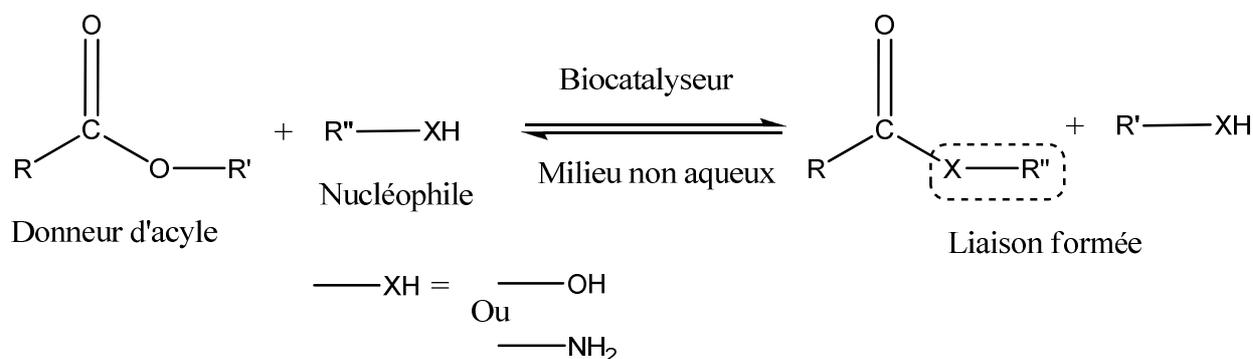


## 2. L'acylation enzymatique

### 2.1. Définitions

La réaction d'acylation est une réaction dans laquelle un donneur d'acyle réagit avec un nucléophile tel qu'une amine ou un alcool. La fonction thiol est également susceptible d'être acylée pour donner une liaison thioester. Ainsi l'acylation enzymatique se fait par l'utilisation d'une hydrolase, plus souvent une lipase, dans un milieu non aqueux. Dans ce milieu hydrophobe, la réaction inverse de l'hydrolyse est favorisée et permet ainsi l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile. L'enzyme est capable de catalyser la formation d'une liaison ester lorsque le nucléophile comporte une fonction hydroxyle ou bien la formation d'une liaison amide lorsque celui-ci comporte une fonction amine (figure 2.1).



**Figure 2.1.** Schéma général d'une réaction d'acylation catalysée par une enzyme.

L'acylation par voie enzymatique présente beaucoup d'avantages par rapport à la voie chimique, notamment dans les points suivants :

1. Vitesse de réaction : les vitesses des réactions enzymatiques sont multipliées par des facteurs compris entre  $10^6$  et  $10^{12}$  par rapport aux réactions correspondantes non-catalysées.
2. Conditions de réaction : les réactions enzymatiques peuvent avoir lieu dans des conditions douces de température ambiante de pression atmosphérique et de pH.
3. Spécificité réactionnelle : cette propriété singularise les biocatalyseurs par rapport aux catalyseurs chimiques et permet d'éviter la formation de produits secondaires et leur corollaire, des étapes de purification fastidieuses.

Les travaux réalisés en catalyse enzymatique pour synthétiser les dérivés acylés sont nombreux. Ils concernent de nombreux types de substrats aussi bien monofonctionnels,

comme les alcools et les amines, que polyfonctionnels tels que les polyols, les amino-alcools et les flavonoides<sup>1-3</sup>. Généralement, à travers ces réactions, c'est l'énantiosélectivité qui est recherchée et c'est ainsi que de nombreuses biomolécules énantiomériquement enrichies sont produites par la voie biocatalytique<sup>4</sup>.

## 2.2. Paramètres influençant l'acylation enzymatique

La réactivité et la sélectivité de l'acylation enzymatique sont influencées par plusieurs facteurs, notamment la nature d'enzyme, la structure des substrats, la température et l'activité de l'eau ( $a_w$ ).

### 2.2.1. La nature d'enzyme

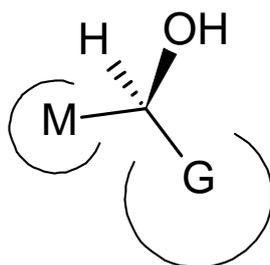
L'enzyme utilisée, son origine et son mode d'obtention, constituent un facteur primordial et déterminant pour l'acylation enzymatique, car chaque lipase possède sa propre caractéristique. Dans ce contexte, nous citons l'exemple suivant issu de la littérature<sup>5</sup> où de différences notables ont été observées dans l'activité hydrolytique de quelques lipases commerciales. Comme le montre le tableau ci-dessous, les activités enzymatiques changent non seulement avec l'origine de l'enzyme mais également, pour une même enzyme, avec le procédé ayant permis d'y accéder, les procédés diffèrent selon le fabricant.

**Tableau 2.1.** Activité hydrolytique de quelques lipases commerciales vis-à-vis de l'huile d'olive<sup>5</sup>.

Lipase	Code de fabricant	Vitesse initiale ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Régiosélectivité	Sélectivité
<i>Aspergillus niger</i> , 1	Amano AP	0.154	1,3	18
<i>Aspergillus niger</i> , 2	Amano K	11.2	1,2,3	10
<i>Candida rugosa</i>	Enzeco	9.82	1,2,3	18
	Sigma	9.70	1,2,3	18
<i>Mucor miehei</i>	Amano MAP	2.67	1,3	<12
	Gist Brocades-S	40.0	1,3	<12
	Novo	5.33	1,3	<12
Porcine pancréatique	Sigma	15.6	1,3	<12
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Gist Brocades	33.4	1,3	<12

### 2.2.2. La structure de substrat

La structure du substrat joue un rôle majeur dans la faisabilité de la réaction d'acylation enzymatique, particulièrement sur l'énantiopréférence des lipases. La règle empirique décrite par Kazlauskas et *al.*<sup>6</sup> explique la sélectivité de la CALB vis-à-vis les alcools racémiques. Les substituants du carbone chiral (le grand et le moyen) sont placés dans les deux poches du site actif selon leur taille. L'énantiomère qui peut être placé de façon favorable (tel que représenté dans le schéma 2.1) réagit plus rapidement selon cette règle.



**Schéma 2.1.** Modèle empirique la prédiction de l'énantiosélectivité des alcools secondaires racémiques. G et M représentent les substituants grand et moyen liés au centre asymétrique<sup>6</sup>.

Ce modèle est simple basé sur la taille des substituants au centre asymétrique utilisable pour estimer l'énantiosélectivité vis-à-vis les alcools secondaires<sup>7</sup>. En règle générale, une sélectivité élevée ( $E > 100$ ) et une vitesse de réaction relativement élevée peuvent être attendues pour les substrats avec le petit substituant du centre asymétrique de taille inférieur à un radical propyle et supérieur à un éthyle pour le grand substituant.

