الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA-

M<sup>me</sup> ARIRI-ZOUIOUECHE

جامعة باجي مختار-عنابة Année/2018

Professeur II R M Annaha

Faculté des sciences Département de chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat.

**Option :** Chimie Organique

THÈME

Dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique non conventionnelle de nouveaux substrats chiraux

Présentée par : M<sup>elle</sup> Fatma Zohra BELKACEMI

Directrice de thèse

Louisa

	Louisu	Directifice de tilese	lioicobcui	
M <sup>r</sup> RIANT	Olivier	Co-directeur de thèse	Professeur	U.C.L. Belgique
		Devant le jury :		
M <sup>me</sup> ZEROR	Saoussen	Présidente	Professeur	U.B.M. Annaba
M <sup>me</sup> BAITICHE	Milad	Examinatrice	Professeur	U.F.A. Sétif
M <sup>me</sup> DJEDOUANI	Amel	Examinatrice	Professeur	U.N.S. Constantine
M <sup>me</sup> FERCHICHI	Loubna	Examinatrice	M.C. A	U.B.M. Annaba

<u>ا لعنوان</u> : الفصل الحركي الأنزيمي لركائز كيرالية جديدة باستعمال اماهة غير تقليدية

تهدف هذه الرسالة إلى دراسة انتقائية وتفاعلية الليبازات في التحليل الحركي الأنزيمي للكحوليات الكيرالية ذات القيمة المضافة العالية من خلال مناهج نظيفة ومستدامة. يتم تحقيق انتقائية الليباز عن طريق ضبط مختلف عوامل التفاعل التي تؤثر بشكل إيجابي على انتقاء المماكبات الضوئية. تم إجراء الأسيلة الانتقائية لـ اله-منثول المحفزة بـ *CCL* وذلك باستعمال أسيتات الفينيل في ثلاثي بوتيل مثيل إيثار (TBME) في وجود الكلويد مضاف : quinidine. من الحصول على مركب المنثيل اسيتات بدرجة عالية من الانتقائية الضوئية 80 =E وتحويل %C = 2 . قمنا بتطبيق العوامل التجريبية المحسنة على سلم الغرام باستعمال ليباز غير مكلف تجاريا، يتم استرداد ا-منثول نشط بصريا مع

من ناحية أخرى, قمنا بتطبيقات مستحدثة للاماهة باستعمال Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> و المحفز CAL-B في وسط عضوي وذلك على مجموعة من المركبات على درجة عالية من الاهمية : Cal-B-أريل-1-سيكلوهكزيل اسيتات و أريل-ألكيل-أمينو استر.

تم فصل المتخايل *cis/trans-*2-أريل-1-سيكلوهكزيل عن طريق الفصل الحركي للأسيتات الراسيمي و يعطي (*CAL-B*)-2-أريل سيكلوهكسانول بدرجة عالية من النقاوة الضوئية مع 99 <ee% و الإنتقائية .E> 200 <br/>.e ان المقارنة بين طرقتي الأسيلة/ الاماهة افادت ان الليباز *CAL-B* هو المحفز البيولوجي الانسب للاماهة القلوية وذلك في نفس المحلول العضوي. حيث تم تصنيع انتقائي عالي الجودة, دياستريوميري و اننتيوميري للمتخايل R انطلاقا من مزيج صنف (cis/trans)-2-فينيل-1-

اخيرا, تم تطبيق الاماهة القلوية المحفزة بـ CAL-B على مجموعة جديدة من المركبات صنف أريل-ألكيل-أمينو استر. تم الحصول على متخايلات هذا النوع من المركبات بدرجة عالية من النقاوة الضوئية وانتقائية عالية 100 <E والتحويلات بين 39٪ و 53٪ وذلك بعد فصلها بسهولة والحصول على المتخايل (R)-كحول عن طريق استخراج سائل سائل دون اللجوء الى الكروماتوغرافية العمودية.

<u>الكلمات المفتاحي</u>ة: الازدواجية الحركية، الاماهة، الأسيلة، الليباز، الكحولات الثانوية، تربين، إضافات، أريل-سيكلوهكسانول ، الإسترات الأمينية.

#### ABSTRACT

# <u>Title</u> : Synthesis of novel chiral substrates using kinetic enzymatic resolution through non-conventional hydrolysis.

The main objective of this thesis is the study of the selectivity and reactivity of lipases as catalysts in kinetic resolution of chiral alcohols with high added value adopting clean and sustainable approaches. Selectivity of lipases is achieved by modulation of several parameters to impact significantly the enantio-differentiation.

The selective acylation of *dl*-menthol catalyzed by *Candida cylindracea lipase* (*CCL*) with vinyl acetate (VA) in tert-butylmethylether (TBME) is carried out in the presence of an alkaloid as additive: quinidine. The *l*-(-)-menthyl acetate is obtained with selectivity  $\mathbf{E} = \mathbf{80}$  and conversion  $\mathbf{C} = \mathbf{49\%}$ . These mild experimental conditions are applied in a multi-gram scale using a commercially inexpensive lipase; the optically active *l*-menthol is recovered with good yield.

New applications of hydrolysis with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> with *Candida antarctica lipase B* (*CAL-B*) in organic media are also reported on two series of substrates: the *cis/trans*-2-aryl-1-cyclohexyl acetate, important chiral auxiliaries, and some Aryl-alkyl-amino ester derivatives.

The kinetic resolution of racemic *trans*-arylcyclohexyl acetate gives (*1R*, *2S*)-*trans*-2arylcyclohexanols with **ee** > **99%** and selectivity **E**> **200**. The acylation/deacylation pathways are compared and the *CAL-B* shows a better affinity for the alkaline hydrolysis paths in the same organic solvents. A good diastereo- and enantioselectivity of *CAL-B* in favor of the (*R*)trans-enantiomer are obtained from the isomeric mixtures of the *cis/trans*-2-phenyl-1cyclohexanol and the corresponding acetates.

CAL-B catalyzed alkaline hydrolysis is applied to a new series of Aryl-alkyl-amino-ester substrates. The best conditions are selected for an exemplification and these new substrates are hydrolyzed with a high selectivity E > 100 and conversions varied between 39% and 53% in favor to the (*R*)-enantiomerically enriched alcohols. Both enantiomers are obtained by simple liquid-liquid extraction, without the use of column chromatography.

**Keywords:** Kinetic resolution, hydrolysis, acylation, lipase, secondary alcohols, terpene, additives, arylcyclohexanols, chiral auxiliaries, amino esters

#### RÉSUME

# <u>**Titre</u>** : Dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique non conventionnelle de nouveaux substrats chiraux.</u>

Ces travaux de thèse ont pour objectif d'étudier la sélectivité et la réactivité des lipases sur le dédoublement cinétique enzymatique d'alcools chiraux à haute valeur ajoutée par des approches propres et durables. La sélectivité des lipases est réalisée en ajustant divers paramètres réactionnels pour impacter favorablement la différenciation énantiomérique.

L'acylation sélective du *dl*-menthol catalysée par la lipase *Candida cylindracea* (*CCL*) avec l'acétate de vinyle (AI) dans le tert-butylméthyléther (TBME) a été réalisée en présence d'un alcaloïde comme additif : la quinidine. Le *l*-(-)-menthyle acétate est obtenu avec une sélectivité  $\mathbf{E} = \mathbf{80}$  et une conversion  $\mathbf{C} = \mathbf{49\%}$ . Ces conditions expérimentales douces sont appliquées dans une production multi gramme avec une lipase commercialement peu coûteuse, *l*-menthol optiquement actifs est récupéré avec un bon rendement.

De nouvelles applications de l'hydrolyse avec le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et la lipase *Candida antarctica* B (*CAL-B*) en milieu organique ont été également rapportées pour deux séries substrats : les acétates de type 2-aryl-1-cyclohexyle *cis/trans* auxiliaires chiraux importants et les dérivés Aryl-alkyl-esters aminés.

Le dédoublement cinétique du *trans*-arylcyclohexyl acétate racémique donne les (*1R*, 2*S*)*trans*-2-arylcyclohexanols avec des **ee> 99%** et une sélectivité **E> 200**. Les voies d'acylation/déacylation sont comparées et la *CAL-B* présente une meilleure affinité pour la réaction d'hydrolyse alcaline dans les mêmes solvants organiques. Une très forte *diastéréo* et *énantio*sélectivité de la *CAL-B* en faveur du (*R*)-*trans*-énantiomère sont obtenues à partir des mélanges des stéréoisomères *cis/trans*-2-phényl-1-cyclohexanol et acétates correspondants.

L'hydrolyse alcaline avec la *CAL B* est appliquée sur une nouvelle série de substrats de type Aryl-alkyl-esters aminés. Les meilleures conditions sont sélectionnées mises en œuvre pour l'exemplification de la réaction et ces nouveaux substrats sont hydrolysés avec une haute sélectivité  $\mathbf{E} > 100$  et des conversions entre **39%** et **53%** de l'ester racémique pour obtenir les (*R*)-alcools énantiomériquement enrichis. Les deux énantiomères sont obtenus par simple extraction liquide-liquide, sans utilisation de la chromatographie sur colonne.

<u>Mots clés</u> : Dédoublement cinétique, hydrolyse, acylation, lipase, alcools secondaires, terpène, additifs, arylalkylcyclohexanols, auxiliaires chiraux, esters aminés.

À mes parents qui ont toujours cru en moi et en mes rêves, A tous ceux qui ont cru en moi, Merci de tout cœur.

### Remerciements

Le travail faisant l'objet de cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-Compatible « L.C.A.E », Université Badji Mokhtar d'Annaba (Algérie) sous la direction de Madame la Professeure *Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE*. Une autre partie

de l'étude a été faite au Laboratoire de chimie organique et médicinale « **CHOM** », Université catholique de Louvain **UCL** (Belgique) sous la direction de Monsieur le professeur *Olivier RIANT*.

Tout d'abord je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse, Madame *Louisa ARIBI-ZOUIOUECHE*, Professeur à l'Université d'Annaba, pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome tout au long de ces années. Au travers de nos discussions, elle m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet. Je salue aussi sa souplesse et son ouverture d'esprit qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Nonobstant, sa relecture finale méticuleuse de chacun des chapitres m'a sans aucun doute permis de préciser mon propos. « Merci madame pour m'offrir l'occasion de travailler avec vous, vous êtes une légende pour moi »

J'adresse mes chaleureux remerciements au co-directeur de ma thèse de doctorat, monsieur Olivier RIANT, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. L'opportunité qu'il m'a offerte m'a permis de parfaire mes compétences en chimie et surtout en synthèse organique. Je lui remercie aussi pour son soutien de tous les instants, de sa patience et sa grande disponibilité au cours de ma période de stage.

« Merci Chef »

Je tiens à remercier tout particulièrement : Madame *Saoussen ZEROR*, Professeur à l'Université de Annaba qui m'a fait un grand honneur de présider le jury de cette thèse. Mes vifs remerciements vont aussi à l'ensemble des membres du jury : Madame *Amel* 

DJEDOUANI (Professeur à l'Université Constantine), Madame Milad BAITICHE (Professeur à l'Université Sétif) et Madame Loubna FERCHICHI (Maitre de conférences A à l'Université de Annaba).

« Merci d'avoir accepté d'examiner, corriger et commenter mon manuscrit et ainsi participé à son amélioration »

Ce travail de thèse fut aussi un grand moment de partage, scientifique ou non avec mes nombreux collègues à L'UCL en Belgique et/ou à L.C.A.E à Annaba.

Je remercie chaleureusement *Mme. Chantal DELAET* pour son soutien inconditionnel et son humour, *François BILLARD* pour son aide et présence à tout moment. Un grand merci, à *Mr. Alain JANCART* pour sa formation en RMN, et à *Mr. Fabio LUCACCIONI* pour sa formation en GC.

