

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR
- ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année / 2021

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat
Option : Chimie organique fine

THÈME :

Dédoublement enzymatique de quelques molécules monofonctionnelles : Optimisation et valorisation.

Présentée par : M^{me} Nour El Houda BENAMARA

Devant le jury :

M^{me} Samia GUEZANE LAAKOUD	Présidente	MCA U.B.M. Annaba
M^{me} Mounia MERABET-KHELASSI	Directrice de thèse	Prof. U.B.M. Annaba
Mme Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE	Co-directrice de thèse	Prof. U.B.M. Annaba
M^{me} Chafika BOUGHELOUM	Examinatrice	MCA U.B.M. Annaba
M^{me} Fahima ALI RACHEDI	Examinatrice	MCA U. Souk Ahras
M^r Hacène BENDJEFFAL	Examineur	MCA E.N.E.S.T. Skikda

المخلص

العنوان: الفصل الأنزيمي لبعض الجزيئات أحادية الوظيفة: تحسين وتثمين.

في هذه الأطروحة ركزنا اهتمامنا على تطوير عمليات وطرق تحفيز حيوي نظيفة بإتباع مبادئ الكيمياء الخضراء للحصول على جزيئات نشطة بيولوجيًا ذات نقاوة ضوئية عالية ضمن نهج متوافق مع البيئة. للقيام بذلك اخترنا طريقة الفصل الحركي عن طريق تفاعل الأسيلية الإنزيمي لجزيئات أحادية الوظيفة ذات قيمة مضافة عالية، على سبيل المثال أحماض ألفا أريل بروبيونيك (بروفينيس)، أحماض كربوكسيلية الدهنية ، 1-فينيل إيثانول و 1-فينيل إيثانامين، كذلك قمنا بدراسة تأثير عوامل التفاعل المختلفة الكفيلة بتحسين الفعالية والانتقائية لبعض الإنزيمات واسعة الاستعمال صناعيا والمتاحة تجاريًا.

في القسم الأول من هذا العمل قمنا بتحسين الفصل الحركي للإيبوبروفين المحفز بواسطة إنزيم *CAL-B*. لقد تم الحصول على :
(*R*)-2-(4- إيزوبوتيل فينيل)-*N*-(4- (ثلاثي فلورو ميثيل) فينيل) بروباناميد **1-A1**، (*R*)-*N*-(4- يودو فينيل)-2- (4-) ثلاثي إيزوبوتيل فينيل) بروباناميد **1-A3**، (*R*)-2-(4- إيزوبوتيل فينيل) -*N*- فينيل بروباناميد **1-A5** بدرجة نقاوة ضوئية عالية $ee=97.3\%$ ؛ 90.5% و 90.8% ، مع تقدم تفاعلي يتعدى 7% ، وذلك باستعمال: التولوين كمذيب عضوي. عند استخدام الهيتان بدلاً من التولوين سجلت زيادة كبيرة في معدل التحويل ولكن من دون انتقائية، مما كشف عن طريقة مناسبة وسهلة لتوليف الأميدات وهذا ضمن إطار متوافق مع البيئة.

من بين الأميدات التي تم تصنيعها، 14 اميد على الأقل تم الحصول عليها لأول مرة مع كل من الإيبوبروفين، الكيتوبروفين، الفلوربيبروفين، و 2-الفيونوكسي بروبيونيك أسيد و *L*-Boc -برولين وأنيلين. وتم كذلك تحديد هيكلين منهم من خلال الأشعة السينية.

في القسم الثاني لهذا العمل، طبقنا مرة أخرى تفاعل الفصل الحركي بواسطة *O*-اسيلة و *N*-اسيلة لـ 1-فينيل إيثانول و 1-فينيل إيثان أمين باستخدام الأحماض الكربوكسيلية التي طول سلسلتها الفحمية بين C14 : C1. تم الحصول على الإسترات الدهنية ومثيلاتها من الأميدات الدهنية نقية ضوئياً ($ee_{(R)} > 99\%$)، وذلك عن طريق تعديل طبيعة الإنزيم وطبيعة المذيب العضوي المستخدم.

الكلمات الدالة: الفصل الحركي الإنزيمي، *N*- اسيلة، *O*- اسيلة، العقاقير غير الستيرويدية المضادة للالتهابات، الأحماض الكربوكسيلية الدهنية، الإسترات والأميدات ذات القيمة المضافة العالية، كيمياء مستدامة.

ABSTRACT

Title: *Enzymatic resolution of some mono-functional molecules: Optimization and valorization.*

In this thesis work, we are interested in the development of clean biocatalytic processes to reach enantioenriched or enantiopure bioactive molecules under eco-compatible approach. For that, the enzymatic resolution is chosen to reach a set of mono-functionalized molecules of high added value; such as: α -arylpropionic acids (Profens), fatty carboxylic acids, 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine. Several parameters which can modulate the selectivity and the reactivity of some commercial lipases are examined.

In the first part, we have optimized the kinetic resolution by amidation of ibuprofen using the *CAL-B* lipase as biocatalyst. The (*R*)-2-(4-isobutylphenyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide (**1-A1**), (*R*)-*N*-(4-iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (**1-A3**) and (*R*)-2-(4-isobutylphenyl)-*N*-phenylpropanamide (**1-A5**) are obtained with enantiomeric excesses of: 97.3%; 90.5% and 90.8%, at conversions not exceeding 7%, for reactions in toluene. The use of heptane instead of toluene has caused a significant increase of the conversion rates without any selectivity. This, has revealed an easy and eco-compatible route to amide synthesis with optimal atom economy.

Among the synthesized amides, at least 14 of them are reported for the first time: from ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, 2-phenoxypropionic acid and *L*-Boc-proline using anilines. Two structures are determined by X-ray diffraction.

In the second part, we have applied the kinetic resolution through *O*-Acylation and *N*-acylation of 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine using carboxylic acids having a length of carbon chain of C1: C14. Fatty esters and their fatty amide analogues are obtained enantiomerically pure (ee (*R*) > 99%), and that by modulating the nature of the enzyme and that of the organic solvent used.

Keywords: Enzymatic kinetic resolution, *N*-Acylation, *O*-acylation, non-steroidal anti-inflammatory drugs, fatty carboxylic acids, esters and amides with high added value, Eco-compatible chemistry.

RÉSUMÉ

Titre : *Dédoublement enzymatique de quelques molécules mono-fonctionnelles: Optimisation et valorisation.*

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la mise aux points de procédés biocatalytiques propres pour accéder aux molécules bioactives énantiomériquement enrichies ou pures dans un cadre d'une approche éco-compatible. Pour ce faire, nous avons choisis le mode de dédoublement cinétique par acylation enzymatique des molécules mono fonctionnalisées d'une haute valeur ajoutée, en l'occurrence, des acides α -arylpropioniques (Profènes), des acides carboxyliques gras, le 1-phényléthanol et le 1-phényléthylamine, et ce, en examinant l'influence de divers paramètres pouvant moduler la sélectivité et la réactivité de quelques lipases d'une large application industrielle et commercialement disponibles.

Dans un premier volet, nous avons optimisé la réaction de dédoublement cinétique par amidation de l'ibuprofène catalysée par la CAL-B. Les amides: (*R*)-2-(4-isobutylphényl)-*N*-(4-(trifluorométhyl)phényl) propanamide (**1-A1**), (*R*)-*N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (**1-A3**) et (*R*)-2-(4-Isobutylphényl)-*N*-phénylpropanamide (**1-A5**) sont obtenus avec des excès énantiomériques de : 97,3% ; 90,5% et 90,8%, à des conversions qui ne dépassent pas 7%, en utilisant le toluène comme solvant organique. En remplaçant ce dernier par l'heptane une augmentation importante du taux de conversion sans aucune énantiosélectivité a été enregistrée. Cela a révélé une voie pertinente de synthèse d'amides facile, éco-compatible avec une économie d'atome optimale. Parmi les amides synthétisés, au moins 14 sont rapportés pour la première fois à partir de l'ibuprofène, du ketoprofène, du flurbiprofène, de l'acide 2-phénoxypropionique et de la *L*-Boc-proline et d'anilines. Deux structures sont déterminées par diffraction RX.

Dans un deuxième volet, nous avons appliqué la réaction de dédoublement cinétique par *O*-Acylation et *N*-acylation du 1-phényléthanol et du 1-phényléthylamine en utilisant des acides carboxyliques ayant une longueur de chaîne carbonée entre C1 : C14. Des esters gras et leurs analogues amides sont obtenus énantiomériquement purs ($ee_{(R)} > 99\%$), et ce, en modulant la nature de l'enzyme et celle du solvant organique utilisé.

Mots clés : Dédoublement cinétique enzymatique, *N*-Acylation, *O*-acylation, anti-inflammatoires non stéroïdiens, acides carboxyliques gras, esters et amides à haute valeur ajoutée, Chimie éco-compatible.

Dédicaces

Toutes les lettres et les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour, mon respect et ma reconnaissance...

C'est tout simplement que je dédie ce travail à

Mes chères parents

A mon cher mari et ma petite

A tous mes frères et ma sœur

A mes chers amis et collègues

Aussi à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-compatible (LCAE) de l'université d'Annaba, sous la direction du **Professeur MERABET-KHELLASSI**.

Au terme de cette thèse je présente ma gratitude et mes remerciements les plus sincères à Madame le **Pr. Mounia MERABET-KHELLASSI** ma directrice de thèse, pour son aide fructueuse, ses précieux conseils pleins de sens, sa patience, et qui m'a beaucoup aidé et dirigé pour trouver le bon chemin vers la réussite. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

En guise de reconnaissance je remercie mon *co*-encadreur Mme le **Pr. Louisa ZOUIOUECHE - ARIBI** pour le suivi et l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux.

Ma gratitude également à Mr. le Pr. **Olivier Riant**, professeur à l'unité de Chimie Organique et Médicinale (CHOM), de l'Université Catholique de Louvain en Belgique, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche lors de mes deux stages et d'avoir gardé un œil attentif sur l'avancement de mon projet.

Je tiens à remercier **M^{me}. Samia GUEZANE LAAKOUD** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à l'ensemble du jury : **M^{me}. Chafika BOUGHELOUM**, **M^{me}. Fahima ALI RACHEDI** et **M^r. Hacène BENDJEFFAL** d'avoir accepté de juger ce travail, et d'avoir apporté des suggestions intéressantes à cette thèse. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout mon respect.

Je tiens à témoigner mes sincères remerciements aux membres du laboratoire MOST, en particulier **M^r. François BILLARD** et **M^r. Laurent COLLARD** pour leur patience et leur aide à la bonne formation en GC et HPLC qui m'ont accordé.

Je n'oserais oublier de remercier **M^{me}. Audrey DEJEAN** pour sa disponibilité et son aide durant mon séjour à Louvain-la-Neuve.

Finalement, je tiens à remercier tous les membres de notre laboratoire (L.C.A.E) pour tout les passionnants moments que nous avons partagé et pour leur soutien.

Symboles & Abréviations	Signification
AA	Agent acylant
Ac	Acétyle
AC	Acide carboxylique
ACS GCIPR	American Chemical Society Green Chemistry Institute Pharmaceutical Round table
AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Boc	tert-butoxycarbonyle
C	Conversion
CAL-B	<i>Candida Antarctica Lipase B</i>
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CRL	lipase de <i>Candida Rugosa</i>
DC	Dédoulement cinétique
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCE	Dédoulement cinétique enzymatique
DCU	dicyclohexylurée
DMSO	diméthylsulfoxyde
E	Facteur de sélectivité
ECPMP	European Committee for Proprietary Medicinal Products
ee _s	Excès énantiomérique du substrat
ee _p	Excès énantiomérique du produit
Eq	Equivalent
FDA	Food and Drug Administration
h	Heure
Hz	Hertz
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
j	Constante de couplage
K	constante de vitesse
k _m	Constante de <i>Michaelis</i>
M	Molaire
mg	Milligramme
mmole	Milli mole

ND	Non déterminé
P	Produit
PA	Aucun avancement
<i>PCL</i>	lipase de <i>pseudomonas cepacia</i>
ppm	Partie par million
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S	Substrat
t.a	Température ambiante
t _R	Temps de rétention
TM	Tamis moléculaire
TON	Number of turn over
UIBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
2M2B	2-méthyl-2-butanol

N°	Titre	Page
1	Dépendance activité biologique/ stéréochimie de quelques molécules chirales.	3
2	Les lipases les plus utilisées en synthèse organique.	36
3	Chromatogrammes des <i>rac</i> -1, <i>rac</i> -1-A1 et leurs énantiomères (<i>S</i>)-1 et (<i>S</i>)-1-A1	68
4	DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet du solvant	68
5	Structures et rendement chimiques des amidopropènes synthétisés	71
6	DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet des anilines	74
7	Données cristallographique de la structure 1-A3	79
8	Paramètres géométriques de la structure 1-A3	79
9	Réaction d'amidation enzymatique <i>versus</i> l'amidation chimique	90
10	Données cristallographiques de la structure 1-A7	95
11	Amidation enzymatique <i>versus</i> amidation chimique de la <i>L</i> -Boc-proline par le biais des anilines	99
12	Inconvénients et Avantages de quelques agents acylants utilisés	103
13	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysée par la CAL-B : Effet du solvant	111
14	DCE du 1-phényléthanol par le biais de l'anhydride acétique : effet du solvant	113
15	Profil cinétique du dédoublement cinétique enzymatique par estérification du <i>rac</i> -6 par l'acide acétique	116
16	<i>O</i> -acylation lipasique du 1-phényl éthanol par des AC	120
17	Les caractéristiques <i>chiroptiques</i> des esters obtenus	121
18	<i>N</i> -Acylation du 1-phényléthanimine catalysée par la CAL-B : impact de la structure de l'acide carboxylique	127
19	Les caractéristiques <i>chiroptiques</i> des amides obtenus	128

N°	Titre	Page
1	Louis Pasteur	1
2	Schématisation de la chiralité	1
3	Les énantiomères du limonène et de la carvone	2
4	Evolution de la biocatalyse	11
5	Les structures des enzymes	13
6	Modèle clé-serrure	14
7	Modèle de l'ajustement induit	14
8	Classification des enzymes	15
9	Mode d'action des enzymes	16
10	Diagramme énergétique d'une réaction catalysée par une enzyme	17
11	Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration	18
12	Biocatalyse et chimie verte	21
13	Le marché mondial des enzymes	23
14	Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E < 10$	32
15	Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E \geq 100$	33
16	Illustration de la reconnaissance chirale	33
17	Positionnement idéal de l'alcool secondaire dans le site actif de l'enzyme (M représente le substituant de taille moyenne et L de substituant le plus encombré)	34
18	Les deux énantiomères de l'ibuprofène	56
19	Le modèle d'investigation	60
20	Structure tridimensionnelle de la <i>CAL-B</i>	60
21	Triade catalytique de la <i>CALB</i> et acides aminés importants du site actif	61
22	Le site actif de la <i>CALB</i>	61
23	Spectre RMN ¹ H du <i>rac</i> -1-A1	65
24	Spectre RMN ¹³ C du <i>rac</i> -1-A1	66
25	Spectre HRMS du <i>rac</i> -1-A1	66
26	Spectre RMN ¹ H du <i>rac</i> -1-A3	72
27	Spectre RMN ¹³ C du <i>rac</i> -1-A3	72
28	Spectre HRMS du <i>rac</i> -1-A3	73
29(a)	Structure RX du N-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide 1-A3	78

29(b)	Empilement cristallin intermoléculaire montrant les liaisons hydrogènes potentielles N—H•••O présentés en pointillés tout au long de l'axe c.	78
30	les carbodiimides les plus utilisés à grande échelle	83
31	Structure RX du N-(4-Bromophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (<i>rac</i> -1-A7)	94
32	Spectre RMN ¹ H du <i>rac</i> -4-A3	97
33	Spectre RMN ¹³ C du <i>rac</i> -4-A3	97
34	Exemples de molécules bioactives ayant un oxygène ou azote en position α - du centre stéréogénique	108
35	Substrats à dédoubler	108
36	Acides carboxyliques sélectionnés	109
37	Profil cinétique du dédoublement cinétique enzymatique par estérification du <i>rac</i> -6 par l'acide acétique	117
38	Structures tridimensionnelles des lipases choisis	118

N°	Titre	Page
1	Spécificité enzymatique	9
2	Réaction enzymatique	17
3	Production de la vitamine B3 par Lonza	23
4	Procédés industriels biocatalysés de l'Amoxicilline et du Céfaclor	24
5	Production biocatalysée d'herbicides énantiomériquement purs	25
6	Production biocatalysée de l'Odanacatib	26
7	Production biocatalysée du Tipranavir	26
8	Production biocatalysée du Brivaracetam	27
9	Illustration du principe du dédoublement cinétique enzymatique	30
10	Mécanisme d'un dédoublement cinétique enzymatique	30
11	Mécanisme des réactions catalysées par les hydrolases à sérine	35
12	Biotransformation possibles par la sérine hydrolase	36
13	Dédoublement cinétique via benzylation enzymatique du 1-méthyl-3-phényl-propyl amine	38
14	Dédoublement cinétique via acylation enzymatique du <i>rac</i> -1-chloro-3-(4-(2-méthoxyéthyl)phénoxy)propan-2-ol.	38
15	Dédoublement cinétique via estérification enzymatique du <i>rac</i> -2-(4-méthyl phényl) propionique acide	39
16	Dédoublement cinétique via estérification enzymatique du flurbiprofène racémique : Effet du solvant	40
17	Effet du solvant lors de l'acylation du 4-hydroxy-4-phénylbutan-2-one	41
18	Effet du solvant lors de l'acylation du <i>rac</i> - <i>N</i> -(6-hydroxy-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl) acétamide	42
19	Catégories d'agents acylants	43
20	Acylation enzymatique du α -tetralol par différents agents acylants	43
21	Acylation enzymatique du 1-(quinolin-3-yl) éthanol par différents agents acylants	44
22	Différentes catégories de donneurs d'acyle utilisées pour la protection des amines	45
23	Aminolyse enzymatique du 1-phényléthanamine : effet du donneur d'acyle	46
24	Aminolyse enzymatique du 1-phényléthanamine : Procédés brevetés BASF	46
25	Alcoolyse enzymatique du 1-phényléthyl acétate : Effet du nucléophile	47
26	Estérification enzymatique de l'acide 2-méthylbutyrique racémique : Effet de l'alcool	48
27	Influence de la structure du substrat lors d'alcools benzyliques secondaires	49

28	Influence de la structure du substrat sur la performance catalytique de la <i>CAL-B</i>	49
29	Amidation enzymatique d'amines primaires par l'acide 4-penténoïque	50
30	Amidation enzymatique d'amines primaires par l'acide laurique	51
31	Transestérification lipasique des esters de l'ibuprofène	52
32	Réaction modèle	57
33	Estérification de l'Ibuprofène par le méthanol dans différents solvants catalysée par la <i>CCL</i>	58
34	Hydrolyse de l'ester éthylique de l'Ibuprofène catalysée par des lipases génétiquement modifiées	59
35	Mécanisme postulé de l'amidation par la lipase de <i>CAL-B</i>	62
36	Acidification des sels de l'ibuprofène	63
37	Synthèse du 2-(4-isobutylphényl)- <i>N</i> -(4-(trifluorométhyl)phényl)propanamide racémique (<i>rac</i> -1-A1)	64
38	DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet du solvant	67
39	Structure des amines choisies	70
40	Synthèse des amidopropènes racémiques (<i>rac</i> -1-A2-A6).	70
41	DCE de l'ibuprofène par amidation : effet de la structure de l'amine	73
42	Quelques exemples sur les molécules portant une fonction amide	81
43	Aminolyse thermique d'acide carboxylique/amine primaire sous une activation non-conventionnelle	82
44	Amidation par couplage en utilisant le DCC d'un acyle pipérazine	84
45	Aminolyse catalysée par des acides benzo-boronique <i>ortho</i> -substitués	85
46	Aminolyse catalysée par le $ZrCl_4$	86
47	Aminolyse catalysée par le $NiCl_2$	87
48	Aminolyse enzymatique d'acide phénolique	88
49	Réaction d'amidation enzymatique versus l'amidation chimique	89
50	mécanisme de la réaction d'amidation enzymatique des acides carboxyliques	92
51	Amidation du <i>rac</i> -4 par <i>p</i> - CF_3 -aniline catalysée par la <i>CAL-B</i> à l'échelle de 1g	96
52	Amidation enzymatique versus amidation chimique de la L-Boc-proline	98
53	<i>O</i> -acylation d'alcools secondaires par l'acide décanoïque catalysée par la <i>CAL-B</i>	106
54	<i>O</i> -acylation du 2-méthoxy-2-phényléthanol catalysée par la <i>CAL-B</i>	106
55	<i>N</i> -acylation d'amines primaires par l'acide 4-penténoïque	107

56	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysée par la <i>CAL-B</i> : Effet du solvant	110
57	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysée par la <i>CAL-B</i> : Effet du solvant	113
58	Mécanisme de la <i>O</i> -acylation catalysée par la <i>CAL-B</i>	115
59	<i>O</i> -acylation lipasique du 1-phényl éthanol par des AC	119
60	Synthèse des amides racémiques 7a, 7d et 7e	125
61	Synthèse des amides racémiques 7c et 7f	126
62	<i>N</i> -Acylation du 1-phényléthanamine catalysée par la <i>CAL-B</i> : impact de la structure de l'acide carboxylique.	126

N°	Titre	Page
1	Les deux énantiomères du <i>rac-1</i> en utilisant un mélange d'éluants (v, v) : isohexane/ isopropanol (95/05) et (98/02).	63
2	Les deux énantiomères du <i>rac-1-A1</i>	64
3	Dédoublage cinétique par amidation catalysée par la <i>CAL-B</i> de l'ibuprofène	76
4	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysée par la <i>CAL-B</i> : Effet du solvant	112
5	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysée par la <i>CAL-B</i>	115
6	<i>O</i> -acylation lipasique du 1-phényléthanol <i>rac-6</i> par différents acides carboxyliques	124

N°	Titre	Page
1	Impact de la structure de l'amine en fonction de solvant lors de l'amidation du <i>rac</i> -1 catalysée par la <i>CAL-B</i>	76
2	Fréquence de publication des agents de couplage	83
3	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysée par la <i>CAL-B</i> : Effet du solvant.	112
4	<i>O</i> -acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysée par la <i>CAL-B</i> : Effet du solvant.	114

SOMMAIRE

	Page
Résumé	I
Dédicace	IV
Remerciements	V
Liste des symboles et des abréviations	VI
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des schémas	XI
Liste des Chromatogrammes	XIV
Liste des Histogrammes	XV
Sommaire	XVI
INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIÈRE PARTIE : MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE	
INTRODUCTION DE LA PREMIÈRE PARTIE	8
<u>CHAPITRE I : Biocatalyse et Chimie verte</u>	
I-1-Introduction	11
I-2-Généralités sur les enzymes	12
I-2-1- Définition et structure	12
I-2-2- Classification des enzymes	15
I-2-3- Fonctionnement des enzymes	16
I-2- 4- La cinétique de la catalyse enzymatique	16
I-2-5- Facteurs influençant l'activité enzymatique	18
I-2-6- Les lipases	19
I-3-La biocatalyse et la chimie verte	20
I-4- Applications industrielles de la biocatalyse	23
I-5- Accès aux molécules à visée thérapeutique par biocatalyse	25
I-6- Conclusion	27

CHAPITRE II : Dédoublément cinétique enzymatique

II-1- Introduction	28
II-2- Le Dédoublément cinétique enzymatique	29
II-2-1- Principe	29
II-3- Paramètres d'évaluation d'un DCE irréversible	31
II-4- Variations des excès énantiomérique en fonction de la conversion	32
II-5- Règles empiriques d'énantiopréférence des lipases	33
II-6-Mode d'action des lipases	34
II-7- Paramètres influant sur la réaction du DCE	36
II-7-1- Nature de l'enzyme	37
II-7-2- Nature du solvant	39
II-7-3- Nature du donneur /accepteur d'acyle	42
II-7-4- Nature de substrat	48
II-8- Conclusion	52
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE	53

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

INTRODUCTION DE LA DEUXIEME PARTIE	54
---	-----------

CHAPITRE III : Dédoublément cinétique via amidation enzymatique de l'Ibuprofène

III-1- Introduction	56
III-2- Aperçu bibliographique	57
III-3- Dédoublément cinétique via amidation enzymatique de l'Ibuprofène	59
III-3-1-Choix des modèles de l'étude	59
III-3-2-Synthèse des racémiques	62
III-3-3-DC <i>via</i> amidation enzymatique de l'Ibuprofène : effet du solvant	67
III-3-4-DC <i>via</i> amidation enzymatique de l'Ibuprofène : effet de la structure de l'amine	70
III-4- RX du <i>N</i> -(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (<i>rac</i> -I-A3)	77
III-5- Conclusion	80

**CHAPITRE IV : Synthèse éco-compatible d'amides à haute valeur ajoutée catalysée par la
CAL-B**

VI-1- Introduction	81
VI-2- Etat de l'art	82
VI-3- Aperçu bibliographique sur la réaction d'amidation par voies catalytiques	85
VI-3- 1-En utilisant des catalyseurs non-métalliques (L'organocatalyse)	85
VI-3-2-En utilisant des catalyseurs métalliques (Métallo-catalyse)	86
VI-3-3-En utilisant des enzymes (Biocatalyse)	87
VI-4- Objectifs de l'étude	88
VI-5-Amidation des acides carboxyliques rac-1-4 catalysée par la CAL-B	89
VI-5-1- Discussion des résultats de l'amidation biocatalytique	93
VI-5-2- Amidation enzymatique de l'acide 2-phénoxypropionique (<i>rac</i> -4) par le biais de la <i>p</i> -CF ₃ -aniline	96
VI-6-Amidation de la L-Boc-Proline catalysée par la CAL-B versus amidation chimique classique par le DCC	98
VI-7- Conclusion	100

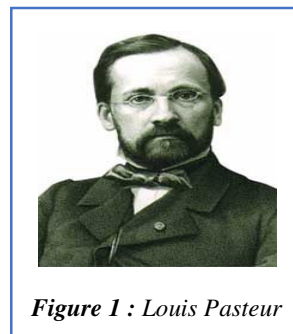
**CHAPITRE V : O-Acylation enzymatique du 1- phényléthanol
versus N-Acylation enzymatique du 1-phényléthanamine : Impact d'acides gras comme
agents acylants verts**

V-1- Introduction	102
V-2- Problématique posée et Objectifs visés	103
V-3- Quelques exemples de la littérature	105
V-4- Intérêts des substrats choisis et esters et des amides	107
V-5- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Voie de synthèse éco-compatible d'esters à haute valeurs ajoutée	109
V-5-1- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Effet du solvant	110
V-5-2- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Profil cinétique	116
V-5-3- Influence de la structure de l'AC sur la réactivité et la sélectivité lipasique	117
V-6- N-Acylation enzymatique du 1-phényléthanamine : Voie de synthèse éco-compatible d'amides à haute valeurs ajoutée	124
V-6- 1- Synthèse des amides racémiques	125
V-6- 2- DC par acylation du <i>rac</i> -7 par le biais de la CAL-B	126

V-7- Conclusion	129
CONCLUSION GENERALE	131
PARTIE EXPERIMENTALE	134
ANNEXE 1 Spectres	163
ANNEXE 2 Publication	200
ANNEXE 3 Communications	209

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La dissymétrie moléculaire a fait l'une des plus grandes découvertes scientifiques, en effet, dans l'année 1847, le jeune chercheur **Louis Pasteur** découvre au début de sa carrière que deux molécules présentant le même nombre d'atomes et les mêmes connectivités entre leurs atomes pouvaient avoir des propriétés différentes. La majorité des molécules naturelles, telles : les acides α -aminés et les sucres sont chirales et existent à l'état naturel sous la forme d'un unique énantiomère.



Ce phénomène qui décrit le fait que certaines figures ou corps ne sont pas superposables à leurs images dans un miroir est généralement illustré par les deux mains comme les deux pieds ou les structure de plusieurs formes de vie comme les coquilles d'escargots, est traduit par la notion de *chiralité*.

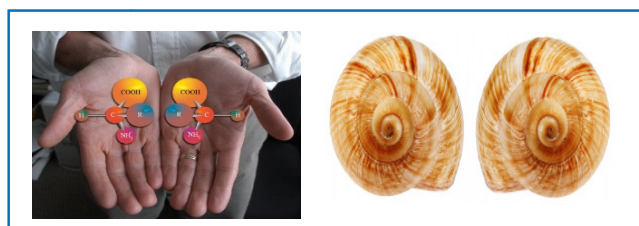


Figure 2 : Schématisation de la chiralité.

Cette propriété détermine les fonctions biologiques et physiologiques des protéines, récepteurs et des différents acides nucléiques des organismes vivants ainsi que les phénomènes régulateurs du développement.¹ En outre, les processus métaboliques et régulateurs des systèmes biologiques sont sensibles à la stéréochimie et différentes réponses peuvent être observées en comparant les activités des énantiomères.²

Par exemple, la stéréospécificité des récepteurs olfactifs peut être illustrée par l'exemple du **limonène** dont l'un des énantiomères donne l'odeur du citron et l'autre celle de l'orange, ou encore par celui de la **carvone**, où la dextrogyre (+) sent du carvi tandis que son antipode optique sent la menthe. (**Figure 3**)

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

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



Figure 3 : Les énantiomères du limonène et de la carvone.

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

Le **tableau 1**, récapitule quelques exemples de molécules présentant des activités biologiques différents liés à leurs stéréochimies

Le comportement assez différent des énantiomères d'une molécule chirale, peut avoir des conséquences dramatiques. L'exemple le plus tragique et qui remonte aux années 60, est celui de la **Thalidomide** où elle était prescrite aux femmes enceintes et administrée sous forme racémique. Son énantiomère (*S*) était tératogène et responsable de malformations congénitales³.

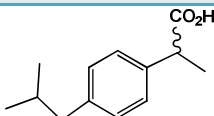
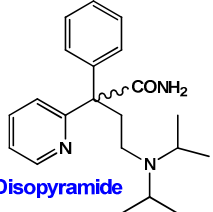
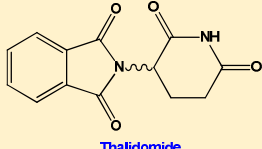
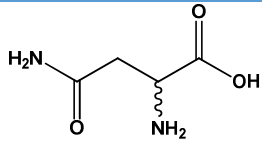
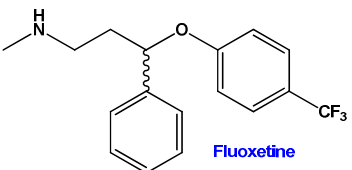
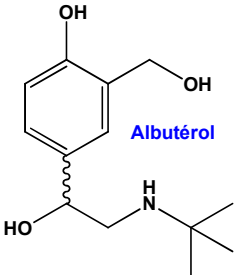
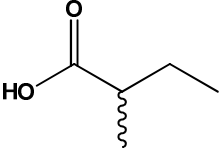
Depuis lors, la séparation des énantiomères et l'obtention des molécules optiquement pures sont devenues une nécessité dans la préparation des médicaments et dans d'autres domaines tels que : l'agrochimie, les arômes et les cosmétiques. Cela est devenu une exigence, par des législations ordonnées par autorités sanitaires réglementaires américaine et européenne la **FDA** (Food and Drug Administration) en **1992**, et l'**ECPMP** (European Committee for Proprietary Medicinal Products) en **1993**, imposant que la commercialisation d'un racémique ne peut être autorisée que si on trouve que les deux énantiomères ont les mêmes propriétés biologiques⁴. Cela est de plus en plus strict lors de la commercialisation des médicaments

³S. Fuchs, R. Berger, L. Klomp, T. De Koning, *Mol. Genet. Metab.* **2005**, 85,168.

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

racémiques. En effet, en **1995**, la recette de tels produits a atteint 60 milliards de dollars aux États-Unis et elle n'a cessé d'augmenter depuis a travers du monde.⁵

Tableau 1 : Dépendance activité biologique/ stéréochimie de quelques molécules chirales.

Structure	Configuration absolue	Effets biologiques
 Ibuprofène	<i>R</i>	Antalgique et antirhumatismal
	<i>S</i>	Inactif
 Disopyramide	<i>R</i>	Inactif
	<i>S</i>	Anti-arythmique
 Thalidomide	<i>R</i>	Anti-nauséux
	<i>S</i>	Tératogène
 Asparagine	<i>R</i>	Goût sucré
	<i>S</i>	Goût amère
 Fluoxétine	<i>R</i>	Antidépresseur
	<i>S</i>	Anti-migraine
 Albutérol	<i>R</i>	Bronchodilatateur
	<i>S</i>	Spasmogène
 Acide 2-méthylbutanoïque	<i>R</i>	Odeur de sueur et de fromage
	<i>S</i>	Odeur fruitée douce

⁵ S. C. Stinson, *Chem. Eng. News*, **2001**, 79, 45.

Conjointement à la prise de conscience de l'importance de la chiralité et les besoins de disposer des médicaments sous forme d'un seul énantiomère, une nouvelle pratique appelée le « *chiral switch* », s'est apparue, et ce, par la mise sur le marché de l'énantiomère de la molécule précédemment commercialisée. Cela permet d'augmenter les bénéfices et de prolonger les brevets. Cette stratégie permet de monopoliser l'exploitation d'un médicament donné et lutter contre l'industrie du médicament générique.⁶

Il est donc indispensable de disposer de diverses méthodes pour concevoir les molécules sous leur aspect énantiomériquement pur. Il existe trois approches⁷:

- ✂ *Par dédoublement d'un mélange racémique* qui peut être, soit spontané⁸, soit cinétique avec un réactif chiral (stœchiométrique) ou un catalyseur chiral (enzyme), soit par séparation de diastéréoisomères formés grâce à un auxiliaire chiral optiquement pur.
- ✂ *Par synthèse asymétrique* qui correspond en l'introduction d'un élément d'asymétrie au sein d'une espèce prochirale à l'aide d'un réactif ou un catalyseur chiral.
- ✂ *Par transformation hautement stéréosélective de synthons chiraux* qui sont souvent des molécules d'origine naturelle (sucres, alcaloïdes, acides aminés) qui subissent une succession de transformations hautement stéréosélectives pour parvenir à l'énantiomère souhaité.

Parmi ces méthodes, la synthèse asymétrique et les méthodes de dédoublements sont les plus exploitées à l'échelle industrielle (pharmaceutique, agro-chimique, alimentaire, arômes et parfumerie,.....) pour parvenir aux briques moléculaires d'une haute valeur ajoutée. Les dédoublements cinétiques biocatalysés s'avèrent la méthode la plus pratique pour accéder facilement aux molécules énantiomériquement pures ou enrichies.⁹

L'utilisation des enzymes comme catalyseurs polyvalents en chimie organique ; biodégradables, faciles à manipuler, moins polluants, hautement stéréosélectifs est une voie

⁶(a) I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**, 1, 753-768 ; (b) A. J. Hutt, J. Valentová, *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana*, **2003**, 50, 23; (c) A. Somogyi, F. Bochner, D. Foster, *Australian Prescriber*, **2004**, 27, 47-49 ; (d) *Pharma-Flash*, ISSN 0378-7958, **2006**, 33, 7-10 ; (e) A. G. Nerkar, K. S. Lade, N. A. Gadhav, S. D. Sawant, *Journal of Pharmacy Research*, **2011**, 4, 1300-1303; (f) M. J. Sweet, *Berkeley Technology Law Journal*, **2009**, 24, 129-147.

⁷C. Rabiller., « *Stéréochimie et Chiralité en Chimie Organique* », Boeck & Larcier, s.a, **1999**.

⁸L. Pasteur., *Ann. Chim. et Phys.*, **1848**, 24, 442.

⁹(a) Z. S. Seddigi, M. S. Malik, S. A. Ahmed, A. O. Babalghith, A. Kamal, *Coordination Chemistry Reviews*, **2017**, 348, 54-70. (b) J. M. Choi, S. S. Han, H. S. Kim, *Biotechnology advances*, **2015**, 33, 1443-1454. (c) K. Faber, « *Biotransformations in Organic Chemistry* », 9th ed.; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, **2018**.

en plein expansion dans les différents domaines de la chimie organique fine. Ils assurent une traçabilité linéaire vers des bioprocédés biocatalysés¹⁰ moins consommateur d'énergie comparant aux catalyseurs traditionnels en s'appuyant sur les douze critères du concept de la chimie verte vers un développement durable¹¹.

Actuellement, une panoplie d'avancées technologiques dévoile l'émergence de procédés biocatalytiques fiables, rapides et économiquement avantageux dans différents secteurs industriels¹². La biocatalyse est devenue le premier choix, non seulement pour la conception des molécules énantiomériquement pures, mais également, une alternative pour réorienter les procédés de chimie organique classique vers des procédés plus efficaces et plus rentables tout en obéissant à certaines exigences environnementales et économiques¹³. Particulièrement avec l'évolution de l'ingénierie de l'enzyme qui permet la conception d'enzymes sur mesures sous des conditions d'intérêt industriel.¹⁴

C'est dans ce contexte que s'orientent les travaux de recherche développés au sein du laboratoire de *Catalyse Asymétrique Eco-Compatible L.C.A.E*, en visant la préparation des molécules bioactives d'intérêt pharmacologique par voies biocatalytiques en tenant en compte les nouvelles contraintes environnementales.¹⁵ Les travaux de recherches développés au cours cette thèse de doctorat s'intègrent parfaitement dans les thématiques de recherche développées au sein du LCAE.

L'objectif visé est la mise aux point de procédés propres biocatalytiques pour accéder aux molécules bioactives énantiomériquement enrichies ou pures dans un cadre d'une approche éco-compatible. Pour ce faire nous avons choisis le mode de dédoublement cinétique par

¹⁰ C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Central Science*, **2021**, *7*, 55-71.

¹¹(a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, **1998**; (b) P. T. Anastas, P. T. Li, *Water as a Green Solvent* (John Wiley & Sons Eds), **2010**; (c) P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 301-312; (d) B. M. Trost, *Science*; **1991**, *254*, 1471-1477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *107*, 285-307, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 259-281.

¹²(a) R. N. Patel, *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, *26*, 1252-1274. (b) S. Wu, R. Snajdrova, J.C. Moore, K. Baldenius, Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88-119. (c) W. Jiang, B. Fang, B. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2020**, *192*, 146-179.

¹³(a) F. Hasan, A. Ali Shah, A. Hameed, *Enzym. Microb. Technol.*, **2006**, *39*, 235-251; (b) C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Org. Proc. Res. Develop.*, **2000**, *4*, 286-290 ; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2004**, *118*, 155-170 ; (d) J. V Prasad, M. Prabhakar, K. Manjulatha, D. Rambabu, K. A. Solomon, G. Krishna, A. Kumar, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 3109-3111; (e) I. Chiarotto, M. M. M. Feeney, M. Feroci, A. Inesi, *Electrochimica Acta*, **2009**, *54*, 1638-1644. (f) A. Mehta, U. Bodh, R. Gupta, *J. Biotech Res.*, **2017**, *8*. (g) A. K. Singh, M. Mukhopadhyay, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 486-520. (h) A. Basso, S. Serban, *Mol. Catal.*, **2019**, *479*, 110607.

¹⁴(a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, S., J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, **2012**, *485*, 185-194 (b) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 526-529.

¹⁵ Laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-compatible (LCAE). Equipe : Molécules Actives d'Intérêt Pharmacologique (MAIP). Université Badji Mokhtar –Annaba - <http://lcae.univ-annaba.dz/?p=279>

acylation enzymatique, en examinant l'influence de divers paramètres pouvant moduler la sélectivité et la réactivité de quelques lipases d'une large application industrielle et commercialement disponibles. Nous avons sélectionné des molécules mono fonctionnalisées d'une haute valeur ajoutée, en l'occurrence, des acides α -arylpropionique (Profènes), des acides carboxyliques gras, le 1-phényléthanol et le 1-phényléthylamine.

L'ensemble de ces travaux sont réunis dans le présent manuscrit de thèse et repartis en deux parties :

La première partie intitulée « *Mise au point bibliographique* » est dédiée à une revue de la littérature sur la biocatalyse comme une méthode de pointe pour la conception des molécules à haute valeur ajoutée et ces applications en biotechnologies industrielles ainsi son relief direct avec le concept de la chimie verte. Elle est subdivisée en deux chapitres (**I, II**).

- ✓ Le **premier chapitre** traite la relation entre le concept de la chimie verte et la biocatalyse comme une méthode d'une large application industrielle pour la conception des molécules d'intérêt potentiel dans différents domaines de la chimie organique fine.
- ✓ Le **second chapitre** est consacré à la mise au point bibliographique sur le dédoublement cinétique enzymatique et sa potentialité comme un mode très appliqué pour obtenir des briques moléculaires chirales énantiomériquement pures ou enrichies.

La **deuxième partie** est consacrée à la présentation des résultats et discussions. Elle comprend trois chapitres (**III-V**).

- ✓ Dans le **chapitre (III)** nous présentons les résultats de l'optimisation de la réaction de dédoublement cinétique *via* amidation enzymatique de l'Ibuprofène. Une discussion des résultats concernant l'impact de quelques paramètres, en l'occurrence, l'hydrophobicité du solvant organique et la nature du partenaire amine sur le comportement lipasique sera détaillée.
- ✓ Dans le **chapitre (IV)**, nous détaillons les résultats de valorisation de la réaction d'amidation discutée lors du chapitre précédent, pour la mise au point d'une synthèse facile et éco-compatible d'une série de nouveaux amides dérivés d'acides α -arylpropioniques (Profènes), acide α -phénoxy propionique et dérivés de la *L*-Boc-proline. Une comparaison avec une méthode chimique sera, également présentée.

- ✓ Le dernier **chapitre (V)** est consacré à l'étude du comportement de trois lipases sur l'évolution de la *N*-acylation de la 1-phényléthanamine et la *O*-acylation du 1-phényl éthanol en utilisant des acides carboxyliques gras comme donneurs d'acyles verts.

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

PARTIE 1

Mise au point bibliographique

Introduction de la première partie

Introduit en 1836 par Berzelius, le terme *catalyse* est utilisé pour qualifier quelques faits expérimentaux observés au cours de différentes réactions chimiques découvertes au début du 19^{ème} siècle, mais il est resté longtemps très mal compris jusqu'au début du 20^{ème} siècle, avec la naissance du concept de la chimie verte énoncé par Anastas et Warner¹. Fondée sur douze principes, la catalyse est classée 9^{ème} et est considérée son pilier. Les normes environnementales contraignent les industries à remplacer les réactions stœchiométriques par des réactions catalytiques. Depuis lors la plupart des procédés de synthèse industriels emploient des catalyseurs. L'utilisation de ces derniers permet une augmentation de la vitesse de réaction et évite des coûts énergétiques trop importants. L'engouement pour la catalyse a pris une nouvelle dimension, ce qui est dû à une prise de conscience concernant la gestion des ressources énergétiques et matières premières et les problèmes d'environnement².

Dans ce cadre les procédés industriels adoptent trois classes de catalyse : hétérogène, homogène et enzymatique.

- ✂ *La catalyse hétérogène* dans laquelle le catalyseur et les réactifs forment plusieurs phases, on utilise des catalyseurs, souvent inorganiques, principalement en chimie lourde, 70% des réactions catalytiques emploient ce type de catalyseurs³, leur exploitation est restreinte en chimie fine à cause de leur faible sélectivité.
- ✂ *La catalyse homogène* : quand le catalyseur et les réactifs ne forment qu'une seule phase. elle est encore peu utilisée dans l'industrie, seulement 20% des réactions catalytiques utilisent ce type de catalyseur, pourtant ils présentent une grande énantiosélectivité.
- ✂ *La catalyse enzymatique* : les enzymes sont des catalyseurs très efficaces, mais nécessitent des conditions très précises pour agir et ils sont très sélectifs. Ces dernières armes intègrent progressivement les protocoles industriels.

¹(a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York. **1998**; (b) P. T Anastas, P. T. Li, *Water as a Green Solvent* (John Wiley & Sons Eds). **2010**; (c) P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 301-312; (d) B. M. Trost, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 259-281.

² www.cnrs.fr/comitenational/doc/rapport/2010/12_conj_2010.pdf. *Rapport de conjoncture 2010: Architectures moléculaires : synthèses, mécanismes et propriétés.*

³ H. U. Blaser, *Catalysis Today*, **2000**, *60*, 161-165.

Ce dernier type de catalyse exploite, soit des enzymes isolées, soit des micro-organismes entiers, soit des cultures cellulaires, et peut être classée à l'intermédiaire entre la catalyse hétérogène et la catalyse homogène, et ce, par le bien de la possibilité du recyclage du catalyseur (avantage de la catalyse hétérogène), et par le bien de la haute sélectivité (avantage de la catalyse homogène).⁴En chimie organique, l'intérêt de la biocatalyse s'étend de la définition classique d'un catalyseur vers des notions plus spécifiques telles que la régio-, la chimio- la diastéréo - et l'énantiosélectivités (**Schéma1**).

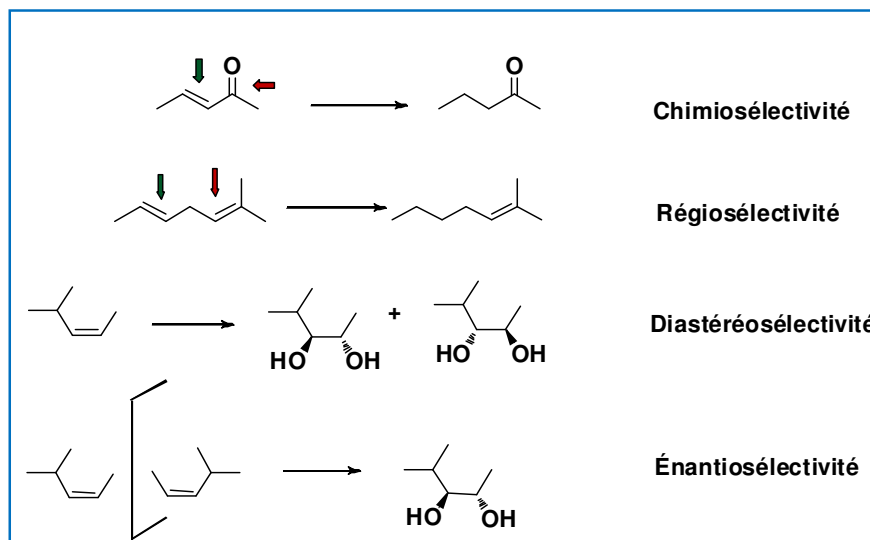


Schéma 1: Spécificités enzymatique.

Dans cette première partie de notre travail intitulée « *Mise au point bibliographique* », nous présentons une synthèse bibliographique sur l'importance des méthodes biocatalytiques permettant un accès aisé aux molécules chirales d'intérêt potentiel, et ce, dans un cadre de chimie durable. Nous exposons également les procédés biocatalytiques énantiosélectives les plus répandus à l'échelle industrielle, principalement, le dédoublement cinétique enzymatique.

Cette partie est subdivisée en deux chapitres :

- Le *chapitre I* intitulé « *Biocatalyse et chimie verte* » est consacré à une mise au point bibliographique sur l'application des procédés biocatalysés à l'échelle industrielle pour la

⁴ G. Rothenberg, "Catalysis: Concepts and Green application", Wiley-VCH: Weinheim, 2008.

préparation des molécules bioactives et l'alliance de ces biotechnologies avec la chimie verte.

- Le *chapitre II* intitulé « *Dédoublement cinétique enzymatique* » dans lequel nous mettons l'accent sur l'efficacité de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique pour la préparation de briques moléculaires énantiomériquement pures ou enrichies d'intérêt potentiel : médicaments, agroalimentaires, arômes et cosmétiques...

CHAPITRE I :

Biocatalyse et chimie verte

I-1-Introduction :

L'utilisation de la « **catalyse enzymatique** », où encore la « **biocatalyse** » a été connue depuis l'antiquité. Les premières civilisations (ancien Babylon, de Rome, Grèce, Egypt, Chine et l'Inde) ont utilisés des enzymes issues des microorganismes pour la production du vinaigre et dans les procédés de fermentation (alcools, bières, fromages et pain)¹. Le diagramme ci-dessous (**Figure 4**) représente l'évolution chronologique de la biocatalyse, qui était très tôt exploitée par rapport à l'énoncé des douze principes de la chimie verte.²

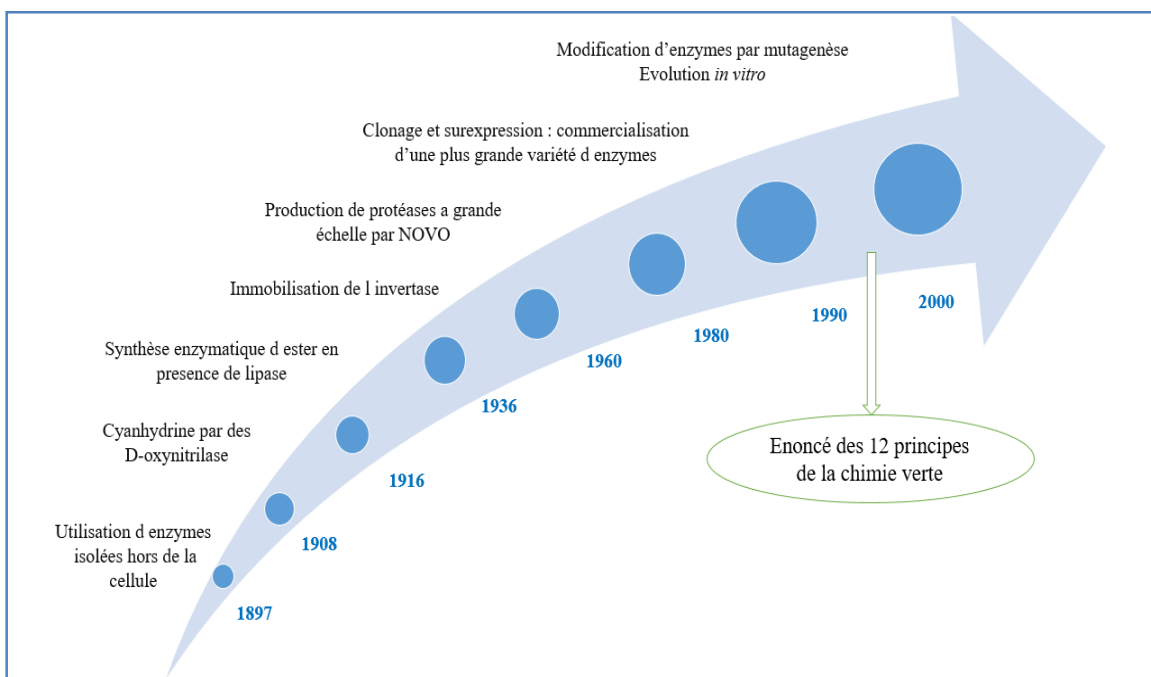


Figure 4 : Evolution de la biocatalyse.

Au début de la millénaire, l'application industrielle de cette biotechnologie a connu une évolution importante, **134** procédés de bioconversions industrielles ont été enregistrés et étaient répartis entre l'industrie agroalimentaire, les détergents, le textile, papeterie, teintures, et d'une grande part dans l'industrie pharmaceutique³. Malheureusement, cette tendance a connu certaines limitations telles que : la stabilité des enzymes et leurs coûts. Cette problématique est actuellement remédiée grâce aux progrès spectaculaires dans le séquençage

¹R. A. Copland, " *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Chapter 1: A Brief history of enzymology*". **2000**, Wiley-VCH, Inc.; ISBNs:0-471-35929-7.

²http://www.cnrs.fr/mi/IMG/pdf/cnrs_10_juillet_paris_laurence_hecquet.pdf

³(a) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature*, **2001**,409, 258–268. (b) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 548-556.

(méta) génomique, la bio-informatique moderne et la modélisation informatique assistée par l'ingénierie enzymatique (Frances Arnold, Prix Nobel en 2018, pour le développement de l'ingénierie enzymatique)⁴. Actuellement, plusieurs centaines de procédés de bioconversions sont implantées dans divers secteurs industries et particulièrement dans l'industrie pharmaceutique.⁵

I-2-Généralités sur les enzymes :⁶

L'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseurs doués d'une haute spécificité a constitué une véritable révolution pour la préparation de nouvelles molécules organiques d'intérêt potentiel. La facilité de mise en œuvre de ces catalyseurs, ainsi que l'exploitation de méthodes d'immobilisation des enzymes libres (ou sous forme sauvage)⁷, facilite leur récupération par simple filtration et autorise une éventuelle réutilisation, ce qui permet de classer ce type de catalyse comme hétérogène. Elle est considérée comme complémentaire à la catalyse homogène par bien des aspects tels que : la reconnaissance d'un seul énantiomère, la grande stéréo- sélectivité des enzymes, et un **TON** (*Number of turn over*) élevé.

I-2-1- Définition et structure :

Les enzymes sont des biocatalyseurs (d'origine animale, végétale ou microbienne) essentielles pour toutes les cellules vivantes. Dans leurs majorité, elles sont de nature protéique elles résultent de la condensation d'acides α -aminés de la série *L* avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé et ainsi de suite, de proche en proche, pour constituer une protéine (polypeptide de masse moléculaire élevée). Les masses moléculaires des enzymes varient de 10 000 Da à 1 000 000 Da environ.

L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés constitue la **structure primaire** est la séquence dans lequel les acides aminés sont disposés linéairement dans la chaîne protéique. Dès que la structure primaire s'enroule sur elle-même elle constitue la **structure secondaire**

⁴(a) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3351 – 3367. (b) S. Galanie, D. Entwistle, J. Lalonde, *Natural product reports*, **2020**, 37, 1122-1143

⁵(a) E. Valeur, S. M. Guéret, H. Adihou, R. Gopalakrishnan, M. Lemurell, H. Waldmann, A. T. Plowright, *Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 10294-10323. (b) J. M. Woodley, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2019**, 103, 4733-4739.

⁶ (a) E. Brown, J. F. Biellmann, © *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, Doc. J 1 240-2*, PP 1-13. (b) H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, **2009**. (c) C. Vollhardt, "*Traité de chimie organique*", DeBoeck université, Traduit par P. Depovere, 2^{ème} édition, Bruxelles, **1994**. (d) Graham L. Patrick, "*Chimie pharmaceutique*", 2^{ème} édition, de Boeck supérieure, **2002**.

⁷ P. Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6406-6436.

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

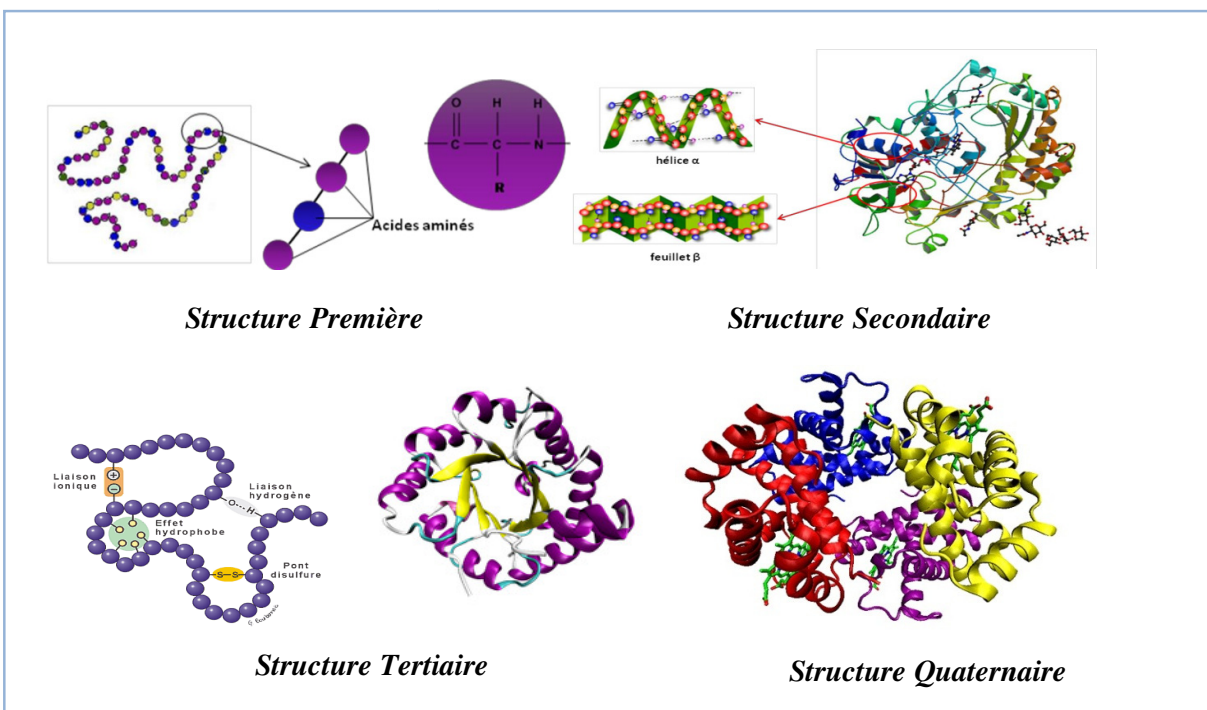


Figure 5 : Les structures des enzymes.

La chaîne polypeptidique se replie pour donner un édifice tridimensionnel bien défini. La diffraction des rayons X sur des cristaux d'enzymes permet de décrire cette structure, dans laquelle on distingue une cavité où s'effectuera la réaction catalysée par l'enzyme. Cette cavité est dite **site actif**. Les substrats viennent s'ancrer et réagissent au sein du site actif, qui ne présente généralement qu'une partie infime de l'ensemble de la structure de protéine. L'environnement chiral de ce site détermine l'empreinte stéréosélective particulière des enzymes, soit *chimio-*, *régio-*, *diastéréo-* et *énantiosélectivité* au cours du processus catalytique.

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

- Modèle clé-serrure : proposé par **Emil Fisher en 1894.(figure 6).**
- Modèle de l'ajustement induit : proposé par **Daniel. E., Koshland. Jr.(figure 7).**

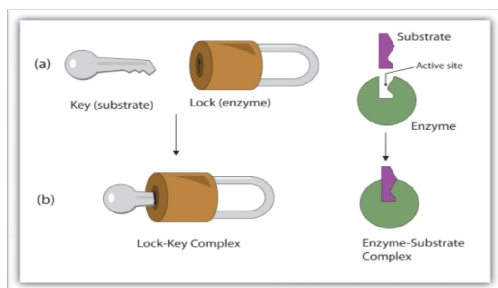


Figure 6 : Modèle clé-serrure

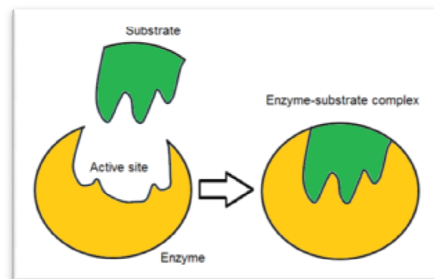


Figure 7 : Modèle de l'ajustement induit

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

Plusieurs enzymes nécessitent la présence d'une molécule, qui n'est pas un acide aminé, appelée *cofacteur* ou *coenzyme* est absolument nécessaire à la catalyse. Ces substances chélatantes vont interagir avec l'enzyme afin qu'elle retrouve son état initial et puisse amorcer un nouveau cycle catalytique. De ce fait, ils ont un rôle d'accepteur et/ou de donneur d'électrons et de protons. Les cofacteurs sont souvent des ions métalliques (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , etc....) et les *co-enzymes* sont des petites molécules organiques.⁸

D'autre part, à la surface externe d'une enzyme on trouve une couche d'eau de solvation ainsi que quelques molécules d'eau, située en son cœur, appelée l'eau constitutive, elle est impliquée dans un réseau de liaison hydrogène qui lui confère la flexibilité structurale indispensable à son fonctionnement lui permettant de jouer un rôle lubrifiant.⁹

⁸ B.Augère, "Les enzymes biocatalyseurs protéiques". Ell. Edi. Mark, **2001**.

⁹ H. Debbeche, *Réactivité de quelques anhydrides cycliques dans la réaction d'acylation enzymatique d'alcools chiraux* (Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba). **2011**, pp 27.

I-2-2- Classification des enzymes :¹⁰

Le classement des six catégories suivantes des enzymes a été établi par l'union internationale de biochimie (UIBMB) en collaboration avec l'IUPAC. Il est exécuté en fonction de la spécificité de l'enzyme pour un seul type de réaction et un substrat déterminé. **(Figure 8)**

1) **Les hydrolases** : cette classe est la plus importante et la plus utilisée car elle ne nécessite pas de co-enzyme. Ce groupe permet l'hydrolyse (d'esters, d'amides, époxydes...) et permet aussi la transestérification des alcools. **Exemple** : les lipases.

2) **Les transférases** : transfèrent des groupements fonctionnels (acyle, alkyl, phosphate, amino,...). **Exemple** : l'alanine transaminase.

3) **Les lyases** : ce type de catalyseurs favorise les additions de HX sur les doubles liaisons comme C=C, C=N, C=O et leur processus inverse. **Exemple** : la pyruvate décarboxylase.

4) **Les isomérases** : elles catalysent aussi bien les migrations intramoléculaires des doubles liaisons C=C que l'isomérisation *cis* – *trans* et peuvent effectuer les racémisation désirées. **Exemple** : le Maléate isomérase.

5) **Les oxydoréductases** : catalysent les réactions d'oxydoréduction et englobent les réactions d'oxygénation. **Exemple** : les oxydases.

6) **Les ligases (synthétases)** : elles permettent la formation de divers types de liaisons telles que C-O, C-C, C-S, C-N. **Exemple** : la pyruvate décarboxylase.

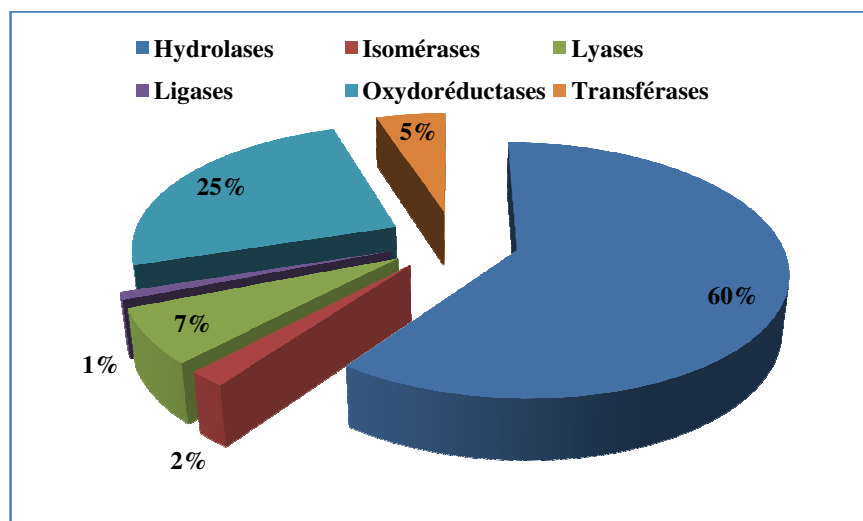


Figure 8 : Classification des enzymes

¹⁰(a) K. Drauzand, H. Waldmann, "Enzyme Catalysis", Ed. Wiley-VCH verlag, GmbH, Weinheim. 2002. (b) J. E. Puskas, K. S. Seo, M. Y. Sen, *Eur. Polym. J.*, 2011, 47, 524-534 ; (c) S. Sen, J. E. Puskas, *Molecules*, 2015, 20, 9358-9379.

Les hydrolases et les oxydoréductases sont les classes les plus utilisées en bioconversions industrielles pour leur facilité de mettre en œuvre et leur disponibilité commerciale. Environ 60% de ces enzymes sont des hydrolases (lipases, estérases, protéases), et 25% sont des oxydoréductases.

I-2-3- Fonctionnement des enzymes :

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

- ✓ **Diffusion** : Les réactions sont réalisées dans des conditions telles que ces phénomènes ne constituent pas une étape limitante de la vitesse de la réaction.
- ✓ **Reconnaissance enzyme-substrat** : La formation du complexe E-S peut s'expliquer soit par le modèle de simple complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit.
- ✓ **Mécanisme catalytique** : L'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction.
- ✓ **Expulsion des produits** : Une fois l'étape catalytique proprement dite *effectuée*, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est ensuite libéré avec une vitesse variable selon la réaction (**figure 9**).

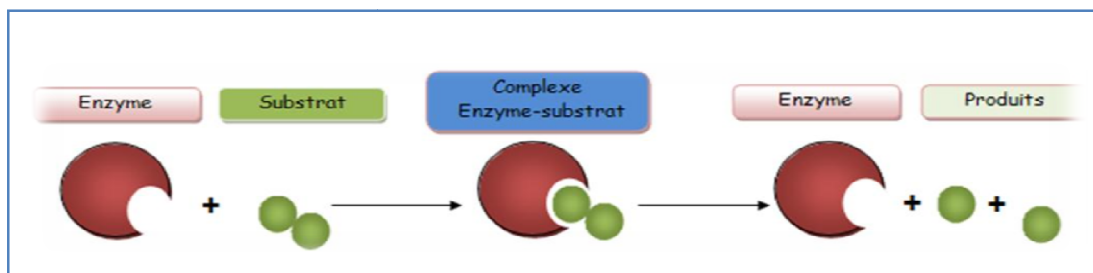


Figure 9 : Mode d'action des enzymes.

I-2-4- La cinétique de la catalyse enzymatique :¹¹

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

¹¹ A. Rogers, Y. Gibon, "Enzyme kinetics: theory and practice. In Plant metabolic networks" 2009, PP 71-103. Springer, New York, NY.

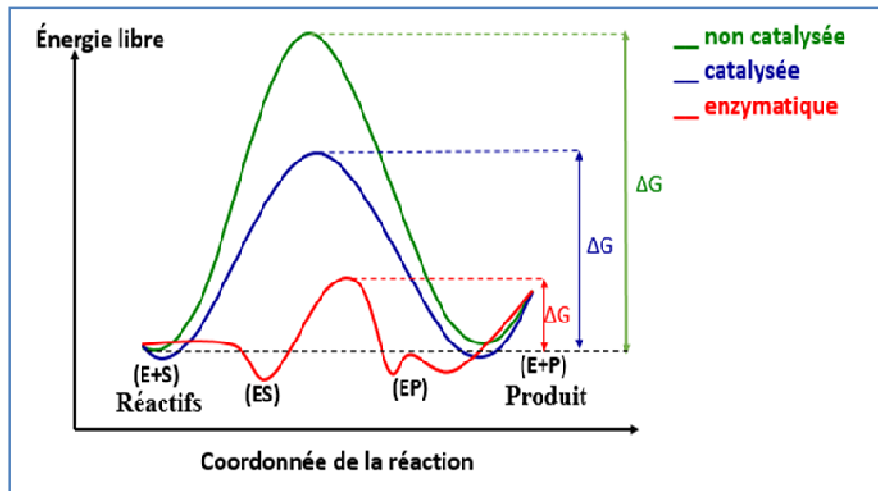


Figure 10 : Diagramme énergétique d'une réaction catalysée par une enzyme.

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

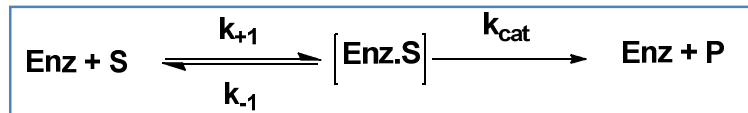


Schéma 2 : Réaction enzymatique.

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

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

k_{cat} : Constante de vitesse de l'étape la plus lente ; c'est la constante de vitesse de l'enzyme.

Cette constante est appelée aussi **TON (turnover)** par le fait qu'elle représente le nombre de molécules converties en produit par le site actif enzymatique par unités de temps.

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

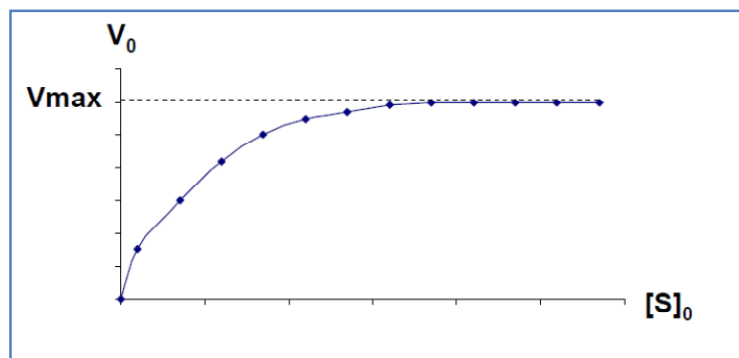


Figure 11 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration.

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

Equation.1.

Or :

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

Equation.2.

k_m est la constante de *Michaelis* qui détermine l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Le rapport (k_{cat}/k_m) appelé constante de spécificité : caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour son substrat, et est un paramètre significatif informant sur l'efficacité d'une enzyme.

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

I-2-5- Facteurs influençant l'activité enzymatique :

Il est connu que la **température**, le **pH** et la **concentration du substrat** sont les principaux facteurs qui influencent l'activité enzymatique en milieu aqueux tout comme en milieu non aqueux. Le pH et la température agissent en synergie sur la conformation de l'enzyme et sa structure tridimensionnelle modifiant ainsi son activité autour de sa température et son pH optimaux.¹² La **concentration du substrat** est également un paramètre très important car elle influence la vitesse de la réaction. D'une part, l'augmentation de cette concentration peut

¹² J. Pelmont, *Enzymes Catalyseurs du monde vivant*; Grenoble Sciences, 2000, 1040.

entraîner l'augmentation de la vitesse de la réaction compte tenu de la loi de vitesse. D'autre part, un substrat en excès peut dans certains cas inhiber l'enzyme et la vitesse de la réaction s'en trouve alors diminuée. De la même façon, l'enzyme peut être également inhibée par le produit de la réaction.¹³ Par ailleurs, d'autres paramètres jouent un rôle très important dans la modulation de l'activité enzymatique : **l'activité de l'eau** et **la pression**. Pour maintenir son action catalytique, notamment en milieu non aqueux, l'enzyme nécessite la présence d'une certaine activité d'eau.¹⁴ Cette dernière peut agir de plusieurs façons sur l'activité enzymatique : en modifiant sa structure par organisation et/ou désorganisation des liaisons non covalentes et des liaisons hydrogène au sein de la protéine, en influençant de façon plus ou moins favorable la diffusion des réactifs et en modifiant l'équilibre de la réaction.¹⁵ D'autre part, la pression agit essentiellement par le changement de l'état d'hydratation des enzymes principalement en modifiant l'organisation des molécules d'eau au sein de ces enzymes. En effet, la pression peut modifier par rupture ou par formation des liaisons non covalentes notamment les liaisons hydrogène qui lient la protéine aux molécules d'eau.¹⁶

I-2-6- Les lipases :

Parmi les six classes d'enzymes, la classe des hydrolases à sérine est de loin le plus utilisé en synthèse organique avec environ les deux tiers des applications¹⁷. Par le bien de leur haute stéréosélectivité, leur stabilité, disponibilité et facilité de manipulation. Elles ne sont pas onéreuses et ne nécessitent pas de cofacteurs pour leur fonctionnement. Particulièrement, les lipases, appelées encore : *triacylglycérol acyl-hydrolase* (**E.C.3.1.1.3**). Elles sont utilisées comme biocatalyseurs performants pour mener des réactions d'estérification et de transestérification des acides organiques et d'alcools dans les solvants organiques et les réactions d'hydrolyse dans les milieux aqueux¹⁸. Elles sont de plus en plus sollicitées pour la

¹³H. Bisswanger, "Enzyme kinetics: Principles and Methods", Wiley-VCH, **2002**, 268.

¹⁴Z. Knez, *J. Supercritic. Fluids*, **2009**, 47, 357-372.

¹⁵H.K. Sajja, *Biotechnol. Adv.*, **2002**, 20, 239-267.

¹⁶ K.H. Vadim V. Mozhaev, J. Frank, P. Masson. C. Balny, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **1998**, 24, 81-91.

¹⁷(a) R. Chênevert, N. Pelchat, F. Jacques, *Curr. Org. Chem.*, **2006**, 10, 1067-1094. (b) U. T. Bomscheuer, R. J. Kazlaskaz, "Hydrolase in Organic Synthesis", Wiley-VCH, Chichester, **2006**. (c) A. Ghanem, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754. (d) S. Akai, Y. Kita, *J. Synth. Org. Chem. Japan.*, **2007**, 65, 772-782. (e) P. Dominguez de Maria, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, A. R. Alcantara, *Biotechnol. Adv.*, **2006**, 24, 180-196. (f) P. Dominguez de Maria, CA. Garcia-Burgos, G. Burgeman, R. W. van Gemert, *Synthesis*, **2007**, 1439-1452. (g) M.T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 145-150.

¹⁸ W. Boland, C. Frossl, M. Lorenz, *Synthesis.*, **1991**, 1049-1072.

synthèse de molécules chirales énantiomériquement pures ou enrichies¹⁹ telles que : les acides carboxyliques²⁰, les aminoacides²¹, les alcools¹⁰ les amines et les amides²².

Leur utilisation permet la limitation de la formation de produits secondaires en réduisant les opérations de traitement et de purification. Les lipases sont stables, disponibles, faciles à utiliser, elles sont peu onéreuses et ne nécessitent pas de cofacteurs pour leur fonctionnement.

Parmi les différentes réactions catalysées par les lipases, nous décrivons ci-dessous les plus utilisées :

a- L'hydrolyse (en milieu aqueux) :



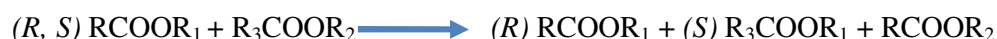
b- L'estérification (en milieu organique) :



c- La transestérification:



d- L'interestérification:



Au cours des travaux réalisés au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés uniquement aux hydrolases et particulièrement aux lipases (E.C.3.1.1.3) appartenant à la famille des hydrolases à sérine et qui sont, soit d'origine animale, végétale, ou microbienne.

I-3-La biocatalyse et la chimie verte :

Le concept de Chimie Verte est apparu en 1991 aux Etats-Unis, et s'inscrivait pleinement dans le cadre de la loi de prévention de la pollution adoptée en 1990. L'objectif étant de prévenir la pollution en concevant des produits et procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer à la source d'utilisation et la synthèse de substances dangereuses, plutôt que de se limiter au traitement de déchets produits.

¹⁹(a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, 82, 3192-3196. (b) R. Azerad, *l'actualité chimique*, **septembre-août 2002**, 31-36.

²⁰ A. Hsu, K. Jones, T. A. Foglia, W. N. Marmar, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2002**, 36, 181-186.

²¹ M. Bakke, M. Takizawa, T. Sugai, H. Ohta, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6929-6938.

²² B. Morgan, A. Zaks, D. R. Dodds, J. Liu, R. Lain, S. Megati, F. G. Njoroge, V. M. Girijavallabhan, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5451-5459.

Ce concept est rapidement devenu populaire et largement adopté par la communauté scientifique grâce aux douze principes développés en 1998 par les deux chimistes américains Anastas et Warner²³. Ces principes peuvent être regroupés en « réduction des risques » et « diminution de l'impact environnementale ». (**Figure12**)

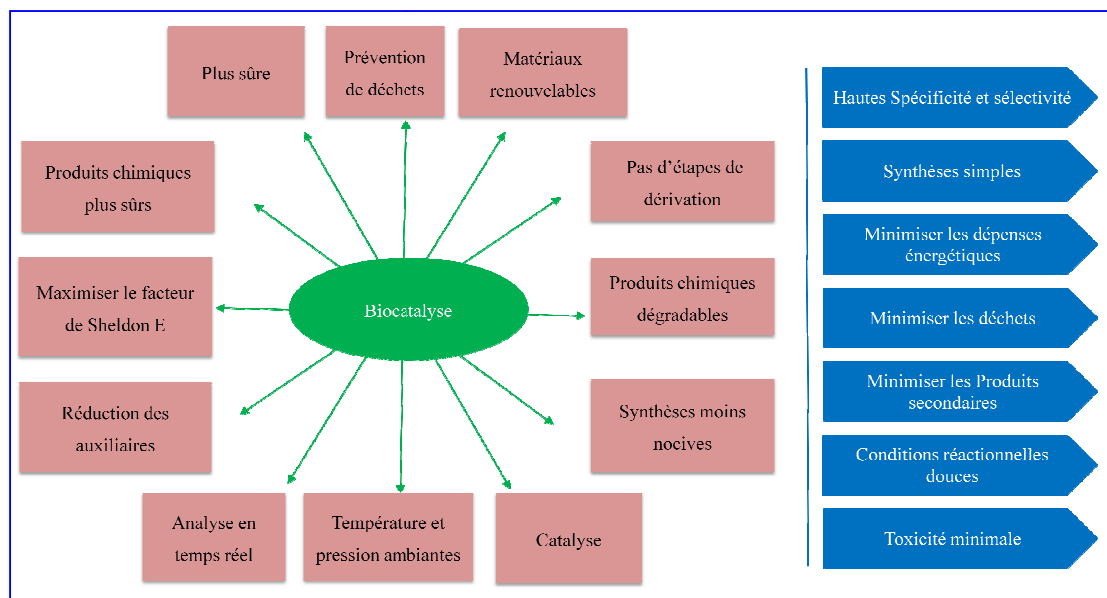


Figure 12 : Biocatalyse et chimie verte

Depuis l'apparition de ce concept, et afin d'être verts et durables, les procédés de synthèses organiques classiques doivent être réorientés vers l'utilisation des matières premières peu ou non toxiques, en générant moins de déchets, avec plus d'efficacité. Pour ce faire, la catalyse, pilier de la chimie verte, s'avère la meilleure des solutions pour y parvenir et la biocatalyse s'avère être l'une des technologies les plus appropriées qui obéit parfaitement aux douze principes de la chimie verte :²⁴

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

²³ P. T. Anastas, J. C. Warner, "Green Chemistry: Theory and Practice", Oxford University Press: New York, **1998**.

²⁴ J.Tao, R. J. Kazlauskas, "Biocatalysis for green chemistry and chemical process development". Hoboken, (Eds.) NJ: John Wiley & Sons, **2011**.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I-4- Applications industrielles de la biocatalyse :

L'intégration des procédés biocatalytiques dans les différents secteurs industriels est en plein essor.²⁵ Cela est approuvé par l'évolution du marché mondial des enzymes qui s'élevait à 8,2 milliards de dollars en 2015 avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 6,6% entre 2016 et 2024, pour atteindre un chiffre d'affaires mondial de 16,9 milliards de dollars en 2024. Des réductions de coûts significatives dues à une consommation d'énergie limitée et à la nature catalytique (meilleure activité du substrat) devraient rester le principal facteur de croissance du marché (Figure 13).²⁶

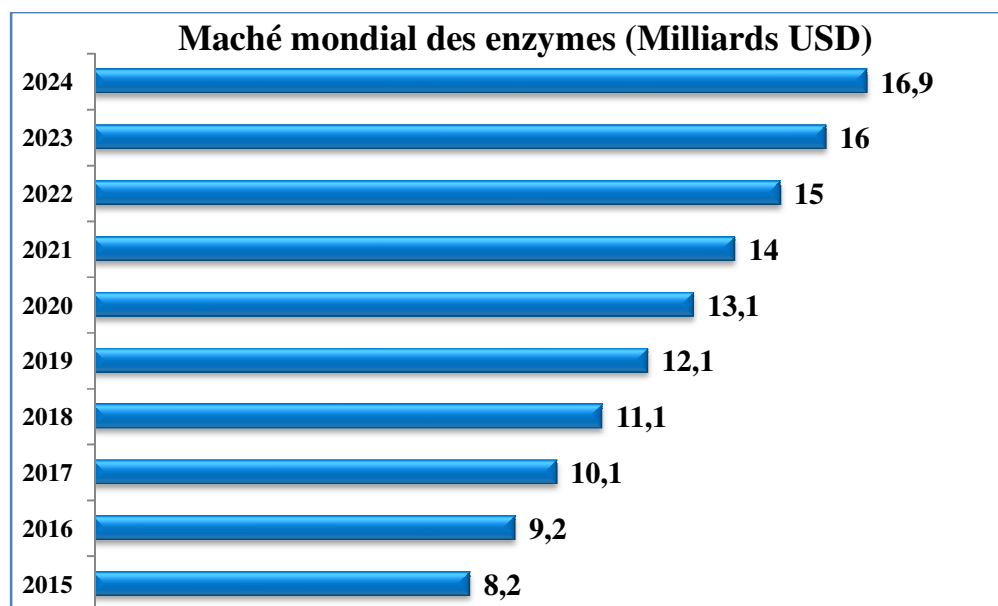


Figure 13 : Le marché mondial des enzymes.

Parmi les applications industrielles biotechnologiques connues²⁷, nous citons :

- ❖ La *Nitrile hydratase (Lyase)* est utilisée par la société **Lonza** pour la production de la *Nicotinamide* (vitamine B3) par une fréquence annuelle de 3000 tonnes (Schéma 3).

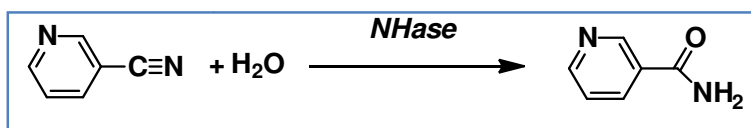


Schéma 3: Production de la vitamine B3 par Lonza.

²⁵ R. Wohlgemuth. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2010**, 21,713–24.

²⁶ *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*. March 18. **2017**, By American research. INC.

²⁷ (a) A. Basso, S. Serban, *Mol. Catal.*, **2019**,479, 110607. (b) R.A. Sheldon, D. Brady, M. L. Bode, *Chem. sci.*, **2020**,11, 2587-2605.

- ❖ Par La même compagnie utilise La *pénicilline acylase (pénicilline amidohydrolase)* pour l'élaboration d'antibiotiques tels que l'*Amoxicilline* et le *Céfactor*, avec un taux de 2000 tonnes/an. L'enzyme hydrolyse d'abord le groupement acyle présent, puis réintroduit d'autres groupements acyles produisant ainsi plusieurs dérivés (**Schéma 4**). Ce procédé rapporte à l'industrie pharmaceutique plus d'un milliard de dollars par an.²⁸

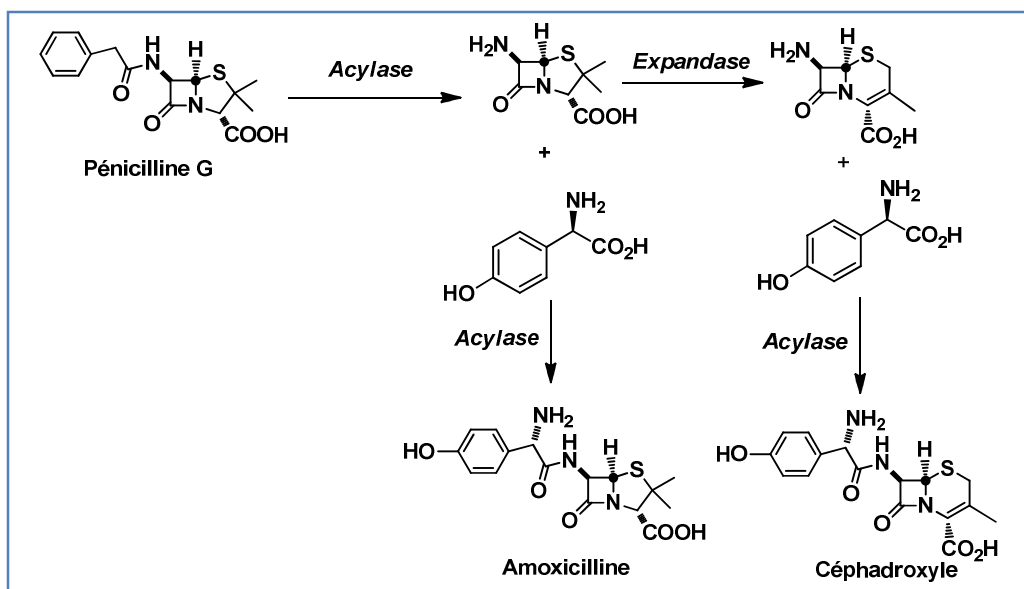


Schéma 4 : Procédés industriels biocatalysés de l'Amoxicilline et du Céfador.

- ❖ Des bioprocédés de production d'herbicides optiquement purs à partir de l'acide (*S*)-chloropropionique obtenus par hydrolyse énantiosélective de l'acide 2-chloropropionique racémique par une *déshalogénase*, sont adoptés par la compagnie *Zeneca* (**Schéma 5**). L'acide (*S*)-chloropropionique énantiomériquement pur est produit avec une fréquence de 2000 tonnes/an.

²⁸K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. H. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 3948.

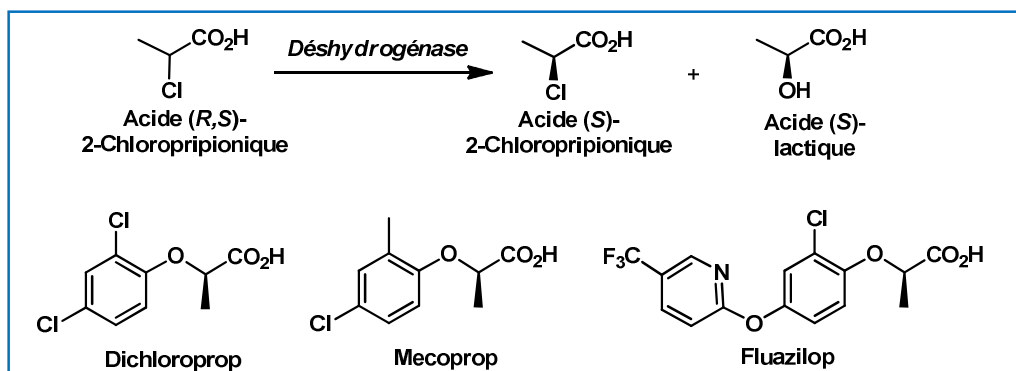


Schéma 5 : Production biocatalysée d'herbicides énantiomériquement purs.

