<i>Ipomoea batatas</i> L	96	76	>99	<b>S</b>
<b>2f</b>	<i>Daucus carota</i> L	96	77	>99	<b>S</b>

L'enzyme *Daucus carota* L a fourni les meilleurs conversions pour la réduction de cétones aromatiques (76% < conv < 88%), concernant l'excès énantiomériques la pureté optique est totale 99%. pour la réduction énantiosélective de loctan-3-one **1c** et de la butan-2-one **1e** ce enzyme n'est pas actif.

L'enzyme *Daucus carota* L a fourni les meilleurs conversions pour la réduction de cétones aromatiques (76% < conv < 88%), concernant l'excès énantiomériques, la pureté optique est totale 99%. Pour la réduction énantiosélective de l'octan-3-one **1c** et de la butan-2-one **1e**, cette enzyme n'est pas active.

Nous avons ensuite effectué la réduction des cétones avec la *Soanum tuberosum* et la *Ipomoea batatas* L qui ont donnés des meilleures conversions pour les substrats aromatiques. Avec le octan-3-one **1c** par le *Ipomoea batatas* L, on a obtenu l'alcool correspondant avec

une conversion de 35% ; par contre le *Soanum tuberosum* n'est pas actif avec le octan-3-one **1c**, ces deux enzymes ne sont pas active pour réduire la butan-2-one **1e**.

En présence de *Lycopersicon esculentum* Mill, les alcools **2a**, **2b**, **2d** sont obtenus respectivement avec conv = 89% , conv = 87% et conv=59%, ces même enzymes ont donné **2c** avec conv = 12% et un excès énantiomérique de 99% pour les quatres alcools obtenus . Concernant le **2e** et le **2f**, on observe une inactivité totale de l'enzyme, après 180 heures de réaction, les deux substrats sont récupérés.

### 3.10 Réactivité et Stéréosélectivité

Tous les essais sont réalisés pour comprendre les aspects différents de la réactivité dans la poche enzymatique [128, 129], selon la nature des substituants  $R_1$  et  $R_2$  du substrat et expliquent si le volume ou le caractère électronique ou le deux sont influençant sur la réactivité et la sélectivité. Donc, si la sélectivité ne change pas avec toutes les enzymes, la cinétique est affectée par la structure et la nature du substrat ; nous pensons que la réaction des cétones aliphatiques 3-octanone (**2c**) et butan-2-one (**2e**) était justement le cas, cette sorte de substrats n'est pas bien acceptée dans le site d'enzyme.

Dans ce travail, nous croyons que ces substrats, substitués par les radicaux apolaires  $R_1$  et  $R_2$  ne s'adaptent avec la poche de récepteur enzymatique, qui ont tendance à accepter les composés aromatiques et polaires. Par exemple, dans le cas du substrat **1f** où  $R_2$  est le chloroéthyle qui est un groupe polaire, La conversion de la réduction avec *Lycopersicon esculentum* Mill est presque totale après juste deux à trois jours. Cependant, dans tout les cas où les substituants aromatiques sont des groupements donneurs ou sont substitués dans la position para, cela ne change pas de façon significative la cinétique de la réaction : par exemple quand les substituants dans la position para sur le benzène sont le méthyle ou le groupement nitro. En général, nous devons dire que les réactions sont déterminées plutôt par les aspects électronique que les considérations stériques rattachées au volume du substituant. Même si nous ne pouvions pas comprendre la réactivité lente de substrat chloré **2f** dans le glycérol comparé avec le même essai réalisé dans l'eau avec *Lycopersicon esculentum* Mill. Finalement, nous dirons, qu'il est difficile de comprendre tous les aspects d'un système complexe où beaucoup de variables sont impliquées. Ceci est compréhensible est conformé dans la littérature [130]. Une fois la réaction finie, l'extraction du produit de la réduction avec l'eau exige de grandes quantités de solvant. Cette méthode est un processus couteux. Cependant avec le glycérol, l'extraction est plus simple, réalisée avec des quantités moindre de solvant. Ceci est influe sur la conversion qui est meilleure avec le glycérol, avec la même énantiosélectivité que la réduction avec l'eau. Le dilemme dans cette manipulation est le choix de solvant : l'eau est peu coûteuse, comparée au glycérol qui permet de meilleures conditions d'extraction, (figure3.7).

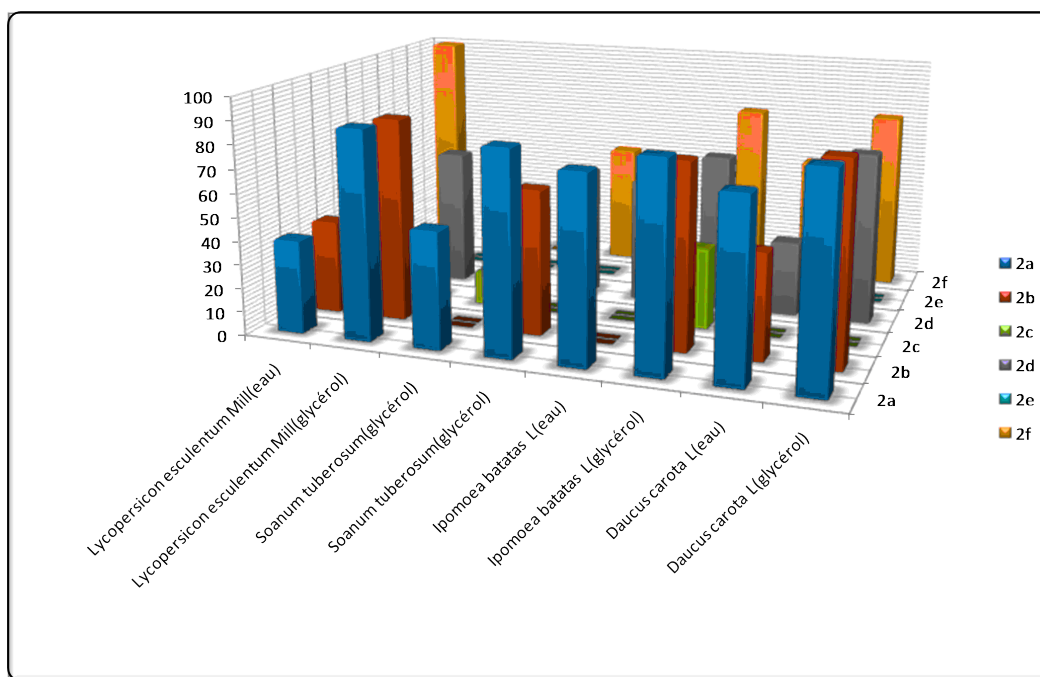


FIGURE 3.7 – Réduction des cétones prochirales avec différents déchets dans l'eau et dans le glycérol.

Pour comprendre la tendance stéréosélectivité dans les réductions enzymatiques. Tous les produits dans les tableaux 3.2 et 3.3 montrent que le composé (*re face*) du groupement carbonyle dans les substrats est attaqué par l'hydrure du NADPH (figure 3.8). La pureté énantiomérique de ces produits est excellente dans la plupart des cas, où la règle de Prelog est confirmée [131]. Bien que nous ayons dit auparavant que la présente réductase est l'une des enzymes qui contribuent selon la règle de Prelog, les alcools anti-Prelog ne sont pas observés dans cette étude. Où la partie à gauche du substrat est la plus encombrante que la partie du côté droit. Quand le glycérol (le Tableau 3.3) est utilisé comme solvant, nous avons noté que les produits sont tous de configuration **S**. Cela confirme l'attaque de l'hydrure sur le carbonyle s'effectue sur la (*re face*) du composé ou la configuration **S** a été confirmée par la rotation optique (pouvoir rotatoire<sup>2</sup>).

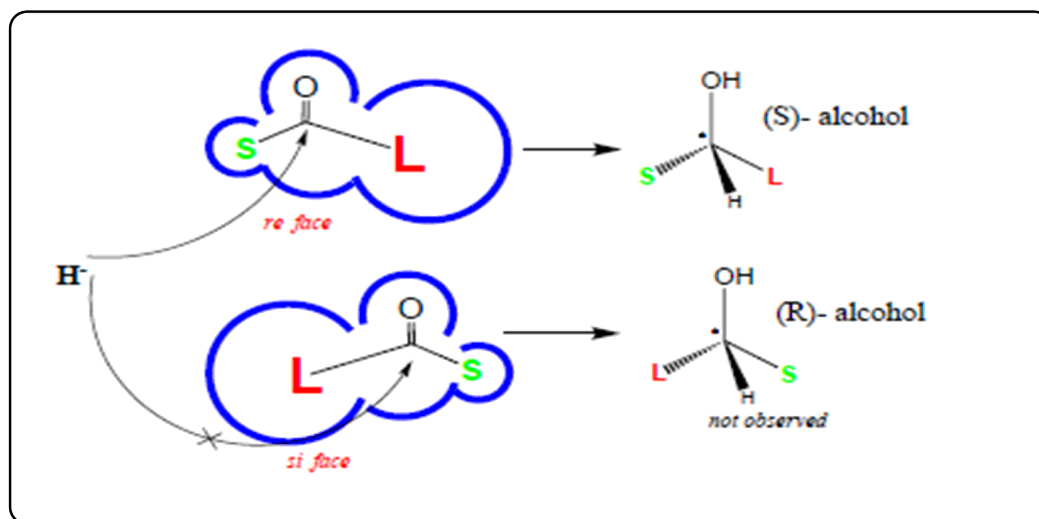


FIGURE 3.8 – Attaque d'hydrure sur re-face selon la règle de Prélog.

### 3.11 Conclusion

Dans ce travail, nous avons voulu montrer l'activité enzymatique des quatre déchets alimentaires « déchets des tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill), déchets des pommes de terre (*Solanum tuberosum*), les déchets de la patate douce (*Ipomoea batatas* L) et les déchets des carottes (*Daucus carota* L) ». Il serait intéressant de valoriser ce processus biotechnologique pour la synthèse d'alcools secondaires biologiquement actifs à configuration S.

Cette activité est lente comparée avec les autres réductases, en particulier avec des petites cétones prochirales, où la poche enzymatique ne peut pas les accepter. La sélectivité est toujours excellente quand les règles de Prelog sont respectées, même si la réaction est lente. Nous avons pu définir la structure et la nature des substituants autour du carbonyle donnant les meilleurs résultats. Nous avons pu montrer que le meilleur substrat est celui porteur de substituants polaires. Nous avons aussi montré que l'utilisation du glycérol peut augmenter la conversion de la réaction mais d'une manière peu significative. Enfin nous avons aussi constaté que l'énantiomère S est plus retenu par la colonne de chromatographie chirale dans tous les cas étudiés.

## Chapitre 4

# Réduction asymétrique des cétones en utilisant la méthode combinatoire

### Sommaire

---

4.1	Introduction . . . . .	55
4.2	Approche combinatoire . . . . .	58
4.3	Sélection des micro-organismes . . . . .	59
4.4	Préparation des souches . . . . .	61
4.5	Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats par lot n°01 . . . . .	61
4.6	Réaction d'oxydo-réduction chez les souches <i>R. buffoni</i> et <i>C. macerans</i> . . . . .	63
4.7	Réaction de racémique avec <i>R. buffoni</i> en fermenteur . . . . .	64
4.8	Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats avec lot n°02 . . . . .	66
4.9	la réduction du Phényl-éthyl-cétone avec <i>P. minuta</i> et <i>R. turuloides</i> . . . . .	68
4.10	Conclusion . . . . .	69

---

### 4.1 Introduction

L'hydrogénation asymétrique catalysée par des micro-organismes tels les levures, les bactéries et les champignons a connu de nombreuses applications académiques et industrielles [132, 133, 134, 135, 136, 137]. Ces micro-organismes sont capables de réduire sélectivement des cétones prochirales en alcools correspondants dans un milieu aqueux, et ce avec une haute pureté énantiomérique. Les systèmes catalytiques pour la réduction énantiosélective de cétones par transfert d'hydrure dans l'eau ont été développés récemment ; plusieurs enzymes ont été testées pour la réduction par transfert d'hydrure dans l'eau, en particulier celle provenant des levures telles *Candida krusei* SW2026, utilisée par Wen Zhang et coll [138]. Dans un autre exemple la *Candida parapsilosis* est utilisée

sous forme immobilisé pour la réduction de l'éthyle 2-oxo-4-phénylbutyrate (OPBE) et conduit à l'amélioration de la sélectivité [139].

La découverte de nouvelles souches bioactives pour une réduction catalytique nécessite la sélection des séries de micro-organismes soumis à des essais sur une cible donnée (des cétones). Dans ce contexte, la chimie combinatoire constitue un outil performant pour évaluer l'impact biologique de souches actives sur une cible enzymatique.

Au cours du présent travail, Nous nous sommes intéressés à la réduction énantiosélective de cétones prochirales par transfert d'hydrure dans une solution tampon avec une série de micro-organismes en utilisant la méthode combinatoire, (figure4.1).

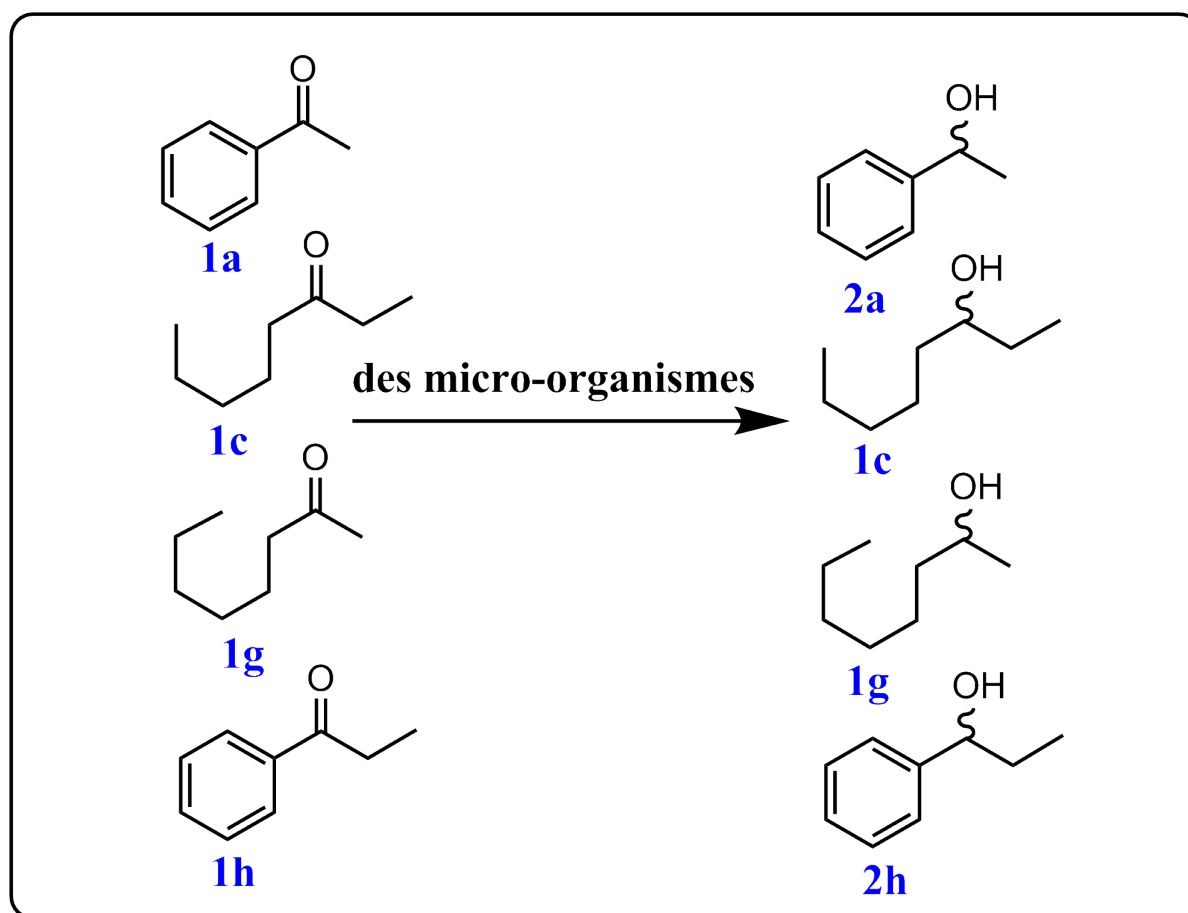


FIGURE 4.1 – La réduction des cétones prochirales en utilisant la méthode combinatoire.

Dans le but de trouver le micro-organisme le plus actif, une mise au point bibliographique sur les travaux de recherche antérieurs nous a permis de constater que la réduction asymétrique de deux cétones dans une solution tampon avec les levures en utilisant le principe de la méthode combinatoire n'a pas été décrite auparavant, (figure4.2).

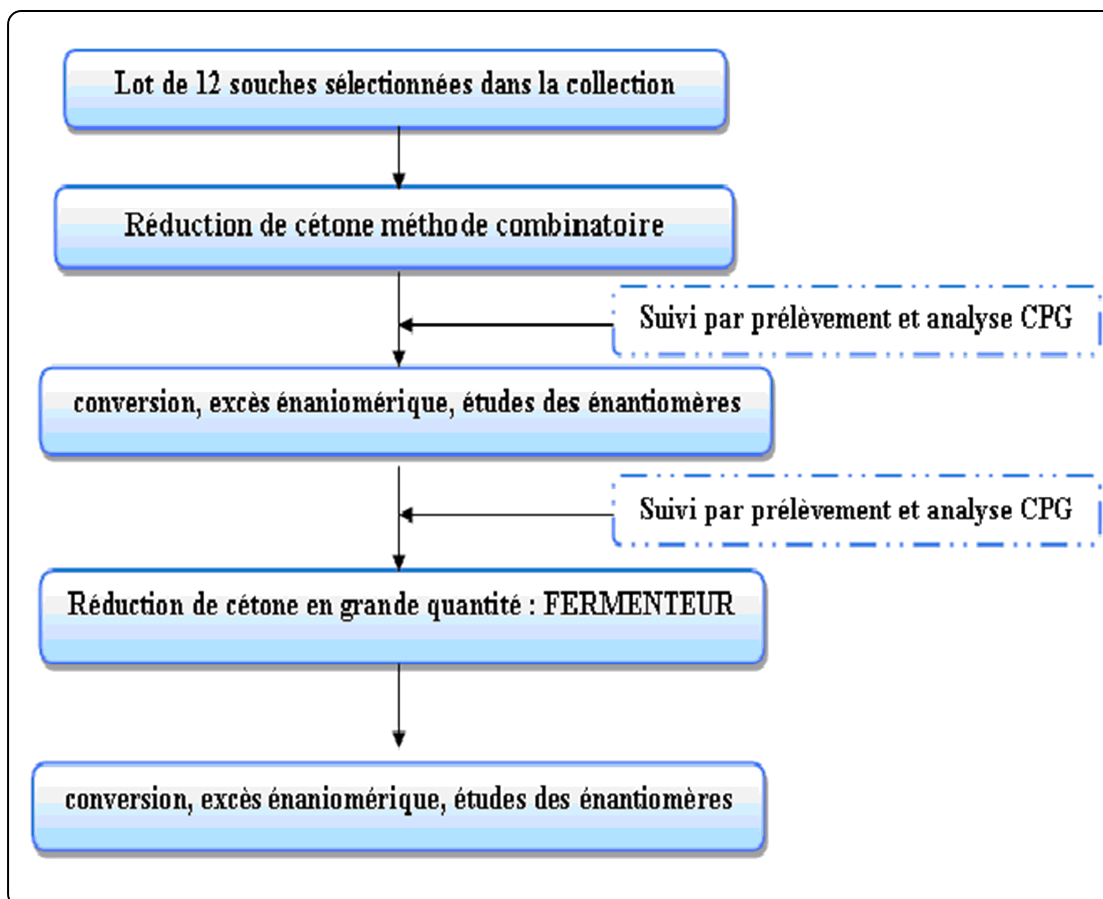


FIGURE 4.2 – Organigramme expliquant les étapes de la méthode.

Parmi les méthodes de synthèse des alcools chiraux utilisant la méthode de criblage, le processus de déracémisation combiné à un système enzymatique est une méthode très intéressante pour l'obtention d'alcools énantiomériquement enrichis [140, 141, 142, 143, 144, 145]. Il existe peu de travaux concernant ce protocole et particulièrement, lorsqu'il est combiné avec les réactions de stéréo-inversion enzymatique [146, 147]. Les indications et les résultats trouvés au cours de ce travail nous encouragent à se concentrer sur la réaction de stéréo-inversion enzymatique des alcools racémiques aux alcools énantiomériquement purs.(figure4.3).

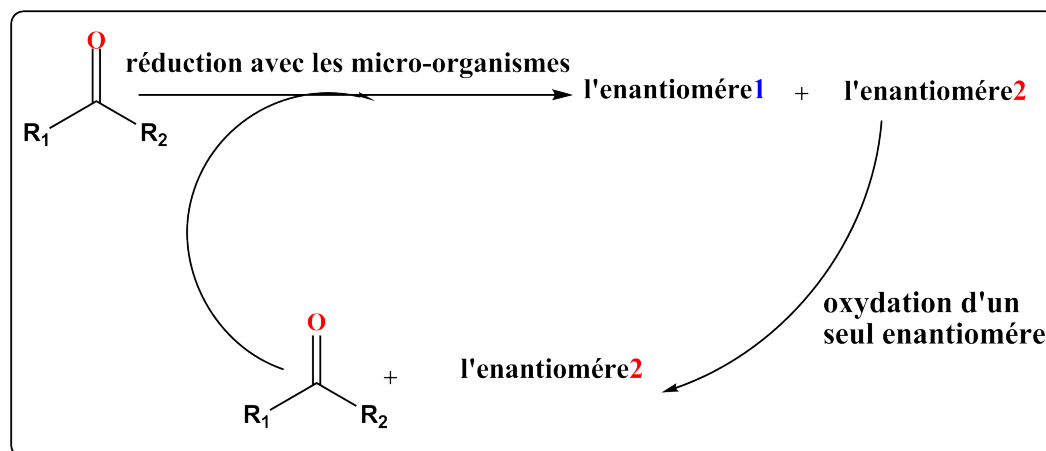


FIGURE 4.3 – la réaction de stéréo-inversion enzymatique des alcools racémiques.

## 4.2 Approche combinatoire

La chimie combinatoire est un concept novateur qui permet de tester rapidement un grand nombre des micro-organismes. Cette technique révolutionne depuis une vingtaine d'années les méthodes de travail en chimie biologique moderne, notamment au sein des laboratoires et des industries pharmaceutiques, répondant à leur besoin de découvrir rapidement des micro-organismes actifs et garantissant ainsi leur productivité et leur compétitivité.

Généralement, l'amélioration d'une enzyme est basée sur un cycle qui comprend 3 phases :

- La première consiste à synthétiser ou préparer les micro-organismes.
- La deuxième phase est consacrée aux tests de l'activité.
- La troisième phase consiste en l'analyse des résultats obtenus et conduit à la conception d'un nouveau bio-réducteur, supposé plus performant.

Cette itération doit être reproduite un grand nombre de fois pour pouvoir générer une enzyme réellement efficace. Le temps investi pour une telle méthode d'optimisation est clairement le facteur limitant [148]. Une alternative à ce problème est de concevoir une approche combinatoire associée au criblage à haut débit permettant d'effectuer le cycle d'optimisation simultanément pour un grand nombre de combinaisons d'enzymes.

Pour être efficace, cette méthode requiert de remplir 3 conditions principales :

- Une source de diversité conséquente : La diversité peut être amenée par une librairie de micro-organismes, de substrats, ainsi que par des variables attenantes aux

conditions de réaction (température, solvants, additifs, ...etc.).

- La synthèse de catalyseurs à haut débit : Les catalyseurs doivent être synthétisés rapidement et avec un bon degré de pureté.
- Une méthode de criblage à haut débit : On doit disposer d'une méthode d'analyse rapide et efficace pour identifier les bons catalyseurs [149, 150],(figure4.4).

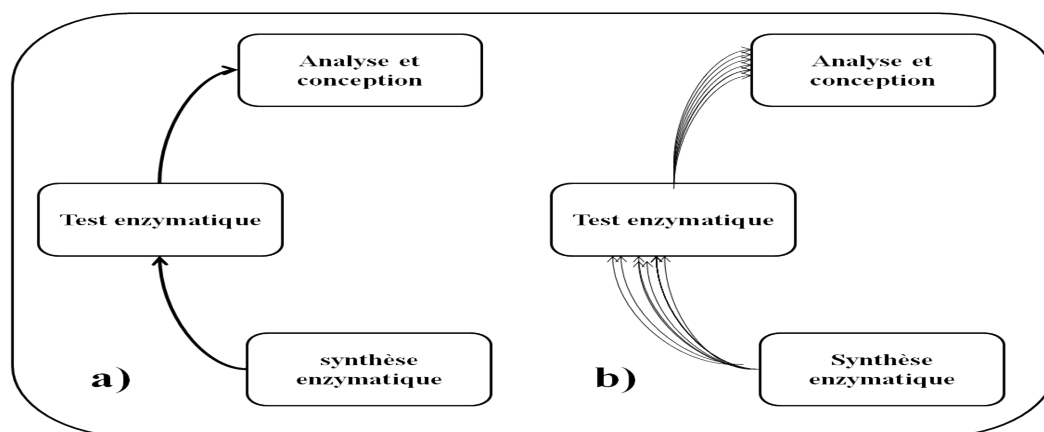


FIGURE 4.4 – L'approche combinatoire, a) procédure classique, b) procédure à haut débit.

La chimie combinatoire a connu un succès relatif pour l'optimisation des enzymes actives [151]. Par exemple Netta Nir et coll. ont identifié le micro-organisme le plus efficace d'une série de levures. L'efficacité de la levure Yeast103 a été montrée par le criblage de 12 levures isolées, en respectant deux facteurs ou paramètres : leur activité spécifique et l'énantioselectivité [152].

### 4.3 Sélection des micro-organismes

Nous avons réalisés des recherches bibliographiques dans le but de connaître les micro-organismes les plus actifs concernant la réduction de cétones. 24 micro-organismes (levures, bactéries, champignons) ont été sélectionnés, puis divisés en deux lots de 12 micro-organismes chacun (les Tableaux 4.1 et 4.2). Ils sont caractérisés par la nomenclature genre espèce additionnée d'un numéro de colonie. Avant d'appliquer la méthode de criblage, ces souches ont été préparées pour extraire la biomasse.

TABLE 4.1 – la liste des levures utilisées dans Le lot n°01.