« Un grand merci pour toute l'équipe de l'UCL qui m'a aidée scientifiquement et pour leurs bonnes humeurs qui font du laboratoire un endroit où l'on se sent bien »

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire **L.C.A.E** pour son soutient et son encouragement et plus particulièrement *Mounia MERABET-KHLASSI* (Maitre de conférences A à l'Université de Annaba) qui a assuré ma motivation grâce à ses précieux conseils tout au long de ces années.

« Merci mounia, notre ange gardien ; votre présence est toujours un plus dans le L.C.A.E »

J'adresse mes profonds remerciements à mes amies et mes sœurettes : **Amna**, **Affaf**, **Aïcha**, **Manhel** et mon âme sœur **Sana** pour leur soutien et d'avoir supporté mon humeur, pour le moins variable, pendant les mois de rédaction de ce manuscrit.

« Merci, vous êtes une source de réconfort et d'énergie permanente, je vous admire »

Enfin, Mes remerciements spéciaux vont également à **ma mère** et **mon père**, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et pour m'avoir fait confiance. Ils se sont beaucoup sacrifiés pour m'offrir toutes les conditions nécessaires afin que je puisse devenir ce que je suis.

« Merci chers parents »

Merci, À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse

Abréviations/ Symboles &	Signification
Acronymes	Signification
AA	Agent acylant
Ac	Acétyle
AE	Acétate d'éthyle
AI	Acétate d'isopropényle
Ar	Aryle
AV	Acétate de vinyle
PS	Pseudomonas cepacia
RC	Candida rugosa
РР	Pancréatique de Porc
AV	Anhydride succinique
CAL-B	Candida Antarctica Lipase B
CCL	Candida Cylindracia
ССМ	Chromatographie sur couche mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
DC	Dédoublement cinétique
DCE	Dédoublement cinétique enzymatique
DIPE	Diisopropyléther
TBME	tertbuthylméthyléther
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
С	Conversion
Ε	Facteur de sélectivité
ee <sub>s</sub> / ee <sub>p</sub>	Excès énantiomérique substrat / produit
Eq.	Equivalent
h	Heure
Hz	Hertz
j	Constante de couplage

Μ	Molaire
mg	Milligramme
Mmole	Milli mole
Р	Produit
S	Substrat
Ррт	Partie par million
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
t.a	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
t <sub>R</sub>	Temps de réaction
TM	Tamis moléculaire

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Activité biologique de différents énantiomères en fonction de leur configuration absolue	3
2	Structures des enzymes	29
3	Lipases utilisées lors de la transestérification du <i>dl</i> -menthol	86
4	Transestérification du <i>dl</i> -menthol en présence et en absence du tamis moléculaires 4Å : Influence de la lipase	88
5	Influence de l'agent acylant sur la transestérification du <i>dl</i> -menthol avec et sans tamis moléculaires 4Å	90
6	Influence d'ester énol/solvant lors de la résolution du <i>dl</i> -menthol catalysée par la <i>CCL</i>	91
7	DC du <i>dl</i> -menthol catalysée par la lipase <i>CCL</i> : Influence d'additifs	94
8	CAL-B-catalyse la déacylation du trans-3a-6a	107
9	Acylation des (±)-trans-arylcyclohexanols- <b>3-6</b> catalysé par la CAL-B	109
10	Acylation/déacylation catalysé par la lipase <i>CAL-B</i> du mélange racémique (±)-( <i>cis/trans</i> )-2-phényl-1-cyclohexyl et son dérivé acétate	113
11	Hydrolyse avec la CAL-B de esters amines racémiques 9a-e	123
12	Hydrolyse enzymatique du O-protégé aryl-alkyl-ester aminé	126

Histogramme	Titre	Page
1	Effet du solvant lors du DC du <i>dl</i> -menthol avec la <i>CCL</i>	92
2	Étude de solvant du DCE des arylcyclohexanols en présence de AI et AV	111

Chromatogramme	Titre	Page
1	Multigramme du DCE du <i>dl</i> -menthol catalysé par la CCL	96
2	Déacylation enzymatique du (±)-5a dans le TBME	108
3	DCE par acylation du $(\pm)$ -6a dans le TBME	111
4	Chromatogramme du mélange racémique cis/trans-3a	115
5	DCE par hydrolyse alcaline du mélange racémique <i>cis/trans</i> - <b>3a</b>	115
6	DCE par déacylation du (±)-12e	126

Figure	Titre	Page
1	Schématisation de la "chiralité"	1
2	Exemple des énantiomères du propoxyphène avec un effet biologique différent	2
3	Énantiomères du Limonène	2
4	Taux de croissance des molécules chirales durant la période 2005-2020	10
5	Évolution en fonction du type de produit sur la période 2005-2020	11
6	Représentation de la distribution des médicaments en fonction de leurs propriétés chirales entre 1983-2006	11
7	Marché mondial en produits chimiques chiraux	12
8	Substrats du réservoir chiral	13
9	Diagramme énergétique d'une réaction catalytique	27
10	Mécanisme catalytique des enzymes	32
11	Modèle des interactions enzyme-substrat	32
12	Fréquence d'utilisation des enzymes en biotransformation industrielles	35
13	Avantages des réaction catalysées par des lipases dans des solvants organiques	36
14	Dépendance des excès énantiomériques ( $ee_p/ee_s$ ) à la conversion	45
15	Modèle de prédiction pour la bioréduction de cétone	45
16	Règle empirique de Kazlauskas pour le dédoublement des alcools secondaires	46
17	Modèle d'Orrénius pour l'énantiosélection de la <i>CAL-B</i> (A) énantiomère réagit rapidement. (B) énantiomère réagit lentement	46
18	Le monoterpène menthol	78
19	Choix des agents acylants lors de DE du <i>dl</i> -menthol	86
20	Additifs sélectionnés pour le DE du <i>dl</i> -menthol	93
21	Alcools et acétates modèles de l'étude	103
22	Esters d'énols	104

Schéma	Titre	Page
1	Synthèse stériosélective du Captopril à partir du réservoir chiral	13
2	Synthèse de dérivés de type méthoxyphényl-pipérazine à partir de la $(R)$ -Carvone	14
3	Synthèse du d'Ambrox®	15
4	Molécules prochirales	15
5	Synthèse asymetrique de L-dopa	16
6	Voie de synthèse de l'anti-hypertensif Candoxtril	16
7	Dédoublement par formation de diastérioisomères.	18
8	Synthèse des ortho-(aminométhyl) phénols (o-APs) par formation de diastéréomère	18
9	Dédoublement cinétique d'un mélange racémique	19
10	Dédoublement cinétique des 2-hydroxy-2-aryléthylphosphonates par un catalyseur ferrocénique dérivé de la DMAP à chiralité planaire	21
11	Dédoublement cinétique d'α-hydroxyacides aromatiques catalysé par la CAL-B	22
12	Hydrolyse enzymatique (±)-2-Acetoxypent-4-enyltosylate catalysée par la <i>PSL</i>	22
13	Procédure catalytique pour la production de l'Ibuprofène	26
14	Alcoolyse lipasique de l'ibuprofène	26
15	Comparaison entre chimio-catalyse et biocatalyse pour la synthèse de la Sitagliptin	28
16	Sélectivités des enzymes	30
17	Réaction enzymatique	32
18	Mécanisme d'action des lipases	38
19	Transestérification des alcools secondaires catalysés par la lipase Burkholderia cepacia	39

20	Synthèse industrielle biocatalysée de l'aspartame	40
21	Synthèse industrielle du Keppra®	41
22	Désacylation régiosélective enzymatique de deux arabinonucléosides	41
23	Réaction catalysée par des enzymes	47
24	Voies de transformation enzymatique complémentaire	47
25	Hydrolyse enzymatique	48
26	Hydrolyse enzymatique du $\beta$ -acétoxybutyronitrile dans un milieu aqueux	49
27	Hydrolyse énantiosélective de l'ester méthylique de Naproxène racémique utilisant la lipase <i>CRL</i> immobilisé dans un système biphasique	49
28	Hydrolyse enzymatique du (±)-éthyl-3-phénylbutanaoate en solution tampon	50
29	Hydrolyse enzymatique en présence du carbonate de sodium	50
30	Transestérification enzymatique	52
31	Transestérification enzymatique d'alcools secondaires par un thioester comme donneur d'acyle	52
32	Transestérification enzymatique d'alcools primaires par des donneurs d'acyle quasi-irréversibles	52
33	Dédoublement cinétique enzymatique avec les esters d'énols	53
34	Transestérification enzymatique avec l'anhydride succinique	54
35	Influence de la lipase sur la transestérification enzymatique de (E)-4-(2',5'-dimethylphenyl)-but-3-en-2-ol	55
36	Influence de la nature de lipase sur la résolution enzymatique d'un hydroxy cyclopenta[b]naphthalenylacetates	56
37	Acylation enzymatique des arylalkylcarbinols	56
38	Résolution cinétique catalysée par la lipase PS des 2-benzyloxy- et 2- silyloxy-1-propanols	57
39	Acylation énantiosélective du racémique 2,3,4,5-tetrahydro-1H- benzo[b]azepin-5-ol par <i>Novozyme 435</i>	58

## Liste des schémas

40	Novozym 435 catalyse le dédoublement des alcools secondaires allyliques	59
41	Transestérification énantiosélective du 2-phenylbut-3-yn-2-ol	59
42	Acylation enzymatique des alcools tertiaires allyliques	60
43	Acylation enzymatique du phényléthylamine sans solvant	61
44	Résolution cinétique enzymatique de cis-2-aminocycloheptane et 2- aminocyclooctane	63
45	Résolution cinétique enzymatique du <b>rac-a</b> par la réaction d'hydrolyse ( <b>Voie a</b> ) et du <b>rac-b</b> par la réaction d'acylation ( <b>Voie b</b> ).	63
46	Synthèse énantiosélective d'un dérivé de benzothiazoles	64
47	Acylation lipasique d'un alcool ferrocènyl primaire à chiralité planaire	64
48	Effet de l'addition des composés nitrés dans l'acétylation enzymatique de racémique 2-methoxy-2-phenylethanol	65
49	Influence de la température sur le DC du 1-phényléthanol par Amano <i>PS-C</i> <i>I</i>	66
50	Effet de la température dans l'acylation enzymatique de N-Boc- protected(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)methanol	66
51	Transestérification du vinyl-3-arylpropanoate	67
52	Transestérification du 1-(quinolin-3-yl)éthanol avec la CAL-B	68
53	Résolution cinétique avec le 2-cyanoacétates d'éthyle comme agent acylant	68
54	Principe d'une déracémisation	70
55	Principe de dédoublement cinétique dynamique	71
56	Résolution cinétique dynamique du monocarbamate	71
57	Dédoublement cinétique dynamique du 1-indanol	72
58	Déracémisation par stéréoinversion.	72
59	Déracémisation des alcools benzyliques par combinaison DCE/Mitsunobu	73
60	Synthèse du menthol à partir de l'hydrogénation de thymol	80

## Liste des schémas

61	Sydnthèse du (-)-menthol à partir du myrcène utilisée par Takasago	80
62	Résolution cinétique du <i>dl</i> -menthyl benzoate catalysé par la <i>CRL</i>	82
63	Résolution cinétique du menthol racémique en présence de la lipase <i>Candida rugora AYL</i>	82
64	Hydrolyse du <i>dl</i> -menthyl acétate par la lipase <i>BCL</i> (cellule entière)	83
65	Réaction d'acylation enzymatique du (dl)-menthol	84
66	Synthèse de l'acétate de menthyle racémique	85
67	Acylation catalysée par CCL du <i>dl</i> -menthol en présence de quinidine	95
68	Réactions d'Acylation/Déacylation	99
69	Acéylation enzymatique du racémique trans-2-(1-Naphthyl)cyclohexan-1-ol	100
70	Acylation du <i>trans</i> -2-phényl-1-cyclohexanol catalysé par la lipase PS30	100
71	Acylation du trans-2-phényl-1-cyclohexanol catalysé par CRL	101
72	Acylation des arylcyclohexanols catalysé par la lipase AK	101
73	Mode de synthèse des <i>trans</i> -arylcyclohexanols <b>4-6</b>	104
74	Synthèse du mélange des <i>cis/trans</i> -phénycyclohexanol <b>3</b>	105
75	Synthèse des acétates arylcyclohexyls-3a-6a	105
76	Étude des voies d'Acylation/Déacylation enzymatique	106
77	DCE des diastéréoisomères (±)- <i>cis/trans</i> -2-phényl-1-cyclohexanol et acétates	112
78	Équilibre conformationnel du <i>cis/trans</i> -1-phénylcyclohexanol <b>3</b>	114
79	Méthodologie de l'hydrolyse enzymatique des esters amines en milieu alcalin	118
80	Procédure de synthèse des 1-phényl-éthyl esters amines	119
81	Modes de synthèse du 1-phényléthyl diméthylglycinate <b>9e</b>	120
82	Synthèse des esters racémiques via Boc2O	121