I-5- Accès aux molécules à visée thérapeutique par biocatalyse :

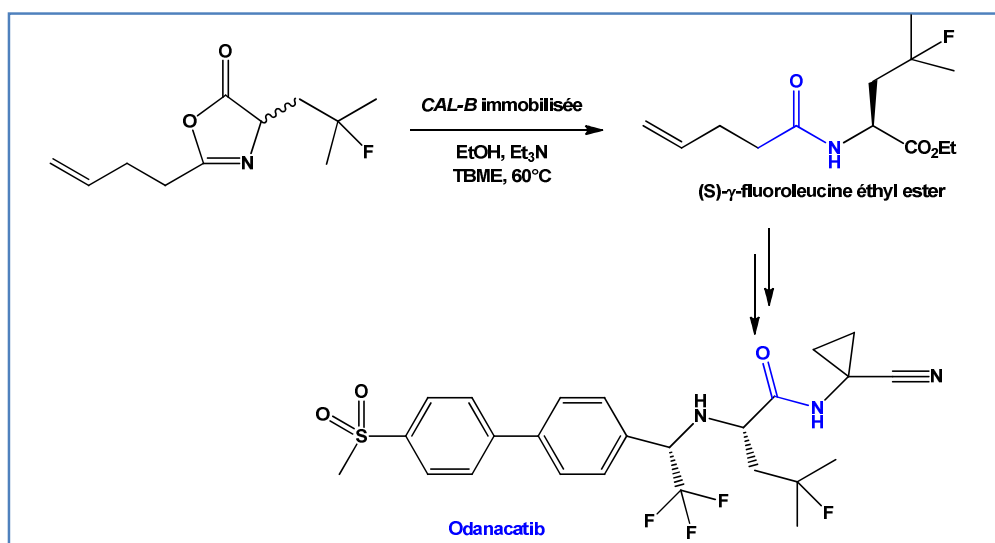
La biocatalyse a permis d'accéder facilement et sous des conditions éco-compatibles à une large panoplie de molécules à visées thérapeutiques. Nous citons dans ce qui suit, quelques méthodes biocatalytiques approuvées par la FDA et adoptées industriellement.²⁹

I-5-1- L'odanacatib :

Découvert en 2008, inhibiteur potentiel de la cathepsine K, utilisé expérimentalement pour lutter contre l'ostéoporose et les métastases osseuses. En 2011, *Merck* a commencé sa fabrication, en passant par une étape clé, qui est l'ouverture de l'azlactone par éthanolyse catalysée par la lipase de *candida antarctica* B immobilisée (**schéma 6**).

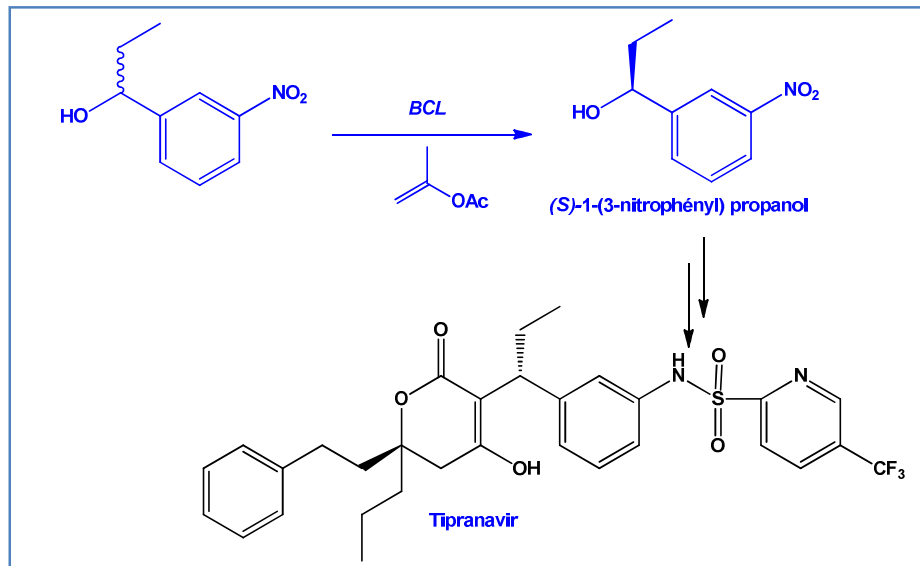
L'ouverture de 100 kg de l'azlactone offre le (*S*)- γ -fluoroleucineéthyl ester avec une conversion de 95% et un excès énantiomérique de 88%.

²⁹(a) A. C. L. D. M. Carvalho, T. D. S. Fonseca, M. C. D. Mattos, M. D. C. F. D. Oliveira, T. L. G. D. Lemos, F. Molinari, I. Serra, *Intern. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 29682-29716. (b) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 88-119. (c) P. Chandra, R. Singh, P. K. Arora, *Microb. Cell Fact.*, **2020**, *19*, 1-42. (d) S. Slagman, W. D. Fessner, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 1-43.



I-5-2- Tipranavir :

C'est un anti-HIV, inhibiteur de protéase, approuvé par la FDA en 2005. L'intermédiaire clé, le (*S*)-1-(3-nitrophényl) propanol est obtenu via un dédoublement cinétique par transestérification catalysée par la *BCL*. (**Schéma 7**)



I-5-3- Brivaracetam :

Approuvé par la FDA en 2016, comme anti-convulsant et commercialisé par la firme pharmaceutique **USB pharma**. Les chercheurs de cette firme ont développé un procédé biocatalysé de synthèse de dérivés (*R*)-acide succinique, briques moléculaires

énantiomériquement purs, pour la préparation du Brivaracetam. Ils ont exploité la protéase C. *Bacillus subtilis* pour l'hydrolyse énantiosélective de l'ester racémique (Schéma 8).

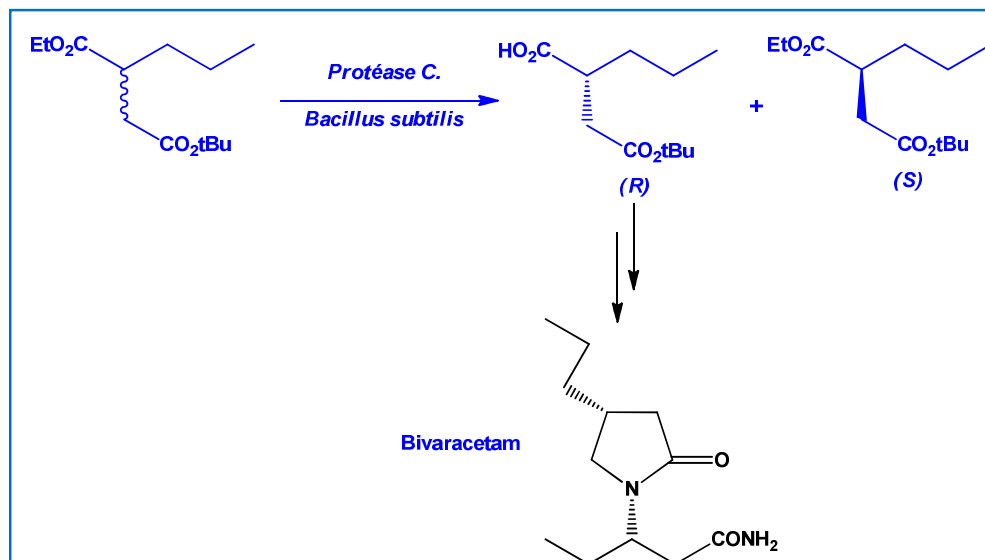


Schéma 8 : Production biocatalysée du Brivaracetam.

I-6- Conclusion :

Au cours de ces deux dernières décennies, la biocatalyse a connu une large expansion pour la préparation des molécules d'intérêt potentiel dans différents domaines de chimie organique fine : agroalimentaire, fragrance et pharmaceutique. Elle répond parfaitement aux exigences contemporaines de la chimie verte. Elle est également en pleine expansion sur le plan industriel dans tous ces domaines pour la production des molécules à haute valeur ajoutée. Parmi les six classes des enzymes, celle des hydrolases est la plus utilisée, particulièrement les lipases qui sont douées par leur haute sélectivité (*chimio-*, *régio-*, *diastéréo-* et *énantiosélective*), pour la préparation des briques moléculaires énantiomériquement enrichies.

Nous avons présenté dans ce chapitre quelques applications biotechnologiques industrielles exploitant des enzymes comme catalyseurs puissants. Nous avons, également, présenté quelques applications des hydrolases pour la préparation des molécules à visées thérapeutiques, dans leurs majorités ces procédés impliquent un dédoublement cinétique enzymatique énantiosélective comme étape clé.

CHAPITRE II :

Dédoublement cinétique enzymatique

II-1- Introduction :

Selon les législations imposées par les autorités sanitaires réglementaires américaine et européenne la **FDA** (Food and Drug Administration) en **1992**, et l'**ECPMP** (European Commette for Proprietary Medicinal Products) en **1993**, imposant que la commercialisation d'un racémique ne peut être autorisée que si on trouve que les deux énantiomères ont les mêmes propriétés biologiques¹. Par ailleurs, la réglementation REACH (règlement N°1907/2006), l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques considère les deux énantiomères d'une substance chirale comme deux molécules différentes du racémique, lui-même.

Pour séparer les deux énantiomères d'un racémique, il existe quatre processus :²

- ❖ **Dédoublement par cristallisation spontanée** : Ce dédoublement constitue la première référence de séparation d'énantiomères découverte par la pure des coïncidences par *Louis Pasteur*³ en **1848** qui isola alors les deux formes optiques de l'acide tartrique par simple tri manuel de ses cristaux énantiomorphes. Cette technique est toujours utilisée industriellement pour la séparation des énantiomères.
- ❖ **Dédoublement par formation de diastéréoisomères** : Consiste en une réaction d'un racémique (dl) en présence d'une copule chirale (D). Les diastéréoisomères (dD et lD) formés seront facilement séparables par leur différence de propriétés physiques. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique.
- ❖ **Dédoublement chromatographique** : basé sur la formation d'un mélange de diastéréoisomères covalents entre les énantiomères du racémique et une phase chirale (stationnaire ou mobile). Il y a séparation en fonction de la différence de vitesse d'éluion de ces diastéréoisomères. La majorité des dédoubléments chromatographiques sont de nature analytique afin de déterminer la composition énantiomérique.
- ❖ **Dédoublement cinétique** : basé sur la différence de vitesse de réaction des deux énantiomères vis-à-vis d'une entité chirale énantiomériquement pure (réactif, catalyseur) capable d'intervenir dans la structure de l'état de transition de la réaction.

¹(a) K-E. Jaeger, M.T. Reetz., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 68-73;(b)C & EN, "Cover Story", **2003**, 81, 55-73.

²C. Rabiller, « stéréochimie et chiralité en chimie organique », De Boeck & Larcier, s.a, **1999**.

³L. Pasteur ; *Ann. Chim. et Phys.*, **1848**, 24, 442.

Comme nous l'avons constaté dans le chapitre 1, le dédoublément cinétique biocatalysé consiste en une étape clé pour la préparation aisée de briques moléculaires énantiomériquement pures ou enrichies indispensables à la synthèse des médicaments, des arômes, de l'agriculture et de l'agroalimentaire⁴. Les lipases sont les enzymes les plus exploitées pour accéder aux molécules énantiomériquement enrichies par DCE que ce soit à l'échelle des laboratoires ou à l'échelle des biotechnologies industrielles. Cela est dû à leur compatibilité avec les milieux organiques pauvres en eau, offrant ainsi de nouvelles opportunités vers une chimie propre et durable. Cela permet⁵ :

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

Dans ce chapitre nous soulignons l'intérêt du dédoublément cinétique catalysé par des lipases. Les travaux de cette thèse s'appuient principalement sur cette réaction.

II-2- Le Dédoublément cinétique enzymatique:

II-2-1- Principe :

Le dédoublément cinétique enzymatique est un processus de séparation des énantiomères, dans lequel, une transformation chimique s'effectue en faveur d'un seul énantiomère, et ce dépendant la reconnaissance chirale enzymatique. L'enzyme est capable d'intervenir préférentiellement au niveau de l'état de transition de la réaction. Cette différence cinétique est la conséquence directe des contraintes structurales imposées par le site actif enzymatique, qui se traduit par l'abaissement de la barrière énergétique du bon énantiomère, en le transformant rapidement en produit. Donc, le DCE est basé sur la différence de vitesse de

⁴ K. Faber, " *Biotransformations in Organic Chemistry*", 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**.

⁵(a) A. M. Klivanov, *Nature*, **2001**, 409, 241-246; (b) R. A. Sheldon, " *Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media*. In *Enzymatic reactions in organic media*", **1996**, 266-307, Springer Netherlands. (c) N. Doukyu, H. Ogino. *Biochem. Engineer. J.*, **2010**, 48, 270-282.

réaction des deux énantiomères du racémique mis en jeu avec une enzyme pour modifier l'un et laisser l'autre inchangé (**Schéma 9**).

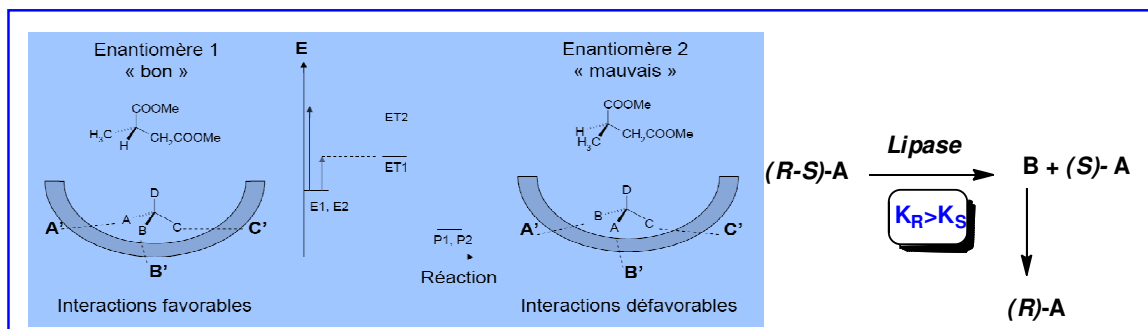


Schéma 9 : Illustration du principe du dédoublement cinétique enzymatique.

Cette biotransformation peut être réversible ou non, selon les conditions sous lesquelles le processus catalytique lipasique s'établit. Pour nous, nous sommes intéressés par la réaction de dédoublement cinétique *irréversible*. Ce processus est décrit par un mécanisme simplifié (**Schéma 10**).

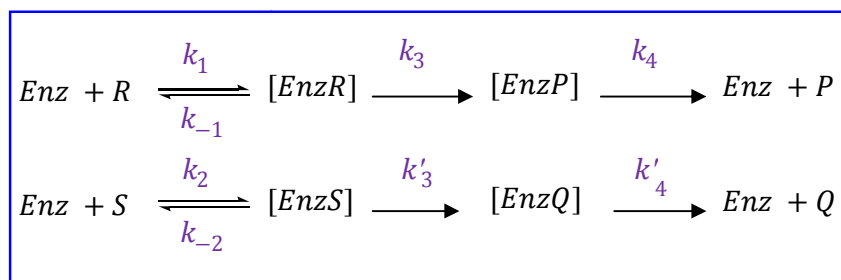


Schéma 10 : Mécanisme d'un dédoublement cinétique enzymatique.

Enz: Enzyme.

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

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

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

P et **Q** : Produits de la réaction.

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

II-3- Paramètres d'évaluation d'un DCE irréversible :

L'efficacité et la réactivité enzymatique du dédoublement cinétique peuvent être évaluées par les trois principaux paramètres suivants. Les relations mathématiques décrites par Kagan et Fiaud⁶ ainsi que Sih⁷ et coll.

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

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

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

$$C = \frac{ees}{ees+eep} \quad 0 \leq C \leq 1 \quad \text{Equation 2}$$

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

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

Pour le produit

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1+eep)]}{\ln[(1-C)(1-eep)]} \quad \text{Equation 4}$$

Pour le substrat

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ees)]}{\ln[(1-C)(1+ees)]} \quad \text{Equation 5}$$

Ces équations ne sont valides que si l'on prend pour acquis que la réaction est irréversible et qu'il n'y a aucune inhibition de l'enzyme. Ainsi, on peut considérer que les réactions avec les

⁶H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "Kinetic Resolution". *Topics in Stereochemistry*, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Eds; Wiley & sons, Inc. *Newyork*, **1988**, 18, 249-330.

⁷C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294-7299.

hydrolases en milieu aqueux en présence d'un grand excès d'eau et les acylations en milieu organique à l'aide d'esters d'énols sont irréversibles.

II-4- Variations des excès énantiomérique en fonction de la conversion :

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

L'excès énantiomère du produit ee_p (ou du substrat résiduel ee_s) ne constitue pas à lui seul une mesure valable de l'énantiosélectivité d'un dédoublment cinétique car cette valeur change constamment en fonction de la conversion c de la réaction. Ainsi, il est possible d'obtenir un excès énantiomérique élevé pour un substrat résiduel en laissant la réaction progresser vers un taux de conversion avancé au détriment du rendement, et ce, même si la réaction possède un facteur de sélectivité faible.⁸

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

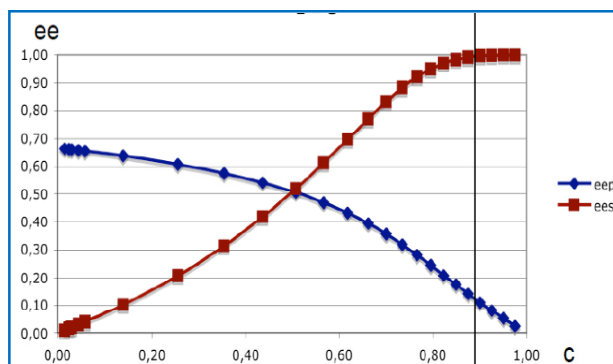


Figure 14 : Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E < 10$.

⁸ K. Faber, H. Hönig, A. Kleewein, 2006, <http://www.orgc.mgraz.at/>

- ❖ **Facteur de sélectivité élevé** : Dans le cas où ($E > 100$) on pourrait obtenir les deux énantiomères d'un racémique avec une haute pureté optique en un seul dédoublment.

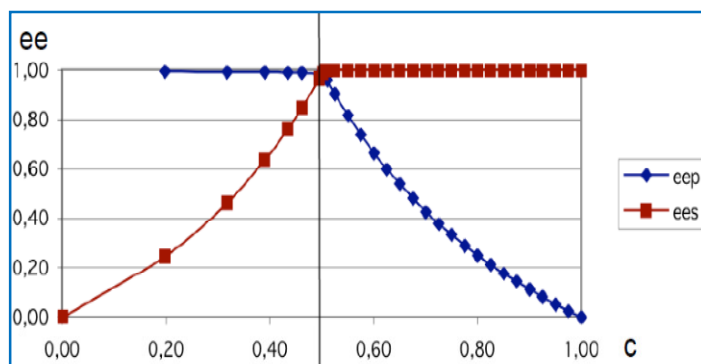


Figure 15 : Dépendance des excès énantiomériques de la conversion avec $E \geq 100$.

Dans le cas idéal, la différence de réactivité est tellement grande qu'un des énantiomères est complètement transformé avant que l'autre n'ait eu le temps de réagir. La réaction s'arrête alors complètement à 50% de conversion et les composés sont obtenus avec des excès énantiomères (ee) proche de 100%. Les enzymes agissant in vivo sur leur substrat naturel présentent cette propriété, d'où leur utilisation courante en dédoublment cinétique (**Figure 16**).

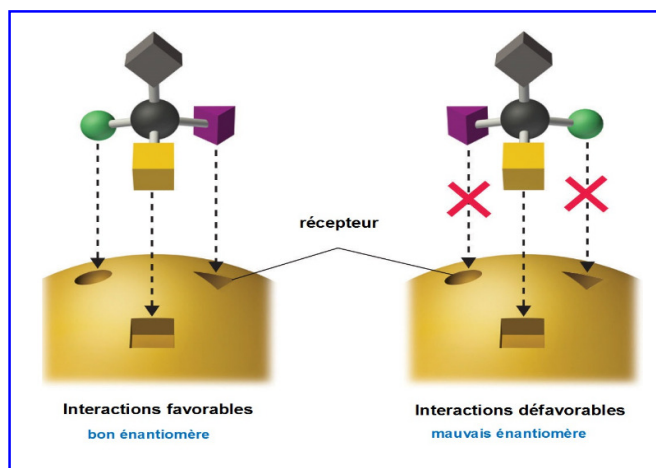


Figure 16 : Illustration de la reconnaissance chirale.

II-5- Règles empiriques d'énantiopréférence des lipases :

La reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et les énantiomères a été, dès les années 90, identifiée comme un paramètre clé responsable de leur énantiosélectivité. Le premier modèle

prédictif a été proposé par l'équipe de Kazlauskas⁹. De nature empirique, ce modèle repose sur le criblage systématique de nombreux alcools secondaires et il a permis d'établir que l'énantio-préférence est corrélée à la différence de taille entre les deux substituants de l'alcool secondaire et à leur positionnement distinct dans les poches du site actif des lipases de *Burkholderia cepacia* et de *Candida rugosa*. Lors de réactions de dédoublement énantiosélective, Kazlauskas a démontré que la stabilisation du substrat de configuration (*R*) est favorisée dans le site actif, pour des raisons stériques (**Figure17**).

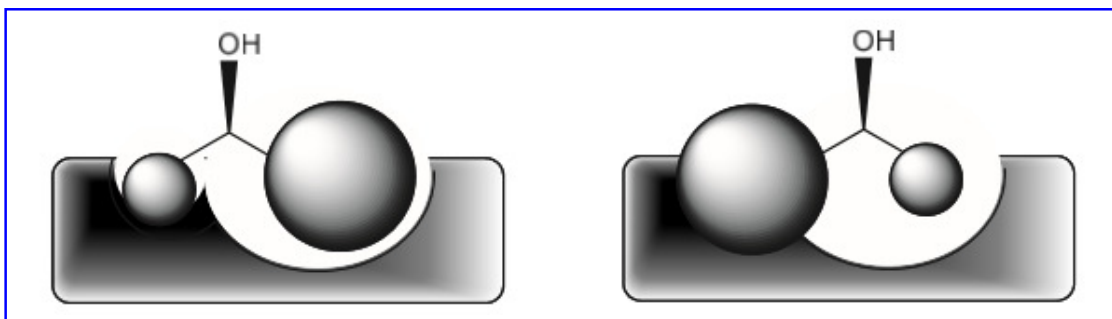


Figure17 : Positionnement idéal de l'alcool secondaire dans le site actif de l'enzyme (*M* représente le substituant de taille moyenne et *L* de substituant le plus encombré)

Lors du positionnement idéal du substrat dans l'enzyme, l'énantiomère le plus favorisé (ici à gauche) a son substituant le plus encombré (noté L) dans la poche large de l'enzyme, alors que le substituant moyen (noté M) est dans la poche stéréospécifique de l'enzyme. Cette configuration induit une catalyse enzymatique optimale. Dans le cas de l'énantiomère avec le substituant le moins encombré dans la poche large pénètre dans le site actif de l'enzyme, la catalyse est défavorisée. Les substituants, par des interactions stériques défavorables sont moins stables dans le site actif. Cet énantiomère sera faiblement catalysé.¹⁰

II-6-Mode d'action des lipases :

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

⁹ L. E. Janes, R. J. Kazlauskas. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1997**, 8, 3719-3733.

¹⁰ Lafaquière V. *Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases*. Thèse de Doctorat à l'INSA de Toulouse. **2010**, 48-51.

200 aminoacides. Le point commun de ces lipases réside dans la triade catalytique qui constitue leurs sites actifs : **la sérine**, **l'aspartate** (ou **glutamate**) et **l'histidine**. Le fonctionnement de ces trois opérateurs chimiques est élucidé dans le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'un ester par la sérine-hydrolase (**Schéma 11**).¹¹

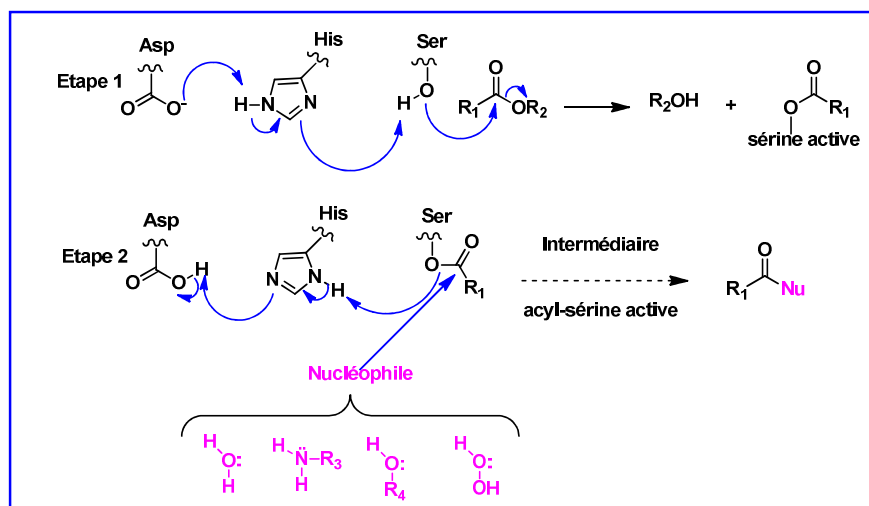


Schéma 11 : Mécanisme des réactions catalysées par les hydrolases à sérine.

Ce mécanisme implique *la sérine* comme nucléophile, *l'histidine* et un acide qui est généralement *l'acide aspartique*. Le résidu nucléophile de *la sérine* est activé par une liaison hydrogène en reliant avec *l'histidine* et *l'aspartate* (ou *le glutamate*). La disposition particulière de ces trois groupes entraîne une diminution de la valeur du pK_a du groupement hydroxyle de *la sérine* qui permet, dans une première étape, une attaque nucléophile sur le carbonyle du substrat (R_1COOR_2), et ainsi la formation d'un intermédiaire *acyl-enzyme* par liaison covalente entre la partie acyle du substrat et l'enzyme, suivie de la libération de l'alcool (R_2OH). Un nucléophile comme l'eau, attaque dans la seconde étape l'intermédiaire *acyl-enzyme* avec régénération de l'enzyme et libération de *l'acide carboxylique* (R_1COOH). Dépendant de la nature du milieu (aqueux ou organique), d'autres nucléophiles comme *un alcool*, *une amine*, *l'ammoniac*, *l'hydrazine* ou *l'hydro-péroxyde* peuvent concourir avec l'eau pour l'intermédiaire *acyl-enzyme* donnant ainsi lieu à un nombre de transformations synthétiquement utiles comme *la transestérification*, *l'aminolyse*, *l'ammonolyse*, *l'hydrazinolyse* ainsi que *la perhydrolyse* respectivement selon le schéma (12) ci-après¹²:

¹¹C.S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 695.

¹²V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, **2006**, 40, 111-120.

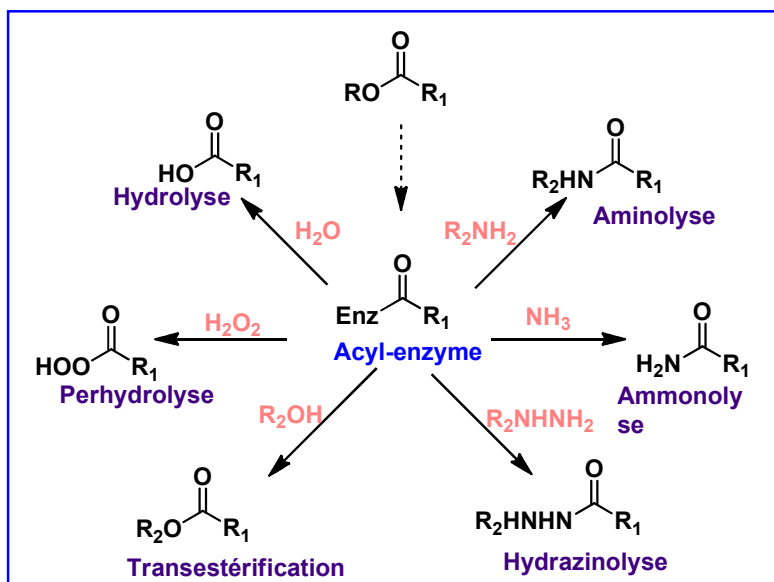


Schéma 12 : Biotransformations possibles par la sérine hydrolase.

Le **tableau 2** résume les lipases (immobilisées et libres) les plus utilisées dans les réactions de dédoublément cinétique et qui sont compatibles avec les milieux organiques.¹³

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

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

II-7- Paramètres influant sur la réaction du DCE :

De nombreux paramètres peuvent influencer sur la réactivité et la sélectivité de la réaction de dédoublément cinétique enzymatique notamment, la nature de l'enzyme, la structure du substrat, la nature du nucléophile, la température, le solvant et le *co*-solvant organique ainsi

¹³(a) P.Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6406-6436. (b) A. Zaidi Bounouala, *Étude de la résolution cinétique de molécules d'intérêt pharmacologique par alcoololyse et aminolyse enzymatiques : Influence de quelques paramètres*. Thèse de doctorat LMD, Université Badji Mokhtar-Annaba- **2016**.

que le pH, etc.....¹⁴. Nous citons dans ce qui suit quelques exemples concernant le dédoublment cinétique par acylation enzymatique, la réaction de base dans les travaux de cette thèse, et ce, en se focalisant sur l'impact de quelques paramètres ayant un impact crucial sur la performance catalytique enzymatique.

II-7-1- Nature de l'enzyme :

L'un des facteurs déterminants pour élaborer des réactions de DCE est la nature de l'enzyme. Afin de déterminer l'enzyme adéquate pour une réaction précise et un substrat déterminé, un *screening* de diverses enzymes est indispensable. Plusieurs études ont été décrites, nous citons ici quelques uns.

✂ Le premier exemple concerne le dédoublment cinétique *via* benzylation du *l*-méthyl-3-phényl-propyl amine. Patti et *coll.*, ont effectué un *screening* de cinq enzymes afin de déterminer l'enzyme adéquate pour accéder à l'énantiomère (*R*)-*N*-(4-phényl butan-2-yl) benzamide énantiomériquement pur, qui constitue la brique moléculaire indispensable pour aboutir aux stéréoisomères pharmacologiquement biocatives du *Labetalol*. Ce dernier est un anti-hypertensif commercialisé sous forme d'un mélange équimolaire des quatre isomères possibles. Seulement les stéréoisomères (*RR*) et (*SR*) possèdent toute l'activité biologique, alors que les deux autres sont complètement inactives¹⁵ (**Schéma 13**).

Seule la lipase *Novozym* a permis l'obtention de l'énantiomère (*R*)-*N*-(4-phénylbutan-2-yl) benzamide énantiomériquement pur avec une conversion C=24% après quatre jours de réaction à 45°C dans le toluène.

¹⁴(a) K. Faber, S.Riva. *J. Synth. Org. Chem.*, **October1992**, 895-910; (b) K. Faber, “ *Biotransformations in Organic Chemistry*”, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**.

¹⁵ C. Sanfilippo, A. A. Paternò, A. Patti, *Mol. Catal.*, **2018**, 449, 79-84.

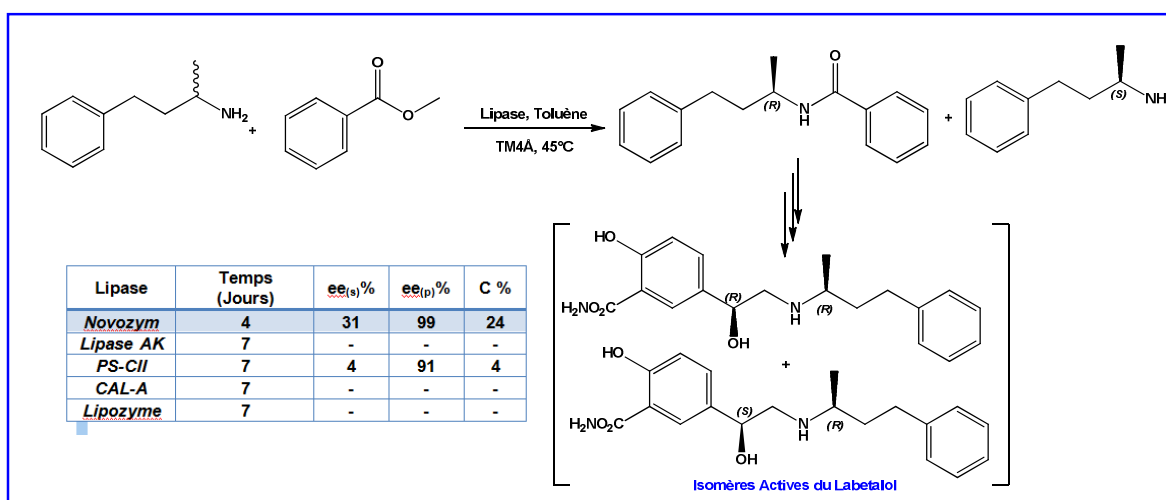


Schéma 13 : Dédoublément cinétique via benzoylation enzymatique du 1-méthyl-3-phényl-propyl amine.

✂ Banerjee et coll., ont mis au point le dédoublément cinétique par transestérification enzymatique du *rac*-1-chloro-3-(4-(2-méthoxyéthyl) phénoxy) propan-2-ol, intermédiaire chiral du *Métoprolol*. Ce dernier est un β -bloquant, utilisé pour le traitement des angines et de l'hypertension ; il est bien connu que l'énantiomère (*S*) procure toute l'activité thérapeutique¹⁶ (Schéma 14).

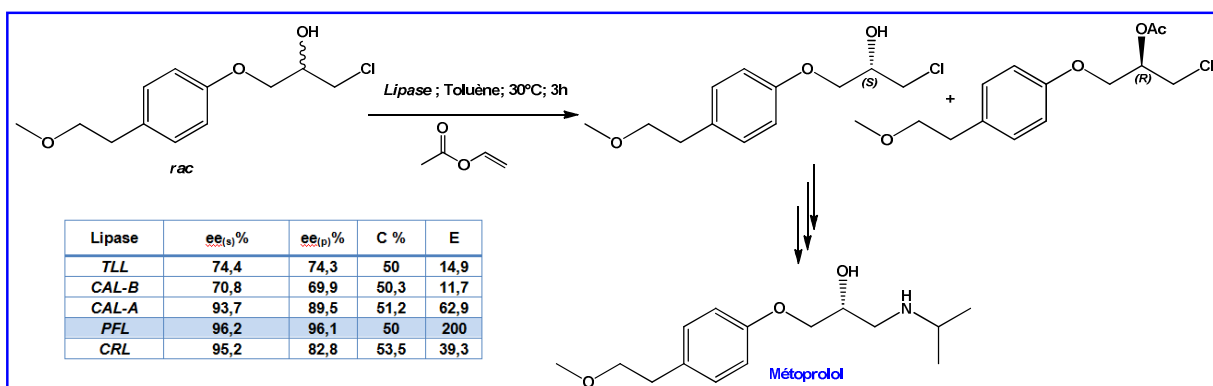


Schéma 14 : Dédoublément cinétique via acylation enzymatique du *rac*-1-chloro-3-(4-(2-méthoxyéthyl)phénoxy)propan-2-ol.

✂ Yuan et coll., ont mis au point le dédoublément cinétique par estérification enzymatique du *rac*-2-(4-méthyl phényl) propionique acide, intermédiaire clé du *Loxoprofen sodium*. Une seule dose de cet anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) est dix à 20 fois plus efficace

¹⁶ S. Soni, B. P., Dwivedee, V. K. Sharma, U. C. Banerjee, *RSC advances*, **2017**, 7, 36566-36574.

que l'Ibuprofène et le Kétoprofène. Après un screening de plusieurs enzymes, en utilisant l'hexanol comme accepteur d'acyle, dans l'hexane à 75°C, ils ont trouvé que seule la lipase *Novozym 435* est réactive lors de l'estérification de cet acide arylpropionique, avec une modeste sélectivité (**Schéma 15**).¹⁷

Après une simulation et une optimisation des conditions réactionnelles, les auteurs ont pu récupérer l'énantiomère bioactif résiduel (*S*) à une conversion de 89,34% et un excès énantiomérique de 97,84%.

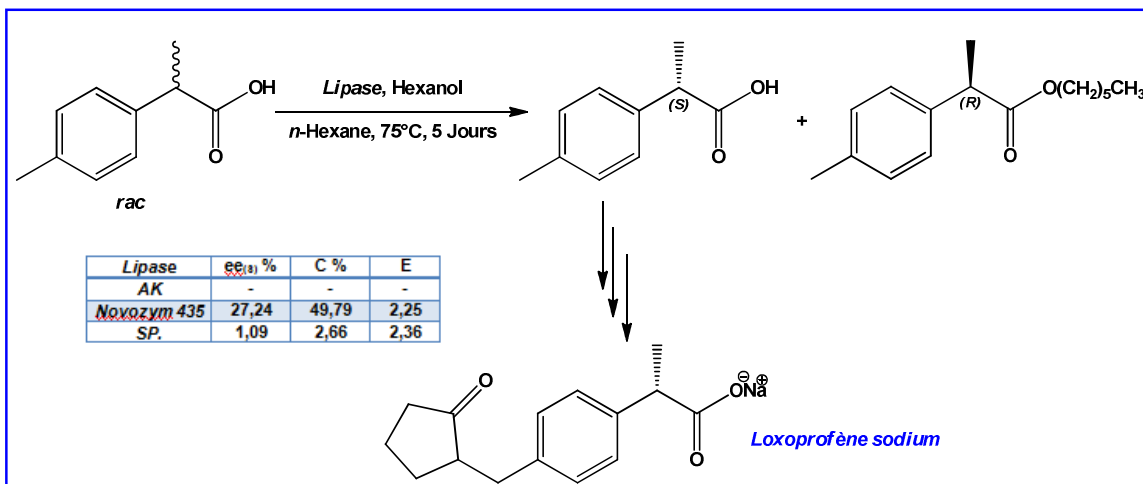


Schéma 15 : Dédoublément cinétique via estérification enzymatique du rac-2-(4-méthylphényl) propionique acide.

II-7-2- Nature du solvant :

Le solvant joue un rôle important dans les réactions de dédoublement cinétique enzymatique. Plusieurs travaux ont démontré l'utilité de choisir des solvants qui contiennent un minimum d'eau pour que l'enzyme fonctionne dans les milieux organiques. La présence d'un excès de molécules d'eau (w_a) autour du site actif enzymatique peut, soit réduire l'énantiosélectivité enzymatique, soit engendrer une modification de la conformation de la lipase ce qui induit un inversement de l'énantiosélection.¹⁸ Généralement, en catalyse enzymatique, la polarité des solvants organique est désignée par une corrélation entre l'hydrophobicité d'un solvant organique et le facteur $\text{Log}P$, le logarithme du coefficient de partition entre le *n*-octanol et l'eau. Les solvants non-polaires avec un $\text{Log}P > 2$ sont les plus sollicités pour les réactions de

¹⁷ X. Yuan, L. Wang, P. Zhang, W. Xu, K. Tang, *Chin. J. Chem. Engin.*, **2020**, 28, 1816-1823.

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

transestérisation enzymatique.¹⁹ Cette règle reste empirique. Des tests préalables doivent être effectués sur une gamme de solvants pour chaque réaction de dédoublément enzymatique. A titre d'illustration, et dans ce contexte, nous citons dans ce qui suit quelques exemples de la littérature.

✂ Gupta et al. ont décrit l'estérisation du *flurbiprofène*, un anti inflammatoire non stéroïdien, via un dédoublément cinétique catalysé par la lipase *Novozym 435*. Les réactions ont été réalisées à 55°C sous irradiations micro-ondes, dans des solvants ayant des hydrophobicités différentes²⁰ (Schéma 16).

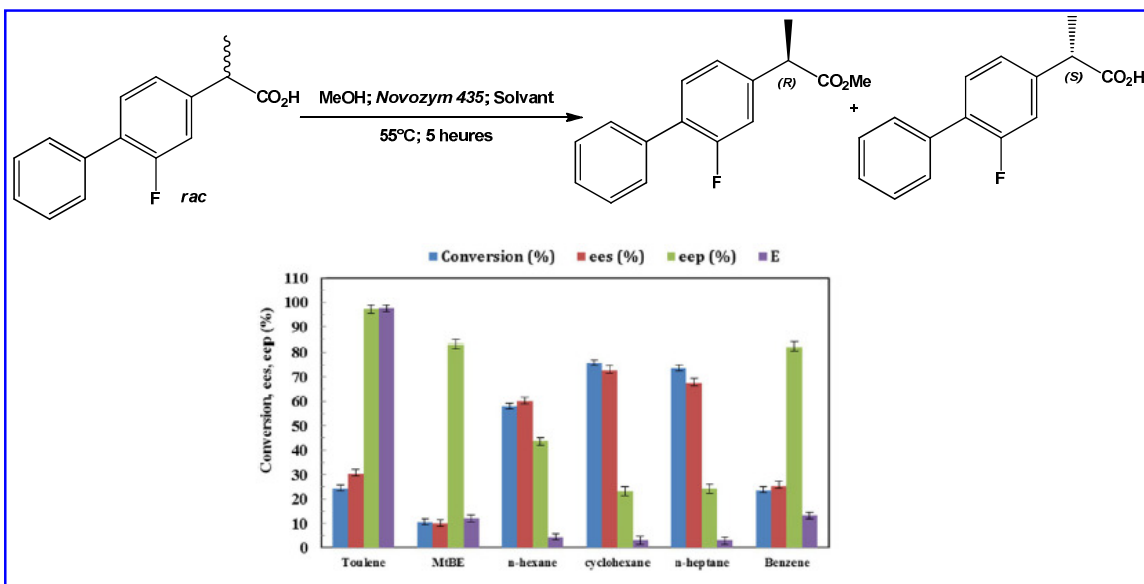


Schéma 16 : Dédoublément cinétique via estérisation enzymatique du flurbiprofène racémique : Effet du solvant.

Ils ont approuvé que la conversion et le facteur de sélectivités dépendent nettement de l'hydrophobicité du solvant organique. La meilleure sélectivité est obtenue dans le toluène (LogP= 2,5), E= 97,6 à une conversion de C= 24,25%. En effectuant l'estérisation dans le cyclohexane (LogP= 3,44), le flurbiprofène s'estérifie avec une conversion de 75,7% avec une faible sélectivité E= 3,11. Ils ont attribué cette influence de l'hydrophobicité du solvant à une bonne stabilité structurale de la triade catalytique de la lipase *Novozym 435* dans le toluène.

¹⁹ M. Merabet-Khelassi, *Mode d'action de quelques additifs sur l'énantiosélectivité dans la réaction de dédoublément cinétique enzymatique : accès à quelques alcools ferrocéniques chiraux*. Thèse de doctorat en sciences. Université Badji Mokhtar-Annaba- **2009**.

²⁰ S. M Gupta, M. P. Kamble, G. D. Yadav. *Molecular Catalysis*, **2017**, *440*, 50-56.

✂ Un exemple plus récent montre l'impact de la nature du solvant sur l'évolution d'une réaction biocatalysée, est décrit par Can *et al.*²¹ Les auteurs ont effectué l'acylation du 4-hydroxy-4-phényl butan-2-one par le biais de la lipase *Amano from Burkholdria cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) (**AL-PS**), en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans des solvants d'hydrophobicités différentes (**Schéma 17**).

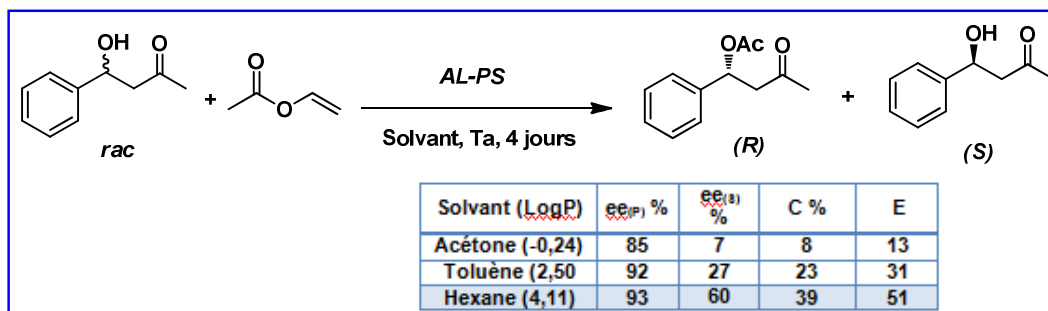


Schéma 17 : Effet du solvant lors de l'acylation du 4-hydroxy-4-phényl butan-2-one.

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de l'hexane améliore nettement la sélectivité et la réactivité enzymatique.

✂ Nous citons également, un travail élégant, publié par Ciceri *et al.*, sur l'exploitation de la réaction de dédoublement cinétique par acylation enzymatique comme étape clé pour la préparation des deux énantiomères (*S*) et (*R*)-*N*-(6-hydroxy-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]-thiazol-2-yl) acétamide, molécules briques pour la préparation du (*S*)-**Pramipexole**, médicament utilisé pour le traitement des stades avancés de la maladie de Parkinson, et son antipode optique le (*R*)-**Dexpramipexole**, médicament utilisé pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique.²² Les auteurs de ce travail, ont examiné l'effet de quelques solvants lors de l'acylation du *rac-N*-(6-hydroxy-4, 5, 6, 7-tetrahydrobenzo[*d*]-thiazol-2-yl) acétamide en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle et catalysée par la lipase de *CAL-A* (**Schéma 18**).

²¹ H. Can, T. Yildiz, H. Ç. Onar, *Chem. Select*, **2020**, *5*, 7543-7547.

²² S. Ciceri, P. Ferraboschi, P. Grisenti, S. Reza Elahi, C. Castellano, M. Mori, F. Meneghetti, *Catalysts*, **2020**, *10*, 941.

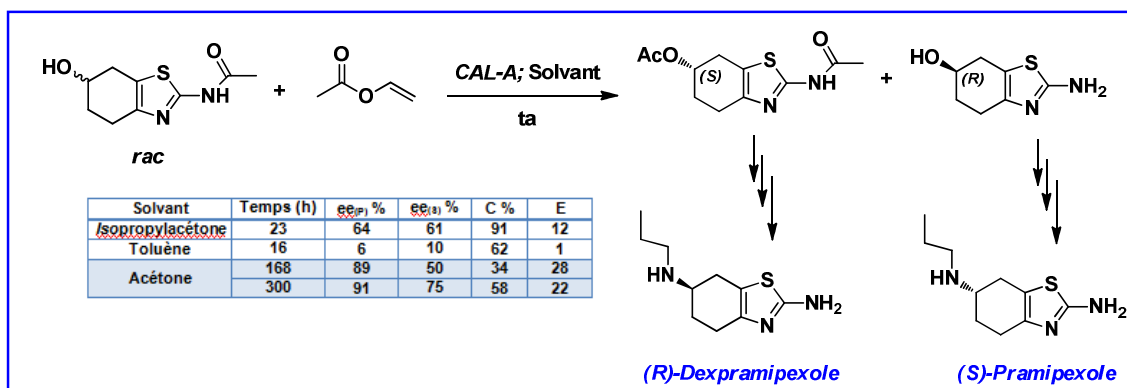


Schéma 18 : Effet du solvant lors de l'acylation du rac-N-(6-hydroxy-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl) acétamide

Les meilleurs résultats ont été obtenus dans l'acétone comme solvant organique. Après 168h, les deux énantiomères (*R*) et (*S*) sont obtenus avec des excès énantiomériques de 50% et 89%, respectivement, à une conversion de 34%. Une prolongation du temps de réaction, une conversion de 58% est achevée les deux énantiomères (*R*) et (*S*) sont récupérés avec des excès énantiomériques de 75% et 91%, respectivement.

II-7-3- Nature du donneur /accepteur d'acyle :

Afin de contourner la réversibilité de la réaction de transestérification, deux possibilités se présentent afin de déplacer l'équilibre thermodynamique vers le sens désiré, soit en faisant appel à la loi d'action de masse en utilisant un excès d'agent acylant, soit en utilisant des agents acylants spécifiques pour rendre la réaction irréversible. Pour cela, plusieurs agents acylants peuvent être appliqués.²³

✂ Les donneurs d'acyle achiraux :

Ces derniers sont classés en trois catégories (**Schéma 19**)²⁴ :

- ❖ **Agents acylants réversibles** : telle que les esters ou les thioesters, ces derniers ne sont pas très utilisés.
- ❖ **Agents acylants quasi-irréversibles** : cette catégorie consiste en des donneurs d'acyle assez nucléophiles. Leur utilisation pour le dédoublage cinétique par

²³ A. Zaidi Bounouala, *Étude de la résolution cinétique de molécules d'intérêt pharmacologique par alcoololyse et aminolyse enzymatiques : Influence de quelques paramètres*. Thèse de doctorat LMD, Université Badji Mokhtar-Annaba- **2016**.

²⁴ H. Hanefeld, *Org. Biomol. Chem*, **2003**, 1, 2405-2415.

transestérisation enzymatique est très commode pour les amines et les alcools primaires.

- ❖ **Agents acylants irréversibles** : cette catégorie de donneurs d'acyle se subdivise en deux : les anhydrides d'acides et les esters d'énols.

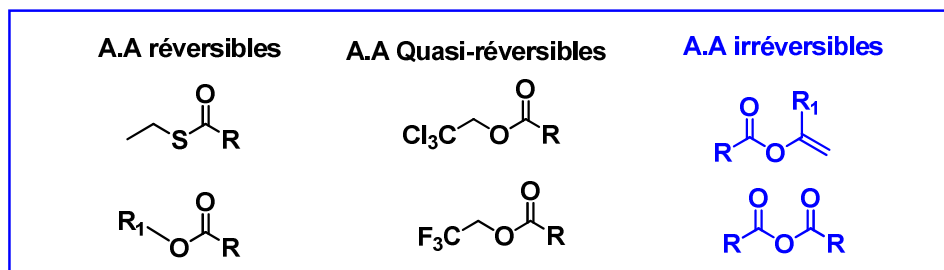


Schéma 19 : Catégories d'agents acylants.

Cette dernière catégorie est la plus adéquate et la plus utilisée pour l'acylation des alcools.

A titre d'illustration, nous citons deux exemples des travaux réalisés au sein de notre laboratoire, consacré à l'étude de l'effet de la nature des agents acylants sur la réactivité et la sélectivité de la lipase de *CAL-B* lors du dédoublement cinétique. Le premier concerne l'acylation enzymatique du α -tetralol, les auteurs ont utilisé deux esters d'énols et l'anhydride succinique (AS) comme donneurs d'acyle dans l'éther diéthylique comme solvant à 40°C.

²⁵(Schéma 20)

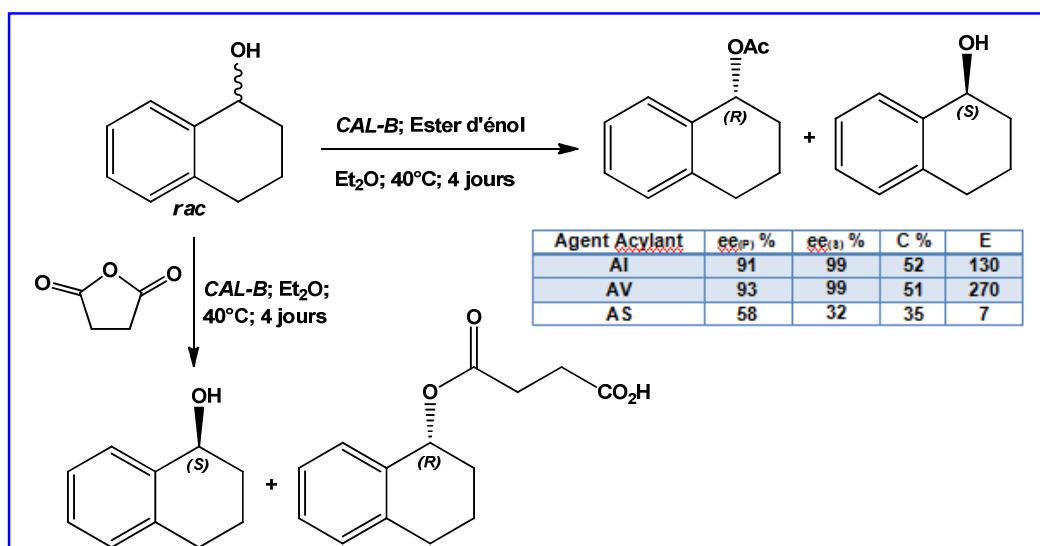


Schéma 20 : Acylation enzymatique du α -tetralol par différents agents acylants.

²⁵ N. Melais, M. Boukachabia, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Bioproc. biosyst. engineering*, **2015**, 38, 1579-1588.

Les meilleurs résultats en termes de réactivité et sélectivité ont été obtenus avec l'acétate d'isopropényle (AI) et l'acétate de vinyle (AV) C=52% et 51%, et E= 130 et 270, respectivement. Alors qu'avec l'anhydride succinique, ils ont remarqué une chute importante du facteur de sélectivité E=7 avec une conversion de 35%.

Ces effets sont variés selon la structure du substrat à dédoubler. Dans ce contexte, dans un travail réalisé par Bouzemi *et al*, consacré à l'étude du dédoublage cinétique d'une série d'alcools benzyliques secondaires par transestérification enzymatique, en utilisant les mêmes agents acylants de l'exemple ci-dessus. Les auteurs ont trouvé des résultats qui vont dans le sens contraire que ceux obtenus avec le α -tetralol avec un alcool hétérocyclique le 1-(quinolin-3-yl) éthanol²⁶(Schéma 21).

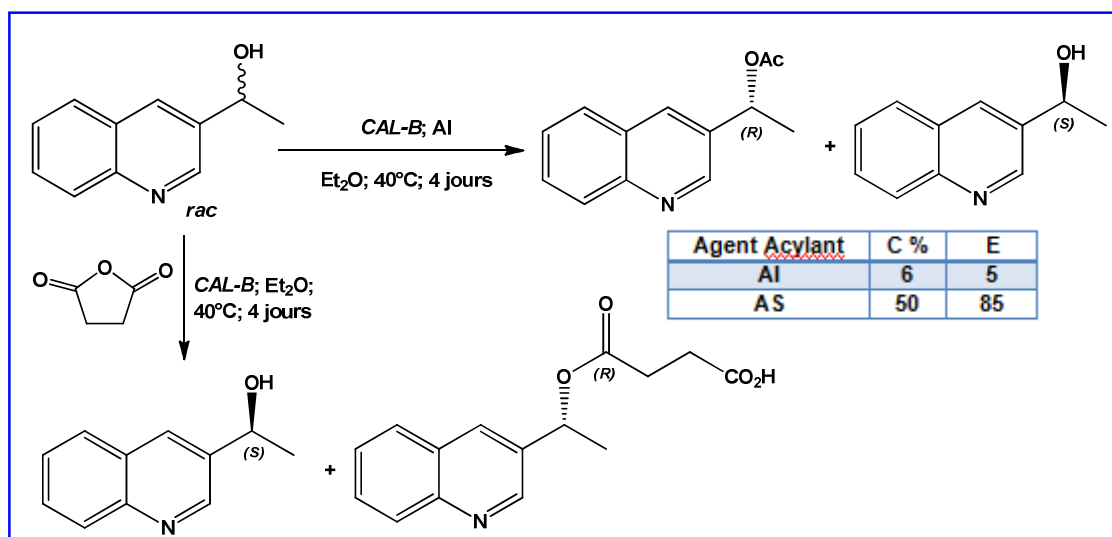


Schéma 21 : Acylation enzymatique du 1-(quinolin-3-yl) éthanol par différents agents acylants.

Ils ont trouvé que l'utilisation de l'anhydride succinique comme agent acylant permet d'optimiser nettement la réactivité et sélectivité de la lipase CAL-B sous les mêmes conditions. La conversion passe de 5% avec l'AI à 50% avec l'AS, et le facteur de sélectivité de 5 à E = 85.

D'autre part, pour les amines, le choix du donneur d'acyle est un paramètre très délicat à étudier, et ce vu les limitations imposées par la grande nucléophilie des amines, en la

²⁶ N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J.-C. Fiaud. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 627-630.

comparant avec celle des alcools. Ils sont repartis selon leurs réactivités en trois catégories, de très réactifs au moins réactifs²⁷, (**Schéma 22**) :

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

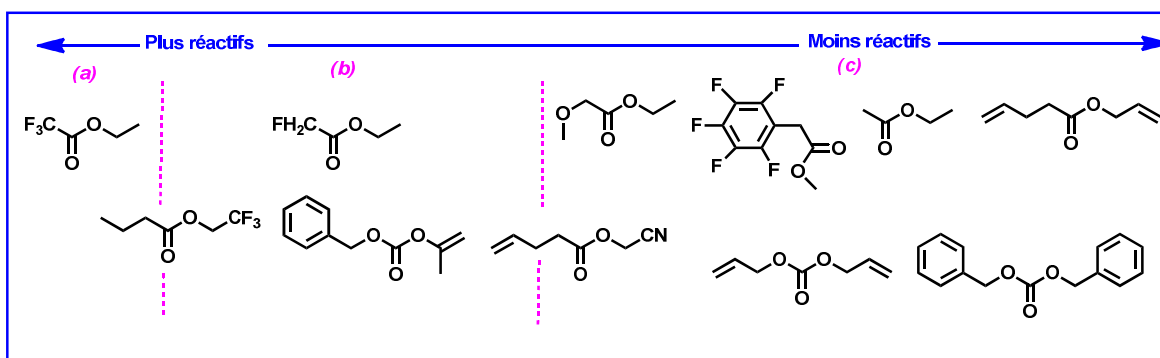


Schéma 22 : Différentes catégories de donneurs d'acyle utilisées pour la protection des amines.

Kanerva *et coll.*, ont décrit l'aminolyse énantiosélective des amines primaires catalysée par la lipase de *candida antarctica B* (CAL-B)²⁸. Les auteurs ont testé une série d'esters activés et non activés afin de déterminer les conditions optimales (**Schéma 23**). Les réactions ont été réalisées dans le toluène en présence du tamis moléculaire 4Å à 23°C durant 6 heures.

L'utilisation des esters activés, type méthoxy-acétates, comme agents acylant offrent d'excellentes énantiosélectivités et réactivités ($49\% \leq C \leq 50\%$ et $E > 200$), tandis que les esters non activés : l'isopropylacétate et le butanoate donnent de modestes conversions ($20\% \leq C \leq 25\%$) avec un effet important sur la sélectivité, avec le premier le facteur de sélectivité enregistré est de l'ordre de 49%, alors qu'avec le butanoate, aucune perturbation de l'énantiosélectivité n'est observée ($E > 200$).

²⁷S. Takayama, S. T. Lee, S-C. Hung, C-H. Wong, *Chem. Commun.*, **1999**, 127-128.

²⁸M. Pääviö, P. Perkiö, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asym.*, **2012**, *23*, 230-236.

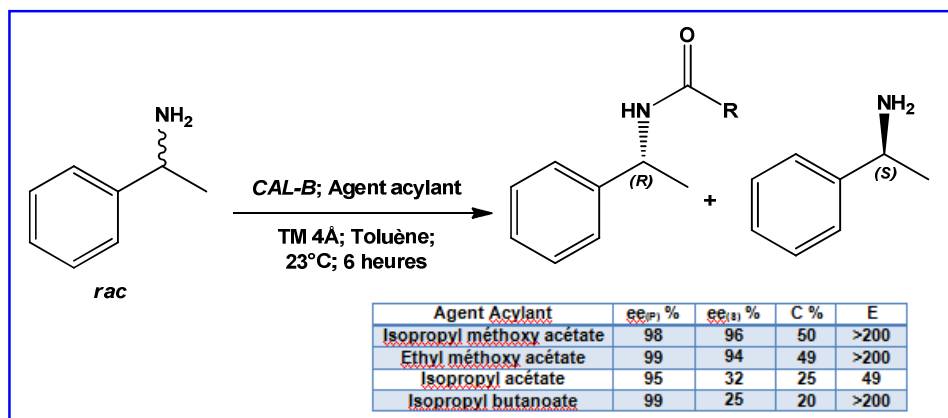


Schéma 23 : Aminolyse enzymatique du 1-phényléthanamine : effet du donneur d'acyle.

Il est impératif de signaler que la compagnie BASF produit près de trois douzaines d'amines énantiopures sur plusieurs centaines de tonnes par acylation enzymatique²⁹. Nous citons ici, un de leurs brevets, concernant la *N*-acylation de la 1-phényléthanamine par le biais d'un dédoublement cinétique catalysé par la *P. plantarii* et en utilisant le méthoxyacétate d'éthyle comme donneur d'acyle. Les deux énantiomères (*S*)-amine et (*R*)-amide sont obtenus énantiomériquement purs et sont séparés facilement par distillation ou extraction³⁰ (Schéma 24).

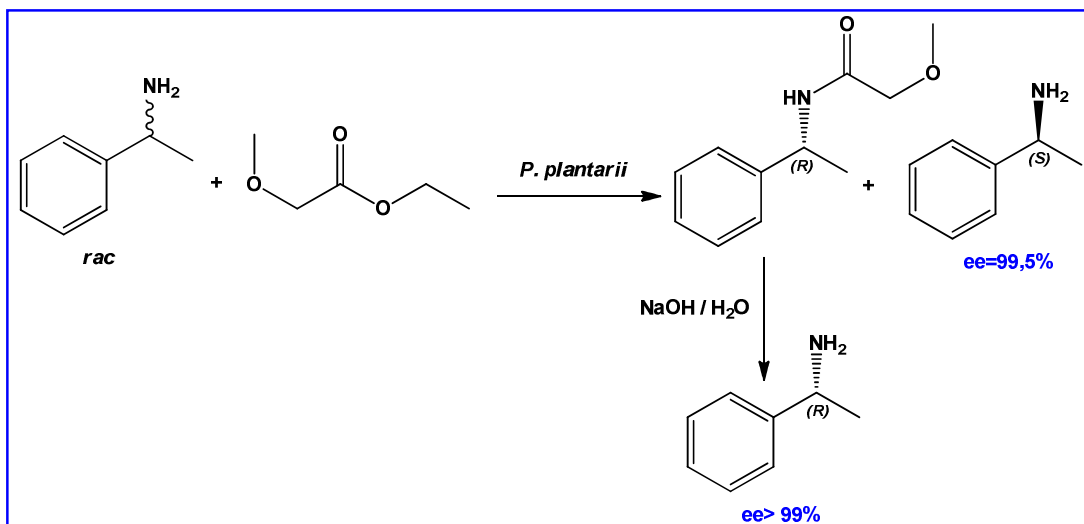


Schéma 24 : Aminolyse enzymatique du 1-phényléthanamine : Procédés breveté BASF.

²⁹ M. Doble, A. Kumar Kruth, V. Ganjanan Gaikar, "Biotransformations and Bioprocesses", Marcel Dekker, USA, 2004.

³⁰ D. Ghislieri, N. J. Turner, *Topics in Catalysis*, 2014, 57, 284-300.

✂ Les accepteurs d'acyle achiraux (Nucléophiles) :

Généralement, les réactions concernées par ce paramètre sont ceux de l'alcoolyse des esters et l'estérification des acides carboxyliques.

A titre d'exemple, nous citons un travail réalisé au sein de laboratoire, concernant l'alcoolyse enzymatique d'une série d'acétates benzyliques³¹. Les auteurs ont examiné l'influence de la structure du nucléophile sur la réactivité et la sélectivité de la lipase *CAL-B* lors de l'alcoolyse du 1-phényléthyl acétate. Les réactions ont été réalisées dans le toluène à 40°C durant 24 heures en présence du tamis moléculaire 4Å ; différents alcools ont été utilisés : primaires, secondaires et tertiaire (**Schéma 25**).

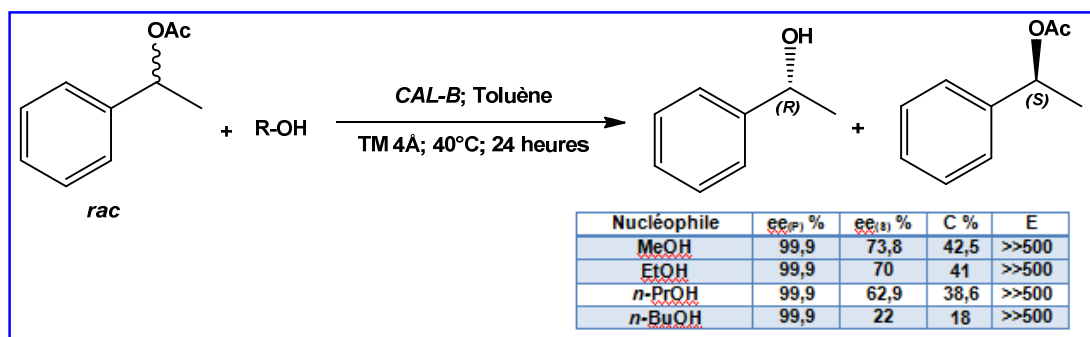


Schéma 25 : Alcoolyse enzymatique du 1-phényléthyl acétate : Effet du nucléophile.

Un effet important de la longueur de la chaîne carbonée du nucléophile, avec les alcools primaires. Plus la chaîne alkyle est longue et linéaire, plus la lipase est réactive. Le meilleur résultat en termes de réactivité et de sélectivité est obtenu avec le méthanol (C= 42,5% et E>>500).

Dans le même contexte, nous citons un travail réalisé par de Jesus *et coll.*, concernant l'estérification du l'acide 2-méthylbutyrique racémique *via* un dédoublément cinétique catalysé par la lipase de *CAL-B*³²(**Schéma 26**).

³¹A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, *Catal. Lett.*, **2015**, *145*, 1054-1061.

³²M. Mittersteiner, B. L. Linshalm, A. P. F. Vieira, P. B. Brondani, D. R. Scharf, P. C. de Jesus, *Chirality*, **2018**, *30*, 106-111.

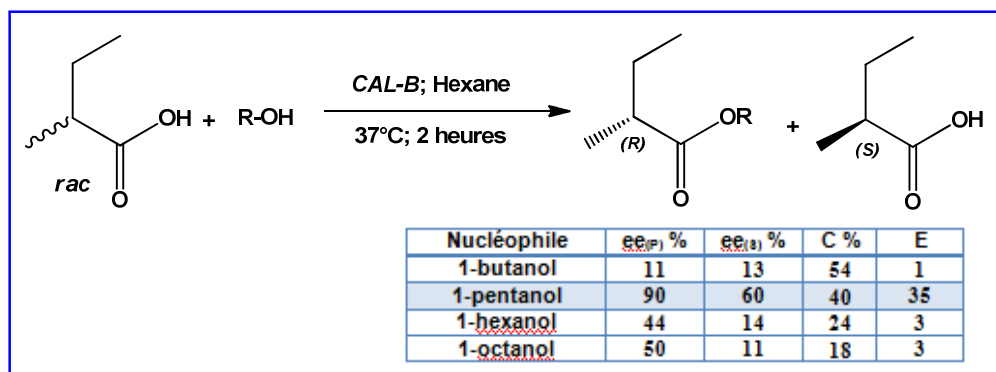


Schéma 26 : Estérification enzymatique de l'acide 2-méthylbutyrique racémique : Effet de l'alcool.

L'effet de la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool a été étudié, le meilleur résultat a été obtenu, après deux heures, avec le 1-pentanol dans l'hexane à 37°C (C=40% et E= 35).

II-7-4- Nature de substrat :

Avec les progrès que le domaine de la biocatalyse a connus, les réactions de dédoublement cinétique enzymatiques sont largement impliquées pour la préparation des molécules à haute valeur ajoutée. Une large panoplie de molécules énantiomériquement pures (alcools, acides carboxyliques, amines, acides aminés, diols, aminoalcools...) est obtenue *via* ce mode, et cette gamme ne cesse à s'étendre.³³

Nous présentons dans ce qui suit quelques exemples concernant précisément les alcools, les acides carboxyliques ainsi que les amines primaires qui font les substrats principaux des travaux réalisés au cours de cette thèse.

³³(a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. rev.*, **2011**, 111, 3998-4035. (b) S. Sen, J. E. Puskas, *Molecules*, **2015**, 20, 9358-9379. (c) R. Kourist, P. D. de María, K. Miyamoto, *Green Chem.*, **2011**, 13, 2607-2618. (d) F. van Rantwijk, M. A. Hacking, R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie*, **2000**, 131, 549-569. (e) E. Forró, F. Fulop, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, 19 (36), 6178-6187. (f) B. Skrobo, J. D. Rolfes, J. Deska, *Tetrahedron*, **2016**, 72, 1257-1275. (g) P. T. Bandeira, R. C. Alnoch, A. R. M Oliveira, *J. Mol. Catal B: Enzym.* **2016**, 125, 58-63. (h) J. C. Silva, M. G. Nascimento. *J. Braz. Chem Soc.*, **2016**, 27, 2226-2233. (i) H. P. Gurushankara. "Recent developments in biocatalysis and its influence on the pharmaceutical industry. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*", **2021**, 127-139. Academic Press. (g) F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant. *Res. Chem. Intermed.*, **2018**, 44, 6847-6860. (k) C. Pilissao M. da Graca Nascimento ; *Tetrahedron: Asymmetry* , **2006** , 17 , 428-433. (l) A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar; *Tetrahedron Lett.*, **2005** , 46 , 4511-4514. (m) R. Irimescu K. Kato, *Tetrahedron Letters* , **2004**, 45 523-525. (n) R. N. Patel, "Enzyme and Microbial Technology", **2002**, 31, 804-826. (o) A. Baldessari, C. P. Mangone; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , **2001**, 11, 335-341. (p) E. Brenner, R. Schneider , Y. Fort , *Tetrahedron*, **2002**, 58 , 6913-6924. (q) J. A. Bender, N. A. Meanwell, T. Wang. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 3111-3128. (r) T. Toyooka; *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2002**, 54, 25-56.

✂ **DCE d'alcools secondaires** : L'exemple ci-dessous, illustre l'effet de la structure du substrat lors de la réaction d'acylation enzymatique, où l'éloignement du centre stéréogène du noyau aromatique joue en défaveur de la sélectivité de la *Novozym 435* lors de la transestérification d'une série d'arylalkylcarbinol, en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans l'hexane comme solvant organique ³⁴(Schéma 27).

La meilleure conversion est achevée avec le rac-1-phenylpropan-2-ol (n=0), l'énantiomère (*R*)-acétate est obtenu avec un excès énantiomérique de 96% à une conversion de 51,1%.

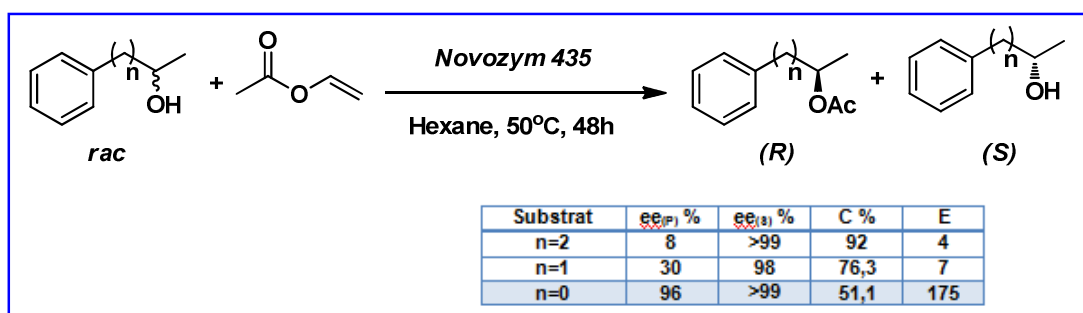


Schéma 27 : Influence de la structure du substrat lors d'alcools benzylques secondaires.

Dans le même contexte, nous citons un travail réalisé au sein de notre équipe par Belkacemi et al.³⁵ Les auteurs ont établi des dédoublements cinétiques par acylation catalysée par la *CAL-B* de quelques (\pm)-*trans*-2-aryl-1-cyclohexanol. En utilisant l'acétate d'isopropényle comme donneur d'acyle dans le TBME, un effet significatif de la structure des alcools cycliques est enregistré (schéma 28).

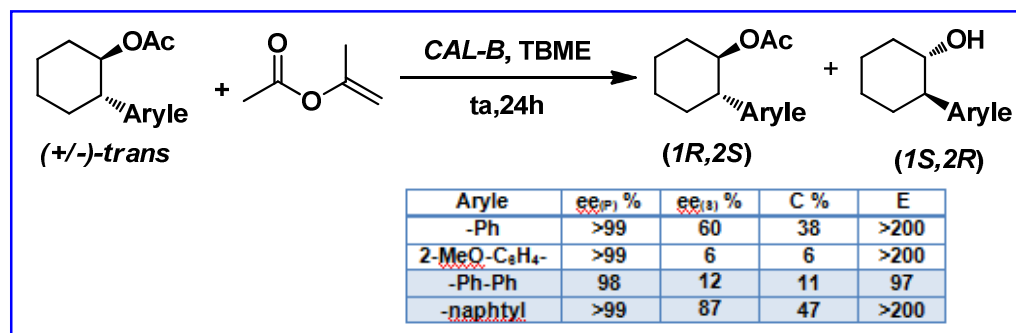


Schéma 28 : Influence de la structure du substrat sur la performance catalytique de la *CAL-B*.

³⁴Xing, X., Jia, J. Q., Zhang, J. F., Zhou, Z. W., Li, J., Wang, N., & Yu, X. Q. *Molecules*, **2019**, *24*, 490.

³⁵F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouieche, & O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2017**, *28*, 1644-1650

L'efficacité catalytique de la *CAL-B* dépend nettement des effets stériques et électroniques du substrat à dédoubler.

✂ **DCE d'amines primaires** : Des effets analogues, concernant la position de la fonction par rapport du centre stéréogène sont enregistrés lors de l'amidation de quelques amines benzyliques primaires par l'acide 4-penténoïque catalysée par la *CAL-B* en utilisant des liquides ioniques comme solvants. Un effet important de l'éloignement de la fonction amine primaire du centre stéréogène a été remarquée³⁶ (**Schéma 29**).

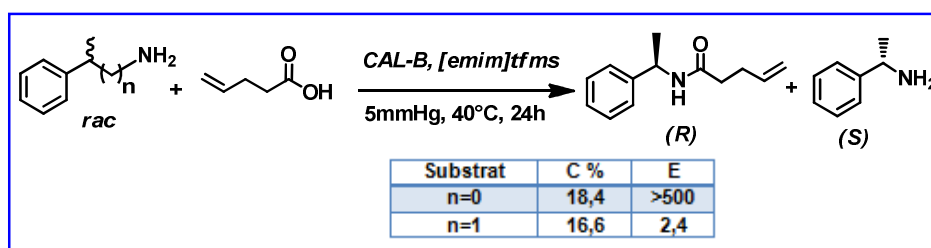


Schéma 29 : Amidation enzymatique d'amines primaires par l'acide 4-penténoïque.

Une excellente énantiosélectivité a été obtenue avec le 1-phényléthanamine avec un E>500. Cette dernière chute, considérablement, lors de l'amidation enzymatique du 2-phénylpropan-1-amine sous les mêmes conditions opératoires, et ce, pour le même taux d'avancement.

✂ Un autre exemple dans ce contexte, aussi attrayant qu'important, qui a remonté à la surface, avec la pandémie **COVID 19**, est celui, de la **Chloroquine** et l'**hydroxychloroquine**. Ces agents antiviraux ont été prescrits sous forme racémique, en février 2020, pour lutter contre le SRAS-CoV-2.³⁷ Il a été proposé de tester des deux énantiomères (*R*) et (*S*) en adoptant la stratégie du **chiral switch**.³⁸

En 2007, Gil *et coll.*, ont mis au point les conditions optimales, à l'échelle de la millimole, pour dédoubler une série d'amines primaires en utilisant des acides

³⁶ R. Irimescu, K. Kato; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, *30*, 189–194.

³⁷ (a) M. Wang, R. Cao, L. Zhang, X. Yang, J. Liu, M. Xu, Z. Shi, Z. Hu, W. Zhong, G. Xiao, *Cell Research*, **2020**, *30*, 269–271. (b) E. de Wita, F. Feldmann, J. Cronina, R. Jordanc, A. Okumura, T. Thomas, D. Scott, T. Cihlar, H. Feldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2020**, *117*, 6771–6776; (c) C.-J. Gordon, E.-P. Tchesnokov, J.-Y. Feng, D.-P. Porter, M. Gotte, *J. Biol. Chem.* published online **February 24, 2020**.

³⁸ S. Slagman, W. D. Fessner, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**. DOI: 10.1039/d0cs00763c.

carboxyliques aliphatiques comme agents acylants (**Schéma 30**).³⁹ Les réactions ont été réalisées des réactions d'amidation à 80°C, en utilisant la *Novozym 435* comme biocatalyseurs. Une des amines dédoublée avec succès le synthon chiral de l'(hydroxy) chloroquine (*rac-c*). Les deux énantiomères ont été obtenus énantio-purs ($ee > 99\%$) à une conversion de 50%.

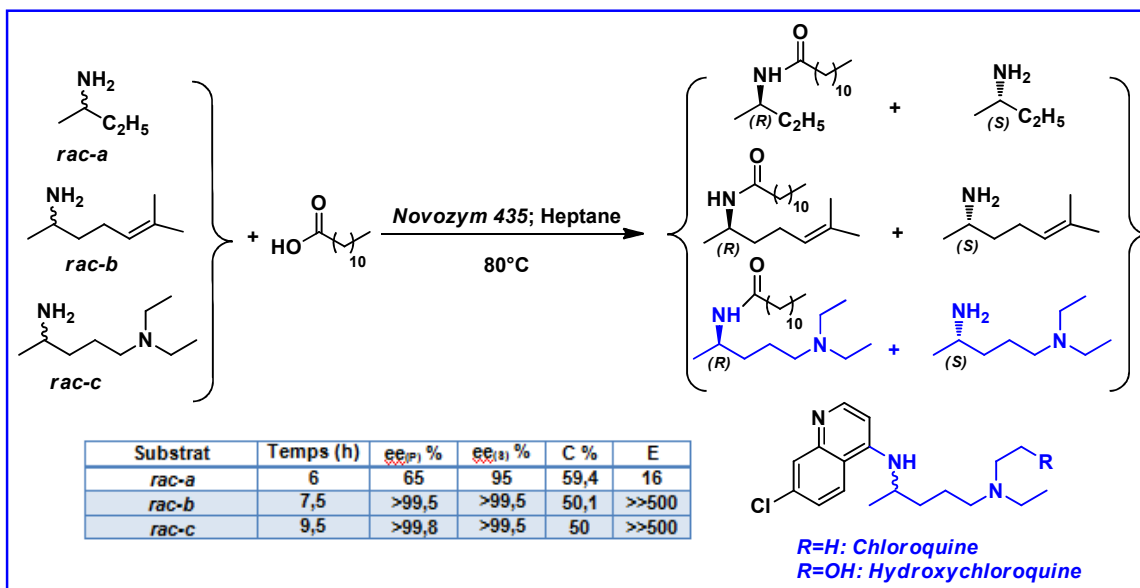


Schéma 30 : Amidation enzymatique d'amines primaires par l'acide laurique

Ils ont eu des résultats variables en fonction de la structure de l'amine dédoublée, en série aliphatique, les meilleures énantiosélectivités et réactivités sont enregistrés avec les structures ayant un substituant allongé et ramifié (*rac-b* et *rac-c*).

✂ **DCE d'acides carboxyliques** : Parmi les acides carboxyliques qui possèdent une activité biologique importante, nous citons les acides α -arylpropioniques et les acides α -aryloxypropioniques. La première classe « **les Profènes** » sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs), d'où l'activité thérapeutique est attribuée à l'énantiomère (*S*). Par contre la deuxième classe, utilisée principalement comme herbicides, l'activité biologique est portée par l'énantiomère (*R*).⁴⁰ La plupart des

³⁹ M. Nechab, N. Azzi, N. Vanthuyne, M. Bertrand, S. Gastaldian G. Gil, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 6918–6923.

⁴⁰ R. A. Sheldon, *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press. **1993**.

travaux décrits dans ce contexte concernent les dédoubléments cinétiques par estérification et hydrolyse enzymatiques.⁴¹

L'exemple ci-dessous (**Schéma 31**), montre l'influence du radical R sur l'avancement du dédoublément cinétique par alcoolyse des esters de l'ibuprofène par la *CAL-B* dans le toluène.

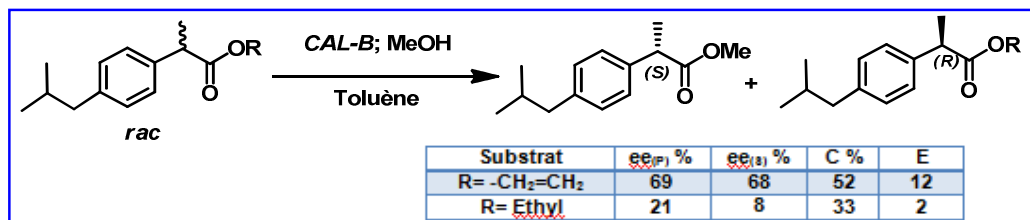


Schéma 31 : Transstérification lipasique des esters de l'ibuprofène.

Un effet significatif de la nature du substrat sur la réactivité de la *CAL-B* ainsi que le temps réactionnel de cette biotransformation. Cela, se révèle bien, en présence de la liaison vinylique du substrat ester sur la conversion et la sélectivité de la lipase sous les conditions expérimentales de cette réaction⁴²

II-8- Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons présenté une mise au point bibliographique sur la réaction de dédoublément cinétique enzymatique qui est une réaction très sollicitée pour l'obtention des molécules énantiomériquement enrichis, présentant un intérêt potentiel. Sur le plan industriel, c'est la méthode la plus exploitée vu les avantages de la biocatalyse mais également en termes de respect de l'environnement, dans le cadre d'un développement durable. Nous avons cité quelques exemples pointus concernant principalement les réactions d'acylation enzymatique, et qui montrent l'influence significative de divers paramètres sur la réactivité et l'énantiosélectivité, notamment, la nature de la lipase, du solvant et de l'agent acylant employés. Ces exemples sont choisis en fonction de la réaction principale et des substrats visés au cours de la réalisation de nos travaux de thèse.

⁴¹ (a) G. De Crescenzo, A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2000**, 9, 49-56. (b) R. Kourist, P. D. de María, K. Miyamoto, *Green Chem.*, **2011**, 13, 2607-2618.

⁴² E. Henke, H. Schuster, H. Yang, U.T. Bornscheuer, *Monstshefte für chimie*, **2000**, 131, 633-638.

Conclusion de la première partie

Au cours de cette première partie, nous avons mis l'accent sur l'importance de la biocatalyse pour la préparation des molécules d'intérêt potentiel dans différents domaines de chimie organique fine : agroalimentaire, fragrance et pharmaceutique. Elle répond parfaitement aux exigences contemporaines de la chimie verte. Elle est également en pleine expansion sur le plan industriel dans tous ces domaines pour la production des molécules à haute valeur ajoutée, cela est élucidé par des exemples d'applications industrielles. Parmi les six classes des enzymes, celle des hydrolases est la plus utilisée, particulièrement les lipases qui sont douées par leur haute sélectivité (*chimio-*, *régio-*, *diastéréo-* et *énantiosélective*), particulièrement, pour la préparation des briques moléculaires énantiomériquement enrichies. Les lipases interviennent efficacement lors d'un dédoublement cinétique, sur le plan industriel, c'est la méthode la plus exploitée par le bien des avantages de la biocatalyse en termes du respect de l'environnement et dans le cadre d'un développement durable. Nous avons cité quelques exemples pointus concernant principalement les réactions d'acylation enzymatique, et qui montrent l'influence significative de divers paramètres sur la réactivité et l'énantiosélectivité, notamment, la nature de la lipase, du solvant et de l'agent acylant employés. Une bonne maîtrise de ces paramètres donne lieu à un dédoublement cinétique enzymatique sélectif efficace.

Les travaux de cette thèse s'axent principalement sur la réaction de dédoublement cinétique par acylation catalysée par des lipases pour obtenir des molécules énantiomériquement pures ayant un intérêt potentiel dans différents domaines : pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique.

PARTIE 2

Résultats et discussions

Introduction de la deuxième partie

Parmi les bioprocédés industriels, les réactions d'acylation catalysées par des lipases sont les plus utilisées pour la création des liaisons esters et amides. Ces biotechnologies sont économiquement viables pour la synthèse des médicaments et des arômes. La biocatalyse est une alternative en plein expansion, par le bien de plusieurs avantages : catalyseurs verts, hautement sélectifs (*chimio-*, *régio-*, *énantio-* et diastéréosélectives), donnent des produits avec de bons rendements, sous des conditions douces, à température ambiante et pression atmosphérique, évitant ainsi l'utilisation de conditions de réaction les plus extrêmes qui pourrait provoquer des problèmes avec l'isomérisation, la racémisation et le réarrangement du composé. Elle permet également de réduire la formation des sous-produits.¹

Au sein du laboratoire de catalyse asymétrique éco-compatible (L.C.A.E), plusieurs investigations ont été dédiées à la recherche et la mise au point de nouveaux procédés biocatalysés en vue de la préparation des molécules bioactives d'intérêt potentiel. Une des variantes les plus étudiées est le dédoublement cinétique enzymatique, et ce, en étudiant les divers paramètres ayant une influence cruciale sur l'efficacité de cette réaction, afin d'obtenir des molécules à haute valeur ajoutée, sous forme énantiomériquement pures ou enrichies.²

Les travaux de cette thèse s'intègrent dans la continuité des travaux du laboratoire. En premier temps, nous sommes intéressées à l'optimisation de la réaction d'amidation de l'Ibuprofène catalysée par des lipases. Dans une seconde étape, nous avons focalisé notre intérêt sur la synthèse d'une nouvelle gamme d'amides à haute valeur ajoutée en optimisant les conditions réactionnelles enzymatiques. Finalement, nous avons mis au point des réactions d'acylation enzymatiques : *N*-acylation du 1-phényléthylamine et *O*-acylation du 1-phényléthanol, en utilisant des acides carboxyliques gras comme agents acylants verts.