Lot n°01		
Genre	Espèce	Numéro de colonie
<i>Candida</i>	<i>magnolia</i>	MUCL 27871
<i>Cryptococcus</i>	<i>humicola</i>	MUCL 30305
<i>Cryptococcus</i>	<i>macerans</i>	MUCL 30616
<i>Kluyveromyces</i>	<i>dobzanski</i>	MUCL 30252
<i>Rhodotorula</i>	<i>buffonii</i>	MUCL 29812
<i>Pichia</i>	<i>guilliermondii</i>	MUCL 27758
<i>Rhodosporium</i>	<i>toruloides</i>	MUCL 30328
<i>Saccaromyces</i>	<i>uvarum</i>	NRRL Y969
<i>Sporidiobolus</i>	<i>johnsonii</i>	ATCC 20490
<i>Zygosaccaromyces</i>	<i>fermentati</i>	MUCL 31281
<i>Rhodotorula</i>	<i>minuta</i>	MUCL 30637
<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginososa</i>	MUCL 30328

TABLE 4.2 – la liste des levures utilisées dans Le lot n°02.

Lot n°02		
Genre	Espèce	Numéro de colonie
<i>Pichia</i>	<i>minuta</i>	MUCL 27758
<i>Rhodosporium</i>	<i>turuloides</i>	MUCL 27758
<i>pichia</i>	<i>anomala</i>	NRRL Y40
<i>Kloekera</i>	<i>Magna</i>	NRRL Y1611
<i>Torulaspora</i>	<i>Delbuckii</i>	MUCL 27816
<i>Candida</i>	<i>pinus</i>	MUCL 27856
<i>Saccaromyces</i>	<i>montanus</i>	MUCL 6772
<i>Saccaromyces</i>	<i>calbergis</i>	MUCL 27810
<i>Rhodotorul</i>	<i>arubra</i>	ATCC 4055
<i>Rhodotorul</i>	<i>apilimanae</i>	MUCL 27811
<i>Rhodotorul</i>	<i>aglutinis</i>	NRRL 41091
<i>Yarrowiali</i>	<i>polytica</i>	MUCL 29853

**MUCL** = Mycothèque de l'université catholique de Louvain.

**NRRL** = Northern Regional Research Lab.

**ATCC** = American type culture collection.

#### 4.4 Préparation des souches

La préparation des souches se fait en deux étapes, l'ensemencement des 12 souches de chaque lot et la récupération de biomasse.

— **4.4.1- Ensemencement des 12 souches à tester :**

Les souches du laboratoire sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  sous forme de suspension de spores ou de cellules dans du glycérol de 10% à 20%. Ces suspensions sont ensemencées ou repiquées dans des tubes de milieu YMS puis conservées à  $27^{\circ}\text{C}$  dans une salle spéciale d'incubation afin de cultiver les souches (le repiquage est aussi appelé : passage). Le milieu A est un milieu non sélectif, sa composition est riche et variée afin qu'un maximum de micro-organismes différents puisse être cultivé sur celui-ci. Pour les *Streptomyces*, plus difficiles à cultiver, nous utilisons un milieu spécifique pour leur croissance.

— **4.4.2- Récupération de biomasse :**

A cette étape, nous désirons récupérer la biomasse des 12 micro-organismes sans le milieu YMS. Les micro-organismes ayant un gros volume sont filtrés et les champignons sont récupérés sous forme de billes de mycélium. Pour les bactéries, elles sont centrifugées.

#### 4.5 Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats par lot n°01

Dans 4 erlenmeyers on a réparti les souches de chaque lot selon l'ordre énoncé dans le tableau 2. Ces 4 mélanges des 5 souches chacun sont réalisés 3 fois (pour tester la réduction de deux cétones isolées et l'ensemble des deux substrats pour les 4 mélanges), donc 12 mélanges sont obtenus pour le lot n°01, (tableau 4.3).

TABLE 4.3 – les mélanges des souches de Lot n°01.

Lot n°=01				
Les souches	A	B	C	D
<i>C. magnolia</i>	X			X
<i>C. humicola</i>	X			X
<i>K. dobzanskii</i>	X			
<i>C. macerans</i>	X	X		
<i>R. buffonii</i>	X	X		
<i>P. guilliermondi</i>		X		
<i>R. turuloides</i>		X	X	
<i>R. mucilaginoso</i>		X	X	
<i>S. uvarum</i>			X	
<i>S. johnsonii</i>			X	X
<i>Z. fermentati</i>			X	X
<i>P. minuta</i>				X

La première réduction d'acétophénone et d'octan-3-one a été effectuée avec les souches de lot n°01.

Afin de suivre l'avancement de cette manipulation, notamment pour savoir s'il y a ou non bioconversion de l'acétophénone **1a** et du 3-octanone **1c**, on a effectué des prélèvements qui consistent à extraire un petit volume du milieu dans chaque erlenmeyer pour l'analyser. À partir des résultats du tableau 4.4, nous observons un bon avancement de la réaction de 4 à 24 heures pour le **1c**, dans tous les mélanges, ce qui est peu intéressant pour démontrer l'efficacité de la méthode. Par contre, cette étude montre une grande affinité enzyme / substrat lors des réactions de réduction asymétrique de cétones. Des conversions élevées sont obtenues avec les 2 cétones.

Pour le **1a**, nous remarquons qu'avec 78,71 % d'avancement de la réaction le mélange A est le plus efficace. Ensuite un résultat étrange attire notre attention : En effet à 4 heures dans le mélange B2, l'avancement de la réaction est de 74% et chute à 33,56% après 24 heures. On observe le même effet dans les mélanges A3 et B3, , (tableau 4.4).

Ce phénomène n'est pas observé dans les mélanges C et D, donc seulement certaines souches de A et B sont responsables de produire ce phénomène.

TABLE 4.4 – l’avancement des réductions des cétones par le lot n°01.

mélange	temps(4h)		Temps(24h)	
	1c	1a	1c	1a
A1	84,52		90,43	
B1	65,72		72,46	
C1	34,6		92,04	
D1	65,28		97,54	
A2		78,71		33,54
B2		74,49		19,89
C2		40,4		73,23
D2		43,92		60,25
A3	81,73	73,73	93,42	37,31
B3	57,23	70,17	78,6	27,64
C3	33,57	34,12	84,47	58,34
D3	61	25,91	100	75

#### 4.6 Réaction d’oxydo-réduction chez les souches *R. buffoni* et *C. macerans*

Ce phénomène observé ci-dessus pourrait être une oxydo-réduction, nous émettons l’hypothèse qu’un ou plusieurs micro-organismes réduisent la cétone en alcool racémique, puis un ou plusieurs micro-organismes ré-oxydent l’alcool en cétone. Il serait très intéressant qu’un micro-organisme ré-oxyde un seul énantiomère d’un alcool racémique car cela permettrait d’obtenir un produit énantiomériquement pur. Nous allons donc étudier ce phénomène particulier chez les souches *R. buffoni* et *C. macerans* après production de biomasse et analyse CPG. Nous choisissons ces souches car le phénomène se produit dans les lots A et B seulement et les souches présentes uniquement dans ces mélanges sont les souches *R. buffoni* et *C. macerans*.

Après ensemencement et récupération de biomasse, la réaction se fait en deux parties, la première consiste à la réduction de **1a** avec les deux souches sélectionnées, et l’autre consiste à réagir ces souches avec un mélange racémique de **2a**.

Pour la réduction d’acétophénone **1a** avec les deux souches. Nous observons bien deux pics sur les chromatogrammes, donc, il y a bien une réduction de **1a** en alcool pour les deux souches. Au contraire, la ré-oxydation a été observée seulement avec le *R. buffoni* (tableau 4.5).

TABLE 4.5 – l’avancement des réactions avec les souches *R. buffoni* et *C. macerans*.

substrat	1a		2a	
La souche	conv(%)	e.e (%)	conv(%)	e.e(%)
<i>C. macerans</i>	<b>52</b>	<b>71</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>R. buffoni</i>	<b>77</b>	<b>99</b>	<b>86</b>	<b>99</b>

Concernant la réaction avec le racémique, les analyses par CPG chiral confirment notre hypothèse, nous n’observons aucun changement avec la *C. macerans* mais il y’a une oxydation d’un des deux énantiomères racémiques, nous noterons que la réaction n’est pas loin d’être totale car il ne reste que peu d’acétophénone.

Suite aux résultats obtenus, nous décidons de pousser la recherche plus loin en nous intéressant aux énantiomères de **2a** racémique. En effet, il est possible qu’un seul de ces énantiomères ait été oxydé comme nous avons énoncé dans l’hypothèse de ré-oxydation. Nous avons décidé de passer à l’échelle préparative (grande quantité) avec la souche *R. buffoni* pour suivre plusieurs paramètres (pH, acidité, basicité, température, solvant, glycose), étape faite dans un fermenteur.

#### 4.7 Réaction de racémique avec *R. buffoni* en fermenteur

Le fermenteur aussi appelé bioréacteur est un appareil dans lequel on réalise des expériences ou des productions de microorganismes. Il est utilisé pour la production de biomasse, mais aussi pour la production de métabolite d’intérêt ou de bioconversion. Dans notre cas, nous utilisons le fermenteur dans un but de bioconversion. Il est employé hermétiquement et en condition stérile, branché à un ordinateur pour contrôler les paramètres de la conversion.

Avant de lancer le fermenteur, il faut calibrer la machine, en particulier les pompes péristaltiques et la sonde pH. La calibration des pompes sert à déterminer volume qu’elles délivrent au cours de leur fonctionnement à 100%.

Nous programmons le pH à une valeur consigne de 7, la température à 27 °C, une valeur pour laquelle la levure est bien cultivée. Après la préparation d’une grande quantité de *R. buffoni*, le racémique **2a** est ajouté, des prélèvements à 12h, 24h, 36h et 48h sont effectués par la suite, réalisés en aseptie grâce au système de prélèvement, (tableau 4.6).

TABLE 4.6 – l'avancement de la réaction avec la *R. buffoni* en fermenteur.

prélèvement	1a (%)	2a (%)	e.e(%)
temps=0	0	100	0
temps=12h	21,87	78,13	32
temps=24h	28	72	55
temps=36h	38,29	61,7	75
temps=48h	30,65	69,35	94

Nous avons analysé les résultats à la CPG et la CPG chirale. Nous observons au tableau 4.6 que de 0 à 12 heures, le racémique **2a** est oxydé en **1a**. Nous constatons la réduction de l'acétophénone en **2a** à partir de 12 heures. Aussi, l'excès énantiomérique est augmenté au cours du temps, montrant que l'énantiomère 1 est oxydé en **1a**, ce dernier est réduit en énantiomère 2, Ce qui explique l'obtention de 94% d'excès énantiomérique de cet énantiomère à 48 heures . Donc, nous sommes bien en présence d'une déracémisation incomplète.

L'ordinateur contrôle le fermenteur grâce à un programme, chaque paramètre peut être réglé à une valeur précise : pH, température, vitesse du moteur, quantité d'air ajoutée. Il contrôle alors automatiquement les pompes pour ajouter de l'acide ou de la base si on lui ordonne de maintenir le pH à 7(Cas de notre exemple).Le graphique en-dessous nous permet d'observer les différents changements au niveau de l'acidité et de la température et de déterminer les différents paramètres durant le BATCH et de vérifier que le meilleur le meilleur pH est 7 et la meilleure la température est 27°C pour une meilleure conversion ou transformation. Nous avons aussi ajouté une quantité de glucose en continu par le canal représenté en rouge sur le graphique. A 30 heures, nous avons arrêté cette pompe, expliquant le pic vers le bas. L'arrêt de l'ajout du glucose se fait une fois de fermentation de levure terminée, ce qui permet bien sûr de connaître la quantité de glucose suffisante ou nécessaire pour une meilleure réduction asymétrique,(figure4.5).

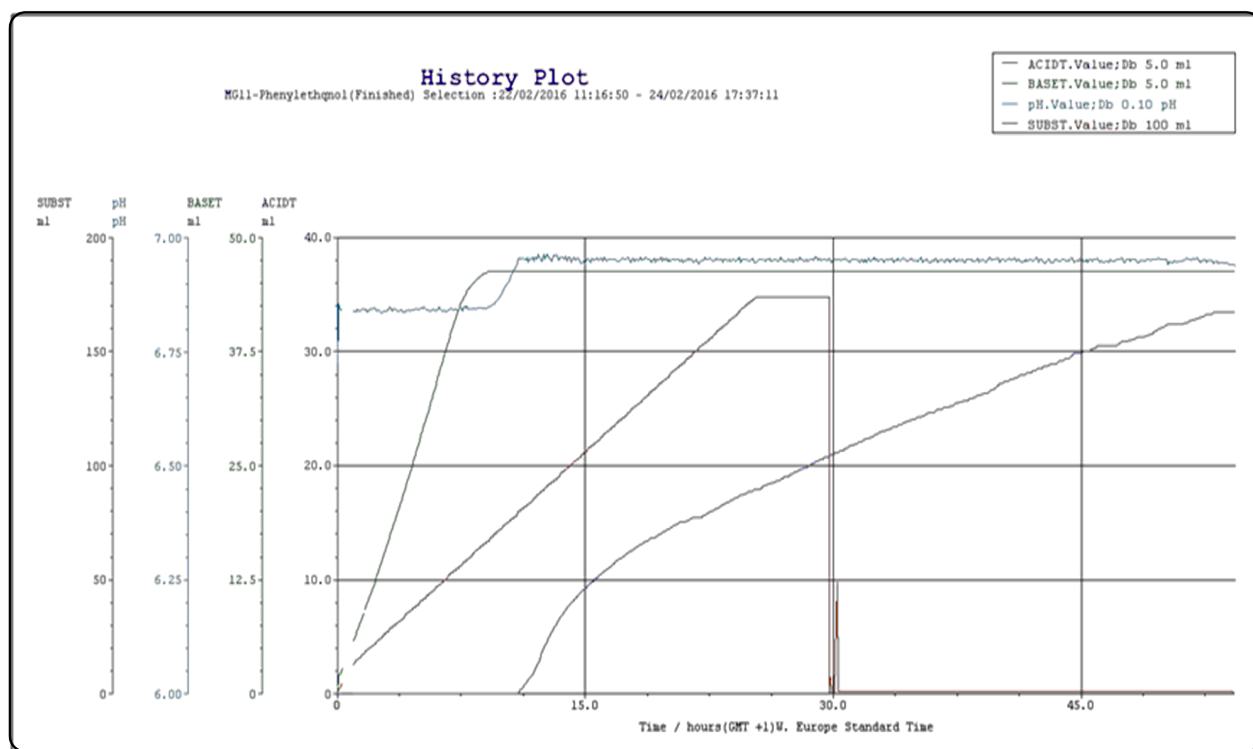


FIGURE 4.5 – Le suivi des conditions de la réaction dans le fermenteur.

#### 4.8 Évaluation des souches pour la réduction énantiosélective de cétones par criblage multi-substrats avec lot n°02

Nous avons réalisé la même expérience que le lot de levures n°1 mais avec des levures différentes et des cétones différentes, dans ce cas-là nous avons utilisé le 2-octanone et le phényl-éthyl-cétone , (tableau 4.7).

TABLE 4.7 – les mélanges des souches de Lot n°02.

Lot n°02				
Les souches	E	F	G	H
<i>P. minuta</i>	X			X
<i>R. turuloides</i>	X			X
<i>P. anomala</i>	X			
<i>K. magna</i>	X	X		
<i>T. Delbuckii</i>	X	X		
<i>C. pinus</i>		X		
<i>S. montanus</i>		X	X	
<i>S. calbergis</i>		X	X	
<i>R. rubra</i>			X	
<i>R. pilimanae</i>			X	X
<i>R. glutinis</i>			X	X
<i>Y. polytica</i>				X

Suite aux analyses de la CPG, nous observons bon avancement pour la 2-octanone **1g** dans chaque mélange, de ce fait, elle n'est plus intéressante en raison de la facilité de sa réduction par toutes les levures. Pour le phényl-éthyl-cétone **1h**, à 4h, l'avancement est modéré mais présent pour chaque mélange. Il est très bon à 24H pour les mélanges E et H. Quant aux erlenmeyers contenant le mélange de cétone, nous observons de bon avancement dans l'ensemble des mélanges (E, F, G et H). L'analyse des résultats montre aussi que le criblage multi-substrat ne fait apparaître aucune enzyme qui fournit les meilleurs résultats pour l'ensemble des substrats, (tableau 4.8)

TABLE 4.8 – l’avancement des réductions des cétones par le lot n°02.

mélange	temps(4h)		Temps(24h)	
	1g	1h	1g	1h
E1	27,88		91,42	
F1	17,6		90,04	
G1	8,66		75,95	
H1	58,22		87,33	
E2		57,07		94,64
F2		24,72		41,97
G2		30,67		87,48
H2		57,50		99,24
E3	28,08	53,93	93,42	94,5
F3	2,17	30,28	38,6	33,20
G3	24,86	42,79	64,47	89,20
H3	22,9	63,30	97	99,46

Nous décidons donc de nous intéresser aux souches donnant le meilleur rendement pour le phényl-éthyl-cétone **1h**. Donc les lots choisis sont E et H, ceux qui ont fourni les meilleures conversions pour la réduction des cétones et ayant en commun les souches : *P. minuta* et *R. turuloides*. Cela a conduit à l’application de la réduction de cétone avec les deux souches pour connaître la plus efficace entre et pour confirmer la réussite de la méthode de criblage.

#### 4.9 la réduction du Phényl-éthyl-cétone avec *P. minuta* et *R. turuloides*

Après avoir mis en culture les souches *P. minuta* et *R. turuloides*, nous l’avons mis en contact pendant 24 h avec le **1h** selon le même protocole préalablement employé. Nous avons ensuite extrait le produit qui a fait l’objet d’une analyse à l’aide de la CPG chirale, (tableau 4.9).

TABLE 4.9 – l’avancement de la réduction du Phényl-éthyl-cétone avec *P. minuta* et *R. turuloides*.

La souche	temps(4h)		temps(12h)		temps(24h)	
	conv(%)	e.e (%)	conv(%)	e.e(%)	conv(%)	e.e(%)
<i>P. minuta</i>	0	0	10	25	15	32
<i>R. turuloides</i>	77	92	86	93	92	96

Nos résultats montrent qu'en présence de *P. minuta* comme agent réducteur, la réduction énantiosélective ne permet pas d'obtenir le phényl-éthyl-alcool **2h** avec la meilleure conversion et le meilleur excès énantiomérique.

Le phényl-éthyl-alcool **2h** est obtenu avec une conversion de 92% et un excès énantiomérique de 96%. Donc, nous pouvons considérer que la souche *R. turuloides* réduit préférentiellement le phényl-éthyl-cétone **1h** en un seul l'énantiomère, montrant ainsi la grande affinité de la *R. turuloides* à cette cétone lors de la réduction. Ces résultats valident la méthode d'évaluation de souches par criblage multi-substrats pour la réduction énantiosélective de cétones prochirales. Nous avons pu sélectionner la meilleure souche et nous pouvons ensuite vérifier son efficacité sur une série de cétones analogues.

## 4.10 Conclusion

Dans cette étude, nous avons utilisé des souches de levures pour la réduction de cétones. Différentes souches ont été évaluées après préparation par une méthode de criblage multi-substrats qui a permis d'évaluer les meilleures. Nous avons mis au point la mesure simultanée de la conversion d'une série des cétones par CPG.

Les résultats obtenus avec les souches du lot n°01 ne sont pas intéressants pour démontrer l'efficacité de la méthode car la sélection de la souche qui a permis d'obtenir les meilleures inductions asymétriques pour l'ensemble des cétones étudiées était impossible. Au contraire, nous avons pu sélectionner une souche fournissant le meilleur excès énantiomériques par une déracémisation. Les substrats de la même famille ont été ensuite réduits avec des excès énantiomériques identiques, en présence de la souche sélectionnée, montrant des interactions analogues enzyme/substrat.

Ainsi les résultats du lot n°02 montrent que nous avons développé une méthode de criblage qui permet de sélectionner les meilleurs micro-organismes au sein d'une librairie. Cette méthodologie nous a permis de sélectionner une levure fournissant les meilleurs excès énantiomériques de façon très rapide avec économie de temps, de solvant et de réaction.

Troisième partie

Étude de la réactivité par modélisation  
moléculaire(M.M.)des réactions  
enzymatiques

# Chapitre 5

## modélisation de la réactivité de la réduction enzymatique

### Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>71</b>
<b>5.2</b>	<b>Méthodes de calculs théoriques</b>	<b>72</b>
<b>5.3</b>	<b>Résultats et discussion</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>conclusion</b>	<b>83</b>

---

### 5.1 Introduction

Ce chapitre aborde la partie la plus ambitieuse de notre projet qui est la modélisation moléculaire de l'énantiosélectivité de la réaction de réduction. La mise au point expérimentale d'enzymes performants en catalyse énantiosélective est un défi majeur en synthèse qui repose actuellement essentiellement sur des approches empiriques.

Les connaissances chimiques ne permettent généralement pas d'évaluer a priori la performance d'un catalyseur et la voie couramment utilisée pour améliorer l'énantiosélectivité repose sur un processus essai-erreur : pour un même squelette chimique, des catalyseurs diversement substitués sont synthétisés puis testés en catalyse.

Sachant que seuls les résultats expérimentaux permettront de valider la pertinence de la substitution utilisée. Ce processus ne semble donc pas optimal, à la fois d'un point de vue purement intellectuel, mais également pour les aspects humain (les temps de synthèse sont longs), économique et écologique (multiplier les essais coûte cher et augmente la production des déchets).

Les études théoriques dédiées pour la prédiction ou l'explication des excès énantiomériques observés expérimentalement en catalyse enzymatique sont peu nombreux dans la littérature [153, 154, 155]. Cela se comprend aisément du fait de la précision nécessaire pour

calculer de façon quantitative l'énantiosélectivité.

Dans ce chapitre, on se propose d'étudier théoriquement l'énantiosélectivité observé expérimentalement dans une réaction de réduction par voie enzymatique de cétones prochirales en se basant sur des concepts de la réactivité comme la théorie de l'état de transition et les indices de réactivité dérivant de la DFT conceptuelle, (figure 5.1).

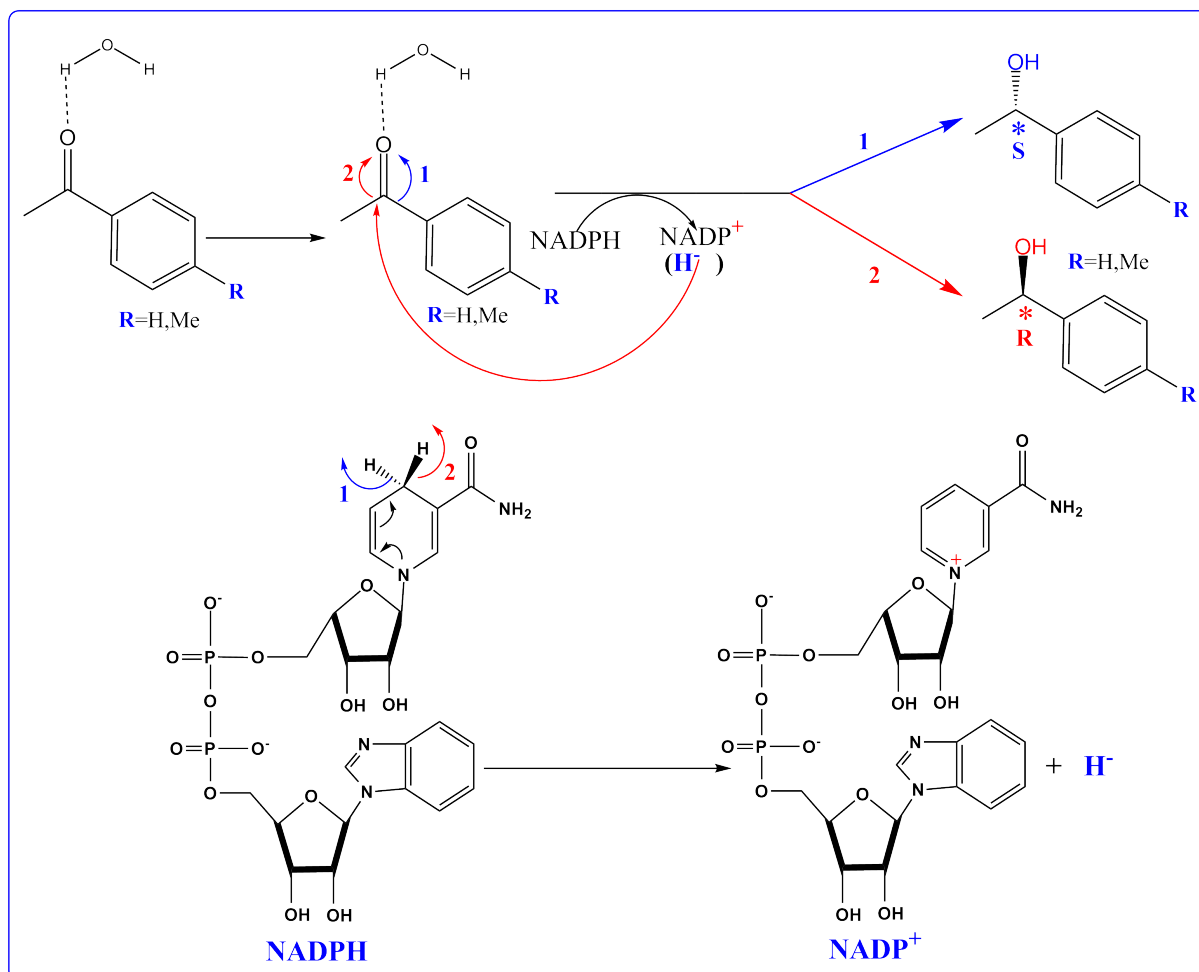


FIGURE 5.1 – Mécanisme de la réaction de réduction de cétone avec le **NADPH**.

## 5.2 Méthodes de calculs théoriques

L'ensemble des calculs ont été réalisés avec le programme Gaussian 09 en utilisant la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31G (d) [156] avec le programme de visualisation moléculaire GaussianView [157, 158, 159]. Les calculs de fréquences de vibration ont été réalisés systématiquement pour chaque géométrie après l'optimisation de leur

géométrie afin de caractériser la nature de ce point stationnaire. Les énergies libres de Gibbs sont calculées en utilisant les conditions expérimentales ( $T^\circ = 298\text{K}$  et  $P = 1\text{atm}$ ) [160].

— **5.2.1- Théorie de la Fonctionnelle de la Densité électronique :**

Aujourd'hui, les approches *ab initio* telles que Hartree-Fock ou semi-empiriques, sont toutes fondées autour d'une fonction mathématique qui est la fonction d'onde. Cette dernière est reliée à l'énergie de la molécule, mais cette grandeur n'a pas une signification physique.