83	Hydrolyse alcaline des esters aminé racémiques 9a-e	121
84	Réduction des cétones benzyliques en alcools correspondants	124
85	Substrats d'exemplification	125
86	Hydrolyse enzymatique des esters aminés	125
87	Traitement de la réaction d'hydrolyse des esters aminés	128

INTRODUCTION GENERALE			
Première partie			
Introduction Première partie	7		
Chapitre I : Généralités sur les modes d'accès aux molécules chirales			
I.1. INTRODUCTION	10		
I.2. Mode d'accès aux molécules chirales	12		
I.2.1 À partir de réservoir chiral (molécule d'origine naturelle)	13		
I.2.2. Synthèse asymétrique	15		
I.2.3. Dédoublement cinétique d'un mélange racémique	17		
<ul> <li>Dédoublement par cristallisation spontanée</li> </ul>	17		
Dédoublement par formation de diastéréoisomères	17		
<ul> <li>Dédoublement chromatographique</li> </ul>	19		
Dédoublement cinétique	19		
Ø Dédoublement cinétique non enzymatique	20		
Ø Dédoublement cinétique enzymatique	21		
I.3. CONCLUSION	23		
Chapitre II : Catalyse enzymatique et chimie verte			
II.1. Catalyse et chimie verte	24		
II.2. La catalyse enzymatique	27		
II.2.1. Définition et structure des enzymes	28		
II.2.2. Avantages et inconvénients des enzymes			
II.2.3. Fonctionnement des enzymes			
II.2.4. Cinétique enzymatique 32			

## XVII

II.2.4. Classification des enzymes	33
II.3. Les lipases	35
II.3.1. Définition des lipases	35
II.3.2. Mécanisme d'action des lipases	37
II.3.3. Les lipases immobilisées	38
II.4. Potentiel d'utilisation de la catalyse en chimie organique	39

## II.5. CONCLUSION

42

## Chapitre III : Dédoublement cinétique enzymatique

43

III.2. Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique			
III.3. Les règles empiriques de kazlauskas sur l'énantiopréférence enzymatique			
III.4. Les réactions catalysées par les lipases			
III.4.1. La réaction d'hydrolyse enzymatique	48		
Ons un milieu aqueux	48		
Oans un milieu biphasique	49		
② Dans une solution tampon	50		
Wydrolyse alcaline dans un solvant organique	50		
III.4.2. La réaction de transestérification enzymatique	51		
Les esters d'énols	53		
Les anhydrides d'acides	53		
III.5. Paramètres qui influent sur le DCE			
III.5.1. Influence de la nature et la quantité de lipase			
III.5.2. Influence de la structure du substrat	57		
Alcools primaires     Alcools     Alcools primaires     Alcools     Alcools primaires     Alcools prim	57		
Alcools secondaires     Alcools     Alcools secondaires     Alcools secondaires     Alcools secondaires     Alcools secondaires     Alcools     Alcools	58		
Alcools tertiaires     Alcools     Alcools	59		
O'autres substrats	60		
III.5.3. Influence de la nature de solvant et co-solvant			
III.5.4. Influence d'additifs			

III.5.5. Influence de la température		
III.5.6. Influence de l'agent acylant	67	
III.6. Dédoublement cinétique et déracémisation	69	
III.6.1. Principe de la déracémisation		
Oédoublment cinétique dynamique (DCD)	70	
Le processus de stéréo-invertion	72	
III.7. CONCLUSION	73	
Conclusion de la première partie	76	
Deuxième partie Introduction de la deuxième partie 77		

# Chapitre IV : Dédoublement cinétique enzymatique d'un monoterpène : le menthol

IV.1. INTRODUCTION		
IV.2. Importance du substrat	78	
IV.3. Mise au point bibliographique		
IV.4. Dédoublement cinétique par acylation enzymatique du Menthol	84	
IV.4.1. Résultats et discussion		
- Etude de la nature et de la quantité d'enzyme	87	
- Etude de la nature de l'agent acylant	89	
- Etude de solvant	90	
- Etude de l'ajout d'additifs	92	
- Réaction à grande d'échelle	95	
IV.5. CONCLUSION	96	

98

## Chapitre V : Acylation/déacylation enzymatique des arylcyclohexanols

#### V.1. INTRODUCTION

V.2. Objectifs du travail		
V.3. Mise au point bibliographique sur le sujet		
V.4. Résultats et discussion	102	
V.4.1. Préparation des arylcyclohexanols racémiques et leurs acétates	104	
• Préparation du mélange (±)- <i>cis/trans</i> -2-phény1-cyclohexanol-3	104	
• Préparation des acétates arylcyclohexyls racémique 3a-6a	105	
V.4.2. Dédoublement cinétique enzymatique des arylcyclohexanols		
V.4.2.1. Déacylation enzymatique des acétates trans-arylcyclohexyls 3a-6a	106	
V.4.2.2. Acylation enzymatique des trans-arylcyclohexanols 3-6		
V.4.2.3. Application des conditions sur le mélange cis/trans-phénylcyclohexanol 3	112	

### V.5. CONCLUSION

115

## Chapitre VI : Hydrolyse enzymatique de nouveaux esters amines en milieu organique alcalin

VI.1. INTRODUCTION	117
VI.2. Objectif de travail	117
VI.3. Mode de synthèse des esters aminés	119
- Synthèse des 1-phényl-éthyl esters aminés 9a-e	119
- Synthèse des esters aminés dérivé des aryl-alkyl-carbinols 10-15e	120
VI.4. Étude de l'hydrolyse alcaline avec la CAL-B des phényl esters aminés racémiques	121
VI.5. Application de l'hydrolyse alcaline avec la CAL-B : Exemplification	124
- Les modèles choisis	124
- Hydrolyse enzymatique des esters amines derivé des aryl-alkyl-carbinol	125

VI.6. CONCLUSION	128
CONCLUSION GÉNÉRALE	130
PARTIE EXPÉRIMENTALE	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Le phénomène de la chiralité joue un rôle clé non seulement dans le monde vivant mais aussi en pharmacie, en agriculture et d'autres industries chimiques. Toutes les protéines, enzymes, acides aminés, glucides, nucléosides et un grand nombre d'alcaloïdes et des hormones sont des composés chiraux. La chiralité est désormais un sujet de premier ordre pour la recherche fondamentale ainsi que pour le développement industriel et pharmaceutique.

Une molécule chirale est une molécule asymétrique qui existe sous deux formes non superposables l'un sur l'autre dans un miroir (*Figure 1*). Ces deux entités sont nommées des énantiomères



Figure 1 : Schématisation de la "chiralité".

Les industries de produits chimiques destinées aux domaines pharmaceutique et agroalimentaire sont plus que jamais confrontées au défi de la chiralité. La plupart des énantiomères des médicaments racémiques possèdent des différences importantes de leurs activités biologiques : pharmacologie, toxicologie, pharmacocinétique, métabolisme etc. Il est donc important de promouvoir la séparation et l'analyse chirale des médicaments racémiques dans l'industrie pharmaceutique afin d'éliminer l'isomère indésirable de la préparation et d'optimiser le traitement. La *Food and Drug Administration* (FDA) impose l'évaluation de l'activité de chaque énantiomère pour les médicaments racémiques et favorise le développement de nouveaux médicaments chiraux en tant qu'énantiomères uniques. De nombreux exemples sont présentés tels que les énantiomères du médicament Propoxyphène (*Figure 2*) qui ont des effets thérapeutiques différentes, <sup>1</sup> ou ceux du limonène qui présentent des odeurs différentes. <sup>2</sup> (*Figure 3*)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> B. Kasprzyk-Hordern, Chem. Soc. Rev., 2010, <u>39</u>, 4466–4503.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> J. Sun, Alternative Medicine Review., 2007, <u>12(3)</u>, 259.



*Figure 2* : Exemple des énantiomères du propoxyphène avec un effet biologique différent.



Figure 3 : Énantiomères du Limonène

Cette différence de l'activité biologique est généralement associée à un seul énantiomère. Donc, il est essentiel de contrôler la pureté optique des molécules pour toutes les substances qui interagissent avec le vivant. Un exemple tristement connu est celui de la thalidomide, <sup>3</sup> qui est utilisée comme sédatif chez les femmes enceintes, pour soulager les nausées matinales ; et qui a conduit à de nombreuses malformations congénitales chez les nouveau-nés attribuées à l'usage du mélange racémique. D'autres molécules moins médiatiques peut-être, présentent cette dichotomie, ou un énantiomère présente des propriétés thérapeutiques intéressantes, l'autre est toxique où possède des propriétés biologiques totalement différentes. C'est le cas de l'Ethambutol <sup>4</sup> qui, sous sa forme (*S*, *S*), est utilisé pour le traitement de la tuberculose alors que son énantiomère (*R*, *R*) entraîne de graves troubles oculaires ; la Kétamine peut également être citée : l'isomère (*S*) est utilisé comme anesthésiant alors que le produit de stéréochimie (*R*) présente un fort pouvoir hallucinogène.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> J. Seyden-Penne, "Synthèse et Catalyse Asymétriques", **1994**, Inter Edition / CNRS.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> R. Yendapally, R. E. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, <u>18(5)</u>, 1607-1611.

Composé	Effet biologique	Composé	Effet biologique
(S)-thalidomide	Tératogène	(R)-thalidomide	Sédatif
(R)-Kéatamine	Hallucinogène	(S)-Kéatamine	Anesthésiant
HOH <sub>2</sub> C $C_2H_5$ H R, R)-(-)-éthambutol	Toxique	$C_2H_5$ H H <sub>2</sub> H, $CH_2OH$ HOH <sub>2</sub> C C, N C C H <sub>2</sub> H, $CH_2OH$ (S, S)-(-)-éthambutol	Antituberceuleux

<u>**Tableau**</u> 1: Activité biologique de différents énantiomères en fonction de leur configuration absolue.

Face aux exigences commerciales et médicales, la demande en produits chiraux énantiopurs s'est fortement accrue ; ce qui a longuement contribué au développement, des voies de synthèses énantiosélectives. L'une de ces voies est basée sur le dédoublement d'un mélange racémique, stratégie majoritairement exploitée à l'échelle industrielle.

Ainsi, la synthèse et surtout la catalyse énantiosélective sont devenues un thème central de la chimie organique moderne. Le développement des méthodes alternatives aux réactions classiques est l'un des axes prioritaires pour une chimie plus respectueuse de l'environnement. La chimie du chiral est un ensemble de méthodes faisant intervenir des entités chirales (réactif ou catalyseurs) qui induisent un contrôle sur la sélectivité réactionnelle afin d'éviter la production d'énantiomères indésirables. Cette approche de chimie fine intègre parfaitement le concept de la chimie verte « Green Chemistry », élaboré en 1998 par les chimistes américains **Anastas** et **Warner**, <sup>5</sup> avec l'application de plusieurs principes parmi les douze principes fondateurs dont la catalyse est " Le pilier".

