1. Les lipases

1.1. Généralités sur les lipases

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des α/β-hydrolases d'esters du glycérol, elles appartiennent à la famille des hydrolases. Elles sont présentes aussi bien dans des tissus animaux, de végétaux, que chez de nombreux micro-organismes[1]. *In vivo*, les lipases catalysent, en milieu aqueux, la décomposition, par hydrolyse, des triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Leur utilisation *in vitro* permet non seulement d'effectuer des réactions d'hydrolyse, en milieu aqueux, mais également de nombreuses autres réactions en milieu organique, comme les estérifications, les transestérifications et les amidations[2,3]. Comme la plupart des autres biocatalyseurs, les lipases présentent souvent une très grande chimio-, régio- et énantiosélectivité[4]. Mais l'avantage essentiel des lipases est qu'elles ne nécessitent pas la présence d'un cofacteur, contrairement à beaucoup d'autres biocatalyseurs[5,6].

1.2. Les réactions catalysées par les lipases

En fonction du milieu réactionnel, conventionnel (milieu aqueux) ou non-conventionnel (solvants organiques), des substrats mis en jeu et des conditions réactionnelles, les lipases peuvent catalyser un très large éventail de réactions. Ces réactions ont lieu avec tous les avantages inhérents à l'utilisation des biocatalyseurs en général : douceur des conditions réactionnelles, activité et surtout sélectivité exceptionnelles.

1.2.1. Réaction d'hydrolyse

En milieu aqueux, les lipases catalysent l'hydrolyse de la fonction ester. La réaction s'effectue à l'interface entre le substrat hydrophobe et le milieu aqueux, formant ainsi un système réactionnel biphasique. Ce dernier résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau, constituée soit de l'ester seul, soit de l'ester dissout dans un solvant non miscible à l'eau. Quand il s'agit d'un substrat asymétrique, les lipases présentent souvent une grande sélectivité. A cause cette activité hydrolytique, les lipases trouvent des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie des détergents et l'industrie laitière pour la production d'arômes, ainsi dans la résolution d'esters racémiques.

A titre d'illustration, l'exemple ci-dessous montre la résolution du (*R*,*S*)-mandelate de méthyle par hydrolyse par la lipase de *Candida rugosa*, un rendement de 73% et avec ee_p de 96% ont été obtenus[7].

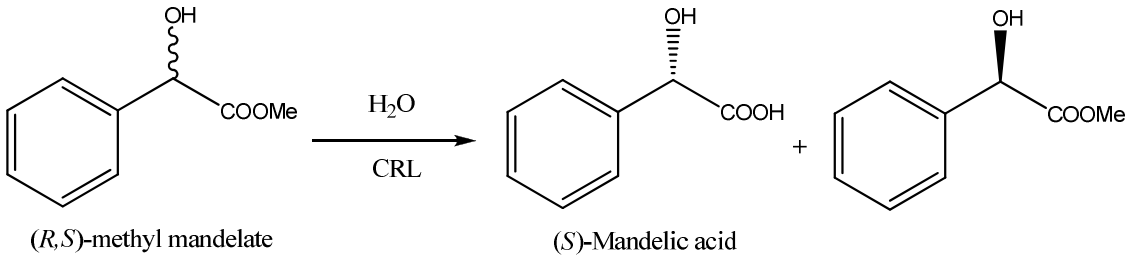


Schéma 1.1. Résolution énantiosélective du (*R*,*S*)-mandelate de méthyle par la CRL[7].

1.2.2. Réactions de synthèse

En milieu non-conventionnel, à faible activité de l'eau, les lipases possèdent également la capacité de catalyser une grande variété de réactions de synthèse, tout en acceptant une large gamme de substrats synthétiques et en gardant leurs propriétés de régio, chimio et énantiosélectivité. Ces caractéristiques très intéressantes des lipases les classent parmi les biocatalyseurs les plus utilisés en synthèse organique, spécialement pour la résolution des mélanges racémiques visant l'accès à des molécules de haute pureté optique.