A titre d'illustration, le tableau suivant rassemble deux études sur l'influence de la structure du substrat sur l'activité et l'énantiosélectivité de la CALB. Dans la première, Overbeeke et *al.*<sup>8</sup> ont trouvé que l'énantiosélectivité a augmenté avec longueur de la chaîne de l'alcool aléphasique, au contraire de l'activité qui a diminué. Dans la deuxième étude, Johnson et *al.*<sup>9</sup> ont étudié l'influence de la taille du cycle et du substituant en position  $\alpha$  d'un alcool cyclique, la CALB a exhibé une énantiopréférence élevée avec l'alcool dont le substituant est volumineux.

**Tableau 2.2.** Exemples issus de la littérature de l'activité de la CALB en fonction de la structure du substrat.

Substrat	Structure	Temps (h)	C(%)	E	Enantio-préférence	Référence
1	R=Pr	0.20	34	>500	R	
2	R=i-Pr	2.48	35	>500	R	8
3	R=hexyl	0.21	28	>900	R	
4	n=1 X=I	1.30	49	>700	R	
5	n=2 X=I	18.00	50	>450	R	
6	n=2 X=Br	18.00	48	>110	R	9
7	n=2 X=H	1.30	48	1.6	R	
8	n=3 X=I	96.00	49	>240	R	

### 2.2.3. Le donneur d'acyle

L'acylation enzymatique d'alcools racémiques par les lipases implique la présence de deux substrats dans leur site actif, un alcool chiral et un donneur d'acyle. Les parties acyle et alcool se positionnent dans le site actif pour former l'intermédiaire tétraédrique. Il n'est donc pas surprenant que la taille et la forme de la chaîne acyle intervienne dans la discrimination des énantiomères. D'autre part, l'utilisation d'un excès de donneur d'acyle dans l'acylation enzymatique permet de maintenir constant le rapport acyl-enzyme/enzyme libre, et d'orienter ainsi la réaction dans le sens de la synthèse.

Dans ce contexte, Ottosson et *al.*<sup>10</sup> ont montré expérimentalement que la longueur de la chaîne acyle d'esters vinyliques employés comme donneurs d'acyle avait une grande influence sur l'énantiosélectivité ( $E$  est proportionnel à la longueur de la chaîne carbonée de la partie acyle qui passe de 4 à 8 atomes de carbone) (tableau 2.3). L'étude, réalisée par modélisation moléculaire, a révélé que le volume accessible dans le site actif pour la chaîne acyle du donneur d'acyle, lors de l'état de transition, est différent pour chacun des énantiomères. Parmi les donneurs d'acyle vinyliques utilisés dans cette étude, le propionate de vinyle donne la meilleure énantiosélectivité.

**Tableau 2.3.** Enantiosélectivité de la CALB dans l'acylation enzymatique du 3-méthyl-2-butanol avec différent donneurs d'acyle vinyliques<sup>10</sup>.

Donneur d'acyle	Enantiosélectivité ( <i>E</i> )	$\Delta\Delta G^\#$ (KJ.mole <sup>-1</sup> )
Propionate de vinyle	470	-15.3
Butanoate de vinyle	390	-14.8
Hexanoate de vinyle	720	-16.3
Octanoate de vinyle	810	-16.6

#### 2.2.4. La température

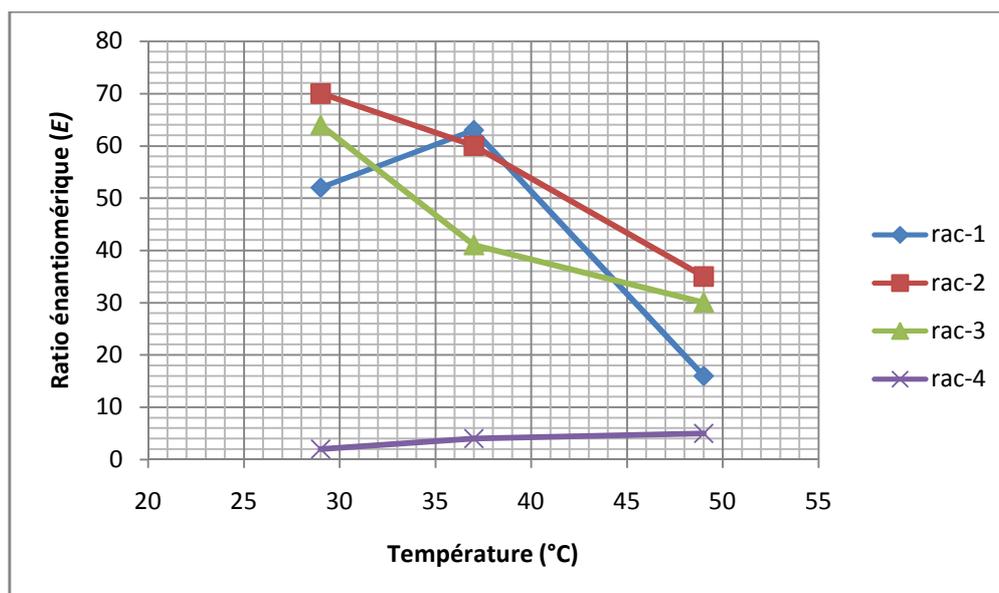
Il est connu que la vitesse de la plupart des réactions chimiques s'élève quand la température s'accroît. Les réactions enzymatiques n'échappent pas à cette règle. Dans le cas d'une acylation enzymatique, la vitesse de la réaction s'élève jusqu'à une valeur maximale, puis décroît rapidement, car la chaleur dénature l'enzyme, et la vitesse de sa dénaturation augmente avec la température. La température affecte également la viscosité du milieu ainsi que la solubilité des substrats et des produits.

Il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique  $T_c$ , au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation. D'autre part, la résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend d'autres paramètres tels que le pH ou la force ionique et de la présence de ligands. La fixation du substrat protège généralement l'enzyme. Concernant l'énantiosélectivité, celle-ci augmente généralement avec la diminution de la température. Cela peut être expliqué par la modification de la structure tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique sous l'effet de la chaleur et toucherait les liaisons de faible énergie de type liaison hydrogène, intervenant dans le maintien de la structure tridimensionnelle et la formation du complexe acyl-enzyme.

Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfures sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. Mais, en général, elles sont plus stables dans l'extrait brut en présence d'autres protéines ou immobilisées à l'état insoluble.

Plusieurs études sur l'influence de la température sur les réactions enzymatiques menées avec des lipases ont été rapportées. Olsen et *al.*<sup>11</sup> ont étudié l'estérification du lavandulol par

CALB, une augmentation de la vitesse de réaction a été observée en passant de 50 à 60°C; une forte diminution de celle-ci a lieu à partir de 80°C. Moure et al.<sup>12</sup> ont mesuré le ratio énantiomérique à différentes températures dans la résolution cinétique d'alcools allyliques secondaires via la transestérification avec l'acétate de vinyle. Les réactions ont été effectuées à 29, 37 et 45 °C (figure 2.2). Les résultats ont montrés que la valeur de  $E$  a augmenté avec une augmentation de la température de 29 à 37 °C, mais a ensuite diminué avec une augmentation supplémentaire de la température à 45 °C.