L'utilisation des enzymes en catalyse énantiosélective s'inscrit parfaitement dans le développement durable et a connu un essor considérable au cours de ces dernières années. La

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, **1998**, p.30.

recherche fondamentale s'est orientée progressivement vers les processus de bioconversion pour respecter les nouvelles exigences environnementales et économiques. <sup>6</sup> Les lipases sont les plus couramment utilisées dans la fabrication d'une large gamme de composés à haute valeur ajoutée, que ce soit pour la recherche académique ou pour le développement industriel. La recherche des applications sur les lipases en catalyse énantiosélective est croissante et les processus d'optimisation pour une mise en œuvre industrielle sont encouragés. Leurs propriétés de stabilité, sélectivité et spécificité de substrat constituent des avantages majeurs pour une exploitation industrielle.

Parmi les modes d'accès aux molécules chirales, le dédoublement cinétique enzymatique est le plus exploité à l'échelle industrielle (pharmaceutique, agro-chimique, alimentaire, arômes et parfumerie) et l'utilisation des lipases comme catalyseurs dans les réactions de dédoublement cinétique de racémiques est très employée dans la production industrielle d'énantiomères purs.<sup>7</sup> C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de recherche développés dans cette thèse et réalisés au sein du laboratoire de Catalyse Asymétrique Eco-Compatible (L.C.A.E), sous la direction du Professeur L. ARIBI-ZOUIOUECHE. Durant cette thèse, nous avons pu bénéficier d'un financement de 12 mois en alternance entre 2014 et 2016 dans le laboratoire de chimie organique et médicinale dirigé par le Professeur O. **RIANT** à l'Université catholique de Louvain pour réaliser une partie du travail. L'objectif de ces travaux est la mise au point de procédés propres pour accéder aux molécules bioactives énantiomériquement enrichies ou pures dans un cadre d'une approche éco-compatible par catalyse avec des lipases. La voie utilisée est le dédoublement cinétique des racémiques et l'étude est axée sur le mode d'action des lipases pour atteindre une sélectivité optimale. Nous avons étudié les différents éléments qui interférent sur la performance catalytique lipasique lors du DC avec divers substrats d'un grand intérêt tels que : un monoterpène "le menthol" et des auxiliaires chiraux de type "arylcyclohexanols". Nous avons également utilisé de nouveaux types "esters amines" qui ont été mis en œuvre, en particulier, dans la réaction d'hydrolyse alcaline en milieu organique.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> (a) F. Hasan, A. Ali Shah, A. Hameed, *Enzyme and Microbial Technology.*, 2006, <u>39</u>, 235-251 ; (b) C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Research & Development.*, 2000, <u>4</u>, 286-290 ; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied Biochemistry & Biotechnology.* 2004, <u>118</u>, 155-170.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> (a) K. E. Joeger, T. Eggert, *Cun. Opin. Biotechnol.*, **2002**, <u>13(4)</u>, 390-397 ; (b) A. Schmid, F. Hollman, J.B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, <u>13(4)</u>, 359-366.

Ce manuscrit de thèse est reparti en deux parties :

Une première partie de mise au point bibliographique est subdivisée en trois chapitres :

Le **premier** concerne des généralités sur les modes d'accès aux molécules chirales en détaillant le principe du dédoublement d'un mélange racémique.

Le **deuxième** chapitre intitulé « *Catalyse enzymatique et chimie verte* » présente la complémentarité entre la catalyse énantiosélective et la chimie verte ainsi que la structure des enzymes.

Le **troisième** chapitre intitulé « *Dédoublement cinétique enzymatique* » concerne le développement du dédoublement cinétique enzymatique ainsi les paramètres réactionnels influençant sur la réactivité et la sélectivité des enzymes dans la réaction.

Une conclusion finalise cette première partie.

La deuxième partie constituée de trois chapitres présente les résultats des travaux de recherche avec les études expérimentales et les résultats obtenus.

Le quatrième chapitre intitulé «*Dédoublement cinétique d'un monoterpène: le menthol* » étudie l'acylation du menthol racémique avec la lipase de *Candida Cylindracea* (*CCL*). Plusieurs paramètres ainsi que l'influence de divers additifs sont étudiés et une production à grande échelle est mise en œuvre.

Le cinquième chapitre intitulé «*Acylation et déacylation enzymatique des arylcyclohexanols* » concerne le DC des **arylcyclohexanols** catalysée par la lipase *candida antarctica B* (*CAL-B*). Deux approches sont étudiées et comparées sur les dérivés *trans-arylcyclohexanols* avec la *CAL-B* : l'hydrolyse alcaline avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et l'acylation avec des esters d'énols. Les meilleures conditions sont appliquées sur le mélange stéréorisomères *cis/trans-*2-phényl-1-cyclohexanol et son dérivés acétates correspondants.

Le sixième chapitre intitulé « Hydrolyse enzymatique de nouveaux esters aminés en milieu organique alcalin » aborde la synthèse de nouveaux esters aminés dérivés des alcools de type arylalkylcarbinols. Ces nouveaux substrats sont dédoublés par hydrolyse alcaline catalysée par la CAL B.

La présentation des travaux de thèse est finalisée par la **Conclusion générale**. La description des protocoles opératoires détaillés et l'indentification spectroscopique des différentes structures synthétisées sont réunies dans **la partie expérimentale**. Les travaux publiés sont joints en annexe.

PREMIÈRE PARTIE

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

#### Introduction de la première partie

Un grand nombre de médicaments et de produits candidats actuellement commercialisés sont chiraux, et les sociétés pharmaceutiques cherchent généralement à développer ces composés en tant qu'énantiomères uniques. Ainsi, la molécule énantiopure est une partie importante du marché pharmaceutique global suite aux directives imposées par les législations internationales que ce soit la FDA ou la commission européenne <sup>8</sup> pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire.

Dans ce cadre on constate de développement parallèle des « CHIROTECHNOLOGIES » ou les technologies du chiral qui représente la chimie et la technologie de production et de séparation des énantiomères. C'est un domaine qui a connu un développement croissant que ce soit pour accéder aux énantiomères uniques ou pour leur séparation et leur identification chirale.

La conception de ce type de molécules a contribué au développement soutenu des voies de synthèses énantiosélectives. Une des méthodes développées consiste en l'exploitation de la catalyse, pilier du concept moderne de la chimie verte. Selon le type de catalyseur utilisé ; il existe trois catégories de catalyse :

*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 catalyseurs, leur exploitation est restreinte en chimie fine à cause de leur faible sélectivité. Les développements enregistrés ces dernières années dans le domaine des catalyses biphasiques (aqueuse, fluorée, sels ioniques) et celui de l'hétérogénéisation contrôlée de catalyseurs « moléculaires » (organométalliques greffés, colloïdes) permettent de concilier les avantages intrinsèques de la catalyse homogène à la praticité des procédés hétérogènes.

La catalyse homogène : (organocatalyse, catalyse organométallique, ...) quand le catalyseur et les réactifs ne forment qu'une seule phase. Elle est encore peu utilisée dans l'industrie,

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> (a) H. Kagan, M. Tabart, L'Act. Chim., 2015, 393-394, 31-38; (b) A. M. Rouhi, Chem. Eng. News, 14June2004, 47-62; (c) K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 6th ed, 2011.

seulement 20% des réactions catalytiques utilisent ce type de catalyseur, pourtant ils présentent une grande sélectivité. C'est indéniablement dans le domaine de la chimie fine que le plus grand nombre d'applications industrielles de la catalyse homogène a vu le jour ces dix dernières années et l'isomérisation asymétrique des allylamines pour la synthèse du menthol (Takasago, 1985) est un exemple. Par ailleurs, l'explosion des secteurs des arômes, parfums, de la pharmacie et de l'agrochimie, avec la montée en puissance des principes actifs chiraux, ont largement contribué aux développements tant académiques qu'industriels de la catalyse homogène.

La catalyse enzymatique (Biocatalyse) : Depuis 1960, les enzymes entrent dans la composition des produits de lessive et il est possible d'obtenir des enzymes capables de répondre aux missions les plus diverses avec des applications intéressantes dans divers domaines. La croissance du marché des enzymes est accrue notamment grâce à leur forte utilisation en tant que catalyseurs actifs. Cette tendance est accentuée par les avancées scientifiques et une impulsion législative en faveur des processus verts. Plusieurs biotransformations industrielles, particulièrement pharmaceutiques et agroalimentaires, font appel aux enzymes pour la fabrication des produits chimiques, par le bien de leur grande efficacité et sélectivité.

Dans cette dernière catégorie de catalyse, une stratégie majoritairement exploitée à l'échelle industrielle, consiste en le dédoublement cinétique enzymatique (DCE) pour accéder aux molécules énantiopures.

Dans cette partie, une mise au point bibliographique sur le sujet est présentée, elle est subdivisée en trois chapitres :

Le premier chapitre consacré à une « Généralités sur les modes d'accès aux molécules chirales » permettra de détailler les différentes méthodes d'accès aux molécules chirales, et particulièrement la réaction de dédoublement d'un mélange racémique.

Le second chapitre intitulé « Catalyse enzymatique et la chimie verte » est une présentation de l'utilisation des lipases comme catalyseurs dans un cadre de chimie verte avec des nouveaux modes d'activations qui sont les nouveaux outils en catalyse enzymatique.

Le troisième chapitre intitulé « Le dédoublement cinétique enzymatique » développe deux approches réactionnelles de DCE : l'acylation et la déacylation) en montrant les différents paramètres influant sur l'activité et la sélectivité lipasique lors d'un DCE en faisant appel à quelques exemples de la littérature.

PREMIÈRE PARTIE

## PREMIER CHAPITRE

# GÉNÉRALITÉS SUR LES MODES D'ACCÈS AUX

# **MOLÉCULES CHIRALES**

#### I.1. INTRODUCTION

Depuis plusieurs dizaines d'années la recherche s'est orientée vers la découverte de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique permettant l'accès aux molécules chirales. <sup>9</sup> L'accès à un énantiomère unique est un facteur clé pour l'efficacité biologique des différentes molécules biologiquement actives et pour la sécurité de leur utilisation quelques soit leur domaine d'application. La chiralité fait partie du vivant, c'est un phénomène essentiel de la nature. En effet, les éléments du corps humain tels que les d'acide aminés, les sucres sont chiraux et énantiopurs et que toutes les interactions mise en jeu avec l'humain impliquent une reconnaissante chirale pour une action efficace.

La production des énantiomères connait un essor très important dans l'industrie, <sup>10</sup> entre 85-90% des procédés de synthèses industriels impliquent au moins une étape catalytique et ce catalyseur est souvent une enzyme. De ce fait, le marché mondial de catalyseurs a été estimé à plus de **23 milliards de dollars** en **2013** et on s'attend à franchir le seuil de **30 milliards de dollars** d'ici **2019**. <sup>11</sup> Le marché mondial des produits chimiques chiraux montre une évolution importante (*Figure 4*) avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 15% au cours de la période d'analyse 2010-2022. <sup>12</sup> Le rapport montre une évolution également très intéressante en fonction du type de produit : pharmaceutiques, agrochimiques, arômes / parfums et autres (*Figure 5*).



*<u>Figure 4</u>* : Taux de croissance des molécules chirales durant la période 2005-2020.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> C. Gros, G. Boni, Le monde de la chiralité, mars 1995.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> D. Enders, K-E. Jaeger, « Asymmetric Synthesis with Chemical and Biological Method », WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**, p415.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> (a) Global Markets for Catalysts: Focus on Catalyst Regeneration, Jun 2015 By BCC Research ; (b) Market ReportGlobalCatalystMarket. ThirdEdition. Updated: March 2015 Publisher : Acmite Market Intelligence.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> RITMIR009: Chiral Chemical - A Market Insight Report, July 2013.


*Figure 5* : Evolution en fonction du type de produit sur la période 2005-2020.