1.2.2.1. L'estérification

Les lipases catalysent cette réaction en fonction de la quantité d'eau libre présente dans le milieu.

Dans l'exemple suivant, la lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) a été utilisée pour catalyser la réaction d'estérification entre l'acide acétique et le butanol dans le but de produire l'acétate de butyle (saveur d'ananas).

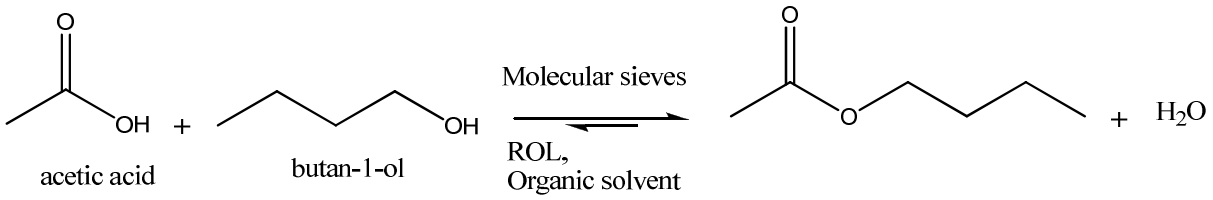


Schéma 1.2. Synthèse de l'acétate de butyle catalysé par ROL[8].

1.2.2.2. La transestérification

La transestérification regroupe deux réactions : l'alcoolyse (la réaction d'un groupe d'acyle avec alcool) et l'acidolyse (la réaction d'un groupe d'acyle avec acide). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification, parmi lesquelles, la production de biodiesels et la résolution des mélanges racémiques.

L'exemple suivant illustre la résolution du (*R*,*S*)-1-phénylethanol par acylation énantiosélective, utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle et l'hexane comme solvant. La lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) a été employée dans cette étude.

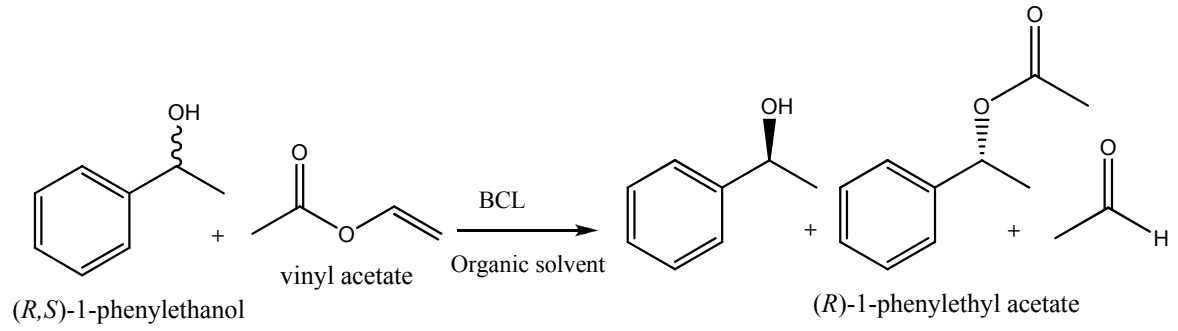


Schéma 1.3. La lipase de *Burkholderia cepacia* catalyse la résolution (*R*,*S*)-1-phénylethanol[9].

1.2.2.3. L'interestérification

La réaction d'interestérification se produit par le transfert d'un groupe d'acyle d'un ester à un autre ester. Cette réaction trouve une large application dans la synthèse de lipides[10]. Dans l'exemple ci-dessous, la lipase de *Candida rugosa* (CRL) a été employée pour la production de biodiesels par l'interestérification de triglycérides avec l'acétate de méthyle.