**Figure 2.2.** Effet de la température sur le ratio énantiomérique ( $E$ ) lors la résolution cinétique catalysée par la lipase de *Burkholderia cepacia* de quelques alcools allyliques racémiques<sup>12</sup>. (1-phenylprop-2-en-1-ol (rac-1), 1-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (rac-2), 1-(3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (rac-3) et 5-methylhex-1-en-3-ol (rac-4))

### 2.2.5. L'activité de l'eau ( $a_w$ )

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) constitue un facteur crucial qui influence l'activité enzymatique<sup>13</sup>. En effet, pour maintenir son activité, une enzyme nécessite la présence d'une quantité minimale d'eau dans son microenvironnement<sup>14</sup>. Cette quantité d'eau joue le rôle d'un « lubrifiant » pour l'enzyme, elle intervient principalement dans le maintien de sa conformation active via des liaisons non-covalentes et des liaisons hydrogène<sup>15</sup>. Ceci concerne donc l'eau directement liée à l'enzyme. De plus, la valeur de  $a_w$  module directement l'équilibre entre le procédé hydrolytique et le procédé synthétique de l'enzyme<sup>16,17</sup>. Plusieurs recherches ont été réalisées sur l'effet de  $a_w$  pour optimiser l'efficacité du biocatalyseur et le rendement des produits<sup>18,19</sup>.

L'activité de l'eau  $a_w$  décrit la distribution de l'eau entre différentes phases pouvant entrer en compétition pour sa fixation. Elle permet de définir l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système, y compris la quantité d'eau dissoute dans le solvant, l'état d'hydratation de l'enzyme et la pression partielle de vapeur d'eau au-dessus du système. Elle est décrite selon l'équation (8) et correspond au rapport de la pression de vapeur de l'eau d'une substance (solution ou mélange,  $p$ ) donnée à la pression de vapeur de l'eau pure ( $p_0$ ).

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (8)$$

Sur une échelle de 0 à 1, l'activité de l'eau est décrite comme la disponibilité de l'eau dans un mélange<sup>20</sup>. Généralement, les enzymes sont faiblement solubles dans les solvants organiques non miscibles à l'eau. Dans ce type de solvants, l'activité de l'eau est proche de 1 et cela en présence de faibles quantités d'eau. Par exemple, l'activité de l'eau du toluène en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,99. Inversement plus le solvant est miscible à l'eau, et par conséquent entrera en interaction avec cette dernière, et moins l'activité de l'eau sera importante pour une même fraction molaire. Par exemple, l'activité de l'eau de l'éthanol en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,2<sup>20</sup>.

Pour contrôler l'activité de l'eau des milieux réactionnels, généralement les composantes de système (biocatalyseurs, solvants et réactifs) sont mis en contact avec des solutions saturées en sels de point de fusion relativement bas, un équilibre de la pression de vapeur d'eau s'établit dans le système<sup>21</sup>. Les paires de sels hydratés vont capter ou libérer des molécules d'eau et ainsi réguler l'activité de l'eau dans le milieu<sup>22</sup>. Le tableau 2.4 résume les valeurs de l' $a_w$  correspondent aux quelques sels utilisés<sup>23</sup>.

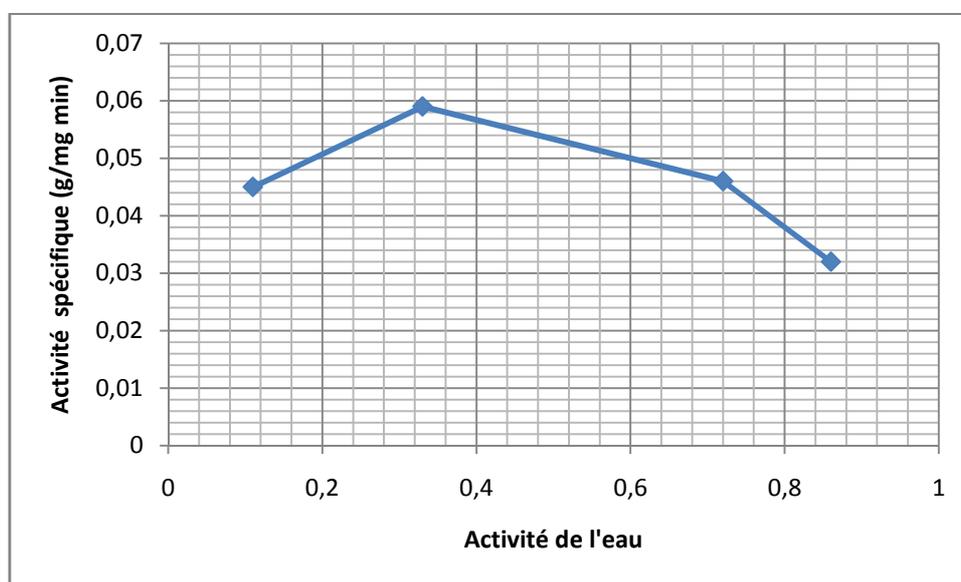
**Tableau 2.4.** Valeurs de l'activité d'eau pour quelques solutions saturées de sel à 25 °C et 50 °C.

Sels	$a_w[25\text{ °C}]^{(a)}$	$a_w[50\text{ °C}]^{(a)}$
LiCl	0.11	0.11
KAc	0.23	0.19
MgCl <sub>2</sub>	0.33	0.31
KCO <sub>3</sub>	0.43	0.43
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.53	0.45

NaBr	0.58	0.51
NaCl	0.75	0.74
KCl	0.84	0.81
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.97	0.96

<sup>(a)</sup>L. Greenspan (1977)<sup>24</sup>.

Chowdary et Prapulla,<sup>17</sup> ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur la synthèse du butyle butyrate catalysée par différentes lipases par acylation, un rapport direct entre l'activité de l'eau et le taux de réaction a été observé. D'autres chercheurs ont rapporté des résultats semblables<sup>25-27</sup>.



**Figure 2.3.** Variation de l'activité de la lipase *Candida rugosa* en fonction de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) dans l'isooctane<sup>25</sup>.

## 2.3. Les milieux non conventionnels des lipases

### 2.3.1. Introduction

Tout au début de la biocatalyse, l'eau étant le solvant naturel des enzymes, seules les réactions d'hydrolyse étaient étudiées. Par la suite, il a été montré que certaines enzymes, telles que les lipases, pouvaient également fonctionner en milieu solvant organique. Ces enzymes se retrouvent essentiellement au niveau des membranes cellulaires, et sont actives dans la cellule dont la concentration en eau est faible, ce qui permet d'expliquer la conservation de leur activité dans un milieu organique<sup>28</sup>. La première étude des enzymes en

milieux dit « non conventionnels » revient à la fin des années 1970. La disponibilité de l'eau dans ce type de milieu est faible, et la réaction de synthèse est alors favorisée<sup>29</sup>. Plusieurs milieux réactionnels pour les enzymes rentrent sous la dénomination « non conventionnels », tels que les solvants organiques, les liquides ioniques, les milieux fondus, le milieu CO<sub>2</sub> supercritique<sup>30-33</sup>. Ces milieux peuvent se trouver sous différents états physiques : liquide ou gazeux.