Depuis 1983, on constate une augmentation importante de la production des médicaments chiraux <sup>13</sup> (*Figure 6*) et en 2016, le marché mondial en produits chimiques chiraux montre que la demande en médicaments chiraux est la plus importante (*Figure 7*) <sup>14</sup> par rapport aux autres secteurs.



Figure 6 : Représentation de la distribution des médicaments chiraux entre 1983-2006.

 <sup>&</sup>lt;sup>13</sup> A. Berthod; « Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations : A General View, in Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications », (A. Berthod, ed), 2010, Springer, pp. 1-32.
 <sup>14</sup> Chiral Chemicals Market Research Report- Forecast to 2023. ID: MRFR/CnM/3509-CRR , March 2018.



Figure 7 : Marché mondial en produits chimiques chiraux

Par ailleurs, une nouvelle réglementation "**REACH**" (enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions des substances chimiques ; règlement n°1907/2006) entré en vigueur en 2007 permet de sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne. Cette loi impose de traiter les deux énantiomères d'une substance chirale comme deux molécules différentes du même racémique et l'excès énantiomèrique doit atteindre au moins de 98%ee pour les médicaments et de 80%ee pour les produits agroalimentaires. Ainsi, il est impératif d'obtenir chaque énantiomère d'une molécule chirale sous forme énantiomériquement pure. Les principales méthodes d'accès aux molécules chirales sont, la synthèse asymétrique à partir d'une molécule prochirale ou la séparation des énantiomères à partir d'un mélange racémique.

## I.2. Mode d'accès aux molécules chirales

Il est possible d'accéder aux molécules chirales par des réactions <sup>15</sup> qui mettent en œuvre des processus permettant la formation d'un énantiomère unique. Il existe trois voies pour accéder aux molécules énantiopures et permettre la séparation physique des énantiomères. <sup>16</sup>

- 1. À partir de réservoir chiral (molécule d'origine naturelle)
- 2. La synthèse asymétrique
- 3. Dédoublement d'un mélange racémique

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> B. M. Trost, Proceedings of the National Academy of Sciences., 2004, <u>101(15)</u>, 5348-5355.

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> (a) H.-U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Appl. Catal. A: General.*, **2001**, <u>221</u>, 119 ; (b) A. Hassner, "Advances In Asymmetric Synthesis", volume 1. JAI PRESS INC, **1995**, p214.

## I.2.1. À partir de réservoir chiral (molécule d'origine naturelle)

Cette première méthode consiste à utiliser comme matière première le réservoir chiral source inépuisable de produits de départ énantiopurs. Ces produits optiquement purs proviennent de la nature : tels que les acides aminés, les sucres, les carbohydrates, les terpènes, les alcaloïdes...etc. <sup>17</sup> (*Figure 8*)



Figure 8 : Substrats du réservoir chiral.

À titre d'exemple, l'agent antihypertenseur Captopril est obtenu stéréosélectivement à partir de l'approche de réservoir chiral alors que l'acide (*R*)- $\beta$ -hydroxybutyrique est employé comme substrat chiral de départ (*Schéma 1*). <sup>18</sup> Il faut noter également que cette synthèse prévoit également l'introduction d'un second centre chiral par l'introduction de l'acide aminé naturel *L*-proline.



<u>Schéma 1</u> : Synthèse stéréosélective du Captopril à partir du réservoir chiral.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> (a) Handbook of Chiral Chemicals, Ed 2 (David Ager) Taylor & Francis Group, New York **2006**; (b) S. Hanessian, J. Franco, B. Larouche, *Pure & App. Chem.*, **1990**, <u>62(10)</u>, 1887-1910; (c) A. M. P. Koskinen, «Asymmetric synthesis of naturel products». A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, **2012**, Second Edition, p51.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> M. Shimazaki, J. Hasegawa, K. Kan, K. Nomura, Y. Nose, H. Kondo, T. Ohashi, K. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, <u>30</u>, 3139-3146.

La carvone, par exemple, une molécule issue du réservoir chiral est très utilisée ; elle est employée dans l'industrie pharmaceutique mais aussi dans l'industrie de parfumerie. Des nouveaux dérivés de type méthoxyphényl-pipérazine, <sup>19</sup> ayant une activité biologique importante, sont synthétisés en utilisant de la (R)-carvone comme produit de départ (*Schéma* 2). Après une chloration, substitution nucléophile puis une réduction de la carvone. Les effets antiprolifératifs de ces composés ont été mesurés dans des cellules du cancer de la prostate humaine LNCaP. L'introduction du N-(4-méthoxyphényl)-pipérazine et du N-(2-méthoxyphényl) de la pipérazine augmente significativement l'effet antiprolifératif.



Schéma 2 : Synthèse de dérivés de type méthoxyphényl-pipérazine à partir de la (R)-Carvone.

La carvone est impliquée également pour la synthèse d'Ambrox® molécule qui a des propriétés organoleptiques. La *S*-(+)-carvone-1<sup>20</sup> est la molécule de départ (*Schéma 3*). L'addition conjuguée de cyanure et de nucléophiles alliés à la *S*-(+)-carvone suivie d'une annulation de robinson avec de la méthylvinylcétone a donné la décalone 2 et 3 stérosélectivement. Les deux décalones ont été transformées en (-)-Ambroxe 5 par modification de la chaîne latérale par méthylation.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> J. Chen, M. Lu, Y. Jing, J. Dong, *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, 2006, <u>14</u>, 6539–6547.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> A. A. Verstqen-Haaksma, H. J. Swarts, B. J. Jansen, A. de Groot, *Tetrahedron.*, **1994**, <u>50(33)</u>, 10095-10106.



Schéma 3 : Synthèse du d'Ambrox®.

## I.2.2. Synthèse asymétrique

Cette voie consiste à introduire un élément d'asymétrie au sein d'une espèce prochirale à l'aide d'un réactif ou d'un catalyseur chiral. C'est la fabrication d'une substance chirale en utilisant au départ une molécule achirale. La réaction peut être effectuée à partir d'instaurations [oléfine (**a**) ou carbonyle (**b**)] ou par sélection de faces énantiotopes ou de sites énantiotopes (**c**) (*Schéma 4*).



Schéma 4 : Molécules prochirales.

Cette méthode a été utilisée par le **Knowles** et **Sabacky** pour la synthèse de la **L-dopa** (*Schéma 5*) médicament pour soigner la maladie de Parkinson. La réaction est une hydrogénation asymétrique en présence d'un catalyseur chiral « Rh-dipamp » ; la Dopa obtenue avec 94% ee.<sup>21</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> W.S. Knowles, M.J. Sabacky, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1968, 1445-1446.



<u>Schéma 5</u> : Synthèse asymétrique de L-dopa.

Depuis, les catalyseurs organométalliques se sont largement développés et sont utilisés pour accéder à des molécules chirales intéressantes. M. Bulliard <sup>22</sup> et son équipe ont synthétisé un intermédiaire chiral clé pour la préparation du Candoxatril (médicament anti-hypertensif) par hydrogénation asymétrique (*Schéma 6*). La réaction est effectuée à grande échelle en utilisant un catalyseur de ruthénium par un processus rentable.



<u>Schéma 6</u>: Voie de synthèse de l'anti-hypertensif Candoxtril.

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> M. Bulliard, B. Laboue, J. Lastennet, S. Roussiasse, Organic Process Research & Development., 2001, <u>5</u>, 438-441.

#### I.2.3. Dédoublement cinétique d'un mélange racémique

Le dédoublement d'un mélange racémique est un mode d'accès basée sur la différence de vitesse de réaction des énantiomères à partir des racémiques de départ. Il existe différents modes de dédoublement des énantiomères et/ou des diastérioisomères.

- Dédoublement par cristallisation spontanée
- Dédoublement par formation de diastéréoisomères
- Dédoublement chromatographique
- Dédoublement cinétique

#### > <u>Dédoublement par cristallisation spontanée</u>

Le dédoublement par cristallisation directe (dédoublement par entrainement) du racémique peut s'effectuer dans les cas où celui-ci est formé de cristaux dont les énantiomères se sont séparés spontanément. Ce type de racémique, appelé conglomérat, est relativement peu fréquent (seulement 10% des composés organiques chiraux). Le premier exemple est rencontré par Louis Pasteur qui a pu dédoubler le tartrate d'ammonium et de sodium par une séparation mécanique appelée encore « tri », à l'aide d'un microscope. Il a pu mettre en évidence pour la première fois le lien entre le pouvoir rotatoire et la forme énantiopure d'une molécule. C'était la première apparition de la notion de chiralité des molécules. Il existe cependant plusieurs applications industrielles pour la séparation des énantiomères.<sup>23</sup>

#### > <u>Dédoublement par formation de diastéréoisomères</u>

Cette méthode de dédoublement d'un mélange racémique qui consiste à utiliser un auxiliaire chiral optiquement pur (**D**) et le faire réagir sur les deux énantiomères du mélange racémique (**dl**). On obtient ainsi deux composés diastéréoisomères (**dD** et **ID**) dont les propriétés physico-chimiques sont différentes et ce qui facilite leur séparation ultérieure. Les diastéréoisomères sont soumis à une réaction de clivage qui permet de récupérer les deux énantiomères d et l comme le schéma ci-dessous (*Schéma* 7).

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> (a) J. Jacques, M. Leclercq, M-J. Brienne, *Tetrahedron.*, **1981**, <u>17</u>, 3727-1733 ; (b) L. Pasteur, *Ann, Chim et Phys.*, **1848**, <u>24</u>, 442.



<u>Schéma 7</u> : Dédoublement par formation de diastérioisomères.

La synthèse de deux diarylméthylamines chirales (*R*) et (*S*) avec un groupe hydroxy phénolique en position ortho a été réalisée par Kodama <sup>24</sup> (*Schéma 8*) par formation de sels diastéréomères en utilisant deux agents de résolution l'acide dibenzoyl-L-tartarique **3** et le (*S*)-naproxène.



Schéma 8 : Synthèse des ortho-(aminométhyl) phénols par formation de diastéréomère.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> K. Kodama, N. Hayashi, Y. Yoshida, T. Hirose, *Tetrahedron.*, **2016**, <u>72</u>, 1387-1394.

L'énantioséparation du *rac*-1 a été réussie avec les agents de résolution l'acide 3 ou 4 par recristallisation dans de l'EtOH à 50%, ce qui a préférentiellement donné les énantiomères (R) ou (S) respectivement. L'obtention du dérivé (R)-disubstitué par un -tert-Butyl à partir du *rac*-2 a été effectuée en présence de l'acide (2S, 3S)-dibenzoyl-tartrique 3. Dans les deux cas, les énantiomères sont obtenus avec de bon excès énantiomérique 99% et des bons rendements 30-42%.

#### > <u>Dédoublement chromatographique</u>

La chromatographie est une méthode analytique efficace pour la séparation des énantiomères, la mesure de l'excès énantiomérique et l'évaluation de la sélectivité. La stratégie consiste à utiliser une entité chirale comme agent de résolution : soit dans la phase mobile, soit dans la phase stationnaire. Les différences de polarité et de solubilité des énantiomères en interaction avec un groupe chiral vont permettre leur séparation. Le principe étant la mise en œuvre des interactions de type diastérioisomérique avec les substrats. Les applications se sont développées pour les phases stationnaire chirales essentiellement, elles sont beaucoup plus limitées pour les phases mobiles chirales.<sup>25</sup>

#### > <u>Dédoublement cinétique</u>

Ce processus, appelé aussi résolution cinétique, correspond à la transformation incomplète d'un substrat racémique **A** par une entité chirale (réactif ou bien catalyseur). Le principe étant la différence de la vitesse de réaction des deux énantiomères (R, S) du substrat **A** ( $k_R \neq k_S$ ) vis à vis d'une entité chirale **E**\*, l'un se transforme en produit **B** et l'autre reste inchangé (*Schéma 9*). Cette transformation permet la séparation des deux énantiomères.