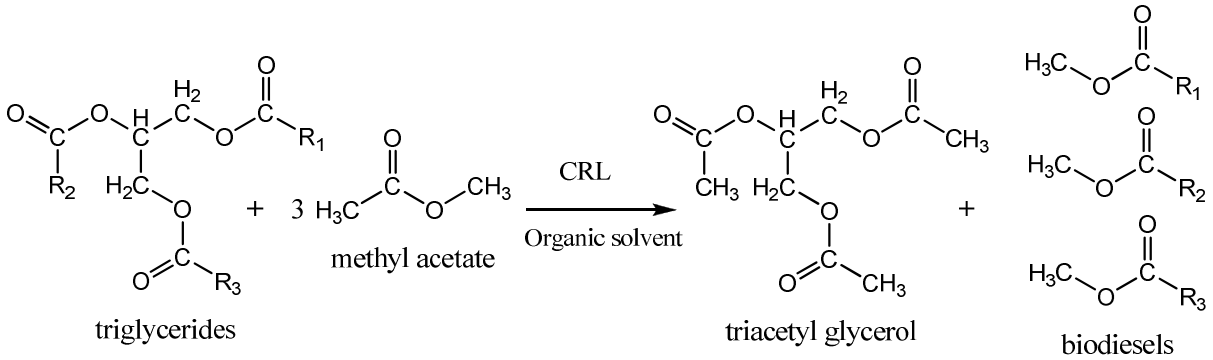


Schéma 1.4. L'interestérification de triglycérides par CRL pour la production de biodiesels[11].

1.2.2.4. L'aminolyse

Les lipases peuvent catalyser également la réaction entre une amine et un ester qui conduit à la formation d'une fonction amide. Les réactions d'aminolyse catalysées par les lipases ont une grande importance dans la synthèse des amides substituées d'intérêt pharmaceutique et la résolution des aminoalcools chiraux.

L'aminolyse du *trans*-2-phenylcyclopentanamine par la lipase de *Candida antarctica* B (CALB), présentée dans l'exemple suivant, donne un produit avec un bon rendement et d'excellents excès énantiomèriques :

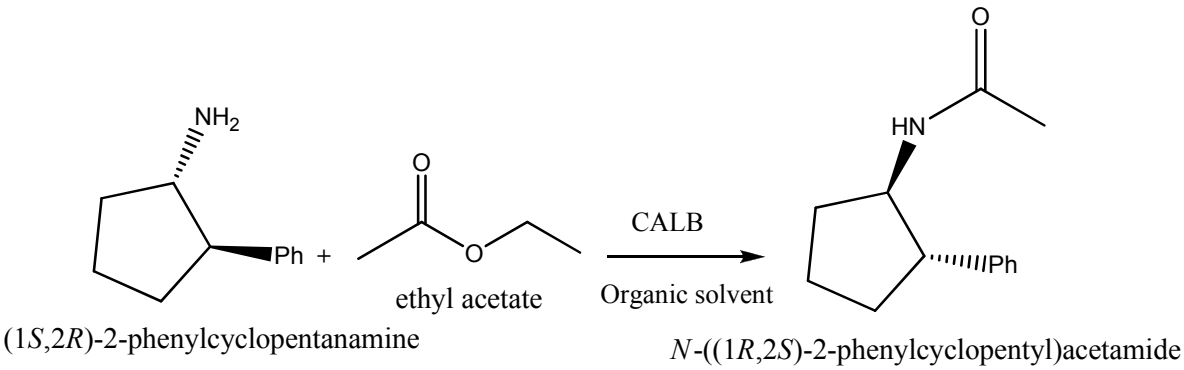
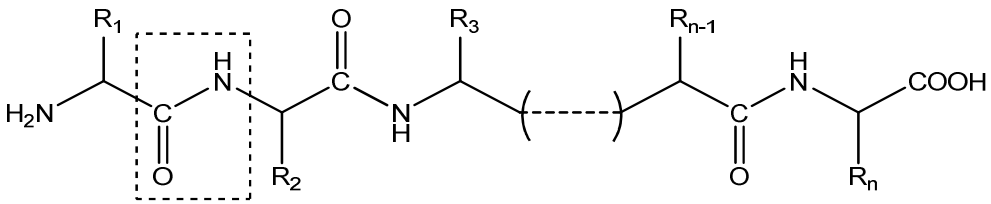


Schéma 1.5. L'aminolyse énantiosélective du *trans*-2-phenylcyclopentanamine par CALB[12].