### 2.3.2. Les solvants organiques

Le travail révolutionnaire réalisé par Klivanov au le début des années 1980 a montré clairement que les enzymes peuvent être utilisées dans des solvants organiques hydrophobes. Plus tard, il s'est avéré que beaucoup de lipases ainsi que quelques protéases et acylases, sont si stables et qu'elles maintiennent leur activité dans des solvants organiques anhydres. Cette dernière caractéristique est à la base de nombreuses applications de ces hydrolases dans des réactions synthétiques, telles que l'acylation des alcools et des amines.

Les solvants organiques sont des composés organiques à l'état liquide contenant des atomes de carbones dans leur structure. Ils sont facilement évaporables et possèdent habituellement des températures de fusion faibles. Dans les milieux organiques, les lipases sont insolubles et se trouvent en suspension dans un solvant anhydre ou faiblement hydraté. Les lipases solubilisées étant plus actives que celles en suspension, des modifications peuvent être apportées à la protéine pour augmenter sa solubilité. Deux méthodes, nommées modifications covalentes et non-covalentes, sont communément utilisées pour atteindre ce but. Les modifications covalentes ou chimiques s'effectuent par la formulation des lipases avec des agents tels que le polyéthylène glycol (PEG) et le polystyrène. Les modifications non-covalentes des lipases se font par la fixation des différents tensioactifs sur les lipases par adsorption. L'utilisation des solvants organiques dans les réactions enzymatiques a ouvert de larges potentialités pour la synthèse des produits de grands intérêts à l'échelle industrielle. Les solvants organiques peuvent être classés en deux grandes classes selon leur capacité à former des liaisons hydrogène ou bien selon leur composition chimique (figure 2.4).

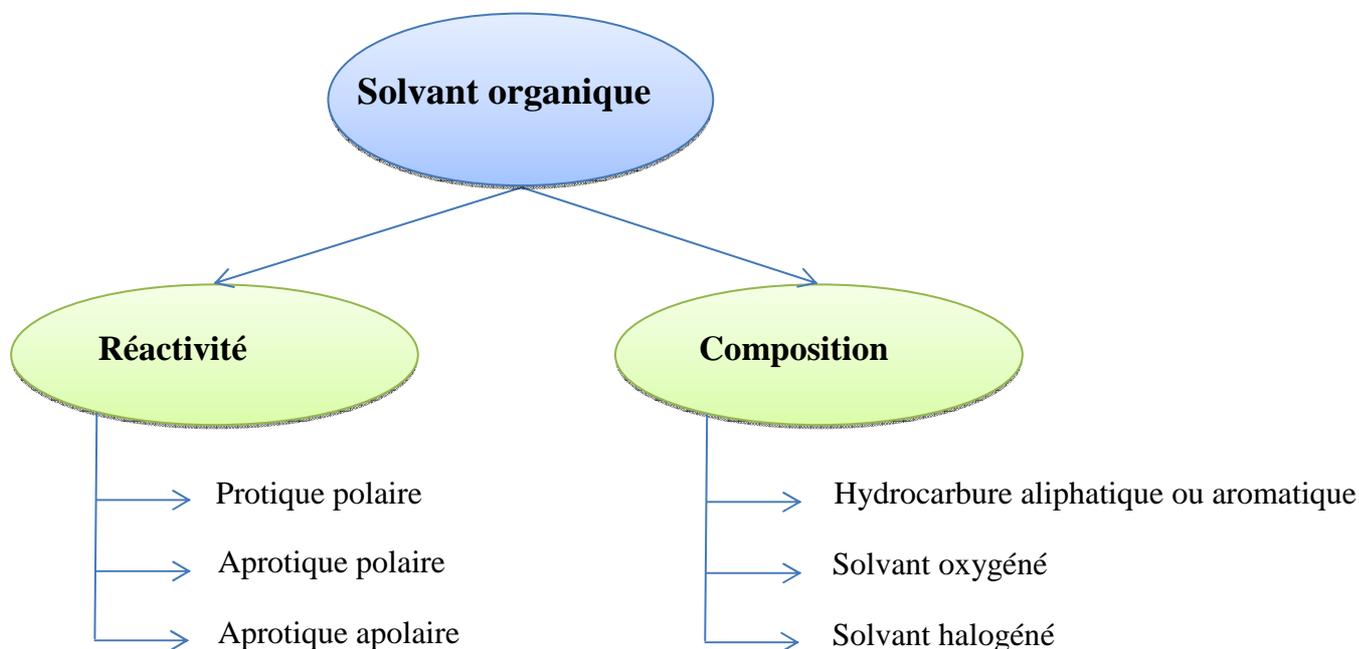
Trois types de solvants organiques rentrent sous la première classe :

1. Les solvants protiques polaires : ils sont capables de former des liaisons hydrogène, miscibles à l'eau et possèdent des faibles moments dipolaires (alcools comme le méthanol).

2. Les solvants aprotiques polaires : ils sont très peu miscibles dans l'eau car ils ne peuvent pas établir de liaisons hydrogènes et présentent de moments dipolaires (solvants halogénés comme le chloroforme).
3. Les solvants aprotiques apolaires : ils ne sont pas miscibles à l'eau et présentent des moments dipolaires nuls (alcanes comme l'hexane).

La deuxième classe regroupe également trois types de solvants organiques :

1. Les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques tels que l'hexane et le benzène
2. Les solvants oxygénés tels que l'éther diéthylique et le dioxane
3. Les solvants halogénés tels que le dichlorométhane et le chloroforme



**Figure 2.4.** Classification des solvants organiques.

La polarité du solvant, sa capacité à dissoudre les substrats et sa volatilité sont les propriétés physiques principales pour considérer un solvant organique comme un bon milieu réactionnel pour les réactions enzymatiques. Le paramètre le plus couramment utilisé pour classer les solvants en termes de polarité ou d'hydrophobicité et par conséquent en leur biocompatibilité, est la valeur  $\log P$ , qui est définie comme le coefficient de partage d'un composé donné dans le système à deux phases le n-octanol et l'eau. Ce coefficient peut être déterminé empiriquement ou bien par la méthode de Nys<sup>34</sup> qui est basée sur les constantes fragmentales d'hydrophobie. Plus tard, cette méthode a été améliorée permettant ainsi une

prédiction et une estimation plus rigoureuse<sup>35</sup>. Le tableau 2.5 présente des valeurs de  $\log P$  de quelques solvants organiques souvent utilisés dans le cadre de la catalyse enzymatique.