Cette seconde partie est composée de trois chapitres :

¹C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil. *ACS Central Science*, **2021**, 7, 55-71.

²(a) J. C. Fiaud, R. Gil, J.-Y. Legros, L. Aribi-Zouiouèche, W. A. König, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, 33, 6967-6970. (b) C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J. Y. Legros, J. C. Fiaud, *J. Soc. Alger. Chim.*, **1999**, 9, 261-268. (c) L. Aribi-Zouiouèche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 4085-4088. (d) C. Bidjou, L. Aribi-Zouiouèche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 3025-3027. (e) M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouiouèche, O. Riant, *Tetrahedron: Asym.*, **2012**, 23, 828-833. (f) Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouèche, *Tetrahedron: Asym.*, **2013**, 24, 290-296. (g) A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouèche, *Tetrahedron: Asym.*, **2016**, 27, 1253-1259. (h) F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouèche, O. Riant, *Res. Chem. Intermed.*, **2018**, 44, 6847-6860. (i) M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouèche, O. Riant, *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43, 5293-5303. (j) N. Braia, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouèche, *Chirality*, **2018**, 30, 1312-1320. (k) S. Razi, S. Zeror, M. Merabet-Khelassi, E. Kolodziej, M. Toffano, L. Aribi-Zouiouèche, *Catal. Lett.*, **2021**, 151, 2603-2611.

- ❖ Le **Chapitre III** intitulé : « *Dédoublé cinétique via amidation enzymatique de l'Ibuprofène* », dans lequel, nous présentons nos investigations concernant l'optimisation de la réaction d'amidation enzymatique en étudiant quelques paramètres.
- ❖ Le **Chapitre IV** intitulé : « *Synthèse éco-compatible d'amides à haute valeur ajoutée catalysée par la CAL-B* », dans lequel nous détaillons les résultats de valorisation de la réaction d'amidation discutée lors du chapitre précédent, pour la mise au point d'une synthèse facile et éco-compatible d'une série de nouveaux d'amides dérivés d'acides des acides α -arylpropioniques (Profènes), acide α -phénoxy propionique et dérivés de la L-Boc-proline. Une comparaison avec une méthode chimique sera, également présentée.
- ✓ Le **Chapitre V** intitulé : « *O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol versus N-Acylation enzymatique du 1-phényléthanamine : Impact d'acides gras comme agents acylants verts* » est consacré à l'étude du comportement de trois lipases sur l'évolution de la N-acylation du 1-phényl éthanamine et la O-acylation du 1-phényl éthanol en utilisant des acides carboxyliques gras comme donneurs d'acyles verts.

CHAPITRE III :

*Dédoublement cinétique via amidation
enzymatique de l'ibuprofène*

III-1- Introduction :

Les **Profènes** appartiennent à la classe thérapeutique la plus utilisée à travers le monde, celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ils portent un carbone asymétrique C2, d'où l'existence de deux énantiomères le (**R**)-(-) et le (**S**)-(+). On distingue une douzaine de Profènes commercialisés en union européenne sous forme racémique à l'exception du naproxène.¹

L'**Ibuprofène**, acide 2-(4-isobutylphényl) propionique, est communément utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et est parfois commercialisé sous forme racémique. Seul le (**S**)-**Ibuprofène**, anti-inflammatoire non-stéroïdien et analgésique est 160 fois plus actif que le (**R**) (**Figure 18**).²

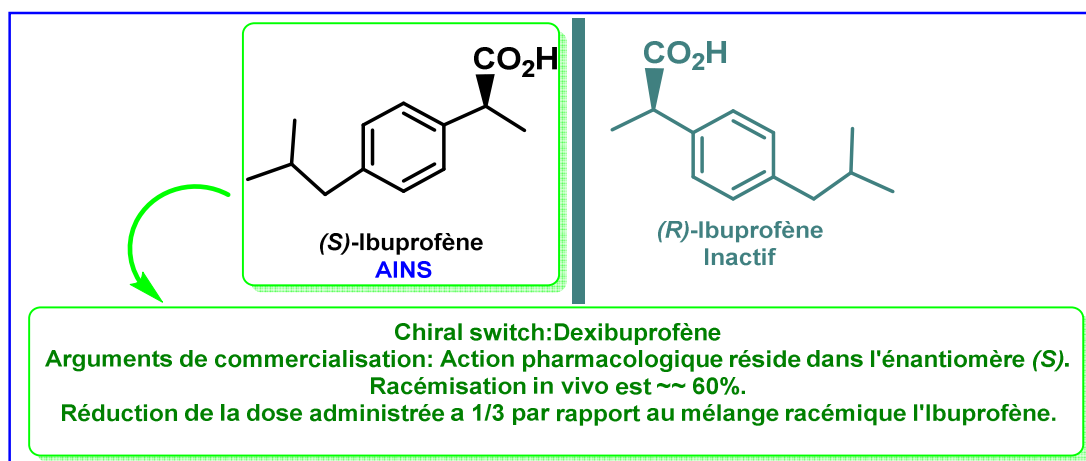


Figure 18 : Les deux énantiomères de l'ibuprofène.

La séparation des énantiomères des **Profènes** est alors un challenge à la fois pour les chimistes et pour les industries pharmaceutiques. Parmi les méthodes décrites, les dédoublements cinétiques par estérification et par hydrolyse enzymatiques sont les plus utilisées³.

¹(a) J. M. Mayer. *Acta pharmaceutica Nordica* ;**1990** ; 2 ;197-216. (b) J. M. Mayer , M. Moy-DeVos, C. Audergon, B. Testa ,J. C. Etter, *Internat. J. Tis. Reacts.*, **1994**,16, 59-72.

²(a) S. S. Adams, P. Bresloff, C.G. Mason, *J. Pharm. Pharma.* **1976**. 28, 256–7. (b) A. J. Hutt, J. Caldwell, *Clin. Pharmacokinet.* **1984**. 9, 371–3.

³(a) F. van Rantwijk, M. A.Hacking, R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **2000**, 131, 549-569. (b) G. De Crescenzo, A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *J. Mol. Catal B: Enz.*, **2000**,9, 49-56. (c) R. Kourist, P. D.de María, , K. Miyamoto, *Green Chem.*, **2011**,13, 2607-2618. (d) S. Ghofrani, A. Allameh, P. Yaghmaei, D. Norouzian, *D. J. Pharma. Sci.*, **2021**, 1-7. (e) S. Salgın, M. Çakal, U. Salgın, *Prep. Biochem. biotechnol.*, **2020**, 50, 148-155. (f) J. Ou, X. Yuan, Y. Liu, P. Zhang, W. Xu, K. Tang. *Proc. Biochem.*, **2021**, 102, 132-140. (g) T. Siódmiak, G. Haraldsson, J. Dulęba. M. Ziegler-Borowska, J. Siódmiak, M. P. Marszał. *Catalysts*, **2020**, 10, 876.

A notre connaissance, le dédoublage cinétique par amidation enzymatique de l'*Ibuprofène* n'a été jamais décrit auparavant. Sur cette base, et vue l'importance de la liaison amide, nous avons engagé de poursuivre le travail préliminaire initialisé au sein de notre équipe,⁴ afin d'aboutir à quelques *amidoprofènes* dérivés de l'*Ibuprofène* sous forme énantiopure.

L'objectif principal de cette étude est l'optimisation de la réaction de dédoublage cinétique *via* amidation catalysée par la lipase de *CAL-B*, en vue de l'obtention de nouveaux amides dérivés de l'*Ibuprofène*. Cela est envisagé par la modulation de quelques paramètres pouvant améliorer la réactivité et la sélectivité lipasique, en l'occurrence, la nature du solvant et celle de l'amine utilisée. Pour cela, nous avons maintenu les conditions optimales antérieurement déterminées : lipase *CAL-B*, température (80°C) et de concentration du milieu réactionnel (1mmole d'acide carboxylique/2 mmoles d'amine) (**Schéma 32**).

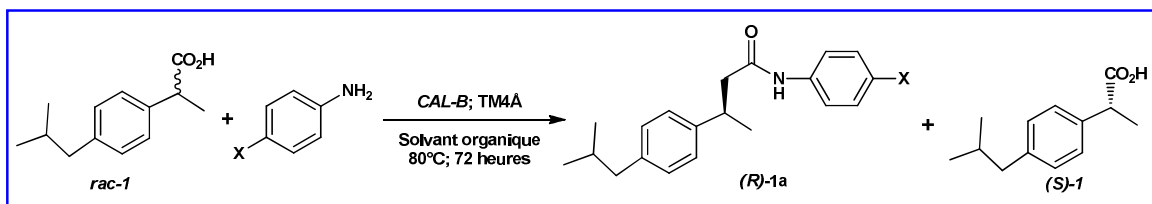


Schéma 32 : Réaction modèle.

III-2- Aperçu bibliographique :

Comme nous l'avons déjà mentionné, la plupart des travaux décrits concernant la séparation des deux énantiomères de l'*Ibuprofène* exploitent le dédoublage cinétique par estérification ou hydrolyse enzymatique. Parmi les lipases les plus utilisées : la lipase de *Rhizomucor miehei*⁵, la lipase de *Carica papaya*⁶ et la lipase de *Candida antarctica* génétiquement modifiée⁷. Il est important de signaler ici, que les meilleures sélectivités ont été enregistrées avec la lipase de *CCL* (formellement nommée *CRL*), soit en apportant des modifications sur le système réactionnel (Utilisation des additifs, supports solides ou *co*-solvants), soit en apportant des modifications génétiques sur les enzymes.

⁴ A. Zaidi Bounouala, *Étude de la résolution cinétique de molécules d'intérêt pharmacologique par alcoololyse et aminolyse enzymatiques : Influence de quelques paramètres*. Thèse de doctorat LMD, Université Badji Mokhtar-Annaba- **2016**.

⁵ Z. Habibi, M. Mohammadi, M. Yousefi. *Proc. Biochem.*, **2013**, 48, 669-676.

⁶ I. S. Ng, S. W. Tsai, *Proc. Biochem.*, **2006**, 41, 540-546.

⁷ B. Qin, P. Liang, X. Jia, X. Zhang, X. M. Mu, X. Y. Wang, S. You, *Catal. Comm.*, **2013**, 38, 1-5.

A titre d'illustration nous citons deux exemples de travaux réalisés à des périodes extrêmement différentes :

✂ Le premier exemple a été décrit par Kim et Lee⁸. Ils ont montré l'influence de l'hydrophobicité du solvant lors de l'estérification de l'**Ibuprofène** catalysée par la lipase de *Candida cylindracea* (CCL), en utilisant le méthanol comme solvant, et la silice comme support solide. (Schéma 33).

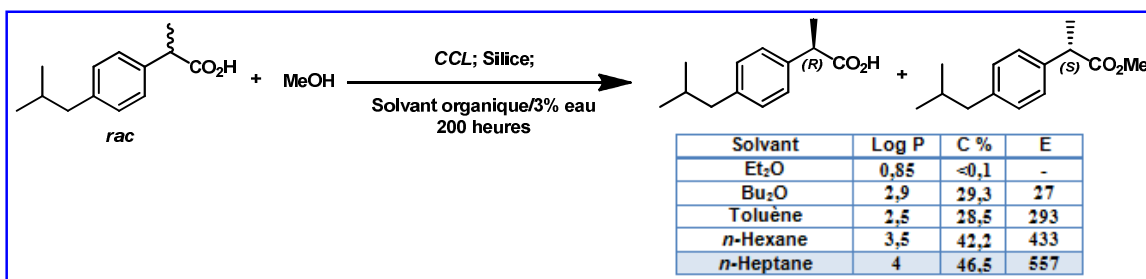


Schéma 33 : Estérification de l'Ibuprofène par le méthanol dans différents solvants catalysée par la CCL.

Les résultats obtenus ont montré que la sélectivité et la réactivité de la CCL augmentent lorsque le caractère hydrophobe du solvant est plus prononcé, et ce, en présence de la silice comme additif. La lipase est hautement performante dans l'heptane, la réaction est effectuée avec une conversion de C = 46.5% et un facteur de sélectivité de E > 500.

✂ Le second exemple décrit par Gerard et al.,⁹ concerne le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de l'ester éthylique de l'Ibuprofène dans un système biphasique. Les auteurs ont comparé la performance de trois lipases, une lipase brute issue de la levure *Yarrowia lipolytica* (Lip2P) et deux iso-formes de la lipase de *candida rugosa* (CRL1 et CRL4) préparées sous forme recombinante de la même levure. La masse protéique de ces deux dernières est 10 fois plus élevée que la lipase brute Lip2P.

Ils ont trouvé que l'ester éthylique de l'Ibuprofène est hydrolysé avec un excellent facteur de sélectivité (E>200) en faveur de l'énantiomère (S).

⁸ M. G. Kim; S. B. Lee, *J. Ferm. Bioengin.*, **1996**, 81, 269-271.

⁹ D. Gerard, M. Gueroult, L. Casas-Godoy, J. S. Condoret, I. André, A. Marty, S. Duquesne. *Tetrahedron: Asym.*, **2017**, 28, 433-441.

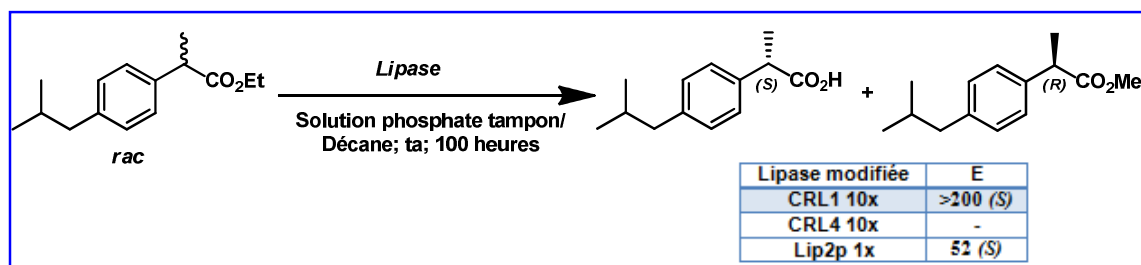


Schéma 34 : Hydrolyse de l'ester éthylique de l'Ibuprofène catalysée par des lipases génétiquement modifiées.

III-3- Dédoublage cinétique via amidation enzymatique de l'Ibuprofène :

Dans un premier temps nous avons envisagé d'optimiser la réaction de dédoublage cinétique de l'*Ibuprofène* par amidation catalysée par la lipase de *candida antarctica* fraction B immobilisée sur résine acrylique (*CAL-B*) en utilisant comme source d'azote une amine primaire aromatique, la 4-(trifluorométhyl)aniline, et ce, en étudiant l'effet de l'hydrophobicité du milieu réactionnel sur l'évolution du processus catalytique lipasique.

III-3-1-Choix des modèles de l'étude :

✂ **Les réactifs :** La molécule à dédoubler est un acide carboxylique appartenant à la grande famille la plus utilisée des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les anilines sont largement utilisées sur le plan industriel, elles sont utilisées dans les industries des peintures, des colorants, des explosifs, des pesticides, des herbicides et des médicaments¹⁰. L'acylation de l'aniline donne lieu à l'acétanilide qui est un analgésique ; et il est aussi un intermédiaire clé pour la synthèse du paracétamol. Le choix de la 4-(trifluorométhyl) aniline est justifié par le fait que la structure amide visée est inédite, et ce, suite à une investigation bibliographique dans les bases de données spécifiques (*REAXYS* et *Scifinder*).

¹⁰(a) C. Xiao, J. Ning, H. Yan, X. Sun, J. Hu. *Chin. J. Chem. Engineer.* **2009**, *17*, , 500-505. (b) J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers; "Chimie Organique", De boeck Edt., © Oxford University Press, **2001**. (c) J. Wang, H. Ma, P. J. Boor, V. M. S. Ramanujam, G. A. S. Ansari, M. F. Khan. *Free Radical Biol. Med.*, **2010**, *48*, 513-518. (d) M. Nehate, V. V. Bokade. *Appl. Clay Sci.*, **2009**, *44*, 255-258. (e) G. Emtiazi, M. Satarii, F. Mazaherion. *Wat. Res.*, **2001**, *35*, 1219-1224. (f) F. J. O'neill, K. C. A. Bromley-Challenor, R. J. Greenwood, J. S. Knapp. *Wat. Res.*, **2000**, *34*, 4397-4409.

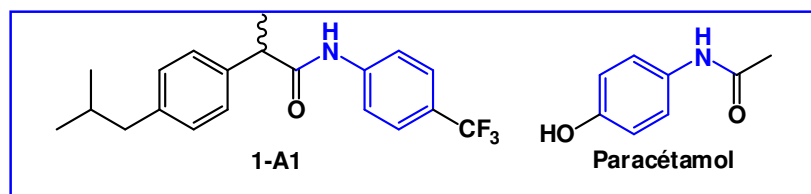


Figure 19 : Le modèle d'investigation.

- **Le choix de la lipase de CAL-B** : c'est la lipase de *Candida antarctica* fraction B immobilisée sur une résine acrylique, achetée de chez *Sigma-Aldrich* d'une activité de 10000 Unités par g. Formellement connue sous les noms : *SP435*, *Novozym* ou *CAL-B*), elle contient 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 33 kDa (**Figure 20**). Le site actif de cette enzyme est constitué de la triade catalytique suivante : la **sérine 105**, agissant comme nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique ; l'**histidine 224** et l'**acide aspartique 187** qui stabilise ce dernier¹¹.

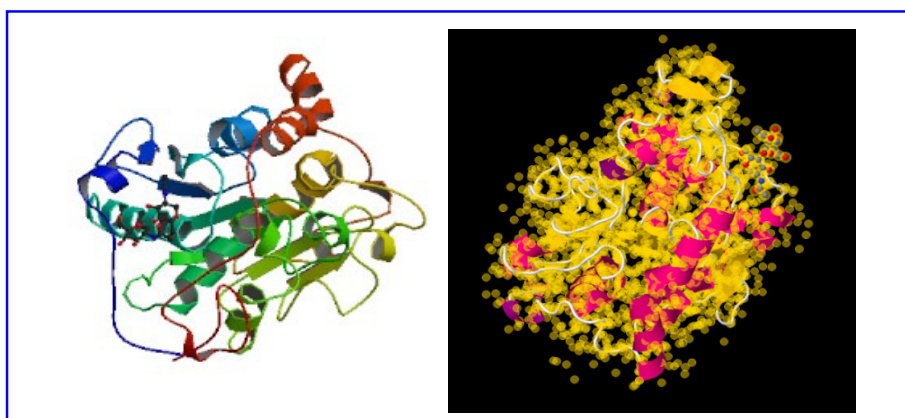


Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la CAL-B¹².

En plus des acides aminés de la triade catalytique (S105, H224, et D187), il existe le tryptophane 104 situé au fond du site actif. Les résidus thréonine 40 et glutamine 106 qui forment le trou oxy-anionique stabilisant l'intermédiaire réactionnel. Dans le fond du site actif, se trouve la sérine 47, la thréonine 42, et la glycine 39 limitant la taille de la poche stéréospécifique, responsable de la reconnaissance chirale. L'entrée du site actif est bordée sur

¹¹(a) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 790–792. (b) J. Uppenberg, N. Ohrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16838–16851.

¹²<http://www.rcsb.org/pdb/>

un côté par les résidus leucine 278, alanine 282 et isoleucine 285, et sur l'autre bord, c'est le résidu histidine 224 qui limite essentiellement l'accès au site actif.¹³

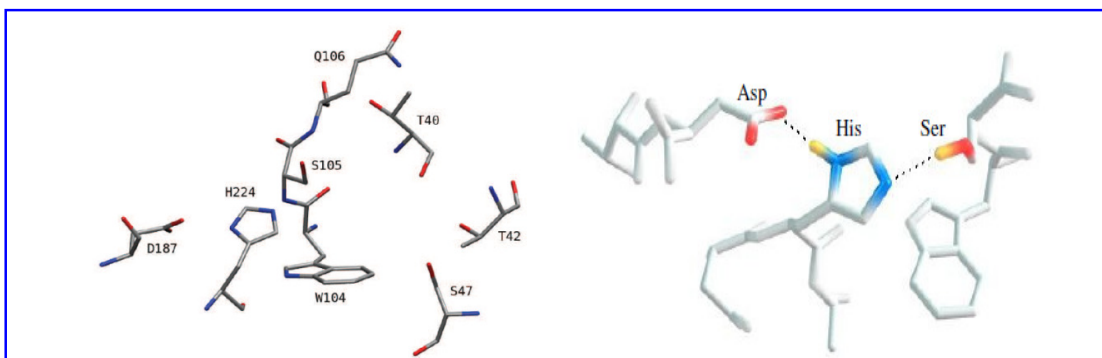


Figure 21 : Triade catalytique de la CALB et acides aminés importants du site actif.

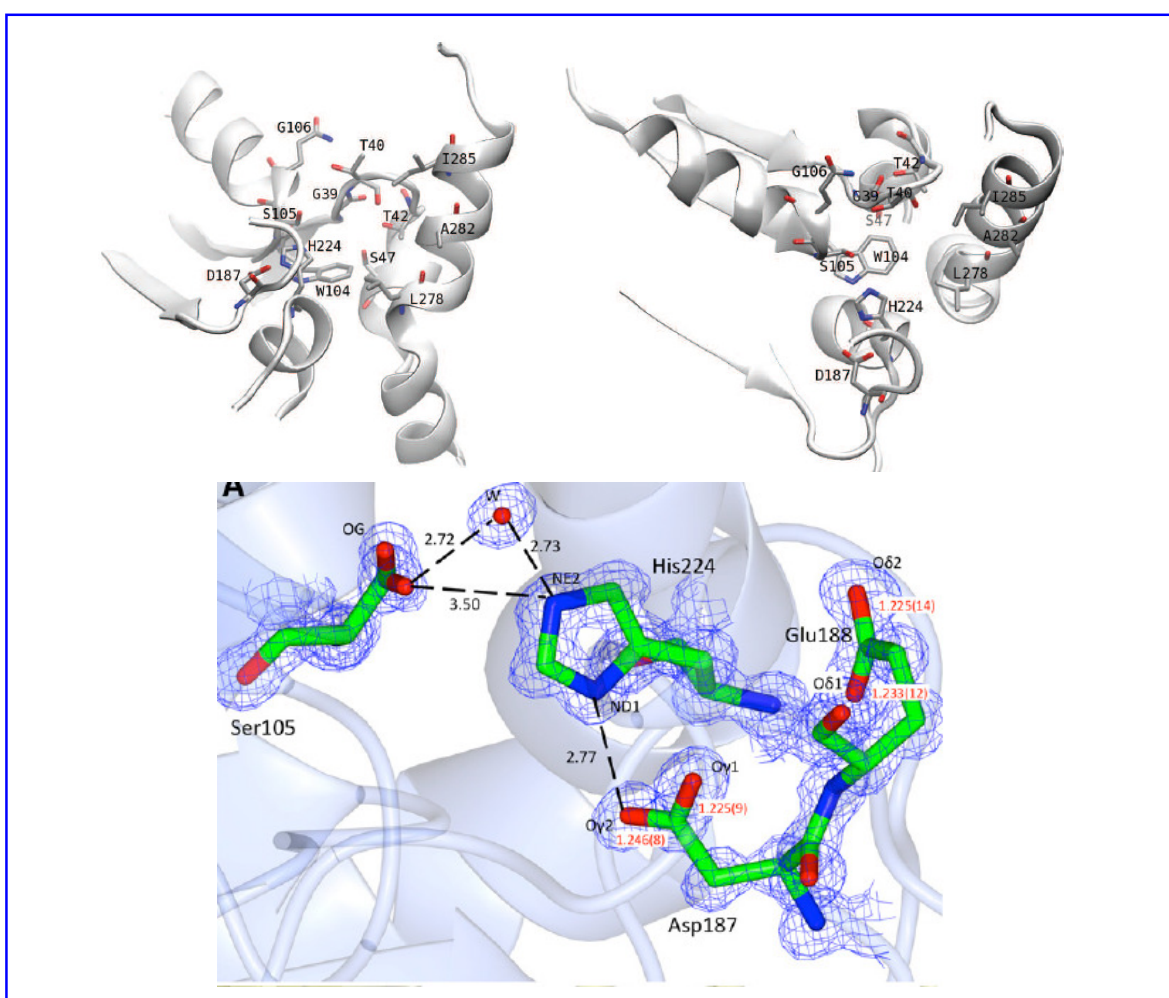


Figure 22 : Le site actif de la CALB¹⁴

¹³(a) L. Chaput, *Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de Candida antarctica: étude par modélisation moléculaire et expérimentation*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle. **2012**, pp 15-17; (b) J. Błaszczuk, P. Kielbasiński. *Crystals*, **2020**,10, 404.

¹⁴ B. Stauch, S. J. Fisher, M. Cianci. *J. lip. res.*, **2015**,56, 2348-2358.

La CAL-B immobilisée est thermostable en milieu organique et peut être utilisée à 120 °C pour de longues durées sans perte d'activité¹⁵. Sa capacité à fonctionner avec une large gamme de substrats est amplement exploitée par les industriels des secteurs agroalimentaires et biotechnologiques, en particulier pour des réactions de synthèse dans des milieux à faible teneur en eau. Elle constitue l'enzyme la plus performante pour la formation de la liaison amide, selon le mécanisme proposé ci-dessous (Schéma 35).¹⁶

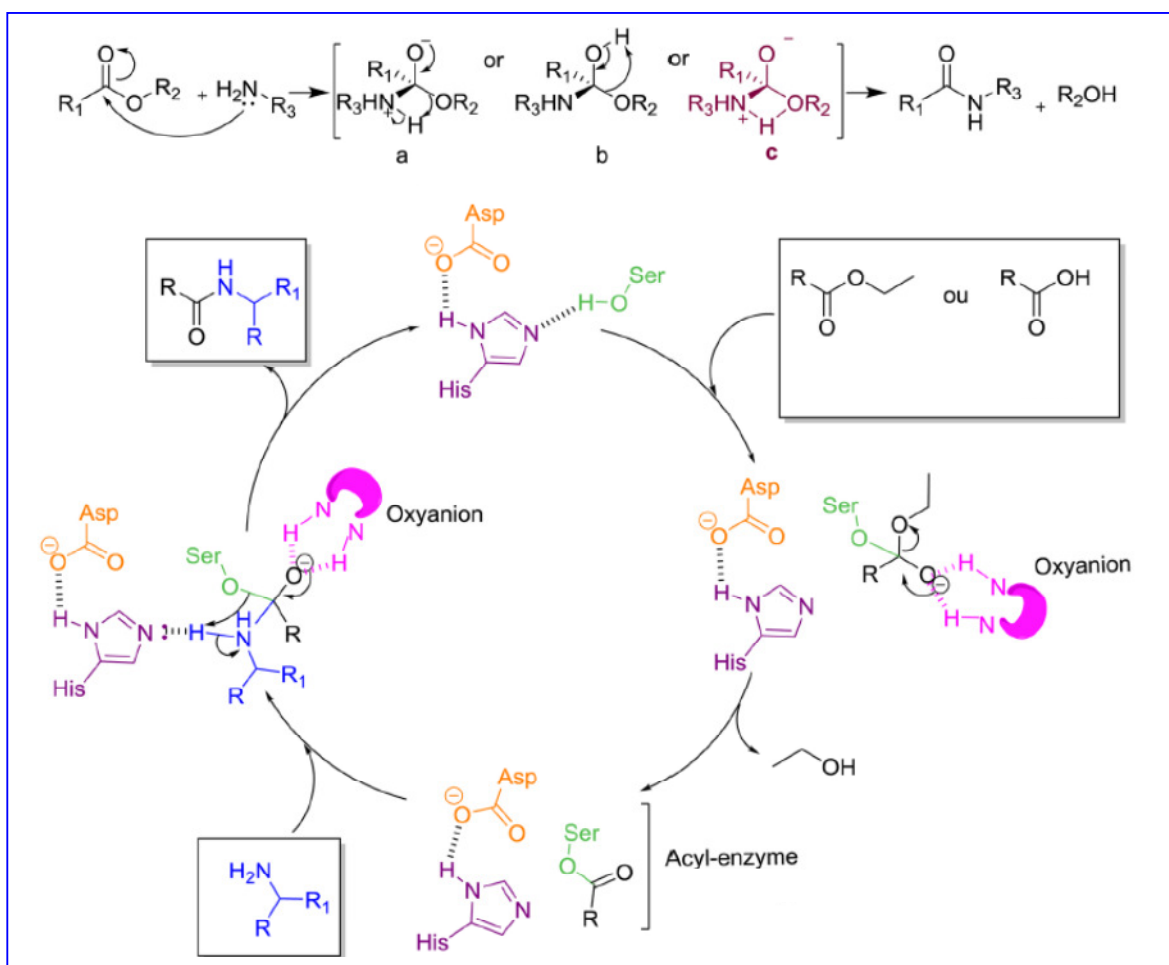


Schéma 35 : Mécanisme postulé de l'amidation par la lipase de CAL-B

III-3-2-Synthèse des racémiques :

L'*Ibuprofène*, commercialisé sous forme sels de sodium. L'acide est récupéré propre, sous forme de cristaux blancs quantitativement, après une simple acidification (Schéma 36).

¹⁵ N. Zhang, W.-C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks. *Protein Engineering*, **2003**, *16*, 599-605.

¹⁶(a) E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor. *Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504. (b) R. N. Lima, C. S. dos Anjos, E. V. Orozco, A. L. Porto. *Mol. Catal.*, **2019**, *466*, 75.

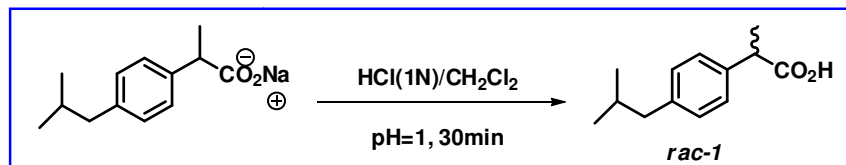
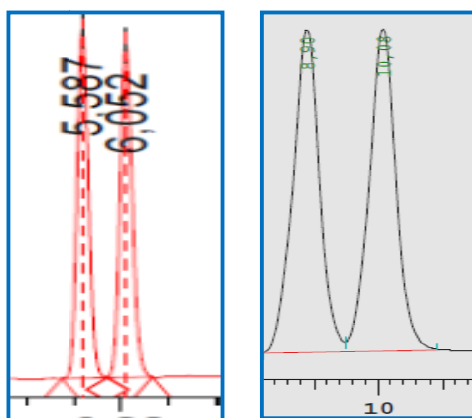


Schéma 36 : Acidification des sels de l'ibuprofène.

Les deux énantiomères du **rac-1** sont séparés par HPLC chirale. La colonne utilisée est la *Chiralcel OJ-H* Colonne de type déposée sur un polymère de Cellulose tris (4-methylbenzoate), en utilisant un mélange d'éluant (v,v) : isohexane/ isopropanol (95/05), en mode isocratique, avec un débit fixe de : 1mL/min. Les temps de rétention sont comme suit : $t_r=5.58$ min; $t_r= 6.05$ min ; ou bien, en utilisant un mélange d'éluant (v,v) : isohexane/ isopropanol (98/02), en gardant le même débit, les temps de rétention enregistrés sont : $t_r=8.9$ min; $t_r= 10.08$ min. (**chromatogrammes 1**).



Chromatogrammes 1 : Les deux énantiomères du **rac-1** en utilisant un mélange d'éluants (v,v) : isohexane / isopropanol (95/5) et (98/2).

Le 2-(4-isobutylphényl)-N-(4-(trifluorométhyl) phényl)propanamide racémique (**rac-1-A1**) est obtenu par couplage direct de l'acide 2-(4-isobutylphényl) propionique (**rac-1**) et la 4-(trifluorométhyl)aniline, en présence d'un agent de couplage, le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dans le Chloroforme à température ambiante (**Schéma 37**).

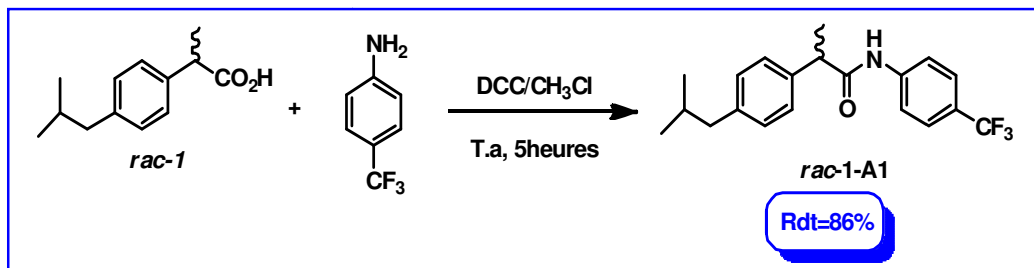


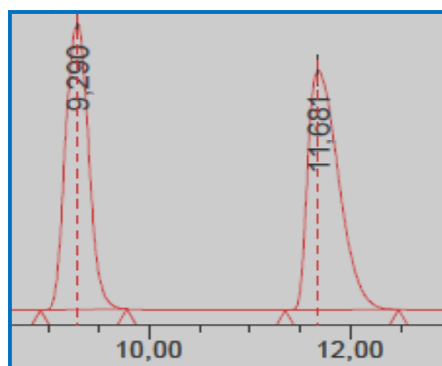
Schéma 37 : Synthèse du 2-(4-isobutylphényl)-N-(4-(trifluorométhyl)phényl)propanamide racémique (*rac-1-A1*)

L'amidoprofène (*rac-1-A1*) est obtenu sous forme de cristaux blancs après un traitement acido-basique suivi par cristallisation recristallisation dans l'hexane, avec un rendement chimique isolé de **86%**. Sa structure est élucidée par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C et HRMS.

❖ **Caractérisation physicochimique :**

Composé	M [g/mol]	Formule brute	T _f [°C]	R _f
<i>rac-1-A1</i>	349,17	C ₂₀ H ₂₂ F ₃ NO	140	0,37 (CH₂Cl₂)

Les deux énantiomères du *rac-1-A1* synthétisé sont séparés par HPLC chirale. La colonne utilisée est la *Chiralpak IA* (Colonne de type immobilisée sur un polymère de Amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate), en utilisant un mélange d'éluant (v,v): isohexane/ EtOH (95/05) , en mode isocratique. Avec un débit fixe de : 1mL/min. Les temps de rétention sont comme suit : tr=9.29 min; tr= 11.68 min (**chromatogramme 2**).



Chromatogramme 2 : Les deux énantiomères du *rac-1-A1*.

❖ **Caractérisation spectroscopique :**

- ✓ **En RMN ^1H** : Ce composé est caractérisé par l'apparition d'un singulet large vers 7,32 ppm du proton amide et de quatre nouveaux protons aromatiques du noyau aniline qui apparaissent entre 7,48 et 7,41 ppm. (**Figure 23**).
- ✓ **En RMN ^{13}C** : la structure de l'amide est élucidée par l'apparition d'un signal à 171,9 ppm, caractéristique du carbone du C=O de l'amide. Ainsi qu'un pic à 140,9 ppm caractéristique du carbone adjacent du -NH de l'amide. (**Figure 24**).
- ✓ **En HRMS (ESI $^+$)** m/z trouvée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 350.17251 ; calculée : 350.17263 . (**Figure 25**).

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C et HRMS du 2-(4-isobutylphényl)-N-(4-(trifluorométhyl)phényl) propanamide racémique (*rac-1-A1*) sont respectivement :

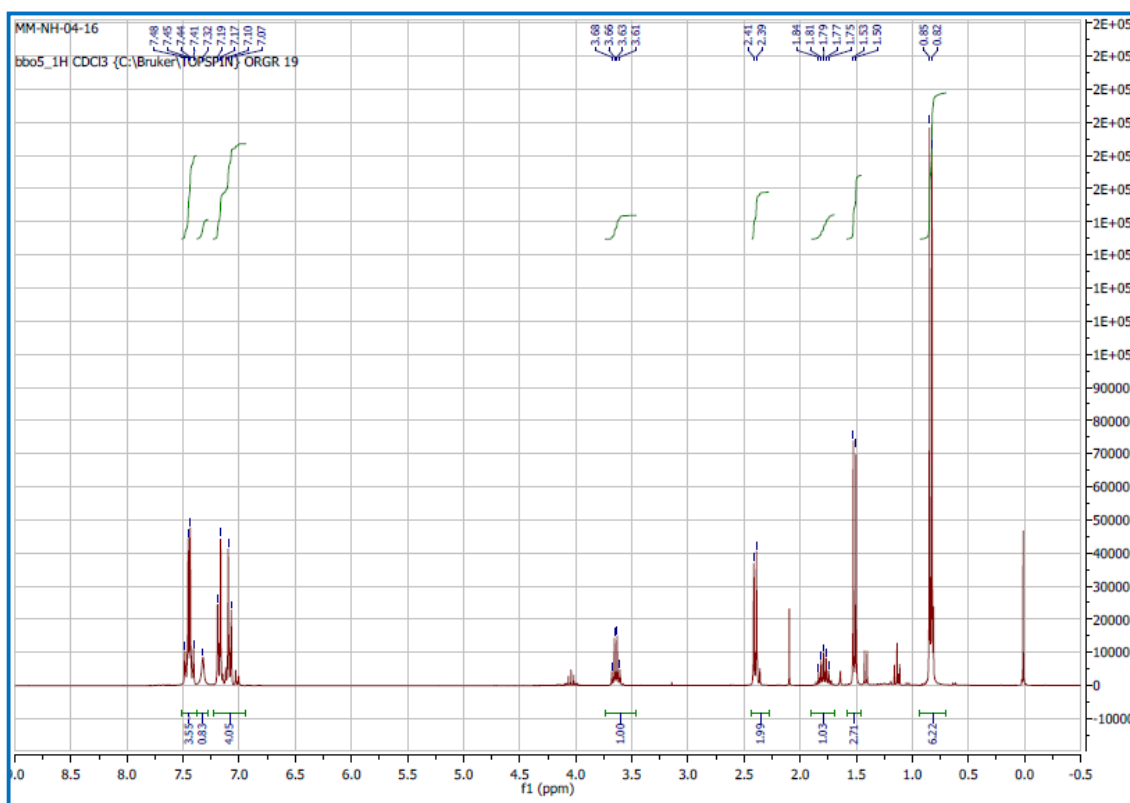


Figure 23 : Spectre RMN ^1H du *rac-1-A1*.

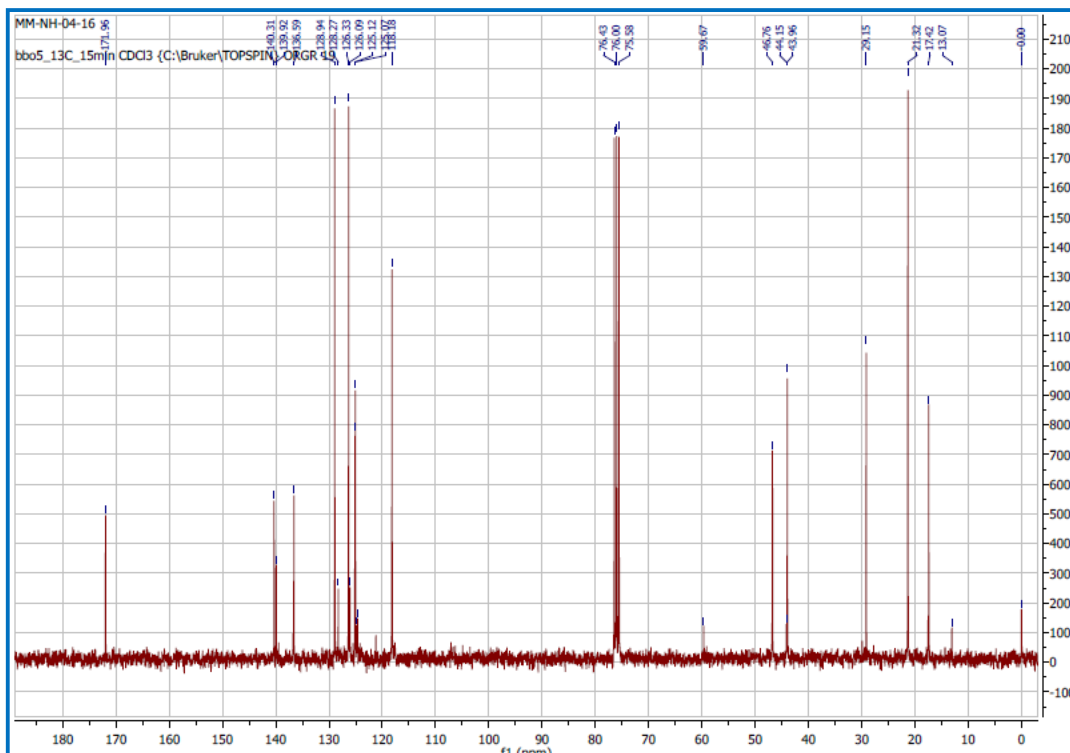


Figure 24 : Spectre RMN ¹³C du rac-1-A1.

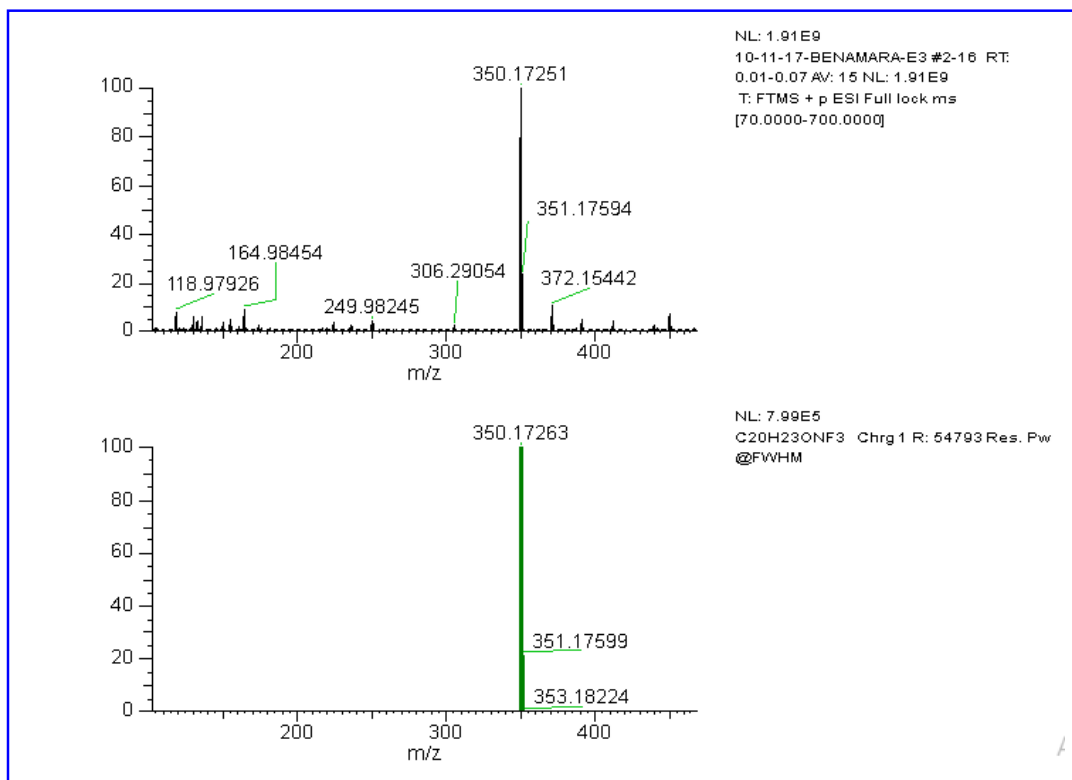


Figure 25 : Spectre HRMS du rac-1-A1.

III-3-3-DC via amidation enzymatique de l'Ibuprofène : effet du solvant :

A ce stade de l'étude, nous avons examiné l'effet de la nature du solvant lors de l'amidation de l'ibuprofène catalysée par la *CAL-B*. Les solvants choisis sont d'hydrophobicités différentes : l'heptane, le toluène, le *tertio*-butanol (*t*-BuOH) et le 2-méthyl-2-butanol (2M2B).

Les expériences sont effectuées sur un 1 mmole du *rac-1*, 2mmoles la 4-(trifluorométhyl) aniline, en présence d'un mélange équimassique *CAL-B*/ Tamis moléculaire 4Å (50mg /50 mg). 1mL de solvant organique est ajouté. Le tout est soumis sous agitation magnétique durant 72 heures à 80°C. (**Schéma 38**).

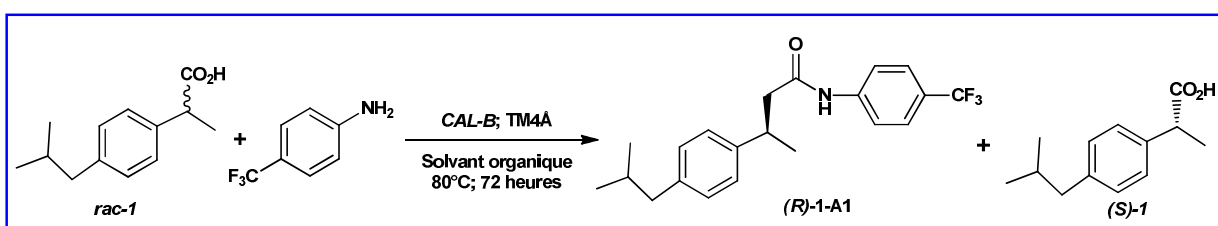
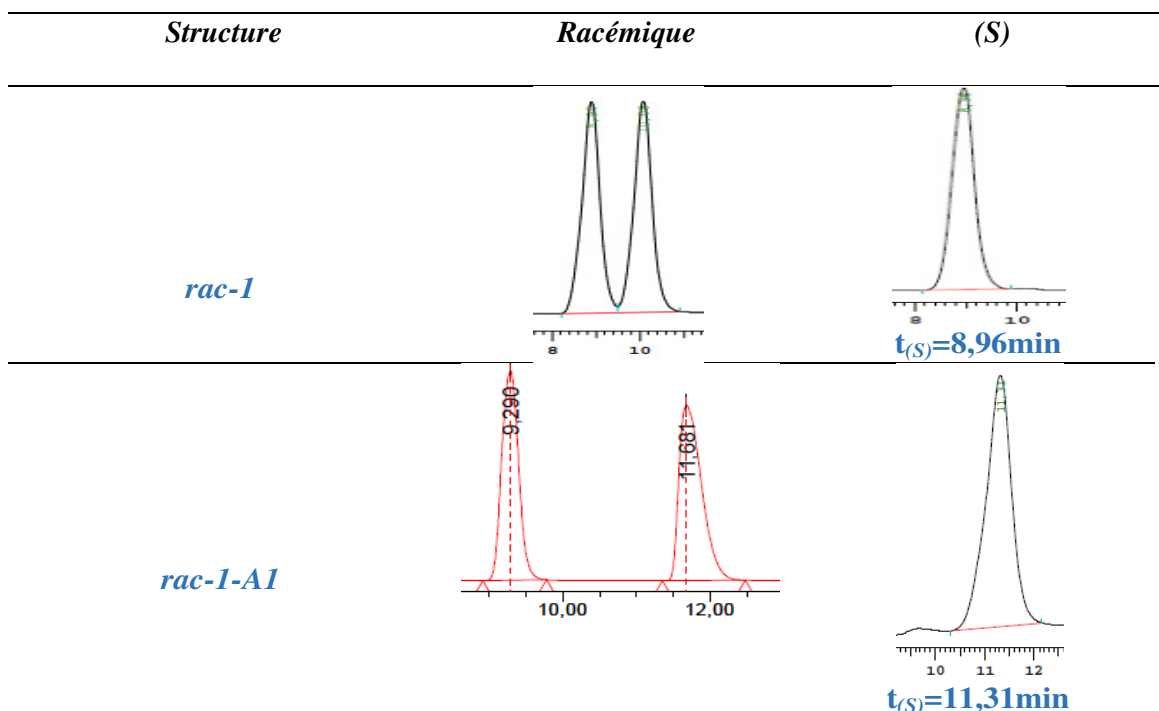


Schéma 38 : DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet du solvant.

Après trois jours d'agitation, la lipase est filtrée, l'amide formé et l'acide résiduel sont récupérés par une simple extraction liquide-liquide (Acido-basique). Les rendements chimiques sont évalués après séchage et évaporation sous vide. Les excès énantiomériques de l'amide formé et de l'acide résiduel sont évalués par HPLC chirale.

La détermination de l'énantiopréférence de la *CAL-B* est effectuée par l'analyse chirale de l'énantiomère (*S*)-Ibuprofène (**S**)-**1** commerciale, et son dérivé amide (**S**)-**1-A1** par HPLC chirale. L'énantiomère (*S*) est celui qui sort le premier, c.-à-d. le moins retenu. Les temps de rétention des deux énantiomères acides sont comme suit : $t_{(S)}=8,96$ min et $t_{(R)}=10,08$ min ; et les deux énantiomères amides : $t_r= 9.29$ min; $t_r= 11.68$ min (**tableau 3**).

Tableau 3 : Chromatogrammes des *rac-1*, *rac-1-A1* et leurs énantiomères (*S*)-1 et (*S*)-1-A1

Les résultats des expériences effectuées sont réunis dans le tableau 4 :

Tableau 4 : DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet du solvant.

Entrée ^(a)	Solvant (proportion %)	ee _p (%) ^(b)	ee _s (%) ^(b)	C (%) ^(c)	E ^(c)
1	Heptane (100)	1.4	4.1	75	1
2	Toluène (100)	97.3	7.54	7	78
3 ^(d)		97	8	8	79
4	Heptane/ Toluène (50/50)	0.9	0.1	39.8	1
5	Heptane/ DMSO (50/50)	-	-	PA	-
6	<i>t</i> -BuOH(100)	19.6	0.7	4	1
7	Heptane/ <i>t</i> -BuOH (50/50)	2	1.8	47.3	1
8	2M2B (100)	-	-	PA	-
9	Heptane/ 2M2B (50/50)	-	-	PA	-

^(a) Immole de l'acide carboxylique, 2mmol d'aniline, 50 mg de CAL-B et 50mg de tamis moléculaire 4Å dans 1mL de solvant à 80°C durant 72 heures.

^(b) Excès énantiomérique des amides produits et d'acides résiduels sont évalués par HPLC chirale

^(c) Conversion: $C=ee_s/ee_p+ee_s$; Selectivité: $E=\text{Ln} [(1-C) (1-ee_s)] / \text{Ln} [(1-C) (1+ee_s)]$

^(d) 15 jours. PA : Aucun avancement

L'analyse des résultats du **tableau 4** révèle un effet important de l'hydrophobicité du solvant organique sur la réactivité et la sélectivité de la *CAL-B* lors de l'amidation de l'Ibuprofène. Il est à signaler qu'aucun avancement n'est observé en absence de la lipase.

Le résultat obtenu dans l'heptane (LogP=4) (entrée 1) est conformément identique à celui obtenu antérieurement. La *CAL-B* catalyse l'amidation de l'ibuprofène sans aucune énantio-sélection, les deux énantiomères réagissent avec des vitesses très proches, $k_R=k_S= E=1$. L'amide **1-A1** est formé sous forme racémique avec une conversion de 75%.

Un effet surprenant est enregistré en changeant l'heptane par le toluène (LogP=2,52). Une nette optimisation de l'énantiosélectivité en détriment de la réactivité de la *CAL-B* est obtenue. L'amide **1-A1** est formé avec un excès énantiomérique de 97% en faveur de l'énantiomère (*R*) avec une conversion modeste de 7% (entrée 2). Malheureusement, le prolongement du temps réactionnel de 3 jours à 15 jours n'a apporté aucune amélioration de la conversion (entrée 2 *versus* 3).

D'autre part l'utilisation des alcools tertiaires (*t*-BuOH et 2M2B) comme solvants, joue en défaveur de la réactivité, voire la bloquer (entrées 6 & 8). Cela est dû probablement à la déstabilisation, voire la dénaturation de la *CAL-B*, en perturbant la répartition de l'eau constitutive de la lipase.

Vu la grande réactivité de la *CAL-B* dans l'heptane et sa bonne sélectivité dans le toluène, nous avons envisagé de combiner les deux solvants, en effectuant une expérience dans un mélange à proportion égale d'heptane et du toluène (entrée 4). Malheureusement, une chute de la conversion de C=75% à C=39,8%, sans aucune amélioration de la sélectivité (entrée 1 *versus* 4). Egalement, en utilisant le *t*-BuOH comme *co*-solvant, une diminution de la conversion de C=75% à C=47,3% est notée (entrée 1 *versus* 6).

D'autre part, l'utilisation du DMSO et du 2M2B comme *co*-solvants inhibe complètement la réactivité de la *CAL-B* lors de l'amidation de l'ibuprofène (entrées 5 & 9). Il est à signalé que le DMSO a été utilisé comme additif afin d'améliorer la réactivité et la sélectivité de certaines enzymes¹⁷, alors que le 2M2B est souvent utilisé, efficacement, comme solvant dans les réactions de dédoublement cinétique enzymatique¹⁸.

¹⁷ K. Watanabe, T. Yoshida, S. I. Ueji. *Chem. Comm.*, **2001**, 14, 1260-1261.

¹⁸ F. Le Joubioux, O. Achour, N. Bridiau, M. Graber, T. Maugard. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2011**, 70, 108-113.

III-3-4-DC via amidation enzymatique de l'Ibuprofène : effet de la structure de l'amine :

Vu les résultats non concluants sur la manière d'intervention de l'hydrophobicité du solvant organique sur la réaction d'amidation de l'ibuprofène sous les conditions susmentionnées, nous avons envisagé d'étudier un autre paramètre qui peut intervenir d'une manière ou d'une autre sur la sélectivité et la réactivité de la *CAL-B* lors de la réaction objet de cette étude. Pour se faire, nous avons choisi quatre anilines substituées par des groupements ayant différents effets stéréo-électroniques : Aniline, *p*-toluidine, 4-iodoaniline, 4-méthoxyaniline ainsi que la benzylamine (**Schéma 39**).

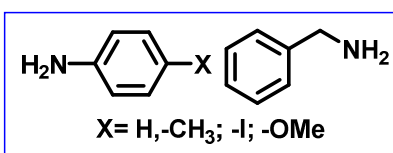


Schéma 39 : Structure des amines choisies.

Pour poursuivre l'avancement des expériences de dédoublément cinétique enzymatique, la synthèse des amidopropènes racémiques est indispensable.

Les amidopropènes racémiques : 2-(4-Isobutyl-phényl)-*N*-(*p*-tolyl)propanamide (**rac-1-A2**), *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide (**rac-1-A3**), 2-(4-Isobutylphényl)-*N*-(4-méthoxyphényl)propanamide (**rac-1-A4**), 2-(4-Isobutylphényl)-*N*-phénylpropanamide (**rac-1-A5**) et le *N*-Benzyl-2-(4-isobutyl- phényl) propanamide (**rac-1-A6**) ont été obtenus par couplage direct de l'acide 2-(4-isobutyl-phényl) propionique (**rac-1**) et l'amine appropriée, en présence d'un agent de couplage, le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dans le Chloroforme à température ambiante (**Schéma 40**).

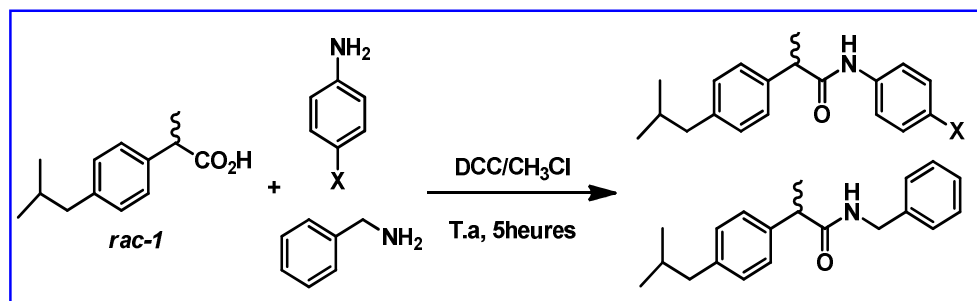
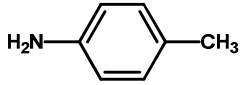
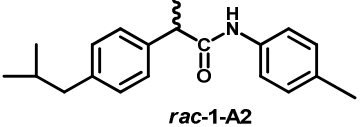
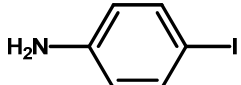
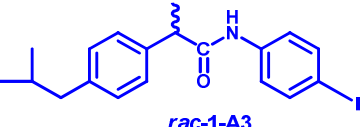
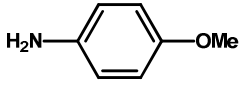
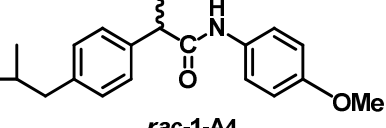
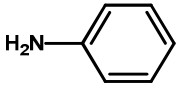
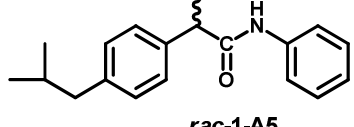
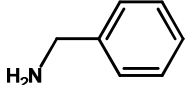
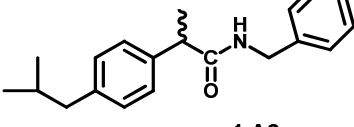


Schéma 40 : Synthèse des amidopropènes racémiques (**rac-1-A2-A6**)

Les amidopropènes (*rac-1-A2-A6*) sont obtenus purs après un traitement acido-basique suivi d'une recrystallisation dans l'hexane, avec de bons rendements chimiques isolés ($82\% \leq \text{Rdt} \leq 96\%$). (Tableau 5).

Leurs structures sont élucidées par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C et HRMS (voir annexes).

Tableau 5 : Structures et rendement chimiques des amidopropènes synthétisés

Entrée	Amine	Amide	Rdt (%)	T _f (°C)	R _f (CH ₂ Cl ₂)
1		 <i>rac-1-A2</i>	94	115	0,41
2		 <i>rac-1-A3</i>	92	131	0,82
3		 <i>rac-1-A4</i>	96	100	0,64
4		 <i>rac-1-A5</i>	95	151	0,52
5		 <i>rac-1-A6</i>	82	49	0,21

Une revue de la littérature et une recherche sur les bases de données spécialisées nous ont permis de constater que la structure *rac-1-A3* est originale (entrée 2).

Les spectres de RMN ¹H, ¹³C et HRMS du *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide racémique (*rac-1-A3*) sont représentés ci-dessous :

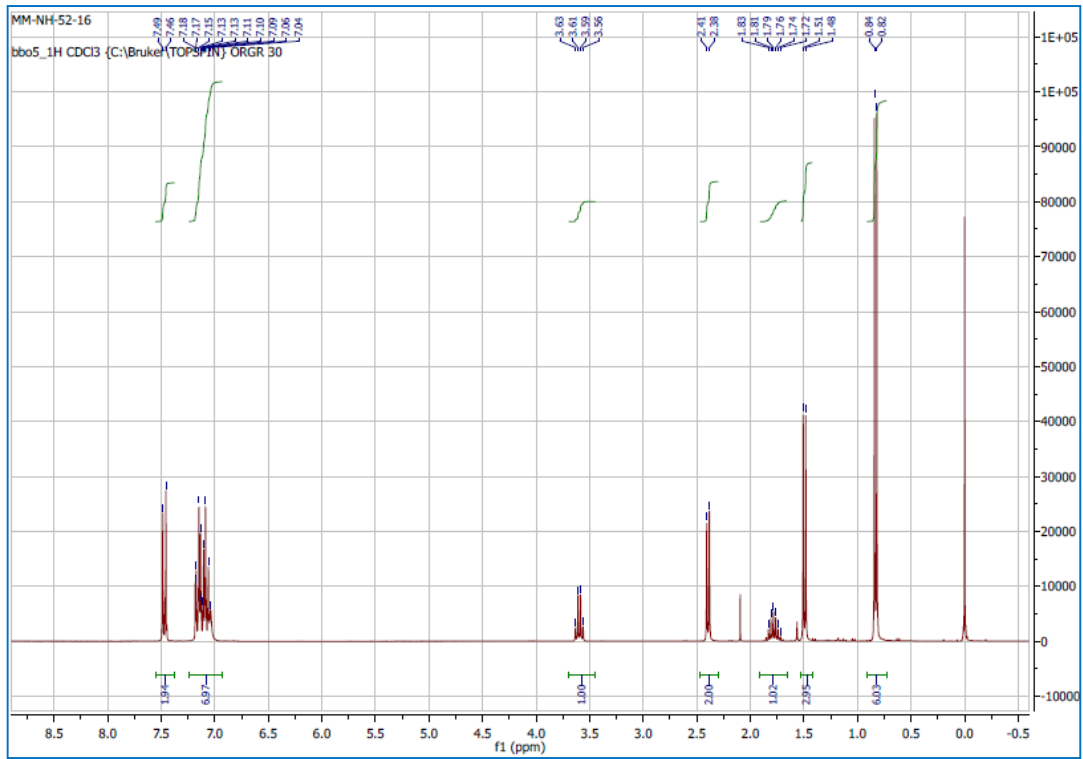


Figure 26 : Spectre RMN¹H du rac-1-A3.

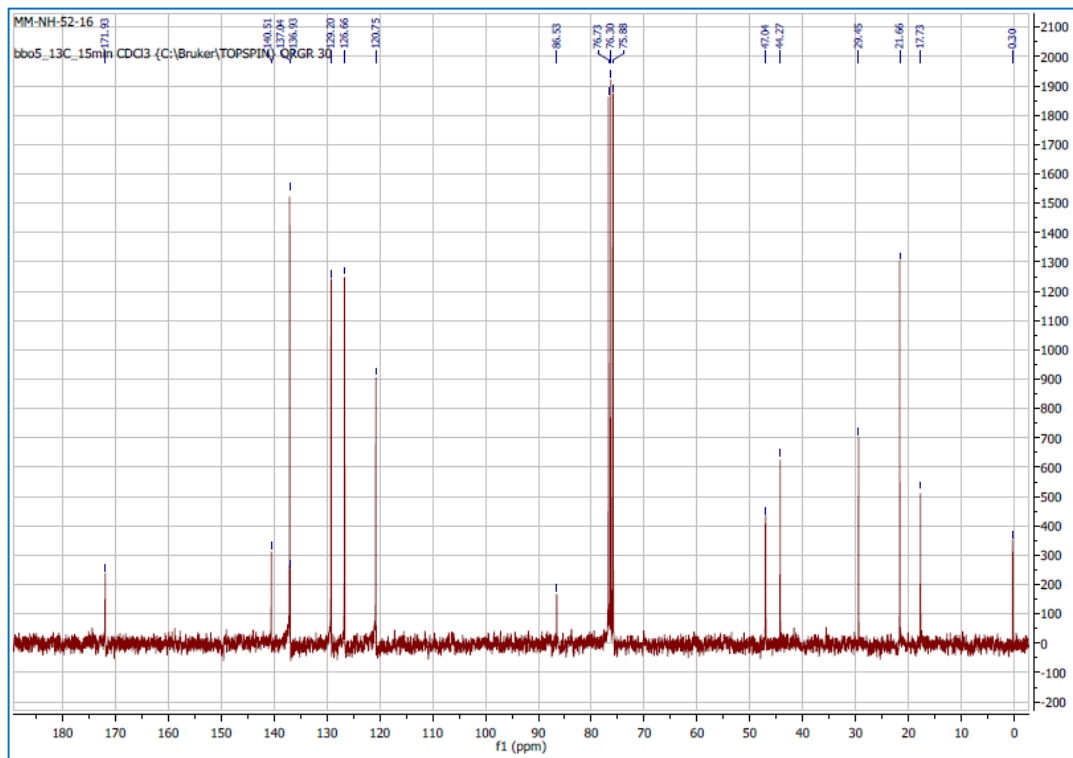


Figure 27 : Spectre RMN¹³C du rac-1-A3.

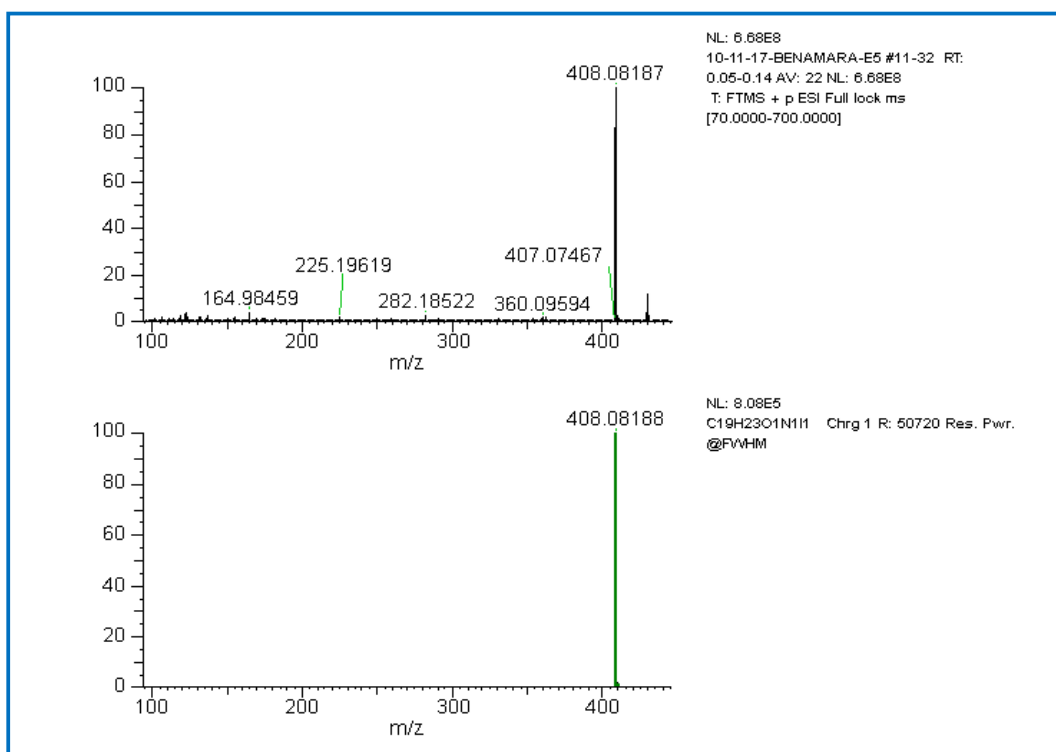


Figure 28 : Spectre HRMS du *rac-1-A3*.

Une fois les amides racémiques sont synthétisés et bien identifiés, nous avons procédé aux expériences de dédoublage cinétique par amidation enzymatique. Les réactions sont effectuées sur 1 mmole du *rac-1*, 2mmoles de l'amine appropriée, en présence d'un mélange équi-massique *CAL-B*/ Tamis moléculaire 4Å (50mg /50 mg). 1mL de solvant organique est ajouté pour assurer une agitation homogène du mélange réactionnel. Le tout est soumis sous agitation magnétique durant 72 heures à 80°C (Schéma 41).

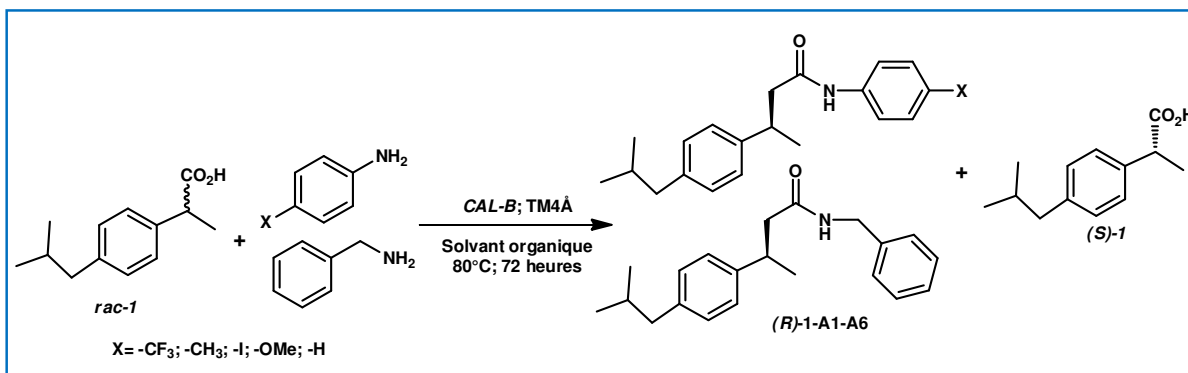
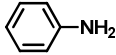
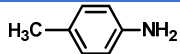
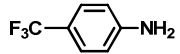
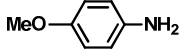
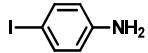
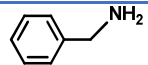


Schéma 41 : DCE de l'ibuprofène par amidation : effet de la structure de l'amine.

Après trois jours d'agitation, la lipase est filtrée, les amides formés et l'acide résiduel sont récupérés par une simple extraction liquide-liquide (Acido-basique). Les rendements chimiques sont évalués après séchage et évaporation sous vide. Les excès énantiomériques de l'amide formé et de l'acide résiduel sont évalués par HPLC chirale.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **Tableau 6** :

Tableau 6: DCE de l'ibuprofène par aminolyse : effet des anilines.

Entrée ^(a)	Amine	Solvant	ee _p (%) ^(b)	ee _s (%) ^(b)	C (%) ^(c)	E ^(c)
1		Heptane	1	1	47	1
2		Toluène	90.8	6.22	6.6	22
3		Heptane	0.2	5.3	96	1
4		Toluène	0.05	5.45	99	1
5		Heptane	1.4	4.1	75	1
6		Toluène	97.3	7.54	7	78
7		Heptane	0.3	0.8	74	1
8		Toluène	0.9	0.7	43.6	1
9		Heptane	3.73	6.8	64.6	1
10		Toluène	90.5	6.53	6.7	21
11		Heptane	99	2	2	200
12		Toluène	99	4	4	207

^(a) 1mmole de l'acide carboxylique, 2mmol d'aniline, 50 mg de CAL-B et 50mg de tamis moléculaire 4Å dans 1mL de solvant à 80°C durant 72 heures.

^(b) Excès énantiomérique des amides produits et d'acides résiduels sont évalués par HPLC chirale

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

PA : Aucun avancement

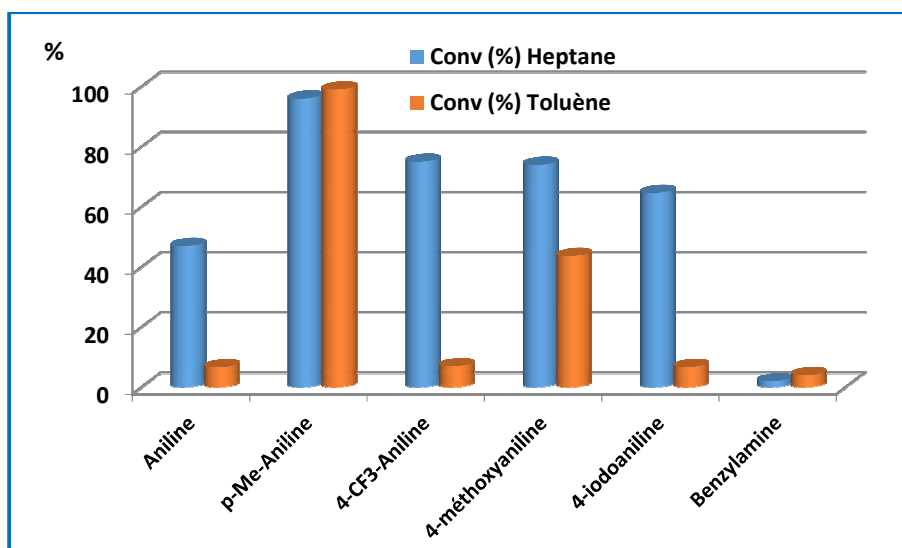
Les résultats du **tableau 6** montrent des effets qui vont dans le même sens que ceux obtenus lors de l'amidation de l'ibuprofène en utilisant la 4-(trifluorométhyl) aniline, et ce dans les deux solvants utilisés.

En utilisant les anilines comme partenaires de l'amidation directe de l'ibuprofène catalysée par la CAL-B, les taux de conversions enregistrés dans l'heptane varient entre 47% et 96%. L'approche des deux énantiomères de l'acide carboxylique *rac-1*, donneur d'acyle chiral, se fait aléatoirement sans aucune énantiopréférence (E=1). La différence enregistrée des

conversions dans ce solvant hydrophobe est liée aux effets électroniques des différents substituants en position *-para* des anilines. Le remplacement du $-CF_3$, groupement électro-attracteur, par le $-CH_3$ qui est groupement électro-donneur cause une augmentation du taux de conversion de C=75% à C=96% (entrée 5 versus 3). Par contre, l'utilisation des anilines ayant des substituants : $-OMe$ et $-I$, ne montre aucun effet sur l'avancement de l'amidation de l'ibuprofène catalysée par la *CAL-B*. Les conversions enregistrées sont respectivement : C=74% et 64.6% (entrées 7 et 9 versus 3), cela est probablement dû aux contraintes stériques des différents substituants. Toujours dans l'heptane, un effet surprenant est noté, à la fois sur la conversion que sur l'énantiosélectivité, en remplaçant l'aniline ($pK_b=9,4$) par la benzylamine ($pK_b=4,67$). La conversion a chuté de C=47% à C= 2%, avec une forte amélioration du facteur de sélectivité de E=1 à E=200 (entrée 1 versus 11). L'amide produit (**R**)-1-A6 est obtenu énantiomériquement pur.

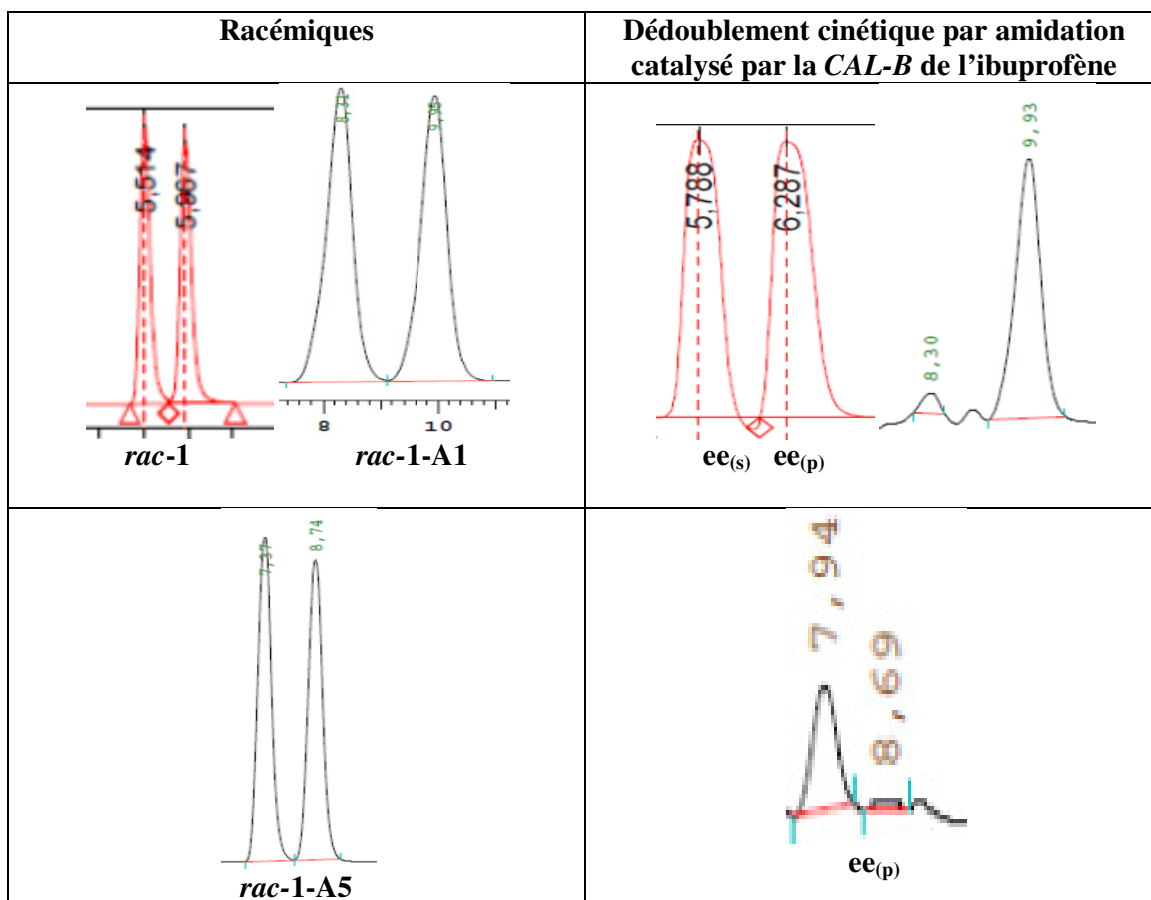
L'utilisation du toluène comme solvant organique, lors de l'amidation de l'ibuprofène *rac*-1 a montré une augmentation spectaculaire du ratio énantiomérique en détriment du taux de conversion, et ce, en fonction de la structure du partenaire amine utilisé (entrées 1,5,7 et 9 versus 2,6,8 et 10), à l'exception de l'amidation avec la *p*-toluidine et la benzylamine, où aucun effet n'est apporté, les mêmes résultats ont été obtenus soit dans l'heptane ou dans le toluène (entrées 3 et 4 versus 11 et 12). L'influence de la nature de ce dernier apparait uniquement sur le facteur de sélectivité à l'exception de la 4-méthoxyaniline, où cet effet s'incline (entrées 2,6 et 10 versus entrée 8). Les conversions enregistrées n'excèdent pas le seuil de 7%. Les amides (**R**)-1-A1, (**R**)-1-A3 et (**R**)-1-A5 sont obtenus énantiomériquement enrichis, leurs excès énantiomériques sont, respectivement : 97.3% ; 90.5% et 90.8%. Le meilleur facteur de sélectivité est obtenu avec la 4-(trifluorométhyl) aniline.

L'histogramme ci-dessous résume les résultats de la conversion du tableau 6.



Histogramme 1 : Impact de la structure de l'amine en fonction de solvant lors de l'amidation du *rac-1* catalysée par la CAL-B.

Les chromatogrammes ci-dessous illustrent quelques résultats du tableau 6.



Chromatogrammes 3 : Dédoublément cinétique par amidation catalysée par la CAL-B de l'ibuprofène

III-4-RX du *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (*rac*-1-A3) :

La réaction de dédoublement cinétique par amidation catalysée par la *CAL-B*, en utilisant la 4-iodoaniline comme partenaire amine de l'amidation, et qui a été effectué dans l'heptane comme solvant organique nous a fournit l'amide *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (**1-A3**) sous forme racémique, $ee_{(p)} = 3.73\%$ (Tableau 6, entrée 9). Cette structure originale a été bien caractérisée par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C et HRMS. En plus, la cristallisation dans l'hexane a permis d'obtenir de beaux cristaux et nous a offert l'opportunité de faire une diffraction des rayons X d'un monocristal isolé.

La collecte et la détermination de cette structure¹⁹ a été établit à l'institut de matière condensée et Nanosciences (IMCN), Plateforme technologique : Analyse structurale moléculaire (ASM), à l'université catholique de Louvain. Un détecteur MAR345 image plate en utilisant une radiation monochromateur Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

Les données cristallographiques ont été déposées au Cambridge Crystallographic Data Center, numéro de déposition : CCDC 1943833 (Data Block Name : data_alg_nh52-16).

La diffraction RX du *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide présente deux structures montrant un désordre avec *twining inversion*, cette forme figure dans le cas des racémiques, ce qui confirme bien les résultats de l'analyse HPLC chirale²⁰. Le RX de cette structure est représenté ci-dessous, le désordre est omis pour des soucis de clarté (**figure 29a**). Également, on représente un empilement cristallin montrant les liaisons hydrogène potentielles intermoléculaires (**figure 29 b**).

Le système cristallin est *orthorombique*, type : énantiomorphique. Les paramètres de la maille du cristal : a 9.5873(5) b 18.7183(8) c 20.8756(9) P212121. Le **tableau 7** rassemble les données cristallographiques principales, alors que le **tableau 8** réunis les distances et les angles. Pour plus de détails sur les données cristallographiques voir annexe, ou consulter site internet : <https://link.springer.com/article/10.1007/s11696-021-01636-5#Sec32>.

¹⁹(a) In Crys Alis Pro - Data Collection and Processing Software for Agilent X-ray Diffractometers Agilent Technologies, Oxfordshire, UK, **1995-2014**. (b) G. M. Sheldrick, SHELXTL Version **2014** / 7. <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/index.php>.

²⁰ A. Linden. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, **2020**, 76, 765-775.

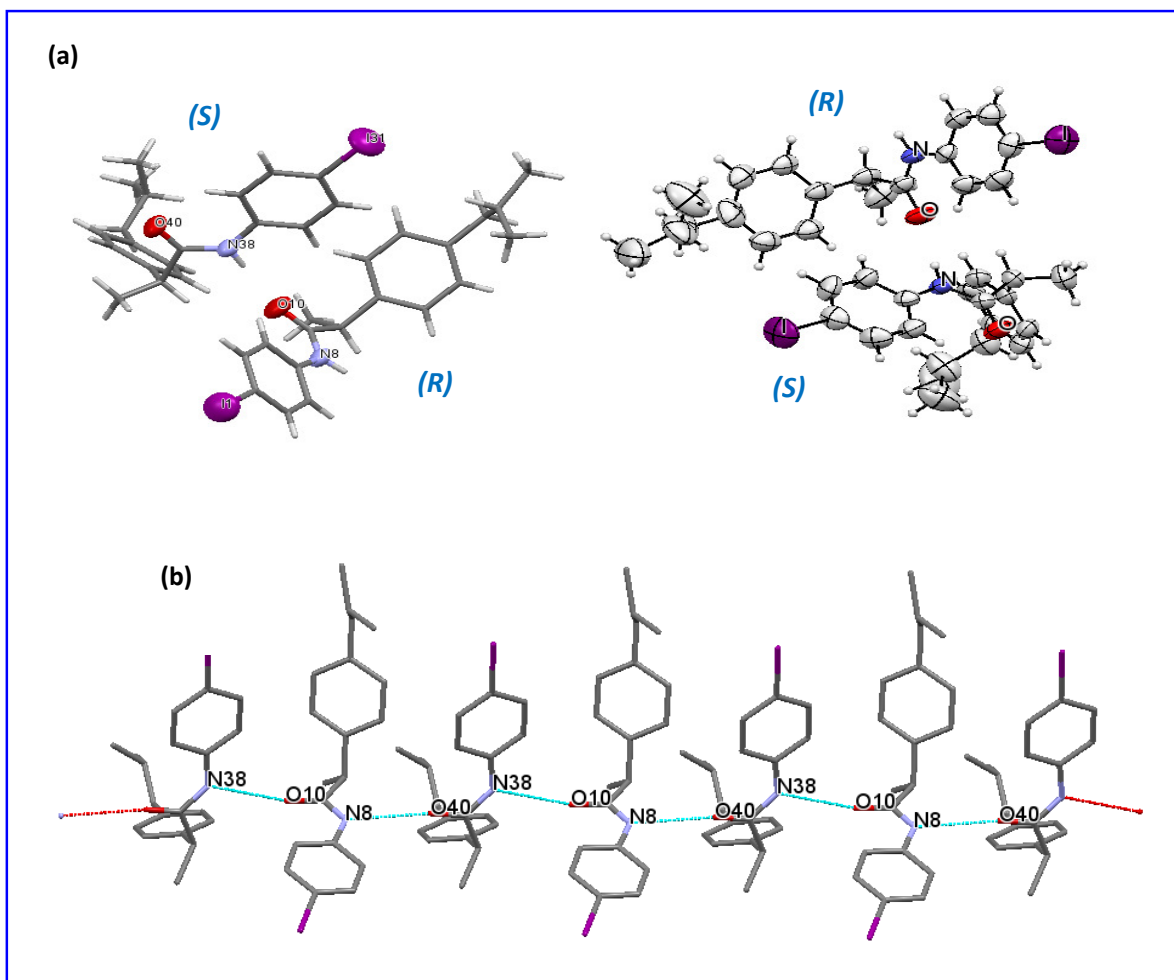


Figure 29 : (a) Structure cristallographique du *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide **1-A3**

(b) Empilement cristallin intermoléculaire montrant les liaisons hydrogènes potentielles N—H...O présentés en pointillés tout au long de l'axe *c*.