1.3. Structure et mécanisme d'action des lipases

1.3.1. Généralités

Comme toutes les protéines, les lipases sont constituées d'enchainement d'acides aminés, qui sont reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques qui se forment entre le groupement carboxylique du premier acide aminé et le groupement aminé suivant :



Laison piptidique

Cette chaîne d'acides aminés détermine la structure primaire de l'enzyme. La structure secondaire des protéines est classiquement définie par le repliement de la chaine polypeptide en hélice α ou en feuillet β (figure 1.1).

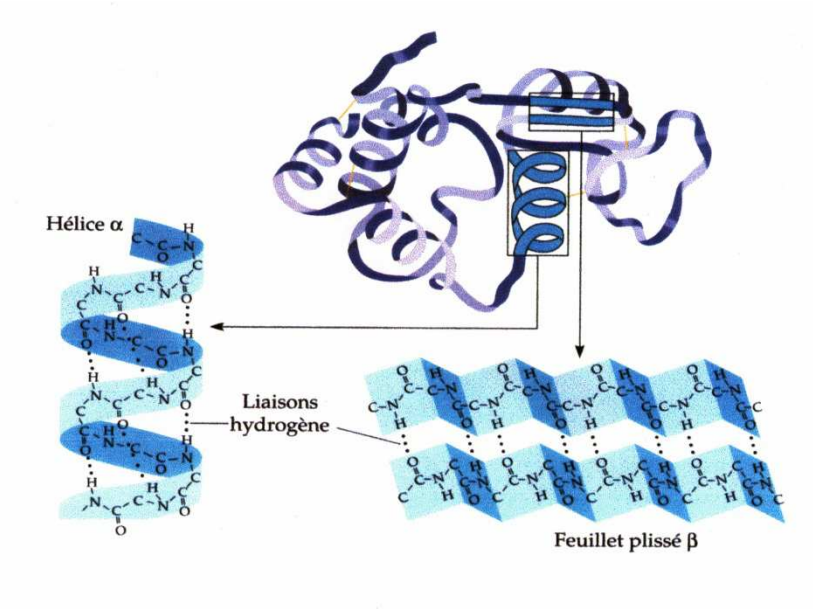


Figure 1.1. Structure secondaire d'une protéine. Hélice α et feuillets plissés β.

La structure tertiaire est due à la formation de différentes liaisons intramoléculaire et interactions, dont les ponts disulfures, les liaisons hydrogène, liaisons ioniques et les interactions hydrophobes (figure 1.2).

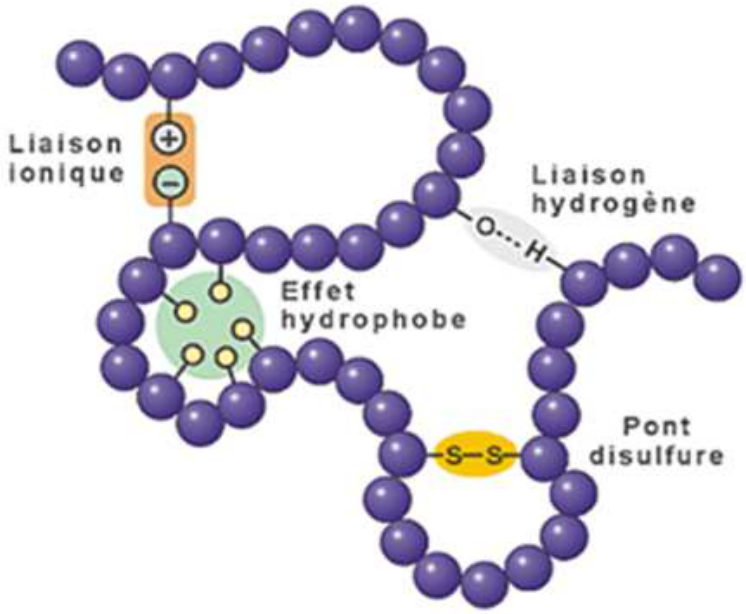


Figure 1.2. Structure tertiaire d'une protéine.