**Tableau 2.5.** Valeurs de  $\log P$  pour quelques solvants organiques<sup>35</sup>.

Solvant organique	$\log P$
Dioxane	-1.12
Diméthylformamide (DMF)	-1.00
Acétonitrile	-0.33
<i>Tert</i> -butanol	0.37
Tétrahydrofurane (THF)	0.49
Pyridine	0.71
Ether diéthylique	0.89
Dichlorométhane	1.25
Chloroforme	1.97
Benzène	2.00
Toluène	2.73
Pentane	3.39
Hexane	3.50
Heptane	4.00
Isooctane	4.50

L'étude concernant l'influence des solvants organiques sur le comportement des lipases a sollicité beaucoup d'attention dans les années précédentes. En général, l'activité enzymatique et la stabilité de l'enzyme augmentent avec l'hydrophobicité du solvant en termes de  $\log P$ . Cela est expliqué par la déshydratation de l'enzyme dans les solvants polaires (la valeur de  $\log P$  inférieure à 2) et par conséquent un changement de conformation de la protéine se traduit par une perte du pouvoir catalytique entraînant une diminution du taux de conversion et de la vitesse initiale de la réaction. Par exemple, Chen et *al.*<sup>36</sup> en étudiant l'acylation enzymatique de la cordycépine par l'acétate de vinyle, ont montré la forte influence de la nature du solvant organique sur la vitesse initiale ( $V_0$ ) et le rendement de la réaction. (tableau 2.6). Comme prévu, aucune biotransformation n'a eu lieu dans le DMSO ou le DMF et l'activité enzymatique était proportionnelle à l'hydrophobicité du solvant.

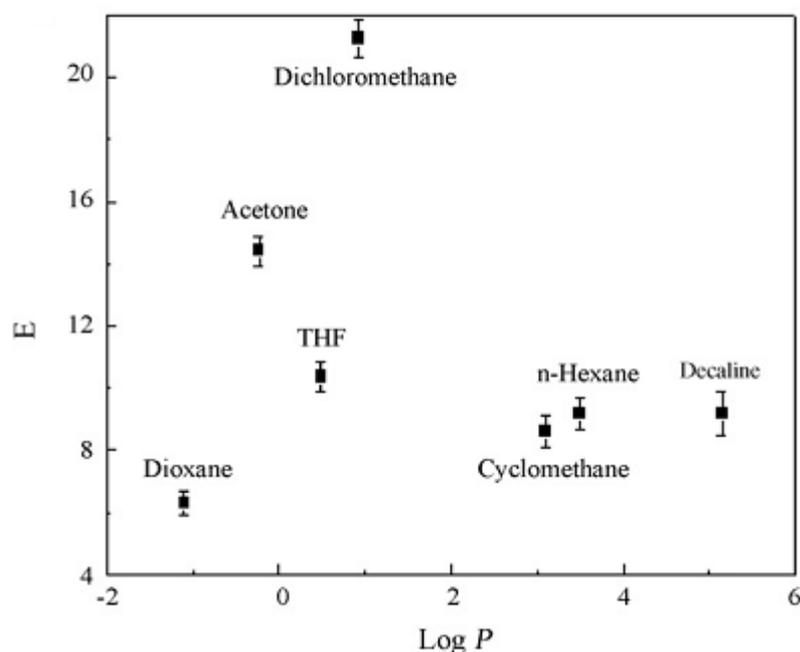
**Tableau 2.6.** Effet du solvant sur l'acylation enzymatique cordycepine catalysée par la lipase<sup>a,36</sup>.

Solvant organique	Log <i>P</i>	Temps (h)	<i>V</i> <sub>0</sub> (mM h <sup>-1</sup> )	Rendement (%)
DMSO	-1.3	12	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
DMF	-1.0	12	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>
Acétone	-0.23	24	5.0 ± 0.5	17.0 ± 1.2
THF	0.49	4	16.0 ± 1.9	88.5 ± 1.3
MeTHF	0.99	3	31.5 ± 1.2	96.5 ± 1.6

<sup>a</sup> Les réactions ont été effectuées à 45 °C et 150 rpm en ajoutant 0,1 mmol de cordycepin, Novozym 435 et 1,0 mmol d'acétate de vinyle dans 5 ml de solvant organique.

<sup>b</sup> Pas de réaction.

Outre l'activité, les solvants influencent également la sélectivité enzymatique et particulièrement l'énantiosélectivité. Cependant, aucune corrélation claire n'a été trouvée entre Log *P* et le facteur d'énantiosélectivité *E*. Wang et al.<sup>37</sup> ont étudié l'effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la lipase de *Alcaligenes sp* (Lipase QLM) dans la résolution de racémique 2-octanol avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle, le dichlorométhane (log *P*=1.25) a donné la valeur de *E* la plus élevée parmi les solvants étudiés (figure 2.5).



**Figure 2.5.** Enantiosélectivité (*E*) en fonction de log *P* de quelques solvants organiques dans la résolution de (*R,S*)-2-octanol avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase QLM<sup>37</sup>.

La taille moléculaire est une autre caractéristique des solvants utilisée pour rationaliser la relation solvant-enzyme. Il a ainsi été rapporté une corrélation négative entre la taille du solvant et l'énantiosélectivité des lipases<sup>38</sup>.

Cependant, l'inconvénient majeur des solvants organiques reste leur toxicité et leur impact néfaste sur l'environnement. La recherche d'autres milieux éco-compatibles est alors axe très important.

### 2.3.3. Les liquides ioniques

Depuis une vingtaine d'années, les liquides ioniques (LIs) sont considérés comme une alternative intéressante aux solvants organiques<sup>39-41</sup>. Les réactions dans les LIs sont essentiellement biocatalysées par des enzymes préalablement utilisées en milieu organique, les lipases étant les plus représentées<sup>42,43</sup>. L'utilisation de LIs dans le domaine de la biocatalyse présente de nombreux avantages, tels qu'une activité élevée, une stabilité thermique et opérationnelle des biocatalyseurs, une bonne énantiosélectivité de la biotransformation par rapport aux milieux réactionnels classiques<sup>44,45</sup>. De plus, les LIs sont considérés comme des solvants verts principalement à cause de leur excellente stabilité thermique, leur nature non-inflammable et leur pression de vapeur négligeable dues aux fortes interactions ioniques dans ces liquides, qui permettent d'utiliser les LIs sans problème d'émission de solvant dans l'atmosphère<sup>46</sup>.

Les LIs sont des sels, composés d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique, dont des points de fusions inférieurs à la température ambiante et une température d'ébullition souvent comprise entre 300 et 400°C<sup>32,47</sup>. Les cations les plus utilisés dans la biocatalyse sont imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, ammonium, phosphonium ou piperidinium. Et les anions les plus fréquemment utilisés sont l'héxafluorophosphate, le tétrafluoroborate, le tosylate, Bis[(trifluorométhyl)sulfonyl]imide, (trifluorométhyl)sulfonyl ou le diméthylphosphate (tableau 2.7)<sup>48,49</sup>. Les propriétés physicochimiques des LIs sont modulables en fonction du choix du cation et de l'anion constitutifs du LIs, on trouve ainsi une grande diversité de LIs par différentes combinaisons cation/anion<sup>48</sup>. Le cation est généralement à l'origine de la stabilité et des propriétés physiques du liquide ionique, alors que l'anion définit plutôt ses propriétés chimiques et sa fonctionnalité<sup>50</sup>.