Tableau 7 : Données cristallographique de la structure *I-A3*

Formule brute	C₁₉H₂₂INO
Masse moléculaire	407.28
Système cristallin	Orthorhombique
Groupe spatial	P2₁2₁2₁ (N° 19)
a, b, c (Å)	9.5873(5), 18.7183(8), 20.8756(9)
α, β, γ (°)	90, 90, 90
V (Å³)	3746.3(3)
Température (°K)	293
Z	8
D_{calc} (g/cm³)	1.444
Radiation	Mo Kα ($\lambda = 0.71073$ Å)
Coefficient abs linéaire μ (mm⁻¹)	1.711
Dimension du cristal (mm)	0.100×0.190×0.390
Nombre d'électrons dans la maille	F (000) = 1632
R_{int}	0.049
R1, wR2, S	0.0499, 0.1375, 1.045
Nombre de réflexions	7561
Nombre de paramètres	411
Flack	0.570(4)
Parsons	0.556(8)
Hooft	0.559(9)

Tableau 8 : Paramètres géométriques de la structure *I-A3*

Atomes	Longueur de liaison (Å)	Atomes	Angles (°)
C39-N38	1.339	N38-C39-C35	26.2
C35-N38	1.407	C39-N38-O40	26.6
O40-C39	1.214		
C41-C39	1.529		

III-5- Conclusion :

Au cours de ce chapitre, nous avons tenté d'optimiser la réaction de dédoublement cinétique par amidation de l'ibuprofène catalysée par la CAL-B. Nous avons examiné l'impact du solvant organique et du partenaire amine de l'amidation, à la fois sur la réactivité et la sélectivité lors de cette importante biotransformation. Cinq anilines substituées par des groupements ayant différents effets stéréo-électroniques ont été utilisées : Aniline, *p*-toluidine, *p*-trifluométhyl aniline, 4-iodoaniline, 4-méthoxyaniline ainsi que la benzylamine.

Parmi les solvants testés, l'amidation n'a eu lieu que dans l'heptane et le toluène. L'amidation lipasique de l'ibuprofène dans l'heptane a donné lieu aux amides correspondants avec des taux de conversions qui varient entre 47% et 96% sans aucune énantiosélectivité ($E=1$), et ce, avec les différentes anilines. L'avancement avec la benzylamine est freiné à 2%. Le remplacement de l'heptane par le toluène a provoqué une amélioration importante de l'énantiosélectivité en détriment de la réactivité de la CAL-B sous les conditions expérimentales adoptées pour élaborer l'amidation de l'ibuprofène ($C \leq 7\%$). Les amides (*R*)-2-(4-isobutylphényl)-*N*-(4-(trifluorométhyl) phényl) propanamide (**1-A1**), (*R*)- *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (**1-A3**) et (*R*)- 2-(4-Isobutylphényl)-*N*-phénylpropanamide (**1-A5**) sont obtenus avec des excès énantiomériques de : 97,3% ; 90,5% et 90,8%.

Bien que les conversions dans le toluène sont faibles, les résultats en terme d'énantiosélectivité sont encourageant et sont rapportés pour la première fois et restent à optimiser.

A notre connaissance les amides 2-(4-isobutylphényl)-*N*-(4-(trifluorométhyl)phényl) propanamide (**1-A1**) et le *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (**1-A3**), soit sous formes racémiques ou énantiomériquement enrichis sont rapportés pour la première fois. La structure *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (*rac*-**1-A3**), est bien caractérisée par diffraction de rayon X.

L'effet activateur bénéfique du milieu organique hydrophobe (Heptane) lors l'amidation de l'ibuprofène catalysée par la CAL-B, a permis d'orienter cette étude vers la valorisation des conditions optimisées de cet amidation enzymatique pour la synthèse de nouveaux amides à haute valeur ajoutée, ce qui fera l'objet du quatrième chapitre suivant.

CHAPITRE IV :

*Synthèse éco-compatible d'amides à
haute valeur ajoutée catalysée par la
CAL-B*

VI-1- Introduction :

La synthèse des dérivés fonctionnels de molécules bioactives constitue un domaine de recherche en pleine expansion. La liaison amide est une liaison primordiale extrêmement répandue dans la nature et essentielle à la vie. En effet, elle constitue une unité pivot pour l'élaboration et la composition des systèmes biologiques, tels que les peptides et les protéines. La fonction amide est, également, omniprésente dans différentes molécules utilisées comme des intermédiaires clés pour la synthèse des composés d'intérêt potentiel dans différents domaines,¹ tel que : thérapeutique, agroalimentaire et cosmétique (**Schéma 42**).

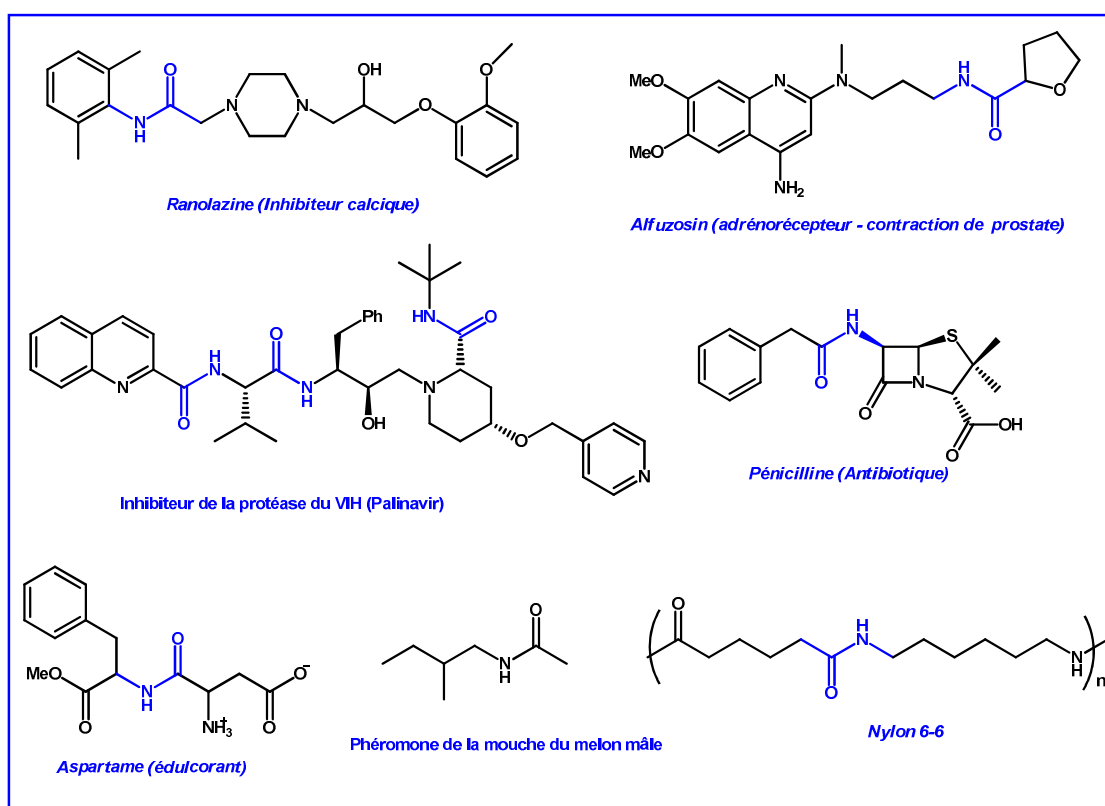


Schéma 42 : Quelques exemples sur les molécules portant une fonction amide.

Une analyse approfondie des bases de données de chimie médicinale a révélé que la liaison amide est présente dans 25% des médicaments actuellement sur le marché, tels que dans les anti-inflammatoires, les anti-dépresseurs, les anti-psychotiques, les anti-

¹A. Greenberg, C. M. Breneman, J. F. Liebman, "The amide linkage: Structural significance in chemistry, biochemistry and materials science". John Wiley & Sons, New York, 2000.

hypertensifs, les anti-cancéreux, les anti-infectieux ou les antibiotiques et cela est dû à sa grande stabilité et sa polarité.²

A ce stade de nos investigations, dans le cadre des travaux de la présente thèse, nous sommes intéressées par la synthèse d'amides par couplage direct acide carboxylique-amine primaire, et ce, en valorisant les conditions optimisées lors du chapitre trois : la CAL-B comme biocatalyseur, l'heptane comme solvant organique à 80°C.

VI-2- Etat de l'art :

L'approche la plus classique de la synthèse d'amides est basée sur une condensation directe d'un acide carboxylique et d'une amine par une activation thermique, généralement nécessite des températures très élevées (>150°C). Ces conditions dures ne sont pas compatibles pour toutes les molécules organiques, thermiquement sensibles ou hautement fonctionnalisées³. Le chauffage classique peut être remplacé par les radiations micro-ondes.

L'exemple ci-dessous montre l'impact des effets électroniques de l'acide et celle de l'amine primaire sur le rendement chimique des amides synthétisés sous irradiation micro-ondes, en utilisant comme support le gel de silice. L'utilisation d'une amine primaire aromatique impacte négativement sur le rendement de l'amide carboxylique synthétisé (**Schéma 43**).⁴

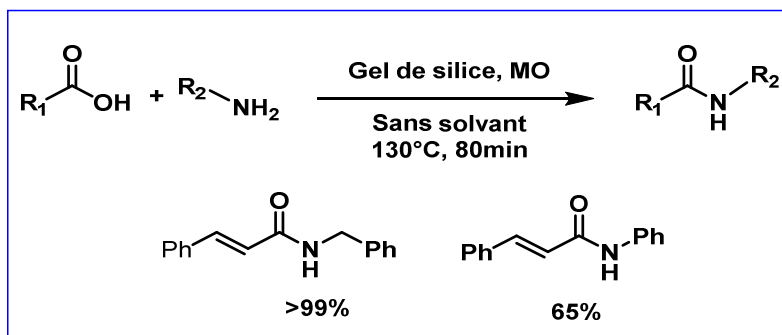


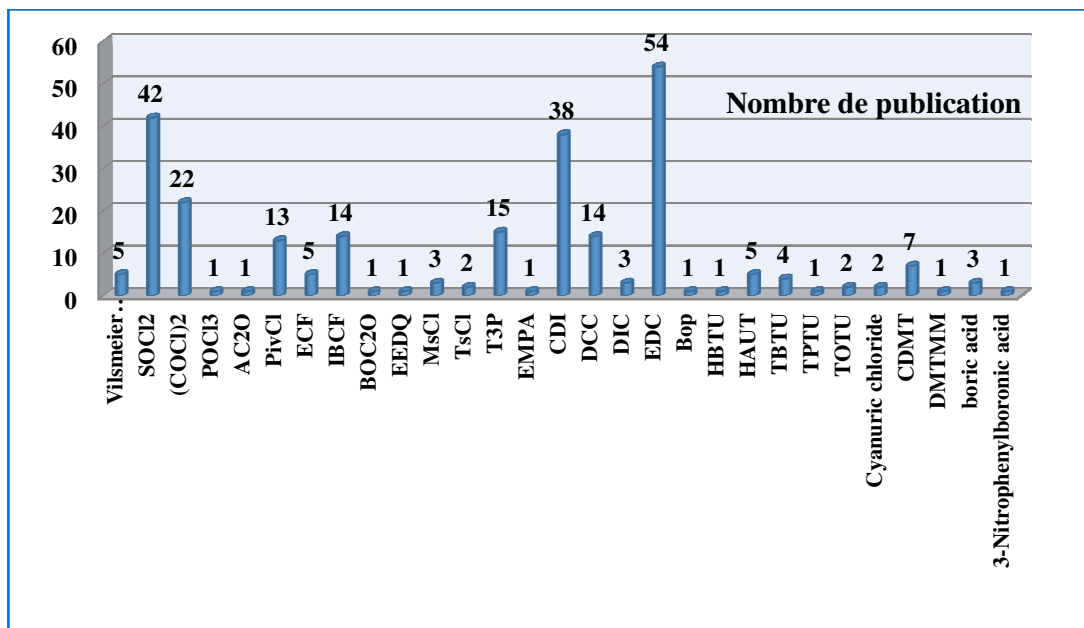
Schéma 43 : Aminolyse thermique d'acide carboxylique/amine primaire sous une activation non-conventionnelle.

²(a) A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.*, **1999**, 1, 55-68. (b) P. Crochet, V. Cadierno, "Ruthenium-catalyzed amide-bond formation", In : *Ruthenium in Catalysis*". P. Dixneuf, C. Bruneau (eds). Topics in Organometallic Chemistry, Springer, Cham, **2014**, 48, p. 81-118. (c) H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 2714-2742.

³(a) B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synth. Commun.*, **1993**, 23, 2761-2770. (b) L. J. Goossen, D. M. Ohlmann, P. P. Lange, *Synthesis*, **2009**, 1, 160-164.

⁴ P. O Jeda, Andrea, H. Santana, G. Sanchez, A. Diego. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3157-3163.

Afin de contourner cet inconvénient une activation *in situ* de l'acide carboxylique est applicable en utilisant des agents de couplages en quantités stœchiométriques, permettant ainsi la formation d'un dérivé *carboxy-* réactive, ainsi que des composés tels que des chlorures d'acide, des anhydrides suivie d'une aminolyse par une amine⁵. Il existe plusieurs types d'agents de couplages développés et sont encore en cours de développement.⁶ (Histogramme 2)



Histogramme 2 : fréquence de publication des agents de couplage.

Parmi les plus exploités à grande échelle, nous citons les carbodiimides, généralement utilisés seuls ou en présence d'additifs (Base) (Figure 30).

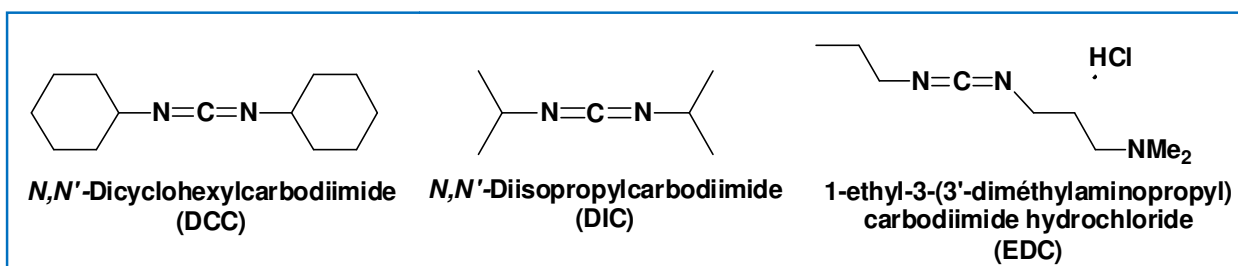


Figure 30 : les carbodiimides les plus utilisés à grande échelle.

⁵(a) A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 6557. (b) C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827. (c) M. M. Joullié, K. M. Lassen, *Arkivoc*, **2010**, 8, 54.

⁶(a) J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.*, **2016**, 20, 140-177. (b) F. Albericio, A. El-Faham, *Org. Process Res. Dev.*, **2018**, 22, 760.

A titre d'exemple, nous citons un travail de Storace et *al.*⁷ Ils ont exploité le DCC comme agent de couplage pour la formation d'un acyle pipérazine, efficacement, à grande échelle. Cet amide est un intermédiaire clé pour la synthèse d'un inhibiteur de l'élastase leucocytaire humaine, qui sert pour le traitement de la fibrose kystique et l'arthrite rhumatoïde.

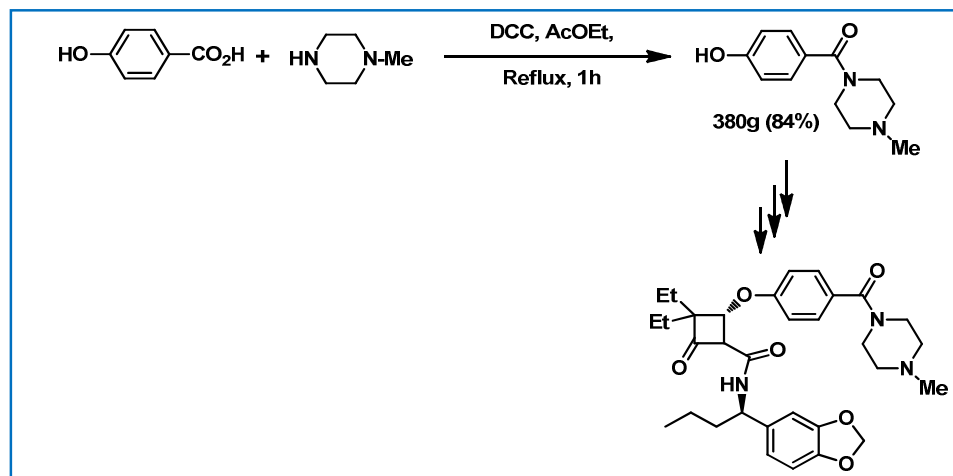


Schéma 44 : Amidation par couplage en utilisant le DCC d'un acyle pipérazine.

Malgré la disponibilité de nombreux agents permettant la formation de liaisons amides rapidement, cette transformation reste un défi pour la communauté chimique. En effet, il n'existe, à ce jour, aucune méthode universelle et «verte» d'amidation. Malheureusement, ces méthodes sont basées sur l'emploi des quantités stœchiométriques des agents de couplages, générant ainsi des sous produits (déchets), souvent toxiques et corrosifs. Encore, elles sont à faible économie d'atomes ce qui affecte les rendements chimiques isolés.

En 2005, «*The American Chemical Society Green Chemistry Institute Pharmaceutical Round table* (ACS GCIPR)» a signalé que le développement de nouvelles méthodes d'amidation à économie d'atomes optimale comme étant l'une des priorités de recherche pour les industries pharmaceutiques.⁸ Cela est toujours le cas aujourd'hui ; en effet, cette réaction se classe en deuxième position sur la liste mise à jour en 2018.⁹

⁷ L. Storace, L. Anzalone, P. N. Confalone, P. W. Davis, J. M. Fortunak, M. Giangiordano, J. J. Haley, K. Kamholz, H. H. Li, P. Ma, W. A. Nugent, R. L. Parsons, P. J. Sheeran, C. E. Silverman, R. E. Waltermire, C. C. Wood. *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6, 54.

⁸ D. J. C. Constable, P. J. Dunn, J. D. Hayler, G. R. Humphrey, J. L. Leazer, R. J. Linderman, K. Lorenz, J. Manley, B. A. Pearlman, A. Wells, A. Zaks, T. Y. Zhang, *Green Chem.*, **2007**, 9, 411–420.

⁹ M. C. Bryan, P. J. Dunn, D. Entwistle, F. Gallou, S. G. Koenig, J. D. Hayler, M. R. Hickey, S. Hughes, M. E. Kopach, G. Moine, P. Richardson, F. Roschangar, A. Steven, F. J. Weiberth, *Green Chem.*, **2018**, 20, 5082.

Vu l'importance de la réaction, et afin de décliner les désavantages des méthodes d'amidation classiques, plusieurs critères sont soulignés :¹⁰

- ✓ La réaction doit être de préférence catalytique économe en atomes.
- ✓ Minimisation des déchets générés.
- ✓ Les solvants et les réactifs utilisés doivent être plus respectueux de l'environnement.
- ✓ Le procédé doit être robuste et facilement applicable à échelle industrielle.

VI-3- Aperçu bibliographique sur la réaction d'amidation par voies catalytiques :

La réaction d'amidation par condensation direct des deux partenaires acide carboxylique-amine utilisant différents catalyseurs s'est avérée comme une alternative bénigne d'un point de vue environnemental, par le fait que le seul déchet est l'eau.¹¹

VI-3- 1-En utilisant des catalyseurs non-métalliques (L'organocatalyse):

Les acides boroniques sont efficacement utilisés comme catalyseurs puisant pour effectuer l'amidation directe de quelques ingrédients pharmaceutiques actifs (API).

A titre d'illustration nous citons un travail décrit Hall *et al*, qui ont élaboré une gamme d'acides benzo-boronique ortho-substitués, et les ont testés à température ambiante.

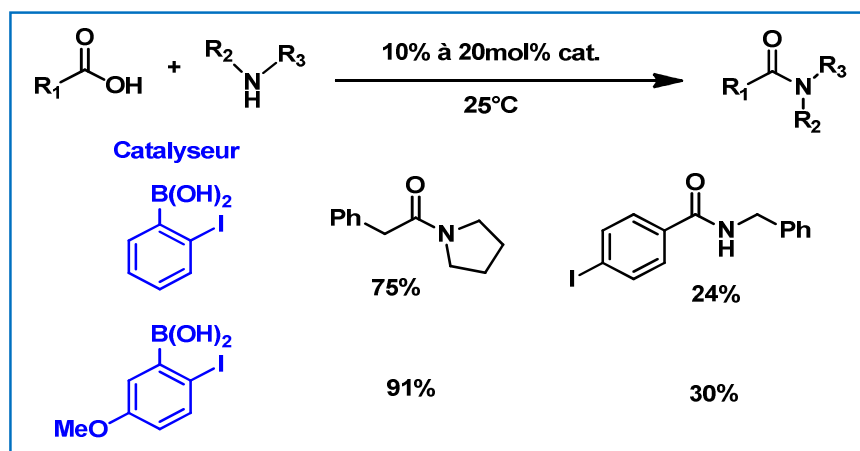


Schéma 45 : Aminolyse catalysée par des acides benzo-boronique ortho-substitués.

¹⁰ M. Sayes, *Développement d'une réaction d'amidation utilisant le diphénylsilane en tant qu'agent de couplage et d'une réaction de borocyclopropanation photochimique*. Thèse de doctorat. Université Montréal 2020.

¹¹(a) J. S. Carey, D. Laffan, C. Thomson, M. T. Williams, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 2337-2347. (b) R. M. Lanigan, T. D. Sheppard, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, *2013*, 7453-7465. (c) H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 2714-2742. (d) R. M. De Figueiredo, J. S. Suppo, J. M. Campagne, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 12029-12122.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide *ortho*-iodobenzo-boronique et l'acide 2-iodo-5-méthoxybenzoboronique.¹²

VI-3-2-En utilisant des catalyseurs métalliques (Métallocalyse):

L'utilisation de la métallocalyse (catalyse métallique) est une voie attrayante permettant la mise au point des procédés à économie d'atomes optimale. Cette approche est en train d'être exploitée pour la formation de liaison amide, ouvrant ainsi la possibilité d'utiliser d'autres réactifs que les acides carboxyliques¹³. Les catalyseurs de cette catégorie sont en leur quasi-totalité des acides de Lewis, et parmi les plus utilisés pour l'obtention des amides nous citons : $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, TiCl_4 , NiCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$...etc; sels de zirconium ou leurs complexes tels que : ZrCp_2Cl_2 , ZrCl_4 ...etc.

A titre d'exemple, Adolfsson *et coll.*, ont utilisé avec succès le ZrCl_4 , comme catalyseur de la réaction d'amidation à partir d'acide carboxylique¹⁴ (Schéma 46).

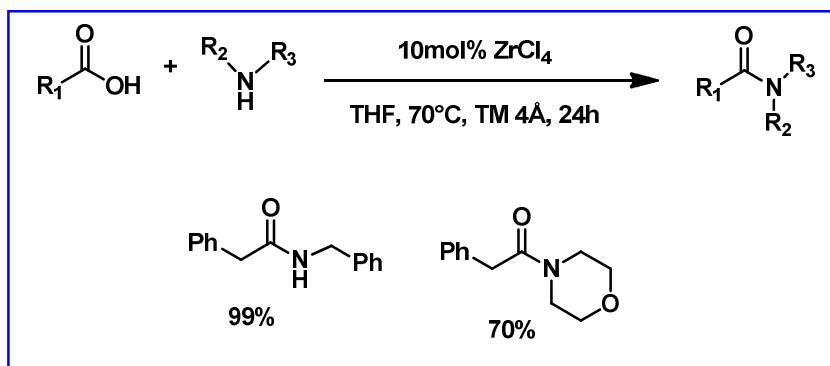


Schéma 46 : Aminolyse catalysée par le ZrCl_4 .

L'utilisation de la morpholine comme partenaire d'amidation impacte négativement le rendement chimique de l'aminolyse, à l'inverse la benzylamine, d'où son usage offre l'amide quantitativement.

¹²(a) R.M. Al-Zoubi, O. Marion, D. G. Hall, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2876-2879. (b) N. Gernigon, R. M. Al-Zoubi, D. G. Hall, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 8386-8400.

¹³(a) C. L. Allen, J. M. J. Williams, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 3405. (b) M. M. Joullié, K. M. Lassen, *Arkivoc.* **2010**, *8*, 189-250. (c) J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.*, **2016**, *20*, 140-177. (d) T. Ohshima, Y. Hayashi, K. Agura, Kazushi, Y. Fujii, A. Yoshiyama, K. Mashima, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 5434-5436. (e) H. Lundberg, F. Tinnis, J. Zhang, A. Algarra, F. Himoto, H. Adolfsson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 2286-2295.

¹⁴ H. Lundberg, F. Tinnis, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 3822-3826.

Dans un travail plus récent, de Cheng et al, une utilisation fructueuse du NiCl₂ comme catalyseur de l'amidation des dérivés de l'acide phényle acétique par la benzylamine, est rapporté¹⁵ (Schéma 47).

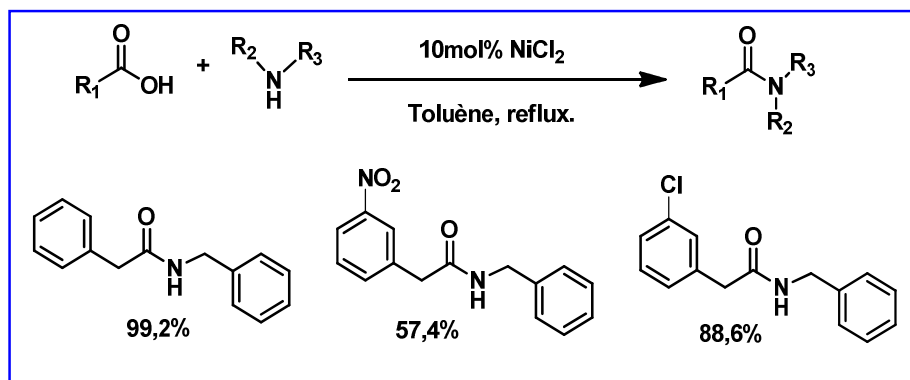


Schéma 47 : Aminolyse catalysée par le NiCl₂.

La substitution sur la position méta sur le noyau aromatique de l'acide carboxylique par un groupement électro-attracteur a donné lieu aux amides avec des rendements modérés comparé à la substitution par un groupement électro-donneur sur la même position.

VI-3-3-En utilisant des enzymes (Biocatalyse) :

Le nombre de travaux publiés utilisant des enzymes comme catalyseurs reste limité, et l'enzyme la plus communément utilisée est la CAL-B. Les variantes des partenaires acides carboxyliques / amine sont principalement : Cbz-Amino-acides / source d'ammonium¹⁶, carboxyliques acides aliphatiques / aminoalcools¹⁷, carboxyliques acides aliphatiques / hydroxylamine¹⁸, acide lipoiqye /amine.¹⁹

A titre d'illustration, nous citons l'exemple ci-dessous, de la synthèse directe d'amide par couplage d'acides phénoliques et d'amines aliphatiques catalysée par la CAL-B²⁰ (Schéma 48). Les amides sont récupérés avec un bon rendement, entre 75% et 83%.

¹⁵ L. Cheng, X. Ge, L. Huang, *Roy. Soc. open sci.*, **2018**, 5, 171870.

¹⁶ E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 4504–4523.

¹⁷ T. Nuijens, E. Piva, J. A. W. Kruijtzter, D. T. Rijkers, R. M. Liskamp, P. J. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53, 3777-3779.

¹⁸ M. Fernández-Pérez, C. Otero, *Enz. Microb. Tech.*, **2001**, 28, 527-536.

¹⁹ M. A. Hacking, H. Akkus, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 68, 84-91.

²⁰ P. Kaushik, N. A. Shakil, J. Kumar, B. B. Singh. *Synth. Commun.*, **2015**, 45,569-577.

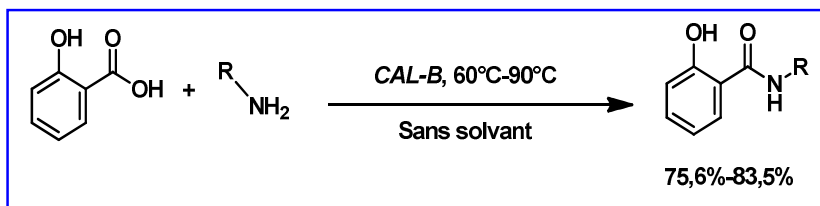


Schéma 48 : Aminolyse enzymatique d'acide phénolique.

Cette dernière approche d'amidation directe s'avère pertinente, particulièrement, par le fait que les résultats obtenus lors du chapitre précédent vont dans le même sens.

VI-4- Objectifs de l'étude :

Le balayage des différentes approches catalytiques rapportées sur l'amidation directe d'acides carboxyliques, nous a permis de constater que l'approche biocatalytique est modestement étudiée. Encore la condensation directe des partenaires acides 2-arylpropionique / Anilines n'a jamais été rapporté auparavant.

C'est ainsi, et dans le cadre de la valorisation des résultats de l'amidation catalysée par la CAL-B obtenus lors du chapitre précédent lors du dédoublement cinétique de l'ibuprofène, nous avons envisagé d'appliquer nos conditions pour synthétiser une série d'amides originaux à haute valeur ajoutée. Cette réaction obéit à certains critères de la chimie verte : économe en atomes, le catalyseur est biodégradable et recyclable, le seul déchet est l'eau, ainsi que le solvant utilisé qui est l'heptane est classé dans la catégorie des solvants utilisable par la firme pharmaceutique Pfizer.²¹

Ainsi, nous avons étudié la réaction d'amidation par voie enzymatique et nous l'avons comparé à une méthode chimique utilisant un des agents de couplage le plus communément utilisés : le *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC).

²¹(a) S. Raza, L. Fransson, K. Hult. *Protein Sci.*, **2001**, 10, 329-338. (b) E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransf.*, **1998**, 16, 181-204. (c) A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnol. Adv.*, **2012**, 30, 550-563.

VI-5-Amidation des acides carboxyliques rac-1-4 catalysée par la CAL-B :

Nous avons sélectionné trois acides 2-arylpropionique (AINS) comme partenaire acide carboxylique, en outre de l'*ibuprofène* (*rac-1*), le *ketoprofène* (*rac-2*) et le *flurbiprofène* (*rac-3*). L'acide 2-phénoxypropionique est également utilisé. Les partenaires amines choisis sont des anilines différemment substituées ainsi que la benzylamine.

Les réactions d'amidation enzymatique sont effectuées sur un 1 mmole d'acide carboxylique, 2 mmoles d'amine, en présence d'un mélange équimassique *CAL-B*/ Tamis moléculaire 4Å (50mg /50 mg). 1mL d'heptane est ajouté pour assurer une agitation homogène du mélange réactionnel. Le tout est soumis sous agitation magnétique durant 72 heures à 80°C (**Schéma 49 : voie A**). Après trois jours d'agitation, la lipase est filtrée, l'amide formé et l'acide résiduel sont récupérés par une simple extraction liquide-liquide (Acido-basique). Les rendements chimiques des amides obtenus sont évalués après séchage est évaporation sous vide, puis cristallisation dans l'hexane. Les conversions sont évaluées par HPLC chirale.

Alors que l'amidation chimique est effectuée par couplage direct entre l'acide carboxylique et l'amine primaire, en présence d'agent de couplage, le *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC), dans le chloroforme. Les amides sont obtenus purs après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. (**Schéma 49 : voie B**).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **tableau 9**.

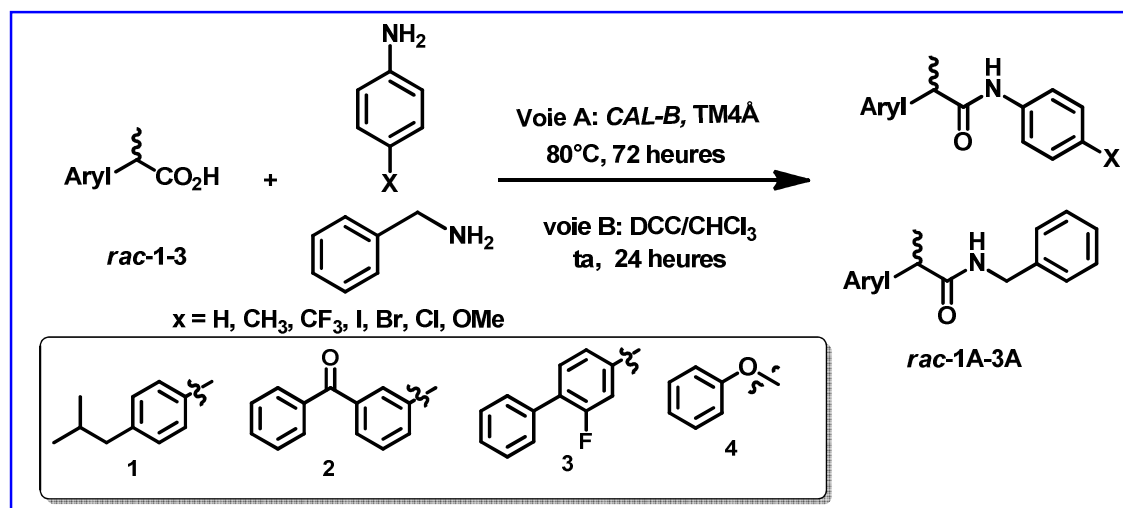
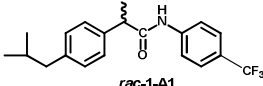
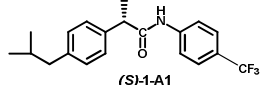
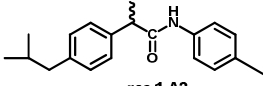
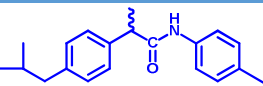
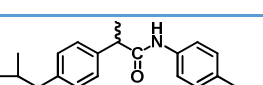
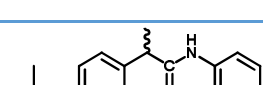
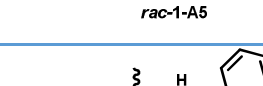
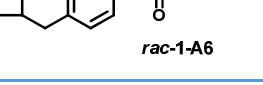
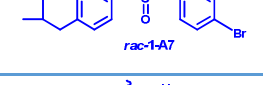
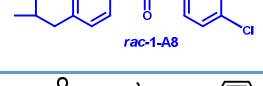
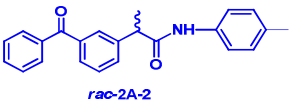
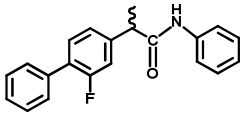
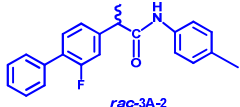
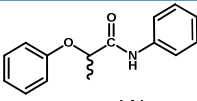
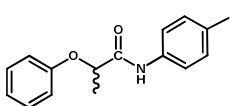
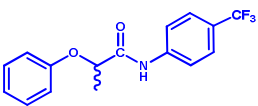
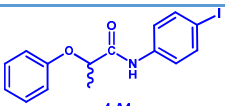
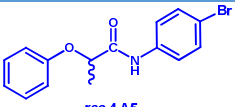
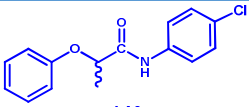
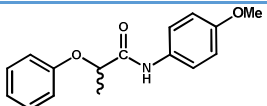
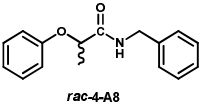


Schéma 49 : Réaction d'amidation enzymatique versus l'amidation chimique.

Les structures des amides formés sont élucidées par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C et HRMS (Caractérisation bien détaillée dans la partie expérimentale, tous les spectres sont joints en annexes). Les structures dessinées en bleu sont nouvelles.

Tableau 9 : Réaction d'amidation enzymatique *versus* l'amidation chimique.

Entrée	Amide formé	Voie A		Voie B	T _f (°C)	R _f (CH ₂ Cl ₂)
		Rdt (%) ^(a)	C % ^(b)	Rdt (%) ^(c)		
1	 <i>rac-1-A1</i>	72	75	86	140	0,37
2	 (<i>S</i>)-1-A1	57	ND	94	140	0,37
3	 <i>rac-1-A2</i>	90	96	94	115	0,41
4	 <i>rac-1-A3</i>	55	64,6	92	131	0,82
5	 <i>rac-1-A4</i>	60	74	96	100	0,64
6	 <i>rac-1-A5</i>	40	47	95	151	0,52
7	 <i>rac-1-A6</i>	34	ND	82	49	0,21
8	 <i>rac-1-A7</i>	50	ND	87	124	0,84
9	 <i>rac-1-A8</i>	45	ND	90	113	0,85
10	 <i>rac-2A-1</i>	30	42	81	90	0,111

11	 <i>rac-2A-2</i>	25	ND	68	118	0,11
12	 <i>rac-3A-1</i>	60	71	87	177	0,48
13	 <i>rac-3A-2</i>	66	ND	75	128	0,47
14	 <i>rac-4-A1</i>	89	100	90	120	0,47
15	 <i>rac-4-A2</i>	40 ^(d)	ND	91	117	0,41
16		85	100			
17	 <i>rac-4-A3</i>	20 ^(d)	ND	89	123	0,11
18		92	100			
19	 <i>rac-4-A4</i>	90	100	92	127	0,5
20	 <i>rac-4-A5</i>	98	100	87	147	0,92
21	 <i>rac-4-A6</i>	80	100	84	132	0,88
22	 <i>rac-4-A7</i>	87	100	98	137	0,83
23	 <i>rac-4-A8</i>	64	ND	68	220	0,28

(a) Rendement chimique isolé après extraction liq-liq

(b) Conversion évaluée par HPLC : $C = ee_s/ee_s + ee_p$

(c) Rendement chimique isolé après purification sur colonne de gel de silice.

(d) Sans CAL-B ; ND : n'est pas déterminé

Les résultats du **tableau 9** montrent une grande variété, en termes des rendements chimiques isolés dans les deux voies utilisées.

Les amides formés par condensation directe, en utilisant une quantité stœchiométrique de l'agent de couplage, DCC, sont récupérés avec de bons rendements chimiques isolés après le recours à une purification sur une colonne de gel de silice ($68\% \leq \text{Rdt} \leq 98\%$). Mis à part les rendements chimiques, cette approche souffre d'inconvénients majeurs, faible économie d'atomes, usage du chloroforme qui est un solvant classé rouge, le DCC produit comme déchet le dicyclohexylurée (DCU), produit nocif pour la santé, sans énumérer les autres auxiliaires utilisés lors des purifications (silice, solvants,...etc.). En outre, étant donné que les structures amides synthétisés sont considérées comme ingrédients pharmaceutiques actifs (APIs), cette approche est loin d'être prise en considération.

D'autre part, la voie biocatalytique offre une grande diversité des résultats et produit proprement les amides désirés avec des rendements chimiques qui varient entre 25% et 98%. Cette différence dépend de la structure des deux partenaires de cette biotransformation, aux effets stériques et électroniques des structures des acides carboxyliques et ceux des amines primaires. Comparée à la voie chimique, d'un point de vue environnementale, l'approche enzymatique est la plus adéquate, par le bien d'accomplir un certain nombre d'indicateurs et paramètres de la chimie verte : économie d'atomes optimale, voie catalytique, la qualité du déchet de la réaction, qui est l'eau, ce dernier n'a pas d'impact ni sur l'homme ni sur l'environnement, le catalyseur est biodégradable, et recyclable. (**Schéma 50**)

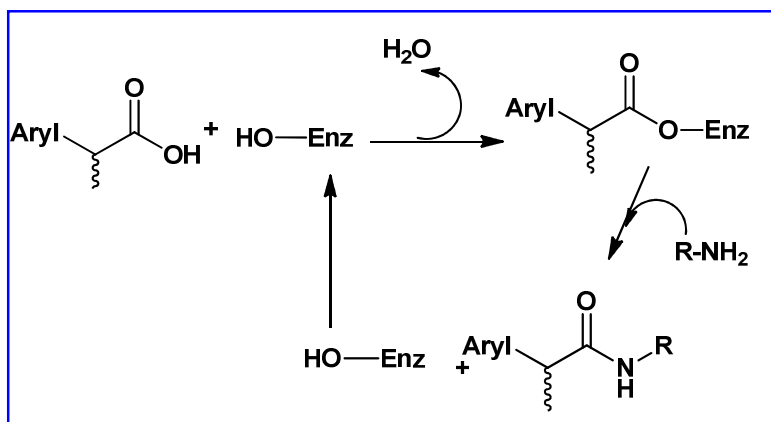


Schéma 50 : Mécanisme de la réaction d'amidation enzymatique des acides carboxyliques.

VI-5-1- Discussion des résultats de l'amidation biocatalytique :

L'amidation enzymatique de l'ibuprofène **rac-1** avec les anilines substituées en *para*- par différents groupements ayant différents effets : électro-donneurs et électro-attracteurs (-CH₃, -CF₃, -OMe, I, Br, -Cl), offre les amides correspondants avec de bons à excellents rendements chimiques (entrées 1-9). L'utilisation de la *p*-toluidine, comme partenaire amine, joue en faveur de la conversion en la comparant avec l'aniline, le taux de conversion est multiplié par un facteur de 2. Les rendements chimiques des amides **rac-1-A6** et **rac-1-A2** sont respectivement C=96% et C=47% (entrée 6 *versus* 3). Un effet similaire est remarqué avec la *p*-CF₃-aniline (entrée 1). L'amidation de l'énantiomère (*S*)-ibuprofène en utilisant *p*-CF₃-aniline sous les mêmes conditions (milieu basique et température élevée) a été effectuée sans aucune racémisation, l'amide **rac-1-A1** est obtenu énantiomériquement pur avec un rendement de 57% (entrée 2). L'utilisation de la *p*-I-aniline, *p*-OMe-aniline, *p*-Br-aniline, et la *p*-Cl-aniline, donne lieu aux amidoprofènes (**rac-1-A3**, **rac-1-A4**, **rac-1-A7**, **rac-1-A8**) avec des rendements acceptables allant de 45% à 60% (entrées 4, 5, 8 et 9). Alors que l'utilisation de la benzylamine provoque une chute inattendue des rendements chimiques isolés jusqu'à 34% (entrée 7).

Dans le même sens, l'amidation enzymatique du Ketoprofène **rac-2** et du Flurbiprofène **rac-3** en utilisant l'aniline et la *p*-toluidine offrent des résultats assez différents. L'amidation du **rac-2** fournit délicatement les amides correspondant **rac-2-A1-A2** avec des rendements qui n'excédant pas le seuil de 30%, alors que les amides du Flurbiprofène **rac-3-A1-A2** sont obtenus avec des rendements chimiques de l'ordre de 60-66% (entrées 10-11 *versus* 12-13).

La substitution du fragment *aryl*- par *aryloxy*- dans la structure du partenaire acide carboxylique, et ce, en utilisant l'acide 2-phénoxypropionique **rac-4** a donné des résultats très intéressants en terme d'efficacité de l'amidation catalysée par la CAL-B, où ce biocatalyseur s'avère plus robuste lors de l'amidation de cette structure. Les amides (**rac-4-A1-A7**) sont isolés quantitativement avec des rendements variant entre 89% et 98% avec une totale conversion du partenaire acide (entrées 14-16 et 18-22). Idem, en utilisant la benzylamine, l'amide **rac-4-A8** est isolé à 64% de rendement (entrée 23). Il est à signaler que l'amidation en absence de la CAL-B n'a pas eu lieu avec les acides **rac-1-3**, par contre avec l'acide **rac-4** un taux de 20% d'amide est récupéré, ce rendement est nettement amélioré en présence du

biocatalyseur. En utilisant la *p*-CF₃-aniline, l'amide correspondant est récupéré à 92% de (entrée 17 *versus* 18).

Il est à noter que les amides (*rac*-4-A1-A8) synthétisés sont des analogues d'une classe d'herbicides classiques, utilisés sélectivement contre les mauvaises herbes.²²

Pour la structure *N*-(4-Bromophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (*rac*-1-A7), obtenue sous forme de cristaux, une analyse diffraction RX a été réalisée. La diffraction RX montre un désordre total (*whole molecule disorder*). Le RX de cette structure est représenté ci-dessous (**Figure 31**).

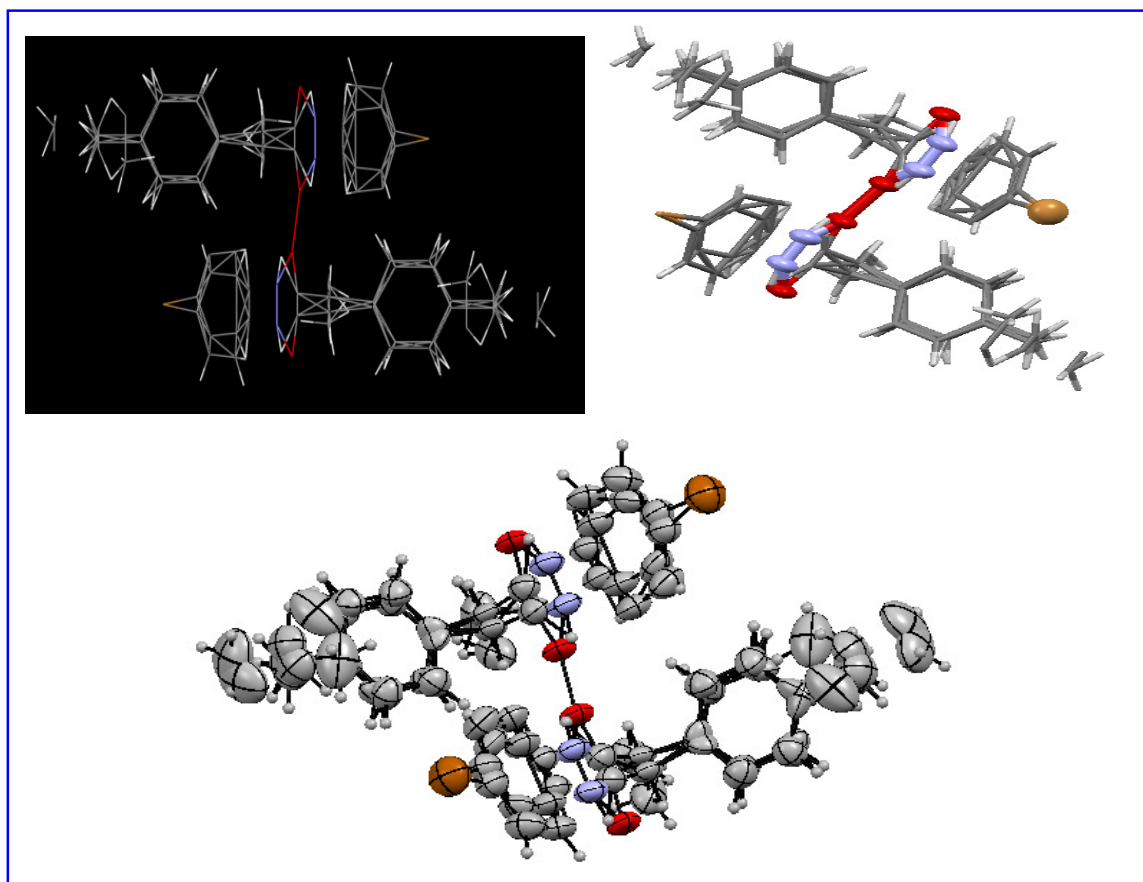


Figure 31 : Structure RX du *N*-(4-Bromophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (*rac*-1-A7).

²² Q.-X. Liu, A.-P. Liu, A.-X. Hu. *Agrochemicals*, **2015**,54, 551-558.

Le système cristallin est *orthorhombique*. Les paramètres de la maille du cristal : a 6,7166(2) b 28,4312(12) c 9,7500(4) pbc. Les données cristallographiques ont été déposées au Cambridge Crystallographic Data Center, numéro de dépôt : CCDC 1943834 (Data Block Name : data_alg_nh50-16).

Le **tableau 10** rassemble les données cristallographiques principales. Pour plus de détails sur les données cristallographiques voir annexe.

Tableau10 : Données cristallographiques de la structure *I-A7*

Formule brute	C₁₉H₂₂BrNO
Masse moléculaire	360.28
Système cristallin	Orthorhombique
Groupe spatial	P b c m (N° 57)
a, b, c (Å)	6,7166(2), 28,4312(12), 9,7500(4)
α, β, γ (°)	90, 90, 90
V (Å³)	1861,88(3)
Température (°K)	297
Z	4
D_{calc} (g/cm³)	1.285
Radiation	Mo Kα ($\lambda = 0.71073\text{Å}$)
Coefficient abs linéaire μ (mm⁻¹)	2,209
Dimension du cristal (mm)	0.50×0.4×0.3
Nombre d'électrons dans la maille	F (000) = 744
R_{int}	0.058
R1, wR2, S	0.0585, 0.1576, 1.052
Nombre de réflexions	1753
Nombre de paramètres	175

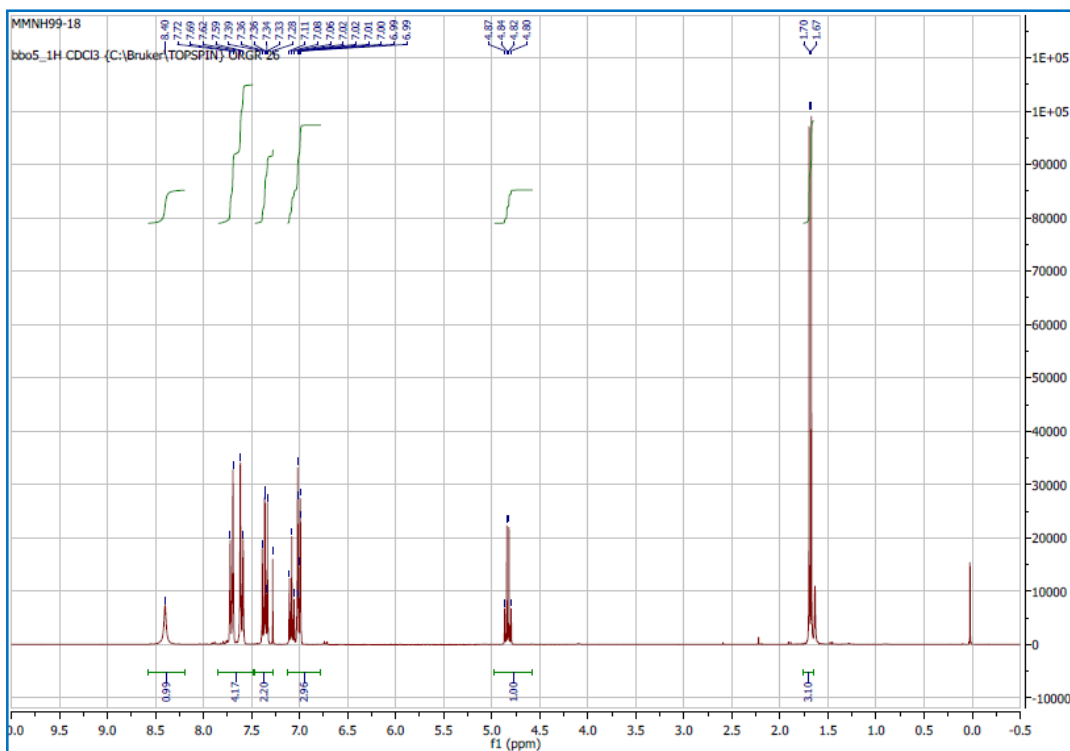


Figure 32 : Spectre RMN¹H du rac-4-A3.

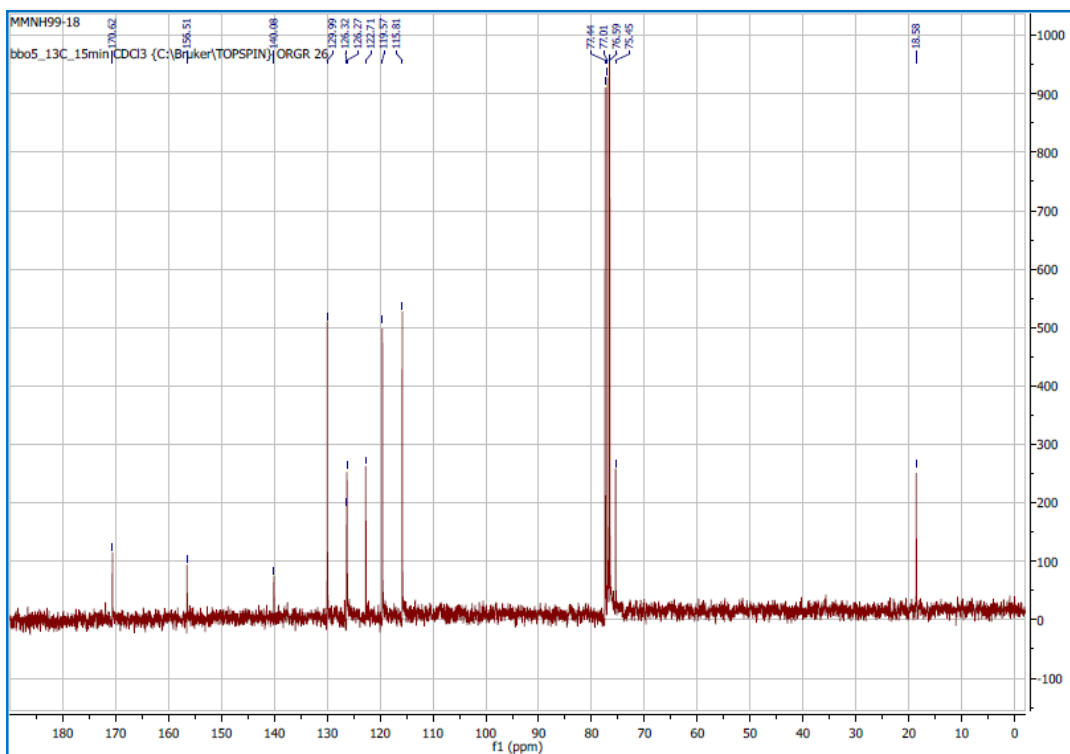


Figure 33 : Spectre RMN¹³C du rac-4-A3.

VI-6-Amidation de la L-Boc-Proline catalysée par la CAL-B versus amidation chimique classique par le DCC :

Afin d'approuver une autre fois l'efficacité de l'amidation biocatalysée mise au point, nous avons envisagé de l'appliquer pour l'amidation de la L-Boc-proline (aminoacide protégé).

La L-proline ainsi que leurs formes amides correspondants, particulièrement ceux de la L-prolinamide sont des organocatalyseurs très puissants et largement employés dans les réactions d'aldolisation, de réduction asymétrique de cétones et d'imines prochirales.²⁴

L'amidation de la L-Boc-proline est généralement réalisée par le biais des agents de couplage, malgré que leurs utilisation peut causer une perte d'énantiopureté ou une racémisation.

C'est ainsi que nous avons sélectionné cet aminoacide protégé pour l'application de nos conditions d'amidation enzymatique. Des réactions d'amidation chimique sont effectuées en utilisant le DCC pour contrôler l'effet racémisant s'il existe.

Les réactions sont effectuées selon les conditions appliquées avec les acides (**Schéma 52**).

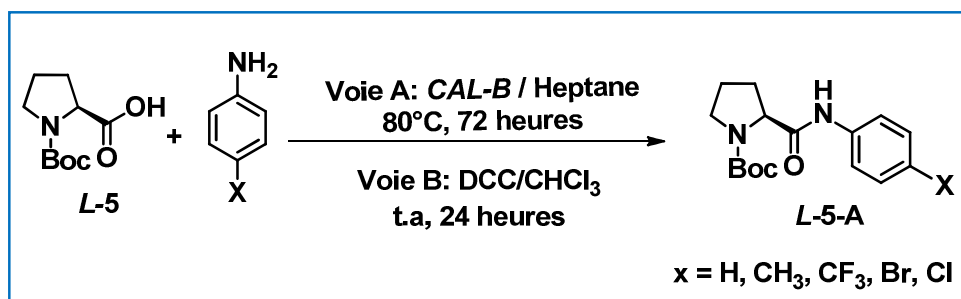


Schéma 52 : Amidation enzymatique versus amidation chimique de la L-Boc-proline.

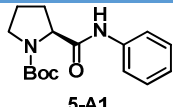

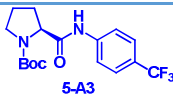
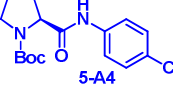
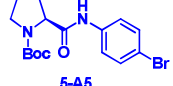
Les amides sont obtenus purs après une purification sur colonne de gel de silice. Les structures des amides formés sont élucidées par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN¹H et RMN¹³C et HRMS (Caractérisation bien détaillée dans la partie expérimentale, tous les spectres sont joints en annexes). Les structures dessinées en bleu sont nouvelles.

²⁴(a) A. P. Galanakis, K. C. Kourounakis, C. Tsiakitzis, E. A. Doulgkeris, A. Rekka, C. Gavalas, C. Kravaritou, P. N. Christos, Kourounakis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 3639-3643. (b) S. Zeror, J. Collin, J. -C. Fiaud, L. Aribi Zouiouche, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 197-204. (c) M. Boukachabia, S. Zeror, J. Collin, J. -C. Fiaud, L. Aribi Zouiouche, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 1485-1489. (d) A. Harrison-Marchand, J. Y. Valnot, A. Corruble, N. Duguet, H. Oulyadi, S. Desjardins, C. Fressigné, J. Maddaluno, *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78, 321-331.

Les pouvoirs rotatoires sont pris au titre d'une comparaison avec les structures connues et déjà rapportées pour contrôler la présence d'une racémisation.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Amidation enzymatique *versus* amidation chimique de la *L*-Boc-proline par le biais des anilines.

Entrée	<i>L</i> -Boc-Proline amides	Voie A ^(a)	Voie B ^(b)	T _f (°C)	R _f (CH ₂ Cl ₂)
		Rdt(%) ^(c) [α] _D ²⁰ (c 1, CH ₂ Cl ₂)	Rdt(%) ^(c)		
1	 5-A1	38 ^(d)	86 (-116.05) ^(d)	187	0,28
2		52 (-147.3 ; Litt: -140.9 ²⁵)			
3	 5-A2	53 ^(d)	75	181	0,27
4		72 (-111.7)			
5	 5-A3	39 ^(d)	77	185	0,35
6		72 (-127.5)			
7	 5-A4	58 (-101.9)	60	185	0,28
8	 5-A5	60 (-92.1)	55	193	0,28

^(a)Voie enzymatique

^(b) Voie chimique avec le DCC.

^(c) Rendement chimique isolé

^(d) Sans CAL-B durant 5 jours

Un taux qui n'est pas négligeable des amides **L-5-A1-A3** est récupéré lors des réactions d'amidation effectuées à blanc, sans CAL-B, et ce, après 5 jours d'agitation sous 80°C. Les rendements chimiques isolés varient entre 38% et 53%, tout dépend des effets électroniques des substituants en *para*- de l'aniline. En présence de la CAL-B, les rendements en amide s'améliorent, et le meilleur a été enregistré pour les amides **L-5-A2-A3**, 72% (entrées 4 et 6). En ce qui concerne la voie chimique, les amides sont obtenus avec des rendements allant de 55% à 86%, et ce en fonction des effets électroniques apportés par les substituants en position *para* du partenaire amine.

²⁵ T. Kanemitsu, A. Umehara, R. Haneji, K. Nagata, T. Itoh, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 3893-3898.

Toujours les meilleurs résultats sont notés pour les amides **L-5-A2-A3**, Rdt= 75% & 77% respectivement.

Il est à souligné qu'aucun clivage du groupement protecteur (-Boc) est observé lors de l'amidation par une enzyme hydrolytique.

D'autre part, la mesure du pouvoir rotatoire de l'amide **L-5-A1** obtenu par voie chimique, en utilisant l'agent de couplage DCC, a montré une perte de la pureté optique en la comparant avec la valeur mesurée pour l'amide récupéré par voie enzymatique et celle décrite. La valeur a chuté de $[\alpha]_D^{20} = -147.3$ (*c* 1, CH₂Cl₂) pour la voie A à $[\alpha]_D^{20} = -116.05$ (*c* 1, CH₂Cl₂) pour la voie B (**entrée 2**), soit un taux de 15% ce qui correspond à une racémisation partielle. Cela renforce les avantages et de la voie enzymatique par rapport à la voie chimique qui souffre de plusieurs inconvénients.

VI-7- Conclusion :

Au cours de ce chapitre, nous avons repris les conditions optimales de la réaction d'amidation catalysée par la CAL-B, en terme de réactivité, déterminées au cours du chapitre précédents, et nous les avons appliqué sur d'autres acides carboxyliques appartenant à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens, outre que l'ibuprofène, le ketoprofène et l'ibuprofène, l'acide 2-phénoxypropionique, et la L-Boc proline. La réaction d'amidation enzymatique est comparée à l'amidation en utilisant le DCC comme agent de couplage.

La comparaison des résultats obtenus par voie enzymatique avec ceux obtenus par voie chimique, montre que l'approche enzymatique est la plus intéressante par le fait d'intégrer un certain nombre d'indicateurs et de paramètres de la chimie verte : économie d'atome optimale, voie catalytique, catalyseur biodégradable et recyclable. Par ailleurs, la nature du déchet de la réaction, qui est l'eau, n'a pas d'impact négatif ni sur l'homme ni sur l'environnement. Ainsi que la qualité des produits synthétisés qui ont une très haute valeur ajoutée sans présenter un risque de racémisation pour les structures énantiomériquement pures.

Les conditions mises au point par voie enzymatique sont rapportées pour la première fois pour la synthèse d'amides par condensation directe, en utilisant des anilines, amines primaires aromatiques, comme partenaire d'amidation. Les amides sont récupérés, facilement, avec une économie d'atome optimale.

Parmi les amides synthétisés, au moins **14** sont rapportés pour la première fois. Toutes les structures sont confirmées par les méthodes spectroscopiques usuelles ainsi que la HRMS.

La voie enzymatique a offert deux structures amides sous forme cristalline, une analyse par diffraction RX a été effectuée : le *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide (**rac-1-A3**) et le *N*-(4-Bromophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide (**rac-1-A7**).

Cette voie biocatalytique s'est montrée très efficace, simple et éco-compatible par le bien de plusieurs avantages. Sa performance dépend des contraintes structurales et effet électroniques apportés par les deux partenaires de la condensation : acide carboxylique et amine.

L'ensemble des résultats rapportés dans ce chapitre sont publiés dans une revue internationale de spécialité²⁶

²⁶ N. Benamara, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouieche, O. Riant.. *Chem. Pap.*, **2021**, 75, 4045–4053.

CHAPITRE V :

*O-Acylation enzymatique du 1-phényl
éthanol versus N-Acylation enzymatique
du 1-phényléthylamine : Impact d'acides
gras comme agents acylants verts*

V-1- Introduction :

L'acylation des alcools (*O*-acylation) et des amines (*N*-acylation) est l'une des biotransformations la plus répandue pour l'obtention des molécules monofonctionnelles énantiomériquement pures qui servent comme synthons clés pour la conception des molécules plus complexes bioactives.¹

Parmi les biocatalyseurs les plus utilisés pour mener cette réaction, les lipases (triacylglycerolacyl hydrolases, EC.3.1.1.3) constituent la classe la plus utilisée et la plus adaptée suite à leurs nombreux avantages, dont les plus pertinents sont; la non-nécessité de cofacteurs, leur biodégradabilité et leur grande stabilité dans les solvants organiques.

Le dédoublement des mélanges racémiques par le biais des lipases est la méthode la plus facile et la plus sûre pour avoir des molécules à haute valeur ajoutée sous formes énantiopures.² Particulièrement le DC par *N*-acylation d'amines primaires et par *O*-acylation d'alcools secondaires.³

Dans la continuité des travaux réalisés au cours de cette thèse, et à ce stade, nous avons envisagé la synthèse des esters et des amides énantiomériquement enrichies par le biais de l'acylation enzymatique. Cela s'enchaîne aux deux premiers précédents qui ont été complémentaires, où nous avons constaté que la nature du donneur d'acyle, partenaire acide carboxylique de l'amidation, impacte nettement la sélectivité de cette réaction catalysée par la CAL-B. Les deux partenaires de la *N*-acylation étaient : acide carboxylique achiral/amine aromatique ou benzylique chirale.

¹(a) D. Mendez-Sanchez, M. Lopez-Iglesias, V. Gotor-Fernandez, *Curr.Org. Chem*, **2016**, 20,1186–1203. (b) Chênevert R, Morin P, Pelchat N. "Transesterification and hydrolysis of carboxylic Acids derivatives, alcohols and epoxides. Chapter In :Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes". Wiley-VCH, Weinheim. **2008**, pp. 133-169. (c) V. Gotor-Fernandez V. Gotor. *Curr. Org. Chem*.**2006**, 10, 1125.

²(a) P. Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. M. Papamichael, *Biotechnol. adv.*, **2013**, 31, 1846-1859.(b) K. Faber, "Biotransformations in Organic Chemistry", Springer, Berlin Heidelberg, **2011**.

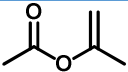

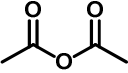

³(a) L. Munoz, A. M. Rodriguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**,9, 8171. (b) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon. *Tetrahedron*, **2004**,60, 501.

V-2- Problématique posée et Objectifs visés:

Dans des travaux antérieurs du laboratoire de catalyse Asymétrique éco-compatible (L.C.A.E), l'impact de plusieurs paramètres pouvant intervenir sur la réactivité et la sélectivité de la CAL-B dans les réactions de dédoublement cinétique enzymatique ont été étudié.⁴ L'efficacité de la réaction d'acylation enzymatique est multifactorielle, plusieurs paramètres interagissent simultanément sur la sélectivité et réactivité de la lipase, en l'occurrence de la nature de l'agent acylant lors des réactions de transestérification.

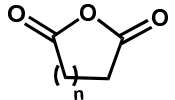
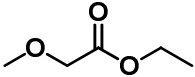
Afin de contourner la réversibilité de la réaction de transestérification, deux éventualités se présentent pour déplacer l'équilibre thermodynamique vers le sens désiré, soit en faisant appel à la loi d'action de masse en utilisant un excès d'agent acylant, soit en utilisant des agents acylants spécifiques pour rendre la réaction irréversible. Pour cela, plusieurs agents acylants peuvent être appliqués (Voir chapitre 2). Ces donneurs d'acyle présentent des inconvénients et des avantages, que sont résumés dans le tableau suivant⁵:

Tableau 12: Inconvénients et Avantages de quelques agents acylants utilisés.

Agent acylant	Produit secondaire	Avantages	Inconvénients
		PS: facile à éliminer par simple évaporation. Non toxique et n'entre pas en compétition. Conforme au 3 ^{ème} principe de la chimie verte.	Economie d'atomes modérée. Séparation des produits par chromatographie sur colonne de gel de silice. Synthèse dangereuse à grand échelle.
		PS: Elimination après un traitement standard. Valorisable à l'échelle industrielle.	Economie d'atomes modérée. Séparation des produits par chromatographie sur colonne de gel de silice. PS: Risque de compétition avec l'agent acylant principal. PS: risque de dénaturation de l'enzyme.

⁴N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouiouche, J. C. Fiand, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 627-630. (b) M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J. C. Fiand; O. Riant, L. Aribi-Zouiouche, *C. R. Chimie*, **2011**, 14, 978-986. (c) M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron: Asym.*, **2008**, 19, 2378-2384. (d) M. Merabet-Khellasi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Tetrahedron: Asym.*, **2009**, 20, 1371-2377.

⁵M. Paravidino, U. Hanefeld. *Green Chem.*, **2011**, 13, 2651-2657.

	Néant	100% d'économie d'atomes. Séparation facile des produits de la réaction par simple extraction liquide-liquide.	Formation de l'acide qui peut dénaturer l'enzyme.
	EtOH	PS: Séparation facile des produits de la réaction. Non toxique et n'entre pas en compétition. Séparation facile des produits de la réaction par simple extraction liquide-liquide. Conforme aux 1 ^{er} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} principe de la chimie verte.	Economie d'atomes acceptable. N'est pas adéquat pour les esters.
R-CO₂-H	H₂O	PS: n'a pas d'impact environnemental. Économie d'atomes élevée. Conforme aux aux 1 ^{er} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} et 10 ^{ème} principe de la chimie verte. Bon score d'analyse de cycle de vie (ACV). Coût faible. La plus part d'origine naturelle.	Réactivité modérée. Risque de réversibilité.

Malgré les avantages des acides carboxyliques, leur utilisation comme donneurs d'acyle dans les réactions d'acylation enzymatique reste modérée⁶.

Parmi les acides carboxyliques les plus utilisés, les acides gras sont les plus exploités généralement pour l'optimisation du caractère lipophile de certains produits pharmaceutiques,

⁶(a) M. H. Guncheva, D. Zhiryakova, *Biotechnol. Lett.*, **2008**, *30*, 509-512. (b) M. B. Smith, J. March. "*March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*", John. Wiley & Sons, Ltd., 5th ed. **2000**, 508-510. (c) H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 2714.

tels que : les dérivés phénoliques⁷, les flavanoides⁸, les aminoalcools⁹, la vitamine C¹⁰ et les sucres.¹¹

À ce stade de nos travaux, nous sommes intéressées par l'utilisation des acides carboxyliques comme donneurs d'acyle lors des réactions de dédoublement cinétique par acylation enzymatique, et nous avons visé les objectifs suivants :

- ✓ Synthèse énantiosélective biocatalysée, propre et facile, d'esters et d'amides, molécules à hautes valeurs ajoutées en industrie des cosmétiques et des pharmaceutiques.
- ✓ Examiner l'efficacité de l'utilisation des acides carboxyliques aliphatiques comme agents acylants verts.
- ✓ Etudier le comportement de différentes lipases lors de ces biotransformations particulièrement en utilisant des acides carboxyliques gras.

V-3- Quelques exemples de la littérature :

L'utilisation des acides carboxyliques comme agents acylants lors des O-acylation et des N-acylation est peu rapportée, et la lipase la plus communément utilisée est la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (CAL-B).¹²

A titre d'illustration, nous citons le dédoublement cinétique par estérification d'alcools secondaires catalysé par la CAL-B sous pression faible, en utilisant des acides carboxyliques gras comme donneurs d'acyle.¹³ (Schéma 53)

⁷(a) P. Weitkamp, N. Weber, K. Vosmann, *J. agr. food chem.*, **2008**, 56, 5083-5090. (b) G. J. H. Buisman, C. T. W. van Helteren, G. F. H. Kramer, J. W. Veldsink, J. T. P. Derksen, F. P. Cuperus, *Biotechnol. Lett.*, **1998**, 20, 131-136. (c) R. N. Lima, V. R. Silva, L. D. S. Santos, D. P. Bezerra, M. B. Soares, A. L. Porto, *Rsc. Adv.*, **2017**, 7, 56566-56574.

⁸ M. Ardhaoui, A. Falcimaigne, J. M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2004**, 29, 63-67.

⁹ L. Couturier, D. Taupin, F. Yvergnaux. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2009**, 56, 29-33.

¹⁰ W. J. Sun, H. X. Zhao, F. J. Cui, Y. H. Li, S. L. Yu, Q. Zhou, Y. Dong, *Chem. Centr. J.*, **2013**, 7, 1-13.

¹¹ D. Arcens, E. Grau, S. Grelier, H. Cramail, F. Peruch, *Eur. J. Lip. Sci. Technol.*, **2020**, 122, 1900294.

¹² (a) R. N. Lima, C. S. dos Anjos, E. V. Orozco, A. L. Porto, *Mol. Catal.*, **2019**, 466, 75-105. (b) D. L. Wang, A. Nag, G. C. Lee, J. F. Shaw, *J. Agr. food chem.*, **2002**, 50, 262-265. (d) J. Ottosson, K. Hult, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2001**, 11, 1025-1028. (e) F. Le Joubioux, O. Achour, N. Bridiau, M. Graber, T. Maugard, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2011**, 70, 108-113. (f) V. Gotor-Fernandez, E. Busto, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 797. (g) S. W. Tsai *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2016**, 127, 98. (h) A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Zysk, R. Ostaszewski. *Catal. Commun.*, **2018**, 106, 82. (i) V. Léonard-Nevers, Z. Marton, S. Lamare, K. Hult, M. Graber *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 59, 90.

¹³ R. Irimescu, T. Saito, K. Kato. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2003**, 80, 659

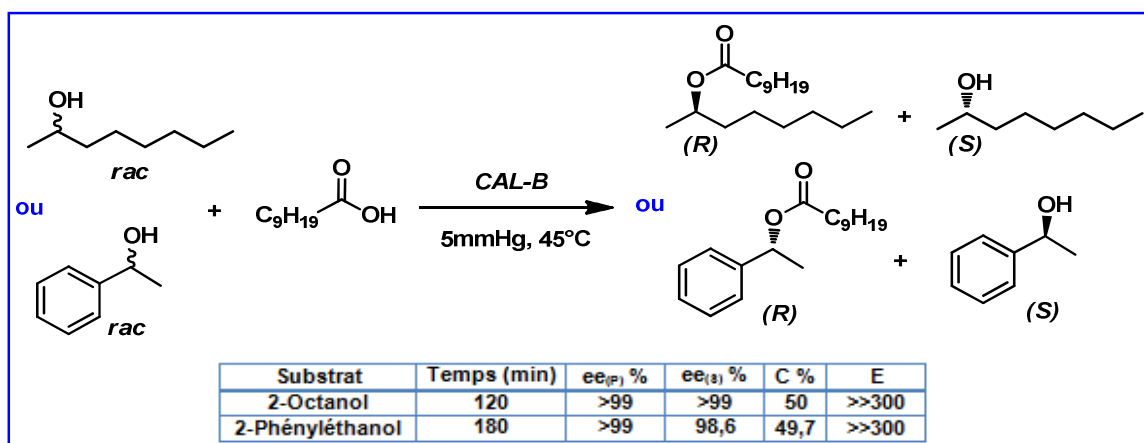


Schéma 53: O-acylation d'alcools secondaires par l'acide décanoïque catalysée par la CAL-B.

La CAL-B s'est montrée hautement réactive et énantiosélective sous les conditions rapportées, soit avec la structure aliphatique ou la structure benzylique. Les énantiomères acétates formés et alcools résiduels sont récupérés énantio-pures.

La même équipe a décrit également le dédoublement cinétique par estérification catalysé par la CAL-B sous les mêmes conditions opératoires, d'un alcool primaire, le 2-méthoxy-2-phényléthanol, par le biais d'acides carboxyliques aliphatique¹⁴. L'estérification a eu lieu avec de faibles facteurs de sélectivités.

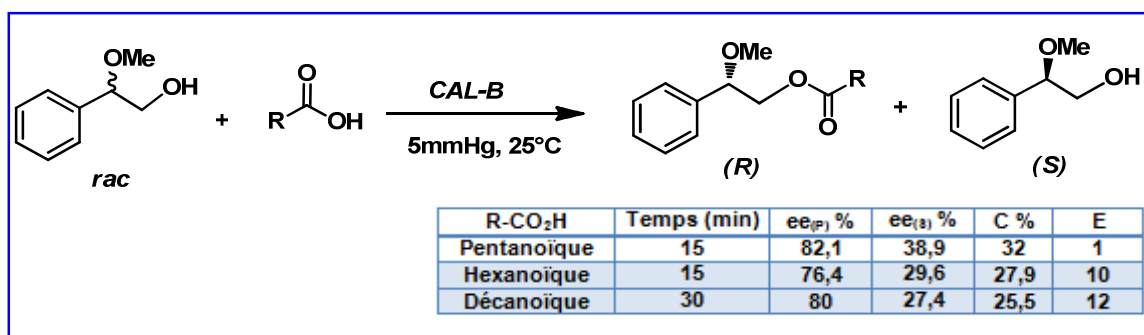


Schéma 54: O-acylation du 2-méthoxy-2-phényléthanol catalysée par la CAL-B.

Un autre travail, également, rapporté par la même équipe, concerne la N-acylation, où les auteurs ont étudié l'effet de la structure de l'amine sur l'énantiosélectivité lipasique. Ils ont montré une influence significative de la structure amines benzyliques primaires, à la fois sur

¹⁴R. Irimescu, T. Saito, K. Kato, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2004**, *27*, 69–73.

la réactivité et la sélectivité de la CAL-B lors de l'amidation par l'acide 4-penténoïque dans des liquides ioniques comme solvants non conventionnels¹⁵ (Schéma 55).

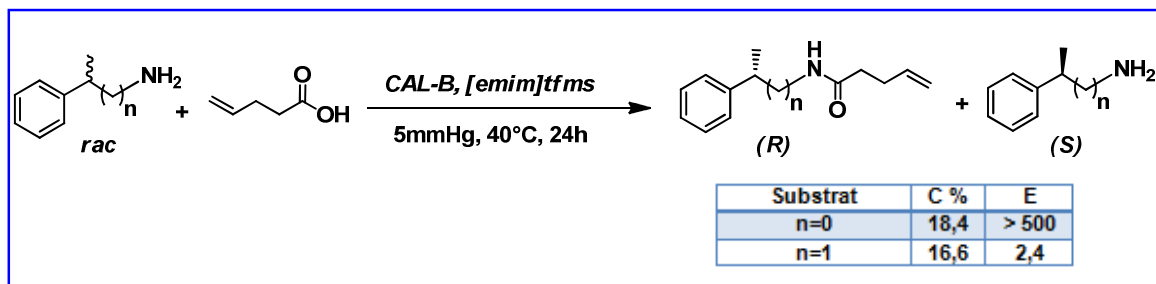


Schéma 55: N-acylation d'amines primaires par l'acide 4-penténoïque.

Ils ont noté un effet important de l'éloignement de la fonction amine primaire du centre stéréogène a été remarquée Une excellente énantiosélectivité a été obtenu avec le 1-phényléthylamine avec un E>500. Cette dernière chute, considérablement, lors du DCE du 2-phénylpropan-1-amine, et ce, pour le même taux d'avancement.

V-4- Intérêts des substrats choisis des esters et des amides:

Les molécules possédants une fonction hydroxyle ou amine en position α - du centre stéréogène possèdent de nombreuses activités pharmacologiques.¹⁶ (Figure 34)

¹⁵R. Irimescu, K. Kato, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2004**, 30, 189–194.

¹⁶(a) A. Rajendran, A. Palanisamy, V. Thangavelu, M. D. C. F. D. Oliveira, T. L. G. D. Lemos, F. Molinari, I. Serra. *Intern. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16, 29682-29716. (b) L. Storace, L. Anzalone, P. N. Confalone, W. P. Davis, J. M. Fortunak, M. Giangiordano, J. J. Haley, K. Kamholz, H. Y. Li, P. Ma, W. A. Nugent, R. L. Parsons, P. J. Sheeran, C. E. Silverman, R. E. Waltermire, C. C. Wood. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2002**, 6, 54. (c) D. Ghislieri, N. J. Turner. *Top. Catal.*, **2014**, 57, 284.

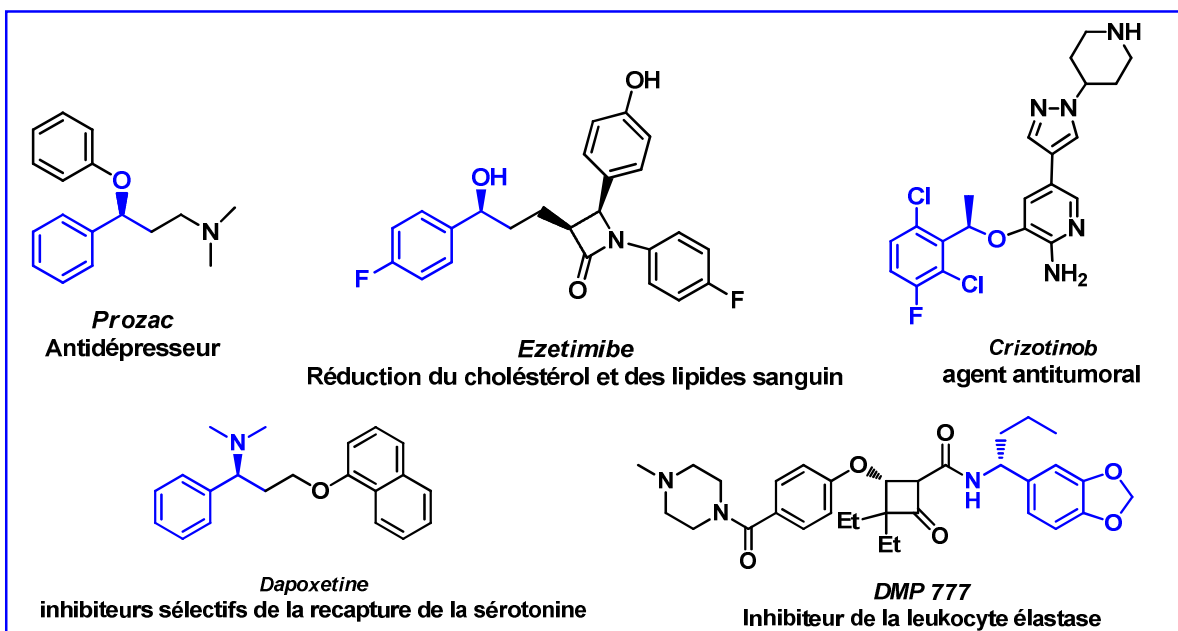


Figure 34 : Exemples de molécules bioactives ayant un oxygène ou azote en position α - du centre stéréogénique.

Pour ce volet du travail, nous avons sélectionné deux structures analogues ayant deux fonctions différentes en position α - du centre stéréogène : un alcool secondaire et une amine primaire. (**Figure 35**)

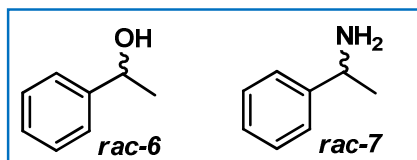


Figure 35 : Substrats à dédoubler.

- ✓ **Le 1-phényléthanol (rac-6)** : est un alcool commercial, son choix est basé sur l'importance de concevoir l'alcool énantiomériquement pur, précisément l'énantiomère (*R*)- qui est utilisé en industrie pharmaceutique comme conservateur ophtalmique¹⁷, ainsi qu'il a fait l'objet de plusieurs études en synthèse asymétrique¹⁸. Leurs dérivés esters sont utilisés comme odorant dans l'industrie des cosmétiques à

¹⁷(a) Guild of Healthcare Pharmacists, <http://www.ghp.org.uk/default.sap?channelid=398&editorialid=6123> (accessed 4 February 2002); (b) C. L. Suan, M. R. Sarmidi, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2004**, *28*, 111–119. (c) K. Zilbeyaz, M. Taskin, E. B. Kurbanoglu, N. I. Kurbanoglu, H. Kilic, *Chirality*, **2010**, *22*, 543–547.

¹⁸ (a) J. Y. Legros, M. Toffano, J. C. Fiaud, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 3253–3246; (b) B. G. Davis, V. Boyer, *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 618–640.

cause de leur odeur florale douce¹⁹. La synthèse de dérivés esters par voies biocatalytique est libellée naturelle conformément aux législations européennes et des états unies satisfaisant ainsi la tendance des consommateurs vers tous ce qui est naturel dans diverses industries.²⁰

- ✓ **Le 1-phényléthylamine (*rac*-7)** : Amine commerciale, utilisée comme auxiliaire très puissant dans les synthèses asymétriques industrielles, et également, en tant qu'additif chiral.²¹

Comme nous l'avons déjà mentionné, des acides carboxyliques aliphatiques de différentes longueurs de chaîne carbonée sont sélectionnés comme agents acylants : Acide acétique, acide propanoïque, acide butyrique, acide caprique (décanoïque), acide laurique (dodécanoïque) et acide myristique (tetradécanoïque). (**Figure 36**)

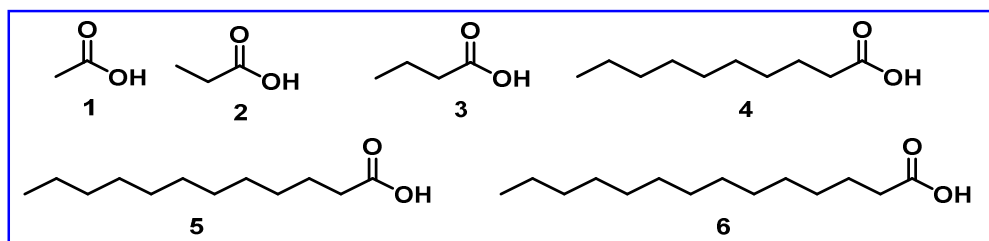


Figure 36 : Acides carboxyliques sélectionnés.

V-5- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Voie de synthèse éco-compatible d'esters à haute valeurs ajoutée :

Tout d'abord, nous avons examiné la faisabilité de la réaction de dédoublement cinétique par estérification direct du 1-phényléthanol avec l'acide acétique, en présence de la *CAL-B*.

¹⁹ (a) https://ec.europa.eu/food/safety/food_improvement_agents/, <https://hmdb.ca/>, <https://www.fda.gov/>, (b) K. Suginaka, Y. Hayashi, Y. Yamamoto, *Tetrahedron: Asym.*, **1996**, 7, 1153. (c) A. E. Ivanov, M. P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1997**, 3, 303. (d) L. S. Chua, M. R. Sarmidi, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2004**, 28, 111-119. (e) A. G. A. Sá, A. C. de Meneses, P. H. H de Araújo, D. de Oliveira. *Trends Food Sci. Tech.*, **2017**, 69, 95.

²⁰(a) J. P. Leszczak, C. Tran-Minh. *Biotechnol. Bioengineer.*, **1998**, 60, 356-361.(b) J. P. Leszczak, C. Tran-Minh. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **1998**, 5, 277-281. (c) A. B. Vanin, T. Orlando, S. P. Piazza, B. M. Puton, R. L. Cansian, D. Oliveira, N. Paroul. *App. Biochem. Biotechnol.*, **2014**, 174, 1286-1298. (d) P. D. Tomke, V. K. Rathod. *Ultrasonics sonochemistry*, **2015**, 27, 241-246.

²¹(a) E. Juaristi, J. L. León-Romo, A. Reyes, J. Escalante. *Tetrahedron: Asym.*, **1999**, 10, 2441-2495; (b) A. Torres-Gavillan, J. Escalante, I. Regla, A. Munguia-Lopez, E. Castillo, *Tetrahedron : Asym.*, **2007**, 18, 2621-2624.