L'étude structurale cristallographiques des lipases, par diffraction aux rayons X, révèle trois caractéristiques principales :

a. Un repliement α/β :

Le repliement α/β est la structure de base commune de toutes les lipases connues, formé d'un corps central de 8 feuillets β connectés aux 6 hélices par un coude nucléophile appelé ″γturn″ contenant le résidu catalytique sérine (nucléophile, Nu). Ce dernier est la caractéristique la plus importante et la plus conservée des α/β hydrolases[13,14].

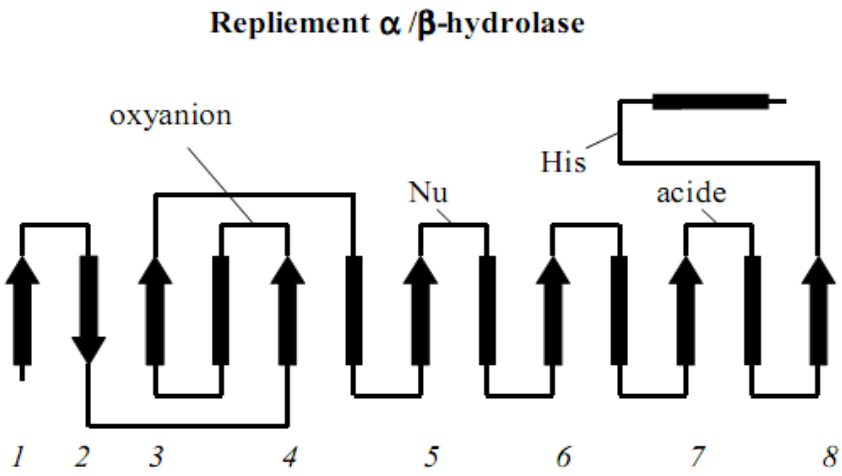


Figure 1.3. Schéma du repliement α/β. Flèches: feuillets β; Rectangles: hélices α; Lignes: coudes[15].

b. Une triade catalytique :

Le site catalytique des lipases se compose essentiellement de trois acides aminés (triade catalytique) : Sérine, Histidine, Acide Aspartique (ou Acide Glutamique) et du trou oxyanion. Ce dernier (intermédiaire tétraédrique) est formé de quelques résidus intervenant dans la stabilisation au cours de la catalyse[16].

c. Un couvercle amphiphile :

Le site actif est recouvert par un volet amphiphile, formé d'une ou deux hélices α reliées au squelette de l'enzyme par une structure flexible. La face hydrophobe de ce volet est orientée vers l'intérieur du site actif, qui le rend totalement inaccessible au solvant et au substrat, lorsque l'enzyme est sous sa forme inactive. Lorsque l'enzyme se trouve à l'interface

lipide/eau, l'hélice α couvrant le site actif s'ouvre, rendant accessible le site actif au solvant et au substrat, l'enzyme est sous sa forme ouverte, activée[17,18].

1.3.2. Notion de site actif

Le site actif d'une lipase est la région tridimensionnelle tapissée de groupes fonctionnels, appelée également poche enzymatique. C'est une cavité de caractère non polaire dans laquelle le substrat s'insère pour être transformé. Cette poche enzymatique est constituée de deux zones fonctionnelles :

(i) un site de fixation : constitué de résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liaisons chimiques. Ce dernier est lui-même divisé en deux compartiments : une large poche hydrophobe et une poche plus petite en aval. Cette petite poche serait responsable de la stéréo-sélectivité des lipases pour les alcools secondaires.