**Tableau 2.7.** Cations et anions des LIs les plus utilisés dans la biocatalyse<sup>51</sup>.

Cations			Anions		
Nom	Abréviation	Structure	Nom	Abréviation	Structure
Imidazolium	[IM] <sup>+</sup>		Tetrafluoro- borate	[BF <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	
Pyridinium	[Pyr] <sup>+</sup>		Héxafluoro- phosphate	[PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	
Pyrrolidinium	[PL] <sup>+</sup>		Tosylate	[TOS] <sup>-</sup>	
Ammonium	[N <sub>a b c d</sub> ] <sup>+</sup>		Bis- [(trifluoro- methyl)- sulfonyl]- imide	[NTf <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Phosphonium	[P <sub>m n o p</sub> ] <sup>+</sup>		(Tri- fluoromethyl)- sulfonyl	[OTf] <sup>-</sup>	
Piperidinium	[PI] <sup>+</sup>		di-alkyl- phosphate	[DAP] <sup>-</sup>	

Les propriétés physiques des LIs (telles que la polarité, l'hydrophobicité, la viscosité et la basicité des liaisons hydrogène) peuvent être parfaitement conçues par la sélection appropriée des cations et des anions. Par exemple, les LIs peuvent être synthétisés pour être miscibles dans l'eau, partiellement miscibles ou non miscibles, avec des polarités différentes, et peuvent également être synthétisés avec différentes viscosités ciblant des applications spécifiques<sup>52</sup>. Toutes ces propriétés accordables sont très importantes pour la stabilisation et l'activation des enzymes. Par conséquent, de nombreuses réactions enzymatiques ont été étudiées dans différents types de LIs<sup>44,53</sup>. Bien que certaines LIs (telles que celles basées sur BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> et Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>) soient moins dénaturantes que les solvants organiques et qu'une activité catalytique élevée et une énantiosélectivité aient été rapportées pour de nombreuses réactions<sup>54</sup>, de nombreuses enzymes présentent la même amplitude d'activités dans les LIs que dans les solvants organiques, qui restent considérablement inférieurs à ceux des solutions aqueuses.

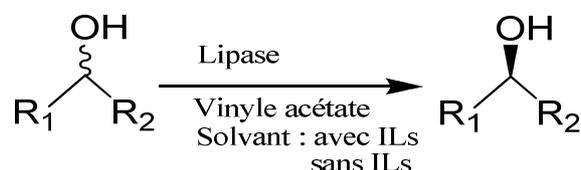
En se basant sur des études solvatochromiques, des LIs ont été trouvés modérément polaires proches à celles des alcools inférieurs<sup>55,56</sup> ou du formamide<sup>57</sup>. Park et Kazlauskas<sup>58</sup> ont observé une augmentation de l'activité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* avec la polarité de LIs pendant l'acylation du 1-phényléthanol racémique avec l'acétate de vinyle (par exemple, la vitesse initiale de réaction en moins polaire [BMIM][PF<sub>6</sub>] est trois fois plus lente que celle en plus polaire [EMIM][BF<sub>4</sub>]). Dans une autre étude, on a également obtenu des activités synthétiques inférieures d' $\alpha$ -chymotrypsine dans des LIs moins polaires<sup>59</sup>. Au cours de l'estérification catalysée par Novozym® 435 de méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside avec des acides gras, Mutschler et al.<sup>60</sup> ont observé que la conversion des esters augmentait avec la polarité des LIs lorsqu'ils ont été utilisés comme additifs à des solvants organiques, mais diminué avec la polarité des LIs lorsque les LIs ont été utilisés comme solvants. Cependant, la corrélation entre la polarité de LIs et l'activité enzymatique n'a pas été établie pour d'autres réactions enzymatiques réalisées dans les LIs<sup>61,62</sup>.

Les LIs sont des fluides plus visqueux par rapport aux solvants organiques classiques<sup>52</sup>. De plus, de nombreuses réactions enzymatiques dans les LIs sont hétérogènes à cause de la faible solubilité des enzymes dans la plupart des LIs. Par conséquent, les limites internes et externes de transfert de masse doivent être prises en considération<sup>53</sup>. Lozano et al.<sup>59</sup> ont indiqué qu'en plus de la polarité des LIs, l'activité de l' $\alpha$ -chymotrypsine dépend également de leur viscosité. Une activité enzymatique plus élevée a été observée dans [EMIM][Tf<sub>2</sub>N] que dans [MTOA][Tf<sub>2</sub>N] (MTOA = méthyl trioctylammonium) car le premier IL (34 mPa s) est

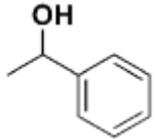
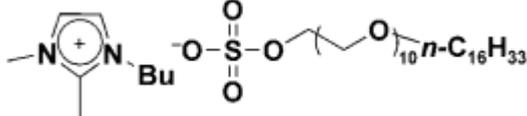
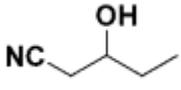
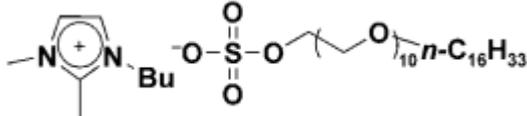
moins visqueux que le dernier (574 mPa s). Eckstein et *al.*<sup>63</sup> ont expliqué que l'énantiosélectivité supérieure de la lipase dans [BMIM] [Tf<sub>2</sub>N] à une faible activité de l'eau ( $a_w < 0,53$ ) que dans l'éther méthylique de tert-butyle (MTBE) était pour deux raisons: (1) la viscosité plus élevée de LI (52 mPas) que celle du MTBE (0,34 mPa) peut entraîner des limitations de transfert de masse et diminuer la vitesse de réaction; (2) la faible solubilité des substrats dans les LIs que dans le MTBE peut provoquer une énergie d'activation plus faible dans les LIs. Van Rantwijk et Sheldon<sup>48</sup> ont expliqué que la viscosité élevée des LIs ralentit les changements conformationnels des protéines, permettant aux enzymes de maintenir leurs structures et leur activité natives. Une étude récente<sup>64</sup> de la transesterification catalysée par lipase de 1-butanol avec le butyrate d'éthyle dans plus de 20 LIs confirme entre autre que la viscosité des LIs peut affecter les taux de réaction dans certains cas, mais n'est pas le principal facteur de contrôle de l'activité de l'enzyme.

Le tableau suivant illustre quelques exemples issus de la littérature, de l'effet des LIs sur l'énantiosélectivité des lipases dans la résolution cinétique de quelques alcools racémiques. On remarque clairement l'amélioration de l'énantiosélectivité des lipases en présence des LIs.

**Tableau 2.8.** Résolution cinétique des alcools racémiques : Exemples issus de la littérature de l'effet des LIs comme additifs sur l'énantiosélectivité enzymatique (*E*).