Schéma 9 : Dédoublement cinétique d'un mélange racémique.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> G-Q. Lin, Y-M. Li, A-S.C. Chan, «Principles and Applications of Asymmetric Synthesis», John Wiley & Sons, In, **2001**, p25.

La réaction est basée sur la différence de vitesse des deux énantiomères et provient du fait que les états de transition formés entre le substrat et de l'entité chirale **E**\* sont diastéréoisomères. Le rendement maximum de cette réaction est de 50% dans le cas idéal d'un DC. <sup>26</sup> L'entité chirale E\* peut etre un réactif ou un catalyseur, l'évaluation de cette réaction est effectuée par des paramètres mathématiques qui seront detaillés dans le chapitre deux. L'inconvénient de cette voie est l'obtention d'un maximum de 50% de rendement de la réaction en énantiomère utile, l'autre moitié est un énantiomère inutile, ce qui constitue une perte pondérale et il est important de le valoriser. <sup>27</sup> Par ailleurs, l'accès aux deux énantiomères peut être un avantage afin de pouvoir disposer des deux formes d'énantiomères. Ces dernières années de nombreuses méthodes de déracémisation se sont développées qui permettent la transformation de l'énantiomère inutile en énantiomère utile, nous les développerons dans le chapitre 2.

Le dédoublement cinétique est largement utilisé à l'échelle industrielle pour la production de composés énantiomériquement purs. <sup>28</sup> Le DC peut être catalytique ou non catalytique. En cas de la catalyse, le catalyseur peut être enzymatique ou non enzymatique. Nous présentons succinctement un exemple de DC non enzymatique mais nous axerons l'essentiel de notre propos sur les catalyseurs enzymatiques.

## Of the second second state with the second secon

Dans ce cas, l'entité chirale peut être un réactif énantiopur ou un catalyseur. Les hydroxyphosphonates optiquement purs sont largement utilisés dans une variété de stratégies synthétiques pour la préparation d'autres produits organiques de grande valeur. Une procédure de résolution cinétique non enzymatique pour obtenir des 2-hydroxy-2-aryléthylphosphonates chiraux à partir des homologues-racémiques facilement disponibles est décrite.<sup>29</sup> (*Schéma 10*)

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> A. Collet, J. Crassous, J-P. Dutasta, L. Guy, « Molécules chirales Stéréochimie et propriétés ». CNRS ÉDITIONS, 2006, p144.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> B.M. Trost, Angew. Chem. Int. Ed., **1995**, <u>34</u>, 259-281.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> (a) R. Siedlecka, *Tetrahedron.*, **2013**, <u>69</u>, 6331-6363 ; (b) A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby Eds. *Chirality in Industry II*, Wiley, Chichester, **1997** ; (c) C. M. Monteiro, C. A. M. Afonso, *Journal of Chemical Education.*, **2010**, <u>87(4)</u>, 423-425.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> L. Mesas-Shánchez, A. E. Díaz-Álvarez, P. Koukal, P. Dinér, *Tetrahedron.*, **2014**, <u>70</u>, 3807-3811.



<u>Schéma 10</u> : Dédoublement cinétique des 2-hydroxy-2-aryléthylphosphonates par un catalyseur ferrocénique dérivé de la DMAP à chiralité planaire

Une gamme de 2-hydroxy-2-aryléthylphosphonates était résolue efficacement en utilisant un catalyseur de type ferrocénique dérivé de la DMAP à chiralité planaire (-)-1. La réaction a lieu à  $0^{\circ}$ C en présence d'anhydride acétique comme donneur d'acyle. Les hydroxyphosphonates chiraux ont été isolés avec de bons rendements et un excès énantiomérique élevé (> 95% ee).

## <u>Dédoublement cinétique enzymatique</u>

Dans le cas où l'entité chirale est un enzyme, le DCE peut être réalisé par différentes voies réactionnelles efficaces qui permettent de dédoubler les racémiques telles que : la transestérification, l'hydrolyse, l'estérification, l'aminolyse...etc.

Une approche d'aminolyse enzymatique hautement efficace a été développée récemment par une résolution cinétique d'un  $\alpha$ -hydroxyacide aromatique en milieux non aqueux. L'ester d'acide  $\alpha$ -hydroxyle a été dédoublé en présence de la lipase *Candida antarctique B* comme biocatalyseur et de l'ammoniaque anhydre (*Schéma 11*).



<u>Schéma 11</u> : Dédoublement cinétique d'α-hydroxyacides aromatiques catalysé par la CAL-B.

Les meilleurs résultats sont obtenus dans l'isopropyléther et l'isooctane comme solvant à température ambiante. Les produits sont obtenus avec une conversion optimale C = 49% avec un excès énantiomérique du produit de 99% et une sélectivité E > 200. <sup>30</sup>

Récemment, le groupe de **K. Matsumoto** a décrit une méthode d'hydrolyse enzymatique catalysée par la lipase *PS* des dérivés monotosylates optiquement actifs de type 1,2-diol. <sup>31</sup> L'utilité de cette procédure a été démontrée par une synthèse multi étapes de (*R*)-massoia lactone (un arôme naturel de noix de coco) à partir du racémique ( $\pm$ )-2-Acetoxypent-4-enyltosylate dont le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique a été la première étape de cette synthèse (*Schéma 12*).



Schéma 12 : Hydrolyse enzymatique (±)-2-Acetoxypent-4-enyltosylate catalysée par la PSL.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> S. Chen, F. Liu, K. Zhang, H. Huang, H. Wanga, J. Zhou, J. Zhang, Y. Gong, D, Zhang, Y. Chen, C. Lin, B. Wang, *Tetrahedron Letters.*, **2016**, <u>57</u>, 5312–5314.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> K. Matsumoto, K. Oohana, M. Hashimoto, K. Usuda, T. Shimoda, H. Ohshima, Y. Suzuki, T. Togawa, *Tetrahedron.*, **2018**, <u>74(29)</u>, 3981-3988.

Le  $(\pm)$ -2-acetoxypent-4-enyltosylate est dédoublé efficacement et donné le (R)-2hydroxypent-4-enyl tosylate énantiomériquement enrichi après 24h avec une conversion optimale de 50% et une sélectivité E>200.

## I.3. CONCLUSION

Dans ce premier chapitre nous avons montré l'importance de la génération des substances énantiopures qui présentent un intérêt majeur pour la recherche académique et dans le domaine industriel lié à l'activité biologique spécifique de la forme unique des molécules chirales. Ensuite, une mise au point bibliographique présente les principes des différents modes d'accès aux molécules chirales, plus précisément le dédoublement des mélanges racémiques. Cette voie d'accès aux molécule chirales étant privilégiée dans ce travail, nous avons consacré plusieurs exemples de la littérature a cette réaction.

Ces dernières années, l'utilisation d'enzymes comme catalyseurs lors du dédoublement cinétique est apparue comme une voie efficace intéressante vu son efficacité sur une large gamme de substrats et dans différents milieux réactionnels.

L'utilisation des lipases comme biocatalyseurs dans la réaction de dédoublement cinétique enzymatique est une méthode efficace pour obtenir des substrats énantiomériquement enrichis à partir de racémiques et nous nous sommes intéressés au développement de cette voie pour accéder à de nouvelles molécules énantiopures.

PREMIÈRE PARTIE

## **DEUXIÈME CHAPITRE**

CATALYSE ENZYMATIQUE ET CHIMIE VERTE

#### II.1. Catalyse enzymatique et chimie verte

La chimie fait aujourd'hui partie de notre quotidien : c'est une industrie polluante à cause des déchets qu'elle fournit lors de fabrications des produits ou bien les réactifs toxiques utilisés dans les synthèses. Le concept de **la chimie verte ou « Green Chemistry »** <sup>32</sup> a été lancé aux États-Unis au début des années 1990 dans le but de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses. Le concept est introduit par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner en 1998 avec la mise en place de nouvelles pratiques pour la conception de produits et de processus chimiques basés le respect des *12 principes de la* chimie verte conçus sur la durabilité et basés sur des ressources renouvelables et qui incluent les enzymes comme outils catalytiques.

#### Les 12 principes de chimie verte : <sup>33</sup>

*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.

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 le non nécessite du chauffage. Également, quelques biocatalyseurs sont

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Réf 5: P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, 1988, p. 30.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> J. Whittal, P. W. Sutton, «Practical methods for biocatalysis and biotransformations 2». 1ère édition, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.

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 :* pilier de la chimie verte 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.

On constate que les processus biocatalytiques sont fortement alignés avec ces 12 principes et cela a contribué au développement de la catalyse enzymatique. L'emploi de biocatalyseurs permet de répondre beaucoup plus adéquatement aux principes de chimie verte, c'est une alternative viable à la chimie classique qui emploi des complexes organiques, métalliques dans les protocoles de synthèse industrielle.

De nombreux procédés ont été modifiés et adaptés afin de respecter ces principes de chimie verte et l'exemple de la synthèse de **l'ibuprofène** est particulièrement représentatif. L'ancien procédé de synthèse de cet anti-inflammatoire non stéroïdien connu depuis les années 1960 est le procédé de Boots. <sup>34</sup> Cette synthèse se déroule **en six étapes** et génère des quantités très importantes de déchets qu'il faut séparer et éliminer, la production annuelle de

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> H. U. Blaser, *Catalysis Today.*, **2000**, <u>60</u>, 161-165.

13000 tonnes d'ibuprofène génère plus de 20000 tonnes de déchets. Au début des années 1990, la société BHC a développé et a mis en exploitation industrielle un procédé catalytique **en trois étapes** (*Schéma 13*) qui génère une quantité beaucoup plus faible de produits secondaires. Ces sous-produits sont par ailleurs récupérés et valorisés, ce processus ne génère finalement pas de déchets.



Schéma 13 : Procédure catalytique pour la production de l'Ibuprofène.

Par ailleurs, c'est l'activité biologique de l'énantiomère (*S*)-ibuprofène qui est la plus importante et depuis plusieurs années les travaux de recherche sont axés sur l'obtention de l'énantiomère (*S*) : soit par hydrolyse des esters correspondants ou par alcoolyse de l'acide racémique. C'est la voie biocatalytique qui est privilégiée avec l'utilisation de la forme immobilisée de la lipase de *Candida rugosa* (*CRL*), lors de l'alcoolyse de l'acide par le 1-butanol, le (*S*)-ester est obtenu avec un ee = 83%. <sup>35</sup> (*Schéma 14*)



Schéma 14 : Alcoolyse lipasique de l'ibuprofène.

La catalyse, pilier fondamental de la chimie verte est un axe majeur de recherche et de développement industriel. C'est une approche clé pour fournir des solutions réalistes à de nombreux problèmes environnementaux. <sup>36</sup> Un catalyseur est une substance minérale ou organique qui participe à une réaction en favorisant chimiquement la formation

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> M. P. Marszałł, T. Siódmiak, Catalysis Communications., 2012, 24, 80-84.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> (a) G. Centi, P. Ciambelli, S. Perathoner, P. Russo, *Cat. Today.*, **2002**, <u>75</u>, 3-15 ; (b) J. C. Warner, A. S. Cannon K. M. Dye, *Env. Imp. Asses. Rev.*, **2004**, <u>24</u>, 775.

d'intermédiaires réactionnels, ou physiquement en permettant de meilleurs contacts entre les réactants, ce qui fait que sa présence diminue l'énergie d'activation nécessaire pour effectuer une réaction en son absence, augmentant ainsi la vitesse de cette dernière. <sup>37</sup> (*Figure 9*)



Figure 9 : Diagramme énergétique d'une réaction catalytique.

Un catalyseur a la propriété d'être sélectif et favorise la formation du produit recherché, dans certains cas il peut être récupérable et réutilisable. Il tâche d'optimiser d'autres facteurs tels que le rendement réactionnel, la stabilité, la solubilité, et la facilité de la séparation du produit synthétisé.