La théorie de la fonctionnelle de la densité (**DFT**) diffère des approches précédentes en prenant pour propriété fondamentale la densité électronique, qui est une grandeur a un sens physique. Cette approche a pour origine le postulat de Thomas et Fermi selon lequel l'énergie du système, dans son état fondamental, peut être décrite sous la forme d'une fonctionnelle de la densité électronique ( $\rho$ ).

$$E^{DFT} = E^{core} + E^{nuclaire} + E^{coulomb} + E_{XC}[\rho]$$

— **5.2.2- Théorie de l'état de transition (TST) :**

Tout processus cinétique peut être décrit par un mécanisme réactionnel, qui constitue d'une ou une séquence de réactions élémentaires. En générale, pour un système contenant des réactifs et des produits d'une réaction élémentaire, il est utile d'introduire un diagramme de potentiel multidimensionnel qui reflète la variation de l'énergie du système en fonction des coordonnées des atomes impliqués dans cette réaction, (figure 5.1).

La théorie de l'état de transition a été développée par Eyring en 1931 [161] dans le but d'expliquer les vitesses réactionnelles observées en fonction des paramètres thermodynamiques. Elle est basée sur le concept que les réactifs doivent passer par un état de transition sous forme d'un complexe active de courte durée de vie, et que la vitesse de cette réaction est proportionnelle à la concentration de cet complexe. L'avantage primordial de cette théorie est de relier la cinétique à la thermodynamique.

Soit la réaction chimique suivante :



Au niveau microscopique, la constante de vitesse  $k$  dépend des états quantiques des molécules A, B, C et D, c'est à dire des états de translation, de rotation et de vibration. A l'échelle macroscopique, la constante de vitesse est prise comme une moyenne des

constantes de vitesse microscopiques pondérées par les probabilités de trouver chaque molécule dans un certain état quantique. On note que la thermodynamique statistique permet de relier les états microscopique et macroscopique d'un système.

Selon la théorie de l'état de transition, le passage des réactifs (état initial) aux produits (état final) nécessite le passage par un état de transition c'est-à-dire l'affranchissement d'une barrière d'activation calculée par :

$$\Delta G^* = G(TS) - G(\text{réactifs})$$

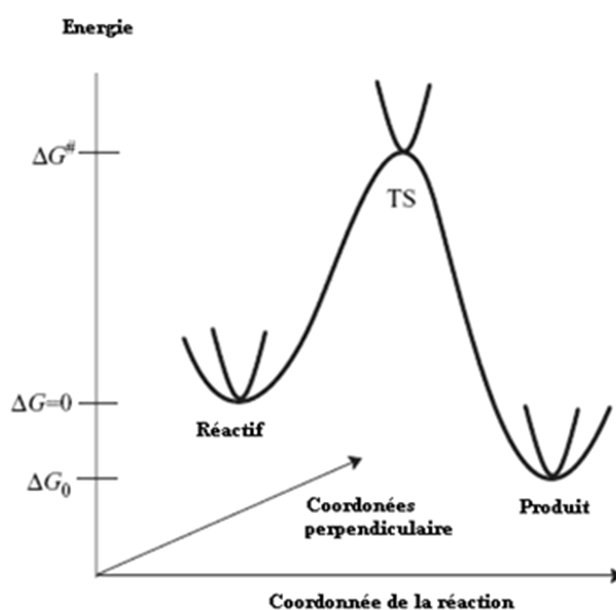


FIGURE 5.2 – Illustration schématique du chemin d'une réaction élémentaire.

D'après la Figure 5.2, le point qui correspond à l'énergie maximale représente l'état de transition qui est un point de selle d'ordre 1 (First-order saddle point) sur la surface d'énergie potentielle (PES), c'est-à-dire un maximum dans la direction de la coordonnée de la réaction et un minimum par rapport aux autres coordonnées perpendiculaires. Pour un point de selle d'ordre 1, il existe une seule fréquence imaginaire de vibration.

## 5.3 Résultats et discussion

### 5.3.1- Géométrie optimisée :

Comme mentionné précédemment, tous les calculs ont été effectués en appliquant la méthode DFT avec la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31G (d). Les résultats sont discutés pour les complexes [1a-NADPH], [2a(S)-NADP<sup>+</sup>] et [2a(R)-NADP<sup>+</sup>]

]pour la réaction avec l'acétophénone **1a**, et pour les complexes [**1b**-NADPH], [**2b(S)**-NADP<sup>+</sup>] et [**2b(R)**-NADP<sup>+</sup>] pour la réaction avec p-méthyl-acétophénone **1b** et. La structure optimisée des complexes ainsi que la numérotation des atomes sont représentées dans la Figure 5.3.

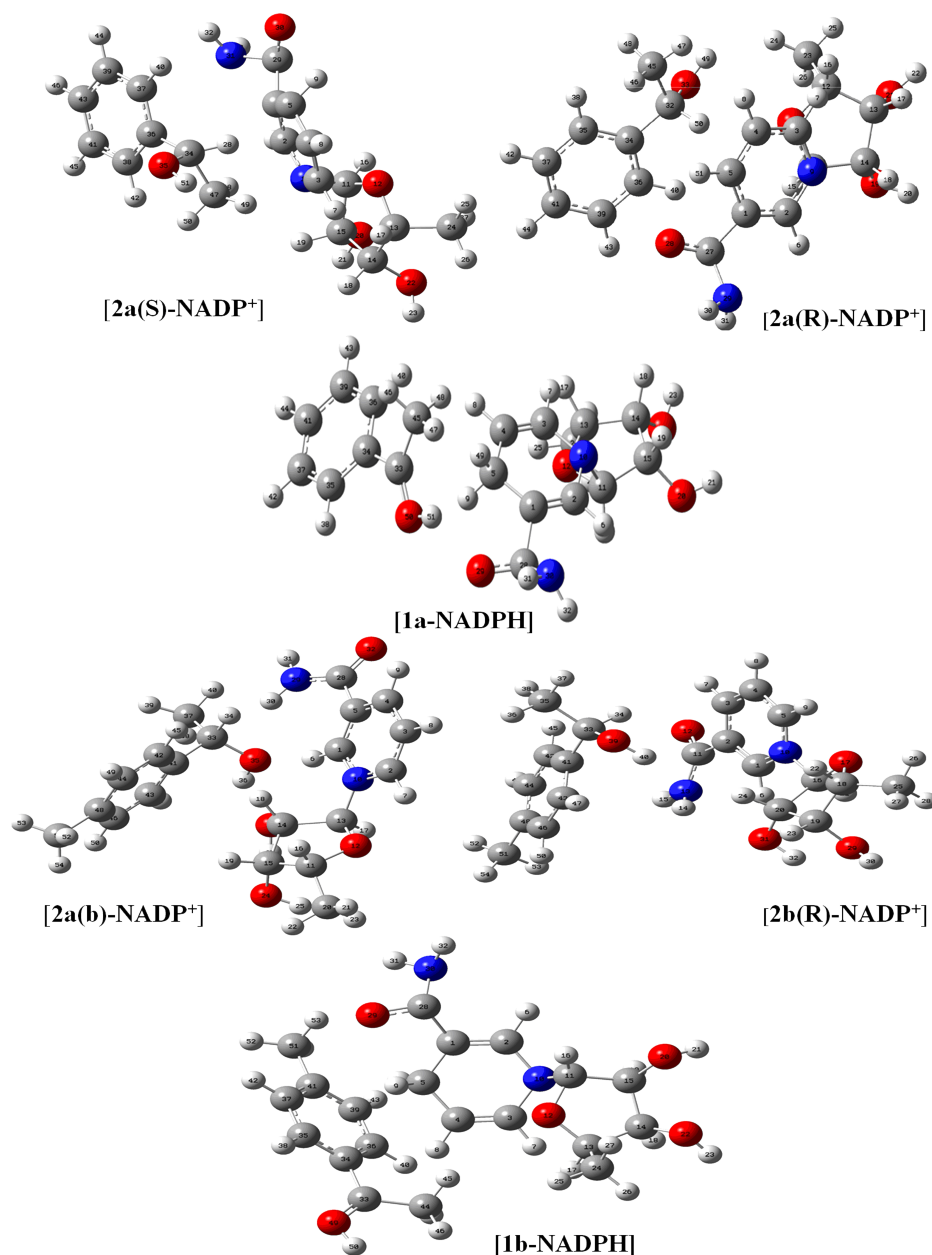


FIGURE 5.3 – Structures optimisées des complexes de réaction des composés **1a** et **1b** avec le NADPH à B3LYP/6-31G (d).

### 5.3.2- les énantiomères **2a(S)** et **2a(R)** :

Comme on a déjà représenté dans la figure 5.1, les deux formes énantiomères **2a(S)** et **2a(R)** peuvent exister pour les molécules de titre ; la première avec une fonction d'alcool (groupement hydroxy) en arrière du plan et le second avec une fonction d'alcool en avant du plan. Le mécanisme énantiosélective de l'obtention de ces deux composés a été théoriquement étudié. Les énantiomères **2a(S)** et **2a(R)** peuvent être obtenus par l'intermédiaire d'une réaction de transfert intermoléculaire d'un hydrure à partir du **NADPH**. En raison de la migration de l'atome d'hydrogène lié à l'atome du carbone C5 du (**NADPH**) vers l'atome du carbone C<sub>33</sub> de la cétone (**1a**), il y a seulement certains changements qui ont observés dans la structure de ces composés. La distance entre l'atome du carbone C<sub>34</sub> et de l'hydrogène H28 dans le complexe [**2a(S)**-**NADP**<sup>+</sup>] et entre l'atome du carbone C<sub>32</sub> et l'atome d'hydrogène H50 pour le complexe [**2a(R)**-**NADP**<sup>+</sup>] diminue au cours du transfert de proton **Cétone-NADPH** → **ET** → **Alcool-NADP**<sup>+</sup>. Ainsi, on peut déduire que la liaison C-H est rompue, et une liaison O-H est formée au cours de ce processus du transfert intermoléculaire du proton dans les composés **NADP**<sup>+</sup> et **2a** (Tableau 5.1).

TABLE 5.1 – Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés [**2a(S)**- **NADP**<sup>+</sup>] et [**2a(R)**- **NADP**<sup>+</sup>] optimisés en phase gazeuse

Paramètres		B3LYP/6-31G(d)	
Longueurs de liaison (Å)			
		ET	Alcool - <b>NADP</b> <sup>+</sup>
[ <b>2a(S)</b> - <b>NADP</b> <sup>+</sup> ]	C <sub>5</sub> -H <sub>28</sub>	1.413	1.472
	C <sub>34</sub> -H <sub>28</sub>	1.294	1.094
[ <b>2a(R)</b> - <b>NADP</b> <sup>+</sup> ]	C <sub>5</sub> -H <sub>50</sub>	1.581	1.602
	C <sub>32</sub> -H <sub>50</sub>	1.20	1.099

### 5.3.3- les énantiomères **2b(S)** et **2b(R)** :

Les énantiomères **2b(S)** et **2b(R)** peuvent être obtenus par le mécanisme précédent des énantiomères **2a(S)** et **2a(R)** qui se déroule à travers d'une réaction de transfert intermoléculaire d'un hydrure à partir du **NADPH**. L'obtention de ces énantiomères liées à des changements dans la géométrie de ces composés. Au cours du transfert de proton **1b-NADPH** → **ET** → **2b-NADP**<sup>+</sup>, la distance entre l'atome du carbone C<sub>34</sub> et de l'hydrogène H<sub>28</sub> dans le complexe [**2b(S)**-**NADP**<sup>+</sup>] et entre l'atome du carbone C<sub>32</sub> et l'atome d'hydrogène H<sub>50</sub> pour le complexe [**2b(R)**-**NADP**<sup>+</sup>] diminue. Ainsi, au cours de ce processus du transfert intermoléculaire du proton dans les composés **NADP**<sup>+</sup> et **2b**, on peut déduire que la liaison C-H est rompue, et une liaison O-H est formée (Tableau 5.2).

TABLE 5.2 – Les Longueurs de certaines liaisons à l'état de transition des composés [2b(S)-NADP<sup>+</sup>] et [2b(R)-NADP<sup>+</sup>] optimisés en phase gazeuse

Paramètres		B3LYP/6-31G(d)	
Longueurs de liaison (Å)			
		ET	Alcool-NADP <sup>+</sup>
[2b(S)-NADP <sup>+</sup> ]	C <sub>5</sub> -H <sub>28</sub>	1.424	1.461
	C <sub>34</sub> -H <sub>28</sub>	1.283	1.098
[2b(R)-NADP <sup>+</sup> ]	C <sub>5</sub> -H <sub>50</sub>	1.578	1.597
	C <sub>32</sub> -H <sub>50</sub>	1.20	1.12

### 5.3.4- Analyse de l'énergie des points stationnaires pour la réduction de réduction d'acétophénone 1a :

Nous avons procédé au calcul de l'énergie des points stationnaires (réactifs, états de transition et produits) pour les énantiomères d'alcool textbf2a en phase gazeuse en utilisant la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Par conséquent, nous avons étudié deux états de transition et deux produits. La géométrie des structures de transition et les longueurs des nouvelles liaisons sont données à la Figure 5.4. Le Tableau 5.3 regroupe les valeurs des énergies totales et les énergies relatives. Le profil énergétique du procédé du transfert unique d'hydrure textbf(1a-NADPH/2a-NADP<sup>+</sup>) est représenté sur la Figure 5.5.

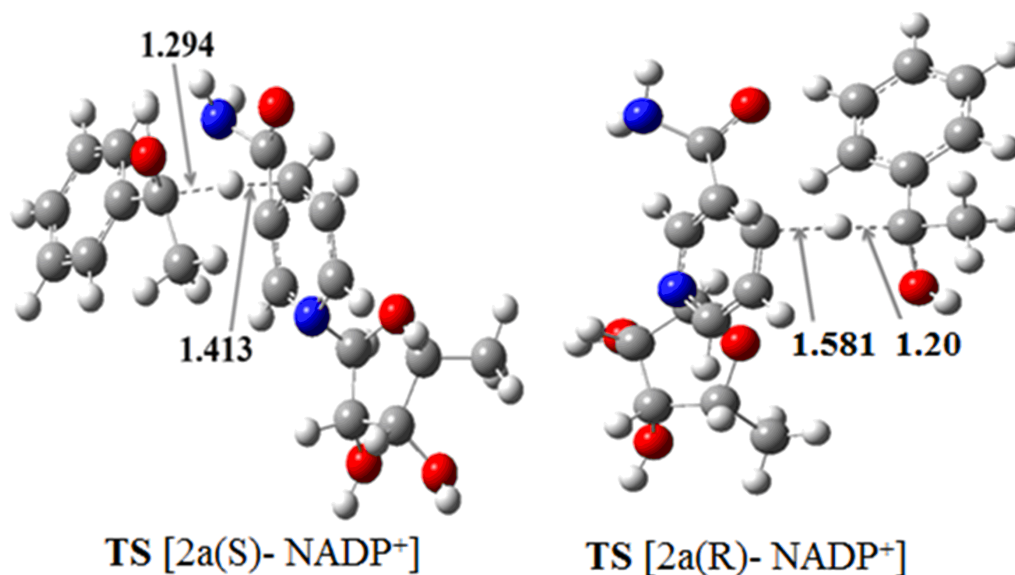


FIGURE 5.4 – Les états de transition impliqués dans la deuxième étape de la réaction.

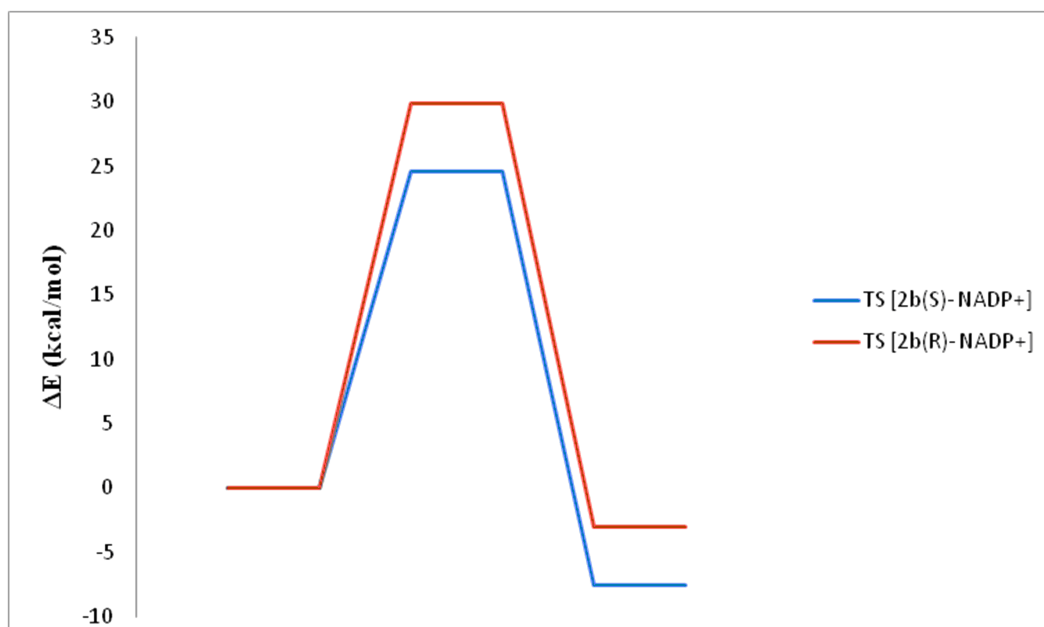


FIGURE 5.5 – Le profil énergétique relative des complexes [2a(S)- **2a**-NADP<sup>+</sup>] et [2a(R)- **2a**-NADP<sup>+</sup>] en phase gazeuse.

La comparaison entre les énergies d'activation indique que l'état de transition de l'énantiomère **2a(S)** (24,85 kcal. mole<sup>-1</sup>) est plus faible par rapport à celle de l'énantiomère **2a(R)** (30,17 kcal. mole<sup>-1</sup>), où l'attaque de l'hydrure s'effectue préférentiellement sur la face du carbonyle (re-face) que sur l'arrière du carbonyle (si-face). De plus, la différence entre les énergies d'activation  $\Delta\Delta E=5,32$  kcal. mole<sup>-1</sup> révèle la formation d'un seul produit **2a(S)** qui est le produit favorisé cinétiquement.

Ainsi, on peut remarquer que cette réaction de réduction est faiblement exothermique donnant lieu la formation du complexe le plus stable, le [**2a(S)**-NADP<sup>+</sup>] avec  $\Delta E=-8,16$  kcal.mole<sup>-1</sup>. La formation du complexe [**2a(R)**-NADP<sup>+</sup>] est légèrement exothermique  $\Delta E=-3,32$  kcal.mole<sup>-1</sup>. Donc, il est un peu moins stable par rapport au complexe complexe [**2a(S)**-NADP<sup>+</sup>]. Par conséquent, le complexe [**2a(S)**-NADP<sup>+</sup>] est favorisé thermodynamiquement.

On peut dire que le transfert d'hydrure du NADPH vers la cétone dans cette réaction est beaucoup plus facile sur la face *si* du carbonyle, expliquant la formation majoritaire de l'énantiomère **2a(S)** observé expérimentalement.

TABLE 5.3 – Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés [2b(S)-NADP<sup>+</sup>] et [2b(R)-NADP<sup>+</sup>] optimisés en phase gazeuse

Complexe	E	$\Delta E$
1a- NADPH	-1224.46696461	/
TS 2a(S)-NADP <sup>+</sup>	-1224.42736050	24.85
TS 2a(R)-NADP <sup>+</sup>	-1224.41887797	30.17
2a(S)-NADP <sup>+</sup>	-1224,47998367	-8.16
2a(R)-NADP <sup>+</sup>	-1224.47226282	-3.32

### 5.3.5- Analyse de l'énergie des points stationnaires pour la réduction de réduction de p-méthyle-acétophénone 1b :

Concernant l'analyse de l'énergie des points stationnaires (réactifs, états de transition et produits) pour la réduction de réduction de p-méthyle-acétophénone **1b**, Nous avons suivie le même procédure utilisée dans la réaction avec l'acétophénone **1a**. Donc, on a effectué nos calculs en phase gazeuse en utilisant la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). La géométrie des structures de transition et les longueurs des nouvelles liaisons sont données à la Figure 5.6. Le Tableau 5.4 regroupe les valeurs des énergies totales et les énergies relatives. Le profil énergétique du procédé du transfert unique d'hydrure (**1b**-NADPH/**2b**-NADP<sup>+</sup>) est représenté dans la Figure 5.7.

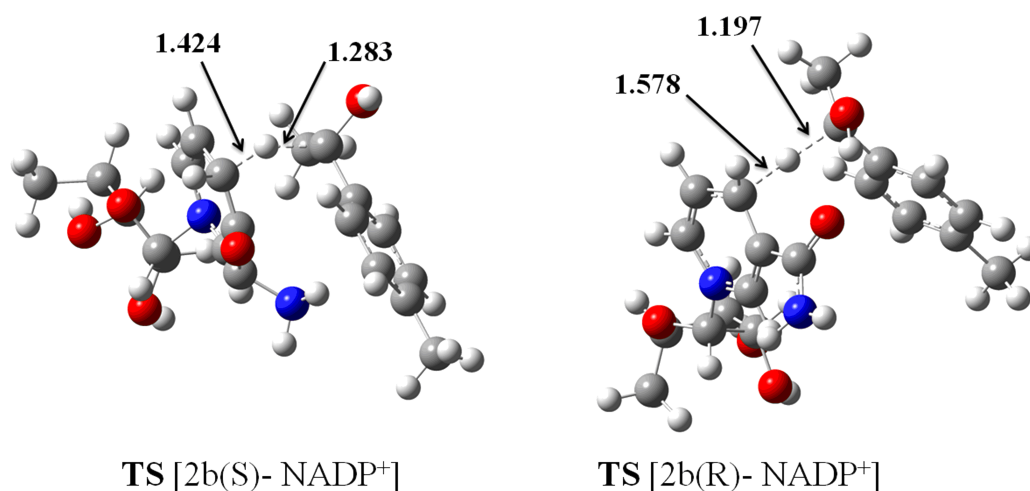


FIGURE 5.6 – Les états de transition impliqués dans la deuxième étape de la réaction.

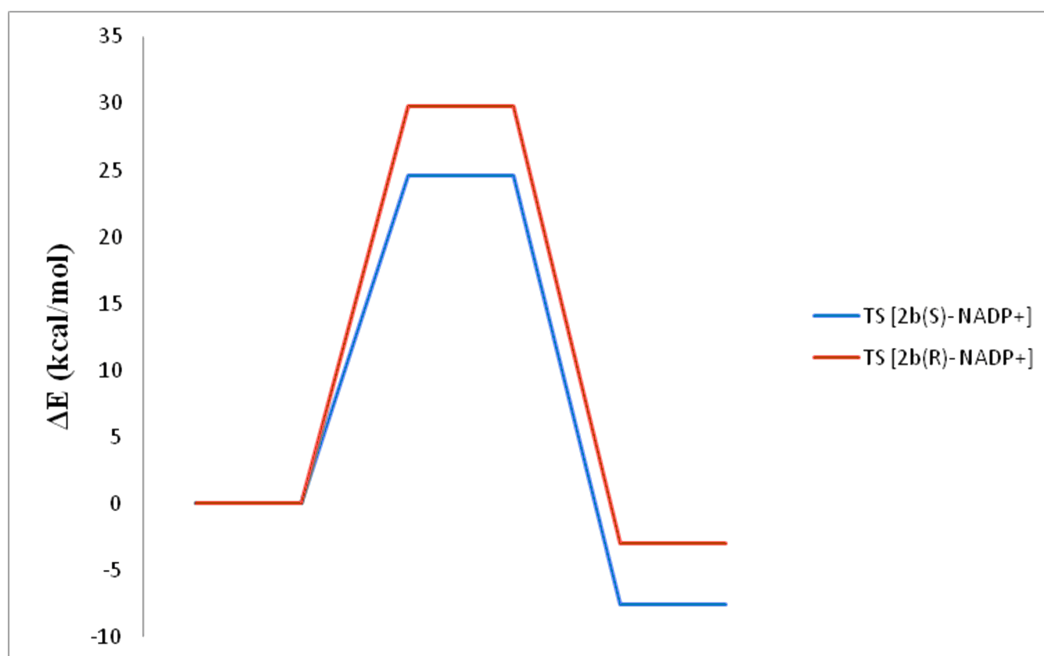


FIGURE 5.7 – Le profil énergétique relative des complexes  $[2b(S)-2a-NADP^+]$  et  $[2b(R)-2a-NADP^+]$  en phase gazeuse.

La comparaison entre les énergies d'activation indique que l'état de transition de l'énantiomère **2b(R)** ( $29.83 \text{ kcal. mole}^{-1}$ ) est plus fort par rapport à celle de l'énantiomère **2b(S)** ( $24.61 \text{ kcal. mole}^{-1}$ ), où l'attaque de l'hydrure s'effectue préférentiellement sur la face du carbonyle (re-face) que sur l'arrière du carbonyle (si-face). De plus, la différence entre les énergies d'activation  $\Delta\Delta E = 4.59 \text{ kcal. mole}^{-1}$  révèle la formation d'un seul produit **2b(S)** qui est le produit favorisé cinétiquement.

Ainsi, on peut déduire que cette réaction de réduction est exothermiquement faible donnant lieu à la formation du complexe le plus stable, le  $[2b(S)-NADP^+]$  avec  $\Delta E = -7.56 \text{ kcal. mole}^{-1}$ . La formation du complexe  $[2b(R)-NADP^+]$  est légèrement exothermique  $\Delta E = -2.97 \text{ kcal. mole}^{-1}$ , ce qui indique qu'il est moins stable par rapport au complexe  $[2b(S)-NADP^+]$ . Par conséquent, le complexe  $[2b(S)-NADP^+]$  est favorisé thermodynamiquement.

On peut dire que le transfert d'hydrure du **NADPH** vers la cétone dans cette réaction est beaucoup plus facile sur la face si du carbonyle, expliquant la formation majoritaire de l'énantiomère (S) observé expérimentalement.