V-5-1- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Effet du solvant :

Comme la nature du solvant est un des paramètres qui peut contrôler la réactivité et la sélectivité lipasique lors des réactions de dédoublements cinétique, nous avons opté à commencer par l'examen de ce paramètre. Six solvants ayant des hydrophobicités différentes sont alors sélectionnés : l'éther diéthylique, le TBME, le toluène, l'hexane, l'heptane et le cyclohexane.

La réaction de DC par estérification est effectuée sur un mélange équimolaire du *rac*-6 et de l'acide acétique (1mmole/1mmole), en présence de 40 mg de *CAL-B*, le tout est dilué dans 5mL de solvant organique. 60mg du tamis moléculaire 4Å sont ajoutées afin de contrôler l'eau produite. Le mélange réaction est soumis sous agitation magnétique à 45°C pendant 24 heures (**Schéma 56**).

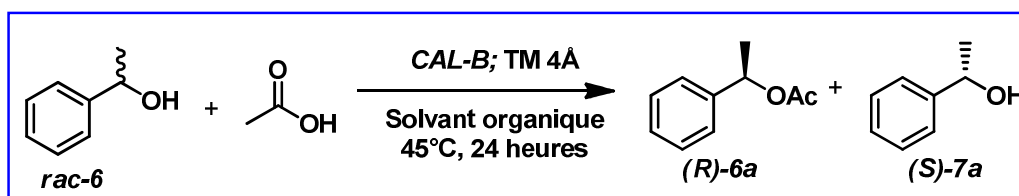


Schéma 56: O-acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysé par la *CAL-B* :
Effet du solvant.

Après 24 heures d'agitation, l'enzyme est filtrée, l'excès d'acide est éliminé par extraction liquide-liquide. Les excès énantiomériques de l'acétate produit et de l'alcool résiduel sont déterminés par CPG chirale.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 13** :

Tableau 13 : O-acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysé par la CAL-B : Effet du solvant.

Entrée	Solvant (log p)	ee _P (%) ^(c)	ee _S (%) ^(c)	C(%) ^(d)	E ^(d)
1 ^(a)	Et ₂ O (0.85)	>99	32.5	24.7	>>200
2 ^(a)	TBME (0.35)	>99	30.5	23.6	>>200
3 ^(b)		>99	39.4	28.5	>>200
4 ^(b)	Toluène (2.52)	>99	85.5	46.3	>>200
5 ^(b)	Cyclohexane (3.2)	>99	85	46	>>200
6 ^(b)	Hexane (3.9)	>99	87	46.8	>500
7 ^(a)	Heptane (4)	>99	90.5	47.8	>>200

(a) 1mmole de *rac*-6, 1mmole d'acide acétique, 40mg de CAL-B et 60mg de TM 4Å, 5mL de solvant organique, 45°C, 24 heures

(b) 48 heures.

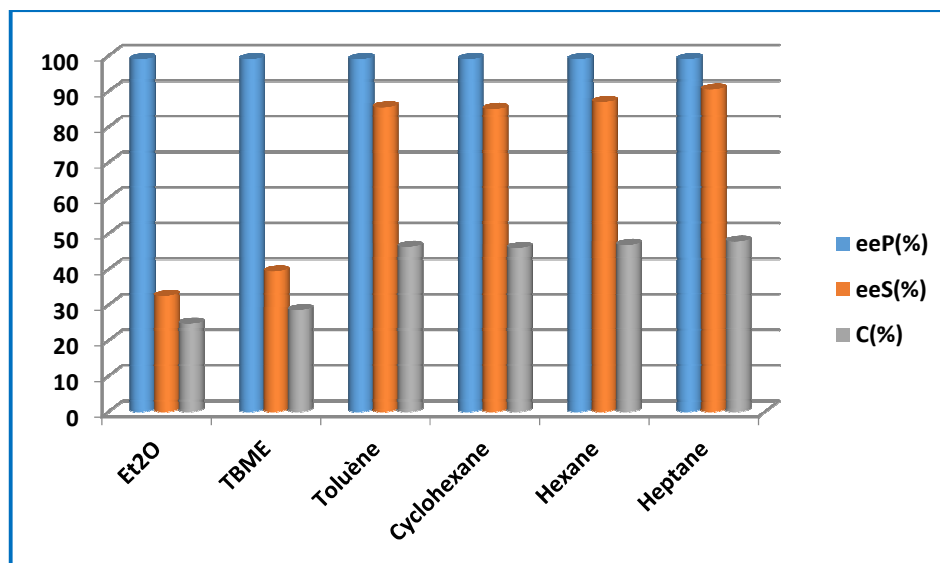
(c) Excès énantiomériques mesurés par CPG chirale : $ee = \left| \frac{R-S}{R+S} \right|$.

(d) Conversion: $C = \frac{ee_S}{ee_P + ee_S}$; Sélectivité: $E = \frac{\ln [(1-C) (1-ee_S)]}{\ln [(1-C) (1+ee_S)]}$.

L'utilisation de l'acide acétique comme donneur d'acyle lors du DC du *rac*-6 catalysé par la CAL-B n'a pas affecté l'énantiosélectivité. L'acétate (**R**)-6a est obtenu énantiomériquement purs ($ee_P > 99\%$) dans tous les solvants utilisés. Par contre l'hydrophobicité du solvant impacte fortement la réactivité lipasique. Dans les solvants ayant un $\log P < 1$, le taux de conversion ne dépasse pas le seuil de 28,5% (Entrées 1- 3), alors que dans les solvants ayant un $\log P > 2,5$, des conversions supérieures à 46% sont enregistrées (entrées 4-7).

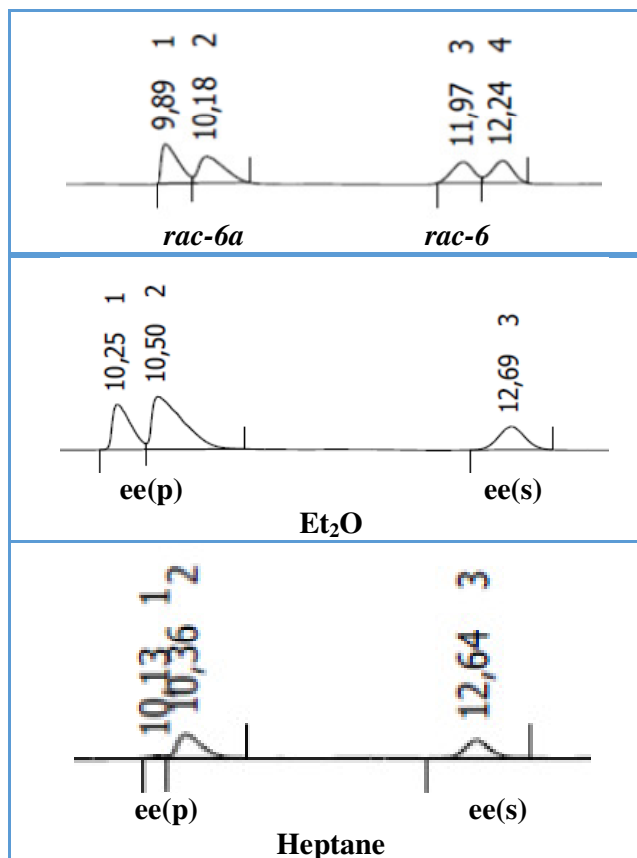
L'influence négative sur la réactivité de la CAL-B dans les solvants polaires tels que l'éther diéthylique et le TBME, peut être attribuée à la déstabilisation de la répartition de l'eau à la surface du site actif lipasique, ce qui n'est pas le cas dans les solvants peu polaires ou apolaires.

Les résultats du tableau 13 sont représentés par l'**histogramme 3**.



Histogramme 3: O-acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysé par la CAL-B : Effet du solvant.

Les chromatogrammes ci-dessous illustrent quelques résultats du tableau 13 :



Série de chromatogrammes 4 : O-acylation du 1-phényléthanol par l'acide acétique catalysée par la CAL-B : Effet du solvant.

Vu ces résultats intéressants obtenus pour la première fois avec un acide carboxylique à courte chaîne, qui n'a montré aucun impact nocif sur la CAL-B, nous avons envisagé de contrôler l'impact de la concentration de l'acide acétique dans l'environnement enzymatique, et ce par sa présence au tant que sous produit.

Cela est envisagé par l'utilisation de l'anhydride acétique comme donneur d'acyle, lors de l'acylation du *rac*-6 dans les mêmes conditions appliquées avec l'acide acétique comme donneur d'acyle (Schéma 57)

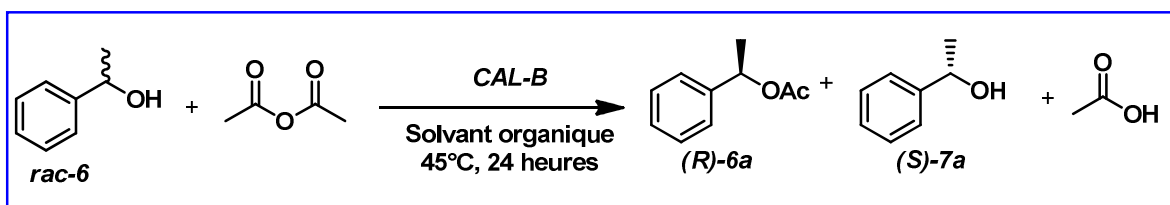


Schéma 57: O-acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysé par la CAL-B : Effet du solvant.

Les résultats obtenus sont réuni dans le tableau suivant :

Tableau 14 : DCE du 1-phényléthanol par le biais de l'anhydride acétique : effet du solvant.

Entrée ^(a)	Solvant (log p)	ee _P (%) ^(b)	ee _S (%) ^(b)	C (%) ^(c)	E ^(c)
1	Et ₂ O (0.85)	>99	88.8	47	>>200
2	TBME (0.35)	>99	>99	50	>>200
3	Toluène (2.52)	>99	>99	50	>>200
5	Cyclohexane (3.2)	72.7	50.3	40.9	10.4
6	Hexane (3.9)	79.8	58.6	42.3	16
7	Heptane (4)	78	42.4	35.2	12

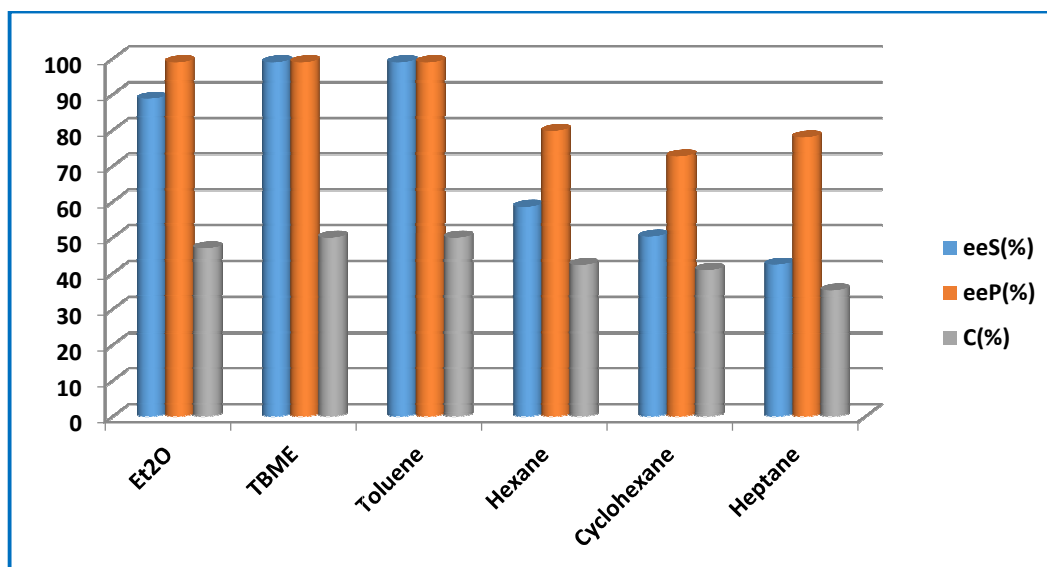
(a) 1mmole de *rac*-6, 1mmole d'anhydride acétique, 40mg de CAL-B, 5mL de solvant organique, 45°C, 24 heures.

(b) Excès énantiomériques mesurés par CPG chirale : $ee = |R-S| / |R+S|$.

(c) Conversion: $C = ee_S / ee_P + ee_S$; Sélectivité: $E = \ln [(1-C) (1-ee_{(S)})] / \ln [(1-C) (1+ee_{(S)})]$.

L'analyse des résultats du tableau 14 montrent des effets complètement inverses que ceux obtenus lors de l'utilisation de l'acide acétique comme agent acylant.

La *CAL-B* s'est montrée hautement réactive et énantiosélective dans les solvants ayant un $\log P < 2$. L'acétate (R) est obtenu énantiomériquement pur dans l'éther diéthylique, le TBME et le toluène, à des taux de conversions qui varient entre 47% et 50% (entrées 1-3). Tandis que dans les solvants hydrophobes une chute importante du facteur de sélectivité ($E \leq 16$), un effet moins marquant est noté sur la réactivité ($35,2\% \leq C \leq 42,3\%$).



Histogramme 4 : O-acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysée par la *CAL-B* : Effet du solvant.

Ce phénomène est dû probablement à l'augmentation de la concentration de l'acide acétique, sous produit de la réaction, par sa libération au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, ce qui provoque une perturbation de la réactivité et la sélectivité de la *CAL-B*. Cet impact est apparemment, plus prononcé dans les milieux hydrophobes.

Ce phénomène de perturbation de l'énantiosélectivité n'apparaît pas lorsque l'acide acétique est utilisé comme agent acylant, puisque il est impliqué directement dès la première étape du mécanisme enzymatique de type Bi-Bi Ping-Pong²², en formant l'état tétraédrique TS1 portant une charge négative stabilisée par le trou oxyanionique, libérant ainsi l'eau pour générer l'intermédiaire acyl-enzyme. Par contre, dans le deuxième cas, l'acide acétique, est libéré au même stade, et ainsi il peut perturber le pKa des acides aminés impliqués. (**Schéma 58**)

²² M.-P. Bousquet-Dubouch, M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, M.-D. Legoy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2001**, 26, 90–99.

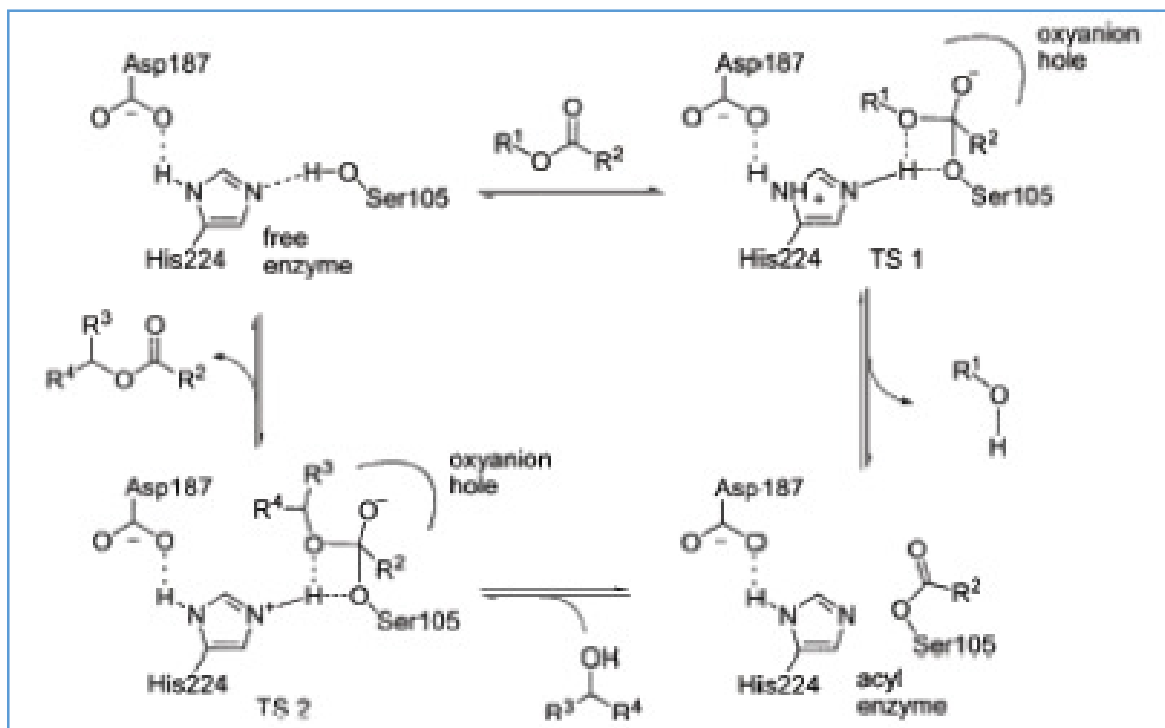
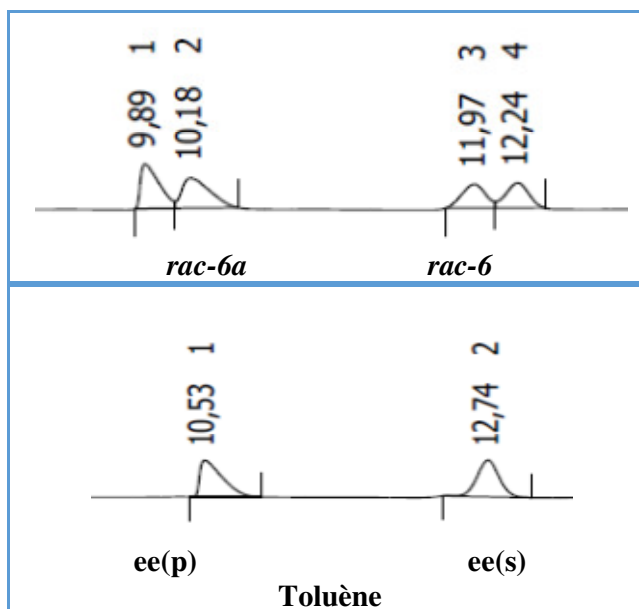


Schéma 58: Mécanisme d'O-acylation catalysée par la CAL-B.

Les chromatogrammes ci-dessous illustrent quelques résultats du tableau 14 :



Série de chromatogrammes 5 : O-acylation du 1-phényléthanol par l'anhydride acétique catalysée par la CAL-B.

En comparant les réactions avec les deux agents acylants, acide acétique et anhydride d'acide, et d'un point de vue durabilité, nous allons adopter le mode opératoire de l'acide acétique dans l'heptane, et ce par le bien de plusieurs avantages tels que:

- ✓ Réaction à économie d'atomes optimale.
- ✓ Pas d'impact nocif sur l'environnement ni sur la santé.
- ✓ Solvant classé utilisable par la firme pharmaceutique *pfizer*.

V-5-2- O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol : Profil cinétique :

Pour approuver la conformité de l'utilisation de l'acide acétique comme donneur d'acyle, nous avons envisagé de contrôler le déplacement de la réaction d'estérification dans le bon sens, et ce, sous les conditions optimales : Température 45°C, 60 mg de tamis moléculaire comme contrôleur de l'eau produite et comme solvant l'heptane. La réaction est effectuée sur 6 mmoles du phényléthanol *rac-6*.

L'évolution de la réaction de DCE est suivie par chromatographie chirale en phase gazeuse (CPG) en prélevant des échantillons de 50µL du mélange réactionnel dilués dans l'éther diéthylique et est filtrés sur célite.

Les résultats des différents prélèvements sont réunis dans le **tableau 15**:

Table 15 : Profil cinétique du dédoublement cinétique enzymatique par estérification du *rac-6* par l'acide acétique:

Entrée	Temps (min)	ee _S (%) ^(a)	ee _P (%) ^(a)	C(%) ^(b)	E ^(b)
1	15	17.6	>99	15	>500
2	30	20.8	>99	17.4	>500
3	60	28	>99	22.1	>500
4	120	40.3	>99	30	>500
5	240	72.2	>99	42.2	>500
6	300	76.1	>99	43.4	>500
7	360	80.2	>99	44.7	>500
8	960	84.8	>99	46.1	>500
9	1200	90.5	>99	47.8	>500

(a) Excès énantiomériques mesurés par CPG chirale : $ee = \left| \frac{R-S}{R+S} \right|$.

(b) Conversion: $C = ee_S/ee_P + ee_S$; Sélectivité: $E = \frac{\ln [(1-C) (1-ee_S)]}{\ln [(1-C) (1+ee_S)]}$.

Le profil cinétique est représenté par la Figure 37 :

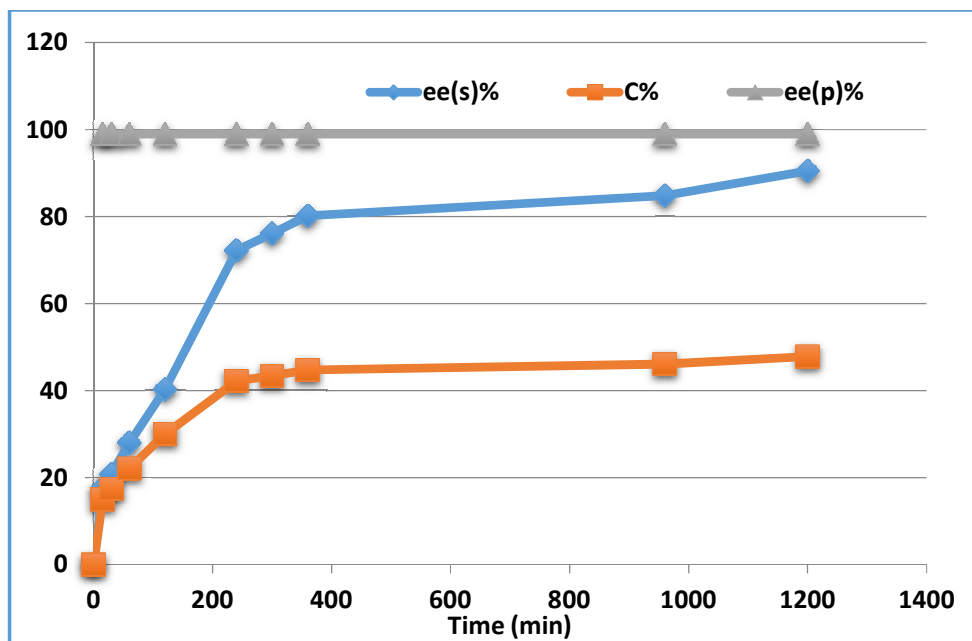


Figure 37 : Profil cinétique du dédoublement cinétique enzymatique par estérification du rac-6 par l'acide acétique.

Le profil cinétique de cette réaction et l'allure de l'évolution de la réaction en fonction du temps montrent la conformité avec la cinétique de type Michaelis-Menten. L'allure de la courbe correspond à une réaction de DCE irréversible. L'enrichissement énantiomérique de l'alcool n'ayant pas réagi est proportionnel à la conversion. L'énantiomère acétate produit est obtenu énantiomériquement pur dès le début de la réaction.

Ce résultat renforce nos conclusions concernant l'efficacité des conditions optimisées pour la valorisation de l'O-acylation en utilisant des acides carboxyliques comme donneurs d'acyle autant efficaces que verts pour la synthèse d'esters gras à haute valeur ajoutée.

V-5-3-Influence de la structure de l'AC sur la réactivité et la sélectivité lipasique :

A ce stade de travail, nous avons repris les conditions optimales mises au point, et les appliquées sur une série d'acides carboxyliques aliphatiques à différentes longueurs de la chaîne alkyle (AC). Cela dans un but majeur, est celui de la préparation d'une série d'ingrédients aromatisants (**6a-6f**) sous formes énantiopures sous conditions durables.

Le comportement de trois lipases menant ces réactions est étudié : la *CAL-B* immobilisée et deux autres sous forme libre : la lipase de *pseudomonas cepacia* (*PCL*) et la lipase de *candida rugosa* (*CRL*). A notre connaissance, les deux dernières lipases n'ont pas été utilisées auparavant pour catalyser cette approche d'estérification.

Les caractéristiques de la *CAL-B* sont présentées dans le chapitre 3. Les deux autres lipases sont aussi commerciales : la lipase de *Candida Rugosa* (*CRL*), d'origine fongique, achetée de chez *Sigma* d'une activité de 1170 Unités par mg, et la lipase de *Pseudomonas cepacia* (*PCL*) d'origine bactérienne, présentant une activité enzymatique >30000 Unités par g.

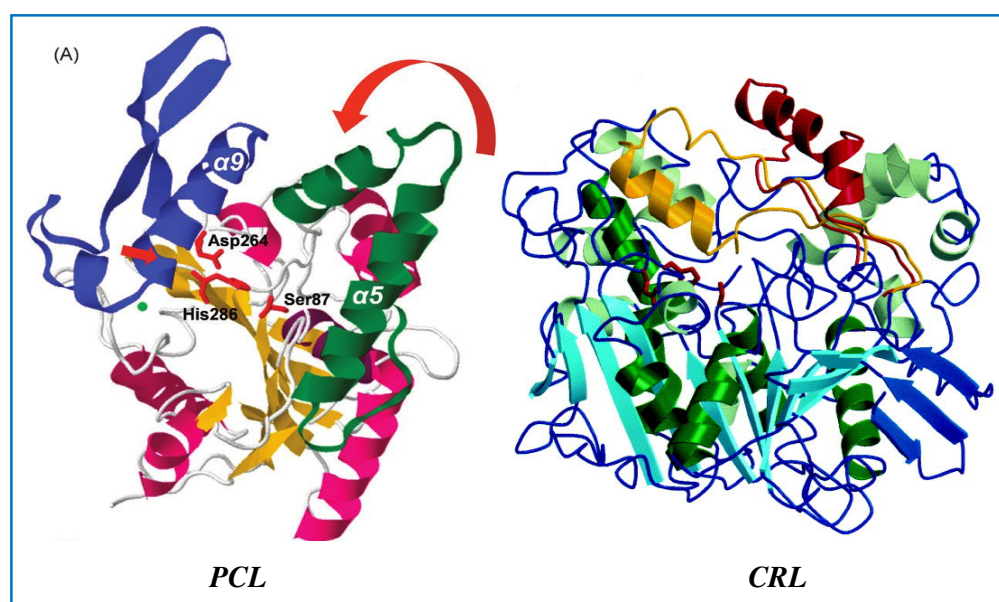


Figure 38 : Structure tridimensionnelle des lipases choisies²³.

Les réactions de dédoublement cinétique par estérification enzymatique du *rac-6*, sont effectuées sur un mélange équimoléculaire alcool-acide carboxylique approprié (2mmoles/2mmoles), en présence de la quantité appropriée de la lipase utilisée (40mg de *CAL-B*, 100mg pour la *CRL* et la *PCL*). (Schéma 59)

²³<http://www.rcsb.org/pdb/>

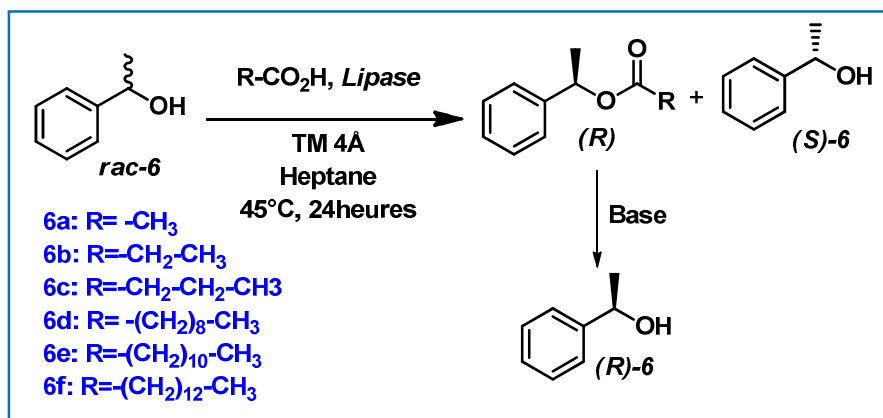


Schéma 59: O-acylation lipasique du 1-phényléthanol par des AC.

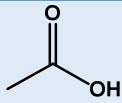
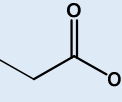
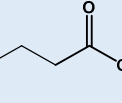
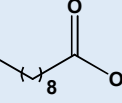
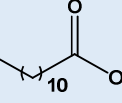
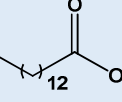
Après 24 heures d'agitation sous 45°C, pour chaque réaction, la lipase est filtrée, et le résidu réactionnel est concentré sous vide. Les rendements des esters (**(R)-6a-6f**) produits et les alcools résiduels (**(S)-6**) sont évalués après séparation sur colonne de gel de silice. Leurs excès énantiomériques sont mesurés par CPG chirale.

Après confirmation des structures par les analyses spectroscopiques usuelles, RMN ¹H et du ¹³C, mesure des pouvoirs rotatoires, des esters produits, une hydrolyse est effectuée pour analyser les alcools (**(R)-6**) par CPG chirale.

L'énantio-préférence des trois lipases est confirmée par la comparaison des pouvoirs rotatoires mesurés avec ceux rapportés dans la littérature.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 16**.

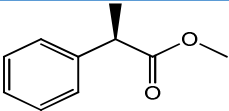
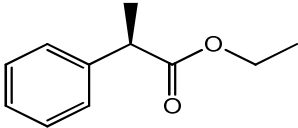
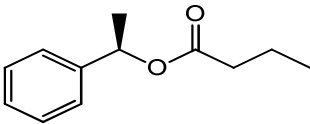
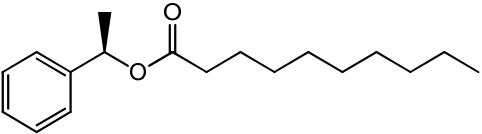
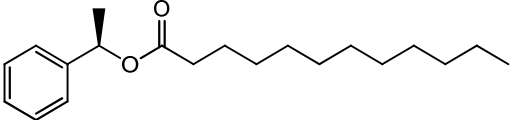
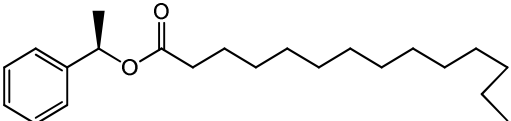
Tableau 16 : O-acylation lipasique du 1-phényl éthanol par des AC.

Entrée	Acide carboxylique	Lipase	ee _p (%) ^(c) Rdt % ^(f)	ee _s (%) ^(c) Rdt % ^(f)	C (%) ^(d)	E ^(d)
1		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (44)	90 (44)	48	>>200
2		<i>PCL</i> ^(b)	-	-	PR	-
3		<i>CRL</i> ^(c)	-	-	PR	-
4		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (44)	88 (43)	47	>>200
5		<i>PCL</i> ^(b)	-	-	PR	-
6		<i>CRL</i> ^(c)	-	-	PR	-
7		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (43)	87 (46)	46.8	>>200
8		<i>PCL</i> ^(b)	-	-	PR	-
9		<i>CRL</i> ^(c)	86.4 (30)	56.4 (60)	39.5	24
10		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (40)	82.8 (50)	45.5	>>200
11		<i>PCL</i> ^(b)	>99 (25)	39.8 (50)	28.7	>>200
12		<i>CRL</i> ^(c)	83 (35)	75 (38)	47.5	24
13		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (40)	82.8 (50)	45.5	>>200
14		<i>PCL</i> ^(b)	>99 (25)	45.8 (55)	31.6	>>200
15		<i>CRL</i> ^(c)	84.6 (32)	56.8 (50)	40.2	21
16		<i>CAL-B</i> ^(a)	>99 (45)	93.3 (40)	48.5	>>200
17		<i>PCL</i> ^(b)	>99 (37)	65.8 (38)	40	>>200
18		<i>CRL</i> ^(c)	-	-	PR	-

(a) 1mmole de *durac-6*, 1mmole l'acide carboxylique, 40mg de *CAL-B* et 60mg de tamis moléculaire 4Å dans 5mL d'heptane. (b) 1mmole de *rac-6*, 1mmole l'acide carboxylique, 100mg de *PCL* et 60mg de tamis moléculaire 4Å dans 5mL d'heptane. (c) 1mmole de *rac-6*, 1mmole l'acide carboxylique, 100mg de *CRL* et 60mg de tamis moléculaire 4Å dans 5mL d'heptane. (d) Excès énantiomériques mesurés par CPG chirale $ee = |R-S| / |R+S|$. (e) Conversion: $c = ee_s / ee_p + ee_s$; Sélectivité : $E = \ln [(1-C) (1-ee_s)] / \ln [(1-C) (1+ee_s)]$. (f) Rendements chimiques isolés. **PR**: Pas de réaction

Les caractéristiques chiroptiques des esters obtenus sont réunis dans le tableau 17 :

Tableau 17: Caractéristiques chiroptiques des esters obtenus

Acétates	$[\alpha]_D^{20}$ (c1; CHCl ₃)	Littérature
 (R)-methyl 2-phenylpropanoate	+136 Pour ee _(R) >99%	$[\alpha]_D^{20} = +135.9$ (c0.1; CHCl ₃) Pour ee _(R) >99% ²⁴
 (R)-ethyl 2-phenylpropanoate	+101.100 Pour ee _(R) >99%	$[\alpha]_D^{20} = +101$ (c1; Et ₂ O) Pour ee _(R) >95% ²⁵
 (R)-1-phenylethyl butyrate	+83.59 Pour ee _(R) >99%	$[\alpha]_D^{20} = +97$ (c1; Et ₂ O) Pour ee _(R) >95% ²⁵
 (R)-1-phenylethyl decanoate	+52.213 Pour ee _(R) >99%	N'est pas décrit
 (R)-1-phenylethyl dodecanoate	+49.097 Pour ee _(R) >99%	N'est pas décrit
 (R)-1-phenylethyl tetradecanoate	+42.393 Pour ee _(R) >99%	N'est pas décrit

Le **tableau 16** montre une variété de résultats qui dépend de la nature de la lipase et celle de l'acide carboxylique.

En utilisant la *CAL-B* comme biocatalyseur, tous les (*R*)-esters (**6a-6f**), sont obtenus énantio-purs, et ce, indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide

²⁴ Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche, *Tetrahedron: Asym.*, **2013**, 24(5-6), 290-296.

²⁵ D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5531-5534.

carboxylique utilisé ($E \gg 200$). Les conversions recordées sont $45.5\% \leq c \leq 48.5\%$ (entrées 1, 4, 7, 10, 13 et 16). Il est bien connu que la *CAL-B* a une bonne affinité pour les acides carboxyliques gras à longue chaîne carbonée, ce qui est confirmé par la présente étude. En plus nous avons prouvé son affinité même pour ceux ayant une courte chaîne carbonée.

Avec la *PCL* comme biocatalyseur, aucune réactivité n'est notée avec les acides : acétique, propionique et butyrique, c.-à-d. acides à courte chaîne alkyle (entrées 2, 5 et 8). Cette lipase ne s'est montrée réactive qu'avec les acides carboxyliques gras, d'où les (*R*)-esters gras d'acide caprique (**6d**), laurique (**6e**) et myristique (**6f**) sont obtenus avec excellentes sélectivités $ee_{(p)} > 99\%$ et $E \gg 200$. Les taux de conversions enregistrées augmentent proportionnellement avec la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle, de C :10 à C :14, où ces valeurs passent de 28,7% à 40%.(entrées 11, 14 et 17). A notre connaissance, il est à souligner que les résultats obtenus avec cette lipase sont rapportés pour la première fois.

Avec la *CRL* comme biocatalyseur, les résultats obtenus sont en concordance avec ceux décrits par Janssen *et al.* (1996)²⁶, qui ont montré que cette lipase ne montre aucune réactivité en utilisant l'acide myristique. Quant à nous, nous avons montré également qu'elle n'est pas réactive ni avec l'acide acétique ni le propionique (entrée 18 *versus* 3 et 6).

Comparée aux deux autres lipases, la *CRL* offre les (*R*)-esters d'acides gras (**1c-1e**) avec de modestes sélectivités ($21 < E < 24$) à des conversions de l'ordre de $C > 39\%$.(entrées 9, 12 et 15).

Il est à souligner que des résultats qui vont dans le même sens ont été rapportés avec des esters d'énols vinyliques.²⁷

Les résultats obtenus dépendent de la forme des sites actifs des trois lipases qui ont des formes différentes. Il est établi que, la longueur, la forme et le site actif des lipases varient considérablement. Les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacea* ont un site actif en forme d'entonnoir de tailles différentes (celui de la *PCL* est plus large que celui de la *CAL-B*), mais la lipase de *Candida rugosa* a un site actif en forme de tunnel²⁸. Ainsi, la poche énantiométrique des lipases *CAL-B* et *PCL* sont mieux adaptées à accepter des substituants

²⁶A. E. Janssen, A. M. Vaidya, P. J. Halling, *Enz. Microb. Technol.*, **1996**,18, 340-346.

²⁷N. Melais, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant. *C R Chimie*. **2016**, 19, 971.

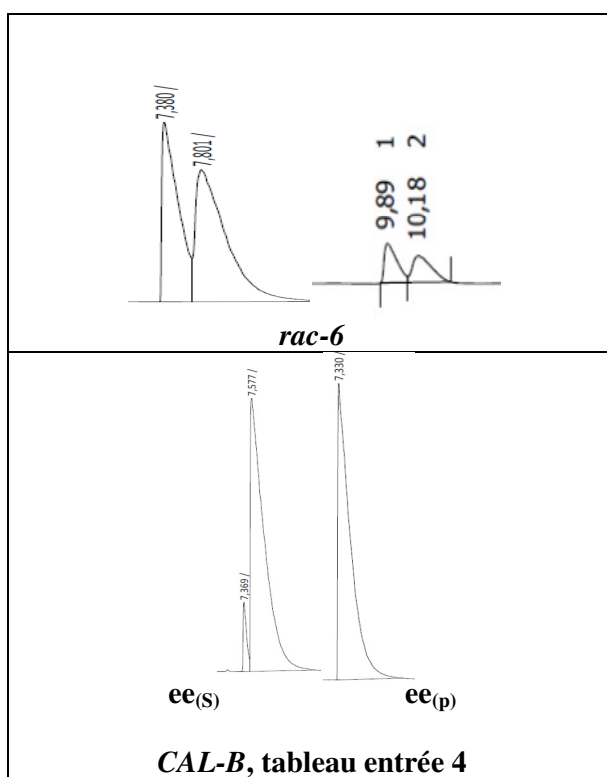
²⁸J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 93, 67-80.

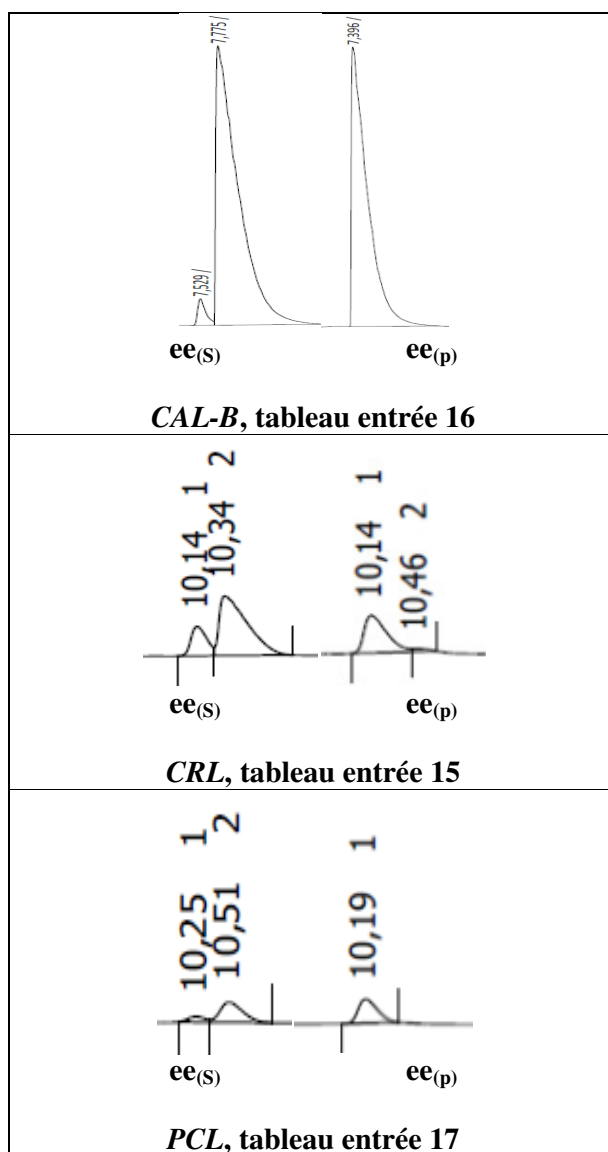
aliphatiques qui peuvent facilement pénétrer dans l'entonnoir. Pour la lipase **CRL**, le site est long et étroit donc il aura une incidence sur l'insertion du substrat au niveau du site actif.

Finalement, on peut dire qu'on a mis au point une voie naturelle, éco-compatible, biocatalytique de synthèse des esters floraux énantio-purs, en utilisant des acides carboxyliques comme agents acylants verts, dont certains sont naturels. L'ester (*R*)-**6f** est obtenu énantio-pure pour la première fois sous les conditions mises aux points.

Parmi les trois lipases utilisées, la **CAL-B** est la plus performante pour cette biotransformation, alors que la **PCL** est plus commode pour la synthèse énantiosélective des esters gras à longues chaînes carbonées.

Les chromatogrammes ci-dessous illustrent quelques résultats du tableau 16.





Série de chromatogrammes 6 : O-acylation lipasique du 1-phényléthanol *rac*-6 par différents acides carboxyliques.

V-6- N-Acylation enzymatique du 1-phényléthylamine : Voie de synthèse éco-compatible d'amides à haute valeur ajoutée :

À ce stade, nous avons envisagé d'appliquer les conditions optimales de l'O-acylation enzymatique du *rac*-6, pour effectuer la N-acylation du 1-phényléthylamine *rac*-7, pour accéder à une série d'amides d'une haute valeur ajoutée.

Pour se faire, nous avons sélectionné la *CAL-B* comme biocatalyseur, qui est une lipase thermostable comparée à la *PCL* et la *CRL*. Cette caractéristique est primordiale, puisque la *N*-acylation par condensation directe amine – acide carboxylique nécessite une température élevée, comme nous l'avons déjà vu lors du chapitre 3.

V-6- 1- Synthèse des amides racémiques :

L'obtention des amides racémiques *rac-7a-7f* est indispensable car ils servent comme références pour les analyses chromatographiques chirales.

Pour se faire nous les avons obtenus *via* deux méthodes :

Les amides *rac-7a, 7d, 7e* sont obtenus *via* une méthode *éco-compatible*, mise au point récemment au sein du laboratoire de *Catalyse Asymétrique éco-compatible*, et qui consiste en l'utilisation des esters d'énol comme donneurs d'acyle, sans solvant et sans aucune activation préalable²⁹ (Schéma 60).

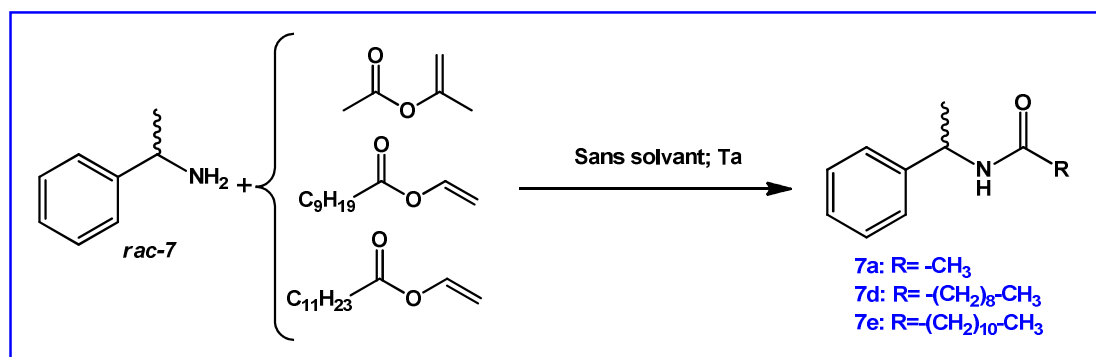


Schéma 60: Synthèse d'amides racémiques 7a, 7d et 7e.

Les acétamides racémiques ont été obtenus par un simple couplage entre 1 équivalent de l'amine racémique et 3 équivalents de l'ester d'énol approprié, le mélange est soumis sous agitation magnétique à température ambiante, jusqu'à la consommation totale de l'amine, généralement durant une nuit. Les amides purs sont obtenus par cristallisation dans l'hexane avec des rendements supérieurs à 70%. Il est à noter que l'utilisation d'un donneur d'acyle ayant une longue chaîne carbonée n'affecte pas l'efficacité de cette réaction de couplage chimique.

²⁹A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouiouche, O. Riant, *Synth. Commun.*, **2014**, 44, 2364-2376.

Les amides *rac* -7c et 7f sont obtenus par condensation directe de l'amine racémique et l'acide carboxylique adéquat, en utilisant l'agent de couplage DCC. (Schéma 61)

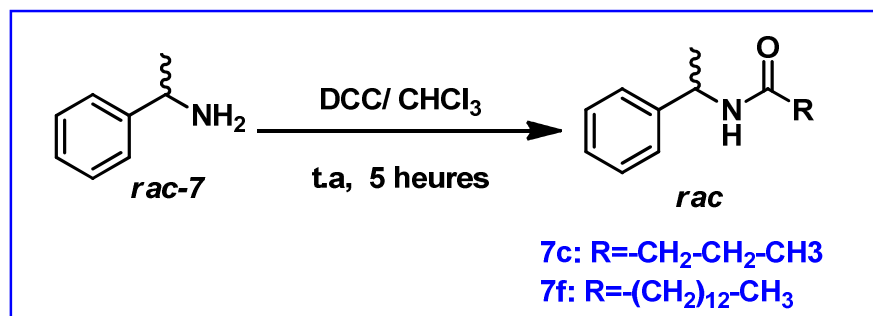


Schéma 61: Synthèse des amides racémiques 7c et 7f.

Les amides racémiques sont obtenus purs après une flash chromatographie, avec des rendements supérieurs à 80%. Les structures des amides racémiques synthétisés ont été confirmées par les analyses spectrales usuelles : RMN¹H et RMN¹³C.

V-6- 2- DC par acylation du rac-7 par le biais de la CAL-B

Les réactions de dédoublement cinétique par acylation catalysée par la CAL-B sont effectuées sur un mélange équimolaire amine *rac*-7 et acides carboxyliques (même série utilisée lors de la O-acylation), en présence de 50 mg de CAL-B et 50mg du tamis moléculaire 4Å, dilués dans 2mL d'heptane. Les mélanges sont soumis sous agitation magnétique à 80°C. Après 72 heures, les mélanges sont dilués dans l'acétate d'éthyle, et l'enzyme est filtrée (Schéma 62)

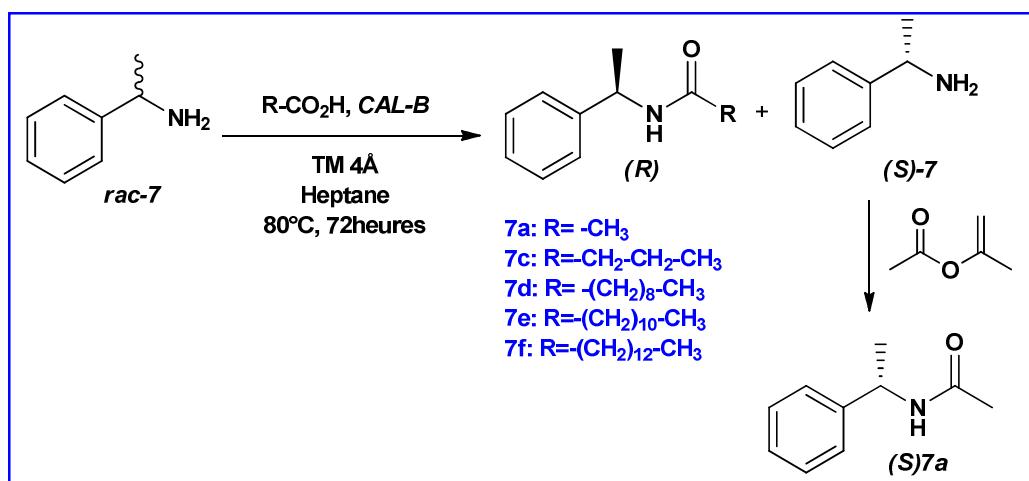


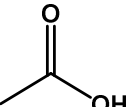
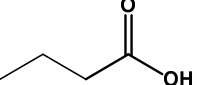
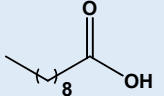
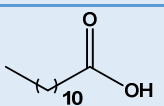
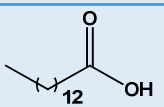
Schéma 62: N-Acylation du 1-phényléthylamine catalysée par la CAL-B : impact de la structure de l'acide carboxylique.

Les amides formés et les amines résiduelles sont séparés par une extraction liquide-liquide acido-basique. Les amines (*S*)-résiduelles sont acylées par l'acétate d'isopropényle pour former l'acétamide (*S*)-**7a**. Les conversions et les excès énantiomériques du (*S*)-**7a** et des (*R*)-**[7a-7f]** sont déterminés par HPLC chirale.

L'énantiopréférence des trois lipases est confirmée par la comparaison des pouvoirs rotatoires mesurés avec ceux rapportés dans la littérature.

Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 18**.

Tableau 18: N-Acylation du 1-phényléthylamine catalysée par la CAL-B : impact de la structure de l'acide carboxylique.

Entrée	Acide carboxylique	ee _P (%) ^(a) Rdt % ^(c)	ee _S (%) ^(a) Rdt % ^(c)	C (%) ^(b)	E ^(b)
1		5.8 (36)	7 (30)	55	1
2		52.5 (40)	56.4 (28)	51.8	5
3		70.6 (42)	>99 (25)	58.4	29
4		74.4 (35)	91 (30)	45	49
5		60.7 (46)	>99 (20)	60.7	22.5

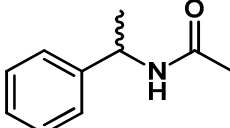
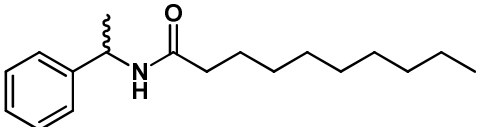
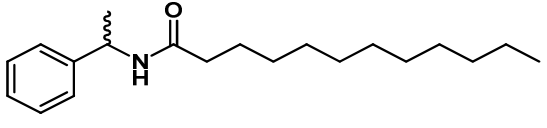
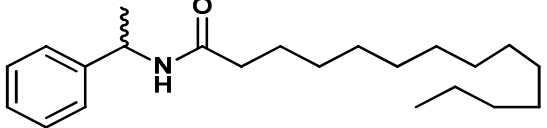
(a) Excès énantiomériques mesurés par CPG chirale $ee = \left| \frac{R-S}{R+S} \right|$.

(b) Conversion: $c = ee_S / ee_P + ee_S$; Sélectivité : $E = \frac{\ln [(1-C) (1-ee_S)]}{\ln [(1-C) (1+ee_S)]}$.

(c) Rendements chimiques isolés.

Les caractéristiques *chiroptiques* des amides obtenus sont réunis dans le tableau 19 :

Tableau 19: Les caractéristiques *chiroptiques* des amides obtenus

Acétates	$[\alpha]_D^{20}(c1; CHCl_3)$	Littérature
 N-((S)-1-phenylethyl) acetamide (2a):	$[\alpha]_D^{20} = -98$ (c 1, $CHCl_3$) pour $ee >99\%$.	[Lit. $[\alpha]_D^{20} = +101$ (c 0.1, $CHCl_3$), 95% ee (R). [40]
 N-((R)-1-phenylethyl)decanamide (2d):	$[\alpha]_D^{20} = +42.39$ (c 1, $CHCl_3$) pour $ee = 70.6\%$.	N'est pas décrit
 N-((R)-1-phenylethyl)dodecanamide (2e):	$[\alpha]_D^{20} = +43.86$ (c 1, $CHCl_3$) pour $ee = 74.4\%$.	N'est pas décrit
 N-((R)-1-phenylethyl)tetradecanamide (2f):	$[\alpha]_D^{20} = +27.09$ (c 1, $CHCl_3$) pour $ee = 60.07\%$.	N'est pas décrit

Les réactions de N-acylation catalysées par la *CAL-B* du *rac-7* en utilisant des acides carboxyliques comme donneurs d'acyle s'effectuent d'une manière moins énantiosélective que celles de la O-acylation.

Le facteur de sélectivité varie entre $E=1$ avec l'acide acétique et $E=49$ avec l'acide laurique (entrées 1-5).

Le meilleur résultat est obtenu avec l'acide laurique, avec $E=49$ et une conversion de $C=45\%$ (entrée 5).

Aucune influence significative sur la réactivité de la *CAL-B* n'est observée, par contre la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle impacte significativement l'énantiosélectivité lipasique (entrées 1-2 versus 3-5).

Les (*R*)-amides gras (**5d-5f**) sont obtenus avec des excès énantiomériques $60.7\% \leq ee_p \leq 74.4\%$ et les amines (*S*)-7 avec des excès énantiomériques $91\% \leq ee_s \leq 99\%$ (entrées 3-5).

A notre connaissance, le *N*-((*S*)-1-phenylethyl) dodecanamide (**5f**), un antibactérien puissant³⁰, est obtenu sous forme énantiomériquement enrichie pour la première fois.

Pour conclure, nous avons développé une voie de synthèse efficace des amides gras via un DC par *N*-acylation catalysée par la *CAL-B*. cette approche permet l'accès aisé à un nombre d'intermédiaires clés énantiomériquement purs ou enrichies d'une grande importance en industrie pharmaceutique.

V-7- Conclusion :

Les acides carboxyliques aliphatiques, de courte à longue chaîne carbonée sont utilisés avec une grande performance, comme donneurs d'acyle verts lors de la *O*-acylation du 1-phényléthanol *rac-6*, et la *N*-acylation du 1-phényléthylamine *rac-7*, par voie enzymatique, afin de préparer des esters et d'amides à haute valeur ajoutée.

Trois lipases sont examinées; la *CAL-B* immobilisée et deux autres sous forme libre la *PCL* et la *CRL*. Seule la *CAL-B* s'est montrée performante lors de ces biotransformations.

En utilisant la lipase de *CAL-B*, l'*O*-acylation du *rac-6* permet l'obtention des (*R*)-phényléthyl esters [**6a-6f**] énantipures ($ee_p > 99\%$) et ce quel que soit la structure de l'acide carboxylique.

Les amides sont récupérés avec une haute énantiosélectivité à des conversions $c > 45\%$.

D'autre part, la lipase de *PCL* s'est montrée compatible avec les acides carboxyliques gras, et offre les esters gras [**6d-6f**] avec une excellente énantiosélectivité. Le meilleur résultat est obtenu avec l'acide myristique comme donneur d'acyle ($c = 40\%$, $E \gg 200$).

Les résultats avec la *PCL* sont rapportés pour la première fois.

Pour la *N*-acylation, seulement les (*R*)-amides gras sont obtenus [**7d-7f**] avec des excès énantiomériques acceptables ($60.7\% \leq ee_p \leq 74.4\%$).

³⁰A. Ammendola, T. Wieber, A. Wuzik, M. Lang. U.S. Patent App, **2009**, 12,540.

Nous avons décrit un protocole biocatalytique offrant facilement et avec une grande performance des esters et des amides sous formes énantiomériquement pures.

La génération de l'eau comme le seul déchet de ces biotransformations les classes comme réactifs verts pour une application industrielle éco-compatible, sans impact nocif sur l'environnement.

L'approche mise au point est dite naturelle par le bien de l'utilisation des biocatalyseur afin de produire des esters et des amides à haute valeur ajoutée.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article au cours de finalisation.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de ces travaux de thèse nous nous sommes intéressées à la mise aux points de procédés biocatalytiques propres pour accéder aux molécules bioactives énantiomériquement enrichies dans une approche éco-compatible. Le dédoublement cinétique par acylation enzymatique est choisi pour l'obtention aisée et efficace des molécules énantiomériquement pures, tout en obéissant à certaines exigences environnementales et économiques. Nous avons examiné l'influence de divers paramètres pouvant moduler la sélectivité et la réactivité de quelques lipases d'une large utilisation industrielle et commercialement disponibles. Des molécules mono fonctionnalisées d'une haute valeur ajoutée sont sélectionnées, en l'occurrence, des acides α -arylpropionique (Profènes), des acides carboxyliques gras, le 1-phényléthanol et le 1-phényléthylamine, pour mener ces travaux de thèse.

Ce travail est réparti sur deux volets avec le même objectif.

Dans le **premier volet**, nous avons optimisé la réaction de dédoublement cinétique par amidation de l'ibuprofène catalysée par la *CAL-B*. Nous avons examiné l'impact du solvant organique et du partenaire amine de l'amidation, à la fois sur la réactivité et la sélectivité lors de cette importante biotransformation. Cinq anilines substituées par des groupements ayant différents effets stéréo-électroniques : Aniline, *p*-toluidine, *p*-trifluorométhyl aniline, 4-iodoaniline, 4-méthoxyaniline ainsi que la benzylamine.

L'amidation lipasique de l'ibuprofène dans l'heptane a donné lieu aux amides correspondants avec des taux de conversions qui varient entre 47% et 96% sans aucune énantiosélectivité ($E=1$), et ce, avec les différentes anilines. L'avancement avec la benzylamine est freiné à 2%. Le remplacement de l'heptane par le toluène a provoqué une amélioration importante de l'énantiosélectivité en détriment de la réactivité de la *CAL-B* sous les conditions expérimentales adoptées pour élaborer l'amidation de l'ibuprofène ($C \leq 7\%$). Les amides (*R*)-2-(4-isobutylphényl)-*N*-(4-(trifluorométhyl)phényl)propanamide (**1-A1**), (*R*)-*N*-(4-Iodo phényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide (**1-A3**) et (*R*)-2-(4-Isobutylphényl)-*N*-phényl propanamide (**1-A5**) sont obtenus avec des excès énantiomériques de : 97,3% ; 90,5% et 90,8%. Bien que les conversions dans le toluène sont faibles, les résultats en terme d'énantiosélectivité sont encourageants, ils sont rapportés pour la première fois et restent à optimiser.

Nous avons appliqué les conditions optimales de la réaction d'amidation catalysée par la *CAL-B* et réalisée dans l'heptane sur d'autres acides carboxyliques appartenant à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens, outre que l'ibuprofène, le ketoprofène et l'ibuprofène, l'acide 2-phénoxypropionique, et la *L*-Boc proline. La réaction d'amidation enzymatique est comparée à l'amidation en utilisant le DCC comme agent de couplage. Les conditions qu'on vient de mettre au point, par voie enzymatique, sont rapportées pour la première fois pour synthétiser des amides par condensation directe, en utilisant des anilines, amines primaires aromatiques, comme partenaire d'amidation. Les amides sont récupérés, facilement, avec une économie d'atome optimale. Parmi les amides synthétisés, 14 sont rapportés pour la première fois.

La voie enzymatique a offert deux structures amides sous forme cristalline, une analyse par diffraction RX a été effectuée : le *N*-(4-Iodophényl)-2-(4-isobutylphényl) propanamide (**rac-1-A3**) et le *N*-(4-Bromophényl)-2-(4-isobutylphényl)propanamide (**rac-1-A7**).

Cette voie biocatalytique s'est montrée très efficace, simple et éco-compatible par le bien de plusieurs avantages. Son efficacité dépend des contraintes structurales et effet électroniques apportés par les deux partenaires de la condensation : acide carboxylique et amine.

Dans le **second volet**, nous avons utilisé des acides carboxyliques aliphatiques, de courte à longue chaîne carbonée qui sont utilisés avec une grande performance, comme donneurs d'acyle verts lors de la *O*-acylation du 1-phényl éthanol **rac-6**, et la *N*-acylation du 1-phényléthylamine **rac-7**, par voie enzymatique, afin de préparer des esters et des amides à haute valeur ajoutée. Trois lipases sont examinées; la *CAL-B* immobilisée et deux autres sous forme libre la *PCL* et la *CRL*. Seule la *CAL-B* s'est montrée performante lors de ces biotransformations. En utilisant la lipase de *CAL-B*, l'*O*-acylation du **rac-6** permet l'obtention des (*R*)-phényléthyl esters [**6a-6f**] énantio-pures ($ee_p > 99\%$) et ce, quelque soit la structure de l'acide carboxylique. Les amides sont récupérés avec une haute énantiosélectivité à des conversions $c > 45\%$. D'autre part, la lipase de *PCL* s'est montrée compatible avec les acides carboxyliques gras et offre les esters gras [**6d-6f**] avec une excellente énantiosélectivité. Le meilleur résultat est obtenu avec l'acide myristique comme donneur d'acyle ($c = 40\%$, $E >> 200$). Les résultats avec la *PCL* sont rapportés pour la première fois.

Pour la *N*-acylation, seulement les (*R*)-amides gras sont obtenus [**7d-7f**] avec des excès énantiomériques acceptables ($60.7\% \leq ee_p \leq 74.4\%$).

Nous avons décrit un protocole biocatalytique offrant facilement et avec une grande performance des esters et des amides sous formes énantiomériquement pures. La génération de l'eau comme le seul déchet de ces biotransformations permet de classer ces agents acylants comme réactifs verts pour une application industrielle éco-compatible, sans impact nocif sur l'environnement.

L'approche mise au point est dite naturelle par le bien de l'utilisation des biocatalyseur afin de produire des esters et des amides à haute valeur ajouté.

Partie Expérimentale

Généralités

Appareillages et Analyses :➤ Méthodes spectrales :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN¹H) et de carbone (RMN¹³C) : Les spectres RMN¹H ont été enregistrés sur des spectromètres Varian GEMINI-300 BB, Brüker-300 dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl₃) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard, sauf indication contraire. Les déplacements chimiques "δ" sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne (δ= 7,24 ppm pour CDCl₃). Les abréviations suivantes ont été utilisées : **s** = singulet, **sl** = singulet large, **d** = doublet, **dd** = doublet de doublet, **t** = triplet, **q** = quadruplet, **m** = multiplet et **ma** = massif. Les constantes de couplage (**J**) (valeurs absolues) sont mentionnées en Hertz (Hz).

Les spectres Infrarouges (IR) : ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu FTIR-8400S. Les nombres d'onde "ν" sont exprimés en cm⁻¹. Les produits ont été analysés sous forme de films sur l'ATR soit purs, soit en solution dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂).

➤ Méthodes chromatographiques :

Les analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été effectuées sur un chromatographe avec contrôleur et une pompe Water 600, équipé d'un détecteur UV-VIS Water 996 muni d'une barrette de diode. Les colonnes chirales utilisées sont mentionnées pour les analyses concernées.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse chirale (CPG) ont été réalisées sur un appareil HRGC 5300 avec Intégrateur chromato D-2500 ou un appareil ThermoFinnigan Trace GC utilisant une colonne de type CHIRALSIL-DEX CB (25m ; 0,25mm, 25mm). Le détecteur de type FID est chauffé à 300°C et l'injecteur est à 250°C. Les pressions des gaz sont : He : 100kPa ; H₂ : 50kPa et l'air sec à 100kPa.

Les chromatographies liquides sur colonne faites sur gel de silice Merck 230-400 Mesh (0,04-0,063 mm) ; les phases mobiles constituées par des mélanges différents selon la polarité des produits séparés, tel que les solvants qui composent les mélanges de la phase mobile sont des solvants technique mais distillés avant l'usage pour confirmer la pureté de ses solvants.

Les chromatographies analytiques sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice commerciales de type MERCK 5179, 250 mesh en aluminium, avec un indicateur fluorescent 60 PF254 ; 0,25 mm d'épaisseur et révélées à l'UV ($\lambda = 254$ nm) ou à l'aide d'un révélateur chimique l'iode.

➤ Les pouvoirs rotatoires : ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241 MC et les concentrations sont données en g/100mL.

➤ Les points de fusion : ont été déterminés au moyen d'une fusion mètre BÜCHI MELTING POINT B-545.

➤ Réactifs et solvants :

Produits : les produits commerciaux utilisés dans les synthèses ou dans les dédoublements cinétiques sont fournis par les firmes Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, et STREM.

Lipases : les enzymes utilisés dans les dédoublements cinétiques des mélanges racémiques sont commerciales et sont achetées de chez les Sigma-Aldrich, Fluka et Amano.

Les solvants : les solvants utilisés sont de qualité p.a. ou distillés avant emploi. Les solvants utilisés en HPLC sont de qualité HPLC, filtrés et dégazés avant usage.

Chapitre III & IV

« Dédoublage cinétique via amidation enzymatique de l'Ibuprofène »

Et

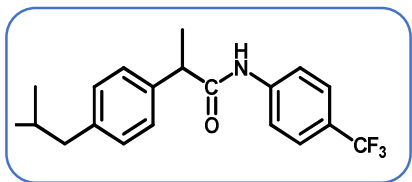
« Synthèse éco-compatible d'amides à haute valeur ajoutée catalysée par la CAL-B »

➤ Procédure générale de la synthèse des amidopropènes racémiques :

Dans un petit ballon, on dispose 1mmole d'acide racémique, 1.2 équivalent d'amine et 1.1 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans 20ml de chloroforme (CH₃Cl). Le mélange réactionnel est soumis sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie chromatographie sur couche mince (CCM) jusqu'à la consommation totale de l'acide de départ. Le produit amide est obtenu pur suite à une filtration suivi d'une évaporation sous vide, puis une recristallisation dans l'hexane. Une purification sur colonne de gel de silice est effectuée si nécessaire.

➤ Procédure générale d'aminolyse enzymatique d'acide carboxylique non-activité :

Dans un petit ballon, on dispose 2 mmoles d'amine et de 1 mmole d'acide carboxylique dissous dans 1 mL d'heptane, on introduit 50 mg des tamis moléculaires 4Å et 50 mg de CAL-B immobilisé. Le mélange réactionnel est agité à 80 ° C pendant 3 jours. Après refroidissement, le solvant est évaporé et le résidu brut a été exposé à un traitement acido-basique standard (HCl, 3M / 3M NaOH). Le solvant a été éliminé sous vide et le résidu a été cristallisé dans l'hexane, ou purifié par Chromatographie si nécessaire.

↪ *2-(4-isobutylphényl)-N-(4-(trifluorométhyl) phényl) propanamide 1-A1*Formule brute : C₂₀H₂₃ F₃NO.

Masse moléculaire : 350.4 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 140°C.

Rendement chimique = 86 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal :R_f = 0.37. Eluant : CH₂Cl₂.

- HPLC chirale : Colonne : Chiralpak IA.6x250mm ; Isohexane / EtOH (95/5) ; avec un débit de 1mL/min ; temps de rétention : 6.73min et 7.68min.

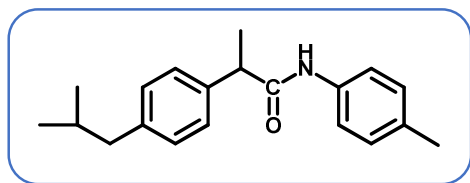
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z C₂₀H₂₂NO [M+H⁺]: 350.17251 calculée, 350.17263 trouvée.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48-7.41 (q, J = 9 Hz, 4H_{arm}), 7.32 (bs, 1H amide), 7.19-7.03 (m, 4 H_{arm}), 3.68-3.61 (q, J = 7.1 Hz, -^{*}CH-C=O, 1H), 2.41-2.39 (d, J = 7.2 Hz, 2H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.84-1.75 (m, 1H, -CH₂-CH₂-(CH₃)₂), 1.53-1.50 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃-^{*}CH-C=O), 0.85-0.82 (d, J = 6.6 Hz, 6H, -CH₂-CH-(CH₃)₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 171.96 (C=O amide); {140.91-139.92-136.59-128.94-128.27-126.33-126.09-125.12-125.07-121.21-118.18} (C=C aromatique); 124.63 (-CF₃); 59.67 ((CH₃)₂-CH-CH₂); 46.76 (CH₃-^{*}CH-C=O); 43.96 ((CH₃)₂-CH-CH₂-); 29.15-21.32 ((CH₃)₂-CH-CH₂-); 17.42-13.07 (CH₃-^{*}CH-C=O).

👉 *2-(4-isobutylphényl)-N-(p-tolyl) propanamide 1-A2*



Formule brute : C₂₀H₂₅NO.

Masse moléculaire : 295.42 g/mole.

Aspect physique : poudre blanc.

Point de fusion : 115°C.

Rendement chimique = de 94 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : R_f = 0.41. Eluant : CH₂Cl₂.
- HPLC chirale : Colonne : Chiralpak IA.6x250mm ; Isohexane / EtOH (95/5) ; avec un débit de 1mL/min ; tr: 9.2min et 11.15min.

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

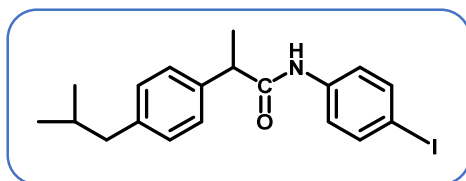
HRMS (ESI) m/z C₂₀H₂₅NO [M+H⁺]: 296.20071 calculé, 296.20089 trouvé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.23-7.16 (m, 4H_{arm}), 7.16 (bs, 1H amide), 7.07-7.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H_{arm}), 6.98-6.96 (d, J = 8.3 Hz, 2H_{arm}), 3.63-3.56 (q, J = 7.1 Hz, -^{*}CH-C=O, 1H),

2.39-2.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$), 2.19 (s, 3H, arm- CH_3); 1.82-1.69 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-(CH}_3)_2$), 1.50-1.48 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$), 0.83-0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2\text{-CH-(}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.58 (C=O amide); {140.99-138.22-135.43-133.74-129.81-129.36-127.44-119.78} (C=C aromatique); 47.63 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$); 45.04 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$); 33.98-30.21 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$); 25.63-25.00 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$); 22.42-20.85 ($-\text{CH}_3$); 18.57 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$).

 *N*-(4-iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl) propanamide 1-A3



Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{INO}$.

Masse moléculaire : 407.28 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 131°C.

Rendement chimique = 92 %.

 **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.82$. Eluant : CH_2Cl_2 .
- HPLC chirale : Colonne : Chiralpak IB, Méthode : Isohexane-EtOH 95/ 5. Débit : 1ml/min, $T_r = 9.87$ min et 13.80 min. Acquisition pour 20min.

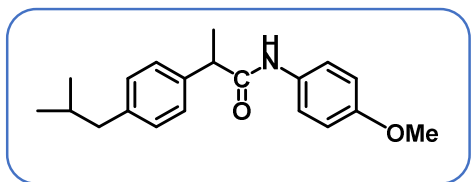
 **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{I}^{127}\text{NO}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 408.08187 calculé, 408.08188 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49-7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_{arm}), 7.24-6.93 (m, $6\text{H}_{\text{arm}}+1\text{H}_{\text{amide}}$), 3.63-3.56 (q, $J = 7.1$ Hz, $-\text{}^*\text{CH-C=O}$, 1H), 2.41-2.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$), 1.83-1.48 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-(CH}_3)_2$), 1.53-1.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$), 0.84-0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2\text{-CH-(}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 171.93 (C=O amide); {140.51-137.04-136.93-129.20-126.66-120.75} (C=C aromatique); 86.1(Ar-I); 47.04($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$);44.27 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$); 29.45 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$); 21.66 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$); 17.73 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$).

↳ 2-(4-isobutylphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)propanamide 1-A4



Formule brute : $C_{20}H_{25}NO_2$.

Masse moléculaire : 311.41 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 100°C.

Rendement chimique = 96 %.

✚ **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.64$. Eluant : CH_2Cl_2 .
- HPLC chirale : Colonne : ChiralpakIB , Méthode: Isohexane-EtOH 95/ 5. Débit : 1ml/min, $T_r = 9.47$ min et 11.52 min. Acquisition pour 20min.

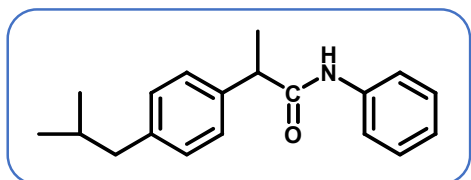
✚ **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $C_{20}H_{25}NO_2$ [$M+H^+$]: 312.19586 calculé, 312.19581trouvé.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28-7.20 (m, 4H_{arm}), 7.11-7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H_{arm}), 6.94 (bs, 1H_{amide}), 6.77-6.74 (m, 2H_{arm}), 3.71 (s, -O-CH₃), 3.66-3.59(q, $J = 7.2$ Hz, -*CH-C=O, 1H), 2.43-2.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.86-1.77 (m, 1H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.55-1.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃-*CH-C=O), 0.87-0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, -CH₂-CH-(CH₃)₂).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172.42 (C=O amide); { 156.29, 141.04, 138.19, 131.05, 129.84, 127.45, 121.49, 114.02 } (C=C aromatique); 55.47 (-O-CH₃); 47.57 ((CH₃)₂-CH-CH₂); 45.03 (CH₃-*CH-C=O); 30.20 ((CH₃)₂-CH-CH₂-); 22.40 ((CH₃)₂-CH-CH₂-); 18.54 (CH₃-*CH-C=O).

↳ 2-(4-isobutylphenyl)-N-phénylpropanamide 1-A5



Formule brute : $C_{19}H_{23}NO$.

Masse moléculaire : 281. 39 g/mole.

Aspect physique : poudre blanc.

Point de fusion : 151°C.

Rendement chimique = 95 %.

✚ **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.52$. Eluant : CH_2Cl_2 .
- HPLC chirale : Colonne : Chiralpak IB, Méthode : Isohexane-EtOH 95/ 5. Débit : 1ml/min, $T_r = 9.47$ min et 11.52 min. Acquisition pour 20min.

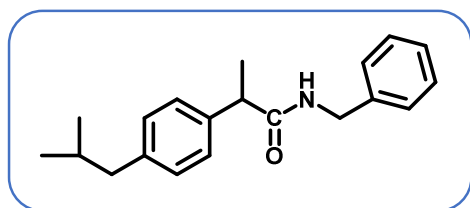
✚ **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]:304.1675 calculé, 304.16718 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.33 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H_{arm}), 7.22- 7.15 (m, $3\text{H}_{\text{arm}}+1\text{H}$ amide), 7.08-6.95 (m, 4 H_{arm}), 3.65-3.5 (q, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$, 1H), 2.41-2.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1.83-1.72 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1.52-1.5 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 0.84-0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.63 (C=O amide); {141.10-138.07-137.93-129.87-128.90-127.44-124.17-119.64} (C=C aromatique); 47.75 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2$); 45.03 ($\text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); 30.21 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2$); 22.40 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2$); 18.52($\text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$).

✚ ***N*-benzyl-2-(4-isobutylphenyl)propanamide I-A6**



Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}$.

Masse moléculaire : 295.42 g/mole.

Aspect physique : poudre blanc.

Point de fusion : 49°C .

Rendement chimique = 82 %.

✚ **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.21$. Eluant : CH_2Cl_2 .
- HPLC chirale : Colonne : Chiralpak IA, 4.6x250 mm; Isohexane/Ethanol : 95/5; avec un débit de 1mL/min. t_r : 15min et 20 min.

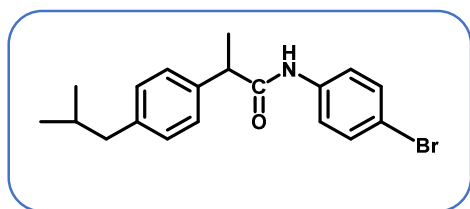
✚ **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]:318.1828 calculé, 318.18283 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.12 (m, 9H_{arm}), 5.66 (bs, 1H_{amide}), 4.43-4.41 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{HN}-\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 3.64-3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$, 1H), 2.49-2.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}$ -CH-(CH_3) $_2$), 1.91-1.82 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}$ -(CH_3) $_2$), 1.59-1.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$ - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 0.93-0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\underline{\text{CH}_3})_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 174.34 (C=O amide); {140.82-138.45-129.68-128.59-127.38-127.32} (C=C aromatique); 46.82 (HN- CH_2 -Ph); 45.00 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2); 43.51 (CH_3 - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); 30.20 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2 -); 22.38 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2 -); 18.45 (CH_3 - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$).

\rightarrow *N*-(4-bromophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide 1-A7



Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{BrNO}$.

Masse moléculaire : 360.28 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Pointe de fusion : 124°C .

Rendement chimique = 94 %.

\pm *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.85$. Eluant : CH_2Cl_2 .

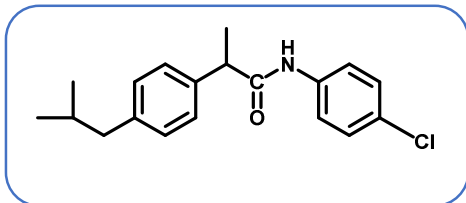
\pm *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{22}^{79}\text{BrNO}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 360.09582 calculé, 360.09575 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.51-7.10 (m, 8H_{arm}), 7.06 (bs, 1H_{amide}), 3.74-3.67 (q, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$, 1H), 2.51-2.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}$ -CH-(CH_3) $_2$), 1.93-1.84 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}$ -(CH_3) $_2$), 1.62-1.59 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$ - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 0.94-0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\underline{\text{CH}_3})_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.59 (C=O amide); {141.29-137.77-136.96-131.84-129.97-127.42} (C=C aromatique); 121.16 (Ar-Br); 47.78 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2); 45.01 (CH_3 - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); 30.19 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2 -); 22.39 ((CH_3) $_2$ -CH- CH_2 -); 18.46 (CH_3 - $^*\text{CH}-\text{C}=\text{O}$).

↪ *N*-(4-chlorophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide 1-A8



Formule brute : $C_{19}H_{22}ClNO$.

Masse moléculaire : 315,83 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 113°C.

Rendement chimique = 90 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.84$. Eluant : CH_2Cl_2 .

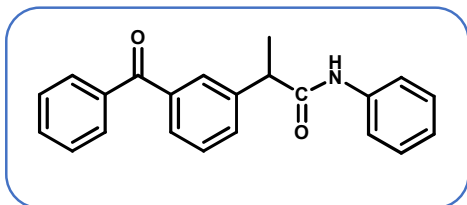
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $C_{19}H_{22}^{35}ClNO$ [$M+H^+$]: 316.14623 calculé, 316.14627 trouvé,

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.31-7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, $2H_{arm}$), 7.24-6.93 (ddd, , $J = 19.2$, 13.8, 8.2 Hz, $6H_{arm} + 1H_{amide}$), 3.65-3.58 (q, $J = 7.1$ Hz, $-^*CH-C=O$, 1H), 2.42-2.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$), 1.84-1.75 (m, 1H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$), 1.52-1.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, $CH_3-^*CH-C=O$), 0.85-0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-CH_2-CH-(CH_3)_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172.71 (C=O amide); {141.24-137.82-129.93-129.11- 128.88-127.40-120.93} (C=C aromatique); 136.48 (Ar-Cl); 47.70($(CH_3)_2-CH-CH_2$); 45.02 ($CH_3-^*CH-C=O$); 30.2 ($(CH_3)_2-CH-CH_2-$); 22.40 ($(CH_3)_2-CH-CH_2-$); 18.49 ($CH_3-^*CH-C=O$).

↪ *2*-(3-benzoylphényl)-*N*-phénylpropanamide 2-A1



Formule brute : $C_{22}H_{19}NO_2$.

Masse moléculaire : 329.38 g/mole.

Aspect physique : poudre blanc.

Point de fusion : 90°C.

Rendement chimique = 81%.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.11$. Eluant : CH_2Cl_2 .

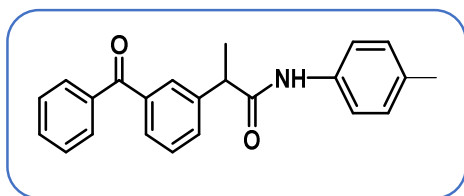
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z C₂₀H₂₅NO₂ [M+Na⁺]:318.1828 calculé, 318.18283 trouvé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (m_a, *J* = 13.8, 5.8 Hz, 4H), 7.58 – 7.38 (m_a, 5H), 7.22 (m_a, *J* = 36.5, 31.2 Hz, 5H), 6.98 (*J* = 7.4 Hz, NH, 1H), 3.69 (q, *J* = 7.0 Hz, *CH 1H), 1.49 (d, *J* = 7.1 Hz, CH-CH₃, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 196.75 (C=O Benzoyl-), 171.60 (C=O amide), {141.68, 138.09, 137.35, 135.25, 133.98, 132.64, 131.51, 130.08, 129.40, 129.31, 129.22, 128.91, 128.37, 119.90 } (18C,aromatique), 47.85 (CH-CH₃), 18.83 (CH-CH₃).

↪ *2-(3-benzoylphényl)-N-(p-tolyl)propanamide 2-A2*



Formule brute : C₂₃H₂₁NO₂.

Masse moléculaire : 343.40 g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 118 °C.

Rendement chimique = 68 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal :R_f= 0.11. Eluant : CH₂Cl₂.

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

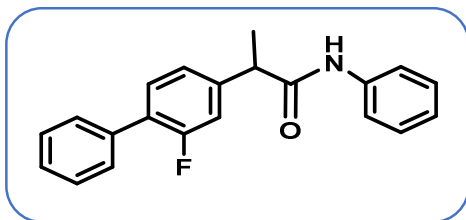
HRMS (ESI) m/z C₂₃H₂₁NO₂ [M+Na⁺]: 366.1465 calculé,366.14645 trouvé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.71 (m, 3H, 2H arm+ 1H amide), 7.64-7.50 (m, 3H arm), 7.43-7.38 (m, 3H arm), 7.27-7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2Harm), 7.03-7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 3.72-3.65(q, *J* = 7.1 Hz, 1H of C*), 2.22 (s, Ar-CH₃), 1.55-1.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H,CH₃-CH-CO).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ196.61 (C=O Benzoyl-); 171.60 (C=O amide); {, 156.83, 141.68, 138.09, 137.35, 135.25, 133.98, 132.64, 131.51, 130.08, 129.40, 129.31, 129.22,

128.91, 128.37, 119.90 } (C=C aromatique); 47.83 (CH₃-*CH-C=O); 25.59-24.94 (Ar-CH₃-); 18.84 (CH₃-*CH-C=O).

↪ 2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-phenylpropanamide 3-A1



Formule brute : C₂₁H₁₈NOF.

Masse moléculaire : 319.37g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 177°C.

Rendement chimique = 87 %.

✚ Caractéristiques chromatographiques :

- Rapport frontal :R_f = 0.48. Eluant :CH₂Cl₂.

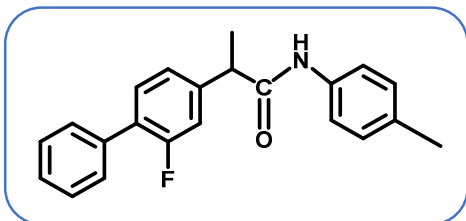
✚ Caractéristiques spectroscopiques :

HRMS (ESI) m/z C₂₁H₁₈F NO [M+H⁺]: 320.14450 calculé, 320.14452 trouvé.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.50-7.03 (m_a, 14H, 13H arm+ 1H amide), 3.70-3.63 (q, J = 7.1 Hz, 1H of C*), 1.57-1.55 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 170.69 (C=O amide); {141.43 (Ar-F)-136.81, 134.40, 130.47, 128.13, 128.09, 128.05, 127.64, 126.94, 123.62, 122.73, 118.96, 114.66, 114.35} (C=C aromatique); 46.78 (CH₃-*CH-C=O); 17.80 (CH₃-*CH-C=O).

↪ 2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-(p-tolyl)propanamide 3-A2



Formule brute : C₂₂H₂₀NOF.

Masse moléculaire : 333.4 g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 182°C.

Rendement chimique = 75 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.68$. Eluant : CH_2Cl_2 .

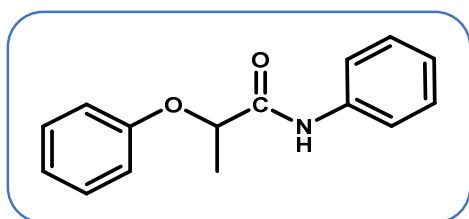
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FNO}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 334.16004 calculé, 334.16017 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49-7.01 (m_a, 13H, 12H arm+ 1H amide), 3.69-3.61 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H of C*), 2.22 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.56-1.54 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 171.50 (C=O amide); { 142.44 (Ar-F)-142.34, 135.31, 135.14, 134.13, 131.23, 129.46, 128.96, 128.92, 128.50, 127.78, 123.60, 119.96, 115.52, 115.21 } (C=C aromatique); 47.54 (CH_3 -*CH-C=O); 20.86 (Ar-CH₃); 18.68 (CH_3 -*CH-C=O).

↪ *2-phenoxy-N-phenylpropanamide 4-A1*



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$.

Masse moléculaire : 227. 28 g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 120°C .

Rendement chimique = 90 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.48$. Eluant : CH_2Cl_2 .

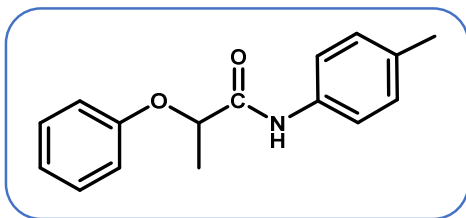
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 264.0996 calculé, 264.0995 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (bs, 1H, NH amide), 7.48-7.45 (m, 2H arm), 7.28-7.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H arm), 7.08-6.90 (t, m, 3H arm), 4.75-4.68 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 1.60-1.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.29 (C=O amide); {156.73 (Ar-O)-137.04, 129.94, 129.05, 124.71, 122.48, 119.96, 115.75} (C=C aromatic); 76.62 ($\text{CH}_3\text{-*CH-C=O}$); 18.77 ($\text{CH}_3\text{-*CH-C=O}$).

↪ 2-phenoxy-N-(p-tolyl) propanamide 4-A2



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_2$.

Masse moléculaire : 241.31 g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 117°C .

Rendement chimique = 91 %.