(ii) un site de reconnaissance du substrat : constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de la lipase[15,16].

Pleiss et *al.*[19] ont réussi à identifier la topographie générale des sites actifs en se basant sur des structures de lipases cristallisées en présence et en absence d'analogues d'états de transition. Ils les classent ainsi en trois sous-groupes :

- les lipases avec site actif en forme de crevasse, près de la surface de la protéine. C'est le cas des lipases de *Rhizomucor* et de *Rhizopus*,

- les lipases avec site actif en forme d'entonnoir. C'est le cas de la lipase de *Burkholderia cepacia* et celle de *Candida antarctica* B,

- les lipases avec site actif en forme de tunnel. Cas de la lipase de *Candida rugosa*.

Si toutes les lipases se ressemblent au niveau du site de fixation de la de la partie alkyle, en revanche, le site de fixation de la partie acyle, varie d'une lipase à une autre. Par exemple celui de la lipase de *Candida rugosa* est un long tunnel pouvant accueillir une chaîne carbonée longue d'au moins 18 atomes de carbone. Dans le cas de la lipase *Rhizomucor miehei*, le site de fixation est plus court et situé à la surface de la protéine. La profondeur de site actif de la lipase de *Candida antarctica* se situe entre celui de la lipase de *Rhizomucor miehei* et lipase de *Candida rugosa*[19].

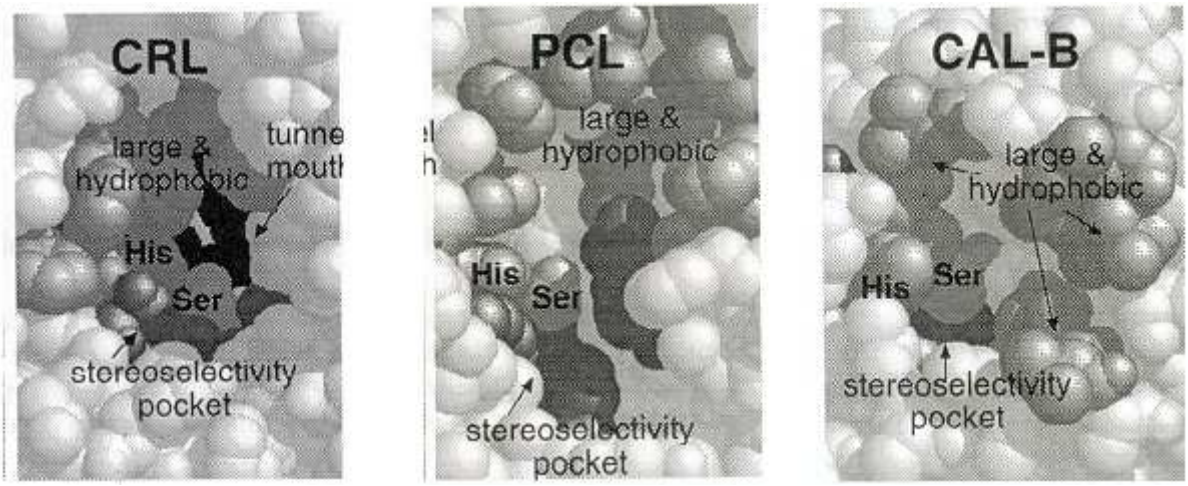


Figure 1.4. Topologie des sites actifs de la CRL, PCL et CALB[15].