TABLE 5.4 – Les Longueurs de certaines liaisons dans l'état de transition des composés [2b(S)-NADP<sup>+</sup>] et [2b(R)-NADP<sup>+</sup>] optimisés en phase gazeuse

Complexe	E	ΔE
1b- NADPH	-1263.78684587	/
TS 2b(S)-NADP <sup>+</sup>	-1263.74762205	24.61
TS 2b(R)-NADP <sup>+</sup>	-1263.73929511	29.83
2b(S)-NADP <sup>+</sup>	-1263.79889587	-7.56
2b(R)-NADP <sup>+</sup>	-1263.79158942	-2.97

### 5.3.6. Spectroscopie IR du 2a :

Dans cette partie de ce chapitre, les fréquences vibratoires harmoniques de composé **2a** étudié ont été calculées en utilisant toujours la méthode DFT au niveau théorique (B3LYP/6-31G (d)). Les vibrations correspondant aux fréquences calculées ont été visualisées et confirmés en utilisant le programme de visualisation moléculaire Gauss-View. Les fréquences de vibration sélectionnées correspondants aux bandes qui ont une importance considérable et qui fournissent une indication significative sur la formation du dérivé de l'alcool chirale et confirme leur structure.

Pour faciliter l'attribution des pics observés, nous avons analysé et comparé les fréquences de vibration des résultats du calcul avec celles expérimentales. Les fréquences IR importantes de composé **2a** sont énumérées dans le tableau 5.5.

D'après ces valeurs, on peut remarquer qu'il existe un accord acceptable entre les fréquences de vibration expérimentales et théoriques.

Le spectre FT-IR de 1-phényl-éthanol montre l'existence une bande d'intensité large à 3365.27 cm<sup>-1</sup>. Les calculs indique qu'on a une vibration à 3508.05 cm<sup>-1</sup>, cette valeur confirme la conversion du groupement carbonyle (C=O) à un groupement hydroxyle (C-OH). En outre, la fréquence de vibration d'élongation de la liaison C-H à été observée à 2934.02 cm<sup>-1</sup> et à 3020.26 cm<sup>-1</sup> dans le spectre expérimental et théorique, respectivement.

la bande qui apparue à 1569.23 cm<sup>-1</sup> (expérimentale) et à 1577.85 cm<sup>-1</sup> (théorique) peut être attribué à la vibration d'élongation de la liaison -C=C- du cycle aromatique. De plus, la vibration d'élongation Car-H du composé **2a** a été observée à 794.2 cm<sup>-1</sup> qui a été paru à 825.65 cm<sup>-1</sup> dans le spectre théorique.

TABLE 5.5 – Les fréquences de vibration ( $\text{cm}^{-1}$ ) expérimentales et calculées de composé **2a**.

<b>2a</b>		
<b>Assignments</b>	<b>Expérimentale</b>	<b>Calculée</b>
$\nu\text{OH}$	<b>3365.27</b>	<b>3508.05</b>
$\nu\text{CH}$	<b>2934.02</b>	<b>3020.26</b>
$\nu\text{C}=\text{C}$	<b>1569.23</b>	<b>1577.85</b>
$\nu\text{C}_{AR}\text{H}$	<b>794.20</b>	<b>825.65</b>

### 5.3.7. Spectroscopie IR du **2b** :

Concernant les fréquences de vibration harmoniques du composé **2b**, le calcul a été effectué comme précédemment dans le cas du composé **2a**. Nous avons analysé et comparé les fréquences de vibration des résultats du calcul avec celles expérimentales. Les fréquences IR importantes du composé **2b** sont énumérées dans le tableau tableau 5.6, ainsi que leurs affectations proposées. On peut remarquer d'après ces valeurs, qu'il existe un accord acceptable entre les fréquences de vibration expérimentales et théoriques.

Le spectre FT-IR de 1-(o-tolyl)-éthanol **2b** présente une bande d'intensité large à  $3355 \text{ cm}^{-1}$  expérimentalement. Cette bande apparue à  $3541.2 \text{ cm}^{-1}$  dans le spectre théorique, ce qui confirme la conversion du groupe (C=O) en un groupement (C-OH). En outre, la bande à  $2967 \text{ cm}^{-1}$  qui peut être attribué aux vibrations du groupe C-H. cette dernière apparue à  $3015.85 \text{ cm}^{-1}$  dans le spectre théorique. La bande qui peut être accordé aux vibrations d'élongation du cycle aromatique -C=C- a été observée à  $1515 \text{ cm}^{-1}$ , alors que cette bande est apparue à  $1515.95 \text{ cm}^{-1}$  dans le spectre théorique. En outre, La vibration d'élongation Car-H du composé **2b** a été observée à  $853 \text{ cm}^{-1}$  qui a été paru à  $867.58 \text{ cm}^{-1}$  en théorie.

TABLE 5.6 – Les fréquences de vibration ( $\text{cm}^{-1}$ ) expérimentales et calculées de composé **2b**.

<b>2b</b>		
<b>Assignments</b>	<b>Expérimentale</b>	<b>Calculée</b>
$\nu\text{OH}$	<b>3341.2</b>	<b>3555</b>
$\nu\text{CH}$	<b>2967</b>	<b>3015.85</b>
$\nu\text{C}=\text{C}$	<b>1515</b>	<b>1515.95</b>
$\nu\text{C}_{AR}\text{H}$	<b>853</b>	<b>867.58</b>

## 5.4 conclusion

Dans ce chapitre, l'énantiosélectivité de la réaction de réduction d'acétophénone en 1-phényl-éthanol chirale et du p-méthyle acétophénone en 1-(o-tolyl)-éthanol par voie enzymatique (**NADPH**) a été étudié en utilisant la méthode DFT au niveau B3LYP/6-31G(d).

- La comparaison entre les énergies des états de transition explique avec succès la stéréosélectivité observée expérimentalement pour les deux cas. nous avons trouvé que l'interaction la plus favorable conduit à la formation de l'énantiomère avec la configuration (**S**) que l'énantiomère avec la configuration (**R**), le modèle théorique basé sur les indices de réactivité dérivant de la DFT conceptuelle prédisent également de manière correcte l'énantiosélectivité de cette réaction de réduction d'acétophénone et du p-méthyle-acétophénone avec le **NADPH**.

## Conclusion générale et perspectives

Ce travail de recherche porte sur la réaction de réduction par transfert d'hydrure de cétones prochirales avec différentes enzymes, c'est une réaction simple et efficace pour l'obtention d'alcools secondaires optiquement purs, dont l'intérêt pharmacologique et l'importance en synthèse organique sont reconnus.

Nous avons utilisé les déchets alimentaires pour la réduction énantiosélective de cétones prochirales par transfert d'hydrure dans l'eau et dans le glycérol. La réduction de cétones avec ce type de d'enzyme a conduit à des alcools chiraux avec des bons excès énantiomériques et des conversions chimiques acceptables. Les résultats montrent une bonne performance de notre enzymes qui dépendent essentiellement des effets stéréoelectroniques mise en jeu. Nous avons pu mettre en évidence l'influence des groupements électroattracteurs (*NO<sub>2</sub>*) ou donneurs (*Me*) sur la réactivité et l'énantiosélectivité de l'enzyme.

Dans une deuxième phase de notre travail, nous avons mis au point une méthode de criblage de ces systèmes enzymatiques pour les réductions asymétriques de cétones aliphatiques et aromatiques.

Dans un premier temps, nous avons préparés une bibliothèque de levures qui présentent l'avantage d'être stables, simple à préparer et facile a mettre en oeuvre. Par la suite nous avons mis au point la mesure simultanée des excès énantiomériques d'une série de deux alcools par CPG sur colonne chirale; la sélection des cétones étudiées est conditionnée à leur séparation par CPG chirale. Cette mise au point nous a permis la réduction de deux cétones en une seule expérience avec des excellents excès énantiomériques pour une évaluation rapide des levures mis en oeuvre. cette expérience a permis de sélectionné la levure *R. buffoni* comme le meilleur enzyme pour la déracémisation par oxydo-réduction. Par la suite, nous avons examiné un nouveau lot de levure. Les résultats montrent clairement que la nouvelle approche donne de meilleurs résultats que ce soit pour les excès énantiomériques ou pour les conversions.

Les enzymes étudiés dans ce travail de recherche ont été développés dans des conditions douces et peu onéreuses, ils sont exploités dans une réaction de réduction asymétrique qui présente l'avantage d'être économique et écologique.

On a terminé ce travail avec une étude théorique en comparaison avec les résultats expérimentaux. Pour cela on a utilisé la méthode de la modélisation moléculaire bases sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Les résultats obtenus au cours de

de cette étude théorique confirme les données expérimentales.

Dans les perspectives de développement ultérieur, nous envisageons :

- De développer cette approche combinatoire sur d'autres cétones possédant des structures différentes.
- D'approfondir l'étude théorique de l'effet de solvant sur le mécanisme et sur les sélectivités des réactions de réduction.

# partie expérimentale

Les CCM sont observées en lumière ultraviolette à 254 nm ou trempées dans un révélateur d'iode (I2). Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre **Shimadzu FTIR 8400-S**. Les nombres d'ondes sont exprimés en  $cm^{-1}$ . Les produits ont été analysés sous forme de film solide, ou de pastille de KBr. Les analyses par GC chirale ont été effectuées sur un appareil **Shimadzu GC2010** utilisant une colonne de type *CP FS Cyclodextrin- $\beta$ -ip* column (25m x 0.36 mm AD x 0.25 mm ID). Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre **Perkin-Elmer 241 MC** et les concentrations sont données en g / 100 mL.

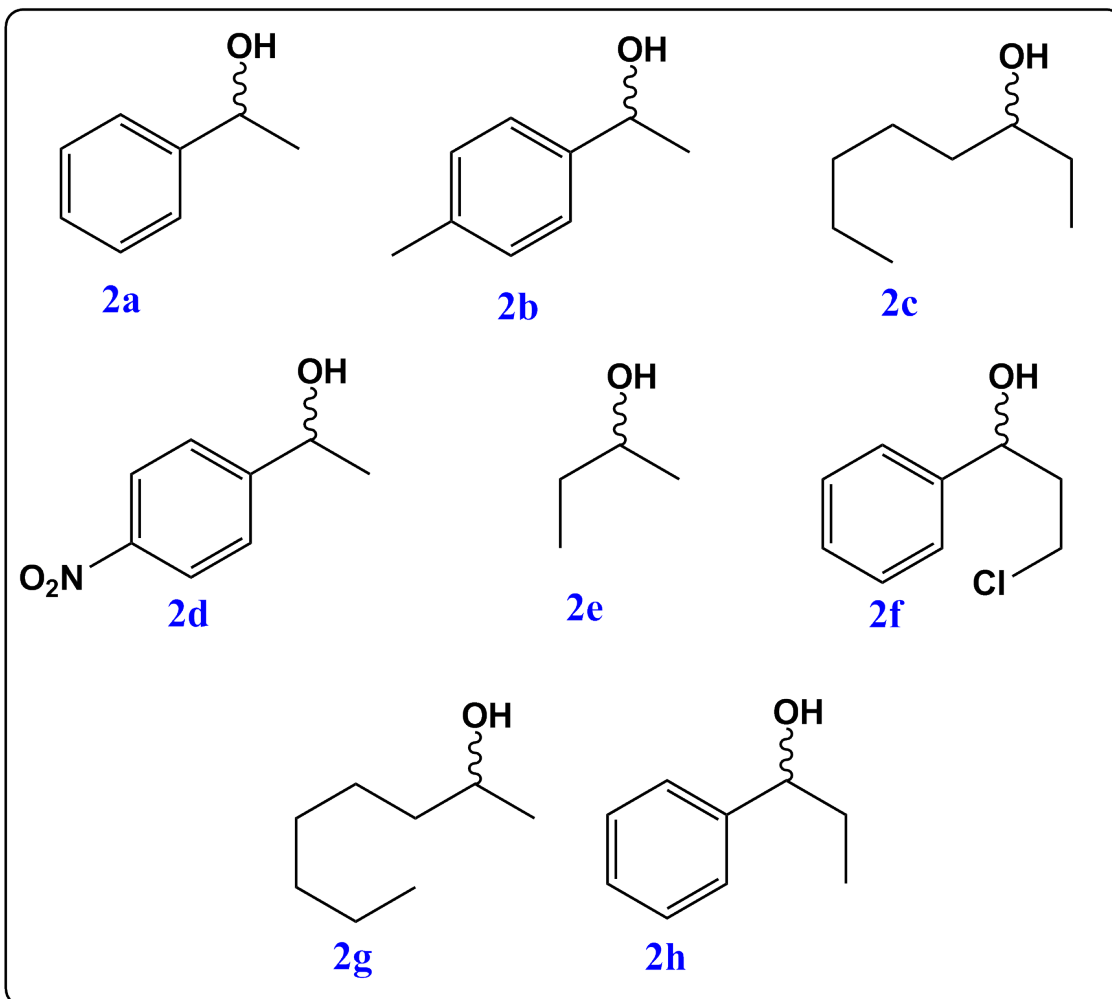
### 1-Préparation des alcools racémiques :

Dans un ballon tricol de 500ml mené d'un réfrigérant, on ajoute à une solution de MeOH (20ml), 2 équivalents de borohydrure de sodium ( $NaBH_4$  : 6 mmole) ; le mélange est soumis à agitation magnétique à 0°C. Par la suite, on additionne 3 mmole de cétone dans 10 ml de MeOH à l'aide d'une seringue. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) avec un éluant : 80/20 éther de pétrole/acétate d'éthyle.

#### -Traitement :

Dès que le produit de départ soit totalement consommé, une hydrolyse du mélange réactionnel est effectuée avec une solution d'acide chloridrique (HCl :1N) lentement à froid. Le mélange est filtré puis partiellement évaporé sous pression réduite. Le résidu (alcool dans la phase aqueuse) est extrait avec l'acétate d'éthyle (3 x 30 ml), la phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) puis concentrée sous pression réduite.

## -Les alcools racémiques :



1-phényl-éthanol, **2a** : aspect physique : huile incolore ;  $R_f = 0.19$  (Et<sub>2</sub>O/ Ep, 6 :4) ;  $([\alpha]_D) = -40$  ( $c = 3.5$ , MeOH) (lit. [162]  $([\alpha]_D)$ ) ; Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [120 °C,  $t_R(R) = 21$  min,  $t_R(S) = 24$  min] ; IR :  $\nu(\text{cm}^{-1})$  : 656, 794, 896, 996, 940, 1076, 1205, 1250, 1304, 1409, 1454, 1542, 1600, 2934, 3365 ( $\nu\text{OH}$ ).

1-(o-tolyl)-éthanol, **2b** : aspect physique : huile jaune ;  $R_f = 0.21$  (Et<sub>2</sub>O/ Ep, 6 :4) ;  $([\alpha]_D) = -22$  ( $c = 1.5$ , CHCl<sub>3</sub>) (lit. [162]  $([\alpha]_D)$ ) ; Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [120 °C,  $t_R(R) = 28.6$  min,  $t_R(S) = 30.7$  min] ; IR :  $\nu(\text{cm}^{-1})$  : 567, 670, 853, 896, 998, 1053, 1150, 1262, 1363, 1407, 1515, 1623, 1647, 2969, 3355 ( $\nu\text{OH}$ ).

octan-3-ol, **2c** : aspect physique : huile incolore ;  $R_f = 0.10$  (Et<sub>2</sub>O/ Ep, 6 :4) ;  $([\alpha]_D) =$

+7.1 (lit. [162]  $[\alpha]_D$ ); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [60 °C,  $t_R(R) = 8.2$  min,  $t_R(S) = 8.33$  min]; IR :  $\nu(cm^{-1})$  : 725, 806, 871, 933, 972, 1010, 1041, 1110, 1142, 1230, 1261, 1326, 1419, 1460, 2360, 2731, 2964, 3372 ( $\nu OH$ ).

1-(4-nitrophenyl)-éthanol, **2d** : aspect physique : huile incolore ; Rf = 0.24 (Et2O/ Ep, 6 :4); ( $[\alpha]_D$ ) = -31 (c = 4, CHCl3) (lit. [162]  $[\alpha]_D$ ); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [190 °C,  $t_R(R) = 37.33$  min,  $t_R(S) = 38.27$  min]; IR :  $\nu(cm^{-1})$  : 802, 872, 1021, 1067, 1272, 1326, 1360, 1411, 1458, 1654, 1924, 2136, 2256, 2414, 2542, 2889, 2927, 3334 ( $\nu OH$ ).

butan-2-ol, **2e** : aspect physique : huile jaune ; Rf = 0.08 (Et2O/ Ep, 6 :4); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [40 °C pas recouvert par le pic du solvant]; IR :  $\nu(cm^{-1})$  : 656, 794, 896, 996, 940, 1076, 1205, 1250, 1304, 1409, 1454, 1542, 1600, 2934, 3365 ( $\nu OH$ ).

3-chloro-1-phénylpropan-1-ol, **2f** : aspect physique : huile incolore ; Rf = 0.26 (Et2O/ Ep, 6 :4); ( $[\alpha]_D$ ) = -28 (c = 1, CHCl3) (lit. [162]  $[\alpha]_D$ ); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [180 °C,  $t_R(R) = 20.5$ ,  $t_R(S) = 21.7$  min] .

octan-2-ol, **2g** : aspect physique : huile incolore ; Rf = 0.11 (Et2O/ Ep, 6 :4); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [60 °C,  $t_R(R) = 7.5$  min,  $t_R(S) = 8.1$  min].

1-phénylpropan-1-ol, **2h** : aspect physique : huile incolore ; Rf = 0.22 (Et2O/ Ep, 6 :4); Chirale GC CP-Cyclodextrin- $\beta$ -ip [120 °C,  $t_R(R) = 12.7$  min,  $t_R(S) = 14.1$  min].

## 2-Réduction de cétones avec la levure de boulanger :

Dans un ballon, la levure du boulanger (5g) et le saccharose (15g) sont dissout dans 100 ml de solvant (eau ou glycérol). Après une heure d'agitation à 30°C, 0,5 mmole de la cétone est additionnée à la solution. Le traitement consiste à centrifuger le mélange réactionnel, l'alcool formé est extrait par acétate d'éthyle (3 x 100 ml) dans le cas d'eau comme solvant et (2x 100 ml) pour le glycérol, la phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) et concentrée sous pression contrôlé.

## 3-Réduction de cétones avec les déchets alimentaires :

Dans un ballon de 250 muni d'un barreau aimanté, on dissout 50 g de déchets alimentaires dans 100 ml de solvant (eau ou glycérol), après une agitation à 30°C pendant une heure, on ajoute 2 mmole de l'cétone. Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température de 30°C pour différentes durées de temps. La réaction est suivie par CCM.

Après réaction, l'alcool formé est extrait par l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml) dans le cas où l'eau est utilisée comme solvant et (2x 100 ml) pour le glycérol, la phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) et concentrée sous vide.

## 4-Bioconversion de cétone avec les lots des levures :

### 4.1-Préparation des souches et méthode de recherche du micro-organisme en fonction de ses propriétés :

#### - Ensemencement des 12 souches à tester :

Les souches du laboratoire sont conservées à (-80°C) sous forme de suspension de spores ou de cellules dans du glycérol de 10% à 20%. Ces suspensions sont ensemencées dans des tubes de milieu YMS puis conservées à 27°C. Nous allons ensemencer 12 souches sélectionnées suite à une incubation des souches, puis un repiquage dans des tubes de 3 mL contenant du milieu YMS (le repiquage est aussi appelé : passage). Le milieu YMS est un milieu non sélectif, sa composition est riche et variée afin qu'un maximum de micro-organismes différents puisse être cultivés. Pour les Streptomyces, plus difficiles à cultiver, nous utilisons un milieu spécifique pour leur croissance. Avant l'ensemencement, nous avons préparé le milieu YMS (yeast maltsoy) grâce au protocole dans le tableau suivant :

Produits	Quantité pour 1L
Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Peptone	5 mL
Eau distillée	Qsp 1L

#### -Récupération de biomasse :

A cette étape, nous désirons récupérer la biomasse des 12 micro-organismes sans le milieu YMS. Après la filtration les micro-organismes ayant un gros volume, les champignons sont récupérés sous forme de billes de mycélium. Concernant les bactéries ou les micro-organismes unicellulaires, la récupération de la biomasse se fait par centrifugation.

### 4-2-Protocole de réduction des cétones avec la méthode combinatoire :

Premièrement, on dissout les biomasses obtenues dans 24 ml du tampon citrate à pH 7 pour les souches présentes dans 2 mélanges, et dans 12 ml de tampon citrate pour les souches présentes dans un seul mélange. Par la suite, et selon l'ordre énoncé dans le

tableau des souches, on répartit les souches dans 4 erlenmeyers de 100mL en déposant 4ml de chacune des suspensions constituant le mélange. Donc les mélanges comportant 5 souches auront tous un volume final de 20 ml (5x4).

Les 4 mélanges de 5 souches chacun sont réalisés 3 fois (pour tester 3 cétones à réduire pour chacun des 4 mélanges). Cela explique le volume de dissolution (4 ml dans 2 erlenmeyers trois fois (4x2=8x3=24 ml)). Après Nous allons mettre en contact la substance à tester : la cétone avec les micro-organismes : nous ajoutons la cétone à 1 g/L dans chaque erlenmeyer, et la dilution se fait dans l'isopropanol au préalable (0.080 g de cétone dans 800 L disopropanol).

Afin de suivre la réaction avec une CPG, il faut prendre des prélèvements de 1500 L de chaque erlenmeyer, ajouter de 500 L d'acétate d'éthyle, puis réaliser d'une centrifugation pendant 8 minutes de chaque prélèvement à 13 000 tours par minute.

### **5-Protocole de la réaction d'oxydo/réduction avec *R. buffoni* et *C. macerans* :**

Après des ensemencements des souches et la récupération des biomasses, nous les séparons dans quatre tubes de poids identiques pour les centrifuger. Puis nous les reprenons dans 20 ml de tampon phosphate de potassium Ph 7, nous ajoutons 20 mg d'acétophénone **1a** et on ajoute 20 ml de **2a** racémique pour la *C. macerans*, de même pour la *R. buffonii*.

Le suivi de la réaction se fait par une CPG chirale avec un prélèvement de 5 ml de chaque erlenmeyer additionné de 3 ml d'acétate d'éthyle, soumis à une centrifugation.

### **6-Protocole bioconversion d'acétophénone avec *R. buffoni* en fermenteur :**

Premièrement, on prépare une quantité de 500ml de culture de *R. buffoni* et on la place dans le fermenteur. Nous prenons **2g** de phényléthanol racémique **2a** en méthanol puis on l'introduit stérilement dans la cuve en verre du fermenteur. Nous fermons hermétiquement la cuve en verre avec 3 vis. Nous programmons les paramètres du fermenteur grâce à l'ordinateur. Nous programmons le pH à une valeur de 7, la température à 27 °C, une valeur pour laquelle la levure sera bien cultiver. Le moteur est réglé à 100 tours par minutes pour commencer à agiter doucement, puis la vitesse est augmentée jusqu'à 180

rpm. Par la suite, 40ml de glucose sont ajoutés en continu via le canal : c'est le substrat.

On a effectué les prélèvements en asepsie grâce à un système spécifique couplé au fermenteur pour suivre l'avancement de la manipulation.

### **7-Protocole réduction du Phényl-éthyl-cétone avec *P. minuta* et *R. turuloides* :**

La réduction de **1h** avec *P. minuta* et *R. turuloides* se fait après la préparation des souches par ensemencement puis récupération des biomasses selon le mode opératoire décrit précédemment. Par la suite, une quantité de **1h** est mise en contact avec les deux souches, l'avancement de la bioconversion se fait par l'analyse des prélèvements avec la CPG.

# Bibliographie

# Bibliographie

- [1] Ernest Ludwig Eliel and Samuel H Wilen. 2008.
- [2] Steven M Southwick, J Douglas Bremner, Ann Rasmusson, Charles A Morgan, Amy Arnsten, and Dennis S Charney. *Biological psychiatry*, 46(9) :1192–1204, 1999.
- [3] William H Frishman. *New England Journal of Medicine*, 305(9) :500–506, 1981.
- [4] EJ Corey, John O Link, and Yang Shao. *Tetrahedron letters*, 33(24) :3435–3438, 1992.
- [5] Sataro Miyano, Linda DL Lu, Steven M Viti, and K Barry Sharpless. *The Journal of Organic Chemistry*, 48(20) :3608–3611, 1983.
- [6] R Andrisano, AS Angeloni, and S Marzocchi. *Tetrahedron*, 29(6) :913–916, 1973.
- [7] Gensheng Yang, Zhimin Ou, Shanjing Yao, and Jiangyan Xu. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 57(1) :83–88, 2009.
- [8] André Collet, Jeanne Crassous, Jean-Pierre Dutasta, and Laure Guy. *Molécules chirales : stéréochimie et propriétés*. 2006.
- [9] Jean-Pierre Jolivet and Marc Henry. *De la solution à l'oxyde-Condensation des cations en solution aqueuse. Chimie de surface des oxyde*. 2012.
- [10] FJ Plou, MA Cruces, M Bernabe, M MARTIN-LOMAS, JL Parra, and A Ballesteros. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 750(1) :332–337, 1995.
- [11] FJ Plou, MA Cruces, M Bernabe, M MARTIN-LOMAS, JL Parra, and A Ballesteros. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 750(1) :332–337, 1995.
- [12] Yeong Min Sin, Ki Woong Cho, and Tae Ho Lee. *Biotechnology letters*, 20(1) :91–94, 1998.
- [13] Salvator Piccicuto, Christophe Blecker, Jean-Christophe Brohée, Aimée Mbampara, Georges Lognay, Claude Deroanne, Michel Paquot, and Michel Marlier. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 5(4) :209–219, 2001.
- [14] Tamio Hayashi, Yonetatsu Matsumoto, and Yoshihiko Ito. *Journal of the American Chemical Society*, 111(9) :3426–3428, 1989.