✚ Caractéristiques chromatographiques :

- Rapport frontal : $R_f = 0.41$. Eluant : CH_2Cl_2 .

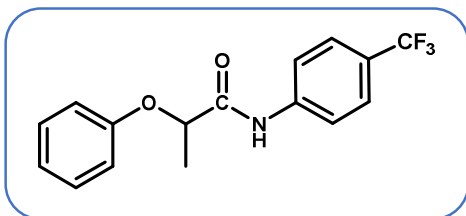
✚ Caractéristiques spectroscopiques :

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: 278.1154 calculé, 279.11515 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (bs, 1H, NH amide), 7.36-7.18 (m, 4H arm), 7.06-6.89 (m, 5H arm), 4.74-4.67 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 2.24 (s, 3H, Ar- CH_3), 1.59-1.57 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.15 (C=O amide); {156.78 (Ar-O)-134.50, 134.36, 129.92, 129.53, 122.42, 120.03, 115.75} (C=C aromatic); 75.49($\text{CH}_3\text{-*CH-C=O}$); 20.91 (Ar- CH_3); 18.77 ($\text{CH}_3\text{-*CH-C=O}$).

↪ 2-phenoxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide 4-A3



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{F}_3$.

Masse moléculaire : 295. 27 g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 123°C .

Rendement chimique = 89 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.11$. Eluant : CH_2Cl_2 .

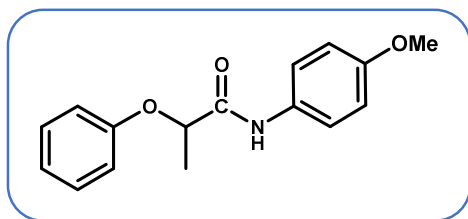
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]:332.0869 calculé, 332.08688 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.31 (bs, 1H, NH amide), 7.63-7.50 (dd, $J = 32.2$ & 8.6 Hz, 4H arm), 7.30-7.19 (dt, $J = 18.8$ & 12.1 Hz, 2H arm), 7.02-6.90 (m, 3H arm), 4.78-4.71(q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 2.24 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.61-1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H,CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.64 (C=O amide); {156.51 (Ar-O-)-140.10, 130.01, 126.33, 126.28, 122.71, 119.57, 115.80} (C=C aromatique); 75.44(CH₃-*CH-C=O); 18.60 (CH₃-*CH-C=O).

↪ *N-(4-methoxyphenyl)-2-phenoxypropanamide 4-A4*



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$.

Masse moléculaire : 241.3g/mole.

Aspect physique : cristaux blancs.

Pointe de fusion : 127°C.

Rendement chimique = 98 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

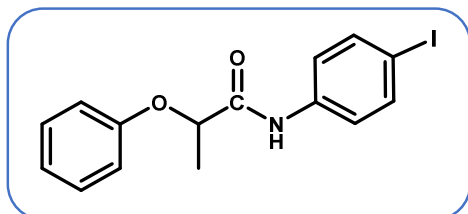
- Rapport frontal : $R_f = 0.50$. Eluant : CH_2Cl_2 .

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (bs, 1H, NH amide), 7.37-7.34 (m, 2H arm), 7.27-7.18 (m, 2H arm), 6.98-6.88 (m, 2H arm), 6.79-6.76 (m, 3H arm), 4.73-4.67(q, $J = 6.7$ Hz, 1H of C*), 3.70 (s, 3H, O-CH₃), 1.59-1.57 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H,CH₃-CH-CO).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.64 (C=O amide); {156.78 (Ar-O-)-156.68, 130.12, 129.91, 122.40, 121.79, 115.73, 114.17} (C=C aromatique); 75.44(CH_3 -*CH-C=O); 55.49(CH_3 -O-); 18.78 (CH_3 -*CH-C=O).

↪ *N*-(4-iodophenyl)-2-phenoxypropanamide 4-A5



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{I}$.

Masse moléculaire : 353.17g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 147°C.

Rendement chimique = 89 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.92$. Eluant : CH_2Cl_2 .

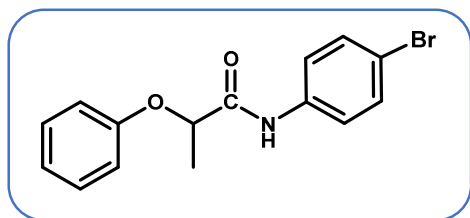
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{14}^{127}\text{INO}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 368.01409 calculé, 368.01420 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (bs, 1H, NH amide), 7.56-7.53 (m, 2H arm), 7.28-7.23 (m, 4H arm), 7.08-6.88 (m, 3H arm), 4.74-4.67(q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 1.59-1.56 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.35 (C=O amide); {156.58 (Ar-O-)-137.96, 136.85, 129.98, 122.61, 121.80, 115.79} (C=C aromatique); 88.00 (Ar-I); 75.46(CH_3 -*CH-C=O); 18.64 (CH_3 -*CH-C=O).

↪ *N*-(4-bromophenyl)-2-phenoxypropanamide 4-A6



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{Br}$.

Masse moléculaire : 306.17g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 132°C.

Rendement chimique = 88 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.88$. Eluant : CH_2Cl_2 .

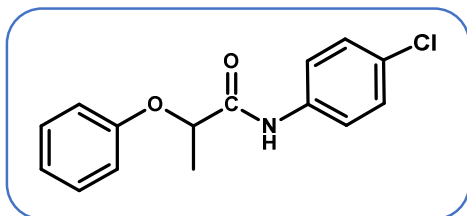
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{14}^{79}\text{BrNO}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 320.02809 calculé, 320.02807 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (bs, 1H, NH amide), 7.39-7.17 (m, 6H arm), 6.99-6.87 (m, 3H arm), 4.73-4.66(q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 1.58-1.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 -CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 169.13 (C=O amide); { 155.38 (Ar-O-)-134.94, 130.79, 121.39, 120.32, 116.11, 114.57 } (C=C aromatique); 128.77 (Ar-Br); 74.22 (CH_3 -*CH-C=O); 17.43 (CH_3 -*CH-C=O).

↪ *N-(4-chlorophényl)-2-phenoxypropanamide 4-A7*



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{Cl}$.

Masse moléculaire : 261.72g/mole.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 137°C .

Rendement chimique = 84 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques :*

- Rapport frontal : $R_f = 0.83$. Eluant : CH_2Cl_2 .

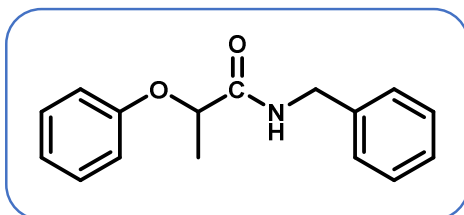
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{14}^{35}\text{ClNO}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 276.07867 calculé, 276.07858 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (bs, 1H, NH amide), 7.43-7.40 (m, 1H arm), 7.27-7.18(m, 4H arm), 6.99-6.87 (m, 3H arm), 4.73-4.66(q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 1.57-1.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 -CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.34 (C=O amide); {156.61 (Ar-O-)-135.65, 129.97, 129.69, 129.05, 122.59, 121.23, 115.78} (C=C aromatic); 135.65 (Ar-Cl); 75.42 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$); 18.65 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$).

↪ *N-benzyl-2-phénoxypropanamide 4-A8*



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_2$.

Masse moléculaire : 241.31 g/mole.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 220°C.

Rendement chimique = 68 %.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

- Rapport frontal : $R_f = 0.16$. Eluant : CH_2Cl_2 .

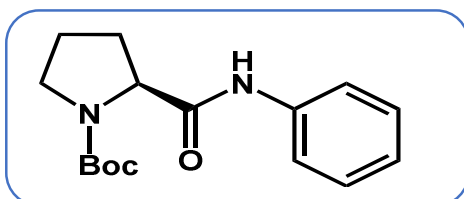
✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: 279.20659 calculé, 279.20635 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (bs, 1H, NH amide), 7.43-7.40 (m, 2H arm), 7.27-7.18 (m, 4H arm), 6.99-6.87 (m, 3H arm), 4.73-4.66 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H of C*), 1.57-1.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-CH-CO).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.34 (C=O amide); {156.61 (Ar-O-)-135.65, 129.97, 129.69, 129.05, 122.59, 121.23, 115.78} (C=C aromatic); 135.65 (Ar-Cl); 75.42 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$); 18.65 ($\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-C=O}$).

↪ *tert-butyl (S)-2-(phénylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A1*



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 187°C.

Rendement chimique = 52 %.

✚ Caractéristiques chromatographiques

- Rapport frontal : $R_f = 0.28$. Eluant : (80 l'éther de pétrole / 20 Acétate d'éthyle).

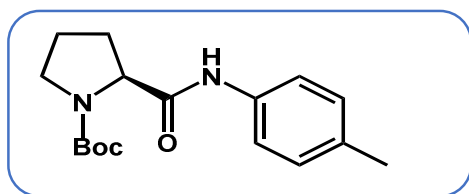
✚ Caractéristiques spectroscopiques :

HRMS (ESI) m/z $C_{16}H_{22}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 291.17023 calculé, 291.17032 trouvé.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.49(bs, 1H, NH amide), 7.54-7.51(dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, 2H arm), 7.30-7.28(m, 2H arm), 7.08 (bs, 1H arm), 4.48 (bs, -N-*CH-C=O, 1H), 3.46(bs, -N-CH₂-, 2H), 2.52-1.80 (m, 4H), 1.50 (s, 9H, -N-Boc).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.96 (C=O amide); 156.56 (-N-C=O); {138.39, 128.92, 123.87, 119.65} (C=C aromatique); 80.90(-O-C-Me₃); 60.55 (-N-*CH-C=O); 47.22 (-CH₂-N-); 28.39 (-CH₃)₃-); 27.11 (-CH₂-*CH-); 24.57(-CH₂-CH₂-CH₂).

👉 *tert-butyl (S)-2-(p-tolylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A2*



Formule brute : $C_{17}H_{24}N_2O_3$.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 181°C.

Rendement chimique = 72 %.

✚ Caractéristiques chromatographiques

- Rapport frontal : $R_f = 0.28$. Eluant : (80 l'éther de pétrole / 20 Acétate d'éthyle).

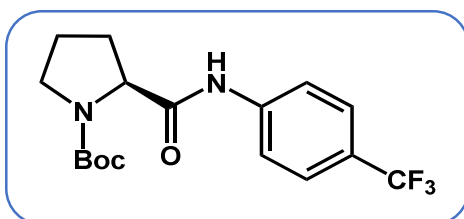
✚ Caractéristiques spectroscopiques :

HRMS (ESI) m/z $C_{17}H_{24}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 305.18571 calculé, 305.18597 trouvé.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.37(bs, 1H, NH amide), 7.42-7.10(m, 4H arm), 4.46 (bs, -N-*CH-C=O, 1H), 3.46(bs, -N-CH₂-, 2H), 2.52-1.94 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 2.32 (s, Ar-CH₃), 1.50 (s, 9H, -N-Boc).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 169.96 (C=O amide); 156.56 (-N-C=O); {138.39, 128.92, 123.87, 119.65} (C=C aromatique); 80.90(-O-C-Me₃); 60.55 (-N-*CH-C=O); 47.22 (-CH₂-N-); 33.74 (CH₃-Ar) 28.39 (-CH₃); 27.11 (-CH₂-*CH-); 24.57(-CH₂-CH₂-CH₂).

tert-butyl (S)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate
5-A3



Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 200°C.

Rendement chimique = 72 %.

Caractéristiques chromatographiques

- Rapport frontal : $R_f = 0.35$. Eluant : (80 l'éther de pétrole / 20 Acétate d'éthyle).

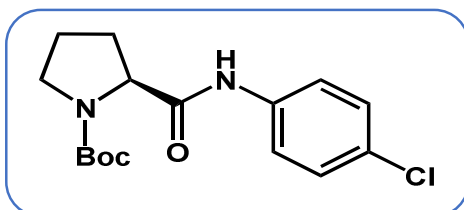
Caractéristiques spectroscopiques :

HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 359.15763, 359 calculé.15770 trouvé.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 9.92 (bs, 1H, NH amide), 7.59-7.46(m, 4H arm), 4.53 (bs, -N-*CH-C=O, 1H), 3.53-3.42(m, -N-CH₂-, 2H), 2.42-1.96 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 1.52 (s, 9H, -N-Boc).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.79 (C=O amide); 156.33 (-N-C=O); {166.75, 141.56, 129.52, 122.32, 118.99, 100.24} (C=C aromatique); 125.92(-C-F₃); 81.04(-O-C-Me₃); 60.58 (-N-*CH-C=O); 47.30 (-CH₂-N-); 28.40 (-CH₃); 27.68 (-CH₂-*CH-); 24.53(-CH₂-CH₂-CH₂).

tert-butyl (S)-2-((4-chlorophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A4



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_3$.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 185°C.

Rendement chimique = 58%.

✚ **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.28$. Eluant : (80 l'ether de pétrole / 20 Acétate d'éthyle).

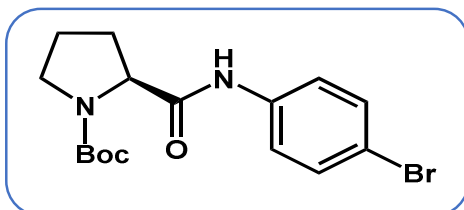
✚ **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $C_{16}H_{21}^{35}ClN_2O_3[M+H^+]$: 325.13137 calculé, 325.13135 trouvé.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.66 (bs, 1H, NH amide), 7.45-7.21(m, 4H arm), 4.48 (bs, -N-*CH-C=O, 1H), 3.50-3.40 (m, -N-CH₂-, 2H), 2.43-1.80 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 1.50 (s, 9H, -N-Boc).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.21 (C=O amide); 156.34 (-N-C=O); {128.74, 120.69} (C=C aromatique); 137.05(-C-Cl); 80.94(-O-C-Me₃); 60.49 (-N-*CH-C=O); 47.26 (-CH₂-N-); 28.40 (-CH₃)₃-); 27.65 (-CH₂-*CH-); 24.55(-CH₂-CH₂-CH₂).

✚ *tert-butyl (S)-2-((4-bromophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A5*



Formule brute : $C_{16}H_{21}BrN_2O_3$.

Aspect physique : cristaux blanc.

Point de fusion : 193°C.

Rendement chimique = 60%.

✚ **Caractéristiques chromatographiques :**

- Rapport frontal : $R_f = 0.28$. Eluant : (80 l'ether de pétrole / 20 Acétate d'éthyle).

✚ **Caractéristiques spectroscopiques :**

HRMS (ESI) m/z $C_{16}H_{21}^{79}BrN_2O_3[M+Na^+]$: 391.06278 calculé, 391.06272 trouvé.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.68 (bs, 1H, NH amide), 7.39-7.28(m, 4H arm), 4.48 (bs, -N-*CH-C=O, 1H), 3.49-3.40 (m, -N-CH₂-, 2H), 2.37-1.89 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 1.50 (s, 9H, -N-Boc).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.26 (C=O amide); 156.34 (-N-C=O); {137.51, 131.70, 121.04, 116.17} (C=C aromatique); 121.40(-C-Br); 80.96(-O-C-Me₃); 60.53 (-N-*CH-C=O); 47.27 (-CH₂-N-); 28.40 (-CH₃); 27.69 (-CH₂-*CH-); 24.53(-CH₂-CH₂-CH₂).

Chapitre V

O-Acylation enzymatique du 1-phényl éthanol versus N-Acylation enzymatique du 1-phényléthylamine : Impact d'acides gras comme agents acylants verts

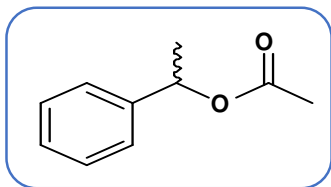
➤ Procédure générale d'acylation chimique des alcools racémiques :

Dans un ballon muni d'un barreau aimanté, on dispose 5mmoles d'alcool racémique, 0.5éq de DMAP (soit 0.061g) et 6éq. de Et₃N (soit 0.6g) dissout dans 30 mL d'éther anhydre ; on y ajoute goutte à goutte 7.5éq. d'anhydride acétique (soit 0.76g). La réaction se déroule sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince CCM. Après la consommation complète de l'alcool initial, on dilue la solution dans l'éther sec, en lavant successivement avec une solution d'HCl 1N (3x40ml) pour éliminer l'excès de l'amine, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ (3x40ml) et à la fin avec une solution saturée de NaCl (3x40ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée sur célite et évaporée sous vide. L'organigramme suivant explique les étapes de traitement.

➤ Dédoublage cinétique par acylation enzymatique du rac-phényléthanol :

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté, 1mmole du phényléthanol racémique et 2 mmoles d'acides carboxyliques comme agent acylant sont ajoutés à des quantités adéquates d'enzymes : *CAL-B* (50mg), *PCL* (100mg), *CRL* (100mg), dans 5mL de solvant organique. Le mélange est soumis à une agitation magnétique à 45°C durant 24h. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. La solution est ensuite filtrée pour éliminer l'enzyme. L'alcool qui n'a pas réagi et l'acétate obtenus ont été séparés par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle: 90/10). Les excès énantiomériques ont été déterminés par des analyses GC chirales.

↳ *rac-1-phényl éthyl acétate 6a*



Formule brute : $C_{10}H_{12}O_2$.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

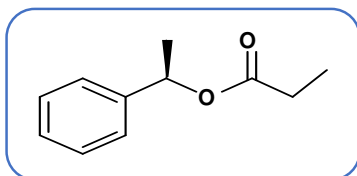
- Rapport frontal : $R_f = 0.80$. Eluant : (90 l'ether de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33-7.25 (m, $5H_{arm}$), 5.91-5.84 (q, CH_3 -* CH -CO, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.03 (s, CH_3 - C=O, 1H), 1.53-1.50 (d, CH_3 -* CH -CO, $J = 6.6$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.26 (C=O), 141.75(C=C-*C aromatique), {128.53, 127.89, 126.12 (C=C aromatique), 72.31 (-* CH -O-), 22.23 (-O-* CH - CH_3), 21.31(O=C- CH_3).

↳ *(R)-1-phényl éthyl propionate 6b*



Formule brute : $C_{11}H_{14}O_2$.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

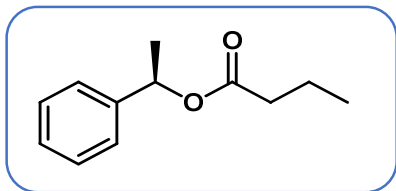
- Rapport frontal : $R_f = 0.78$. Eluant : (90 l'ether de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 – 7.17 (m, $5H_{arm}$), 5.92 (q, CH_3 -* CH -O, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.46-2.31 (t, CH_2 -CO, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.56 (d, CH_3 -CH-O, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.17 (t, CH_2 - CH_3 , $J = 7.6$, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 173.71 (C=O); 141.86 (C=C-*C aromatic); 128.48,127.80,126.04(C=C aromatic); 72.08(*C); 27.88 (-CO-CH₂); 22.29 (*CH-CH₃); 9.10(CH₂-CH₃).

↳ (R)-1-phényl éthyl butyrate 6c



Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ Caractéristiques chromatographiques

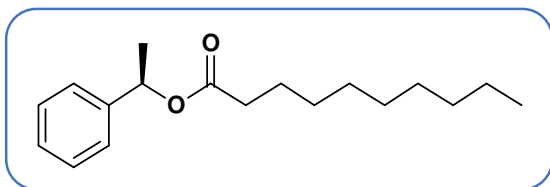
- Rapport frontal : $R_f = 0.80$. Eluant : (90 l'ether de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ Caractéristiques spectroscopiques :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29 – 7.16 (m, 5H_{arm}), 5.82 (q, CH₃-CH-, $J = 6.6\text{Hz}$, 1H), 2.28-2.18 (t, CH₂-CO, $J = 8.0\text{Hz}$, 2H), 1.66 – 1.50 (m, CH₂-CH₂-CO, 2H), 1.45 (d, CH₃-CH-, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H), 0.85 (t, CH₂-CH₃, $J = 7.4$, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.92 (C=O), 141.86 (C=C-*C aromatique), 128.47, 127.78, 126.06(C=C aromatique), 72.01 (*C), 36.51 (-CO-CH₂), 22.30 (-CO-CH₂-CH₂), 18.47 (*CH-CH₃), 13.65 (CH₂-CH₃).

↳ (R)-1-phényl éthyldécanoate 6d



Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_2$.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ Caractéristiques chromatographiques

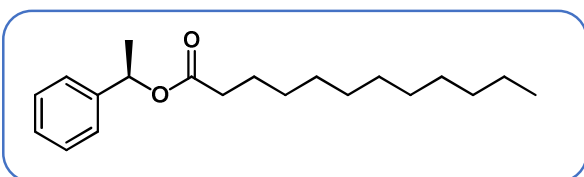
- Rapport frontal : $R_f = 0.86$. Eluant : (90 l'ether de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 – 7.17 (m, 5H_{arm}), 5.82 (q, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 1H), 2.25 (t, CH₂-CO, J = 7.9, 7.4 Hz, 2H), 1.60 – 1.51 (m, CH₂-CH₂-CO, 2H), 1.46 (d, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 3H) 1.18 (s, (CH₂)₆-CH₃ 12H), 0.80 (t, CH₂-CH₃, J = 6.7, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173.11 (C=O), 141.86 (C=C-*C aromatique), 128.46-126.06 (5C, C=C aromatique), 71.99 (-*C), 34.64 (-CO-CH₂), 31.87 (-CO-CH₂-CH₂), 29.42, 29.11 (CH₂)₄CH₂-CH₂-CO), 24.99 (*CH-CH₃), 22.67 (CH₂-CH₂-CH₃), 22.28 (CH₂-CH₂-CH₃), 14.12 (CH₂-CH₂-CH₃).

↪ *1-phényl éthylododécanoate 6e*



Formule brute : C₂₀H₃₂O₂.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

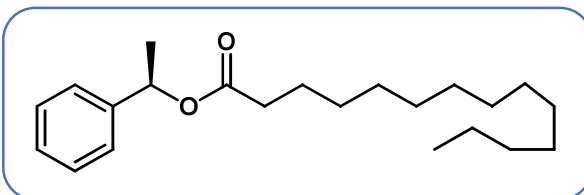
- Rapport frontal : R_f = 0.90. Eluant : (90 l'ether de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 – 7.18 (m, 5H_{arm}), 5.83 (q, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 1H), 2.25 (t, CH₂-CO, J = 7.9, 7.4 Hz, 2H), 1.62 – 1.49 (m, CH₂-CH₂-CO, 2H), 1.46 (d, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 3H) 1.19 (s, (CH₂)₈-CH₃ 16H), 0.82 (t, CH₂-CH₃, J = 6.7, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173.09 (C=O), 141.86 (C=C-*C aromatique), 128.46-126.06 (5C, C=C aromatique), 71.99 (-*C), 34.64 (-CO-CH₂), 31.93 (-CO-CH₂-CH₂), 29.61, 29.12 (CH₂)₆CH₂-CH₂-CO), 24.99 (*CH-CH₃), 22.71 (CH₂-CH₂-CH₃), 22.28 (CH₂-CH₂-CH₃), 14.14 (CH₂-CH₂-CH₃).

↪ *(R)-1-phényl éthyltétradécanoate 6f*



Formule brute : C₂₂H₃₆O₂.

Aspect physique : Huile transparente.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

- Rapport frontal :R_f = 0.88. Eluant : (90 l'éther de pétrole / 10 Acétate d'éthyle).

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39– 7.28 (m, 5H_{arm}), 5.92 (q, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 1H), 2.35 (t, CH₂-CO, J = 7.9, 7.4 Hz, 2H), 1.69 – 1.61 (m, CH₂-CH₂-CO, 2H), 1.55 (d, CH₃-CH-, J = 6.6 Hz, 3H) 1.28 (s, (CH₂)₈-CH₃ 20H), 0.91 (t, CH₂-CH₃, J = 6.7, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173.10 (C=O), 141.86 (C=C-*C aromatique), 128.46-126.06 (5C, C=C aromatique), 71.99 (-*C), 34.63 (-CO-CH₂), 31.94 (-CO-CH₂-CH₂), 29.86, 29.06 (CH₂)₆CH₂-CH₂-CO), 24.99 (*CH-CH₃), 22.71-22.27 (-CH₂)₄-CH₃), 14.26 (CH₂-CH₂-CH₃).

➤ Procédure générale de synthèse des amides racémiques (2a, 2c, 2d)

Dans un petit ballon on a fait agité un mélange de *rac*-phényléthylamine (1 éq.) et de l'ester d'énol approprié (2 éq.) à température ambiante. Après consommation complète de l'aminé, on a concentré le mélange réactionnel brut sous vide et l'amide a été directement obtenu pur. Si ce n'était pas le cas, un simple traitement acide était nécessaire pour purifier l'acétamide obtenu.

➤ Procédure générale de synthèse des amides racémiques (2b, 2e)

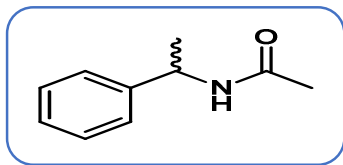
Une 1 mmol de *rac*-phényléthylamine *rac*-2 (1 éq.) dissoute dans 20 mL de CHCl₃, 2 éq. de l'acide carboxylique approprié a été ajouté, suivi par l'ajout de 1,1 mmol de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 5 heures. Le solvant a été éliminé sous vide et le mélange réactionnel brut a été purifié par Chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) pour donner l'amide correspondant.

➤ Procédure générale de la N-acylation enzymatique:

Dans un petit ballon, on dispose 1 mmole de la *rac*-phényléthylamine et de 1 mmole d'acide carboxylique dissous dans 2 mL d'heptane, on introduit 50 mg des tamis moléculaires 4Å et 50 mg de CAL-B immobilisé. Le mélange réactionnel est agité à 80 ° C pendant 72 heures. Le

mélange réactionnel a été filtré et concentré sous vide. L'amine restante et l'amide produit ont été séparés par extraction acido-basique (HCl/NaOH).

↳ *N*-(1-phényl éthyl) acétamide 7a



Formule brute : $C_{10}H_{13}NO$.

Aspect physique : cristaux marron.

Point de fusion : 56- 57°C.

Rendement chimique =92%.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

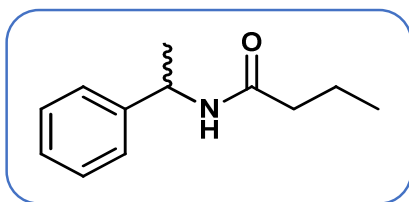
- Rapport frontal : $R_f = 0.26$. Eluant : (98% CH_2Cl_2 /2%MeOH).
- HPLC chirale :Colonne : Chiralpack IA, 4.6x250 mm ; Isohexane/Ethanol : 90/10 ; avec un débit de 1mL/min. tr :5.72 min et 6.55 min.

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 – 7.26 (m, 5 H_{arom}), 6.27 (s, NH, 1H), 5.16 – 5.06 (q, CH_3 -*CH-CO, 1H), 1.96 (s, CH_3 -CO, 2H), 1.52- 1.49 (d, CH_3 -*CH-CO, $J = 6.9$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.33 (C=O amide), 143.26 (C=C- *C aromatique), 128.62, 127.3, 126.19(C=C aromatique), 48.84 (-HN- *C), 21.74 (CO- CH_2 - CH_2), 23.28 (- *CH- CH_3), 21.78 (CH_3 -CO).

↳ *N*-(1-phényl éthyl) butylamide 7b



Formule brute : $C_{12}H_{17}NO$.

Aspect physique : poudre blanc.

Point de fusion : 35- 36°C.

Rendement chimique =88%.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

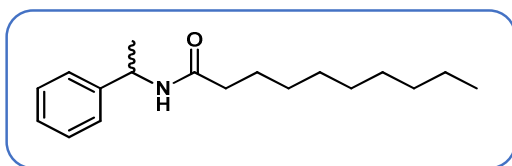
- Rapport frontal : $R_f = 0.38$. Eluant : (98% CH_2Cl_2 /2%MeOH).
- HPLC chirale :Colonne : Chiralpack IA, 4.6x250 mm ; Isohexane/Ethanol : 90/10 ; avec un débit de 1mL/min. tr=5.19 min; tr= 5.89 min.

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.24 (m, 5H_{arm}), 5.81 (s, NH, 1H), 5.25 – 5.07 (q, CH_3 -*CH-CO, 1H), 2.23 – 2.10 (t, CH_2 - CH_2 -CO, 2H), 1.66 (m, CH_3 - CH_2 - CH_2 -CO, $J = 14.7, 7.4$ Hz, 2H), 1.50 (d, CH_3 -*CH-CO, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.95 (t, CH_3 - CH_2 -CO, $J = 7.4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.05 (C=O amide), 143.29 (C=C-*C aromatique), 128.6, 127.4, 126.3 (C=C aromatique), 48.57 (-HN-*C), 38.76 (-CO- CH_2 - CH_2); 21.74 (CO- CH_2 - CH_2), 19.19 (*CH- CH_3), 13.74 (- CH_2 - CH_3).

N-(1-phényl éthyl) décanamide 7d



Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{ON}$.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 34- 44°C.

Rendement chimique = 85%.

Caractéristiques chromatographiques

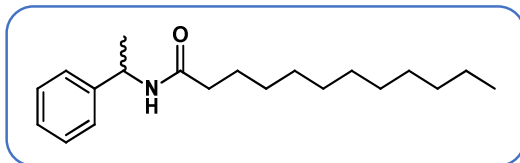
- Rapport frontal : $R_f = 0.70$. Eluant : (98% CH_2Cl_2 /2% MeOH).
- HPLC chirale : Colonne : Chiralpack IA, 4.6x250 mm ; Isohexane/Ethanol : 90/10 ; avec un débit de 1 mL/min. $t_r = 4.97$ min; $t_r = 5.76$ min.

Caractéristiques spectroscopiques :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.38 – 7.25 (m, 5H_{arm}), 5.82 (d, NH, $J = 6.7$ Hz, 1H), 5.16 (q, CH_3 -*CH-, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.22 (t, CH_2 -CO, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.70-1.58 (dd, CH_2 - CH_2 -CO, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.49 (d, CH_3 -*CH-, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.27 (s, -(CH_2) $_6$ - CH_3 , 12H), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, -(CH_2) $_6$ - CH_3 , 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.26 (C=O amide); 143.27 (C=C-*C aromatique); 128.76, 127.38, 125.98 (C=C aromatique); 48.58 (-HN-C); 36.88 (-CO- CH_2); 31.86 (CH_2 - CH_2 -CO), 29.42 ((CH_2) $_4$ - CH_2 - CH_2 -CO), 25.78 (CH_2 - CH_2 - CH_3), 22.67 (CH_3 -CH-NH); 21.71 (- CH_2 - CH_3); 14.12 (CH_2 - CH_3).

↪ *N*-(1-phényl éthyl) dodécanamide 7e



Formule brute : $C_{20}H_{33}ON$.

Aspect physique : poudre blanche.

Point de fusion : 59- 60°C.

Rendement chimique =84%.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

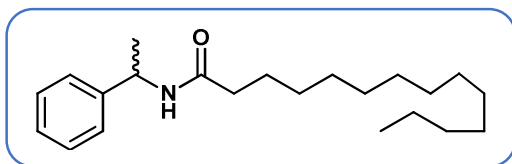
- Rapport frontal : $R_f = 0.77$. Eluant : (98% CH_2Cl_2 /2%MeOH).
- HPLC chirale :Colonne : Chiralpack IA, 4.6x250 mm ; Isohexane/Ethanol : 90/10 ; avec un débit de 1mL/min. $t_r=4.78$ min; $t_r= 5.53$ min.

✚ *Caractéristiques spectroscopiques :*

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36 – 7.26 (m , $5H_{arm}$), 5.74 (d, NH, $J = 6.7$ Hz , 1H), 5.16 (q, CH_3 -*CH-, $J = 7.0$ Hz , 1H), 2.24 (t, $CH_2=CO$, 2H), , 1.63 (dd, CH_2-CH_2-CO , $J = 14.4, 7.1$ Hz, 2H), 1.51 (d, CH_3 -*CH-, $J = 6.9$ Hz, 3H) , 1.27 (16H,-(CH_2) $_8$ - CH_3), 0.90 (t,(CH_2) $_8$ - CH_3 , $J = 6.7$, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172.38 (C=O amide);143.16 (C=C-*C aromatique); 128.5,126.77,126.3(C=C aromatique); 48.68 (-HN-*C); 36.81 (-CO- CH_2); 31.91 (CH_2-CH_2-CO), 29.61-29.27 ((CH_2) $_6$ - CH_2-CH_2-CO), 25.80($CH_2-CH_2-CH_3$),22.69 ($CH_3-CH-NH$); 21.69(- CH_2-CH_3); 14.13 (CH_2-CH_3).

↪ *N*-(1-phényl éthyl) tétradécanamide 7f



Formule brute : $C_{22}H_{37}ON$.

Aspect physique : poudre blanche.

Pointe de fusion : 63- 64°C.

Rendement chimique =82%.

✚ *Caractéristiques chromatographiques*

- Rapport frontal : $R_f = 0.81$. Eluant : (98% CH_2Cl_2 /2%MeOH).
- HPLC chirale :Colonne : Chiralpack IA, 4.6x250 mm ; Isohexane/Ethanol : 90/10 ; avec un débit de 1mL/min. $t_r=4.78$ min; $t_r= 5.53$ min.

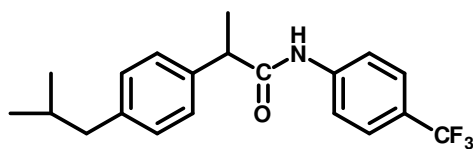
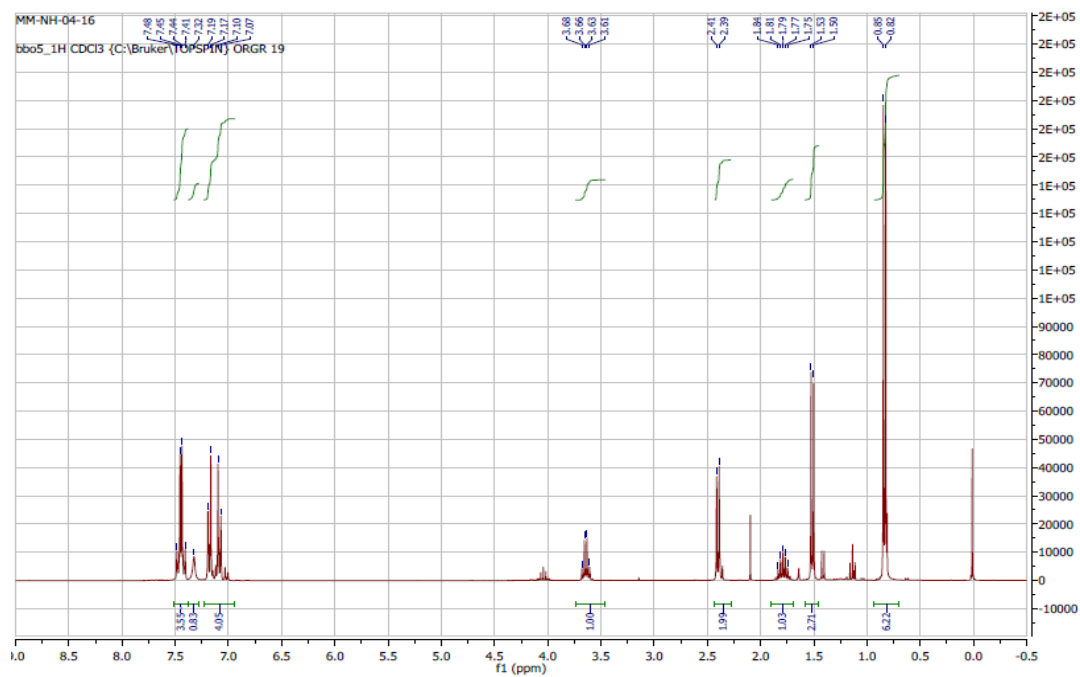
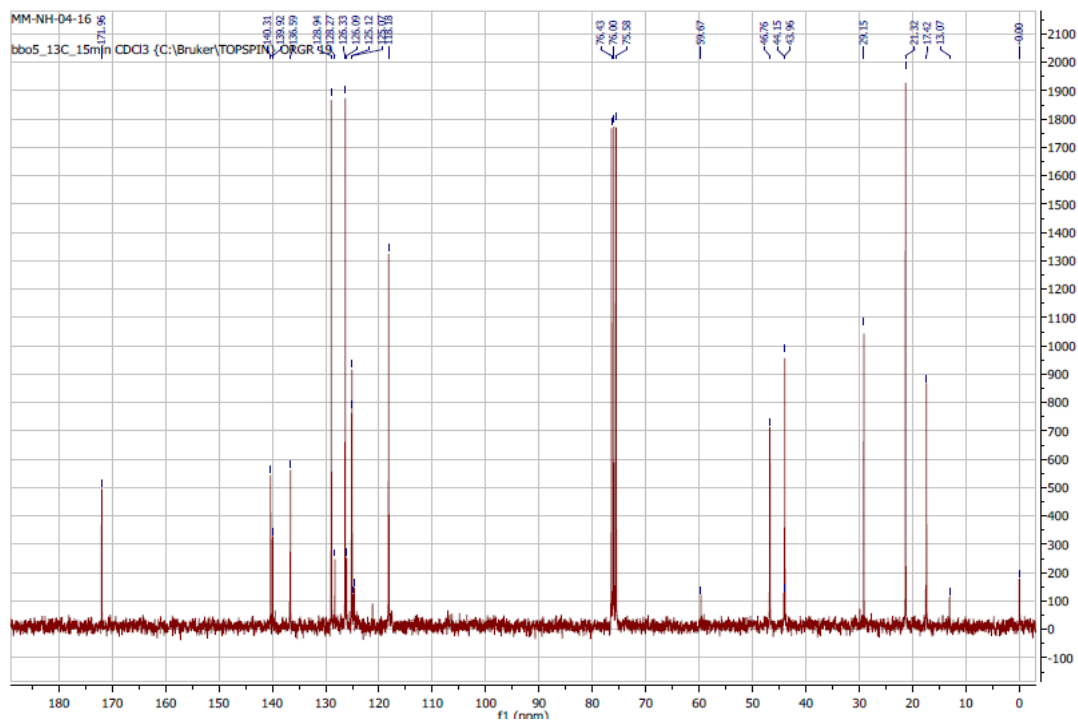
✚ Caractéristiques spectroscopiques :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.17 (m, 5H_{arm}), 6.04 (d, NH, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.15 (q, $\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-}$, $J = 7.7, 7.1$ Hz, 1H), 2.17 (t, $\text{CH}_2=\text{CO}$, $J = 8.0$ Hz, 2H), , 1.65 (dd, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.49 (d, $\text{CH}_3\text{-}^*\text{CH-}$, $J = 6.9$ Hz, 3H) , 1.28 (20H, $\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$), 0.90 (t, $\text{(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$, $J = 7.0$, 3H).

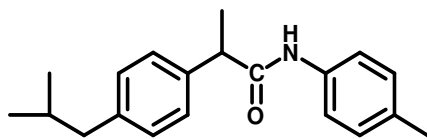
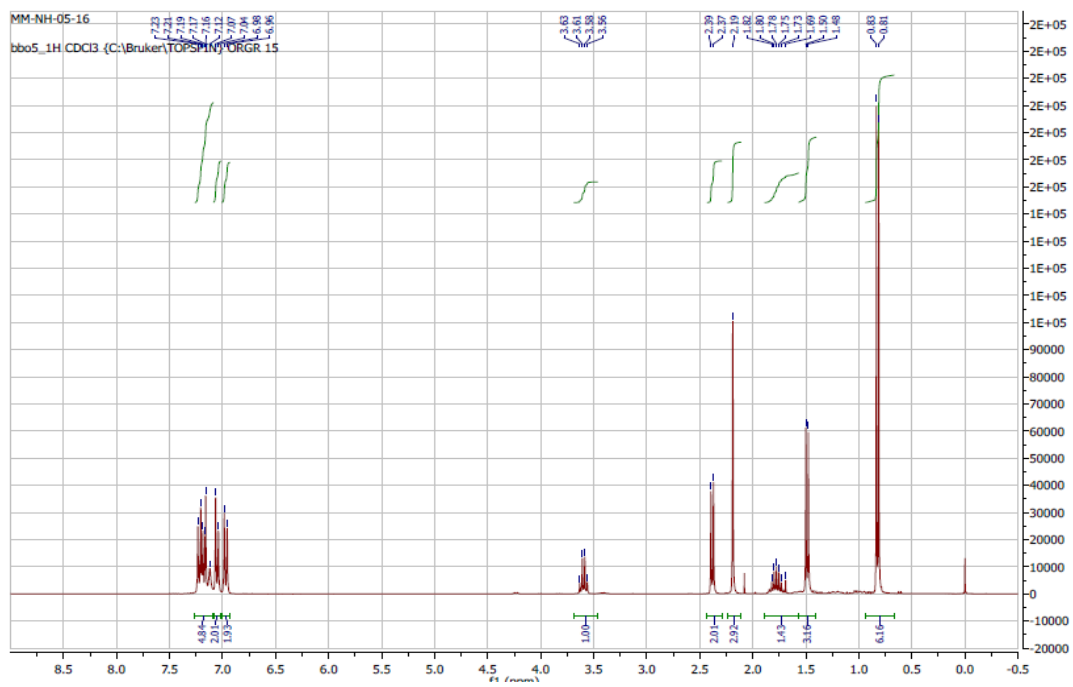
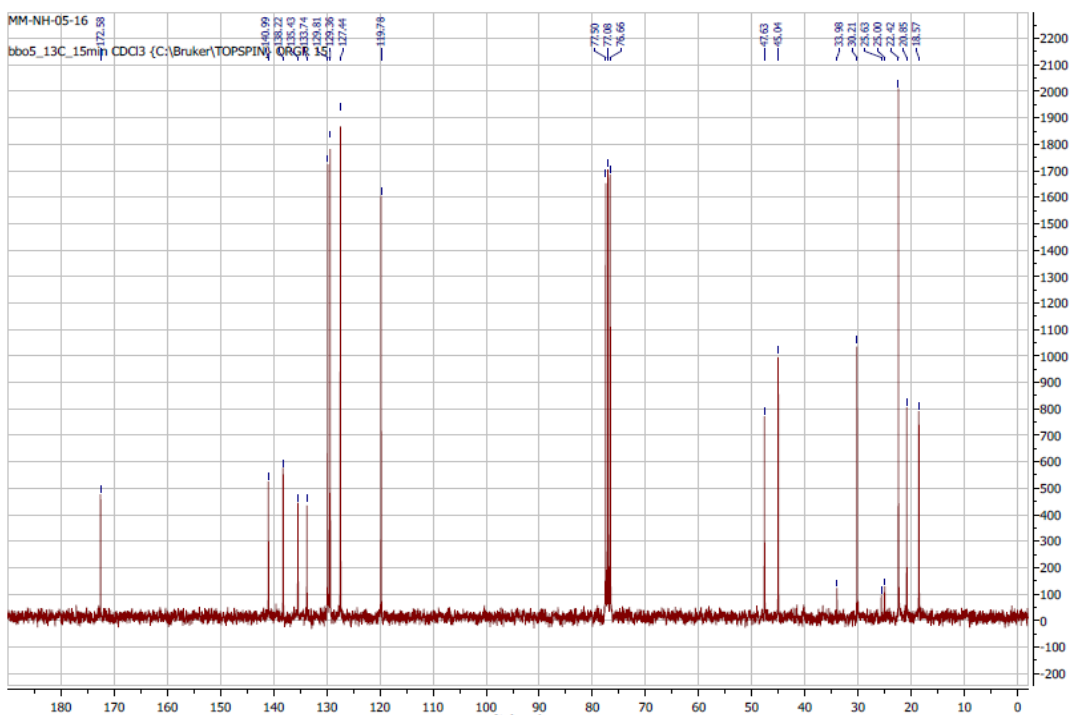
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.22 (C=O amide); 143.43 (C=C- $^*\text{CH}$ aromatique); 128.5, 127.2, 126.3 (C=C aromatique); 48.51 (-HN- $^*\text{C}$); 36.84 (-CO- CH_2); 31.93 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 29.49 ($\text{(CH}_2\text{)}_8\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 25.80 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 22.69 ($\text{CH}_3\text{-CH-NH}$); 21.76 ($\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 14.12 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

Annexe 1 : *Spectres RMN*

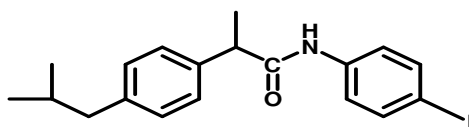
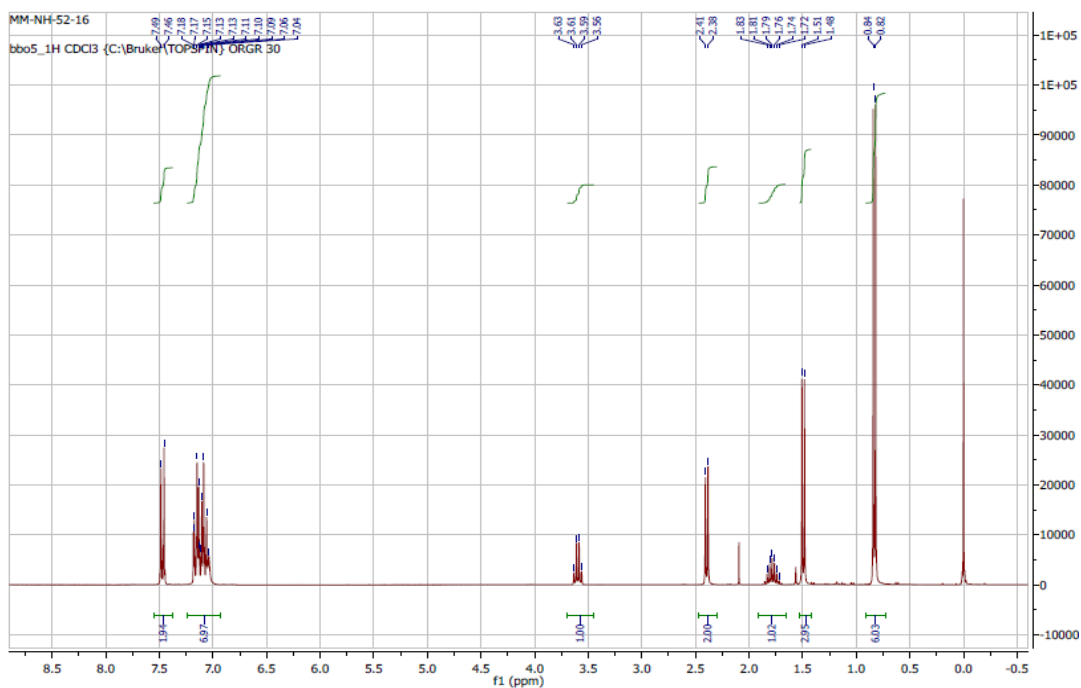
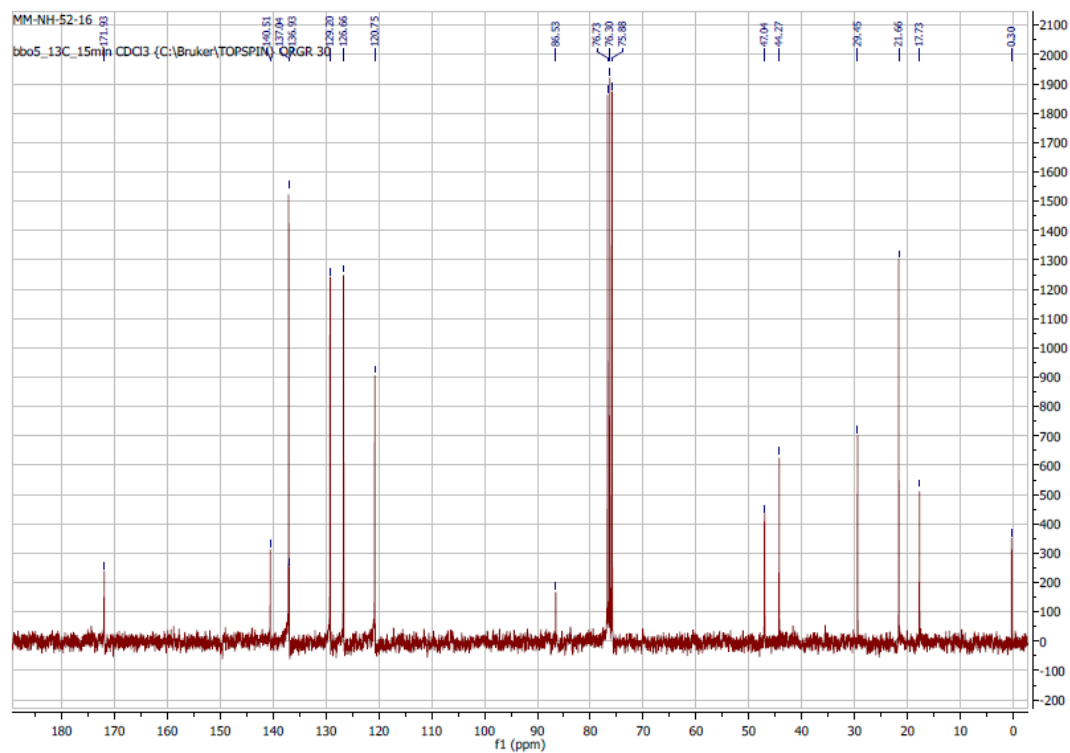
2-(4-isobutylphenyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide 1-A1

RMN ¹HRMN ¹³C

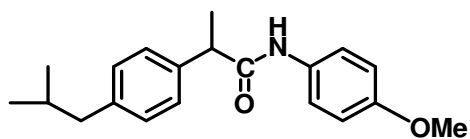
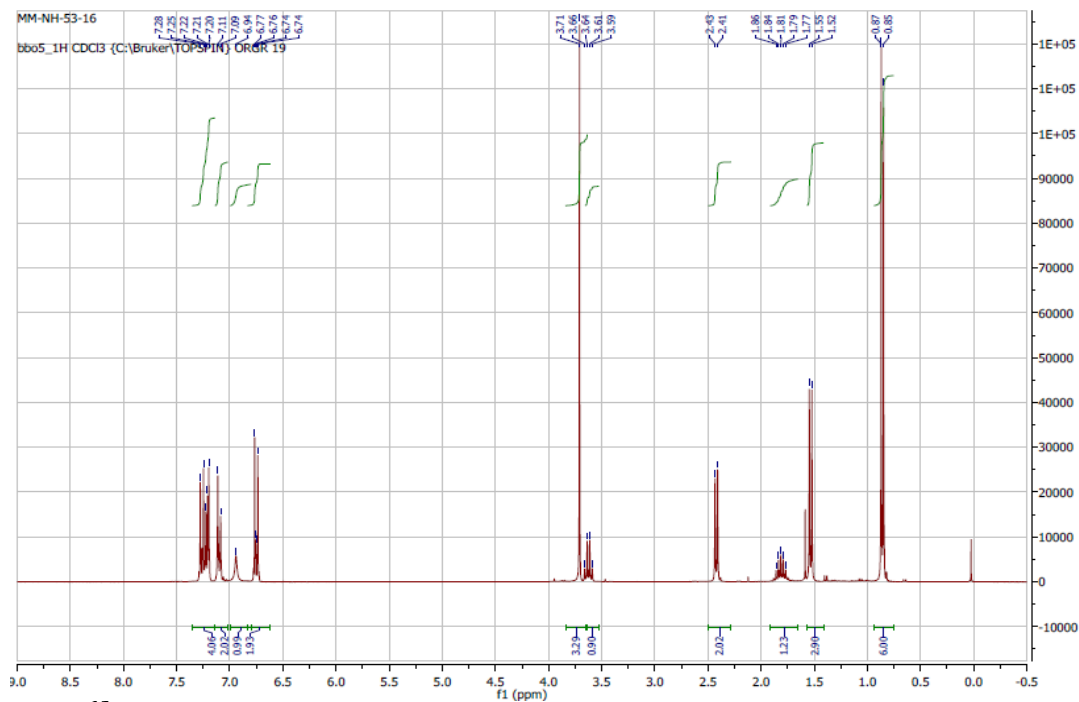
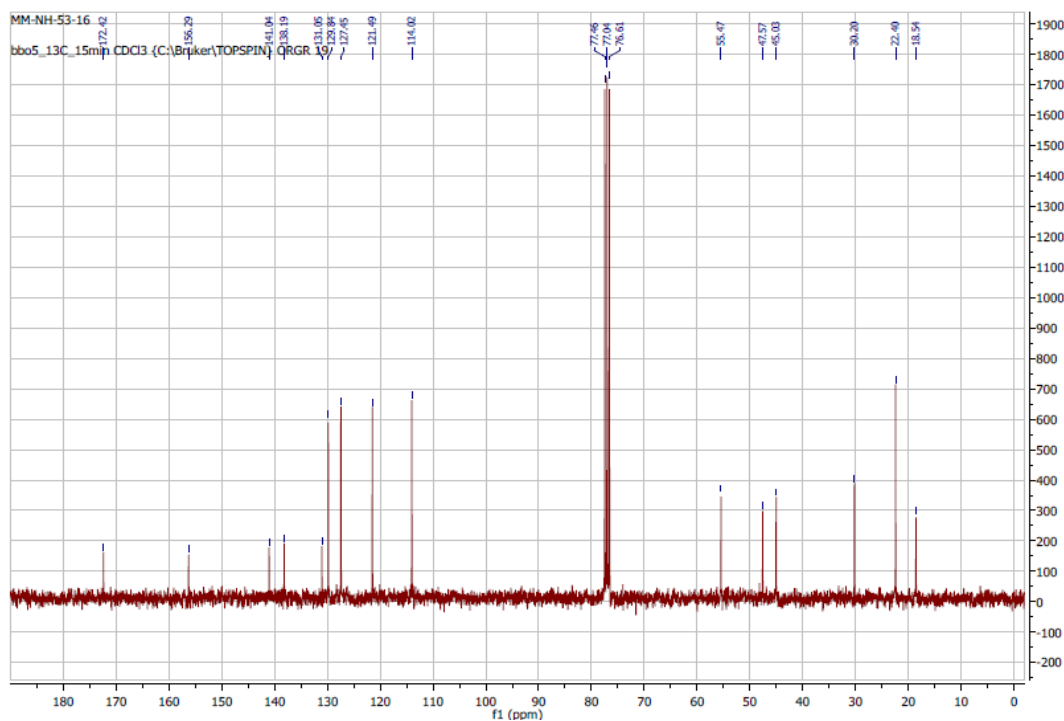
2-(4-isobutylphenyl)-N-(p-tolyl)propanamide 1-A2

RMN ^1H RMN ^{13}C 

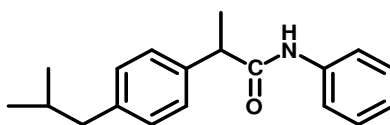
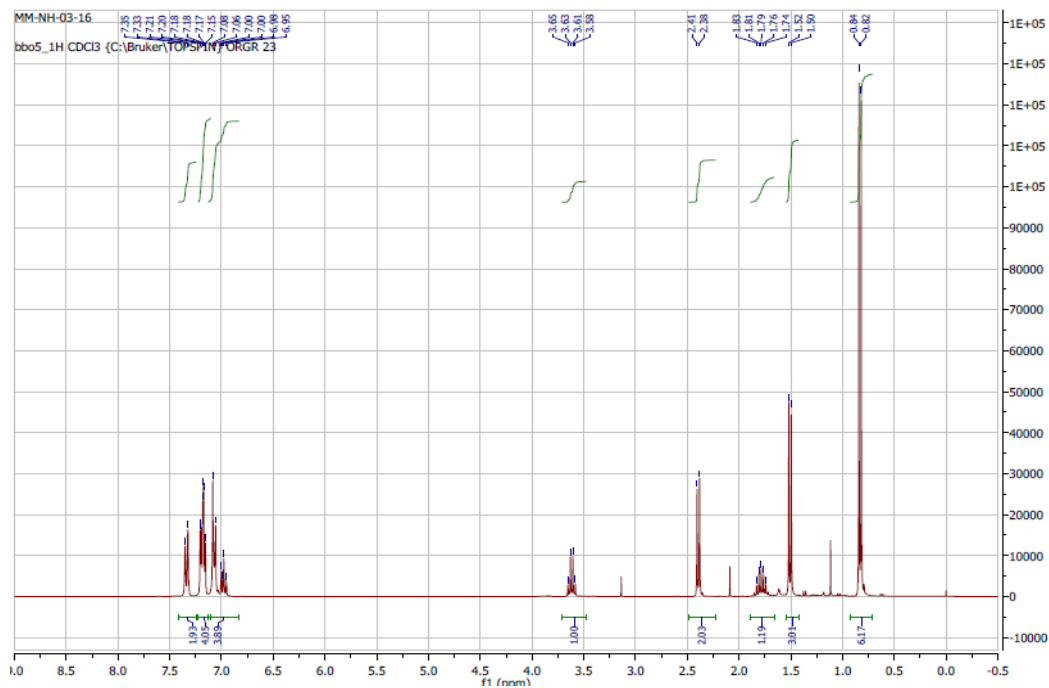
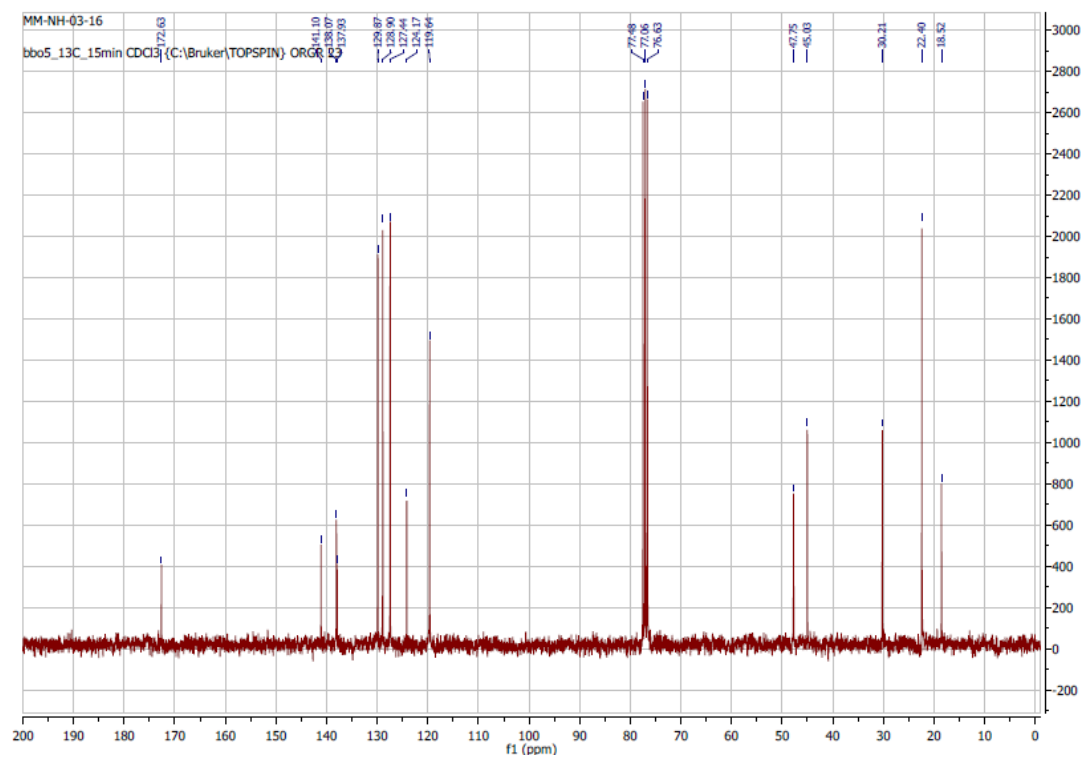
N-(4-iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl) propanamide 1-A3

RMN ¹HRMN ¹³C

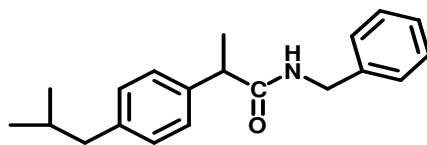
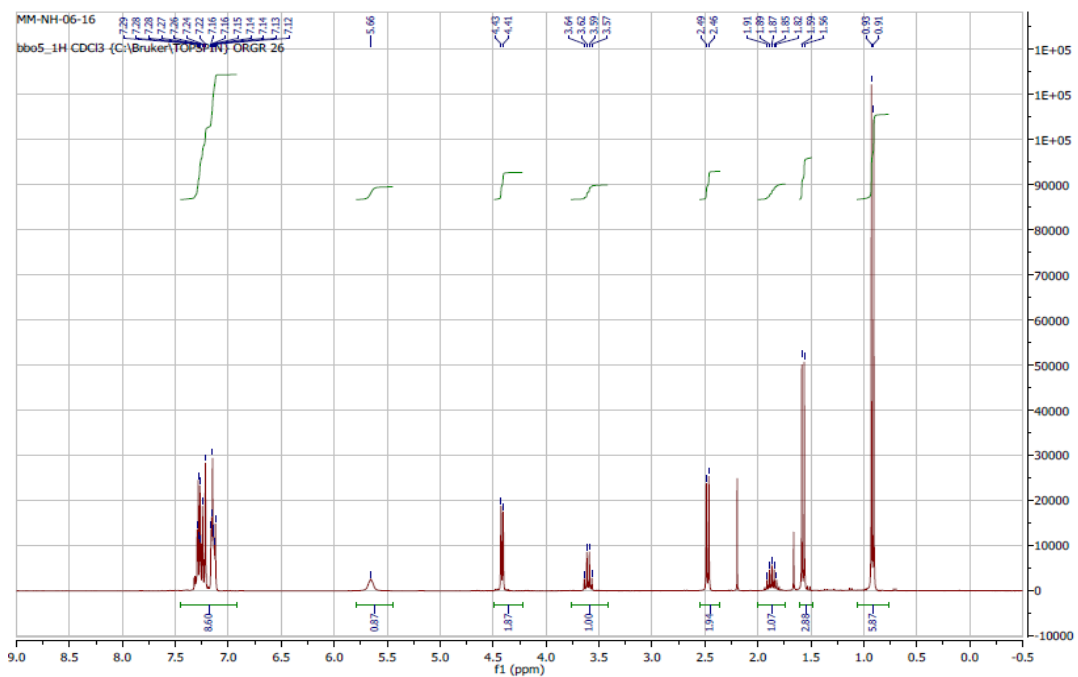
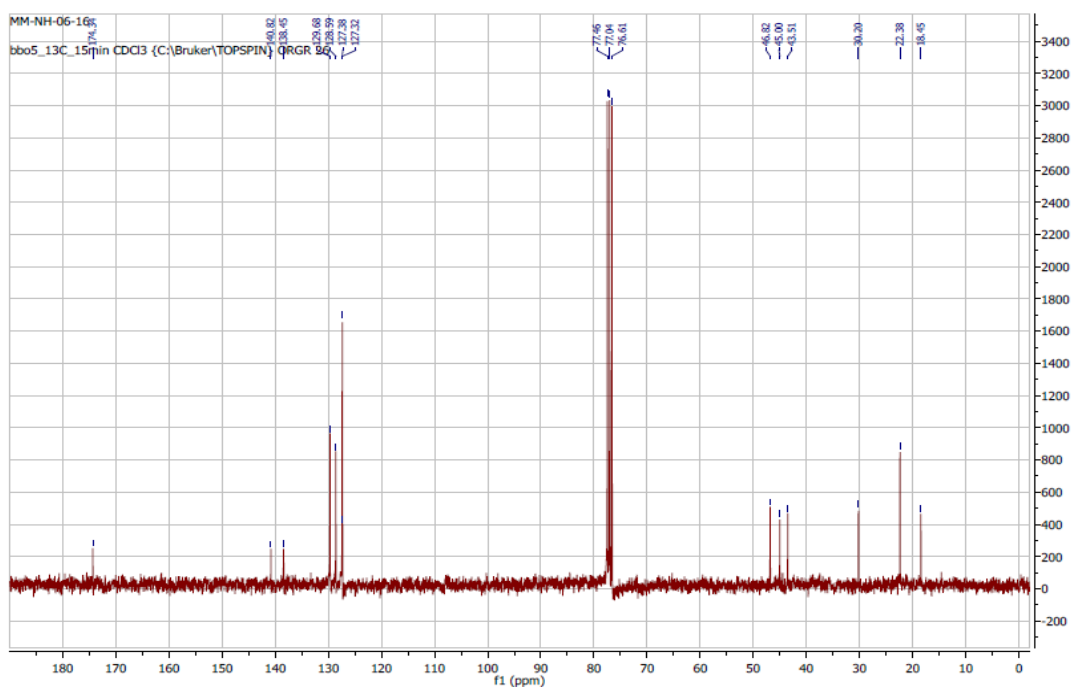
2-(4-isobutylphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)propanamide 1-A4

RMN ^1H RMN ^{13}C 

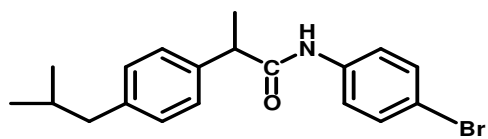
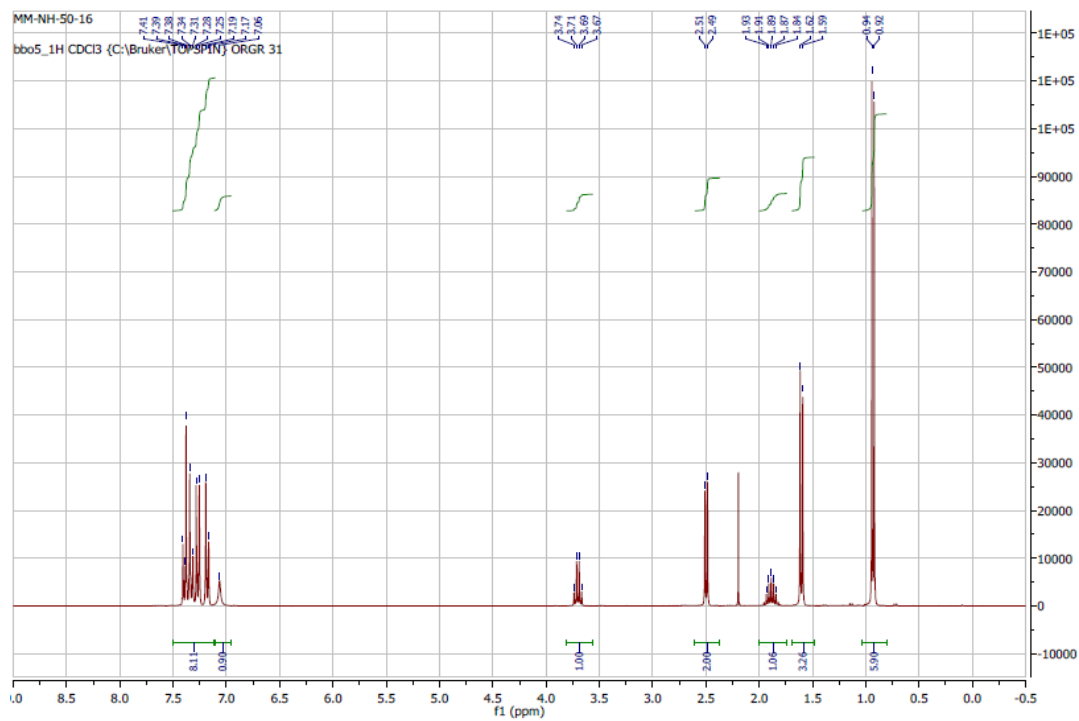
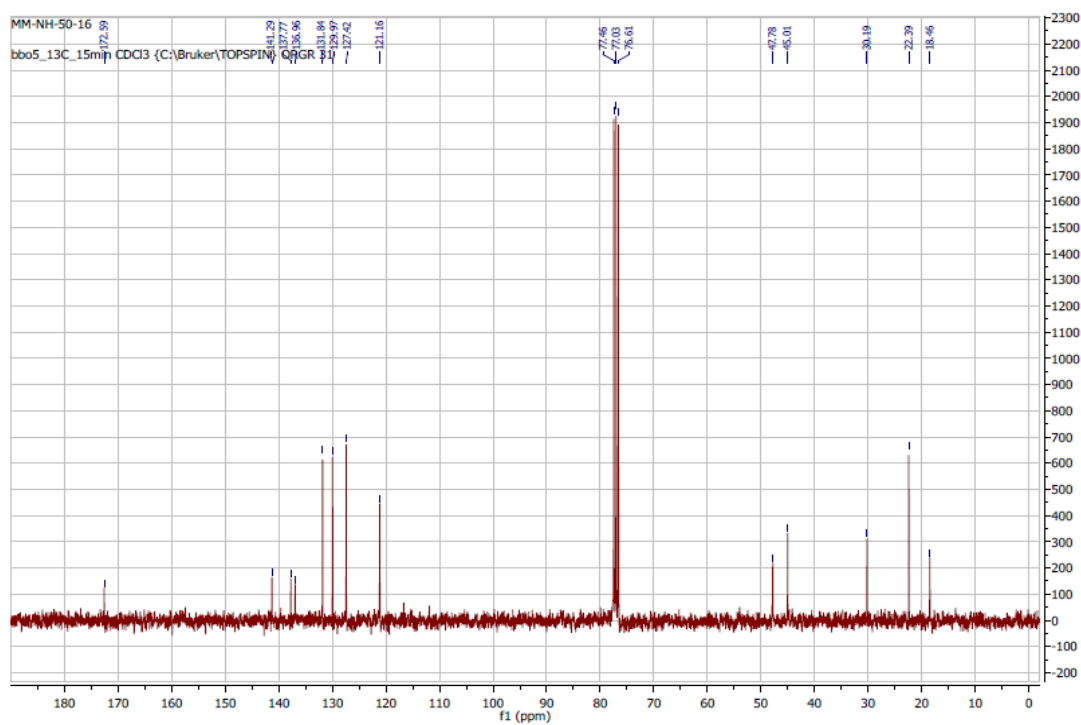
2-(4-isobutylphenyl)-N-phenylpropanamide 1-A5

RMN ^1H RMN ^{13}C 

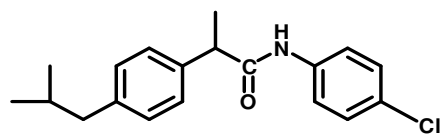
N-benzyl-2-(4-isobutylphenyl)propanamide 1-A6

RMN ^1H RMN ^{13}C 

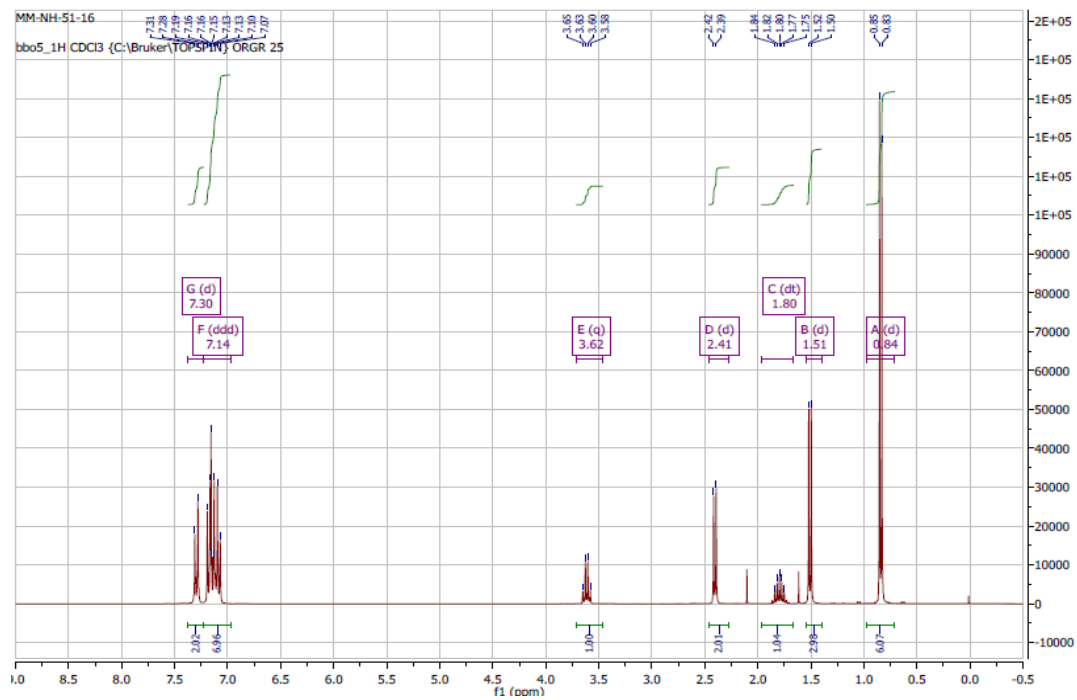
N-(4-bromophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide 1-A7

RMN ^1H RMN ^{13}C 

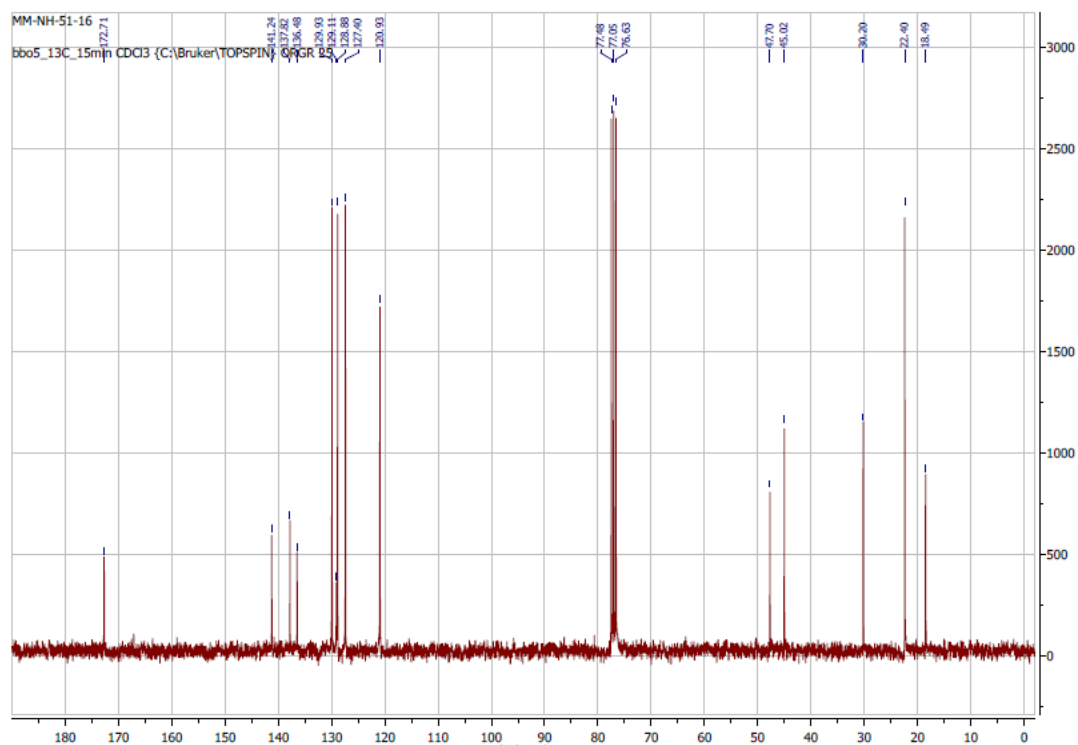
N-(4-chlorophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide 1-A8



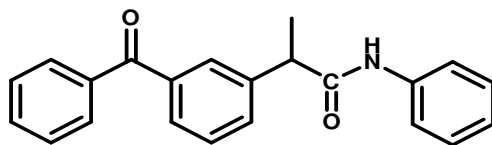
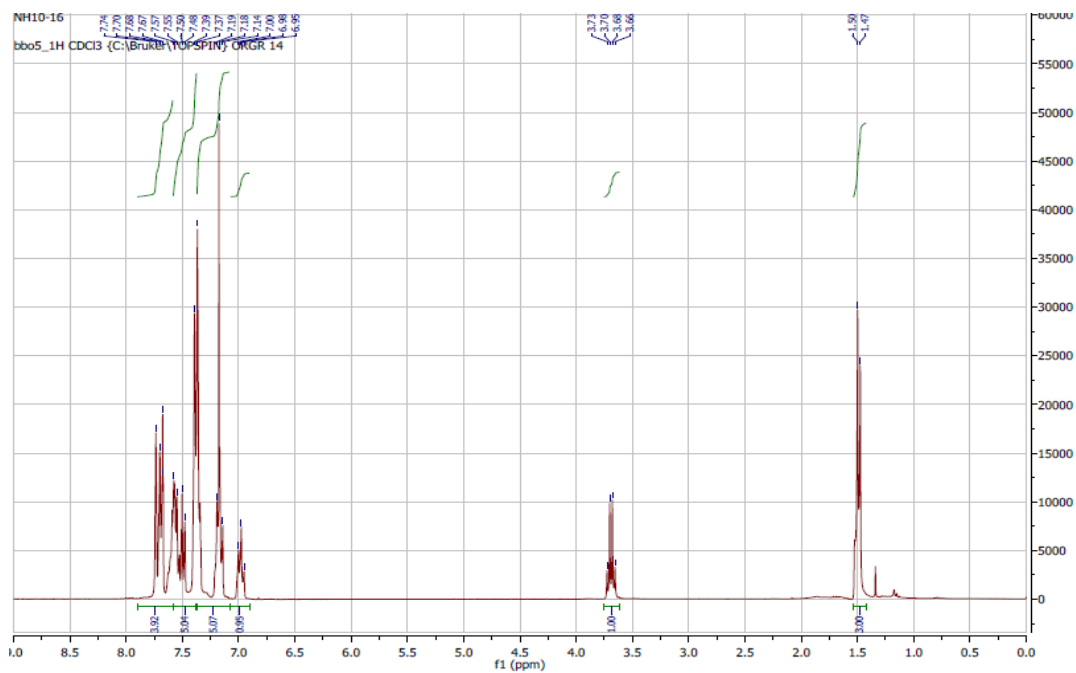
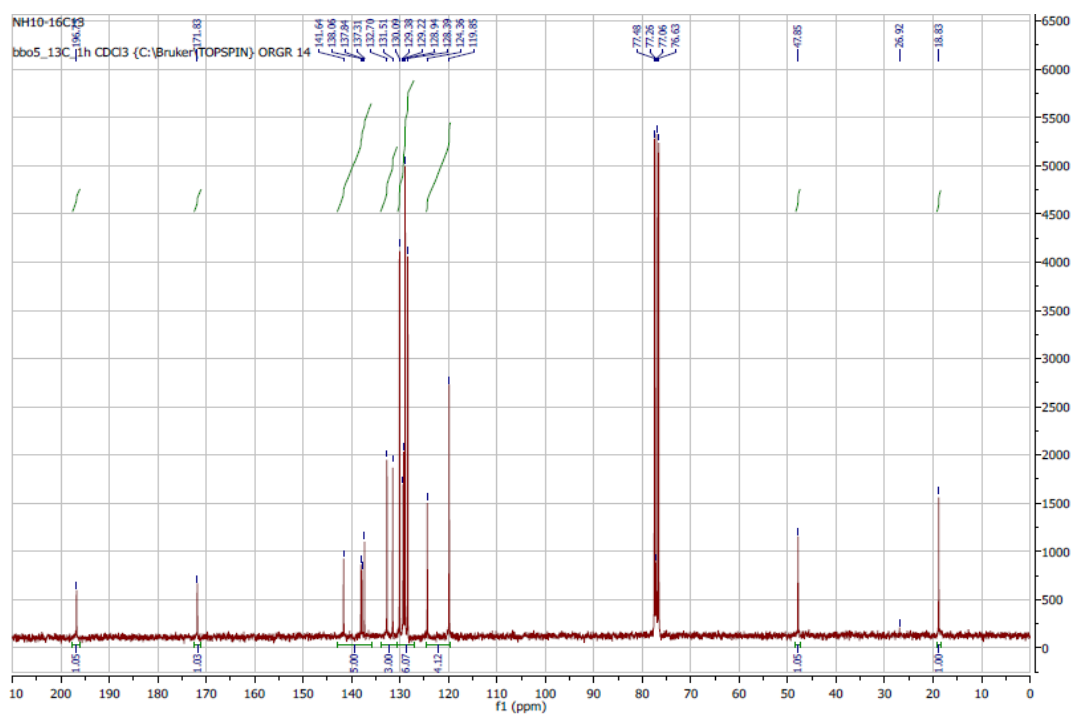
RMN ¹H



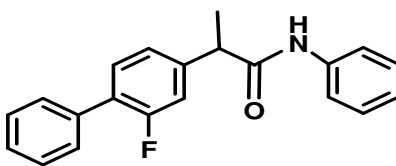
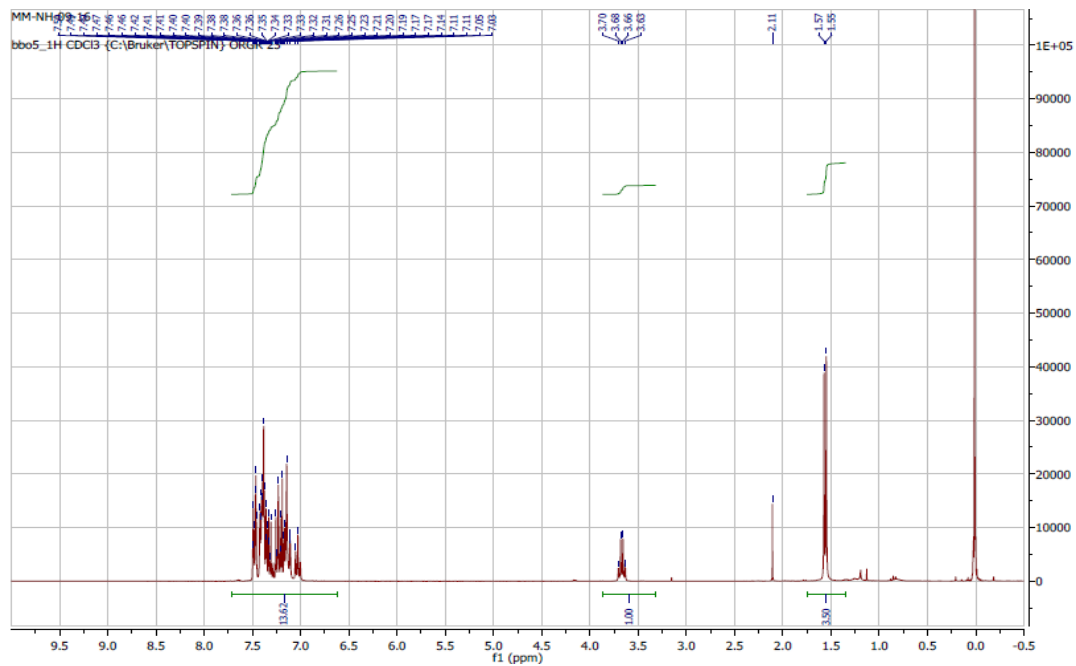
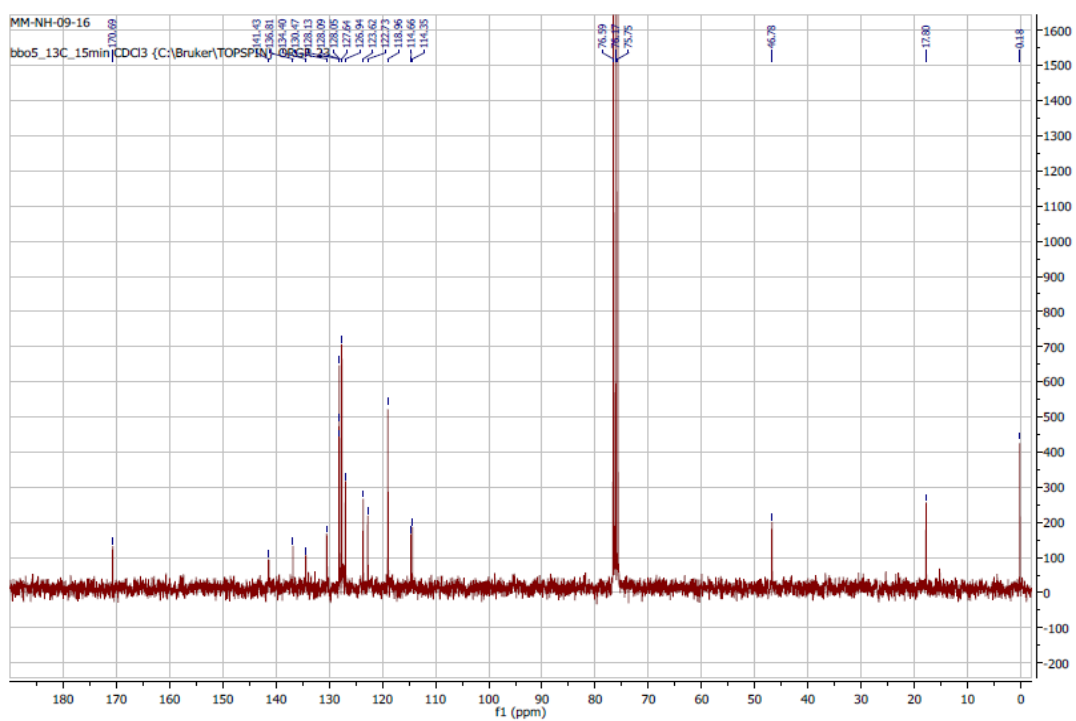
RMN ¹³C