Substrat	IL additif	<i>E</i>	Référence
		Sans LI : 265 Avec LI : 532	<sup>65</sup>
		Sans LI : 293 Avec LI : 574	<sup>65</sup>
		Sans LI : 107 Avec LI : 156	<sup>65</sup>

		Sans LI : 17 Avec LI : 96	66
		Sans LI : 39 Avec LI : 40	67

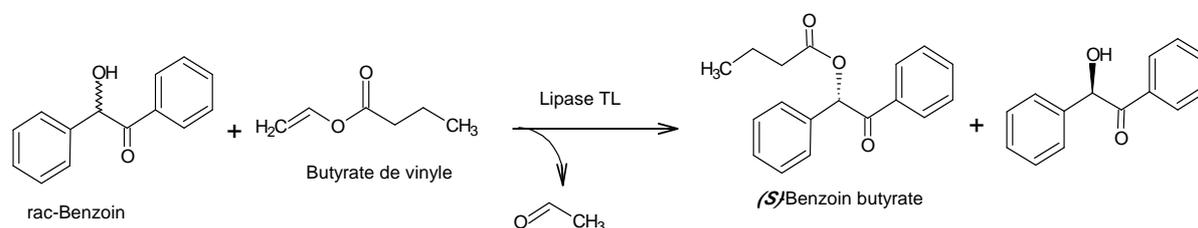
### 2.3.4. Solvants respectueux de l'environnement

Dernièrement, les solvants 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF)<sup>68</sup> et cyclopentyl méthyl éther (CPME)<sup>69</sup> sont de plus en plus utilisés aussi bien au niveau laboratoire qu'à celui industriel, comme alternative à leurs analogues éthers tels le THF et le TBME. Le MeTHF a été utilisé dans diverses réactions organiques comme solvant respectueux de l'environnement, en raison de ses propriétés éco-favorables. Par exemple, le point d'ébullition plus élevé du MeTHF (80 °C contre 66 °C pour le THF) pourrait considérablement réduire l'évaporation du solvant pendant la réaction. Il est partiellement miscible à l'eau et peut former un azéotrope avec l'eau. À 60 °C, la phase organique MeTHF contient environ 4,5% d'eau et la solution aqueuse contient environ 6,6% de MeTHF. A cette température, le MeTHF et l'eau forment un azéotrope (environ 10,4% d'eau), et donc les deux phases peuvent être séparées par distillation classique, utile pour les réactions à deux phases et la récupération du produit. Plus important encore, le MeTHF peut être produit à partir de la biomasse (coquille de maïs, bagasse de la canne à sucre et coques d'avoine) et donc satisfaisant au 7<sup>ème</sup> principe de la chimie verte. Autre avantage, le MeTHF peut être dégradé abiotiquement en présence de la lumière du soleil et de l'air, vraisemblablement par oxydation et par ouverture du cycle. Par conséquent, l'utilisation de MeTHF rendra les processus plus écologique. De même, le cyclopentyle methyl éther (CPME) a été évalué comme une alternative favorable à l'environnement par rapport aux solvants organiques classiques. Le CPME est commercialement disponible depuis 2005. Il peut être fabriqué par méthylation du cyclopentanol ou par addition de méthanol au cyclopentène qui est facilement disponible. Le premier procédé est une substitution nucléophile qui produit des sous-produits en tant que déchets, tandis que le dernier (réaction d'addition) ne produit aucun produit secondaire. Le CPME possède plusieurs caractéristiques avantageuses telles que : (1) une hydrophobicité élevée et donc très facile à sécher, (2) la formation du peroxyde par les produits est nulle, (3) relativement stable dans des conditions acides et basiques, (4) une faible chaleur d'évaporation et (5) une gamme d'explosion étroite.

**Tableau 2.9.** Propriétés physique de MeTHF et CPME.

Propriétés	CPME	MeTHF
Densité (20 °C) [g/cm <sup>3</sup> ]	0.86	0.85
Viscosité (20 °C) [cP]	0.55	0.6
Point d'ébullition [°C]	106	80
Point de fusion [°C]	-140	-136
Chaleur d'évaporation (bp) [kcal/kg]	69.2	89.7
Moment dipolaire [D]	1.27	-
Constante diélectrique (25 °C)	4.76	7
Point azéotrope avec l'eau [°C]	83	71
Solubilité du solvant à l'eau (23 °C) [g/100 g]	1.1	14
point d'inflammabilité [°C]	-1	-14.5
Log <i>P</i>	1.59	0.99

Parmi le peu d'exemples qui existent dans la littérature sur l'effet de ces solvants verts sur l'activité des lipases, le travail de Hoyos et *al.*<sup>70</sup> a montré l'activité et l'énantiosélectivité élevée exhibées par la lipase de *pseudomonas stutzeri* dans la résolution du benzoïne avec le butyrate de vinyle dans le CPME et MeTHF.

**Tableau 2.10.** La lipase de *P. stutzeri* (lipase TL) catalyse la résolution énantiosélective de racémique benzoïne avec le butyrate de vinyle comme donneur d'acyle : comparaison entre CPME, Toluène et MeTHF<sup>70</sup>.


Solvant organique	Temps (h)	conversion	ee (%)
CPME		98.2	99.0
Toluène	5	98.4	98.5
MeTHF		96.9	97.0

### 2.3.5. Influence du milieu sur le comportement de la lipase

L'énorme potentiel des lipases comme des biocatalyseurs pratiques est bien reconnu<sup>71,72</sup>. En particulier, ils sont très exploités dans les biotransformations en synthèse asymétriques<sup>73</sup>, à cause de la demande croissante de produits pharmaceutiques énantiopures<sup>74</sup>. Leur utilité technologique est grandement améliorée en les utilisant dans des milieux organiques plutôt que leurs milieux réactifs aqueux naturels. Des études au cours des 25 dernières années ont révélé non seulement que cette modification du solvant est réalisable, mais aussi que dans ces milieux qui peuvent apparaître hostiles, les lipases peuvent catalyser des réactions impossibles dans l'eau, devenir plus stables et présenter de nouveaux comportements tels que la «mémoire moléculaire»<sup>75</sup>. Une importance particulière a été la découverte que la sélectivité enzymatique, y compris la stéréo, la régio et la chimiosélectivité vis-à-vis les substrats, peuvent être fortement affectées, et parfois même inversées, par le solvant. Les réactions catalysées par les lipases dans les solvants organiques, les liquides ioniques et même dans les fluides supercritiques, ont trouvé de nombreuses applications potentielles, dont certaines sont déjà commercialisées<sup>75</sup>.