- [15] Klaus Hinterding and Eric N Jacobsen. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(7) :2164–2165, 1999.
- [16] Alain Krief and Catherine Colaux-Castillo. *Pure and applied chemistry*, 74(1) :107–113, 2002.
- [17] H. Guo.; D. Liu.; N. A. Butt.; Y. Liu.; W. Zhang. *Tetrahedron*, 68(1) :3295–3299, 2012.
- [18] Xiaoming Tao, Wanfang Li, Xin Ma, Xiaoming Li, Weizheng Fan, Xiaomin Xie, Tahar Ayad, Virginie Ratovelomanana-Vidal, and Zhaoguo Zhang. *The Journal of organic chemistry*, 77(1) :612–616, 2011.
- [19] Tülay Yıldız and Ayşe Yusufoglu. *Tetrahedron : Asymmetry*, 21(24) :2981–2987, 2010.
- [20] EJ Corey, Raman K Bakshi, Saizo Shibata, Chung Pin Chen, and Vinod K Singh. *Journal of the American Chemical Society*, 109(25) :7925–7926, 1987.
- [21] Nicholas J Turner. *Trends in biotechnology*, 21(11) :474–478, 2003.
- [22] Felicitas Lerner, Marc Niere, Antje Ludwig, and Mathias Ziegler. *Biochemical and biophysical research communications*, 288(1) :69–74, 2001.
- [23] Hilde Willekens, Dirk Inzé, Marc Van Montagu, and Wim Van Camp. *Molecular Breeding*, 1(3) :207–228, 1995.
- [24] Yoon Kyung Choi, Jong Hwa Suh, Donghyun Lee, In Taek Lim, Jae Yoon Jung, and Mahn-Joo Kim. *The Journal of organic chemistry*, 64(22) :8423–8424, 1999.
- [25] Laura Ancuta Pop. *Synthèse stéréosélective d'hétéroaryl alcools et alanines*. PhD thesis, INSA de Rouen ; Universitatea Babeş-Bolyai (Cluj-Napoca, Roumanie), 2011.
- [26] E. Mundorff.; D. E. Vries. *U.S. Patent*, 126(1) :37–40, 2013.
- [27] Bartholomeu A Barros-Filho, Fátima M Nunes, F Maria da Conceição, Telma LG Lemos, Marcos C de Mattos, Gonzalo de Gonzalo, Vicente Gotor-Fernández, and Vicente Gotor. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 65(1) :37–40, 2010.
- [28] Xiang Liu, Zheng Guang Pan, Jian He Xu, and He Xing Li. *Chinese Chemical Letters*, 21(3) :305–308, 2010.
- [29] JS Yadav, P Thirupathi Reddy, S Nanda, and A Bhaskar Rao. *Tetrahedron : Asymmetry*, 12(24) :3381–3385, 2002.
- [30] Francisco Felipe Maia da Silva, Daniele Alves Ferreira, Francisco José Queiroz Monte, Marcos Carlos de Mattos, and Telma Leda Gomes de Lemos. *Industrial Crops and Products*, 84 :22–27, 2016.

- [31] Zhuotao Tan, Hongmin Ma, Qing Li, Lingling Pu, Yang Cao, Xudong Qu, Chenjie Zhu, and Hanjie Ying. *Enzyme and Microbial Technology*, 93 :191–199, 2016.
- [32] Guogang Zhao, Wanru Sun, and Jianjun Wang. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(6) :648–651, 2015.
- [33] Xi Chen, Qiaqing Wu, and Dunming Zhu. *Process Biochemistry*, 50(5) :759–770, 2015.
- [34] Mustapha Zaher. *Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands*. PhD thesis, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2010.
- [35] K Zwingenberger and S Wnendt. *Journal of inflammation*, 46(4) :177–211, 1994.
- [36] PF D'arcy and JP Griffin. *Adverse drug reactions and toxicological reviews*, 13(2) :65–76, 1993.
- [37] William Griffith McBride. *The Lancet*, 278(7216) :1358, 1961.
- [38] Y Fulmer Shealy, Clyde E Opliger, and John A Montgomery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 57(5) :757–764, 1968.
- [39] H Ockenfels and F Köhler. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 26(11) :1236–1237, 1970.
- [40] Christopher J Mitchell, Anne E Nelson, Mark J Cowley, Warren Kaplan, Glenn Stone, Selina K Sutton, Amie Lau, Carol MY Lee, and Ken KY Ho. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(12) :4703–4709, 2009.
- [41] W Lindner, M Rath, K Stoschitzky, and HJ Semmelrock. *Chirality*, 1(1) :10–13, 1989.
- [42] Yusaku Iwasaki, Manabu Tanabe, Kenji Kobata, and Tatsuo Watanabe. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(10) :2608–2614, 2008.
- [43] Mehdi Oualha, Mikaël Capelo, Odile Spreux-Varoquaux, Isabelle Drouet-Chaillou, Jean-Marc Tréluyer, Philippe Hubert, and Fabrice Lesage. *European journal of pediatrics*, 173(1) :69–73, 2014.
- [44] John A Myburgh, Alisa Higgins, Alina Jovanovska, Jeffrey Lipman, Naresh Ramakrishnan, John Santamaria, CAT Study Investigators, et al. *Intensive care medicine*, 34(12) :2226, 2008.
- [45] Mustapha Zaher. *Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands*. PhD thesis, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2010.
- [46] Michael Kofink, Menelaos Papagiannopoulos, and Rudolf Galensa. *Molecules*, 12(7) :1274–1288, 2007.

- [47] Harsh Pal Bais, Travis S Walker, Frank R Stermitz, Ruth A Hufbauer, and Jorge M Vivanco. *Plant Physiology*, 128(4) :1173–1179, 2002.
- [48] Judy Huang, David B Agus, Christopher J Winfree, Szilard Kiss, William J Mack, Ryan A McTaggart, Tanvir F Choudhri, Louis J Kim, J Mocco, David J Pinsky, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20) :11720–11724, 2001.
- [49] André Scheen and Jean-Christophe Philips. *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète*, (avril 2009) :2–7, 2009.
- [50] Michel Hautefeuille and Dan Véléa. *Les drogues de synthèse*. 2002.
- [51] Denis Richard. *Dictionnaire des drogues et des dépendances*. 2005.
- [52] Rodney B Croteau, Edward M Davis, Kerry L Ringer, and Mark R Wildung. *Naturwissenschaften*, 92(12) :562, 2005.
- [53] William A Prescott and Kristen A Kusmierski. *Pharmacotherapy : The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 27(1) :137–141, 2007.
- [54] Richard Wolfenden and Mark J Snider. *Accounts of chemical research*, 34(12) :938–945, 2001.
- [55] RMC Dawson, DC Elliot, WH Elliot, and KM Jones. *Data for Biochemical Research*. Oxford University Press, New York, 507, 1969.
- [56] HOUIENE Zahia. *Nouveaux procédés de synthèse énantiosélective de alcools biologiquement actifs par catalyse enzymatique*. PhD thesis, 2013.
- [57] Jaybir Singh, Ashish Bhatt, Ravi Kant, and Pramod Kumar Chauhan. *Chemistry & Biology*, 1(1) :68–78, 2011.
- [58] U Behnke. *Molecular Nutrition & Food Research*, 30(7) :738–738, 1986.
- [59] Eduard Torrents, Patrick Aloy, Isidre Gibert, and Francisco Rodríguez-Trelles. *Journal of molecular evolution*, 55(2) :138–152, 2002.
- [60] Stephen J Elledge, Zheng Zhou, and James B Allen. *Trends in biochemical sciences*, 17(3) :119–123, 1992.
- [61] EE Wollman, L d’Auriol, L Rimsky, A Shaw, JP Jacquot, P Wingfield, P Graber, F Dessarps, P Robin, and F Galibert. *Journal of Biological Chemistry*, 263(30) :15506–15512, 1988.
- [62] Masoud Ghorbani, Thomas H Claus, and Jean Himms-Hagen. *Biochemical pharmacology*, 54(1) :121–131, 1997.
- [63] Nobuyuki Tanaka, Tetsuro Tamai, Harunobu Mukaiyama, Akihito Hirabayashi, Hideyuki Muranaka, Takehiro Ishikawa, Junichi Kobayashi, Satoshi Akahane, and Masuo Akahane. *Journal of medicinal chemistry*, 46(1) :105–112, 2003.

- [64] Ramesh N Patel, Amit Banerjee, Linda Chu, David Brozozowski, Venkata Nanduri, and Laszlo J Szarka. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(11) :1473–1482, 1998.
- [65] Joel C Barrish, Eric Gordon, Masud Alam, Pin-Fang Lin, Gregory S Bisacchi, Ping Chen, Peter TW Cheng, Alan W Fritz, and Jill A Greytok. *Journal of medicinal chemistry*, 37(12) :1758–1768, 1994.
- [66] Ramesh N Patel, Amit Banerjee, Clyde G McNamee, David B Brzozowski, and Laszlo J Szarka. *Tetrahedron : Asymmetry*, 8(15) :2547–2552, 1997.
- [67] SY Sit, RA Parker, I Motoc, W Han, N Balasubramanian, JD Catt, PJ Brown, William E Harte, MD Thompson, and JJ Wright. *Journal of medicinal chemistry*, 33(11) :2982–2999, 1990.
- [68] Ramesh N Patel, Amit Banerjee, Clyde G McNamee, David Brzozowski, Ronald L Hanson, and Laszlo J Szarka. *Enzyme and microbial technology*, 15(12) :1014–1021, 1993.
- [69] Ramesh N Patel, Amit Banerjee, Jeffrey M Howell, Clyde G McNamee, David Brozozowski, David Mirfakhrae, Venkat Nanduri, John K Thottathil, and Laszlo J Szarka. *Tetrahedron : Asymmetry*, 4(9) :2069–2084, 1993.
- [70] A Banerjee, Ko RY, Howell JM, Li WS, and Partyka RA. *Biotechnology and applied biochemistry*, 20(1) :23–33, 1994.
- [71] Ramesh N Patel. *Biocatalysis and Bioenergy*, pages 319–353, 2008.
- [72] Joseph P Yevich, James S New, Walter G Lobeck, Pierre Dextraze, Edith Bernstein, Duncan P Taylor, Frank D Yocca, Michael S Eison, and Davis L Temple Jr. *Journal of medicinal chemistry*, 35(24) :4516–4525, 1992.
- [73] Ramesh N Patel. *Biocatalysis and Bioenergy*, pages 319–353, 2008.
- [74] Ramesh Patel, Linda Chu, Venkata Nanduri, Jianqing Li, Atul Kotnis, William Parker, Mark Liu, and Richard Mueller. *Tetrahedron : Asymmetry*, 16(16) :2778–2783, 2005.
- [75] Steven L Goldberg, Venkata B Nanduri, Linda Chu, Robert M Johnston, and Ramesh N Patel. *Enzyme and microbial technology*, 39(7) :1441–1450, 2006.
- [76] Brett S Robinson, Keith A Riccardi, Yi-fei Gong, Qi Guo, David A Stock, Wade S Blair, Brian J Terry, Carol A Deminie, Fred Djang, Richard J Colonna, et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(8) :2093–2099, 2000.
- [77] Ramesh N Patel, Linda Chu, and Richard Mueller. *Tetrahedron : Asymmetry*, 14(20) :3105–3109, 2003.
- [78] Ramesh N Patel. *Biocatalysis and Bioenergy*, pages 319–353, 2008.

- [79] Zhongmin Xu, Janak Singh, Mark D Schwinden, Bin Zheng, Thomas P Kissick, Bharat Patel, Michael J Humora, Fernando Quiroz, Lin Dong, Dau-Ming Hsieh, et al. *Organic process research & development*, 6(3) :323–328, 2002.
- [80] LS Zalman, MA Brothers, PS Dragovich, R Zhou, TJ Prins, ST Worland, and AK Patick. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(5) :1236–1241, 2000.
- [81] Peter S Dragovich, Thomas J Prins, Ru Zhou, Stephen E Webber, Joseph T Marakovits, Shella A Fuhrman, Amy K Patick, David A Matthews, Caroline A Lee, Clifford E Ford, et al. *Journal of medicinal chemistry*, 42(7) :1213–1224, 1999.
- [82] Junhua Tao and Kevin McGee. *Organic process research & development*, 6(4) :520–524, 2002.
- [83] VB Nanduri, A Banerjee, JM Howell, DB Brzozowski, RF Eiring, and RN Patel. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 25(3) :171–175, 2000.
- [84] CVC Prasad, Shikha Vig, David W Smith, Qi Gao, Craig T Polson, Jason A Corsa, Valerie L Guss, Alice Loo, Donna M Barten, Ming Zheng, et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(13) :3535–3538, 2004.
- [85] Dale Schenk, Dora Games, and Peter Seubert. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17(2) :259–267, 2001.
- [86] CVC Prasad, Shikha Vig, David W Smith, Qi Gao, Craig T Polson, Jason A Corsa, Valerie L Guss, Alice Loo, Donna M Barten, Ming Zheng, et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(13) :3535–3538, 2004.
- [87] Ramesh N Patel, Animesh Goswami, Linda Chu, Mary Jo Donovan, Venkata Nanduri, Steven Goldberg, Robert Johnston, Prasad J Siva, Brent Nielsen, Junying Fan, et al. *Tetrahedron : Asymmetry*, 15(8) :1247–1258, 2004.
- [88] Pedro Joel Rodrigues da Costa. *Fluxos de mineralização e lixiviação de azoto em chorume tratado aplicado ao solo*. PhD thesis, 2016.
- [89] DE LA SANTÉ DU RÉSEAU. Guide de gestion des déchets. 2017.
- [90] Marie Cousin. Le gaspillage alimentaire : un désastre non seulement économique et écologique, mais également éthique, 2012.
- [91] Joel Sotamenou. *Efficacité de la collecte des déchets ménagers et agriculture urbaine et périurbaine dans la ville de Yaoundé*. 2005.
- [92] Edward Giovannucci, Eric B Rimm, Yan Liu, Meir J Stampfer, and Walter C Willett. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(5) :391–398, 2002.
- [93] Edward Giovannucci, Alberto Ascherio, Eric B Rimm, Meir J Stampfer, Graham A Colditz, and Walter C Willett. *Journal of the national cancer institute*, 87(23) :1767–1776, 1995.

- [94] Omer Kucuk, Fazlul H Sarkar, Wael Sakr, Zora Djuric, Michael N Pollak, Fred Khachik, Yi-Wei Li, Mousumi Banerjee, David Grignon, John S Bertram, et al. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(8) :861–868, 2001.
- [95] Kurt Faber. *Biotransformations in organic chemistry : a textbook*. 2011.
- [96] Per Berglund. *ChemBioChem*, 7(8) :1280–1280, 2006.
- [97] Fabien Deswarte. *Introduction to chemicals from biomass*. 2015.
- [98] Yoon Lin Chiew, Johanna Spångberg, Andras Baky, Per-Anders Hansson, and Håkan Jönsson. *Resources, Conservation and Recycling*, 95 :1–14, 2015.
- [99] Fabio Fava, Grazia Totaro, Ludo Diels, Maria Reis, Jose Duarte, Osvaldo Beserra Carioca, Héctor M Poggi-Varaldo, and Bruno Sommer Ferreira. *New biotechnology*, 32(1) :100–108, 2015.
- [100] Tomoko Matsuda, Rio Yamanaka, and Kaoru Nakamura. *Tetrahedron : Asymmetry*, 20(5) :513–557, 2009.
- [101] Kurt Faber. *Biotransformations in organic chemistry : a textbook*. 2011.
- [102] Bibiana Cercado Quezada. *Traitement de déchets issus de l'industrie agro-alimentaire par pile à combustible microbienne*. PhD thesis, 2009.
- [103] Giovanna Boschin, Graziana Maria Scigliuolo, Donatella Resta, and Anna Arnoldi. *Food chemistry*, 145 :34–40, 2014.
- [104] Karlheinz Drauz. *Enzyme catalysis in organic synthesis : a comprehensive handbook*. 2012.
- [105] Manfred T Reetz. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34) :12480–12496, 2013.
- [106] Yan Ni and Jian-He Xu. *Biotechnology advances*, 30(6) :1279–1288, 2012.
- [107] Sinéad E Milner and Anita R Maguire. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. 2012.
- [108] Katja Goldberg, Kirsten Schroer, Stephan Lütz, and Andreas Liese. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(2) :249–255, 2007.
- [109] Frank Hollmann, Isabel WCE Arends, and Dirk Holtmann. *Green Chemistry*, 13(9) :2285–2314, 2011.
- [110] Katja Goldberg, Kirsten Schroer, Stephan Lütz, and Andreas Liese. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(2) :237, 2007.
- [111] Iwona A Kaluzna, Tomoko Matsuda, Aileen K Sewell, and Jon D Stewart. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40) :12827–12832, 2004.
- [112] Charis M Galanakis. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2) :68–87, 2012.

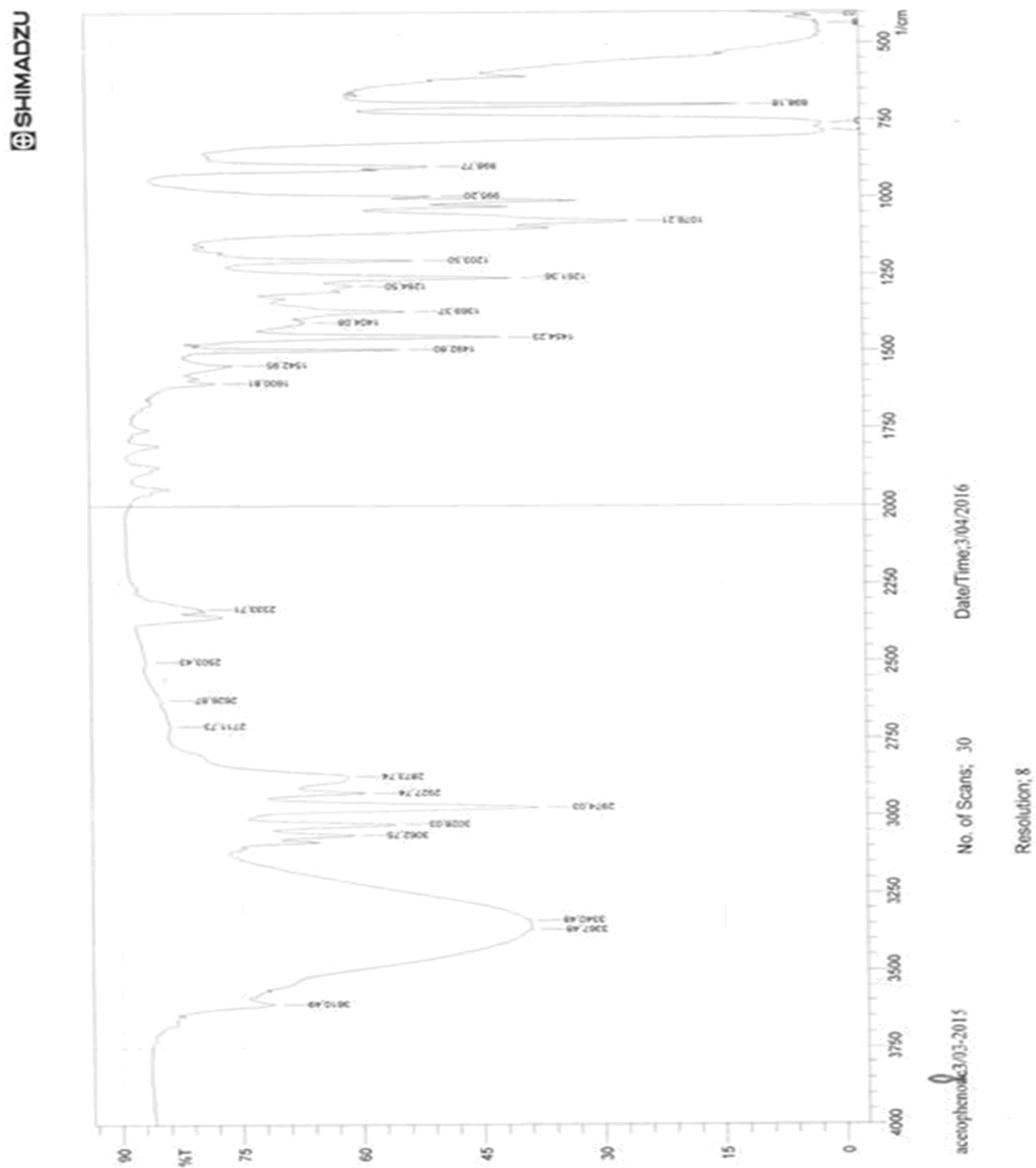
- [113] Aleksey Zaks and Alexander M Klibanov. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17) :8017–8021, 1988.
- [114] Roman V Rariy and Alexander M Klibanov. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25) :13520–13523, 1997.
- [115] Wolfgang Kroutil, Harald Mang, Klaus Edegger, and Kurt Faber. *Current opinion in chemical biology*, 8(2) :120–126, 2004.
- [116] Charis M Galanakis. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2) :68–87, 2012.
- [117] Apostolis A Koutinas, Anestis Vlysidis, Daniel Pleissner, Nikolaos Kopsahelis, Isabel Lopez Garcia, Ioannis K Kookos, Seraphim Papanikolaou, Tsz Him Kwan, and Carol Sze Ki Lin. *Chemical Society Reviews*, 43(8) :2587–2627, 2014.
- [118] Patrícia Melchionna Albuquerque, Maria Alice Witt, Boris Ugarte Stambuk, and Maria da Graça Nascimento. *Process Biochemistry*, 42(2) :141–147, 2007.
- [119] Melanie K Johns, Andrew J Smallridge, and Maurie A Trehwella. *Tetrahedron Letters*, 42(25) :4261–4262, 2001.
- [120] Leonard Y Jayasinghe, Andrew J Smallridge, and Maurie A Trehwella. *Tetrahedron Letters*, 34(24) :3949–3950, 1993.
- [121] Adi Wolfson, Christina Dlugy, Dorith Tavor, Janine Blumenfeld, and Yoram Shotland. *Tetrahedron : Asymmetry*, 17(14) :2043–2045, 2006.
- [122] Iwona A Kaluzna, Tomoko Matsuda, Aileen K Sewell, and Jon D Stewart. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40) :12827–12832, 2004.
- [123] Adi Wolfson, Nisim Haddad, Chrstina Dlugy, Dorith Tavor, and Yoram Shotland. *Organic Communications*, 1(2) :9, 2008.
- [124] K Phukan and N Devi. *Int J Chem Tech Research*, 4 :203–207, 2012.
- [125] Xu Chang, YANG Zhonghua, ZENG Rong, YANG Gai, and YAN Jiabao. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(6) :1029–1033, 2010.
- [126] Xu Chang, YANG Zhonghua, ZENG Rong, YANG Gai, and YAN Jiabao. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(6) :1029–1033, 2010.
- [127] F Baldassarre, G Bertoni, C Chiappe, and F Marioni. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 11(1) :55–58, 2000.
- [128] Vanessa Dutra Silva, Jeferson Schneider Carletto, Eduardo Carasek, Boris Ugarte Stambuk, and Maria da Graça Nascimento. *Process Biochemistry*, 48(8) :1159–1165, 2013.
- [129] Adi Wolfson, Christina Dlugy, Dorith Tavor, Janine Blumenfeld, and Yoram Shotland. *Tetrahedron : Asymmetry*, 17(14) :2043–2045, 2006.

- [130] Lian Peng Tong, Jing Nan Cui, Wei Min Ren, Xing Yong Wang, and Xu Hong Qian. *Chinese Chemical Letters*, 19(10) :1179–1182, 2008.
- [131] Xu Chang, YANG Zhonghua, ZENG Rong, YANG Gai, and YAN Jiabao. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(6) :1029–1033, 2010.
- [132] Ryoji Noyori, Masato Kitamura, and Takeshi Ohkuma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15) :5356–5362, 2004.
- [133] HU Blaser, F Spindler, and M Studer. *Applied Catalysis A : General*, 221(1) :119–143, 2001.
- [134] Alba E Díaz-Álvarez, Javier Francos, Pascale Croche, and Victorio Cadierno. *Current Green Chemistry*, 1(1) :51–65, 2014.
- [135] Wenjun Tang and Xumu Zhang. *Chemical Reviews*, 103(8) :3029–3070, 2003.
- [136] Jun-ichi Matsuo, Yu Hattori, Mio Hashizume, and Hiroyuki Ishibashi. *Tetrahedron*, 66(32) :6062–6069, 2010.
- [137] Yasuhiro Kawanami, Yudai Mikami, Katsuhiko Hoshino, Mikiko Suzue, and Izumi Kajihara. *Chemistry letters*, 38(7) :722–723, 2009.
- [138] Wen Zhang, Ye Ni, Zhihao Sun, Pu Zheng, Wenqing Lin, Po Zhu, and Nianfeng Ju. *Process Biochemistry*, 44(11) :1270–1275, 2009.
- [139] Anju Chadha, Sowmyalakshmi Venkataraman, Radhakrishnan Preetha, and Santosh Kumar Padhi. *Bioorganic Chemistry*, 68 :187–213, 2016.
- [140] Bin Li, Yao Nie, Xiao Qing Mu, and Yan Xu. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 129 :21–28, 2016.
- [141] Roland Wohlgemuth. *Current opinion in microbiology*, 13(3) :283–292, 2010.
- [142] Tomoko Matsuda, Rio Yamanaka, and Kaoru Nakamura. *Tetrahedron : Asymmetry*, 20(5) :513–557, 2009.
- [143] Deepali B Magadum and Ganapati D Yadav. *Biochemical Engineering Journal*, 122 :152–158, 2017.
- [144] Osama El-Sepelgy, Aleksandra Brzozowska, and Magnus Rueping. *ChemSusChem*, 10(8) :1664–1668, 2017.
- [145] Yu-Guo Zheng, Huan-Huan Yin, Dao-Fu Yu, Xiang Chen, Xiao-Ling Tang, Xiao-Jian Zhang, Ya-Ping Xue, Ya-Jun Wang, and Zhi-Qiang Liu. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pages 1–15, 2017.
- [146] Ya-Ping Xue, Hao Zeng, Xiao-Lu Jin, Zhi-Qiang Liu, and Yu-Guo Zheng. *Microbial Cell Factories*, 15(1) :162, 2016.