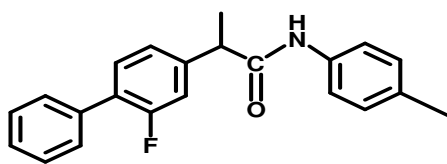
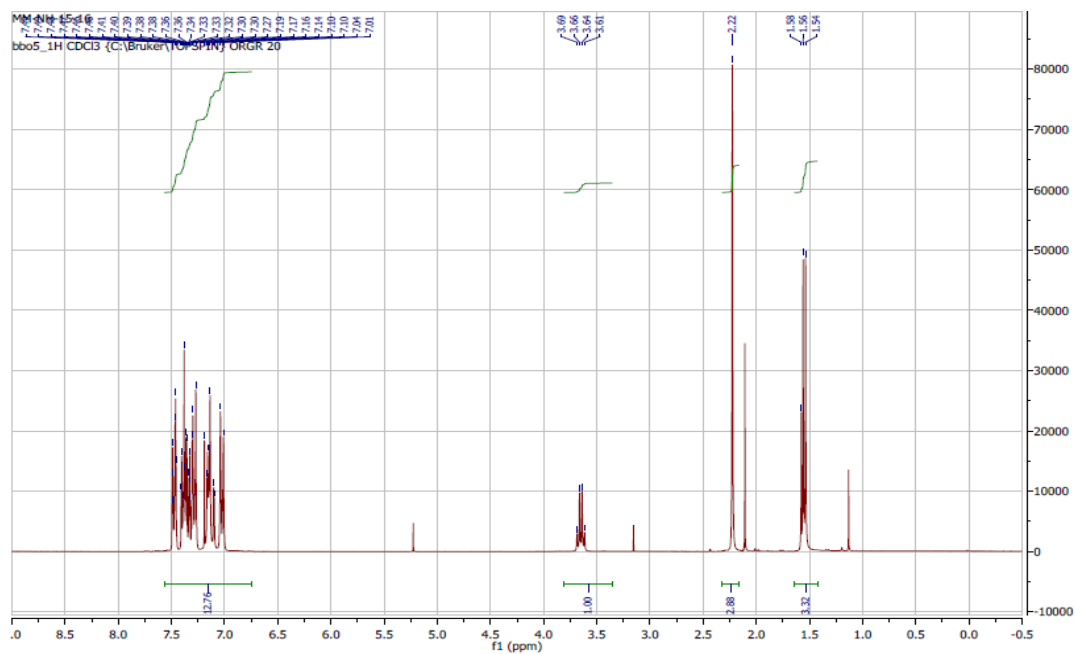
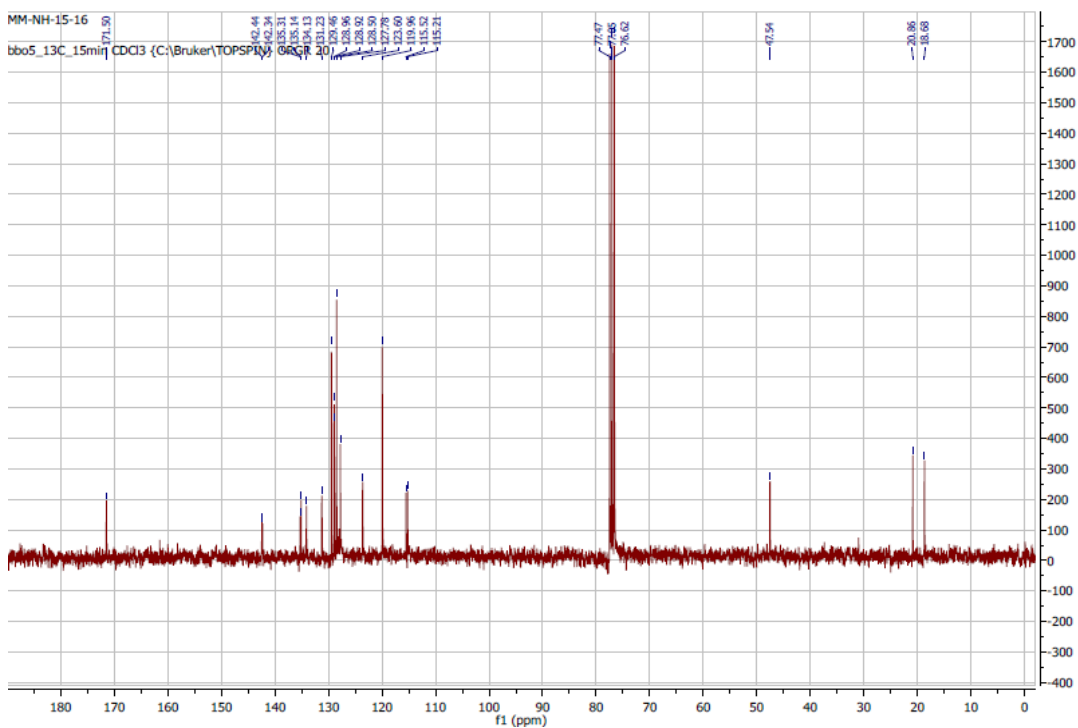
2-(3-benzoylphenyl)-N-phenylpropanamide2-A1

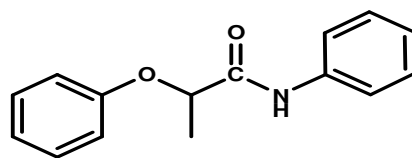
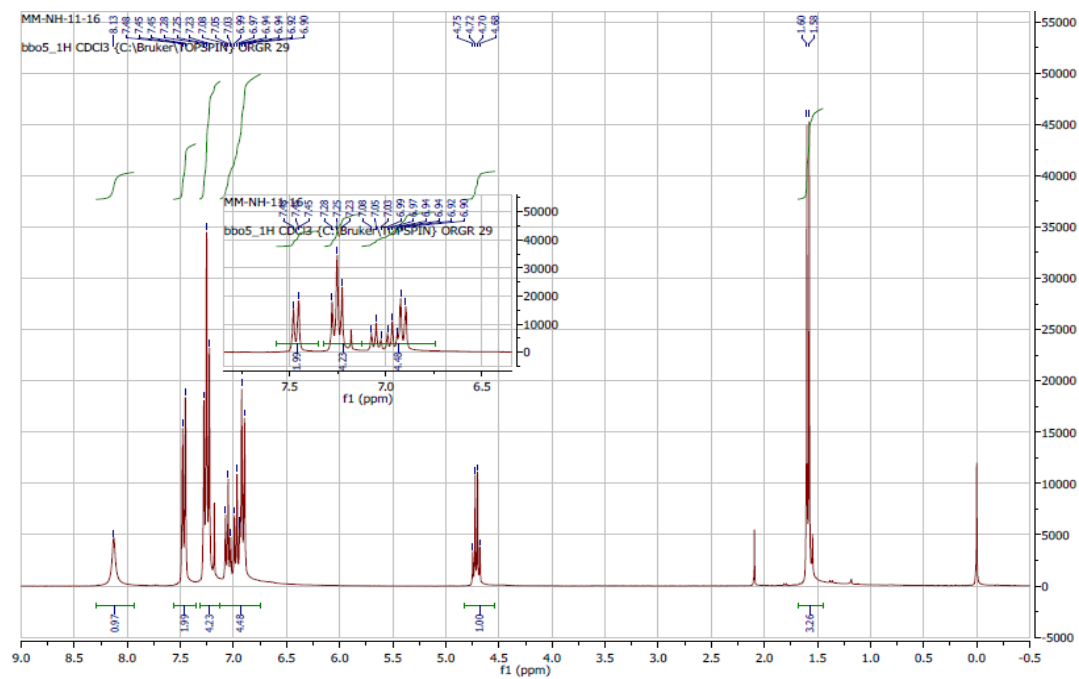
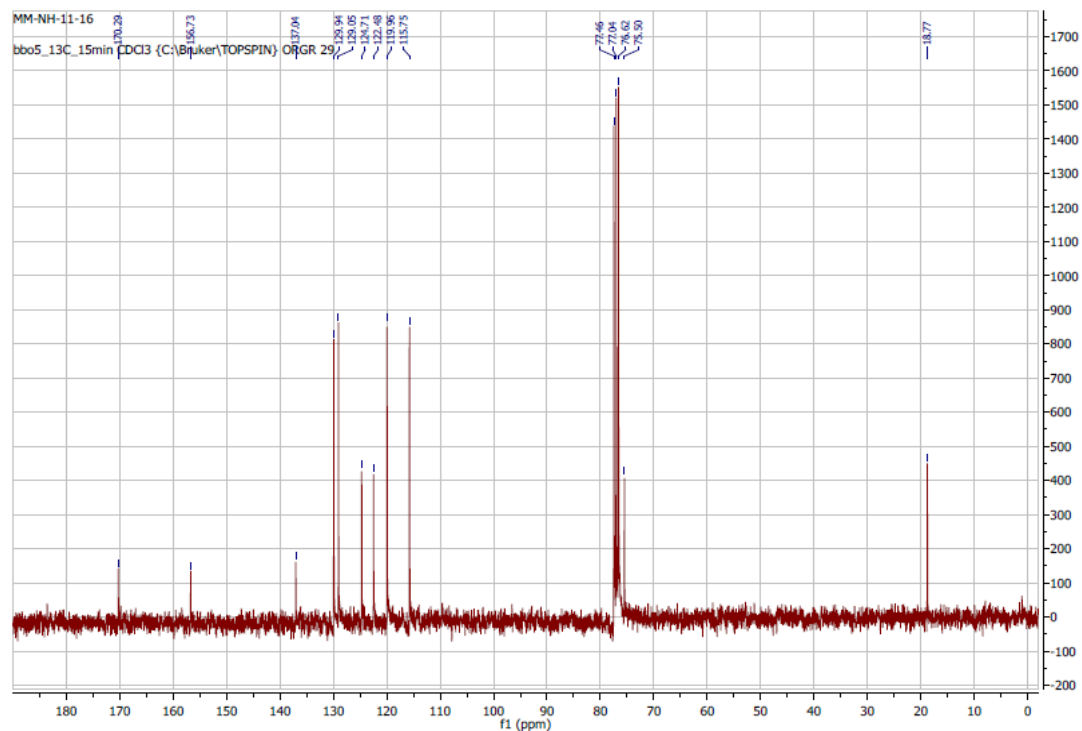
RMN ^1H RMN ^{13}C 

2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-phenylpropanamide 3-A1

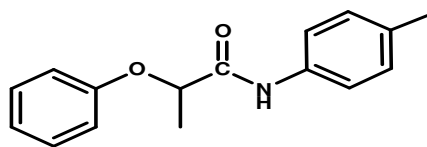
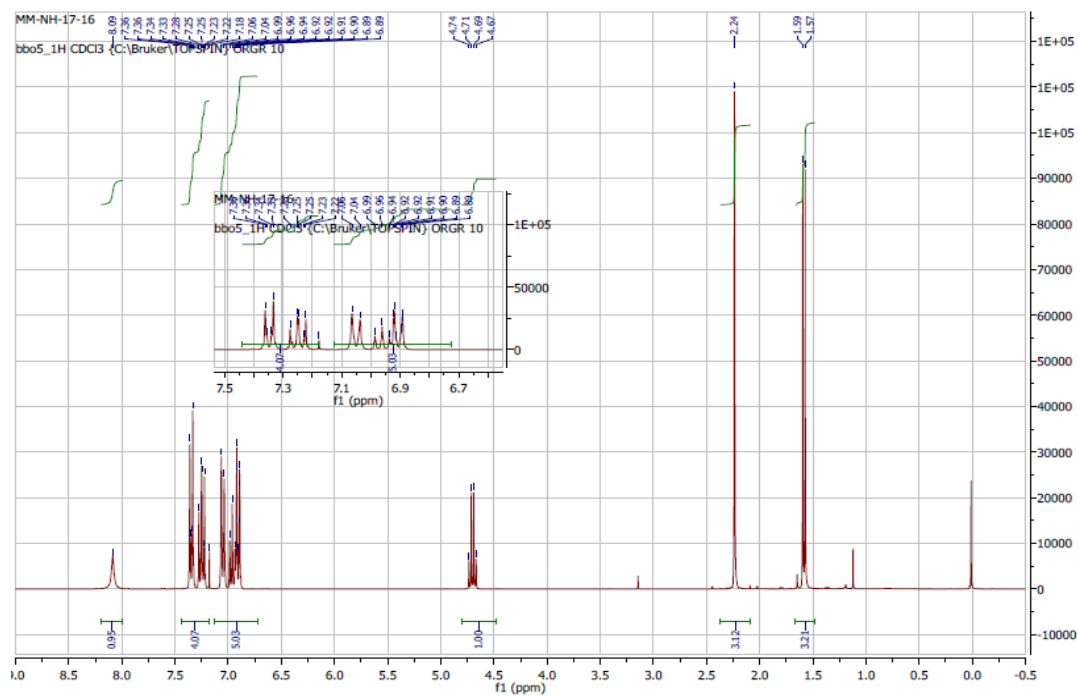
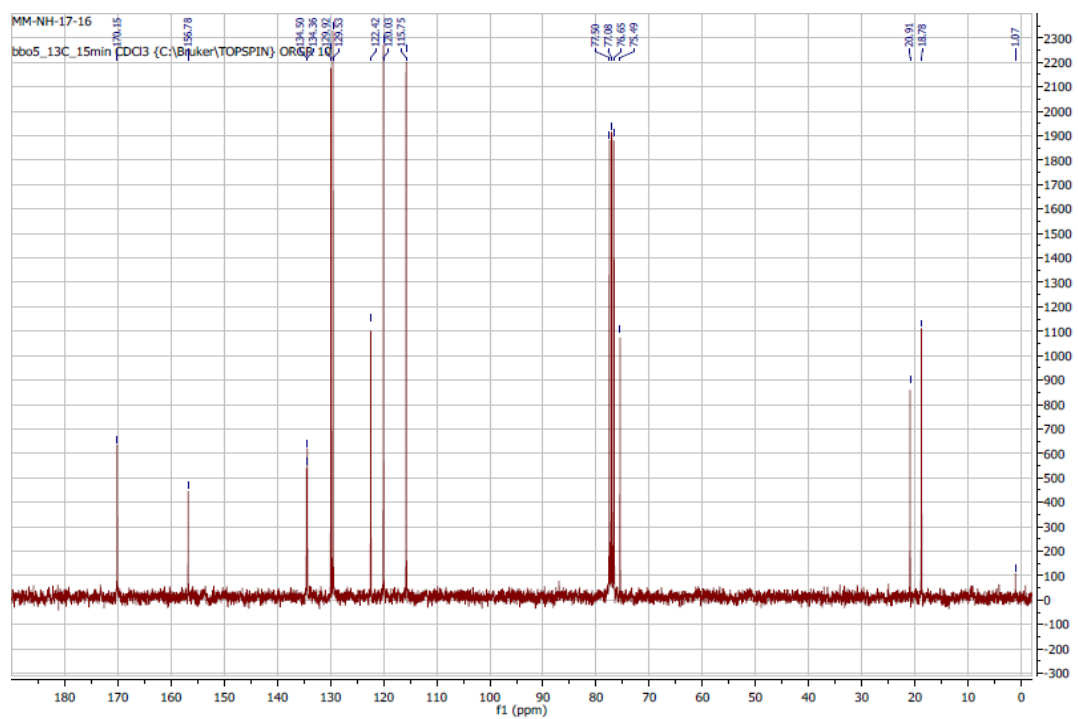
RMN ¹HRMN ¹³C

2-(2-fluoro-[1, 1'-biphenyl]-4-yl)-N-(p-tolyl)propanamide3-A2

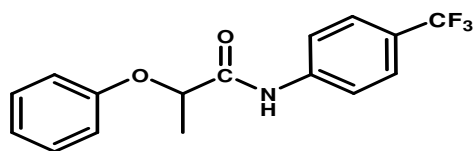
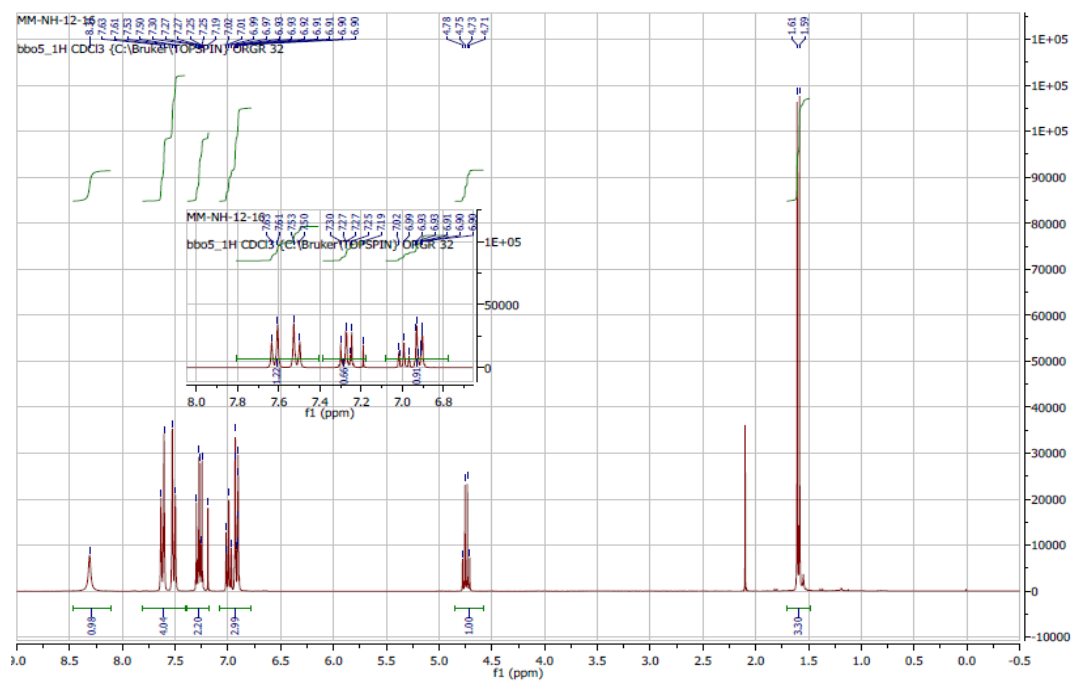
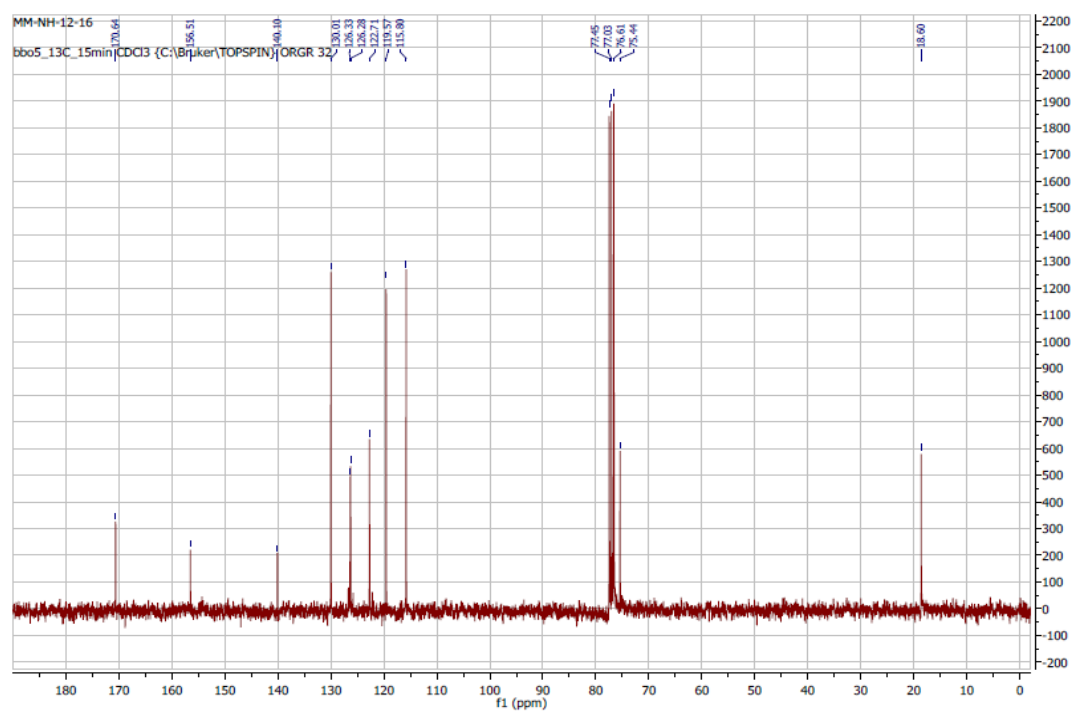
RMN ^1H RMN ^{13}C 

2-phenoxy-*N*-phenylpropanamide 4-A1RMN ^1H RMN ^{13}C 

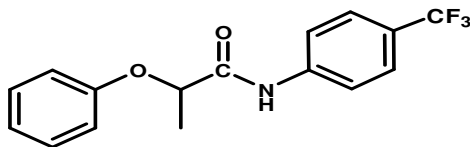
2-phenoxy-N-(p-tolyl) propanamide4-A2

RMN ^1H RMN ^{13}C 

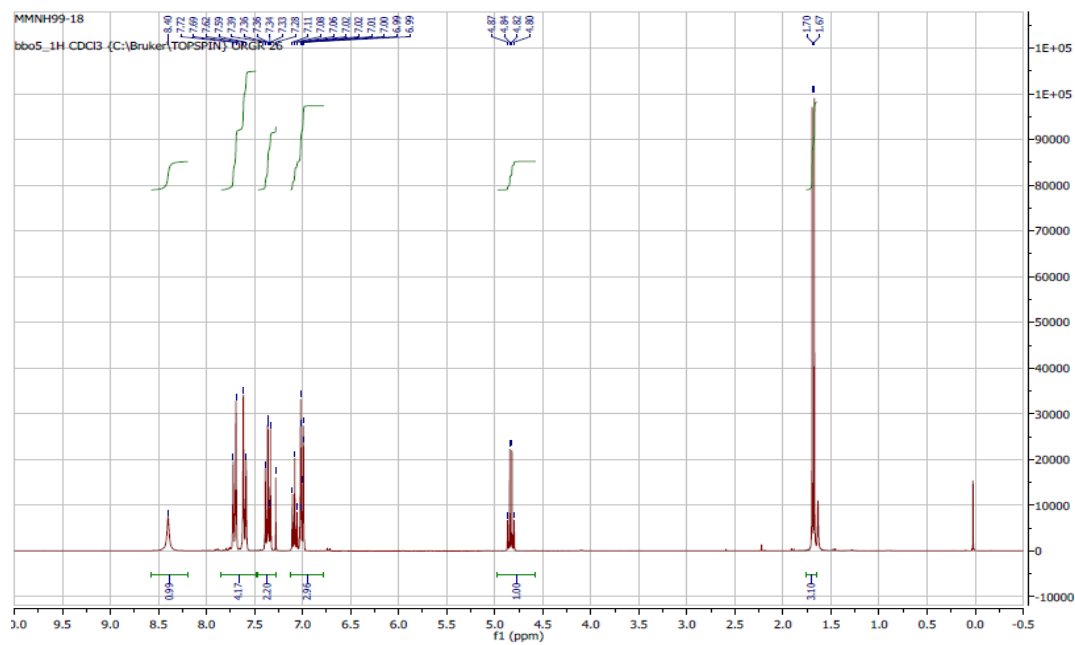
2-phenoxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide4-A3

RMN ¹HRMN ¹³C

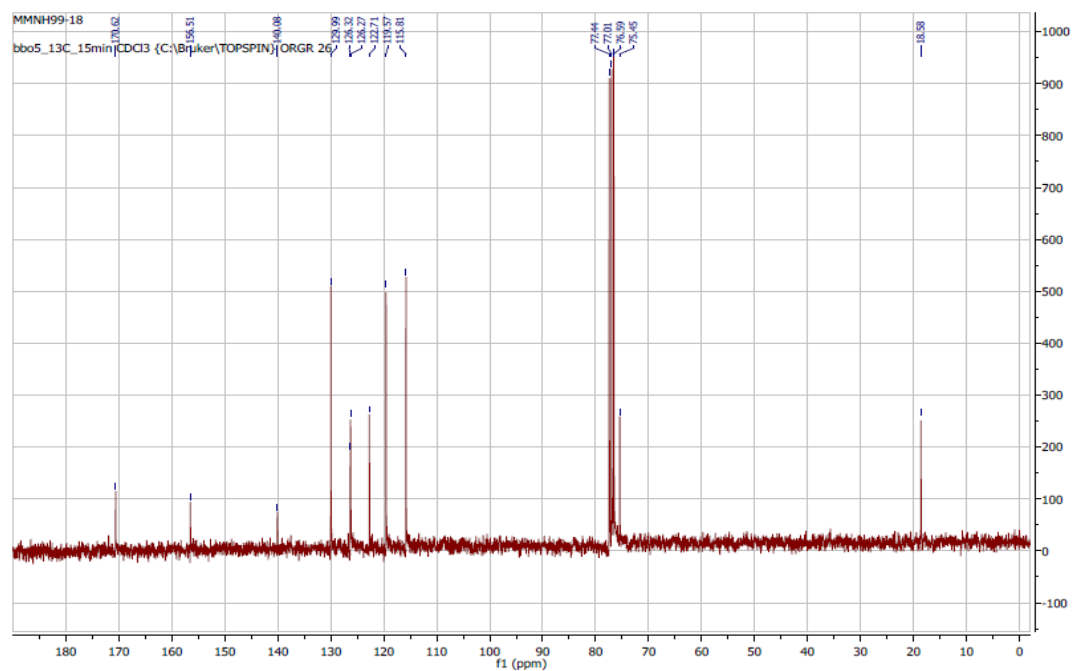
2-(Phénoxy-*N*-(4-(trifluorométhyl) phényl) propanamide (*rac*-4-A3) obtenu par le biais de la réaction à l'échelle de 1g

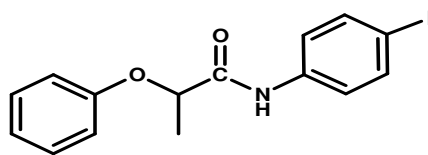
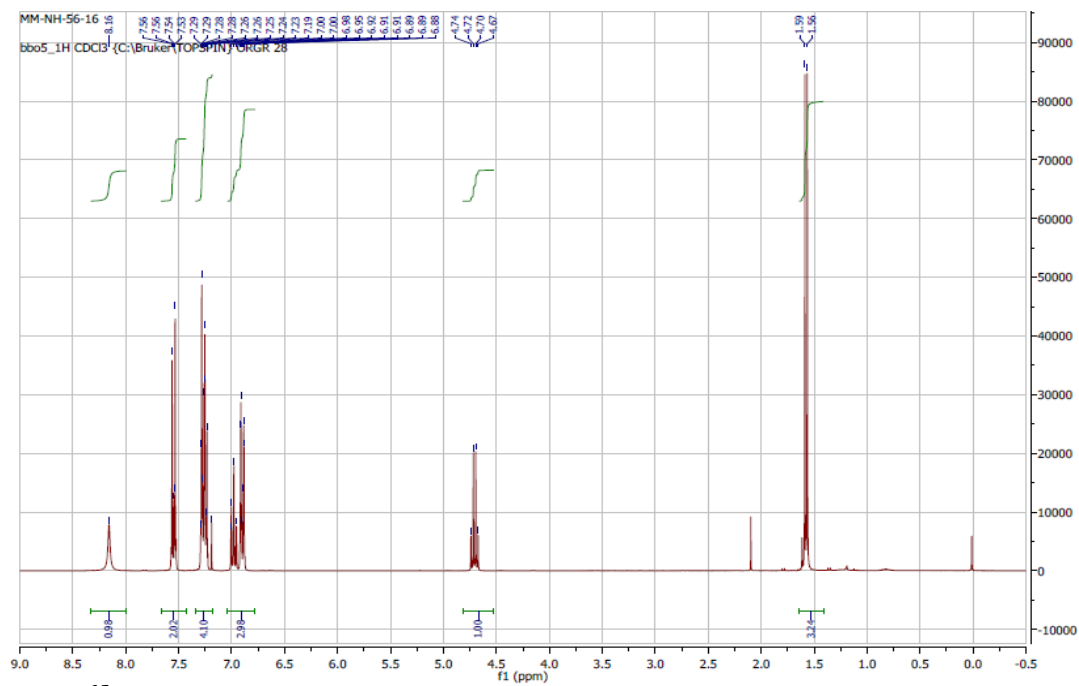
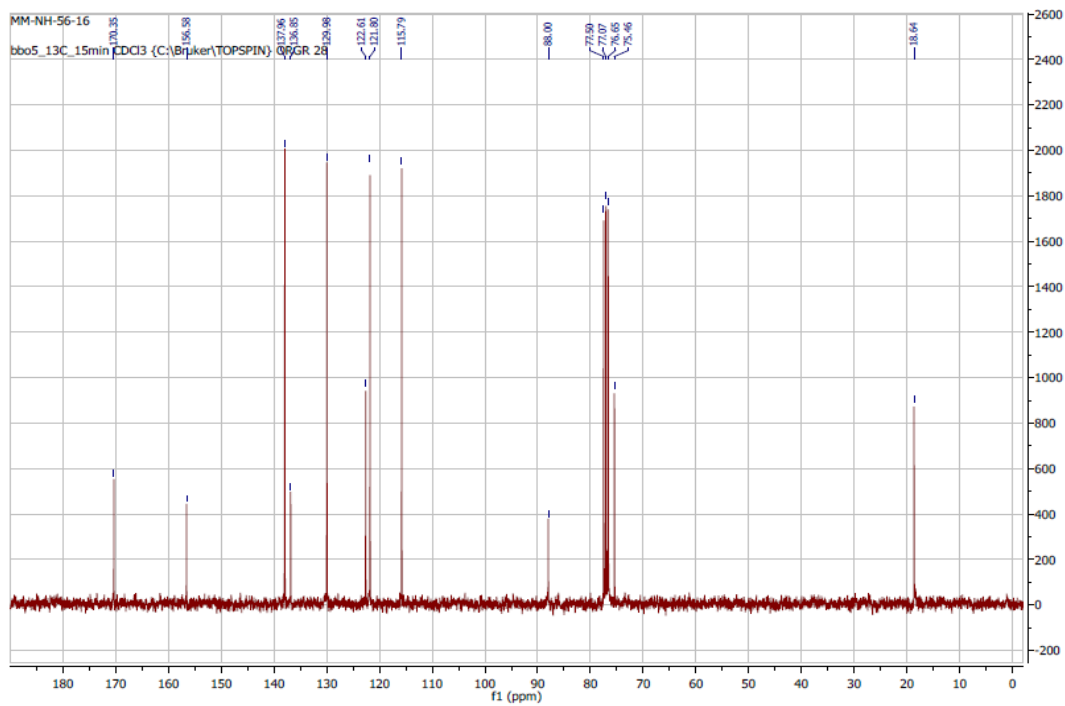


RMN ^1H

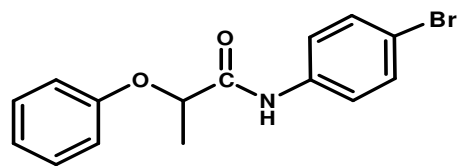
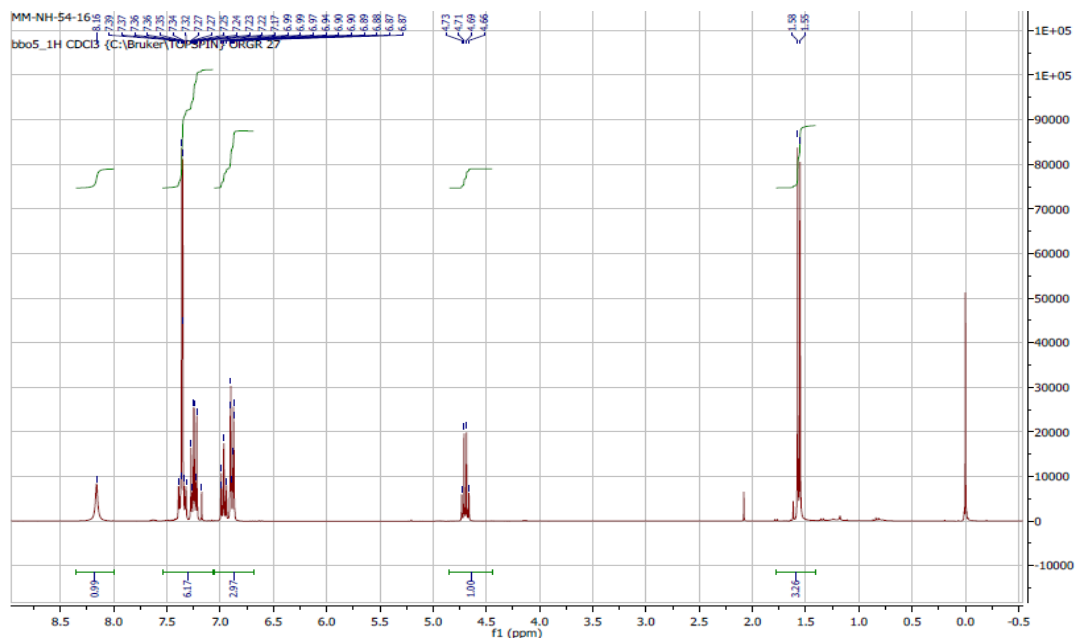
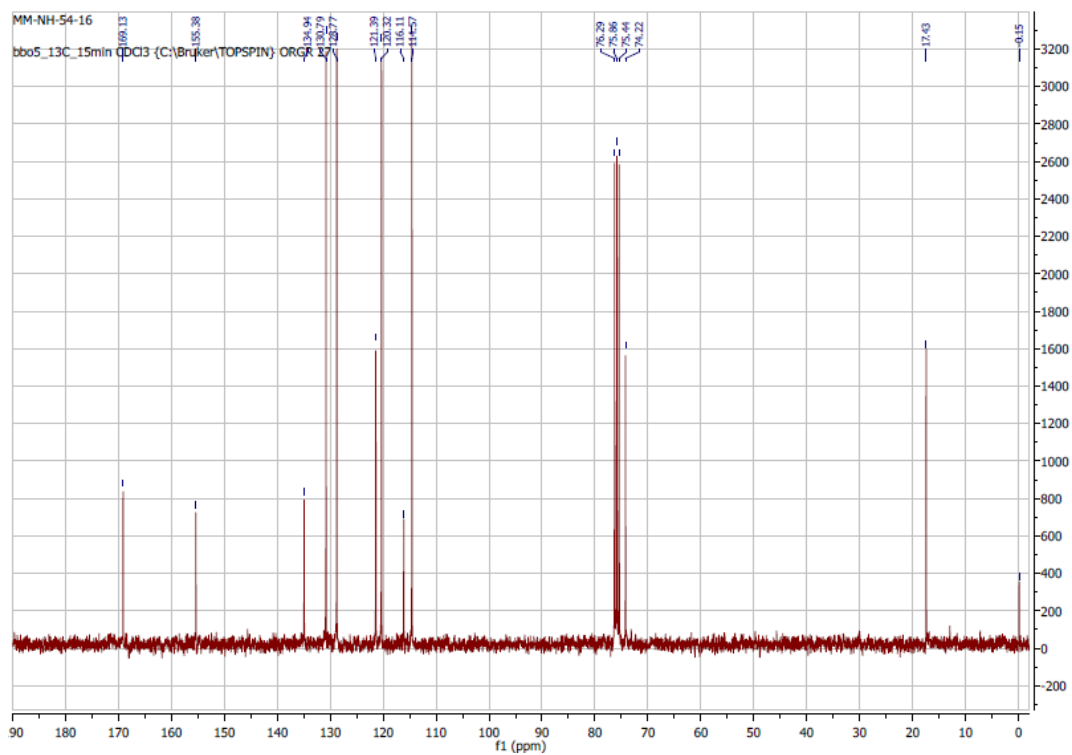


RMN ^{13}C

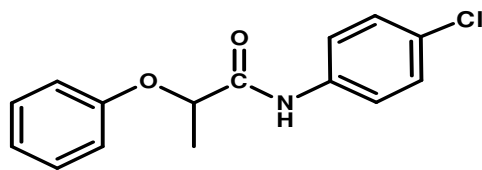
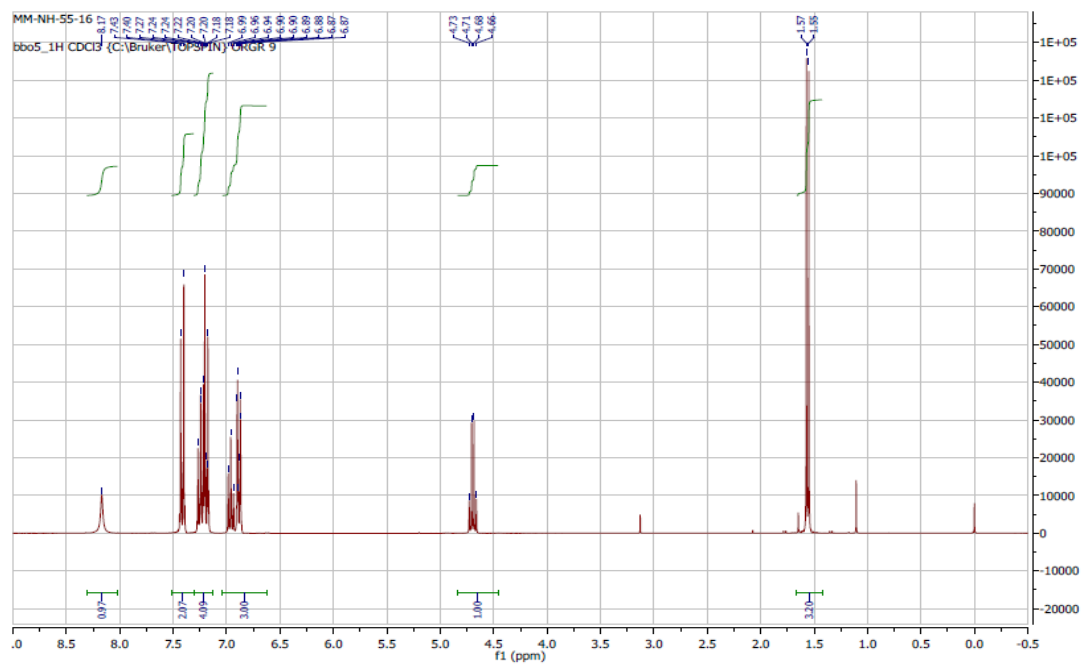
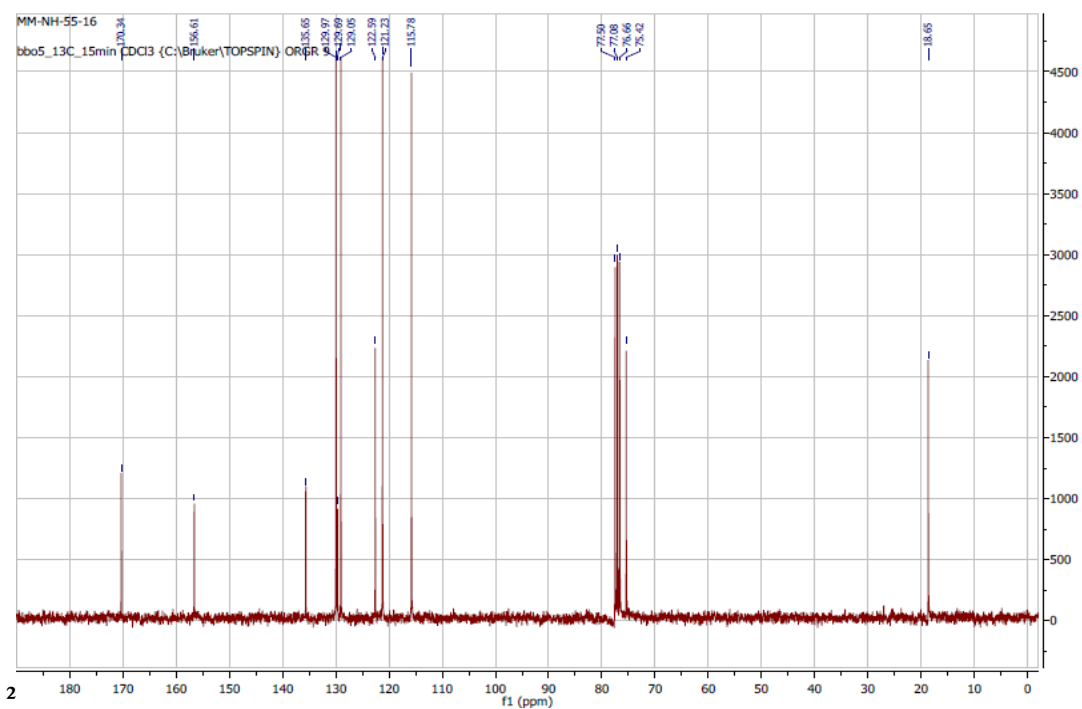


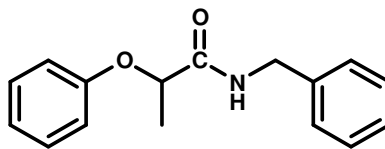
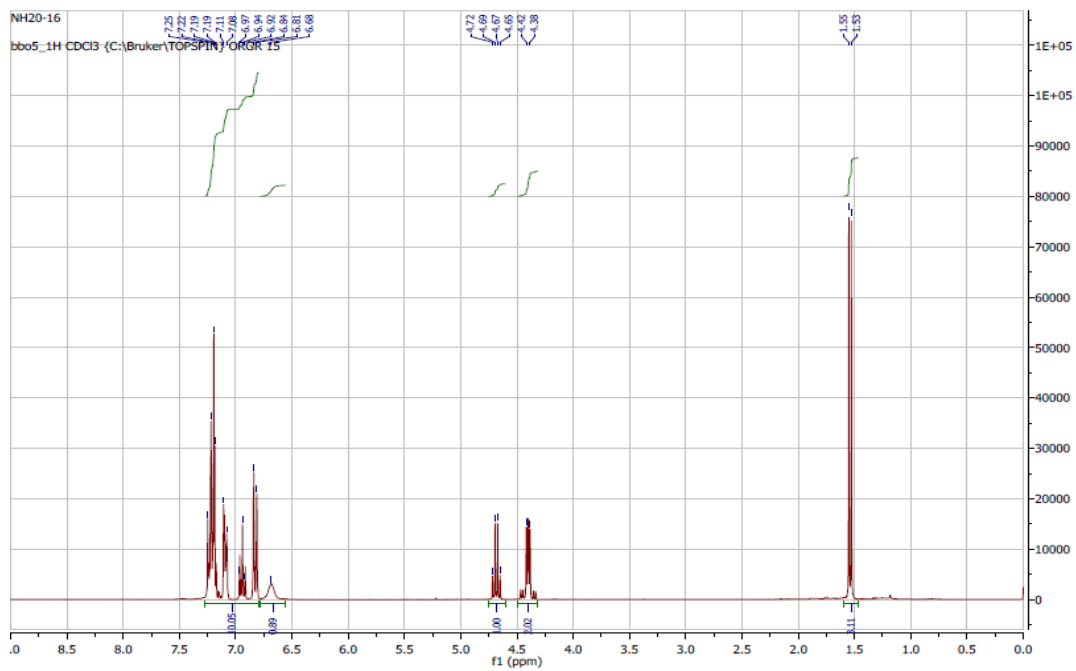
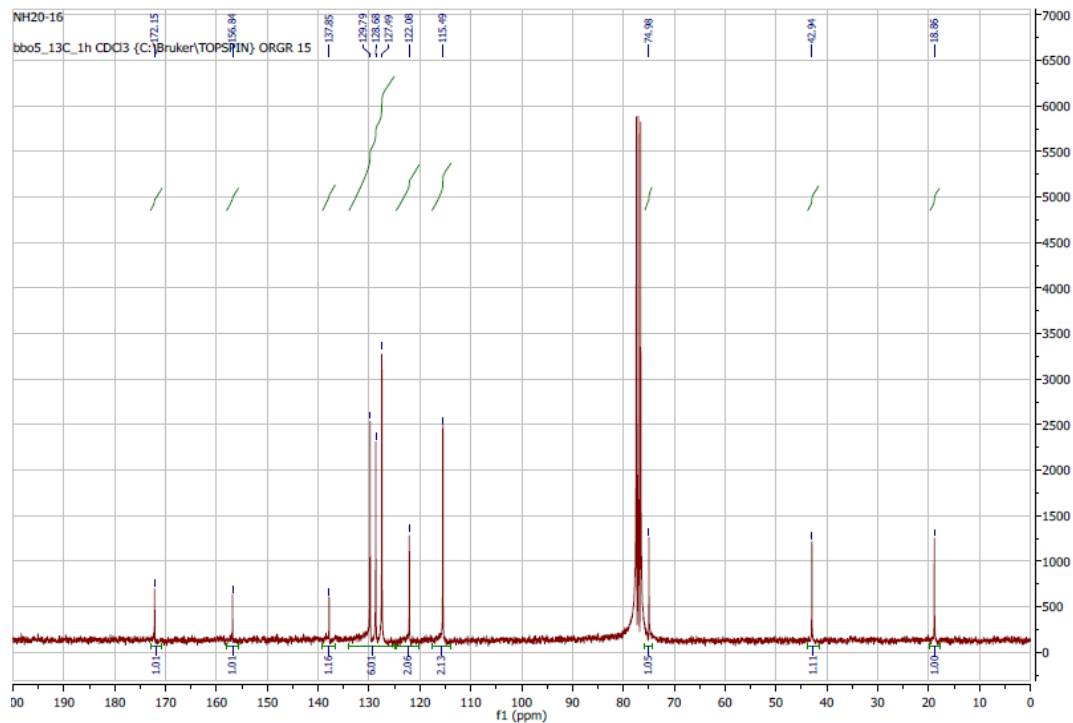
N-(4-iodophenyl)-2-phenoxypropanamide4-A5**RMN ¹H****RMN ¹³C**

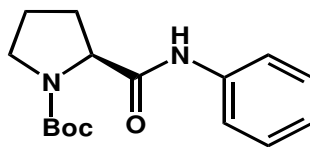
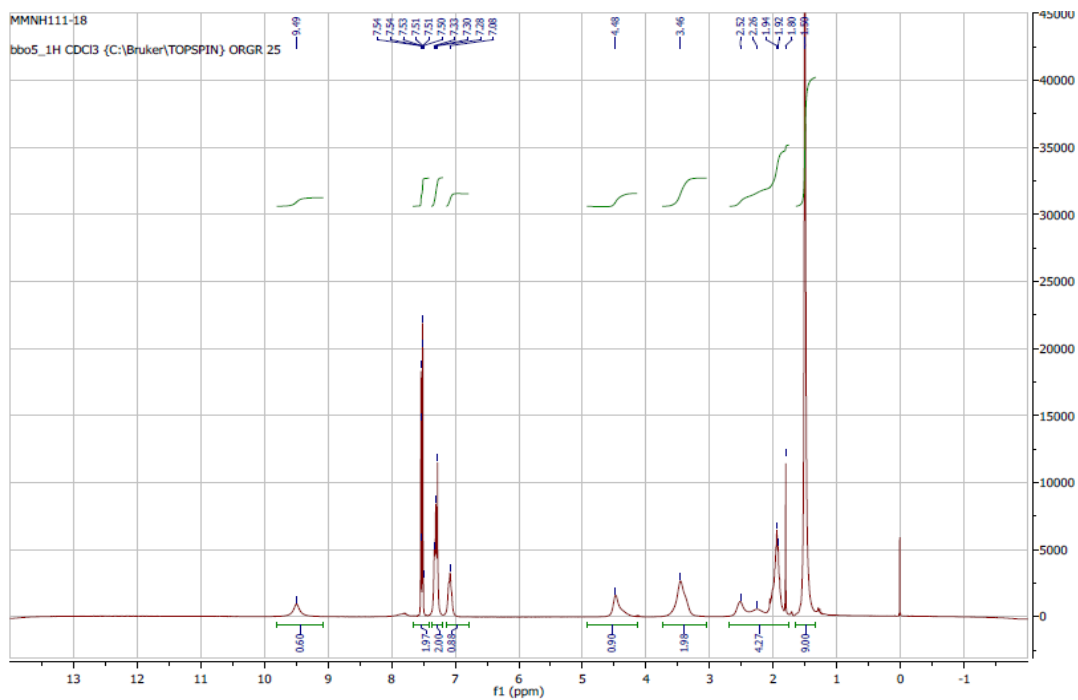
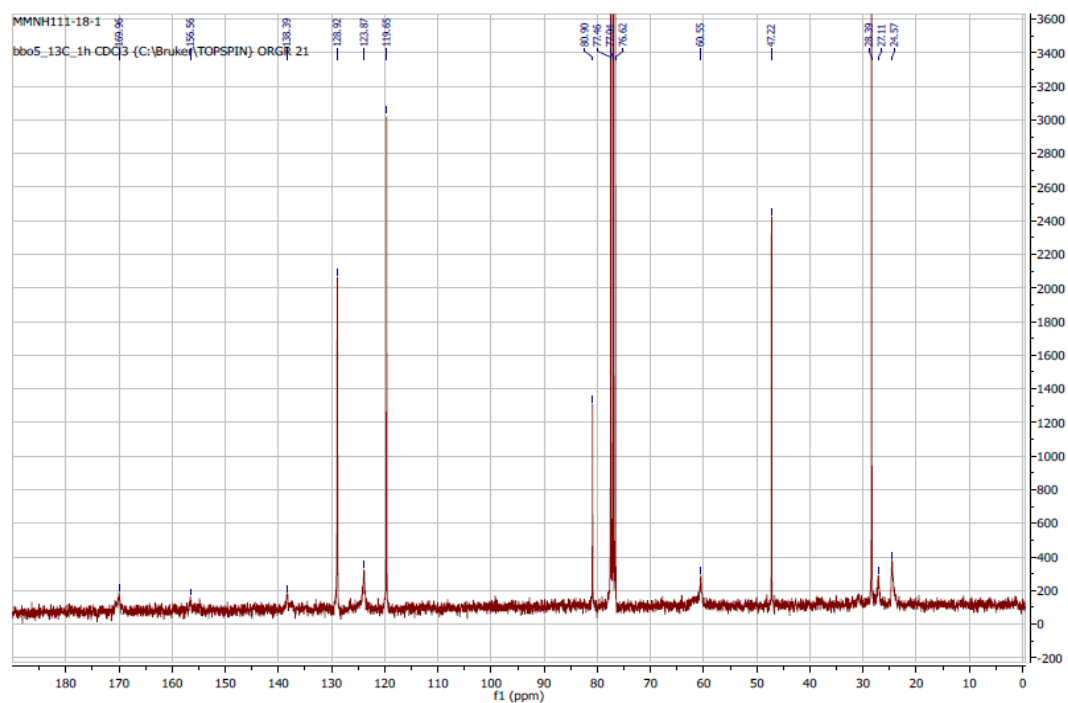
N-(4-bromophenyl)-2-phenoxypropanamide 4-A6

RMN ^1H RMN ^{13}C 

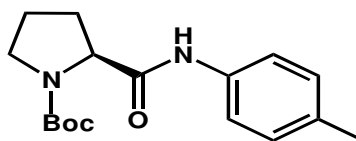
N-(4-chlorophenyl)-2-phenoxypropanamide 4-A7

RMN ^1H RMN ^{13}C 

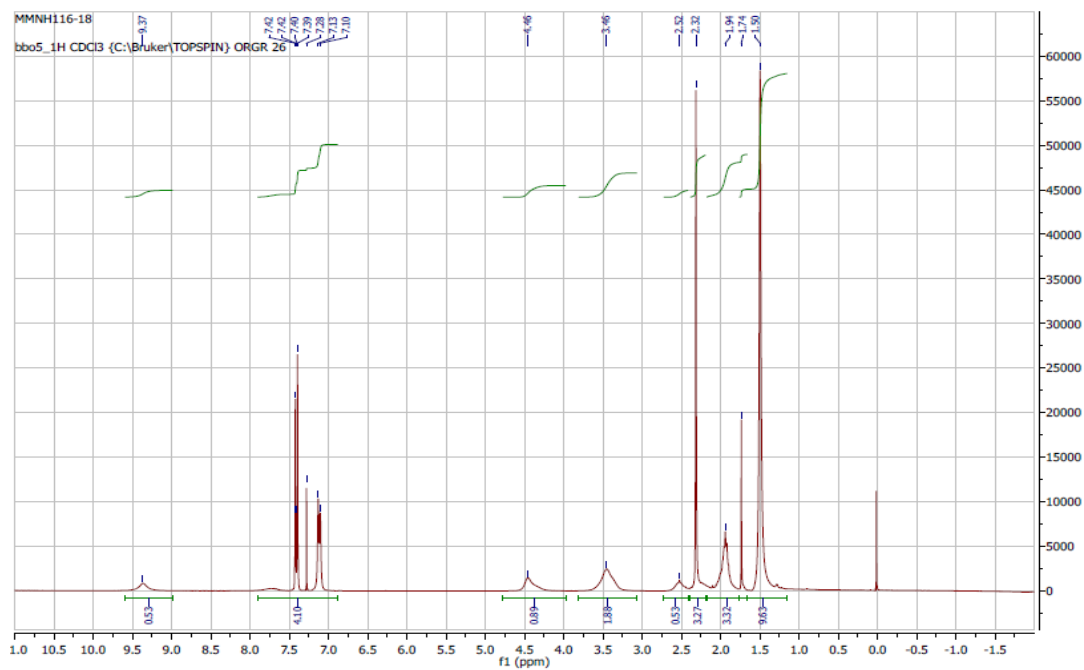
N-benzyl-2-phenoxypropanamide 4-A8**RMN ¹H****RMN ¹³C**

tert-butyl(*S*)-2-(phenylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A1RMN ^1H RMN ^{13}C 

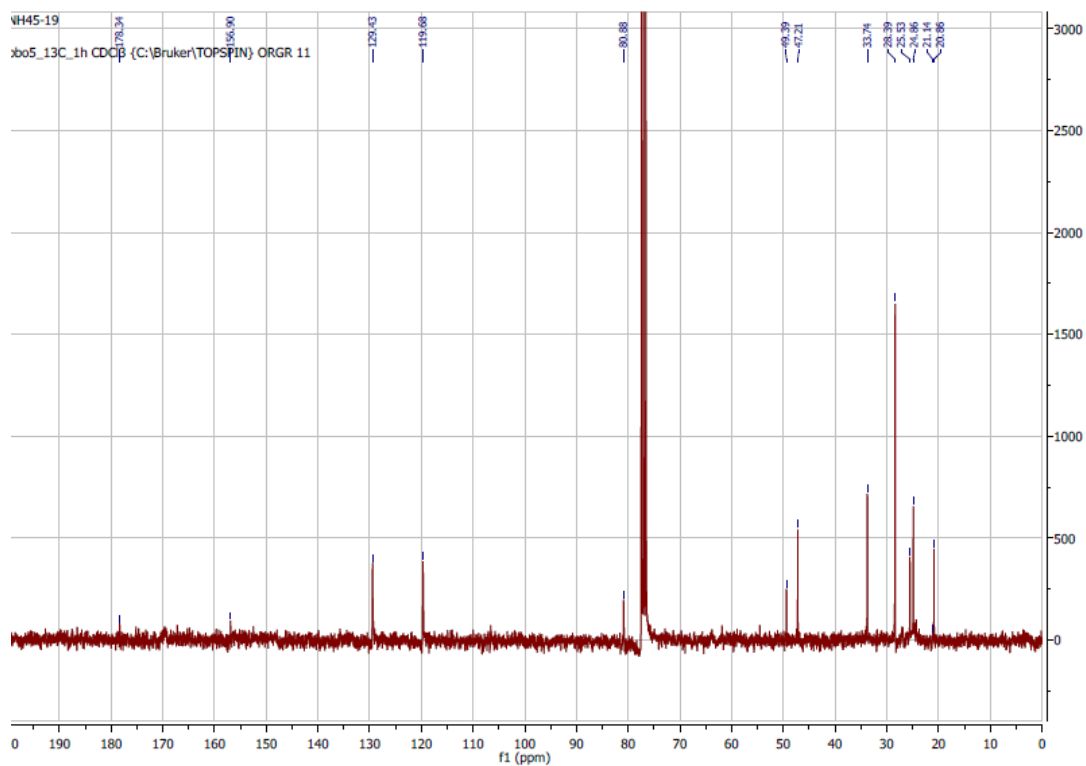
tert-butyl(*S*)-2-(*p*-tolylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate5-A2

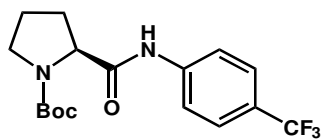
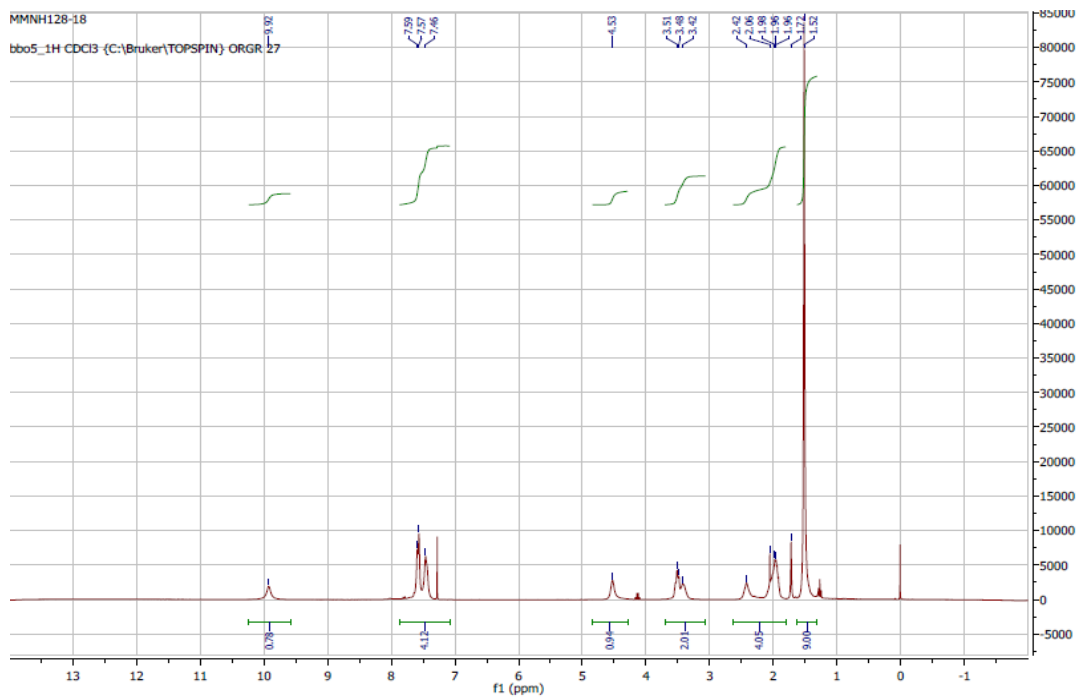
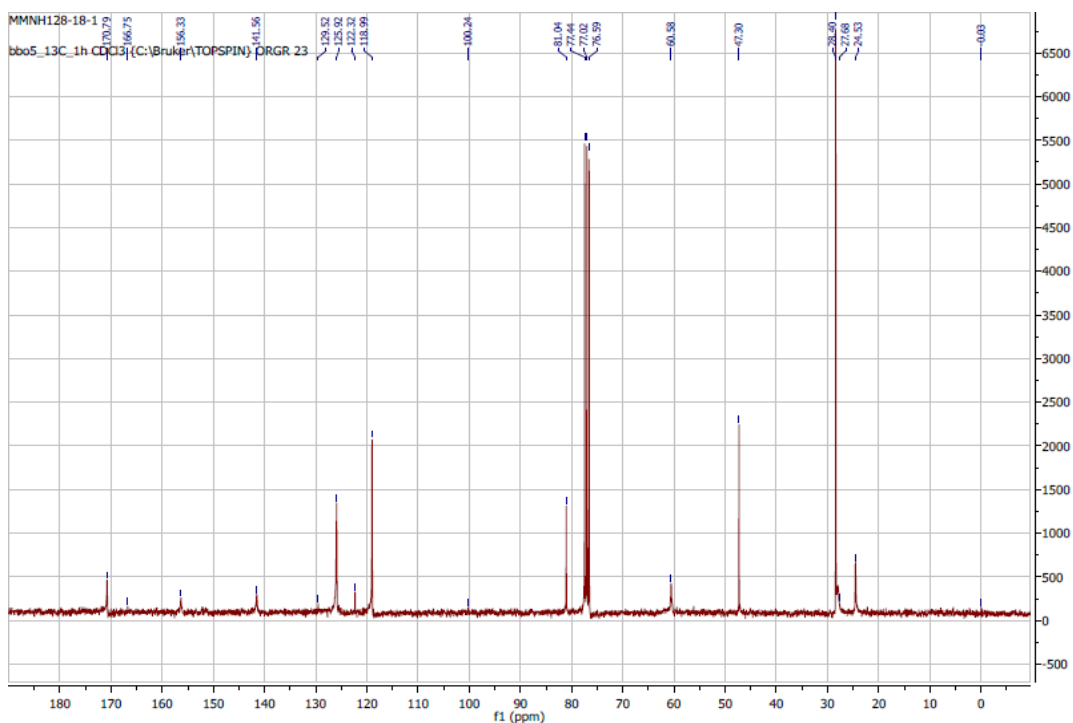


RMN ¹H

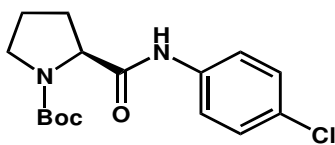


RMN ¹³C

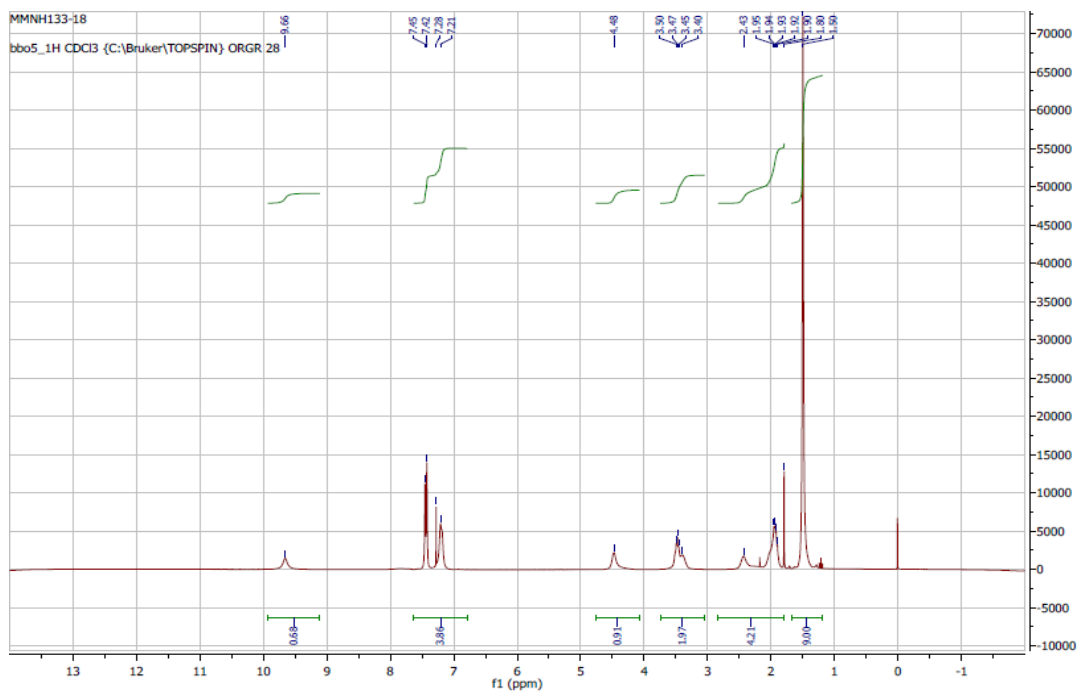


tert-butyl(*S*)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A3RMN ¹HRMN ¹³C

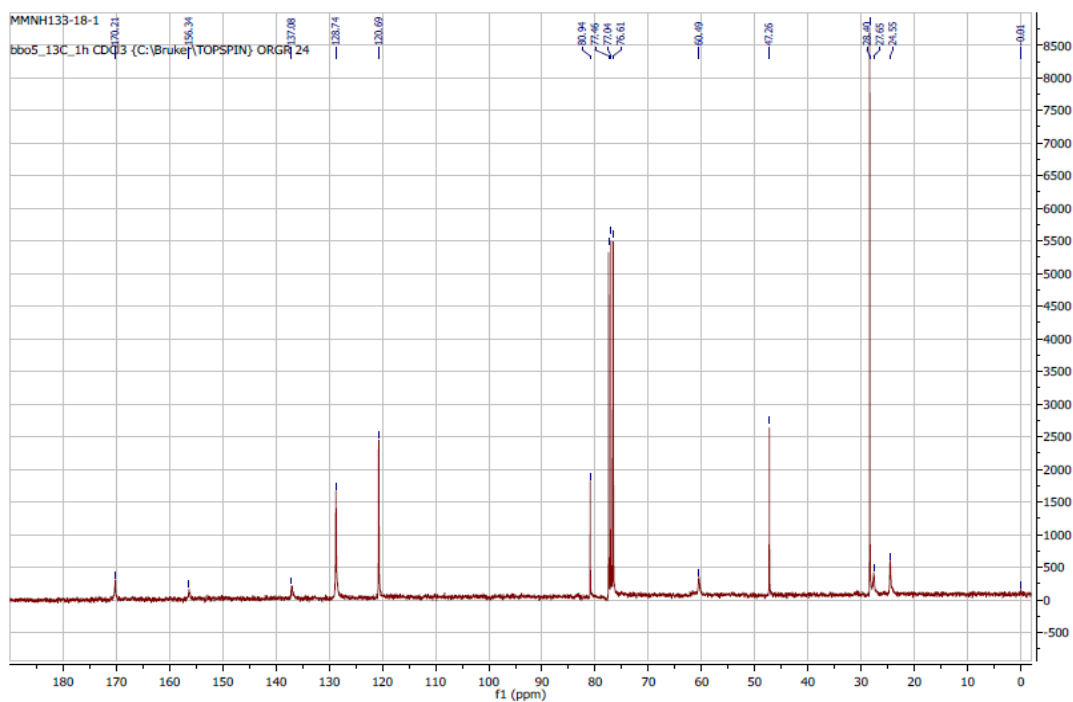
tert-butyl(*S*)-2-((4-chlorophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A4



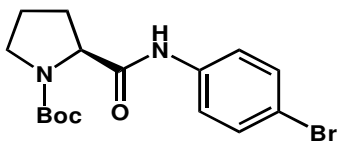
RMN ¹H



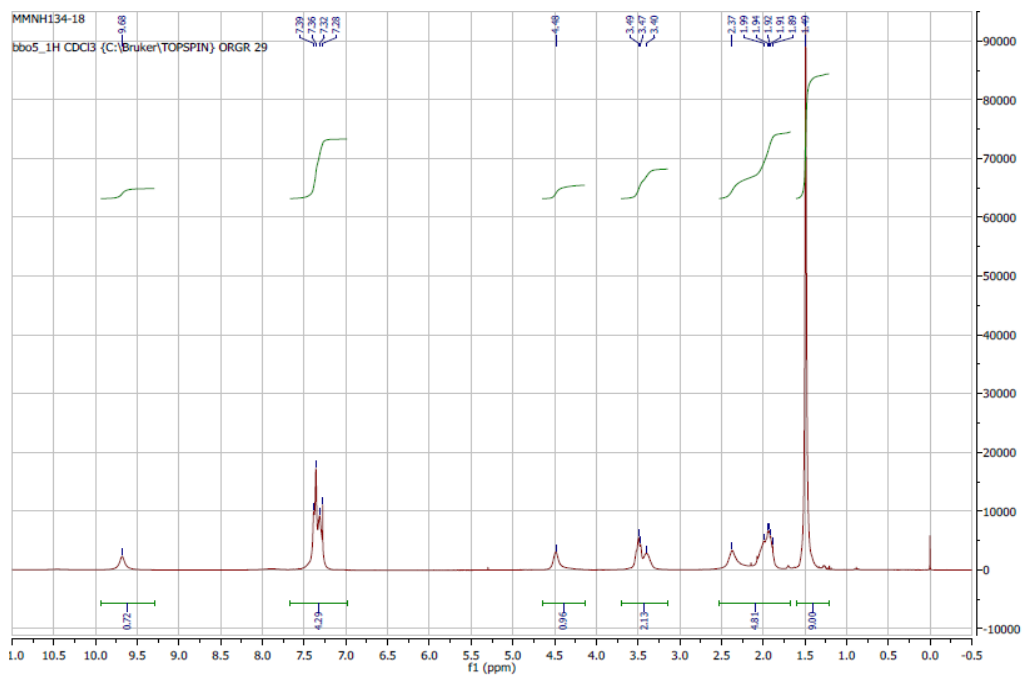
RMN ¹³C



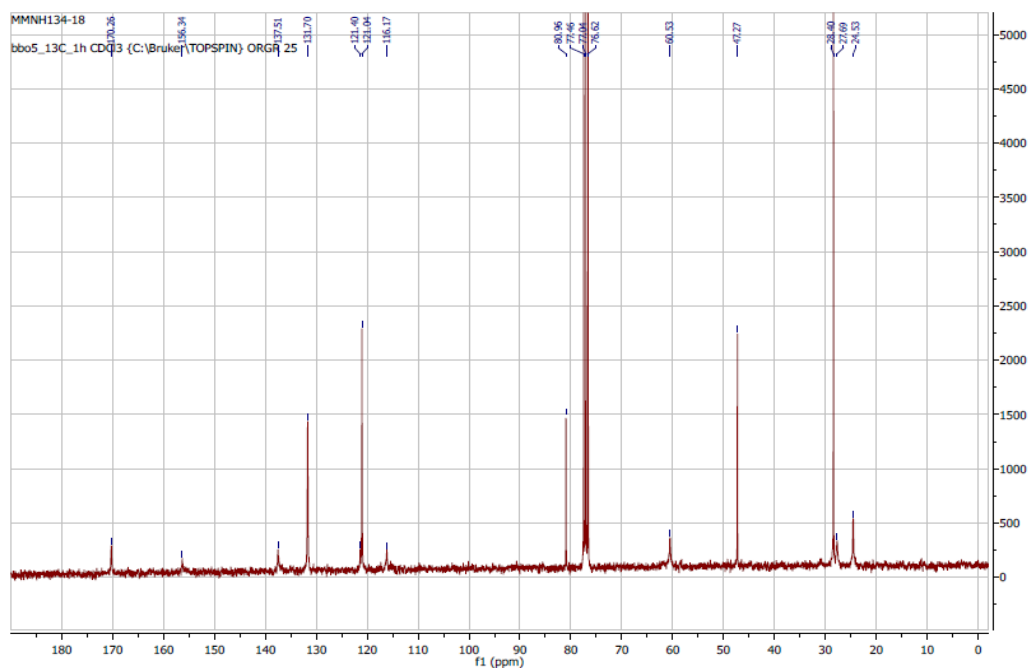
tert-butyl(*S*)-2-((4-bromophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate 5-A5

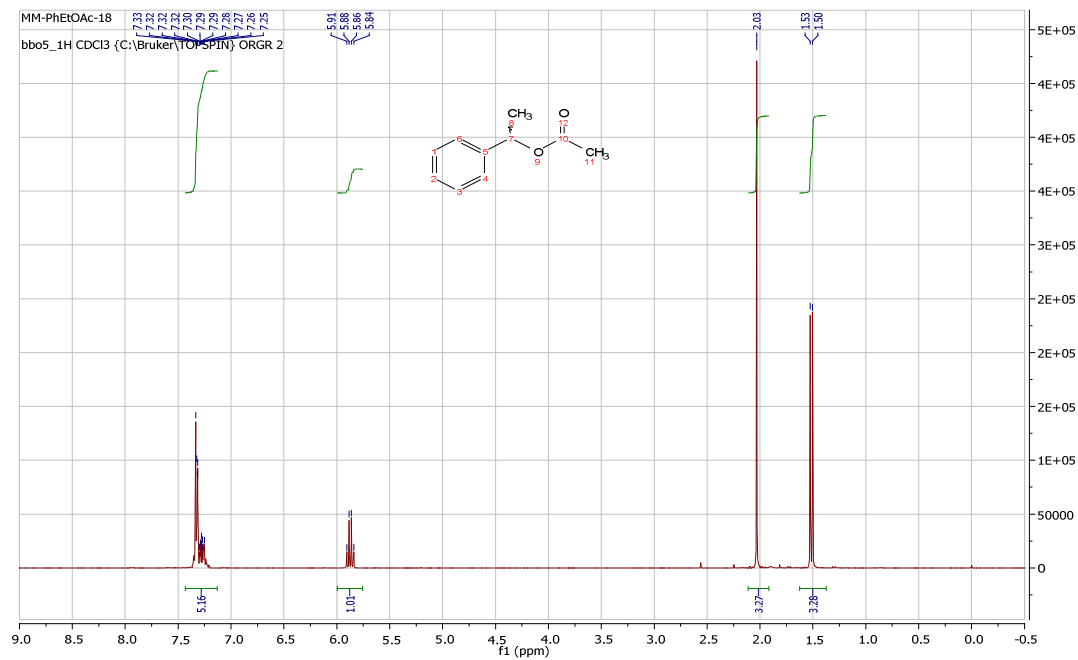
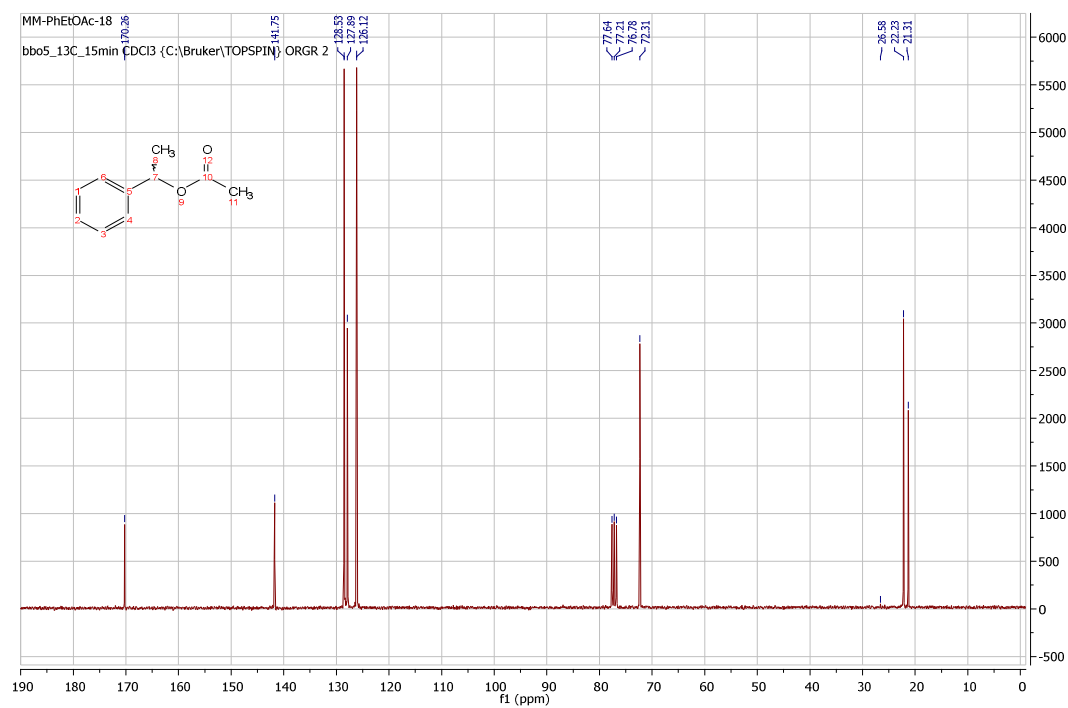


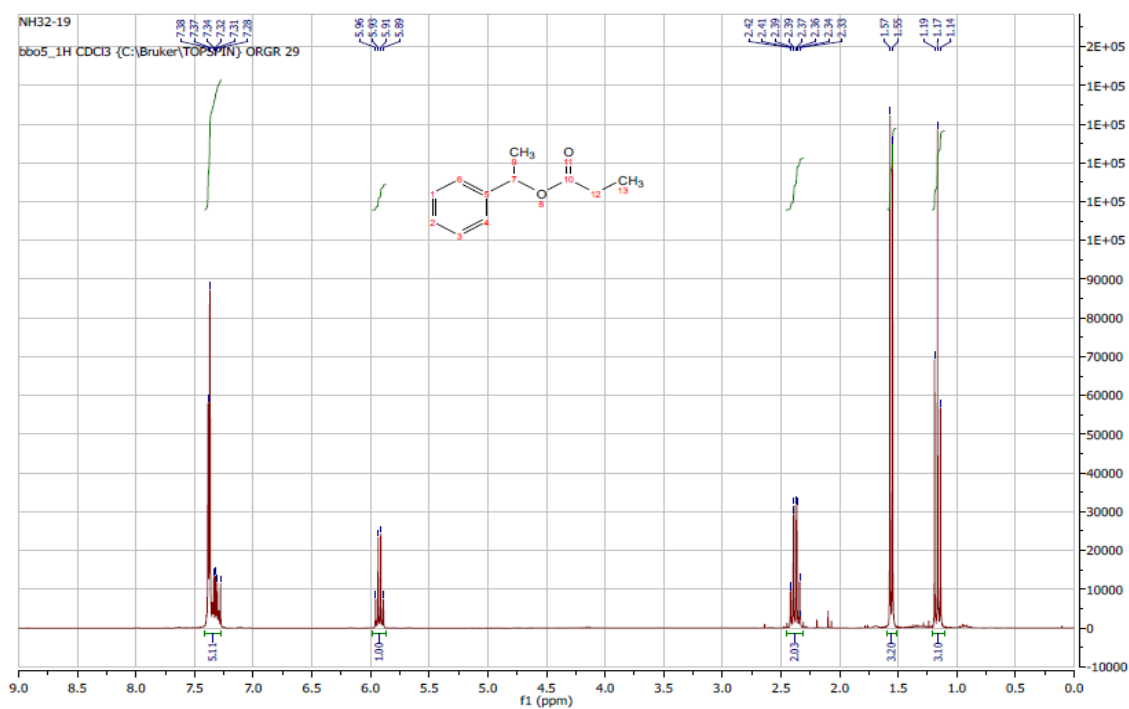
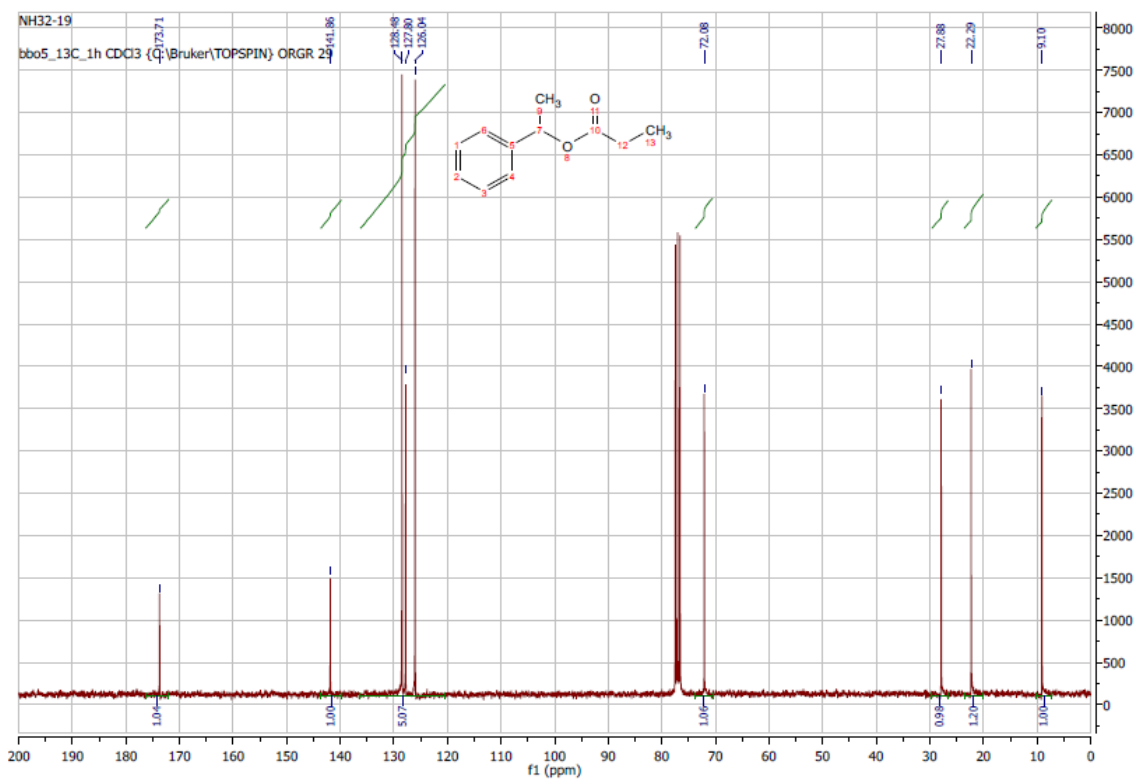
RMN ^1H

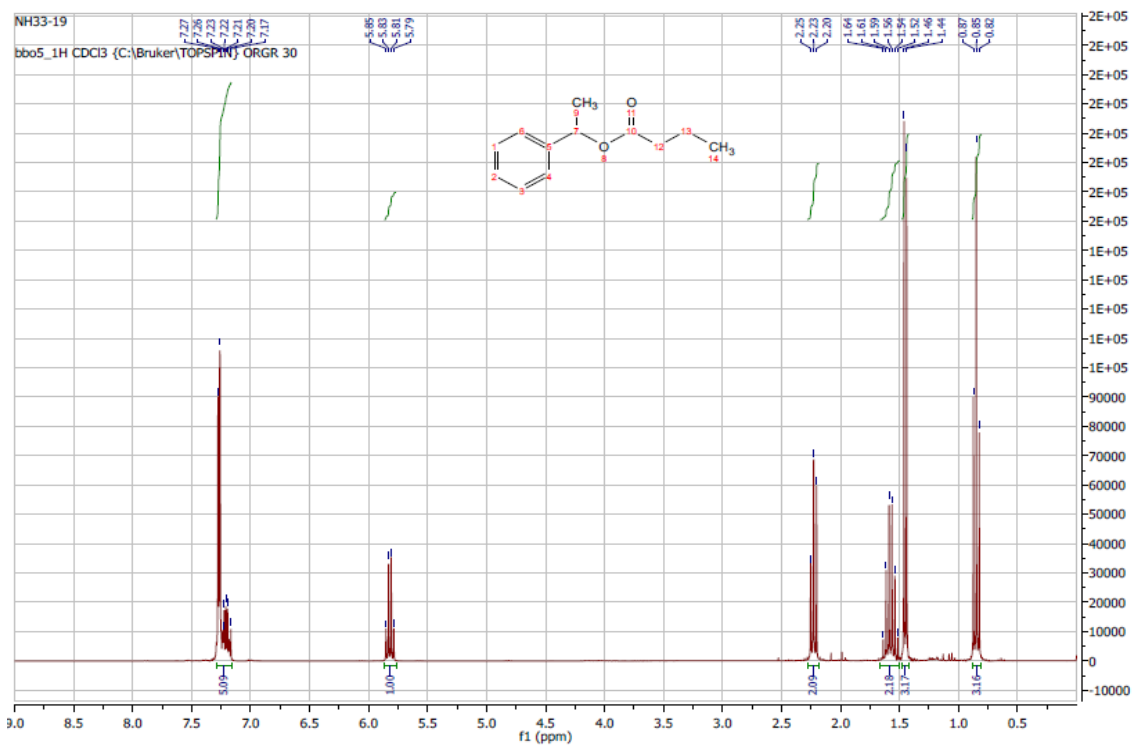
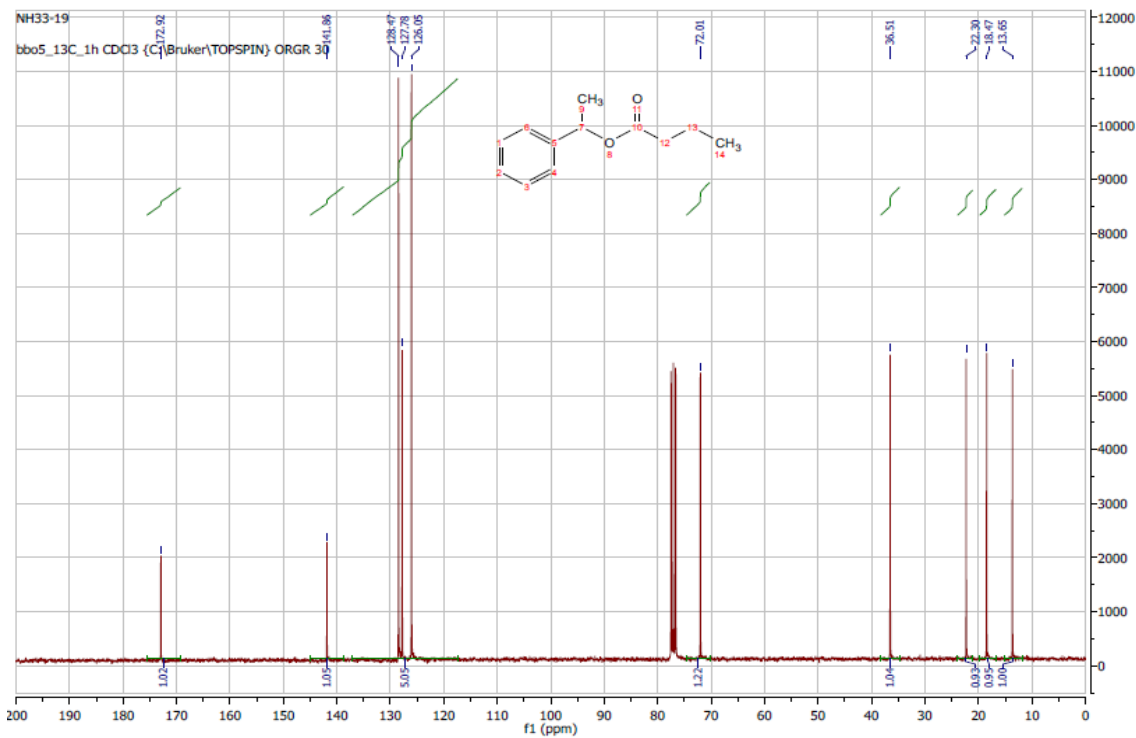