## Références bibliographiques

- (1) Chebil, L.; Humeau, C.; Falcimaigne, A.; Engasser, J.-M.; Ghoul, M. *Process Biochem.* **2006**, *41* (11), 2237–2251.
- (2) Tacias-Pascacio, V. G.; Virgen-Ortíz, J. J.; Jiménez-Pérez, M.; Yates, M.; Torrestiana-Sanchez, B.; Rosales-Quintero, A.; Fernandez-Lafuente, R. *Fuel* **2017**, *200*, 1–10.
- (3) Alalla, A.; Merabet-Khelassi, M.; Riant, O.; Aribi-Zouiouèche, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27* (24), 1253–1259.
- (4) Brahmachari, G. Academic Press, 2017; pp 325–346.
- (5) Sonnet, P. E.; Baillargeon, M. W. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13* (5), 1279–1292.
- (6) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656–2665.
- (7) Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3180–3186.
- (8) Overbeeke, P. L. A.; Ottosson, J.; Hult, K.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A. *Biocatal. Biotransformation* **1999**, *17* (1), 61–79.
- (9) Johnson, C. R.; Sakaguchi, H. *Synlett* **1992**, *1992* (10), 813–816.
- (10) Ottosson, J.; Hult, K. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11* (4–6), 1025–1028.
- (11) Olsen, T.; Kerton, F.; Marriott, R.; Grogan, G. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39* (4), 621–625.
- (12) Moure, V. R.; Fabrício, C.; Frensch, G.; Marques, F. A.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2014**, *3* (2), 146–153.
- (13) G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge, D. G. R. *Elsevier Sci. Ltd* **1995**, *13*, 468–473.
- (14) SJ, S. *Adv. Protein Chem.* **1962**, *17*, 1–68.
- (15) Tanford C, D. P. U. *J. Biol. Chem.* **1961**, *263* (6), 1711–1715.
- (16) Valivety, R. H.; J. Halling, P.; Macrae, A. R. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1992**, *1118* (3), 218–222.
- (17) Chowdary, G. V; Prapulla, S. G. *Process Biochem.* **2002**, *38* (3), 393–397.
- (18) Mikolajek, R.; Spiess, A. C.; Pohl, M.; Lamare, S. **2007**, *1*, 1063–1070.
- (19) Secundo, F.; Carrea, G. *Chemistry* **2003**, *9* (14), 3194–3199.
- (20) Halling, P. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16* (3), 178–206.
- (21) Kuhl, P.; Halling, P. J.; Jakubke, H.-D. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (36), 5213–5216.
- (22) Lise Kvittingen, Birte Sjursnes, and T. A. *Tetrahedron* **1992**, *48* (13), 2793–2802.

- (23) Petrenz, A.; Maria, P. D. De; Ramanathan, A.; Hanefeld, U.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Kara, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 42–49.
- (24) Greenspan, L. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* **1977**, *81A* (1), 89.
- (25) Yu, H. W.; Chen, H.; Yang, Y. Y.; Ching, C. B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *35*, 28–32.
- (26) Ujang, Z.; Vaidya, A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50* (3), 318–322.
- (27) Svensson, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44* (5), 549–556.
- (28) S, D. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11* (4), 194–211.
- (29) L.G, B. *Enzyme Microb. Technol.* **1979**, *1* (4), 253–259.
- (30) J.O, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *37* (21), 2975–2978.
- (31) Hudson, E.P., Eppler, R.K. & Clark, D. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16* (6), 637–643.
- (32) Hernández-Fernández, F. J.; Ríos, A. P. de los; Lozano-Blanco, L. J.; Godínez, C. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85* (11), 1423–1435.
- (33) Doukyu, N. & Ogino, H. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48* (3), 270–282.
- (34) G, N. G. *Chim. thérapeutique* **1973**, *5*, 521–535.
- (35) Mannhold R. Rekker R. *prespectives drug Discov. Des.* **2000**, *18*, 1–18.
- (36) Chen, Z. G.; Zhang, D. N.; Cao, L.; Han, Y. Bin. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 82–86.
- (37) Wang, Y.; Li, Q.; Zhang, Z.; Ma, J.; Feng, Y. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *56* (2–3), 146–150.
- (38) Vrutika, P.; Datta, M. *Appl Biochem Biotechnol* **2015**, *177*, 1313–1326.
- (39) Ghaedizadeh, S.; Emamzadeh, R.; Nazari, M.; Rasa, S. M. M.; Zarkesh-Esfahani, S. H.; Yousefi, M. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *105*, 505–513.
- (40) Yuan, Y.; Bai, S.; Sun, Y. *Food Chem.* **2006**, *97* (2), 324–330.
- (41) Lin, X. S.; Wen, Q.; Huang, Z. L.; Cai, Y. Z.; Halling, P. J.; Yang, Z. *Process Biochem.* **2015**, *50* (11), 1852–1858.
- (42) Shimomura, K.; Harami, H.; Matsubara, Y.; Nokami, T. *Catal. Today* **2015**, *255*, 41–48.
- (43) Domínguez De María, P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (37), 6960–6968.
- (44) Park, Seongsoon; Romas J, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *4* (14), 432–437.
- (45) van Rantwijk, F.; Madeira Lau, R.; Sheldon, R. A. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (3), 131–138.

- (46) Sheldon, R. A.; Lau, R. M.; Sorgedraeger, M. J.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R. *Green Chem.* **2002**, *4* (2), 147–151.
- (47) Koo, Y.-M.; Ha, S. H. *J. Biotechnol.* **2008**, *136*, Suppl, S6–S7.
- (48) van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2757–2785.
- (49) De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M. A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3–4), 234–241.
- (50) Zhao, H. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, No. 85, 891–907.
- (51) Xu, P.; Zheng, G. W.; Du, P. X.; Zong, M. H.; Lou, W. Y. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (2), 371–386.
- (52) Peter Wasserscheid, T. W. *Ionic Liquids in Synthesis*, 2nd Editio.; 2008.
- (53) Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (6), 565–571.
- (54) Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K.; Itoh, T. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2008**, *51* (3–4), 81–85.
- (55) Carmichael, A. J.; Seddon, K. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13* (10), 591–595.
- (56) Aki, S. N. V. K.; Brennecke, J. F.; Samanta, A. *Chem. Commun.* **2001**, No. 5, 413–414.
- (57) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2319–2358.
- (58) Park, S.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8395–8401.
- (59) Lozano, P.; de Diego, T.; Guegan, J.-P.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75* (5), 563–569.
- (60) Mutschler, J.; Rausis, T.; Bourgeois, J.-M.; Bastian, C.; Zufferey, D.; Mohrenz, I. V.; Fischer, F. *Green Chem.* **2009**, *11* (11), 1793–1800.
- (61) Zhao, H.; Olubajo, O.; Song, Z.; Sims, A. L.; Person, T. E.; Lawal, R. A.; Holley, L. A. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34* (1), 15–25.
- (62) Schofer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Chem. Commun.* **2001**, No. 5, 425–426.
- (63) Eckstein, M.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24* (10), 763–767.
- (64) Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57* (1–4), 149–157.
- (65) Lee, J. K.; Kim, M.-J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (19), 6845–6847.
- (66) Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S. H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (36), 9228–9237.
- (67) Itoh, T.; Han, S.; Matsushita, Y.; Hayase, S. *Green Chem.* **2004**, *6* (9), 437–439.
- (68) Aycock, D. F. *Org. Process Res. Dev* **2007**, *11* (1), pp 156–159.
- (69) Watanabe, K.; Yamagiwa, N.; Torisawa, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (2), 251–

258.

- (70) Hoyos, P.; Quezada, M. A.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, 72 (1–2), 20–24.
- (71) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry 4th edn*; Springer: Berlin, 2000.
- (72) Roberts, S. M., Turner, N. J., Willetts, A. J. & Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms*, Cambridge.; Univ. Press: New York, 1995.
- (73) Zaks, A. & Dodds, D. R. *Drug Disc. Today* **1997**, 2, 513–531.
- (74) Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **1998**, 76, 83–96.
- (75) Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, 409 (January), 786–790.