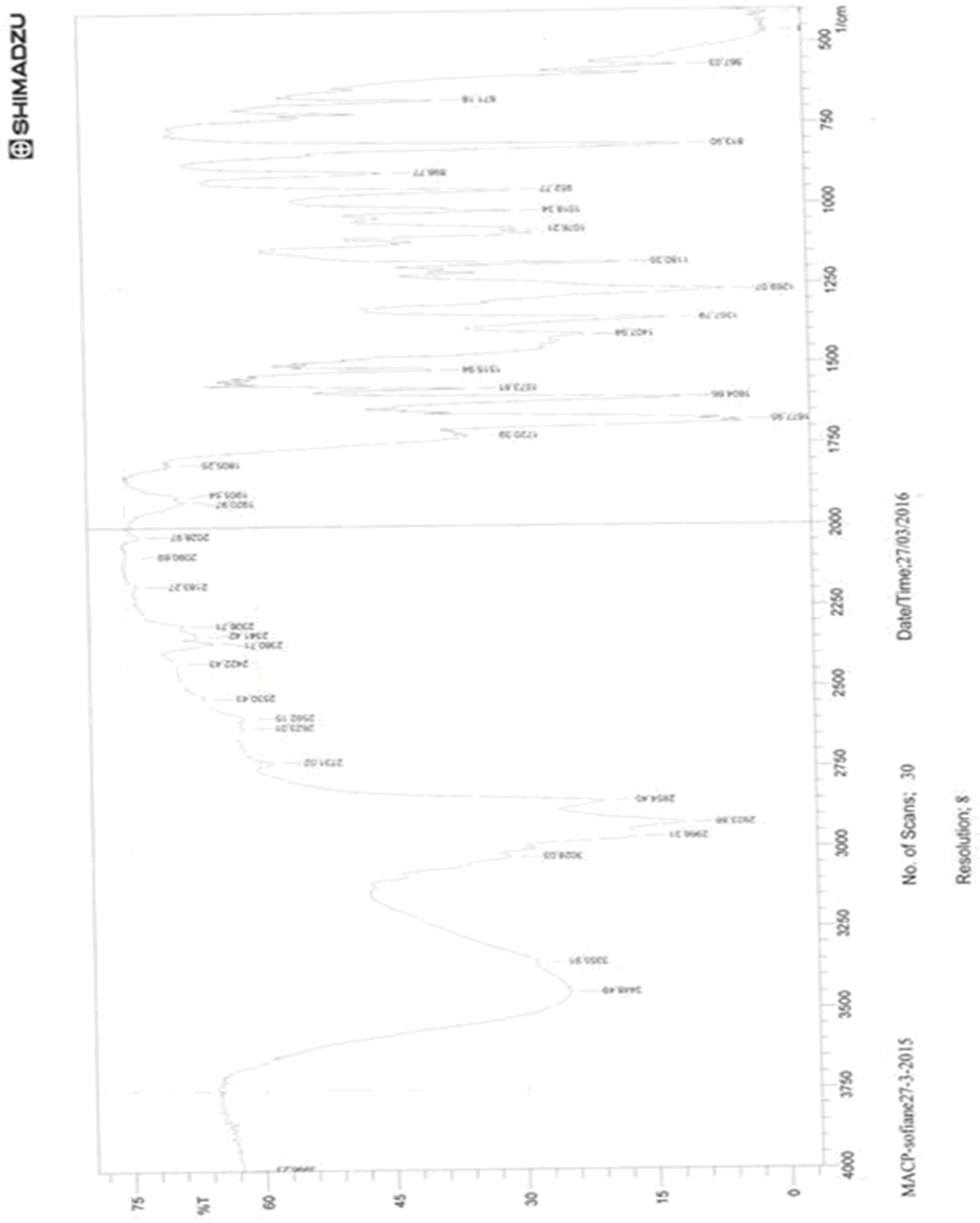
- [147] Ibrahim Karume, Musa M Musa, Odey Bsharat, Masateru Takahashi, Samir M Hamdan, and Bassam El Ali. *RSC Advances*, 6(99) :96616–96622, 2016.
- [148] Bernd Jandeleit, Dieter J Schaefer, Timothy S Powers, Howard W Turner, and W Henry Weinberg. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(17) :2494–2532, 1999.
- [149] Manfred T Reetz. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(2) :284–310, 2001.
- [150] Philip F Hughes, Thomas H Graham, and Jose S Mendoza. *Journal of combinatorial chemistry*, 6(3) :308–311, 2004.
- [151] Ana Cristina Abreu, Maria José Saavedra, Lúcia C Simões, and Manuel Simões. *Biofouling*, 32(9) :1103–1114, 2016.
- [152] Netta Nir, Moran Bahalul, Roi Feingersch, Tal Katz-Ezov, Yechezkel Kashi, and Ayelet Fishman. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(4) :659–667, 2008.
- [153] Jihye Jung, Seongsoon Park, and Hyung Kwoun Kim. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 84 :15–21, 2012.
- [154] Christian Heiss, Maris Laivenieks, J Gregory Zeikus, and Robert S Phillips. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(7) :1659–1666, 2001.
- [155] José D Carballeira, Emilio Alvarez, Mercedes Campillo, Leonardo Pardo, and Jose V Sinisterra. *Tetrahedron : Asymmetry*, 15(6) :951–962, 2004.
- [156] Axel D Becke. *The Journal of chemical physics*, 98(7) :5648–5652, 1993.
- [157] MJ Frisch, GW Trucks, HB Schlegel, GE Scuseria, MA Robb, JR Cheeseman, G Scalmani, V Barone, B Mennucci, GA Petersson, et al. Gaussian 09, revision d. 01, 2009.
- [158] Roy Dennington, Todd Keith, John Millam, et al. Gaussview, version 5. *Semichem Inc., Shawnee Mission, KS*, 2009.
- [159] Donald A McQuarrie and JDS Physical Chemistry. *A molecular approach*. 1997.
- [160] Henry Eyring. *Journal of the American Chemical Society*, 53(7) :2537–2549, 1931.
- [161] JW Peters. *Science*, 282 :1853–1858, 1998.
- [162] Erik FJ de Vries, Johannes Brussee, Chris G Knise, and Arne Van der Gen. *Tetrahedron : Asymmetry*, 5(3) :377–386, 1994.

# Annexe

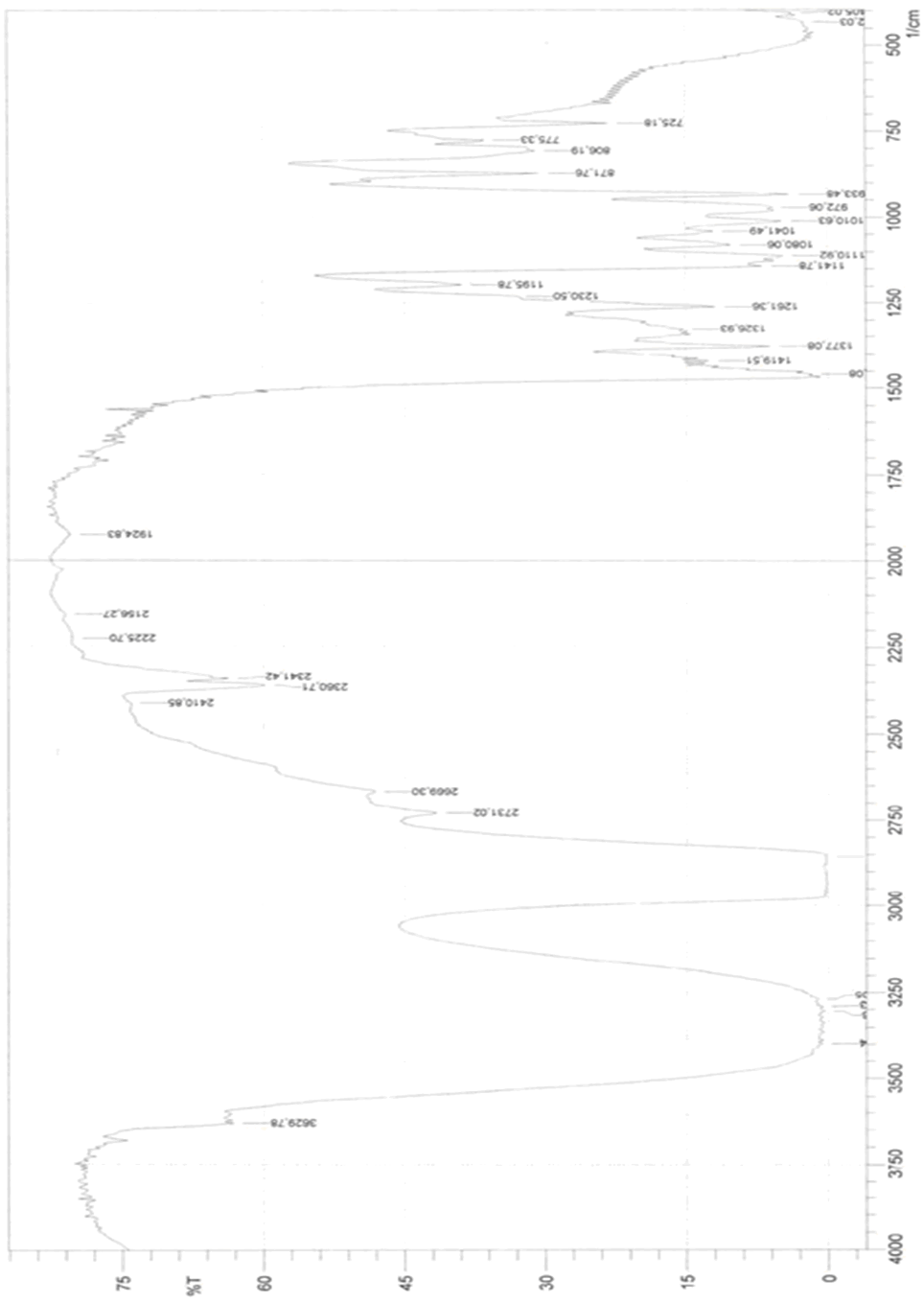
- Les spectres infrarouge



Le spectre infrarouge de 2a



Le spectre infrarouge de 2b

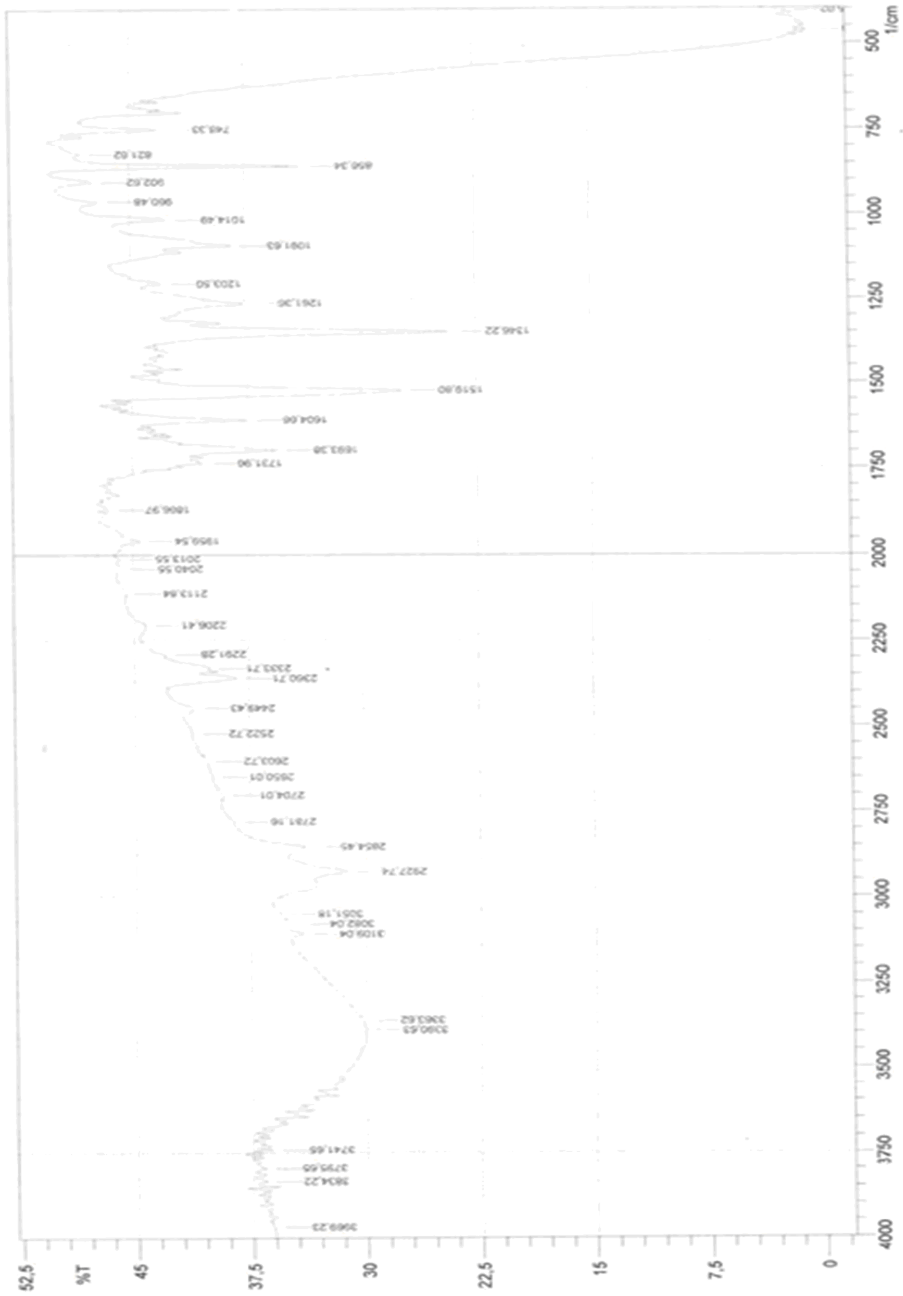


octanol-3/03-2016 No. of Scans: 30 Date/Time: 3/04/2016

Resolution: 8

Le spectre infrarouge de **2c**

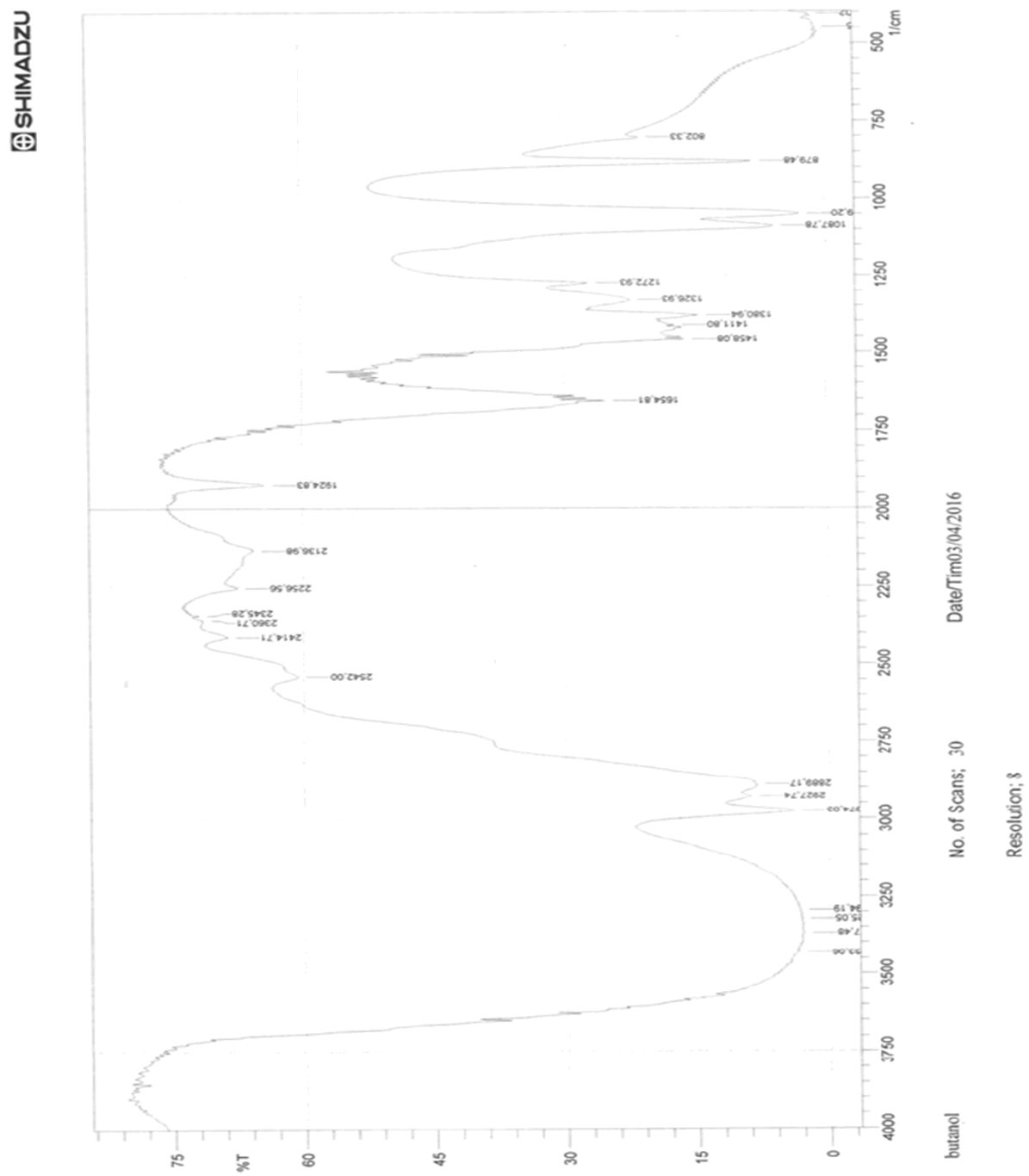
SHIMADZU



NACP-03-4-2016 No. of Scans: 30 Date/Time:03/04/2016

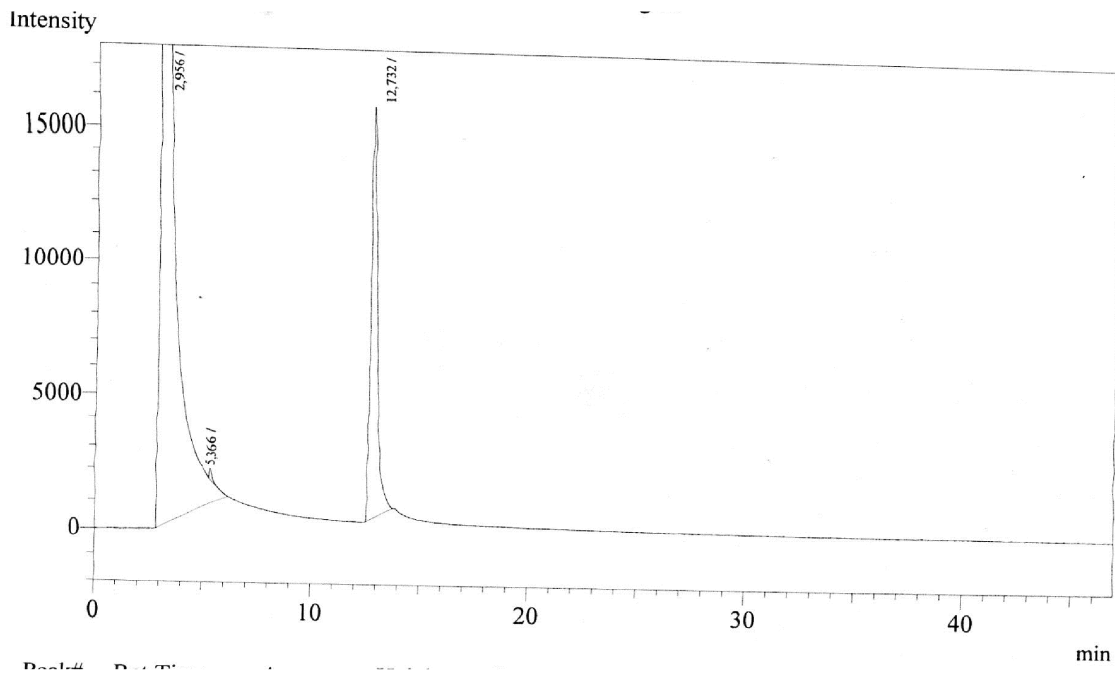
Resolution: 8

Le spectre infrarouge de 2d



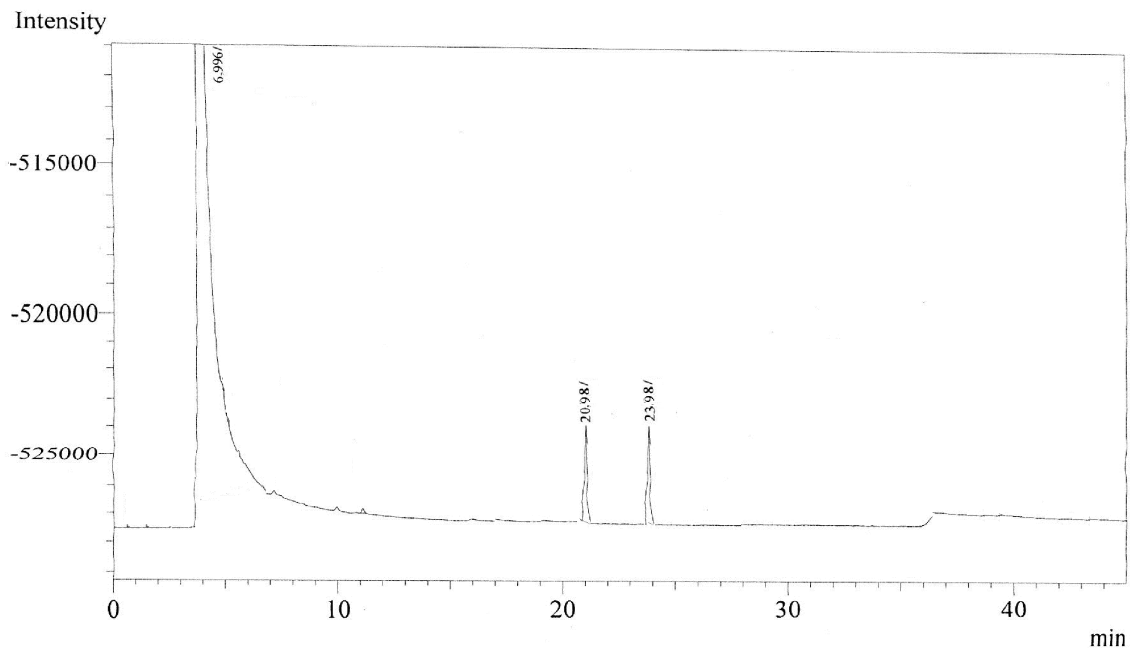
Le spectre infrarouge de **2e**

Le chromatogramme de **1a** :

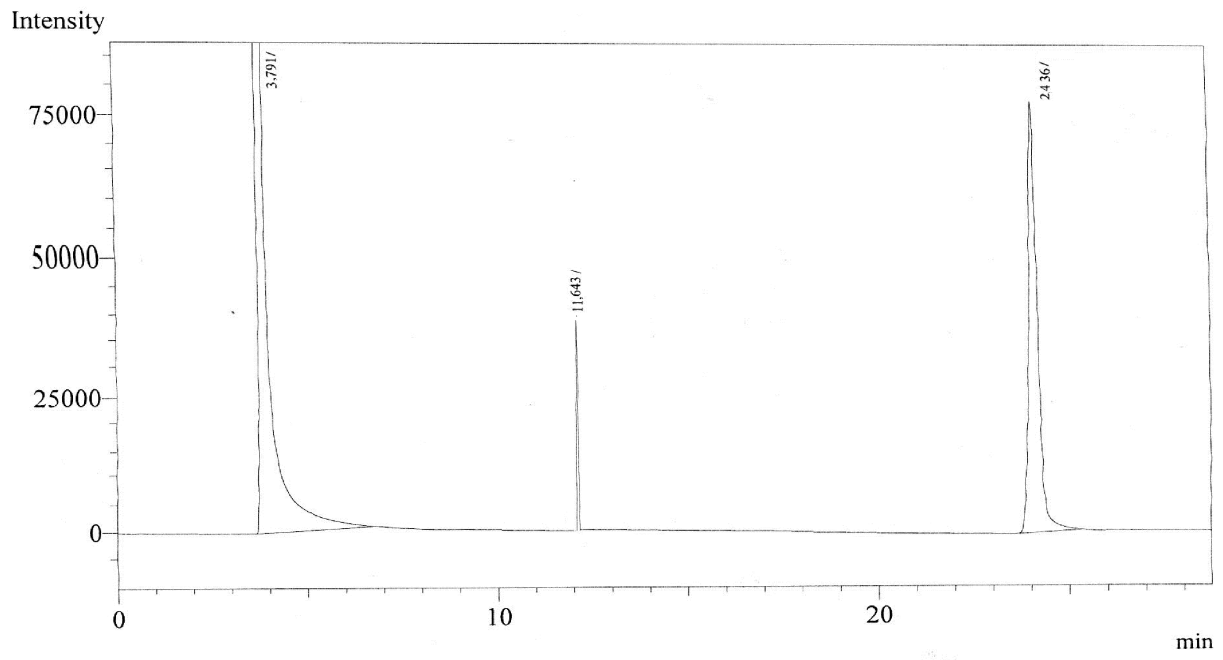


Les chromatogrammes de la réduction de **1a** :

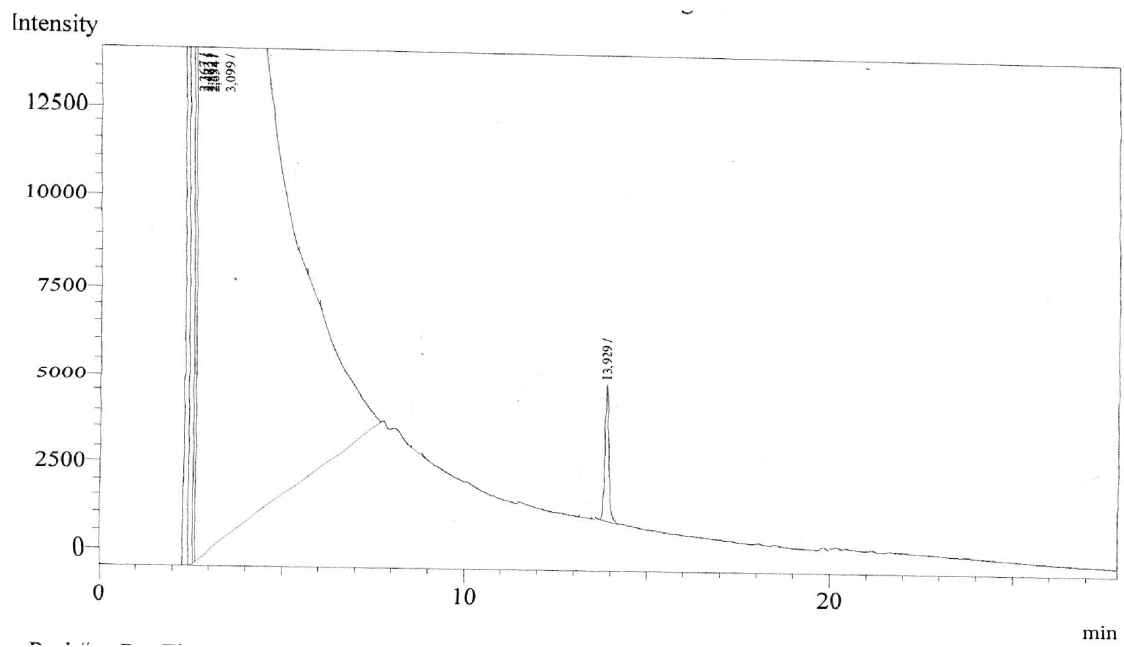
- Avec le NaBH<sub>4</sub> :



- Avec le *Lycopersicon esculentum* Mill dans le glycérol :