#### II.2. La catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique ou *"Biocatalyse"*, consiste en l'utilisation de catalyseurs naturels que sont les enzymes afin de réaliser des transformations chimiques sur des composés organiques. Cette technologie est reconnue en **1833** par la découverte de l'*a-amylase* ou *« la diastase »*, qui était capable d'hydrolyser l'amidon et d'en séparer le sucre soluble. <sup>38</sup> Les biotechnologies connaissent une grande importance dans le domaine de la fabrication des produits pharmaceutiques et/ou des produits chimiques (parfums, produits alimentaires) et des polymères. <sup>39</sup> Une alternative avantageuse est utilisation des biocatalyseurs pour la synthèse des molécules chirales en raison de la régio- et la stéréo-sélectivité que ce soit dans les solvants organiques ou dans les milieux aqueux.

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> P. A. Anastas, M. M. Kirchhoff, T. C. Williamson, App. Cat A: General., 2001, 221, 3-13.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> A. Payen, J. F. Persoz, Ann, Chim, Phys., 1833, <u>53</u>, 73–92.

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> A. Wells, H-P. Meyer, *ChemCatChem.*, **2014**, <u>6</u>, 918–920.

Un exemple intéressant est la synthèse chimique conventionnelle de la *Sitaglipitin* (le composé actif du médicament antidiabétique Januvia<sup>TM</sup>), implique l'hydrogénation asymétrique de la *Prositagliptin* à haute pression avec un catalyseur à base de rhodium, suivie d'un traitement spécial pour éliminer le rhodium et une étape de cristallisation pour isoler le produit souhaité (*Schéma 15*). Bien qu'elle soit énantiosélective, cette voie chimiocatalytique est coûteuse en raison de la nécessité de récipients à haute pression spécialisés, ainsi les étapes difficiles de traitement. Ces limites sont contournées par le développement d'une voie biocatalytique en employant un biocatalyseur *transaminase*, ce qui permet une efficacité de synthèse de la *Sitaglipitin* avec une amélioration du rendement en une seule étape. <sup>40</sup>



<u>Schéma 15</u> : Comparaison entre chimio-catalyse et biocatalyse pour la synthèse de la Sitagliptin.

## II.2.1. Définition et structure des enzymes

Les enzymes sont des enchaînements d'acides  $\alpha$ -aminés de nature protéique ayant une propriété catalytique ; ses protéines ont une masse molaire élevée, supérieure à 10 000

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science.*, **2010**, <u>329</u>, 305–309.

daltons. <sup>41</sup> Cette nature protéinique présente un maximum de quatre niveaux d'organisation structurale. <sup>42</sup> (*Tableau 2*)

Structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme	Remarques
	<i>La structure primaire</i> présente la première séquence des aminoacides sous sa forme linaire ;
	Le premier repliement par des liaisons d'hydrogène à intervalle régulier en hélice $\alpha$ et en feuillet $\beta$ amène à <i>la structure</i> <i>secondaire</i> des enzymes ;
	Après un deuxième repliement par des liaisons diverses à intervalle irrégulier la formation d'une chaine polypeptidique donne naissance à <i>la structure tertiaire ;</i>
	Une dernière forme plus volumineuse est <i>la</i> <i>structure quaternaire</i> qui se forme après la combinaison de plusieurs chaînes polypeptidiques.

Tableau 2 : Structures des enzymes.

## II.2.2. Avantages et inconvénients des enzymes

La résolution enzymatique est une technique simple, verte, hautement sélective qui permet d'aboutir aux deux énantiomères parfaitement séparés. <sup>43</sup> L'utilisation d'enzymes en synthèse comporte plusieurs avantages intéressants par rapport aux réactifs chimiques usuels. Les enzymes sont des catalyseurs qui peuvent être utilisés pour la majorité des réactions connues en chimie organique, ils ont une **très haute sélectivité : chimio-, régio-, diastéréo- et** 

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> (a) A. G. Marangoni, «ENZYME KINETICS: A Modern Approach», A JOHN WILEY & SONS, INC, 2003;
(b) V. Padma, P. V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry.*, 2008, <u>43</u>, 1019–1032.

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> C. Vollhardt, « Traité de Chimie organique », DeBoeck université, Traduit par P. Depovere, 2ème édition, Bruxelles, **1994**.

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> D. Zhu, C. Mukherjee, L. Hua, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2005**, <u>16</u>, 3275-3278.

énantiosélectivité <sup>44</sup> (*Schéma 16*), ces sélectivités peuvent varier d'un substrat à l'autre mais restent souvent très élevées et cet avantage explique leur grande utilisation en synthèse.



Schéma 16 : Sélectivités des enzymes.

Les enzymes catalysent des réactions dans **différents milieux** : en synthèse, il est évidemment possible de les employer en **milieu aqueux** qui est le milieu naturel des enzymes, la combinaison de transformations biocatalytiques et chimio-catalytiques vers des processus one-pot en milieu aqueux présente un domaine de recherche attractif d'un point de vue académique ou industriel. <sup>45</sup> D'autre part, les enzymes sont couramment utilisées dans **les solvants organiques**, ce qui augmente la solubilité des composés organiques et qui a permis le développement de la catalyse enzymatique en chimie organique <sup>46</sup> et cela présente de nombreux avantages :

- Stabilité essentiellement dans les solvants organiques peu polaires tels les solvants aromatiques, les solvants chlorés, les alcanes et les éthers.
- > L'enzyme est facilement éliminée et récupérer par une simple filtration.
- > Augmentation de la sélectivité.

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> R. Azerad, « Biotransformation of natural or synthetic compounds for the generation of molecular diversity. In Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industries», Patel R. ed. Boca Raton, CRC Press : **2006**, pp. 273-297.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> H. Gröger, W. Hummel, Curr. Opin. Chem. Biol., **2014**, <u>19</u>, 171–179.

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> (a) A. M. Klibanov, *Chemtech.*, **1986**, <u>16</u>, 354-359 ; (b) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, <u>108</u>, 2767-2768.

La majorité des procédés synthétiques nécessitent de hautes pressions, des températures élevées et des solvants organiques, les enzymes, elles, se démarquent par les excellentes sélectivités et les hautes efficacités, elles permettent de **réagir dans des conditions douces.** Elles sont habituellement utilisées à température ambiante pour éviter la dénaturation de l'enzyme, à pression atmosphérique, et dans des solutions aqueuses proches des pH neutres. Les enzymes sont généralement **peu toxiques et biodégradables**, elles peuvent être **réutilisables** et n'apportent aucun risque à l'environnement.

Ces biocatalyseurs possèdent toutefois quelques inconvénients, ils sont parfois difficiles à se procurer commercialement, leur coût est élevé et ils n'existent que sous une forme chiral unique. Par ailleurs, leur mode d'isolement et leur pureté font généralement varier leur activité. Leur utilisation reste limitée à cause de leur fragilité et leur sensibilité, ils peuvent se dénature dans certaines conditions opératoires (température, pH) et l'utilisation de solvants polaires peuvent limiter la possibilité d'employer une enzyme donnée. Les hydrolases sont les enzymes les plus faciles à utiliser car elles ne nécessitent pas de coenzyme pour leur utilisation contrairement aux autres enzymes qui sont inactives sans coenzymes. Par ailleurs, ces cofacteurs sont onéreux et leur solubilité est limitée dans les solvants organiques.

## II.2.3. Fonctionnement des enzymes

Les enzymes comportent « un site actif » ; il s'agit généralement d'une petite zone de l'enzyme qui prend en charge le substrat (*Figure 10*). Ce site a deux sous-parties :

- Site de fixation : il permet la stabilité du substrat dans le site actif en mettant face à face la partie de la molécule de substrat qui devra est transformée, avec les acides aminés. Lorsque le substrat est fixé au sein du site de fixation, un complexe enzyme-substrat (ES) se forme grâce à des liaisons faibles.
- Site catalytique : un ensemble d'acides aminés interagirent directement avec le substrat qui pourra ensuite facilement évoluer vers la formation de produit.



Figure 10 : Mécanisme catalytique des enzymes.

L'interaction entre le substrat et l'enzyme s'explique par deux modèles <sup>47</sup> (*Figure 11*) :

Modèle clé-serrure (Fisher 1890) : le substrat se fixe directement dans le site actif de l'enzyme comme une clé s'adapte à une serrure.

Modèle de l'ajustement induit (Koshland 1958) : comme l'enzyme à une structure flexible ; le substrat se fixe après un changement conformationnel du site actif de l'enzyme.



*Figure 11* : Modèle des interactions enzyme-substrat.

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

## II.2.4. Cinétique enzymatique

En catalyse enzymatique, la vitesse initiale  $(v_0)$  croît avec la concentration initiale en substrat  $[S]_0$  jusqu'à un maximum  $(v_{max})$ . Le mécanisme réactionnel de type "Michaelis-Menten" suppose que dans la majorité des réactions enzymatiques, les réactifs constituant un substrat noté (S) d'une réaction biologique catalysée par une enzyme notée (E) donnent des produits (P) en passant par la formation d'un intermédiaire [enzyme-substrat] [ES]. Ce complexe peut

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> R. J. Whitehurst, M. van Oort, «Enzymes in Food Technology», John Wiley & Sons, Ltd, 2nd ed, 2010.

tout aussi bien redonner le substrat et l'enzyme, que produire l'enzyme et les produits comme il est montré dans l'équation ci-dessous :

$$E + S \xrightarrow{k_{+1}} \left[ E.S \right] \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Schéma 17: Réaction enzymatique.

 $\mathbf{k}_{+1}$  et  $\mathbf{k}_{-1}$ : Constantes de vitesses de la réaction de formation du complexe enzyme-substrat qui est un équilibre rapide.

k<sub>cat</sub>: Constante de vitesse de l'étape limitant ; c'est la constante de vitesse de l'enzyme.

La vitesse de la réaction est déterminée en fonction de vitesses de formation des deux énantiomères ( $\mathbf{R}$  et S) du substrat.

$$v = k_{cat} [E.S] = \frac{k_{cat} [E][S]}{k_m}$$

#### **Equation.1.**

 $\mathbf{k}_{m}$  est la constante de *Michaelis* qui détermine l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Le rapport ( $\mathbf{k}_{cat}/\mathbf{k}_{m}$ ) caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour son substrat.

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

#### **Equation.2**.

#### II.2.4. Classification des enzymes

Les enzymes sont classées selon le type de réaction à catalyser ; ce classement était effectué par L'union internationale de biochimie et la biologie moléculaire (**UIBMB**) en collaboration avec l'**IUPAC.** <sup>48</sup> La nomenclature des enzymes est sous la forme : E.C.X.X.X.X (E.C. : *"Enzyme Commission"*). Le premier ''X'' correspond aux 6 types de réactions catalysées par

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> (a) W. V. Dashek, G. S. Miglani, «Plant Cells and their Organelles», John Wiley & Sons, Ltd 2017. 1er édition ; (b) G. P. Moss, *«Enzyme Nomenclature»* (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), 2009.

les enzymes. Le 2ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe du donneur d'électrons sur lequel l'enzyme agit. Le 3ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe accepteur d'électrons sur lequel l'enzyme agit. Le 4ème "X" permet un classement supplémentaire en fonction du substrat sur lequel l'enzyme agit. Cofficiellement, six groupes d'enzymes ont été classifiés :

- Les Oxydoréductases (E.C.1) : catalysent les réactions d'oxydoréduction (transfert d'électrons). Ex : Déshydrogénases, Oxydases.
- Les Transférases (E.C.2) : transfèrent des groupes fonctionnels (acyl-, phosphate-, ...). Ex : *Hexokinases*.
- Les Hydrolases (E.C.3) : catalysent l'hydrolyse de liaisons précises. Ex : Estérases, Protéases, Lipases.
- Les Lyases (E.C.4) : interviennent dans les réactions d'élimination de groupes fonctionnels et le clivage de liaisons C-C, C-N, C-O. afin de former des liaisons doubles C=C, C=N, C=O. Ex : Hydratases, Décarboxylases.
- Les Isomérases (E.C.5) : catalysent des réactions intra-moléculaires d'isomérisation en réarrangeant des groupes fonctionnels. Ex : *Alanine racémase*.
- Les Ligases (E.C.6) : appelées aussi *Synthétases*, ces enzymes permettent de former plusieurs types de liaisons : C-O, C-S, C-N et C-C. Ex : *Glutamine Synthétase*.