1.3.3. Mécanisme d'action des lipases

Le mécanisme d'action catalytique des lipases fait intervenir la triade catalytique située à l'intérieur du site actif. La disposition particulière des 3 résidus formant la triade permet, dans une première étape, le transfert de proton entre l'acide aspartique, l'histidine et la sérine catalytique, entraînant l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine sur le carbonyle du substrat pour former le premier intermédiaire tétraédrique appelé acyl-enzyme avec libération de l'alcool. Cet intermédiaire est stabilisé par des liaisons hydrogène entre l'oxygène du substrat chargé négativement et les acides aminés du trou oxyanion. Dans une seconde étape, cet intermédiaire acyl-enzyme subit une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou par une molécule d'alcool (réaction de synthèse) pour former le second intermédiaire tétraédrique. Cette étape de déacylation qui suit un processus analogue à celui de l'étape d'acylation conduit à la formation du second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) avec régénération de l'enzyme native.

Le mécanisme d'intervention de la triade (Ser, Hist et Asp) est donné par le schéma suivant (schéma 1.6).

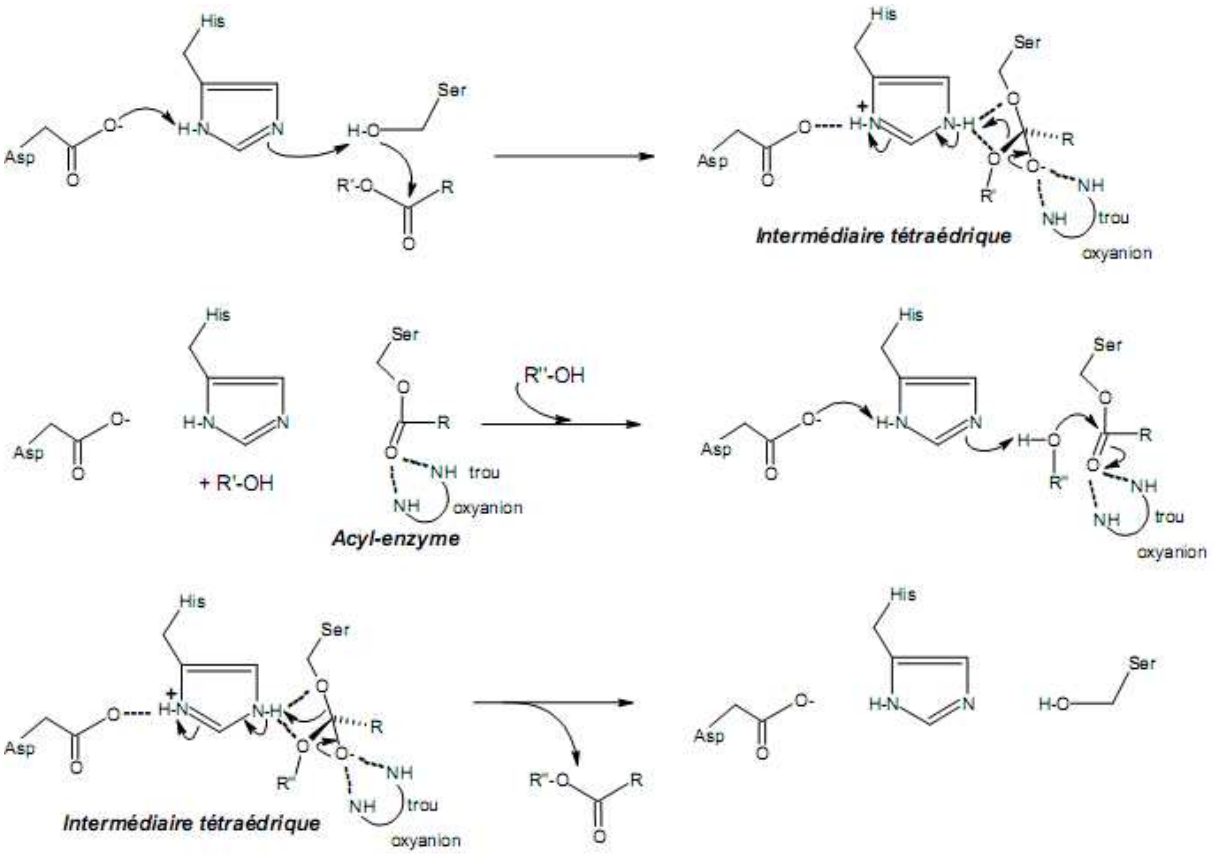


Schéma 1.6. Mécanisme d'action catalytique des lipases : intervention de la triade (Ser, Hist et Asp)[20].