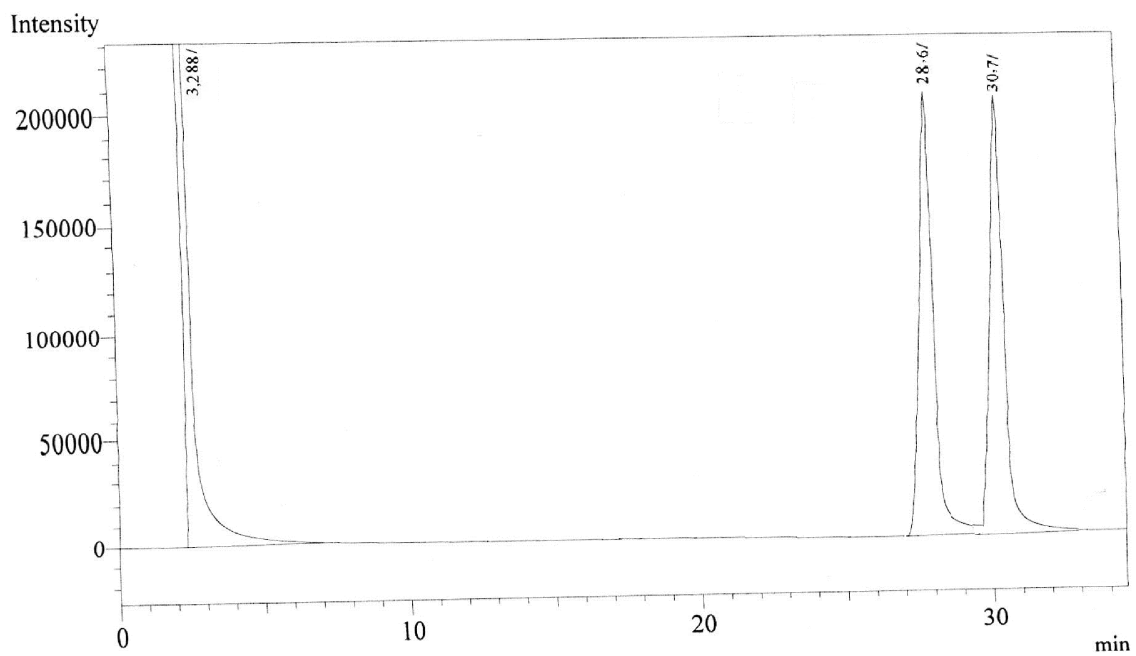


Le chromatogramme de **1b** :

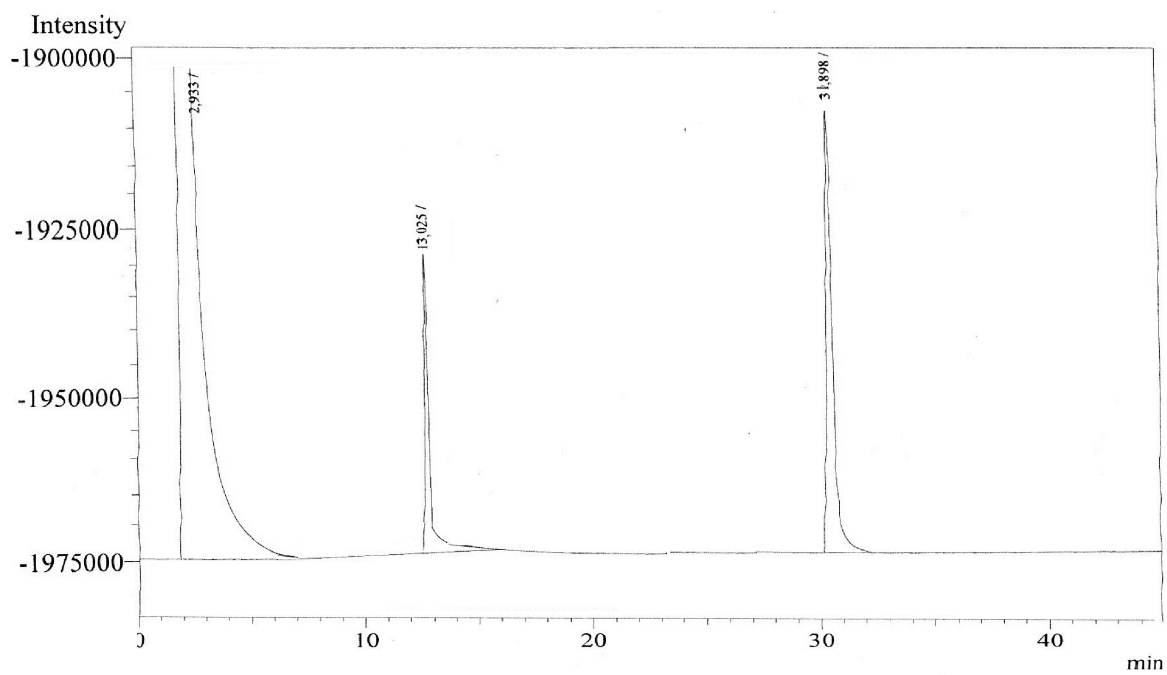


Les chromatogrammes de la réduction de **2b** :

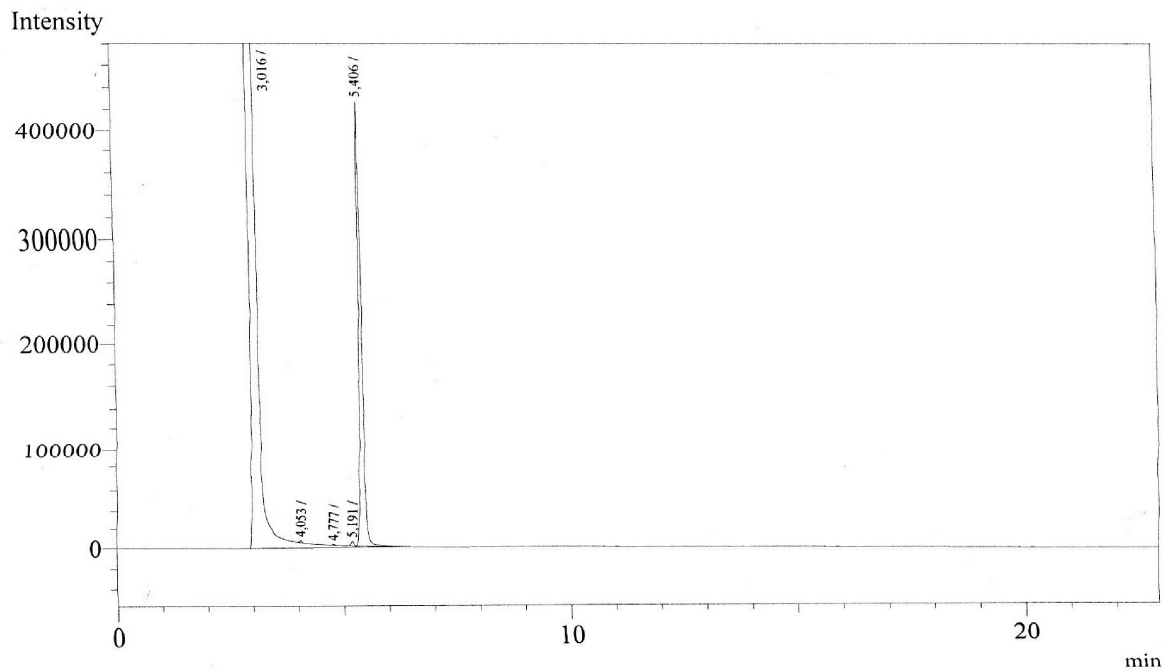
- Avec le NaBH<sub>4</sub> :



- Avec le Daucus carota L dans l'eau :

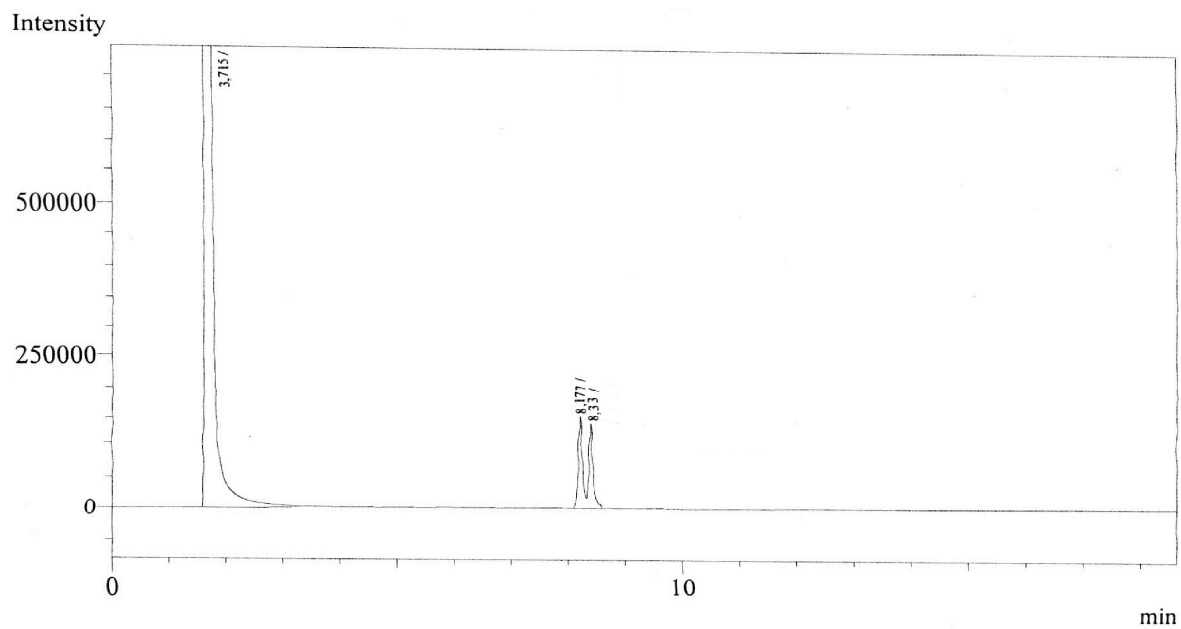


Le chromatogramme de **1c** :

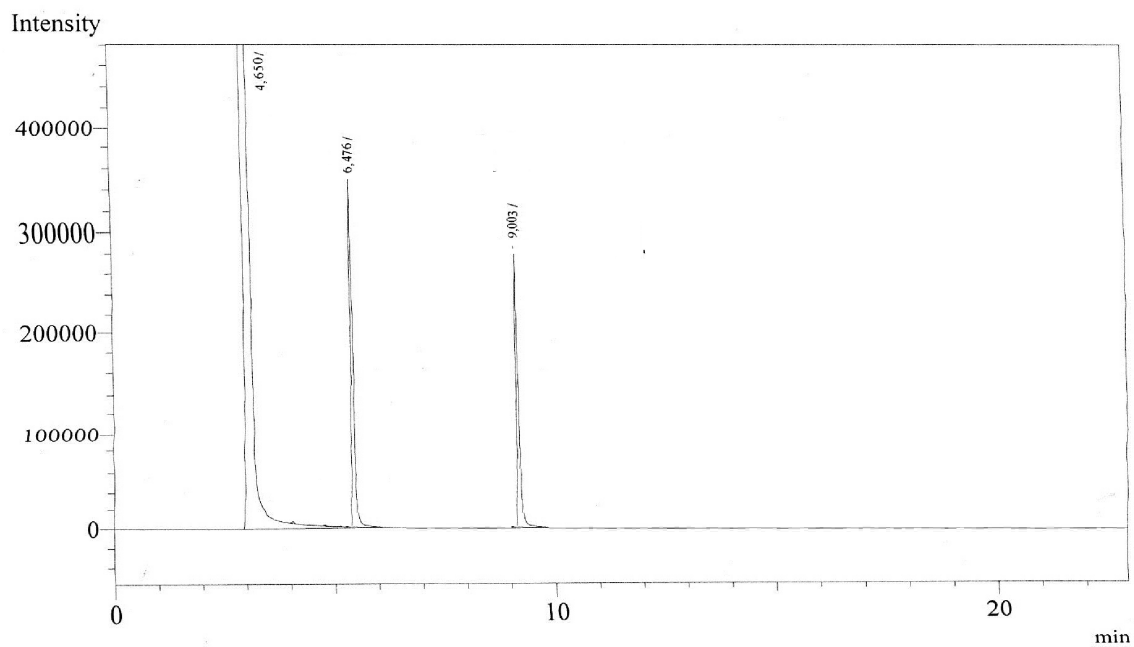


Les chromatogrammes de la réduction de **2c** :

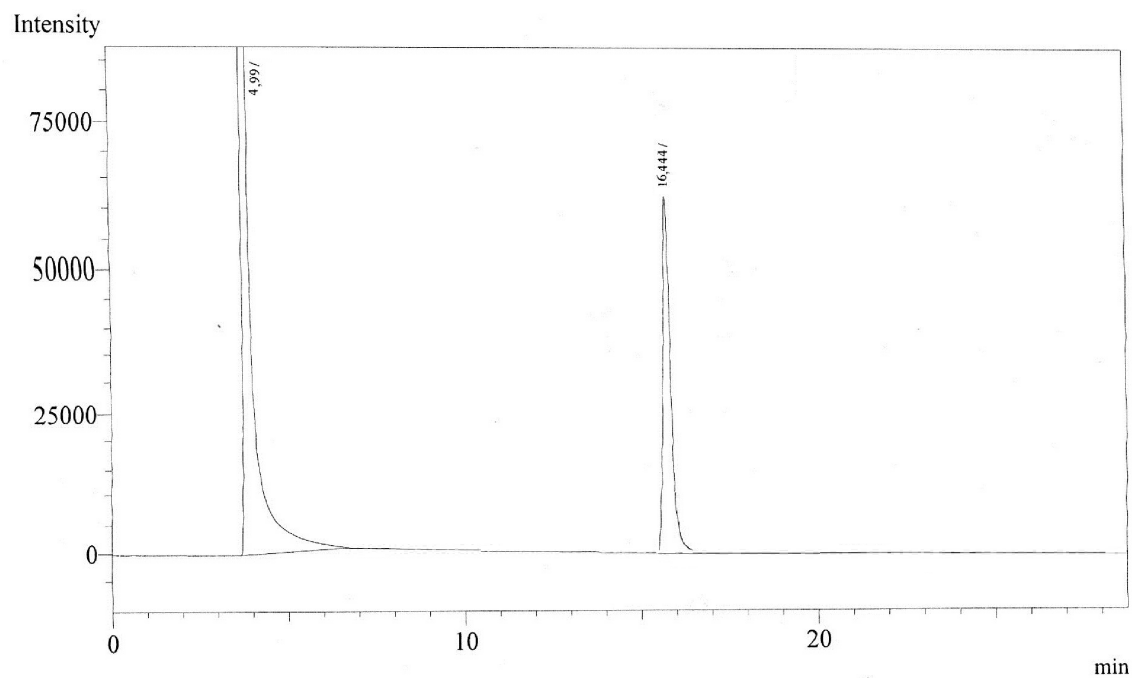
- Avec le  $\text{NaBH}_4$  :



- Avec le Ipomoea batatas L dans le glycérol :

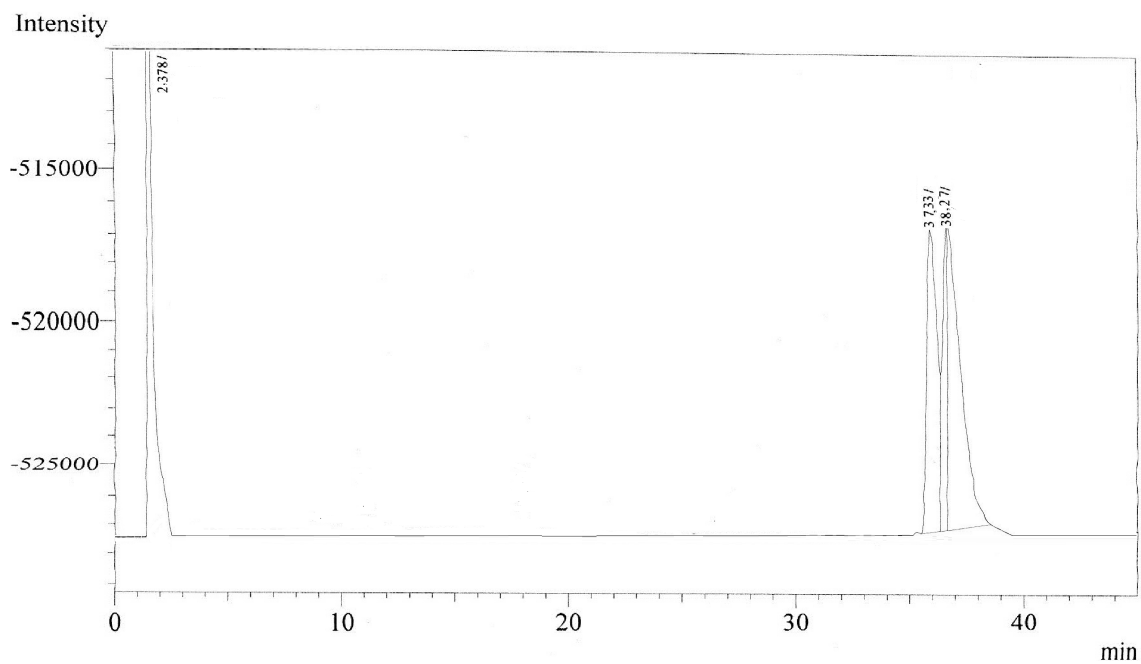


Le chromatogramme de **1d** :

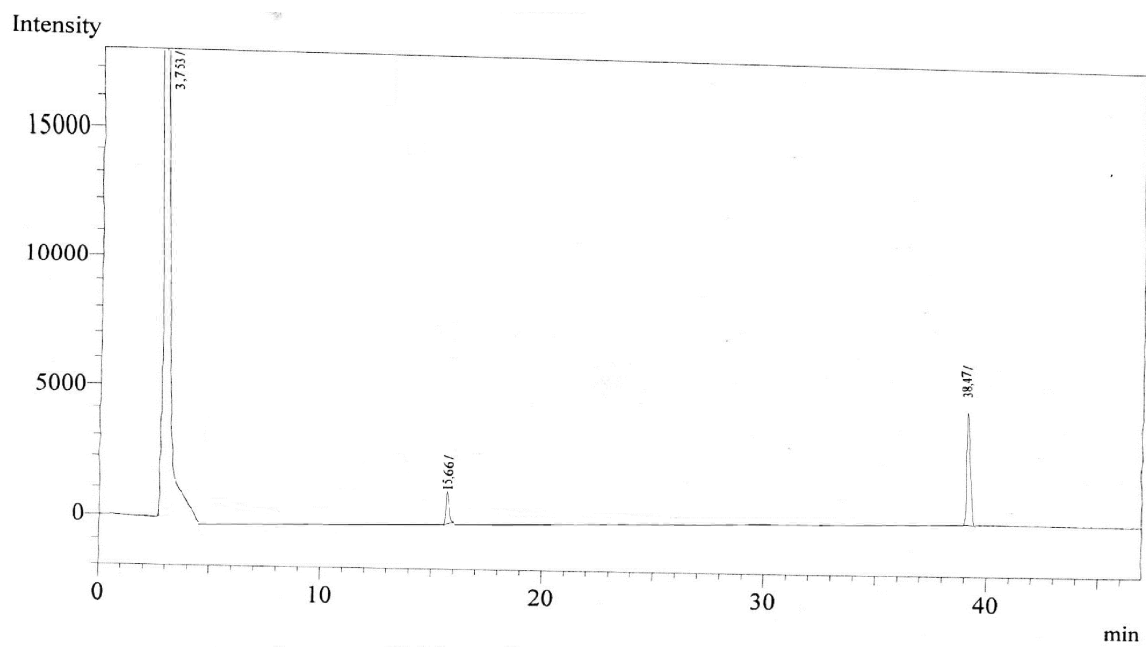


Les chromatogrammes de la réduction de **2d** :

- Avec le NaBH<sub>4</sub> :

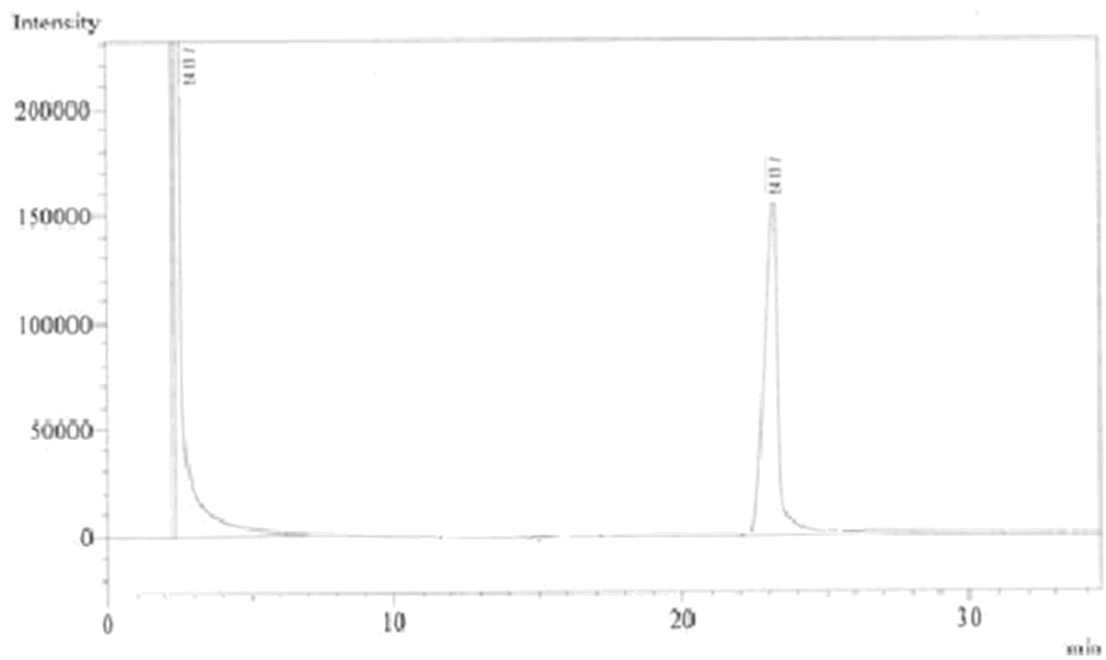


- Avec le Daucus carota L dans le glycérol :

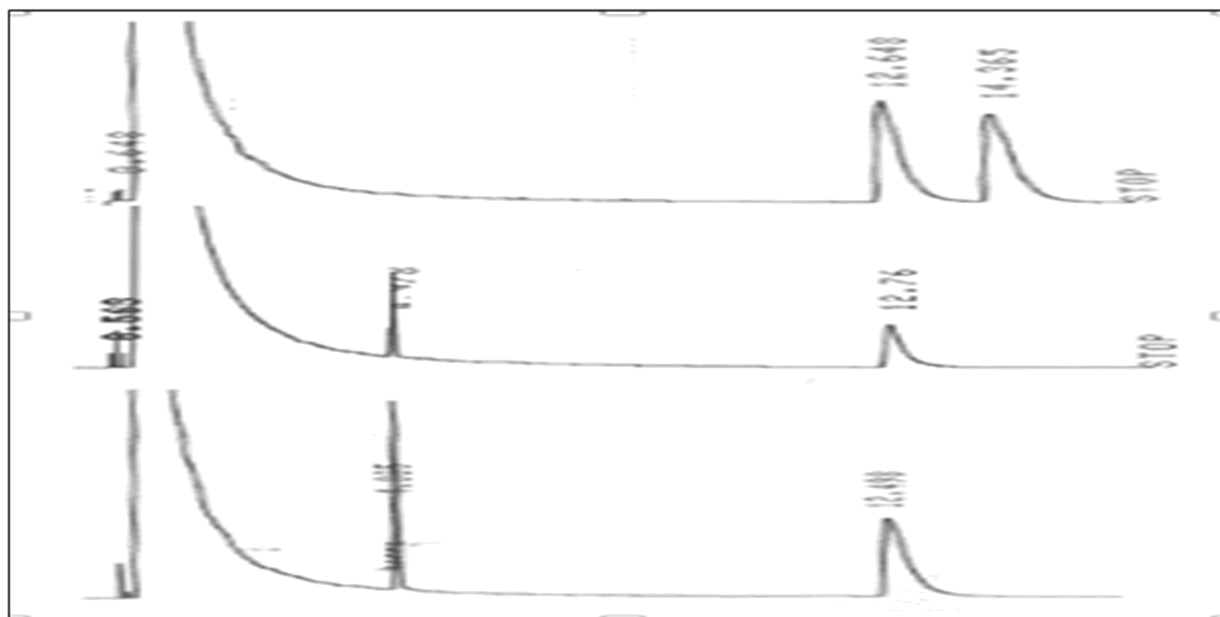




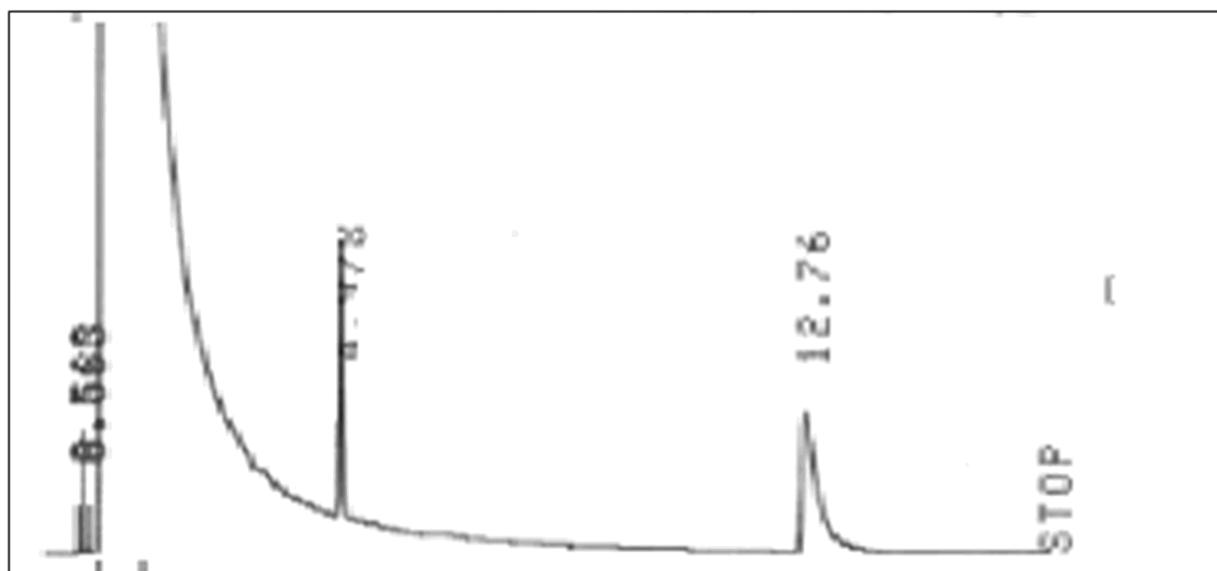
- Avec le *Lycopersicon esculentum* Mill dans l'eau :



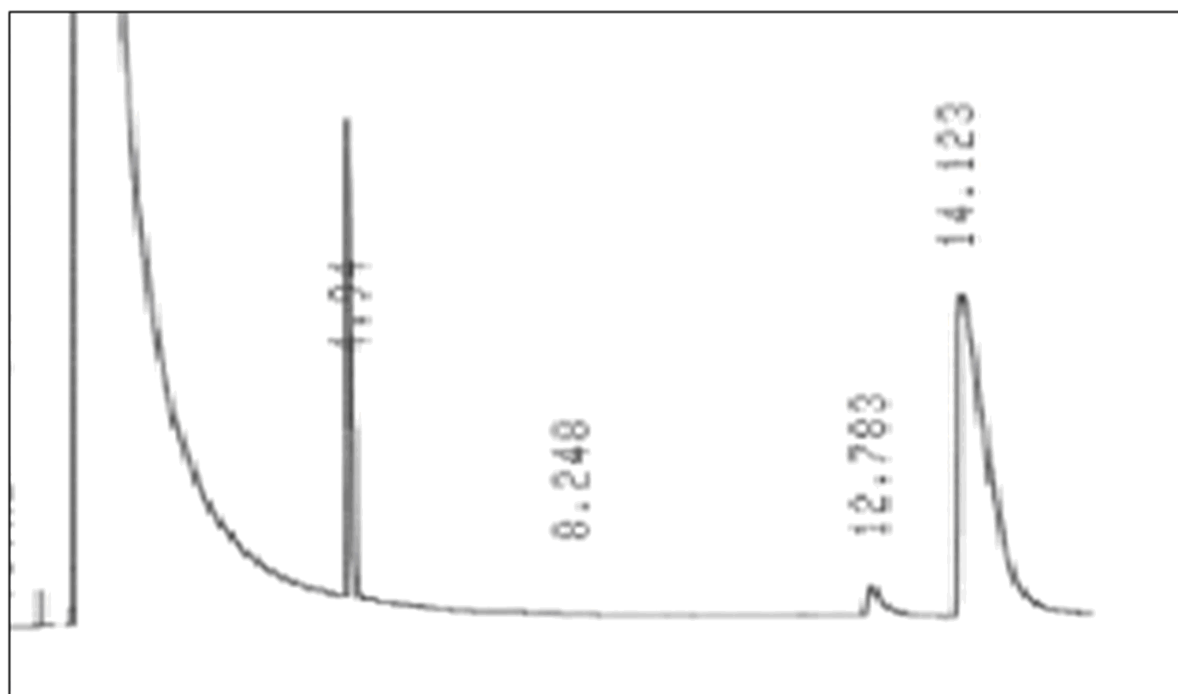
Oxydation du **2a** racémique Par *R. buffoni* :



réduction du **1a** Par *R. buffoni* :



réduction du **1g** Par *R. turuloides* :



article



ISSN: 0975-8585

## Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

### Valorization of Natural Tomato Wastes in the Reduction of Prochiral Ketones

Sofiane Ali Rachedi, Mohamed Aissaoui, and Abdelhafid Djerourou\*.