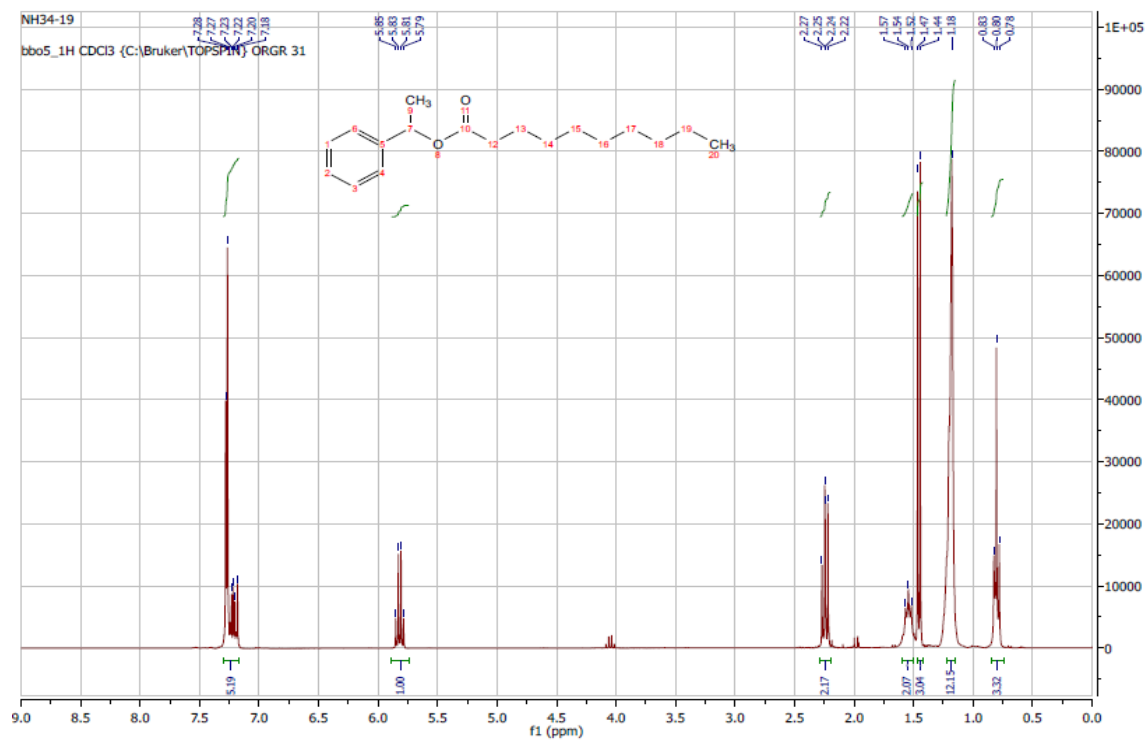
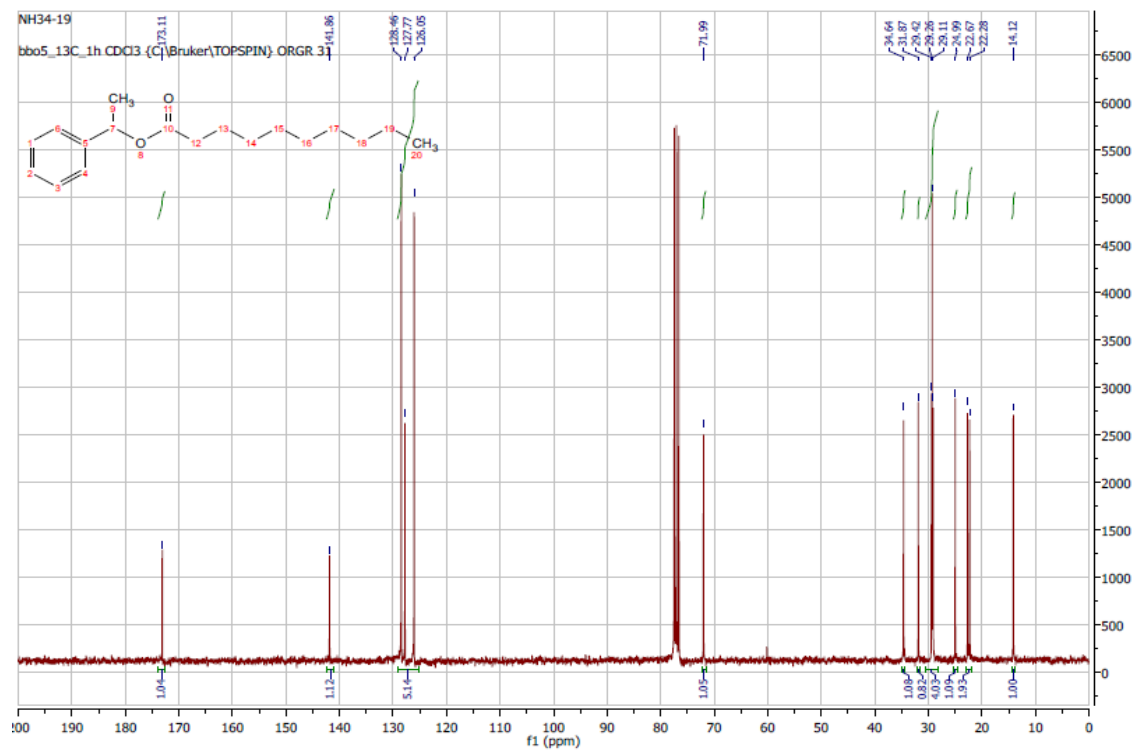
RMN ^{13}C

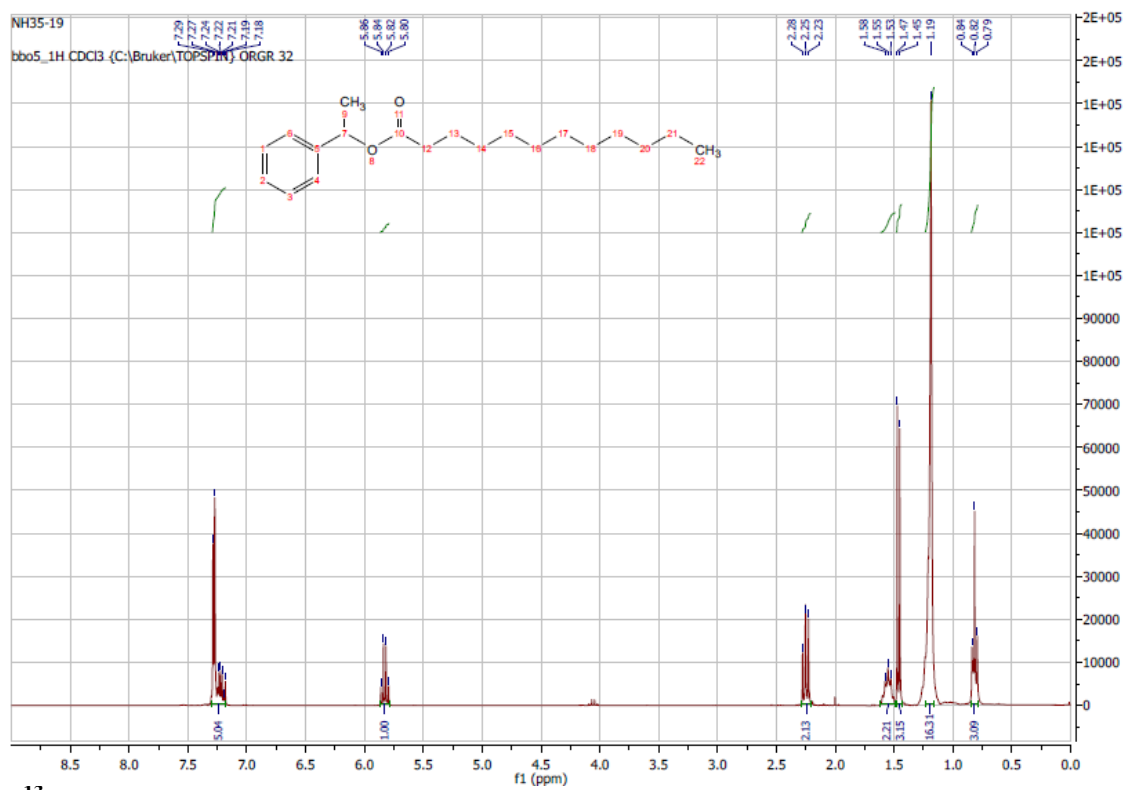
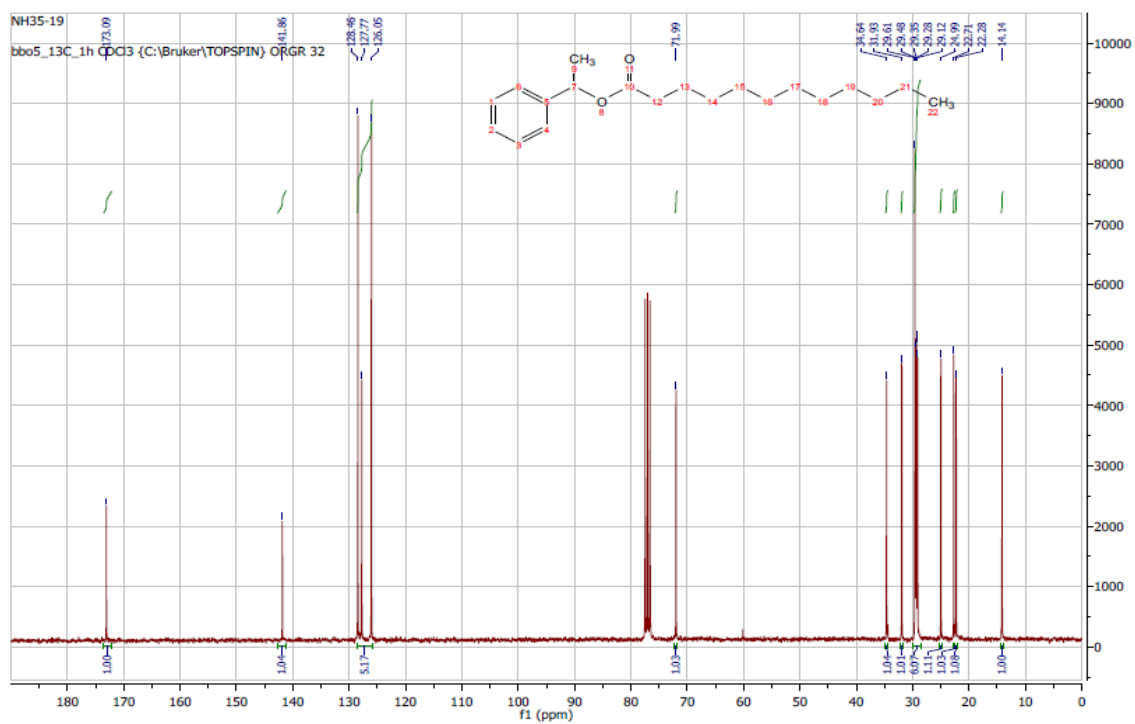


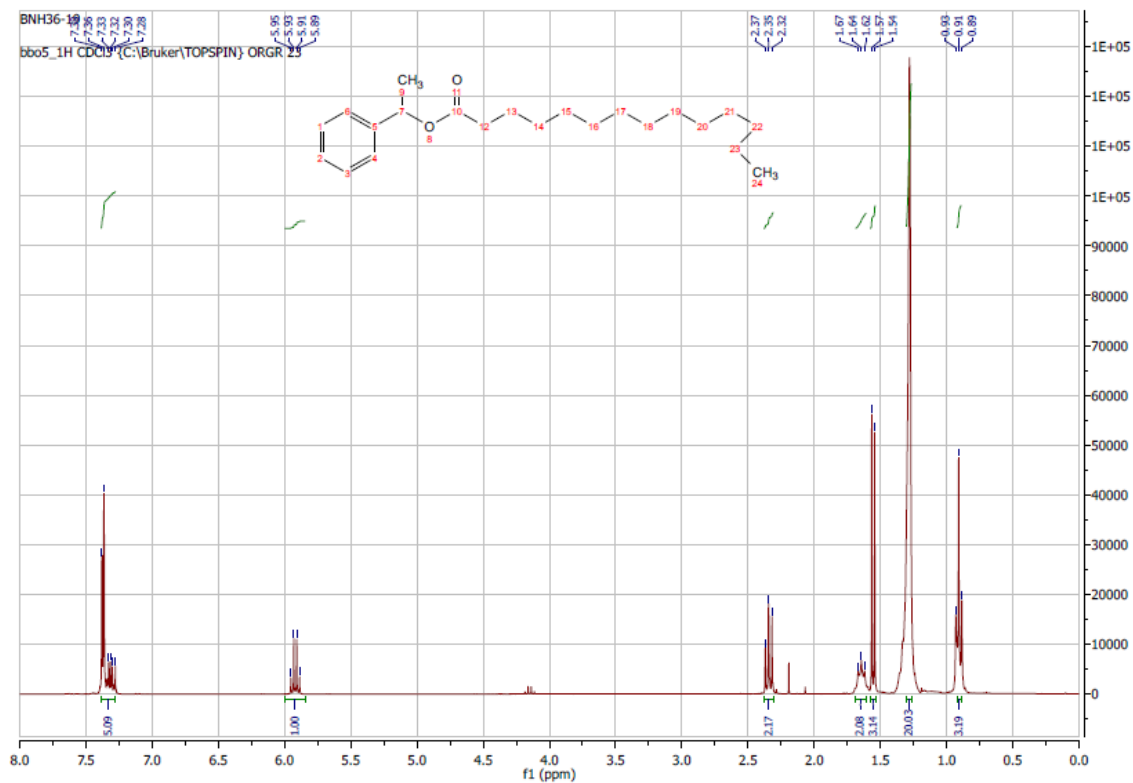
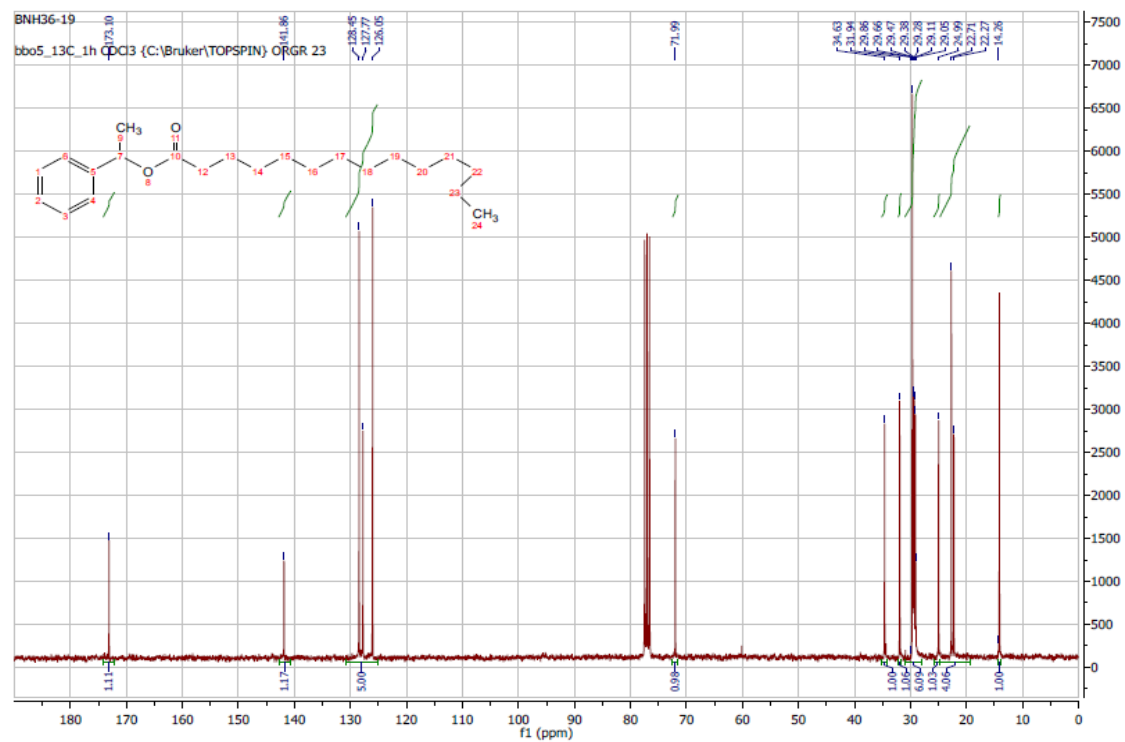
rac-1-phényl éthyl acétateRMN ¹HRMN ¹³C

(R)-1 -phényl éthylpropionate**RMN ¹H****RMN ¹³C**

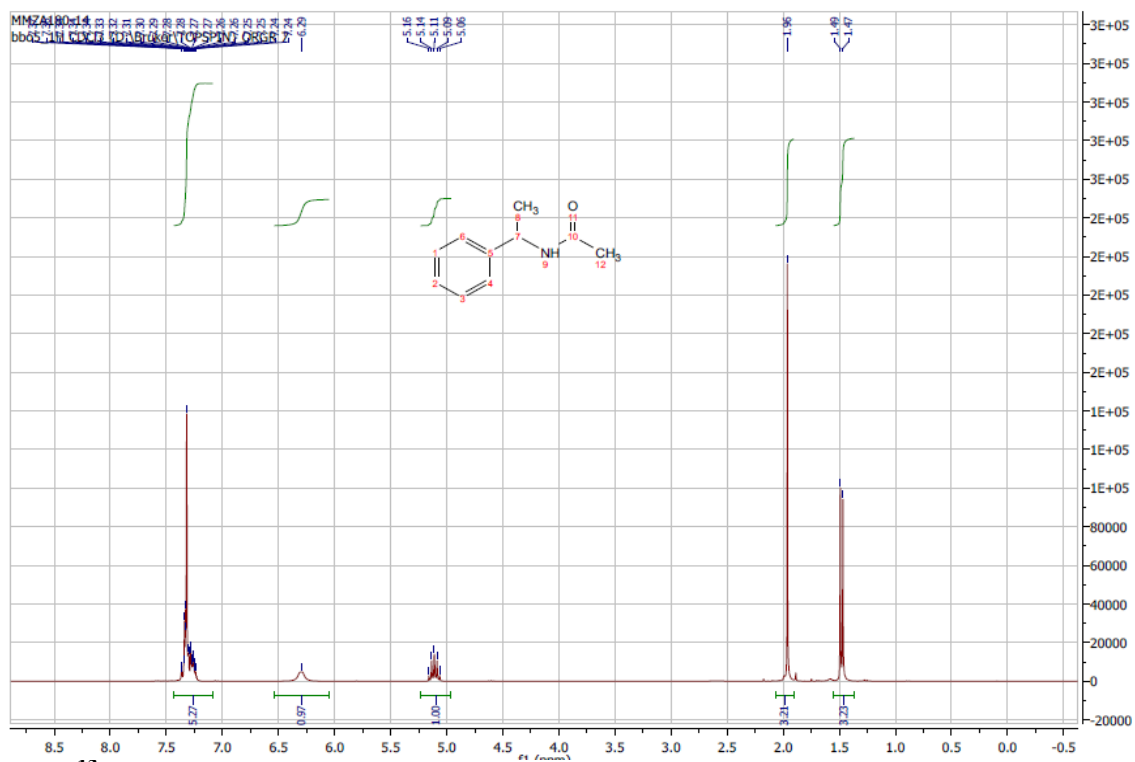
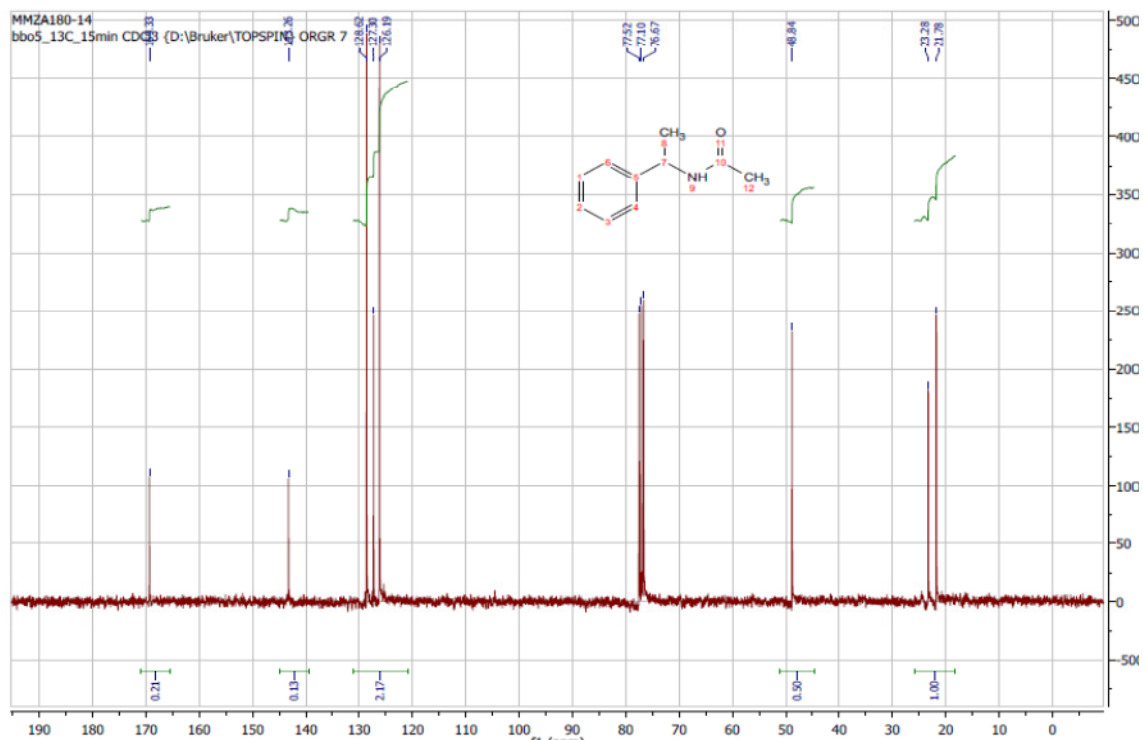
(R)-1- phényl éthyl butyrate**RMN ¹H****RMN ¹³C**

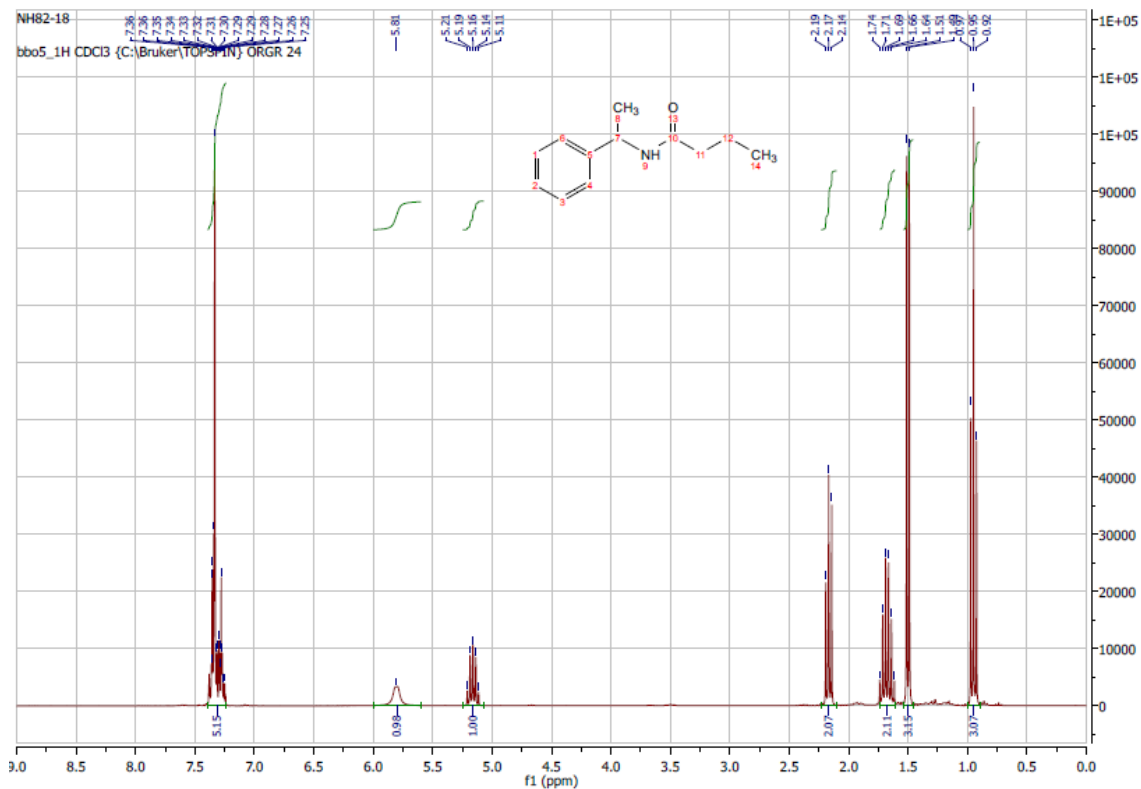
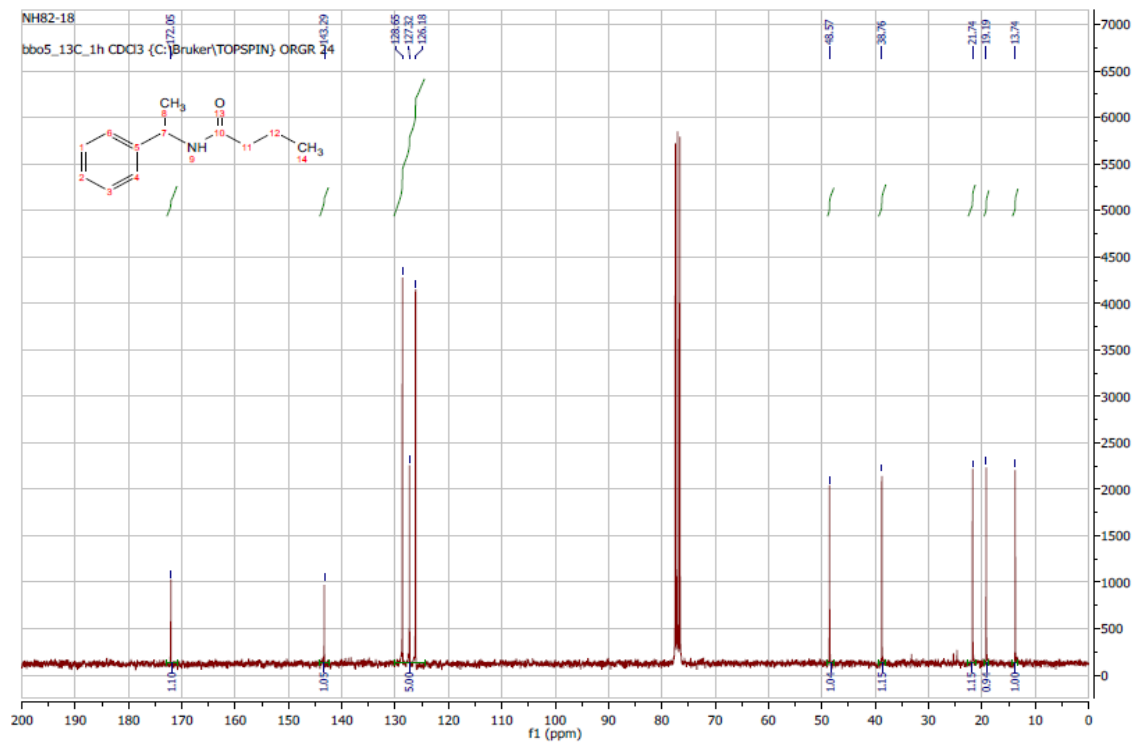
(R)-1-phenyl ethyl-décanoate**RMN ¹H****RMN ¹³C**

(R)-1-phenyl ethyl dodecanoateRMN ^1H RMN ^{13}C 

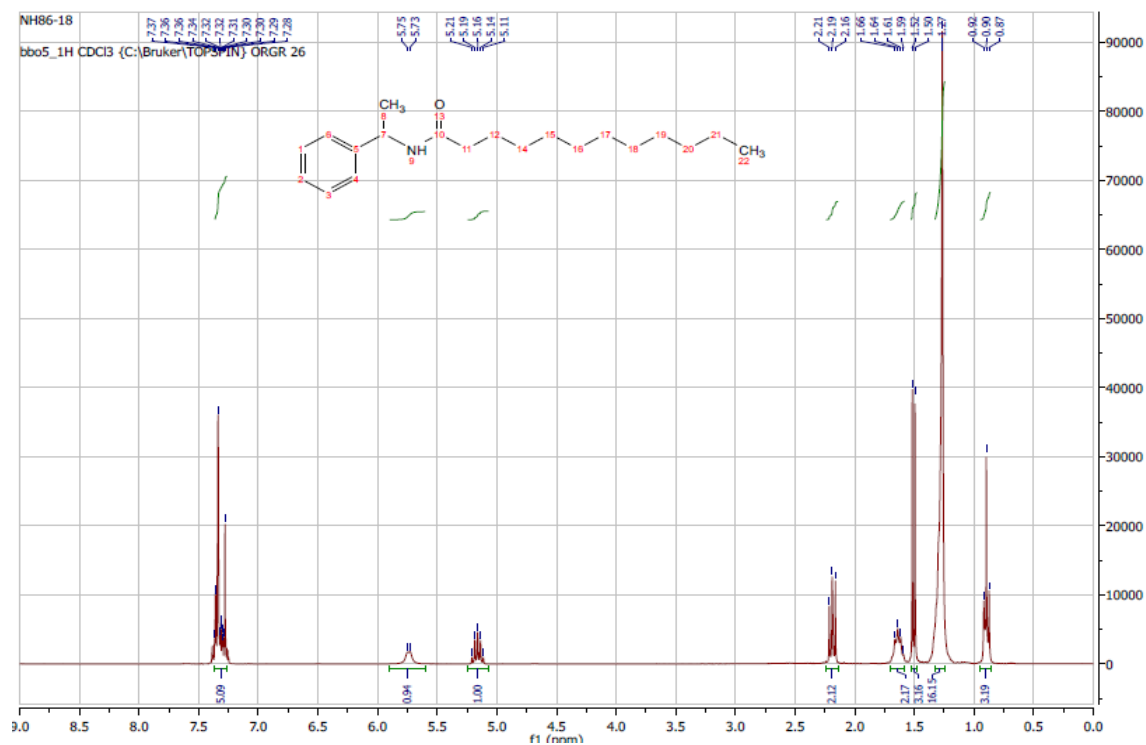
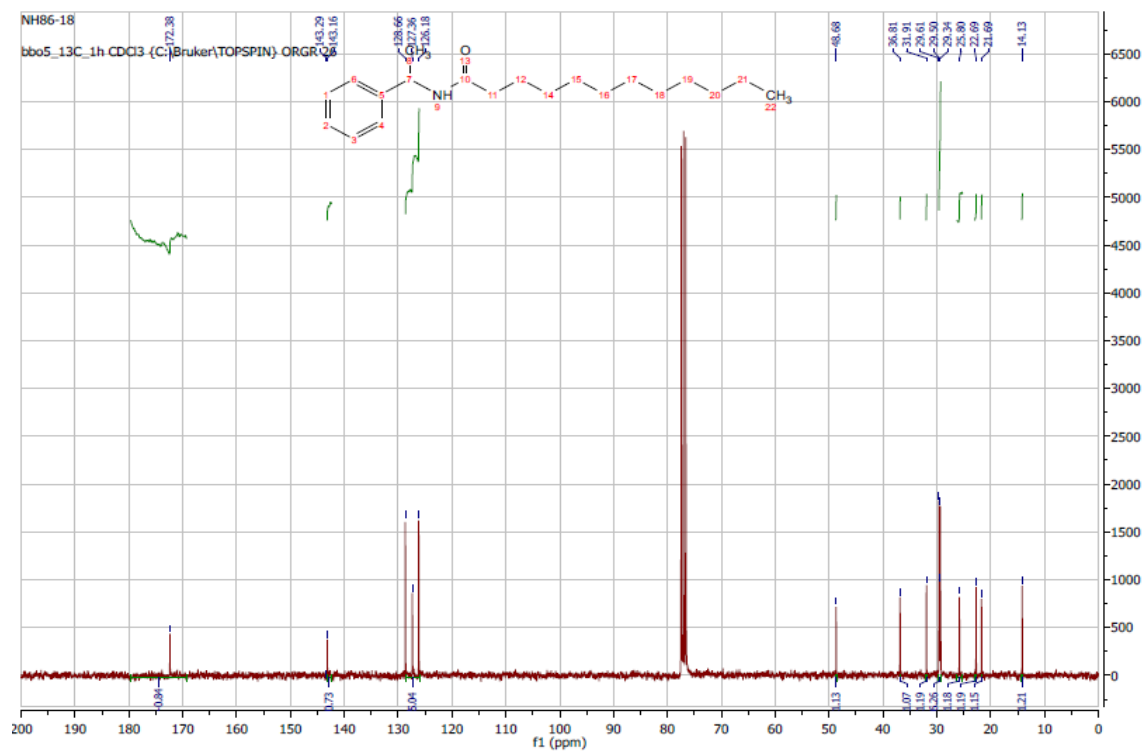
(R)-1-phenyl ethyl tétradécanoate**RMN ¹H****RMN ¹³C**

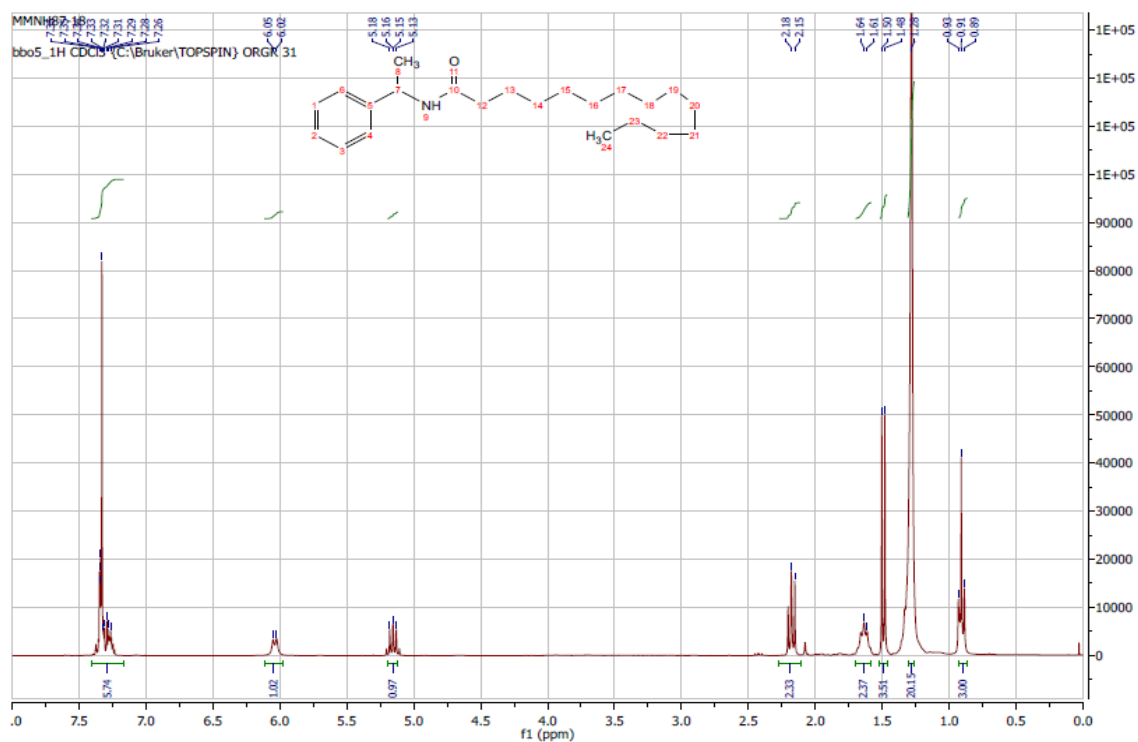
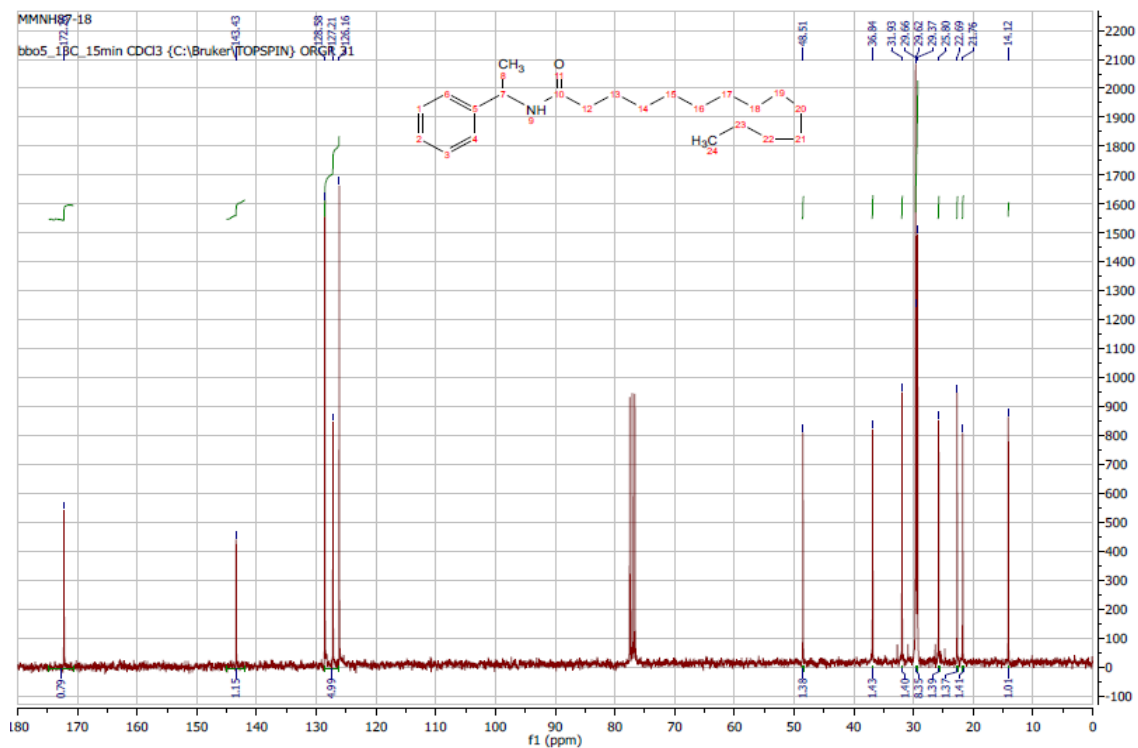
N-(1-phényl éthyl) acétamide

RMN ^1H RMN ^{13}C 

N-(1-phényl éthyl) butylamideRMN ¹HRMN ¹³C

N-(1-phényléthyl) dodécanamide

RMN ¹HRMN ¹³C

N*-(1-phényléthyl)tetradécanamide*RMN ¹H****RMN ¹³C**

Annexe 2 : *Publication*



CAL-B-mediated efficient synthesis of a set of valuable amides by direct amidation of phenoxy- and aryl-propionic acids

Nourelhouda Benamara¹ · Mounia Merabet-Khelassi¹ · Louisa Aribi-Zouiouèche¹ · Olivier Riant²

Received: 7 November 2020 / Accepted: 31 March 2021 / Published online: 10 April 2021
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2021

Abstract

An efficient, easy and sustainable amidation of a set of non-activated carboxylic acids with anilines, assisted by *CAL-B*, as biodegradable catalyst, is reported. The enzymatic amidation reactions are performed on set of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), phenoxypropionic acid and protected-prolines by direct condensation of one equivalent of carboxylic acids and two equivalents of anilines derivatives in heptane after 72 h of reaction at 80 °C. The obtained carboxylic amides are recovered with isolated chemical yields varied between moderate and excellent. Fourteen from them are reported for the first time, and an X-ray crystal is obtained for: *N*-(4-iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide **1d**.

Keywords *CAL-B* · NSAIDs prodrugs · Boc-proline · Direct amidation

Introduction

Amide bonds are a pivot unit in the elaboration and composition of biological systems, such peptides and proteins. Amides as high valuable molecules constitute versatile synthetic intermediates used in the manufacture of several pharmacological and biological active products, polymers, detergents, lubricants, food additives, flavors, nutrients and drug stabilizers (Greenberg et al. 2000; Lundberg et al. 2014; Lima and Porto 2017; Annunziata et al. 2020). The majority of industrial amidation are based on an activation of a carboxylic acid by a stoichiometric reagent followed by nucleophilic displacement with a free amine. This great importance leads to the American Chemical Society Green Chemistry Institute to identify amide formation avoiding poor atom economy process as a priority area of research for the pharmaceutical industry (Constable et al. 2007).

Hence, catalytic pathways were highlighted as a reaction of importance from a “green chemistry” perspective (Montalbetti and Falque 2005). On these lights, several works have been published, using various types of catalysts, for the direct condensation of a carboxylic acid and amine as environmentally benign solution with water as the unique side product (Zheng and Xu 2011; Lanigan and Sheppard 2013; De Figueiredo et al. 2016). Since biocatalysis fits very well with the principles of green chemistry and sustainability, it seems one of the most attractive, clean, sustainable and more eco-friendly pathways to the amide structures, especially for the production of active pharmaceutical ingredients (APIs) (Lundberg et al. 2012, 2017; Cheng et al. 2018; Chandra et al. 2020; Sheldon et al. 2020). Among that, hydrolytic enzymes, and especially lipases (triacylglycerol acyl hydrolases, EC.3.1.1.3) as biocatalysts, dominate the synthesis of amides from carboxylic acids and amines for their ease of use under mild conditions, recyclability, biodegradability and for their remarkable chemo-, regio- and enantioselectivity (Sheldon 2016; Arroyo et al. 2017). More recently, the use of lipases was extended to promiscuous reactions (Hult and Berglund 2007; Guezane-Lakoud et al. 2017; Aissa et al. 2019). The most commonly exploited lipases for the synthesis of primary, secondary and tertiary amides are the *Candida antarctica* lipase immobilized on acrylic resin (*CAL-B*) (Busto et al. 2010; Lima et al. 2019). This lipase is robust, highly active, thermostable, biodegradable, a facile recovery and recyclable, tolerance for polar and non-polar

✉ Mounia Merabet-Khelassi
mounia.merabet@gmail.com;
mounia.merabet@univ-annaba.dz

¹ Ecocompatible Asymmetric Catalysis Laboratory (L.C.A.E), Badji Mokhtar Annaba-University, B.P. 12, 23000 Annaba, Algeria

² Institute of Condensed Matter and Nanosciences Molecules, Solids and reactiviTy (IMCN/MOST), Université Catholique de Louvain, Bâtiment Lavoisier. Pl. Louis Pasteur, 1, bte 3. 1348, Louvain La Neuve, Belgium

solvents and broad range of substrates accommodation. It is also environmentally benign making it attractive for wide applications in several domains (Kourist et al. 2011; José et al. 2016; Alalla et al. 2016; Belkacemi et al. 2017; Braia et al. 2018). Under various reaction conditions, respecting some green chemistry criteria's, the *CAL-B*-catalyzed amidation has been reported for the synthesis of achiral or enantiopure amides and amines widely used as biopolymers, building block compounds and drugs (Nechab et al. 2007; Kaushik et al. 2015; Mouad et al. 2016; Lima et al. 2017; Manova et al. 2018).

Previously, we have reported a clean and eco-compatible pathway for both *N*-benzoylation and *N*-acetylation of anilines, amines, diamines and aminoalcohols using activated enol-esters, under free catalyst conditions (Alalla et al. 2014).

In the present paper, we describe our study on the enzymatic amidation of some 2-aryl-propionic acids (profens) with aniline as the nitrogen source. This family of molecules considered as one of the most important non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The amidation of a phenoxypropionic acid and some protected-prolines is also reported. At the best of our knowledge, the application of this approach for the amidation of profens has never described yet by others.

Materials and methods

General information

All starting materials and reagents used in this study were obtained commercially from Sigma-Aldrich, Acros, TCI or Alfa Aesar and were used as received. The *Candida antarctica* lipase immobilized on acrylic resin *CAL-B* was purchased from Sigma-Aldrich. Specific activity >10,000 U/g was used without any pre-treatment. All reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mmE. Merck silica gel plates (60F-254) use UV light (254 nm) as the visualizing agent and ninhydrine solution and heat as developing agents.

NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers (300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C). Chemical shifts are reported in δ ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard for ^1H NMR and chloroform-*d* (δ 77.0 ppm) for ^{13}C NMR. Coupling constants (*J*) are given in hertz. The following abbreviations classify the multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad signal. The mass spectra were obtained from the mass-service at Université catholique de Louvain (FINNIGAN-MAT TSQ 7000 and FINNIGAN-MAT LQC spectrometers). Conversions were evaluated by measuring of enantiomeric excesses

by a chiral stationary phase HPLC on Chiralcel®OJ-H (4.6 × 250 mm), Chiralpak®OD-H 4.6 × 250 mm, Chiralpak®IC (4.6 × 250 mm), Chiralpak®IA (4.6 × 250 mm) and Chiralpak®IB 4.6 × 250 mm column. Retention times are reported in minutes. Optical rotations were determined using a MCP100 polarimeter at room temperature using a cell of 1-dm length and $\lambda = 589$ nm.

Enzymatic amidation of non-activated carboxylic acids

To a solution of 2 mmol amine and the 1 mmol carboxylic acid dissolved in 1 mL of heptane, 50 mg of the molecular sieves 4 Å and 50 mg of the immobilized *CAL-B* are introduced. The reaction mixture is stirred at 80 °C for 72 h. After cooling, the solvent is evaporated and the crude residue was exposed to a standard acido-basic treatment (HCl, 3 M/3 M NaOH). The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was crystallized in hexane, or purified by flash chromatography if necessary. As a control reaction, the same procedure is followed without introducing lipase. All the synthesized amides are characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR spectra and HRMS. Melting points were determined. Separation conditions on chiral HPLC were established. Optical rotations of proline amides **4a–5e** were measured.

2-(4-Isobutylphenyl)-N-phenylpropanamide (1a)

White solid. mp: 151 °C. Yield: 40%. $R_f = 0.52$ (CH_2Cl_2). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35–7.33 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.22–7.15 (m, 4H), 7.08–6.95 (m, 4H), 3.65–3.5 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.41–2.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.83–1.72 (m, 1H), 1.52–1.5 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.84–0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.6 (C=O amide), 141.1, 138.0, 137.9, 129.8, 128.9, 127.4, 124.1, 119.6, 47.7, 45.0, 30.2, 22.4, 18.5. HRMS (ESI+) m/z (found): 304.1675, Calculated: 304.16718.

2-(4-Isobutylphenyl)-N-(p-tolyl)propanamide (1b)

White solid. mp: 115 °C. Yield: 90%. $R_f = 0.41$ (CH_2Cl_2). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.23–7.16 (m, 4H), 7.16 (bs, 1H), 7.07–7.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.98–6.96 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.63–3.56 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.39–2.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.19 (s, 3H); 1.82–1.69 (m, 1H), 1.50–1.48 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.83–0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.5 (C=O amide), 140.9, 138.2, 135.4, 133.7, 129.8, 129.3, 127.4, 119.7, 47.6, 45, 33.9, 30.2, 25.6, 25, 22.4, 20.8, 18.5. HRMS (ESI+) m/z (found): 296.20071, Calculated: 296.20089.

2-(4-Isobutylphenyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide (1c)

White crystalline solid. mp: 140 °C. Yield: 72%. $R_f = 0.37$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.48–7.41 (q, $J = 9$ Hz, 4H), 7.32 (bs, 1H), 7.19–7.03 (m, 4 H), 3.68–3.61 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.41–2.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.84–1.75 (m, 1H), 1.53–1.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.85–0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.9 (C=O amide), 140.9, 139.9, 136.5, 128.9, 128.2, 126.3, 126, 125.1, 125, 121.2, 118.1, 124.6, 59.6, 46.7, 43.9, 29.1, 21.3, 17.4, 13. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 350.17251, **Calculated:** 350.17263.

N-(4-Iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (1d)

White crystalline solid. mp: 131 °C. Yield: 55%. $R_f = 0.82$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49–7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.24–6.93 (m, 7H), 3.63–3.56 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.41–2.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.83–1.48 (m, 1H), 1.53–1.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.84–0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.9 (C=O amide), 140.5, 137, 136.9, 129.2, 126.6, 120.7, 86.1, 47, 44.2, 29.4, 21.6, 17.7. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 408.08187, **Calculated:** 408.08188.

N-(4-Bromophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (1e)

White crystalline solid. mp: 124 °C. Yield: 50%. $R_f = 0.85$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.51–7.10 (m, 8H), 7.06 (bs, 1H), 3.74–3.67 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.51–2.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.93–1.84 (m, 1H), 1.62–1.59 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.94–0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 172.5 (C=O amide), 141.2, 137.7, 136.9, 131.8, 129.9, 127.4, 121.1, 47.7, 45, 30.1, 22.3, 18.4. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 360.09582, **Calculated:** 360.09575.

N-(4-Chlorophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (1f)

White crystalline solid. mp: 113 °C. Yield: 45%. $R_f = 0.84$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.31–7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.24–6.93 (ddd, $J = 19.2, 13.8, 8.2$ Hz, 7H), 3.65–3.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.42–2.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.84–1.75 (m, 1H), 1.52–1.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.85–0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 172.7 (C=O amide), 141.2, 137.8, 129.9, 129.1, 128.8, 127.4, 120.9, 136.4, 47.7, 45, 30.2, 22.4, 18.4. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 316.14623, **Calculated:** 316.14627.

2-(4-Isobutylphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)propanamide (1g)

White crystalline solid. mp: 100 °C. Yield: 60%. $R_f = 0.64$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28–7.20 (m, 4H), 7.11–7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.94 (bs, 1H), 6.77–6.74 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.66–3.59 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.43–2.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.86–1.77 (m, 1H), 1.55–1.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.87–0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 172.4 (C=O amide), 156.2, 141, 138.1, 131, 129.8, 127.4, 121.4, 114, 55.4, 47.5, 45, 30.2, 22.4, 18.5. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 312.19586, **Calculated:** 312.19581.

N-Benzyl-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (1 h)

White powder. mp: 49 °C. Yield: 34%. $R_f = 0.21$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29–7.12 (m, 9H), 5.66 (bs, 1H), 4.43–4.41 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.64–3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.49–2.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.91–1.82 (m, 1H), 1.59–1.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.93–0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 174.3 (C=O amide), 140.8, 138.4, 129.6, 128.5, 127.3, 127.3, 46.8, 45, 43.5, 30.2, 22.3, 18.4. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 318.1828, **Calculated:** 318.18283 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NONa}$).

2-(3-Benzoylphenyl)-N-phenylpropanamide (2a)

White solid. mp: 90 °C. Yield: 30%. $R_f = 0.11$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82–7.06 (m_a , 15H), 3.78 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.60 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 196.6 (C=O Benzoyl-), 171.7 (C=O amide), 153.8, 141.8, 141.6, 138.1, 137.8, 137.3, 132.6, 132.5, 131.4, 131.3, 130.08, 130.03, 129.3, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.3, 128.3, 124.3, 119.8, 50.1, 47.9, 45.2, 32.7, 32.5, 31.1, 30.6, 26.1, 26.1, 25.4, 25.2, 24.7, 20.5, 18.8. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 330.148, **Calculated:** 330.14886.

2-(3-Benzoylphenyl)-N-(p-tolyl)propanamide (2b)

White solid. mp: 118 °C. Yield: 25%. $R_f = 0.11$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.75–7.71 (m, 3H), 7.64–7.50 (m, 3H), 7.43–7.38 (m, 3H), 7.27–7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.03–7.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 3.72–3.65 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.55–1.53 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 196.6 (C=O Benzoyl-), 171.6 (C=O amide), 156.8, 141.6, 138, 137.3, 135.2, 133.9, 132.6, 131.5, 130, 129.4, 129.3, 129.2, 128.9, 128.3, 119.9, 47.8, 25.5,

24.9, 18.8. **HRMS (ESI+) m/z (found):**247.1783, **Calculated:** 247.17808.

2-(2-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-phenylpropanamide (3a)

White solid. mp: 177 °C. Yield: 60%. $R_f = 0.48$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50–7.03 (m_a , 14H), 3.70–3.63 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.57–1.55 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.6 (C=O amide), 141.4, 136.8, 134.4, 130.4, 128.1, 128.09, 128.05, 127.6, 126.9, 123.6, 122.7, 118.9, 114.6, 114.3, 46.7, 17.8. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 320.14450, **Calculated:** 320.14452.

2-(2-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-N-(p-tolyl)propanamide (3b)

White crystalline solid. mp: 128 °C. Yield: 66%. $R_f = 0.47$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49–7.01 (m_a , 13H), 3.69–3.61 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.56–1.54 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171.5 (C=O amide), 142.4, 142.3, 135.3, 135.14, 134.13, 131.2, 129.4, 128.96, 128.92, 128.5, 127.7, 123.6, 119.9, 115.5, 115.2, 47.5, 20.8, 18.6. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 334.16004, **Calculated:** 334.16017.

2-Phenoxy-N-phenylpropanamide (4a)

White solid. mp: 120 °C. Yield: 89%. $R_f = 0.48$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (bs, 1H), 7.48–7.45 (m, 2H), 7.28–7.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.08–6.90 (m, 4H), 4.75–4.68 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.60–1.58 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.2 (C=O amide), 156.7, 137, 129.9, 129, 124.7, 122.4, 119.96, 115.7, 76.6, 18.7. **HRMS (ESI+) m/z (found):**264.0996, **Calculated:** 264.0995.

2-Phenoxy-N-(p-tolyl) propanamide (4b)

White solid. mp: 117 °C. Yield: 85%. $R_f = 0.41$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (bs, 1H), 7.36–7.18 (m, 4H), 7.06–6.89 (m, 5H), 4.74–4.67 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.59–1.57 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.1 (C=O amide), 156.7, 134.5, 134.3, 129.9, 129.5, 122.4, 120, 115.7, 75.4, 20.9, 18.7. **HRMS (ESI+) m/z (found):**278.1154, **Calculated:** 279.11515 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N O}_2\text{Na}$).

2-Phenoxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propanamide (4c)

White solid. mp: 123 °C. Yield: 92%. $R_f = 0.11$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.31 (bs, 1H), 7.63–7.50 (dd, $J = 32.2$ & 8.6 Hz, 4H), 7.30–7.19 (dt, $J = 18.8$ & 12.1 Hz,

2H), 7.02–6.90 (m, 3H), 4.78–4.71 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.61–1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.6 (C=O amide), 156.5, 140.1, 130, 126.3, 126.2, 122.7, 119.5, 115.8, 75.4, 18.6. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 332.0869, **Calculated:** 332.08688 [$\text{M} + \text{Na}$] + ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N O}_2\text{F}_3\text{Na}$).

N-(4-Methoxyphenyl)-2-phenoxypropanamide (4d)

White crystalline solid. mp: 127 °C. Yield: 90%. $R_f = 0.50$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (bs, 1H), 7.37–7.34 (m, 2H), 7.27–7.18 (m, 2H), 6.98–6.88 (m, 3H), 6.79–6.76 (m, 2H), 4.73–4.67 (q, $J = 6.7$ Hz), 3.70 (s, 3H), 1.59–1.57 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.6 (C=O amide), 156.7, 156.6, 130.1, 129.9, 122.4, 121.7, 115.7, 114.1, 75.4, 55.4, 18.7.

N-(4-Iodophenyl)-2-phenoxypropanamide (4e)

White crystalline solid. mp: 147 °C. Yield: 98%. $R_f = 0.92$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (bs, 1H), 7.56–7.53 (m, 2H), 7.28–7.23 (m, 4H), 7.08–6.88 (m, 3H), 4.74–4.67 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.59–1.56 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.3 (C=O amide), 156.5, 137.9, 136.8, 129.9, 122.6, 121.8, 115.7, 88, 75.4, 18.6. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 368.01409, **Calculated:** 368.01420.

N-(4-Bromophenyl)-2-phenoxypropanamide (4f)

White crystalline solid. mp: 132 °C. Yield: 80%. $R_f = 0.88$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (bs, 1H), 7.39–7.17 (m, 6H), 6.99–6.87 (m, 3H), 4.73–4.66 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.58–1.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 169.1 (C=O amide), 155.3, 134.9, 130.7, 121.3, 120.3, 116.1, 114.5, 128.7, 74.2, 17.4. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 320.02809, **Calculated:** 320.02807.

N-(4-Chlorophenyl)-2-phenoxypropanamide (4g)

White crystalline solid. mp: 137 °C. Yield: 87%. $R_f = 0.83$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (bs, 1H), 7.43–7.40 (m, 1H), 7.27–7.18 (m, 4H), 6.99–6.87 (m, 3H), 4.73–4.66 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.57–1.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.3 (C=O amide), 156.6, 135.6, 129.9, 129.6, 129, 122.5, 121.2, 115.7, 135.6, 75.4, 18.6. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 276.07867, **Calculated:** 276.07858.

N-Benzyl-2-phenoxypropanamide (4h)

White solid. mp: 220 °C. Yield: 64%. $R_f = 0.16$ (CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (bs, 1H), 7.43–7.40 (m,

1H), 7.27–7.18 (m, 4H), 6.99–6.87 (m, 3H), 4.73–4.66 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.57–1.55 (d, $J=6.8$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.3 (C=O amide), 156.6, 135.6, 129.9, 129.6, 129, 122.5, 121.2, 115.7, 135.6, 75.4, 18.65. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 279.20659, **Calculated:** 279.20635.

Tert-butyl (S)-2-(phenylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (5a)

White crystalline solid. mp: 187 °C. Yield: 52%. $R_f=0.28$ (AcOEt/Petroleum Ether: 2/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.49 (bs, 1H), 7.54–7.51 (dd, $J=8.6, 1.0$ Hz, 2H), 7.30–7.28 (m, 2H), 7.08 (bs, 1H), 4.48 (bs, 1H), 3.46 (bs, 2H), 2.52–1.80 (m, 4H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.9 (C=O amide), 156.56, 138.3, 128.9, 123.8, 119.65, 80.9, 60.5, 47.2, 28.3, 27.1, 24.5. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 291.17023 **Calculated:** 291.17032. $[\alpha]_D^{20}$ (c 1, CH_2Cl_2) – 147.3 (– 147.3; Litt: – 140.9 (Doherty et al. 2008; Kanemitsu et al. 2012)).

Tert-butyl (S)-2-(p-tolylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (5b)

White crystalline solid. mp: 181 °C. Yield: 72%. $R_f=0.28$ (AcOEt/Petroleum Ether: 2/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.37 (bs, 1H), 7.42–7.10 (m, 4H arm), 4.46 (bs, 1H), 3.46 (bs, 2H), 2.52–1.94 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.7 (C=O amide), 135.7, 134.9, 129.4, 119.6, 80.8, 60.4, 47.1, 28.3, 24.3, 20.8. **HRMS (ESI+) m/z (found):**305.18571, **Calculated:** 305.18597. $[\alpha]_D^{20}$ (c 1, CH_2Cl_2) – 111.7

Tert-butyl(S)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (5c)

White crystalline solid. mp: 185 °C. Yield: 72%. $R_f=0.35$ (AcOEt/Petroleum Ether: 2/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.92 (bs, 1H), 7.59–7.46 (m, 4H), 4.53 (bs, 1H), 3.53–3.42 (m, 2H), 2.42–1.96 (m, 4H), 1.52 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.7 (C=O amide), 156.3, 166.7, 141.5, 129.5, 122.3, 118.9, 100.2, 125.9, 81, 60.5, 47.3, 28.4, 27.6, 24.5. **HRMS (ESI+) m/z (found):**359.15763, **Calculated:** 359.15770. $[\alpha]_D^{20}$ (c 1, CH_2Cl_2) – 127.5

Tert-butyl (S)-2-((4-chlorophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (5d)

White crystalline solid. mp: 185 °C. Yield: 58%. $R_f=0.28$ (AcOEt/Petroleum Ether: 2/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.66 (bs, 1H), 7.45–7.21(m, 4H), 4.48 (bs, 1H), 3.50–3.40 (m, 2H), 2.43–1.80 (m, 4H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.2 (C=O amide), 156.3,

128.7, 120.6, 137, 80.9, 60.4, 47.2, 28.4, 27.6, 24.5. **HRMS (ESI+) m/z (found):**325.13137, **Calculated:** 325.13135. $[\alpha]_D^{20}$ (c 1, CH_2Cl_2) – 101.9

Tert-butyl (S)-2-((4-bromophenyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (5e)

Brown crystalline solid. mp: 193 °C. Yield: 60%. $R_f=0.28$ (AcOEt/Petroleum Ether: 2/8). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.68 (bs, 1H), 7.39–7.28 (m, 4H), 4.48 (bs, 1H), 3.49–3.40 (m, 2H), 2.37–1.89 (m, 4H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.2 (C=O amide), 156.3, 137.5, 131.7, 121, 116.1, 121.4, 80.9, 60.5, 47.2, 28.4, 27.6, 24.5. **HRMS (ESI+) m/z (found):** 391.06272, **Calculated:** 391.06278 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2$ ^{79}Br ^{23}Na). $[\alpha]_D^{20}$ (c 1, CH_2Cl_2) – 92.1

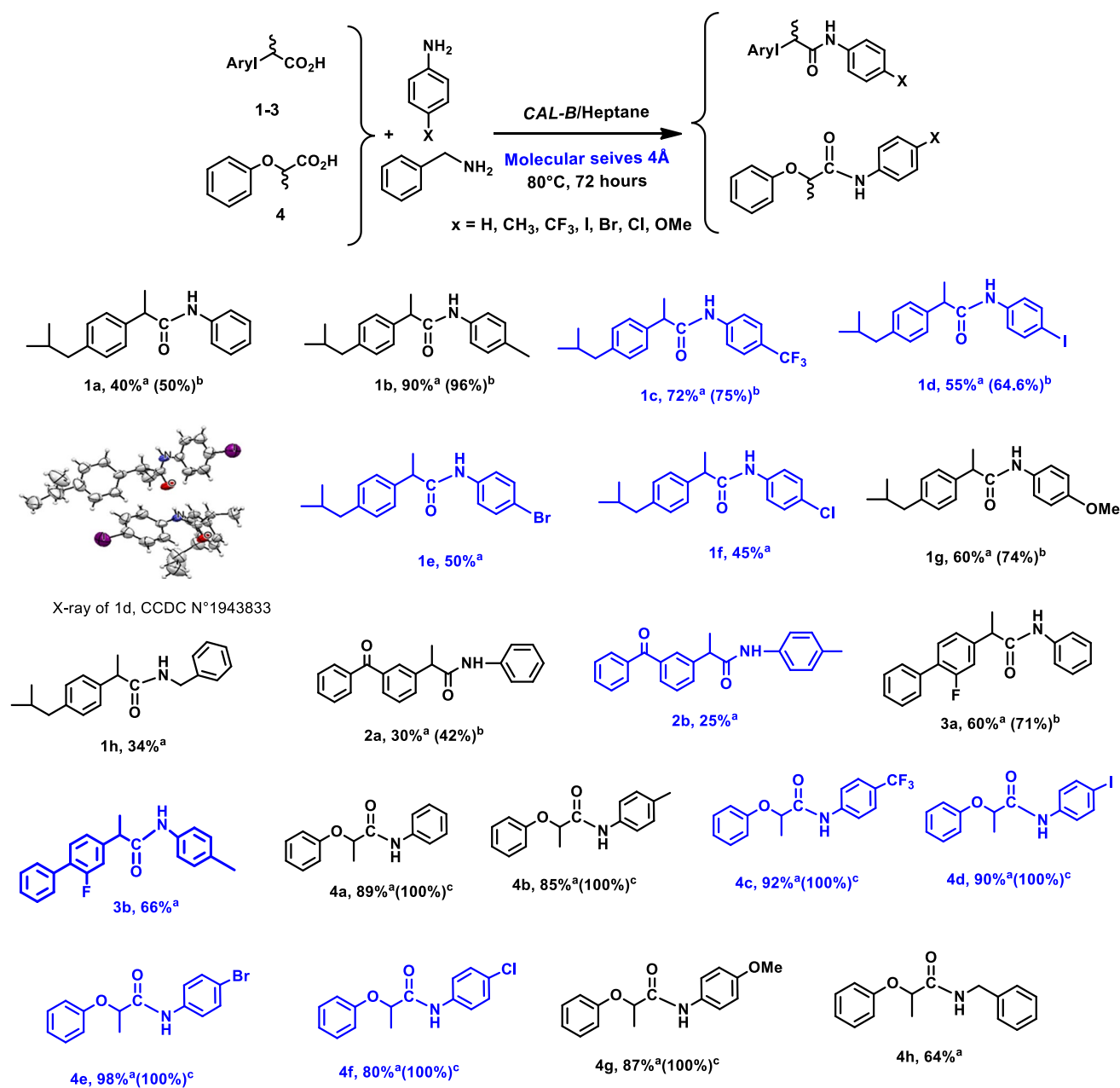
Results and discussion

Firstly, we have examined the efficiency of the amidation reaction conditions. For thus, we have selected four carboxylic acids: ibuprofen **1**, ketoprofen **2**, flurbiprofen **3**, and the phenoxypropionic acid **4** and diverse anilines derivatives, having different electronic effects, as well as benzylamine.

All condensation experiments were performed on one equivalent of carboxylic acids or ester, two equivalents of aniline and 50 mg of *CAL-B* (> 10,000 U/g) diluted in 1 mL of heptane. 50 mg of molecular sieves 4 Å are added. The suspensions were stirred at 80 °C for 72 h. The reactions mixtures were diluted in ethyl acetate and filtered. The amides formed were recovered by acido-basic liquid–liquid extraction. The structures of the formed amides were characterized by usual spectroscopic analyses (NMR ^1H , NMR ^{13}C and HRMS). The conversions were determined by chiral HPLC (Scheme 1).

The enzymatic amidation displays a broad variety of results and offers the synthesized amides with variable yields between $25\% \leq \text{Yield} \leq 98\%$. These differences depend on the structure of the carboxylic acid and the electronic and steric effects of the primary amines.

The enzymatic amidation of the ibuprofen **1** with anilines possessing different substituents on *para*- position, from strong electro-donating to strong electron-withdrawing effects ($-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OMe}$, I, Br, $-\text{Cl}$), gave the corresponding amides in good-to-excellent yields. The use of *p*-toluidine increases significantly the conversion rates and the isolated yields compared to the aniline. The recorded yields are 90% and 40%, respectively; the same effect was notified with the *p*- CF_3 -aniline. The amidoprofen **1c** was isolated with 72% of yield. The use of the *p*-Cl-aniline, *p*-Br-aniline, *p*-I-aniline and the *p*-OMe-aniline gave the amido-profens (**1d–1g**) with acceptable yields varying from 45 to



Scheme 1 Enzymatic amidation of carboxylic acids (1–4) by means of anilines. Reaction Conditions: 1 mmol of carboxylic acid, 2 mmol of aniline derivatives, 50 mg of molecular sieves 4 Å and 50 mg of

CAL-B in 1 mL of heptane at 80 °C for 72 hours. ^(a) Isolated yield. ^(b) Conversion: C = $ee_s/ee_p + ee_s$. ^(c) Monitored by TLC. ND: Not determined

60%. The use of benzylamine instead of anilines decreases significantly the yield of the formed amidoprofen to 34%. On the same lines, the enzymatic amidation of the ketoprofen **2** and the flurbiprofen **3** using aniline and *p*-toluidine as the amidation partners is very different. While the amidation of the ketoprofen **2** was hardly performed (25–30% of isolated yields), those of the flurbiprofen **3** were reached 60–66% of isolated yields.

Moreover, the enzymatic amidation of the phenoxypropionic acid **4** was performed very smoothly compared to the

arylpropionic acids (profens) **1–3**. The carboxylic amides (**4a–4g**) are recovered with good-to-excellent isolated yields (89% to 98%), with total conversions. The same observation is recorded when benzylamine is used instead anilines; the corresponding amide is obtained with 64% yield. The amide structures (**4c–4g**) are reported for the first one. Using the *p*-CF₃-aniline, as the amidation partner, the reaction is widely improved by the presence of the CAL-B as catalyst; the corresponding amide is isolated with 92% yield. From all the synthesized amidoprofens, the structures **1c**, **1d**, **1e**, **2b**

and **3b** are reported for the first time. The **1d** is demonstrated by X-ray data (CCDC deposition number: 1943833).

The reported conditions of the *CAL-B* catalyzed direct amidation allow easily to potent carboxylic amides with a high atom economy and chemical yields depend to the acid structure. Since the *CAL-B* is recyclable and biodegradable, the unique considered waste is water. At the best of our knowledge, the enzymatic amidation of those acid structures, especially, the NSAIDs ones, is described for the first time. It is a cleaner and safer approach with low environmental impact process.

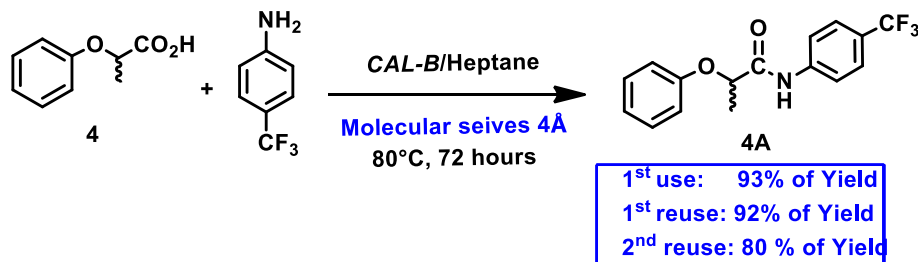
In order to valorize this simple and easy approach, we have done a gram scale reaction. We have applied the optimal conditions on 6 mmol (1 g) of phenoxypropionic acid **4** with 6 mmol (0.193 g) of *p*-CF₃-aniline and 300 mg of *CAL-B*. The enzymatic amidation is reproducible, and the amide is isolated with 93% yields. We have recovered and reused the *CAL-B* lipase in second and third times. The amides are obtained with 92% and 88% yields (Scheme 2), showing that until the third use the lipase keeps its performance.

To further extend this enzymatic approach, we have envisaged to applying it for the amidation of a protected amino acid, the Boc-proline. At the best of our knowledge, only

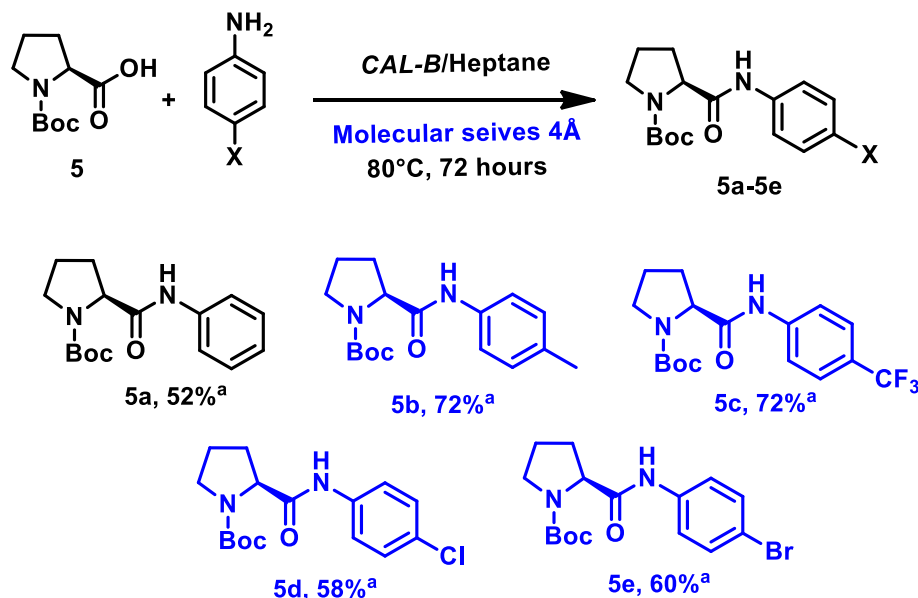
the aminolysis using aniline and benzylamine by means of coupling agents was described for the synthesis of the corresponding amides which were used as a potential organo-catalysts in the aldolization and imine hydrogenation reactions and exploited without Boc-moiety cleavage (Galanakis et al. 2004). It is well known that several described ways for amidation of aminoacids suffer of serious problem of the loss of the enantiopurity or racemization. In our case, we have applied the optimal enzymatic amidation on the L-Boc-proline, commercially available, with aniline derivatives (Scheme 3). All the obtained amide structures are confirmed by the usual spectroscopic data. Their enantiomeric purity was examined by the measurement of the optical rotations and compared to the literature data for the known structures.

The amidation of the L-Boc-proline without lipase is performed smoothly by the five anilines. The amides are furnished with various yields from 52 to 72% and that depending on the electronic effects due to the substituent on *para*- position of aniline. It is to be underlined that the thermal amidation, without the use of lipase, is possible but with less yields and longer reaction time. The presence of a hydrolytic enzyme improves significantly the amidation, especially in the case of *p*-CF₃-aniline, and no cleavage of

Scheme 2 Gram-scale *CAL-B* catalyzed amidation of **4** with *p*-CF₃-aniline



Scheme 3 Enzymatic amidation of Boc-proline by means of anilines. 1 mmol of Boc-proline, 2 mmol of aniline derivatives, 50 mg of molecular sieves 4 Å and 50 mg of *CAL-B* in 1 mL of heptane at 80 °C for 72 h. ^(a) Isolated yield



the protected group (-Boc) was observed. So, this enzymatic approach for the amidation of *N*-protected aminoacids constitutes a new path promising, more safe, clean and sustainable.

Conclusions

In summary, we have developed an efficient direct amidation of a set of non-activated carboxylic acids with anilines and benzylamine, catalyzed by *CAL-B* as biodegradable biotool. A set of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), phenoxypropionic acid and protected-proline are selected to examine the efficiency of the enzymatic pathway. This direct enzymatic amidation system is examined for the first time. The obtained carboxylic amides are recovered with isolated chemical yields varied between moderate and excellent.

Of the twenty five carboxylic amides synthesized, at least fourteen from them are reported for the first time and one from them: *N*-(4-iodophenyl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide **1d** is characterized by X-ray diffraction.

The reported conditions of the *CAL-B*-catalyzed direct amidation allow easily to potent carboxylic amides with a high atom economy, minimal waste production and chemical yields depending on the acid structure. This new sustainable and eco-friendly route opens up very interesting perspectives for easily recoverable applications.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01636-5>.

Acknowledgements Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, FNR 2000) and ANDRU (PNR) are gratefully acknowledged for the financial support of this work. Prof. Olivier Riant (IMCN/UCL-Louvain-La-Neuve, Belgium) is acknowledged for his assistance and the welcome of NourElhouda BENAMARA and Mounia MERABET-KHELASSI to perform specific analyses.

References

- Aissa R, Guezane-Lakoud S, Kolodziej E, Toffano M, Aribi-Zouiouche L (2019) Diastereoselective synthesis of bis(α -aminophosphonates) by lipase catalytic promiscuity. *New J Chem* 43:8153. <https://doi.org/10.1039/C8NJ06235H>
- Alalla A, Merabet-Khelassi M, Riant O, Aribi-Zouiouche L (2014) Green synthesis of benzamides in solvent-and activation-free conditions. *Synth Commun* 44:2364–2376. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.898072>
- Alalla A, Merabet-Khelassi M, Aribi-Zouiouche L, Riant O (2016) Easy kinetic resolution of some β -amino alcohols by *Candida antarctica* lipase B catalyzed hydrolysis in organic media. *Tetrahedron Asymmetry* 27:1253. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.10.003>
- Anunziata F, Letizia-Contente M, Betti D, Pinna C, Molinari F, Tamborini L, Pinto A (2020) Efficient chemo-enzymatic flow synthesis of high value amides and esters. *Catalysts* 10:939. <https://doi.org/10.3390/catal10080939>
- Arroyo M, De Le Mata I, García JL, Barredo JL (2017) Biocatalysis for industrial production of active pharmaceutical ingredients (APIs). In: *Biotechnology of microbial enzymes*, Chap 17. Academic Press, pp 451–473
- Belkacemi FZ, Merabet-Khelassi M, Aribi-Zouiouche L, Riant O (2017) Diastereoselective and enantioselective alkaline-hydrolysis of 2-aryl-1-cyclohexyl acetate: a *CAL-B* catalyzed deacylation/acylation tandem process. *Tetrahedron Asymmetry* 28:1644. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.09.010>
- Braia N, Merabet-Khelassi M, Aribi-Zouiouche L (2018) Efficient access to both enantiomers of 3-(1-hydroxyethyl) phenol by regioselective and enantioselective *CAL-B*-catalyzed hydrolysis of diacetate in organic media by sodium carbonate. *Chirality* 30:1312. <https://doi.org/10.1002/chir.23025>
- Busto E, Gotor-Fernandez V, Gotor V (2010) Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chem Soc Rev* 39:4504. <https://doi.org/10.1039/C003811C>
- Chandra P, Singh R, Arora PK (2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact* 19:169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Cheng L, Ge X, Huang L (2018) Direct amidation of non-activated phenylacetic acid and benzylamine derivatives catalysed by NiCl_2 . *Royal Soc Open Sci* 5:171870. <https://doi.org/10.1098/rsos.171870>
- Constable DJC, Dunn PJ, Hayler JD, Humphrey GR, Leazer JL, Linderman RJ, Lorenz K, Manley J, Pearlman BA, Wells A, Zaks A, Zhang TY (2007) Key green chemistry research areas—a perspective from pharmaceutical manufacturers. *Green Chem* 9:411–420. <https://doi.org/10.1039/B703488C>
- De Figueiredo RM, Suppo JS, Campagne JM (2016) Nonclassical routes for amide bond formation. *Chem Rev* 116:12029–12122. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00237>
- Doherty S, Knight JG, McRae A, Harrington RW, Clegg W (2008) Oxazoline-substituted prolinamide-based organocatalysts for the direct intermolecular aldol reaction between cyclohexanone and aromatic aldehydes. *Eur J Org Chem* 10:1759. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700922>
- Galanakis D, Kourounakis AP, Tsiakitzis KC, Doulgeris C, Rekka EA, Gavalas A, Kravaritou C, Christos C, Kourounakis PN (2004) Synthesis and pharmacological evaluation of amide conjugates of NSAIDs with L-cysteine ethyl ester, combining potent antiinflammatory and antioxidant properties with significantly reduced gastrointestinal toxicity. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3639. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.025>
- Greenberg A, Breneman CM, Liebman JF (2000) *The amide linkage: structural significance in chemistry, biochemistry and materials science*. Wiley, New York
- Guezane-Lakoud S, Toffano M, Aribi-Zouiouche L (2017) Promiscuous lipase catalyzed a new P-C bond formation: green and efficient protocol for one-pot synthesis of α -aminophosphonates. *Heteroatom Chem* 28:e21408. <https://doi.org/10.1002/hc.21408>
- Hult K, Berglund P (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol* 25(5):231. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002>
- José C, Toledo MV, Briand LE (2016) Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. *Crit Rev Biotechnol* 36:891. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1057551>
- Kanemitsu T, Umehara A, Haneji R, Nagata K, Itoh T (2012) A simple proline-based organocatalyst for the enantioselective reduction of imines using trichlorosilane as a reductant. *Tetrahedron* 68:3893–3898. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.035>
- Kaushik P, Shakil NA, Kumar J, Singh BB (2015) Lipase-catalyzed solvent-free amidation of phenolic acids. *Synth Commun* 45:569. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.974611>

- Kourist R, De María PD, Miyamoto K (2011) Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens – recent trends and developments. *Green Chem* 13:2607–2618. <https://doi.org/10.1039/C1GC15162B>
- Lanigan RM, Sheppard TD (2013) Recent developments in amide synthesis: direct amidation of carboxylic acids and transamidation reactions. *Eur J Org Chem* 2013:7453–7465. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300573>
- Lima RN, Porto AL (2017) Biocatalytic aminolysis of ethyl (*S*)-mandelate by lipase from *Candida antarctica*. *Catal Commun* 100:157. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2017.06.020>
- Lima RN, Silva VR, Santos LDS, Bezerra DP, Soares MB, Porto AL (2017) Fast synthesis of amides from ethyl salicylate under microwave radiation in a solvent-free system. *RSC Adv* 7(89):56566. <https://doi.org/10.1039/C7RA11434F>
- Lima RN, dos Anjos CS, Orozco EV, Porto AL (2019) Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Mol Catal* 466:75. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>
- Lundberg H, Tinnis F, Adolfsson H (2012) Direct amide coupling of non-activated carboxylic acids and amines catalysed by zirconium (IV) chloride. *Chem Eur J* 18:3822–3826. <https://doi.org/10.1002/chem.201104055>
- Lundberg HF, Tinnis N, Selander N, Adolfsson H (2014) Catalytic amide formation from non-activated carboxylic acids and amines. *Chem Soc Rev* 43:2714–2742. <https://doi.org/10.1039/C3CS60345H>
- Lundberg H, Tinnis F, Zhang J, Algarra A, Himo F, Adolfsson H (2017) Mechanistic elucidation of zirconium-catalyzed direct amidation. *J Am Chem Soc* 139:2286–2295. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10973>
- Manova D, Gallier F, Tak-Tak L, Yotava L, Lubin-Germain N (2018) Lipase-catalyzed amidation of carboxylic acid and amines. *Tetrahedron Lett* 59:2086. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.049>
- Montalbetti CAGN, Falque V (2005) Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 61:10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
- Mouad AM, Taupin D, Lehr L, Yvergnaux F, Porto ALM (2016) Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: a solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. *J Mol Catal B Enzym* 126:64. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.01.002>
- Nechab M, Azzi N, Vanthuyne N, Bertrand M, Gastaldi S, Gil G (2007) Highly selective enzymatic kinetic resolution of primary amines at 80 °C: a comparative study of carboxylic acids and their ethyl esters as acyl donors. *J Org Chem* 72:6918. <https://doi.org/10.1021/jo071069t>
- Sheldon RA (2016) Green biocatalysis. In: Patel RN (eds) *Biocatalysis and green chemistry*. Wiley Online Library, Chap 1. pp 1–15
- Sheldon RA, Brady D, Bode ML (2020) The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chem Sci* 11(10):2587
- Zheng GW, Xu JH (2011) New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Curr Opin Biotech* 22(6):784. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.07.002>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 3 :

Les communications

7 – 10 Septembre, 2017	Présentation de Poster " <i>Optimization of the CRL-Catalyzed Acetylation of 2-Hydroxymethyl-1-phenylthioferrocene by Addition of Cinchona Alkaloids</i> " au 7 ^{ème} Journées de Chimie Organique - JCO 2017 à Hammamet, Tunisie.
7 – 8 Décembre, 2017	Présentation de Poster " <i>Eco-compatible synthesis of a set of carboxylic amide</i> " à la Conférence <i>Merk Organic Chemistry Symposium MOCS-2017</i> à Blankenberge, Belgique.
18 – 19 Février, 2018	Présentation d'une Poster " <i>Improvement of the catalytic efficiency of the Candida rugosa lipase by addition of Cinchona alkaloids during the acylation of 2-hydroxy methyl-1-phenylthioferrocene</i> " à la 1 ^{ère} école d'hiver de formation sur l'Analyse de Cycle de Vie et l'éco- conception à Boumerdes, Algérie.
1 – 3 Octobre, 2018	Présentation avec Poster " <i>Chemically & enzymatically synthesis of some carboxylic amides</i> " à la 2 ^{ème} international Symposium on Catalysis and Speciality Chemicals ISCSC-2018 à Tlemcen, Algérie.
6 – 7 Décembre, 2018	Présentation de Poster " <i>Influence of Tertiary Amine as Additives During the Deacylation of 1-Phenylethyl Acetate by Means of CAL-B</i> " à la Conférence <i>Merk Organic Chemistry Symposium MOCS-2018</i> à Blankenberge, Belgique.
26 – 29 Septembre, 2019	Présentation de Poster " <i>Enzymatic deacylation of 1-phenylethyl acetat in presence of divers Lewis bases</i> " au 3 ^{ème} Tunisian Chemical Society Conference on Coordination Chemistry JCC-2019 à Hammamet, Tunisie.
26 – 29 Septembre, 2019	Présentation de Poster " <i>Reactivity of some anhydrides in the enzymatic acylation reactions of chiral alcohols</i> " au 3 ^{ème} Tunisian Chemical Society Conference on Coordination Chemistry JCC-2019 à Hammamet, Tunisie.

<p>17 – 18 Décembre, 2019</p>	<p>Participation par communication Orale <i>”Synthesis of a Set of Valuable Amides by Enzymatic and Chemical Direct Aminolysis of Non-Activated Carboxylic Acids”</i> à la 1^{ère} <i>International Seminar on Green Chemistry and Sustainable Engineering ISGCSE-2019</i> à El-Oued, Algérie.</p>
<p>17 – 18 Décembre, 2019</p>	<p>Présentation d’une Poster <i>”Impact of both nature of the acyl donor and the lipase on the outcome of the enzymatic acylation of some arylalkylcarbinols”</i> à la 1^{ère} <i>International Seminar on Green Chemistry and Sustainable Engineering ISGCSE-2019</i> à El-Oued, Algérie.</p>