1.4. Propriétés de sélectivité des lipases

En tant que catalyseurs en synthèse organique, les lipases ont plusieurs propriétés intéressantes. Elles peuvent catalyser une grande variété de réactions (mentionné dans la section 1.2), tout en acceptant des substrats divers, différents même de leur substrat naturel. De plus, les lipases possèdent souvent différents types de sélectivité envers ces substrats. C'est la principale raison de leur utilisation en synthèse organique, car ces caractéristiques permettent d'éviter les réactions de protection des fonctions qui compliquent les synthèses.

1.4.1. Chimiosélectivité

La chimiosélectivité d'une lipase est sa capacité de catalyser spécifiquement la transformation d'une fonction donnée, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes susceptibles de réagir (OH, NH, SH…) (schéma 1.7). Cette caractéristique primordiale des lipases trouve un domaine d'application dans des nombreuses études, particulièrement

l'acylation des substrats polyfonctionnels tels que des aminoalcools, des thioalcools ou des peptides[21,22].

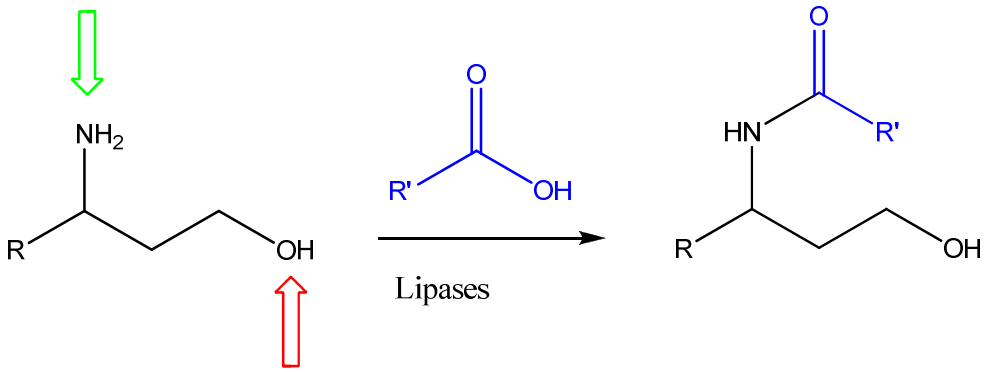


Schéma 1.7. La chimiosélectivié des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.

Une étude, menée par Maugard et *al.*[23] sur la synthèse de N-oléyl-N-méthyl-glucamine, un tensioactif biodégradable, a montré la chimiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica*B, lors de la réaction de de la N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique dans le 2-méthylbutan-2-ol comme solvant. L'étude de la cinétique de la réaction montre qu'en présence de N-méthyl-glucanamine en excès, la CALB catalyse préférentiellement l' N- acylation[23].

Le tableau 1.1 illustre quelques exemples issus de la littérature, lachimiosélectivitéde la lipase de *Candida antarctica* B avec différents substrats. On remarque clairement que l'enzyme est fortement chimiosélective pour de nombreuses réactions.

Tableau 1.1. Exemples de la chimiosélectivité de la lipase *Candida antarctica* B avec différents substrats.

Substrats A	**Substrats B**	**Fonctions acylés**	**Conversion**	**Références**
Acide Laurique	L-sérinamide	-OH	93%	[24]
Prop-2-enoate	Propanolamine	$-NH_2$	89%	[25]
Acide Laurique	Ethanolamine	$-NH_2$	95%	[26]
Linoleate d'éthyle	1,3-diamino-2-propanol	$-NH_2$	89%	[27]
Acide oléique	Lys-Ser, Ser-Leu	$-NH_2$	57%	[28]
		-OH	45%	