Organic Synthesis and Biocatalysis Laboratory, Faculty of Science, Chemistry Department, P.B.: 12, 23000, Annaba, Algeria.

#### ABSTRACT

In recent years, a great amount of attention has been paid to asymmetric synthesis of chiral synthons, the demand for which is increasing as precursors in the development of modern drugs and agrochemicals. Chiral alcohols are one of the many well-known synthons and can be obtained from the corresponding prochiral ketones by asymmetric reduction.. In this work, Organic chemical bioconversion of prochiral ketones to chiral alcohols with natural tomatoes food waste was made in water and glycerol and compared to known strains of waste and microorganisms ( *e.g. Baker's Yeast* , *Daucus carota*). These enzymatic reduction attempts lead to best results with excellent enantiomeric excess (ee) in *S* configuration.

**Keywords:** Tomato wastes, enzymatic reduction, secondary alcohols, enantioselectivity.

\*Corresponding author



ISSN: 0975-8585

## INTRODUCTION

The production and the preservation of the environment without the alteration of the soil and water space during the production or manufacture should be the main condition and one of the greatest preoccupation of public administration.[1] In the East of Algeria, many tomato processing factories are installed around Seybouse Valley and produce a lot of food wastes, source of soil and water pollution of this fertile agricultural plain. In addition to their use as a fertilizer of natural composts, biogas ... etc.[2–4] these wastes can be recycled as valuable organic products with many features of bioconversion in organic and green chemistry and other uses. [5, 6]. It is well know that vegetable and fruit processing by-products, wastes and effluents typically consist of high amounts of proteins, sugars and lipids[7, 8] can be sources of enzyme activity and can be used as a biocatalyst product in various organic chemistry reactions.[9, 10]

On the other hand, chemical synthesis of organic molecules with chiral centers often gives a racemic mixture that is difficult and expensive to separate, presenting a major obstacle to accede to many fine active biologically chemical products. Among the many types of biocatalysts used, the carbonyl reductases were used for preparing optically active alcohols from various prochiral ketones [11–14] For example, in organic synthesis, the reduction of a prochiral ketone to the secondary alcohol, [15–17] is an enantioselective manner among others that could be explored in this valorization. [18, 19].

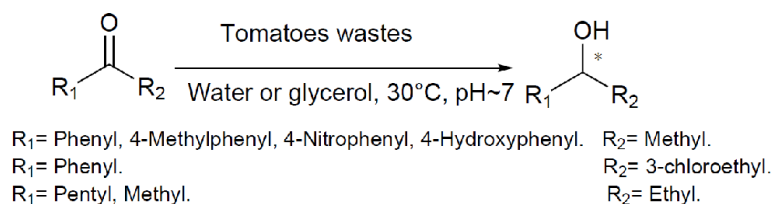


Figure 1 Prochiral ketone reduction

In particular, when the enantioselectivity of the alcohol produced is very high, [20–22] and has a great interest as building block [23, 24] for accede to potentially biologically active products. [25, 26]

## MATERIELS AND METHODS

Tomato wastes are freshly collected in plant manufacture [59] and are directly used without any processing in same day. The reduction's attempts with tomato fruit [60] bought to local market and used after having been cut into small slices are best and comparable with tomato wastes. The conversion and products ratio is determined by GLC.

The enantiomeric composition of product was established by chiral column FS Cyclodex beta- I/P over Shimatzu GC 4010 and P1000-LED polarimeter with precision of lecture 0.05°. Configuration of product was determined by the sign of the specific rotation and in accordance with literature. [61, 62]

## EXPERIMENTAL

### A general procedure used for Bioreduction with

Tomato wastes are in accordance with reference cited [53]. The results are detailed in the table. Tomatoes wastes (5 g), or a tomato cut into small dices (50g) was placed in Erlenmeyer flasks with 50 mL of solvent (water or glycerol)[54]. (50 mg) of the substrate [55] was added to the suspension of the tomato, and the resulting mixture was agitated by a mechanical stirrer with the agitation speed at 300 rpm. The temperature of the reaction system was kept at 30 °C. The process of the reaction was monitored by GC and comparison with product reduces with chemical method. [56, 57, 58]



After completion of the reaction, the suspension was filtered off and the filtrate was extracted with ethyl acetate ((3x40 mL for water and 3x20 mL for glycerol); then the combined organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane: methanol = 9:1).

## RESULTS AND DISCUSSION

The aim of this work was to make several attempts with raw food waste on various prochiral ketones, to know the reduction capacity of waste, optimize the reaction conditions and the solvent use.[27–29] Our interest for tomato waste is dictated by the lack of serious and comprehensive studies of this plant in the field of enzyme activity such as reductase.[30] For these BioReagents / catalysts widely applied in synthetic chemistry, they need to operate in retaining their selectivity in more compatible with organic compounds and solvents. For example: the Baker's yeast is known to perform a variety of transformations in synthetic organic chemistry, such as reduction of carbonyl groups.

However, its use in this field has been limited by the necessity of employing aqueous solvent systems. They exist several works related to these problems. [31, 32] The main advantage of using organic solvents is the ease with which the product can be extracted. Alternative biocatalyst research with the same activity among domestic waste, could be an interesting approach. In this paper, we are particularly interested in the tomato activity (*Lycopersicon esculentum*). So, we studied the tomato reduction activity in both solvents (water and glycerol). The choice of substrate is made by disposability and the structure of prochiral linear ketone : octan-3-one (III) and butan-2-one (V), aromatic cycle: acetophenone (I), aromatic cycle with heteroatome: p-nitroacetophenone (IV) 3-chloro-1-phenylpropan-1-one (VI), and aromatic cycle with substituted alkyl: 4-methylacetophenone (II). The Table 1 below shows some attempts of reduction with Tomato (T) over seven prochiral ketones cited before. The global results of these attempts, shows that enantiomeric excesses in water or glycerol as solvent are the best and (S) conversion is according with Prelog's rule. results.

N°	Red. Sub.	Conv.% t(h)		ee (%)		Conf.	
		Wat.	Gly.	Wat.	Gly.	Wat.	Gly.
1	T I	40(96)	89(96)	>99	>99	S	S
2	T II	40(96)	87(96)	>99	>99	S	S
3	T III	<2(180)	12(96)	-	>99	-	S
4	T IV	36(96)	29(96)	>99	>99	S	S
5	T V	<2(180)	<3(96)	-	-	-	-
6	T VI	100(72)	<1(120)	>99	>99	S	S

**Table 1** The reduction tests with Tomatoes wastes on prochiral ketones in water and glycerol.

Acetophenone (I), 4-methylacetophenone (II), Octan-3-one (III), p-nitroacetophenone (IV), butan-2-one (V), 3-chloro-1-phenylpropan-1-one (VI).

### Reactivity

All the essays realised for understanding various aspects of the reactivity in the enzymatic pocket [33, 34], according to the nature of the substituents R1 and R2 of the substrate (see Fig.1), and explain if either the volume or electronic character or the both can influence reactivity and selectivity. So, if the selectivity does not alter in any case, the reaction kinetic were affected by structure and nature of the substrate; we think, if the reaction is slow with aliphatic compounds, 3-octanone (II) and butan-2-one (V) this is mainly due to the fact, that this kind of products is not well accepted by the enzyme site. In this case, we believe that this kind of



substrate - a prochiral ketone - with apolar substituent R1 and R2 isn't adapted with residues of the enzymatic receptor pocket, which tends to accept the aromatic and polar patterns. For example, in the case where R2 is chloroethyl: a polar group, the reduction yield is almost quantitative ( see entry 6 in Table 1) after just two to three days. However, in the case where the aromatic substituent have the donors or withdrawing groups in para position, this does not alter significantly the kinetic reaction as for example when the moieties in para on the benzene are methyl or a nitro groups. [35,36, 37] In general, we can say that the kinetic reaction is rather dictated by electronics aspects than the steric considerations related to the volume of substituent. However we could not understand the slow reactivity of chlorinated substrate VI in glycerol ( see entry 6 in Table 1) compared with the same essay carried out in the water.[38]. Finally, we will say, that it is difficult to understand all aspects of one complex system where many variables are involved, but understand the essential. This is understandable and consistent with the literature.[39, 40].

When the reaction is finished [41], the extraction of product from water with an organic solvent requires large amounts of solvent [42]. This method is a very expensive process. However with the glycerol the extraction is simpler and the amounts of solvent are less than with the water extraction [43]. This is reflected on the conversion that is better with the glycerol, but with the same enantioselectivity. The dilemma in this manipulation is a choice of solvent: the water is inexpensive and abundant compared to glycerol where the extraction conditions are better. [44–46]

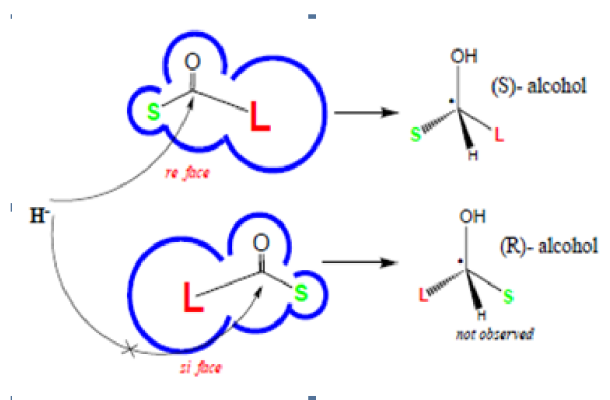


Figure 2 hydride attack on re-face with prelog's rule.

### Stereoselectivity

To understand the stereochemical trend in the enzymatic reductions [47, 48], all the products in Table 1 are drawn in such a way that the  $\alpha$ -face (*re-face*) of the carbonyl group in the substrates is attacked by H<sup>-</sup> (NADPH) (see fig 2). The enantiomeric purity of these products was high in most cases, where the substrate is in desired structure and the Prelog's rule is confirmed (entry 1 and 4 in Table 1). Although we have previously reported that the present reductase is one of the enzymes that contribute to Prelog's rule[49, 50], the anti-Prelog-type[51, 52] alcohols are not observed in this study; the left-hand moiety is bulkier than the right-hand moiety. In second attempt the glycerol (Table 1) is used and the results are reproduced below. The assignment of the *R* and *S* configuration has been confirmed by the optical rotation and chiral chromatography. We have noted that the *R* product is more retained than the *S* product in the all attempts. This confirms the attack of the hydride on the side Re.

### CONCLUSION

In this work we wanted to show the activity of tomato (*Lycopersicon esculentum*). That is interesting for valorization as biotechnological process for synthesis biological active secondary alcohols with *S* configuration.



ISSN: 0975-8585

If this activity is slow compared with another reductases, [63] in particular with the small prochiral ketones, when the enzymatic pocket can't accept this substrates. We could show that the selectivity is always excellent when the reaction works and respect Prelog's rules, even if it is slow. We were able to define the structure and nature of the substituents around the carbonyl, for the best yields. Thus the best substrate is one with polar substituents. We believe that the matter responsible of enzymatic activity is not very significant compared to the total mass and can be adjusted by the large quantity of tomato wastes. We have also shown that the use of glycerol can increase the yield of the reaction without being very significant. Finally we have also shown that the S-enantiomer is more retained by the chiral chromatography column and leaves the latter in all cases studied.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique for their financial support of this work.

#### REFERENCES

- [1] P. J. Withers, J. J. Elser, J. Hilton, H. Ohtake, W. J. Schipper, K. C. van Dijk, Greening the global phosphorus cycle: how green chemistry can help achieve planetary p sustainability, *Green Chemistry* 17 (4) (2015) 2087–2099.
- [2] J. H. Clark, F. Deswarte, Introduction to chemicals from biomass, John Wiley & Sons, 2015. [3] Y. L. Chiew, J. Spångberg, A. Baky, P.-A. Hansson, H. J'onsson, Environmental impact of recycling digested food waste as a fertilizer in agriculture case study, *Resources, Conservation and Recycling* 95 (2015) 1–14.
- [3] Y. L. Chiew, J. Spångberg, A. Baky, P.-A. Hansson, H. J'onsson, Environmental impact of recycling digested food waste as a fertilizer in agriculture case study, *Resources, Conservation and Recycling* 95 (2015) 1–14.
- [4] F. Fava, G. Totaro, L. Diels, M. Reis, J. Duarte, O. B. Carioca, H. M. Poggi-Varaldo, B. S. Ferreira, Biowaste biorefinery in europe: opportunities and research & development needs, *New biotechnology* 32 (1) (2015) 100–108.
- [5] T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura, Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, *Tetrahedron: Asymmetry* 20 (5) (2009) 513 – 557.
- [6] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*, Springer Science & Business Media, 2011.
- [7] A. Moayedi, M. Hashemi, M. Safari, Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antibacterial hydrolysates by proteolytic bacillus subtilis: optimization of fermentation conditions, *Journal of Food Science and Technology* (2015) 1–10And reference cited.
- [8] G. Boschin, G. M. Scigliuolo, D. Resta, A. Arnoldi, Aceinhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes, *Food chemistry* 145 (2014) 34–40.
- [9] K. Drauz, *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook*, Vol. 1, John Wiley & Sons, 2012.
- [10] M. T. Reetz, Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future, *Journal of the American Chemical Society* 135 (34) (2013) 12480–12496.
- [11] Y. Ni, J.-H. Xu, Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols, *Biotechnology Advances* 30 (6) (2012) 1279 – 1288.
- [12] T. S. Moody, J. D. Rozzell, Chapter 6 - modern biocatalytic ketone reduction, in: A. G. D. Stewart (Ed.), *Organic Synthesis Using Biocatalysis*, Academic Press, 2016, pp. 149– 185.
- [13] R. L. Cunha, E. A. Ferreira, C. S. Oliveira, 'A. T. Omori, Biocatalysis for desymmetrization and resolution of stereocenters beyond the reactive center: How far is far enough?, *Biotechnology advances* 33 (5) (2015) 614–623.
- [14] R. Wohlgemuth, Development of sustainable biocatalytic reduction processes for organic chemists, *Synthetic Methods for Biologically Active Molecules: Exploring the Potential of Bioreductions* (2014) 1–25.
- [15] F. Hollmann, I. W. Arends, D. Holtmann, Enzymatic reductions for the chemist, *Green Chemistry* 13 (9) (2011) 2285–2314.



ISSN: 0975-8585

- [16] K. Goldberg, K. Schroer, S. L'utz, A. Liese, Biocatalytic ketone reduction a powerful tool for the production of chiral alcohols part I: processes with isolated enzymes, *Applied microbiology and biotechnology* 76 (2) (2007) 237–248.
- [17] I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions, *Journal of the American Chemical Society* 126 (40) (2004) 12827–12832.
- [18] C. M. Galanakis, Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications, *Trends in Food Science Technology* 26 (2) (2012) 68 – 87.
- [19] A. A. Koutinas, A. Vlysidis, D. Pleissner, N. Kopsahelis, I. L. Garcia, I. K. Kookos, S. Papanikolaou, T. H. Kwan, C. S. K. Lin, Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers, *Chemical Society Reviews* 43 (8) (2014) 2587–2627.
- [20] C. J. Sih, S.-H. Wu, Resolution of enantiomers via biocatalysis, *Topics Stereochem* 19 (1989) 63–125.
- [21] J. Rakels, A. Straathof, J. Heijnen, A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis, *Enzyme and Microbial Technology* 15 (12) (1993) 1051 – 1056.
- [22] K. Shin-ya, H. Sugeta, S. Shin, Y. Hamada, Y. Katsumoto, K. Ohno, Absolute configuration and conformation analysis of 1-phenylethanol by matrix-isolation infrared and vibrational circular dichroism spectroscopy combined with density functional theory calculation, *The Journal of Physical Chemistry A* 111 (35) (2007) 8598–8605.
- [23] H. H. Szmant, *Organic building blocks of the chemical industry*, John Wiley & Sons, 1989.
- [24] E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks, *Chemical reviews* 92 (5) (1992) 1071–1140.
- [25] A. Harvey, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, *Drug discovery today* 5 (7) (2000) 294–300.
- [26] K. M. Koeller, C.-H. Wong, Enzymes for chemical synthesis, *Nature* 409 (6817) (2001) 232–240.
- [27] A. Zaks, A. M. Klibanov, The effect of water on enzyme action in organic media., *Journal of Biological Chemistry* 263 (17) (1988) 8017–8021. Resources, *Conservation and Recycling* 95 (2015) 1–14.
- [28] R. V. Rariy, A. M. Klibanov, Correct protein folding in glycerol, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (25) (1997) 13520–13523.
- [29] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of secondary alcohols, *Current opinion in chemical biology* 8 (2) (2004) 120–126.
- [30] K. Phukan, N. Devi, Biocatalytic preparative method of asymmetric alcohols using *Lycopodium obscurum* (tomato), *Int J Chem Tech Research* 4 (2012) 203–207.
- [31] M. K. Johns, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, The use of liquefied petroleum gas (lpg) as a solvent for yeast reactions, *Tetrahedron Letters* 42 (25) (2001) 4261–4262.
- [32] L. Y. Jayasinghe, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, The yeast mediated reduction of ethyl acetoacetate in petroleum ether, *Tetrahedron Letters* 34 (24) (1993) 3949–3950.
- [33] I. Castellano, A. Merlino,  $\alpha$ -glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications, *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (20) (2012) 3381–3394.
- [34] J. Uppenberg, N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols, *Biochemistry* 34 (51) (1995) 16838–16851.
- [35] In the case where the group is hydroxyl, the reaction is slow and not significant and confirm that the acidity of phenol moiety can perturb enzymatic reaction. This attempt was abandoned because not interesting.
- [36] A. I. Cañinas, S. Camarero, Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes, *Biotechnology advances* 28 (6) (2010) 694–705.
- [37] R. McCague, M. G. Rowlands, S. E. Barrie, J. Houghton, Inhibition of enzymes of estrogen and androgen biosynthesis by esters of 4-pyridylacetic acid, *Journal of medicinal chemistry* 33 (11) (1990) 3050–3055.
- [38] Several tests were carried out in glycerol with the VI substrate: without any success.
- [39] M. Sutter, E. D. Silva, N. Duguet, Y. Raoul, E. Metay, M. Lemaire, Glycerol ether synthesis: A bench test for green chemistry concepts and technologies, *Chemical reviews* 115 (16) (2015) 8609–8651.
- [40] J. I. García, H. García-Marín, E. Pires, Glycerol based solvents: synthesis, properties and applications, *Green Chemistry* 16(3) (2014) 1007–1033.
- [41] The reaction is stirred for a minimum of four days.



ISSN: 0975-8585

- [42] One (01) liter of ethylacetate is used for extract 400 mg of product from the mixture and the ethyl acetate used is continually recycled.
- [43] We used the half quantity of ethylacetate when we used the glycerol.
- [44] M. Hall, C. Stueckler, H. Ehammer, E. Pointner, G. Oberdorfer, K. Gruber, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, P. Macheroux, et al., Asymmetric bioreduction of C-C bonds using enoate reductases opr1, opr3 and yqjm: Enzyme-based stereocontrol, *Advanced Synthesis & Catalysis* 350 (3) (2008) 411–418.
- [45] M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes opr-1 and opr-3 from *Lycopersicon esculentum* (tomato): A striking change of stereoselectivity, *Angewandte Chemie* 119 (21) (2007) 4008–4011.
- [46] L. Agwaramgbo, T. Okegbe, T. Wright, S. Igwe, V. Ogburie, Inhibition of the oxidation of acetophenone by aqueous extracts of edible fruits and vegetables, *Mod Chem appl* 1 (105) (2013)2.
- [47] H. S. Toogood, N. S. Scrutton, New developments in enereductase catalysed biological hydrogenations, *Current opinion in chemical biology* 19 (2014) 107–115.
- [48] M. L. Contente, I. Serra, M. Brambilla, I. Eberini, E. Gianazza, V. De Vitis, F. Molinari, P. Zambelli, D. Romano, Stereoselective reduction of aromatic ketones by a new ketoreductase from *Pichia glucozyma*, *Applied microbiology and biotechnology* (2015) 1–9.
- [49] V. Prelog, Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections, *Pure and Applied Chemistry* 9 (1) (1964) 119–130.
- [50] P. Liang, B. Qin, M. Mu, X. Zhang, X. Jia, S. You, Prelog and anti-prelog stereoselectivity of two ketoreductases from *Candida glabrata*, *Biotechnology letters* 35 (9) (2013) 1469–1473.
- [51] A. Li, L. Ye, F. Guo, X. Yang, H. Yu, Biocatalytic anti-prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of a newly isolated strain *Empedobacter brevis* zjuy-1401, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 117 (2015) 31–37.
- [52] R. Zhang, Y. Geng, Y. Xu, W. Zhang, S. Wang, R. Xiao, Carbonyl reductase scii from *Candida parapsilosis* catalyzes anti-prelog reaction to (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol with absolute stereochemical selectivity, *Bioresource technology* 102 (2) (2011) 483–489.
- [53] L. P. Tong, J. N. Cui, W. M. Ren, X. Y. Wang, X. H. Qian, Asymmetric bioreduction of substituted acenaphthenequinones using plant enzymatic systems: A novel strategy for the preparation of (+)- and (-)-mono hydroxyacenaphthenones, *Chinese Chemical Letters* 19 (10) (2008) 1179–1182.
- [54] The addition of water to the reaction is necessary for good agitation, because the water content in tomatoes is not enough.
- [55] In the case where the substrate is solid, we use a few quantity of ethanol just for solubilize it.
- [56] All prochiral ketones are reduced with correspondent procedure: NaBH<sub>4</sub> in methanol at room temperature.
- [57] J. Seyden-Penne, H. C. Brown, *Reductions by the alumino- and borohydrides in organic synthesis*, John Wiley Sons, 1991.
- [58] S. Phothongkam, B.-J. Uang, Enantioselective reduction of ketones induced by a C<sub>2</sub>-symmetrical chiral hydroxyamide/titanium (IV) complex, *Asian Journal of Organic Chemistry* 4 (8) (2015) 794–799.
- [59] Tomatoes wastes are collected in Benamar Plant between June, 20 and July 15 in Wilaya of El-Tarf, Algeria.
- [60] For 100g of crude tomatoes 80% are the water and the rest is matter formed by different constituents.
- [61] T. Matsuda, T. Harada, N. Nakajima, K. Nakamura, Mechanism for improving stereoselectivity for asymmetric reduction using acetone powder of microorganism, *Tetrahedron Letters* 41 (21) (2000) 4135–4138.
- [62] A. A. Bothner-By, Simple preparation of optically active secondary alcohols<sup>1</sup>, *Journal of the American Chemical Society* 73 (2) (1951) 846–846.
- [63] Baker's Yeast and *Daucus Carota* for example.

**Nom** : ALI RACHEDI

**Prénom** : Sofiane

**Titre de thèse** : Synthèse asymétrique de composés organiques par catalyse et modélisation de la réactivité des réactions enzymatiques.

**Mots clés** : synthèse asymétrique, déchets alimentaires, transfert asymétrique d'hydrure, criblage multi-substrats, cétones aliphatiques, cétones aromatiques, les levures.

### **Résumé**

Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif l'étude théorique et expérimentale de deux procédés de la réaction de réduction asymétrique de diverses cétones par transfert asymétrique d'hydrure avec des enzymes. Pour cela on a utilisé les déchets alimentaires comme catalyseur pour le premier procédé et des micro-organismes en appliquant l'approche combinatoire pour le deuxième. Les résultats expérimentaux obtenus au cours de de cette étude sont confirmés par une étude théorique.