Environ 60% de ces enzymes sont des hydrolases (lipases, estérases, protéases) (*Figure 12*) et représentent un des outils catalytiques des plus utiles, soit dans les laboratoires de recherche ou dans l'industrie pour leur facilité de mettre en œuvre et leur disponibilité commerciale. <sup>49</sup> Leur utilisation contribue au développement des principes de base de la chimie verte.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> (a) S. Piccicuto, C. Blecker, J. C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Agron. Soc. Environ.*, 2001, <u>5(4)</u>, 209–219 ; (b) A. J. J. Straathof., S. Panke., A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology.*, 2002, <u>13(6)</u>, 548-556.



*Figure 12* : Fréquence d'utilisation des enzymes en biotransformation industrielles.

## II.3. Les lipases

## II.3.1. Définition des lipases

Les lipases appartiennent à la famille des hydrolases, nommés aussi *triacylglycérol acylhydrolases* (EC.3.1.1.3). Ils hydrolysent les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras en milieu aqueux ou la réaction inverse dans des solvants organiques. <sup>50</sup> Les lipases sont les enzymes les plus utilisées dans la chimie organique, <sup>51</sup> ils ont un potentiel industriel considérable. <sup>52</sup> Ces biocatalyseurs trouvent de nouvelles applications importantes en biotechnologie. Les dernières établies avec succès avec des lipases sont pour la synthèse des biopolymères, du biodiesel, des substances de l'agrochimique et pour la production des produits pharmaceutiques énantiopurs. <sup>53</sup> L'utilisation des lipases dans les solvants organiques présente de nombreux avantages <sup>54</sup> qui sont résumés dans la *figure 13*.

 <sup>&</sup>lt;sup>50</sup> (a) W.A.M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J-P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008, <u>12(1)</u>, 57-68. (b) K-E. Jaeger., M. T. Reetz, *Trends Biotechnol*, 1998, <u>16</u>, 396-403.
 <sup>51</sup> M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6, 145-150.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> (a) R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, *Biotechnology Advances.*, 2001, <u>19</u>, 627–662 ; (b) A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature.*, 1991, <u>351</u>, 491-494.

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> K-E. Jaeger, T. Eggert, *Current Opinion in Biotechnology.*, **2002**, <u>13</u>, 390–397.

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, P. K. Arora, *Biological Procedures Online.*, 2016, <u>18</u>, 2.



Figure 13 : Avantages des réaction catalysées par des lipases dans des solvants organiques.

Les lipases peuvent généralement être divisées en quatre groupes, selon leur spécificité : lipases spécifiques du substrat, lipases *régio* sélectives, lipases spécifiques d'acides gras et lipases stéréospécifiques. <sup>55</sup> Ces propriétés de *chimio- régio-* et *stéréo*selectivité intéressent fortement les chimistes organiciens pour les impliquer comme outils catalytiques dans des transformations organiques. Les lipases catalysent de nombreuses réactions mais les quatre grands types de réactions où interviennent les lipases sont les suivantes :

#### 

(R, S)-R'-OH + RCOOH  $\longrightarrow$  (R)-R'-OH + (S)-RCOOR' + H<sub>2</sub>O

#### 

(R, S)-R'-O H + RCOO R<sub>1</sub>  $\longrightarrow$  (R)-R'-OH + (S)-RCOOR' + R<sub>1</sub>-OH

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> Réf47: R. J. Whitehurst, M. van Oort, «Enzymes in Food Technology», John Wiley & Sons, Ltd, 2nd ed, 2010.

## 

(R, S)-RCOOR'+ H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  (S)-RCOOR'+ (R)-R'-OH + RCOOH

## 

(R, S)-RCOOR<sub>1</sub> + R<sub>3</sub>COOR<sub>2</sub>  $\rightarrow$  (R)-RCOOR<sub>1</sub> + (S)-R<sub>3</sub>COOR<sub>1</sub> + RCOOR<sub>2</sub>

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement aux Lipases (E.C.3.1.1.3) (hydrolases à sérine) qui sont largement impliquée les réactions de dédoublement cinétique des mélanges racémiques. Selon le milieu réactionnel, aqueux ou organique, plusieurs nucléophiles peuvent intervenir avec l'enzyme, il y a formation d'un intermédiaire *acyl-enzyme* donnant lieu à plusieurs réactions synthétiquement utiles comme *la transestérification*, *l'hydrolyse*, *l'aminolyse*, *l'alcolyse*, *l'hydrazynolyse* etc. <sup>56</sup>

## II.3.2. Mécanisme d'action des lipases

Le site actif des lipases est formé par « une triade catalytique » composée de trois acides aminés : la sérine (*Ser*) ; l'aspartate (*Asp*) (ou le glutamate, *Glu*) et l'histidine (*His*) ; le complexe **d'acyl-enzyme** est l'intermédiaire réactionnel dans toutes les réactions catalysées par les lipases (*Schéma 18*).

L'arrangement de cette triade diminue la valeur du pKa du groupement hydroxylé de la serine. Cette caractéristique favorise l'attaque nucléophile sur la fonction carboxyle du substrat. La fonction acyle du substrat se retrouve temporairement liée d'une manière covalente à l'enzyme. La deuxième étape implique l'attaque de l'intermédiaire acyl-enzyme par un nucléophile (eau, alcool, amine, etc.) pour conduire au produit (acide carboxylique, ester, amide, etc.) et à l'enzyme libre. <sup>57</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, J. Mol. Cata B. Enz., 2006, <u>40</u>, 111-120.

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> (a) D. L. Nelson, M. M. Cox. «Lehninger Principles of Biochemistry», W.H. Freeman, New York, **2008**; (b) **Réf50b:** K-E. Jaeger, M. T. Reetz, *Trends Biotechnol.*, **1998**, <u>16</u>, 396-403; (c) **Réf51**: M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, <u>6</u>, 145-150.



Schéma 18 : Mécanisme d'action des lipases.

## II.3.3. Les lipases immobilisées

Les lipases libres et immobilisées sont disponibles dans le marché, leur capacité à hydrolyser et à estérifier, trouvent des applications dans différents secteurs industriels. Cependant, un nombre croissant d'application de lipase dans certaines biotransformations spécialisées exigent que le biocatalyseur soit immobilisé pour son efficacité d'utilisation. L'immobilisation permet un recyclage et une réutilisation facile des enzymes après une réaction. En outre, l'immobilisation peut améliorer la stabilité et l'activité enzymatique. <sup>58</sup>

Les méthodes d'immobilisation des enzymes sont nombreuses et variées et peuvent être classées en trois groupes : l'adsorption sur un matériau porteur ; l'inclusion ou l'encapsulation ; la fixation covalente à une matrice activée. <sup>59</sup> Un exemple récent explique l'avantage d'immobilisation d'une lipase *Burkholderia cepacia* (*BCL*). **Zheng** <sup>60</sup> a effectué une comparaison entre l'utilisation de la forme libre de la *BCL* et sa forme immobilisée sur la silice mésoporeuse ordonnée modifiée par un phényle la *BCL*@*Ph-OMM* dans une réaction transestérification des alcools secondaires (*Schéma 19*).

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> (a) Réf50a: W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J. P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2008, 12, <u>1</u>, 57-68; (b) AK. Chandel, R. Rudravaram, L. V. Rao, R. Pogaku, M. L. Narasu, *J Comm Biotechnol.*, 2007, <u>13</u>, 283–91.

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> P. Villeneuve., J.M. Muderhwa., J. Graille., M.J. Haas, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2000**, <u>9</u>, 113–148.

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> M. Zheng, X. Xiang, S. Wang, J. Shi, Q. Deng, F. Huang, R. Cong, *Process Biochemistry.*, **2017**, <u>53</u>, 102-108.



<u>Schéma 19</u> : Transestérification des alcools secondaires catalysés par la lipase Burkholderia cepacia.

Les résultats montrent une meilleure activité de la forme immobilisée par rapport à la forme libre. Par ailleurs, L'activité de *BCL@Ph-OMM* a été maintenue constante dans 50 cycles consécutifs.

## II.4. Potentiel d'utilisation de la catalyse en chimie organique

Les industries chimiques s'engagent vers des processus de synthèse par voie biocatalytique qui peut être facilement appliquée en chimie organique fine, dérivés agricoles, aromes et médicaments. <sup>61</sup> L'utilisation des biocatalyseurs augmente de façon surprenante dans le monde <sup>62</sup> et a trouvé de nouvelles applications dans de nombreux domaines en chimie industrielle. <sup>63</sup> Ces biocatalyseurs produisent près de **20 000 Euros** de produit par **Euro** de catalyseur. Les coûts de traitement pour l'utilisation des biocatalyseurs sont également très inférieurs par rapport à la catalyse chimique. <sup>64</sup>

Ainsi, l'intérêt de la croissance de l'utilisation des biocatalyseurs est dû au large potentiel biotechnologique des réactions enzymatiques avec le développement de nouveaux processus qui maximisent la production et minimisent les coûts et l'impact environnemental. <sup>65</sup> L'utilisation d'enzymes dans des réactions catalytiques, à une grande importance industrielle pour ses faibles besoins énergétiques en raison des conditions de température modérées et de

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> G. Angajala, P. Pavan, R.Subashini, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology., 2016, 7, 257-270.

<sup>62</sup> J.D. Rozzell, Bioorg. Med. Chem., 1999, 7, 2253-2261.

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> R. Wohlgemuth, Curr. Opin. Biotechnol., 2010, <u>21</u>, 713–724

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> G. Angajala, P. Pavan, *RSC Adv.*, **2015**, <u>5</u>, 45599-45610.

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> S. Armenta, S. Garrigues, M, Guardia, Trends Anal. Chem., 2015, <u>71</u>, 2–8.

pression ambiantes. En outre, les enzymes sont des ressources renouvelables et biodégradables, ce qui constitue un outil précieux pour les transformations écologiques.

Les biotransformations en utilisant des enzymes sont de plus en plus exploitées dans l'industrie ou dans les laboratoires de recherche. Plus de **500** produits industriels sont fabriqués utilisant des enzymes. <sup>66</sup> Nous citons dans ce qui suit quelques applications industrielles biotechnologiques en utilisant des biocatalyseurs :

**L'aspartame,** est un produit à l'échelle des kilotonnes par l'entreprise Holland Sweetener. Cet édulcorant de faible teneur calorique est obtenu par biocatalyse, on emploie une enzyme, la Thermolysine qui catalyse la formation du dipeptide de l'acide L-aspartique N-protégé et de la phénylalanine racémique. <sup>67</sup> (*Schéma 20*)



<u>Schéma 20</u> : Synthèse industrielle biocatalysée de l'aspartame.

Le levetiracetam (Keppra®) est un médicament pour traiter l'épilepsie dont les ventes s'élevaient à plus de 1.5 milliards de dollars en 2007. Une voie biocatalytique avec un nitrile hydratase permet le dédoublement d'un nitrile racémique et, du même coup, un recyclage plus facile de l'énantiomère inutilisable. <sup>68</sup> (Schéma 21)

<sup>67</sup> U.T. Bomcheuer, K. Buchholz, *Eng. Life Sci.*, **2005**, <u>5</u>, 309-323.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> (a) J. L. Adrio, A. L. Demain, *Microbial Enzymes and Biotransformations.*, 2005, <u>17</u>, 1–27 ; (b) T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006, <u>9</u>, 261–267.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> J. Tao, J.H. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, <u>13</u>, 43-50.



Schéma 21 : Synthèse industrielle du Keppra®.

**Arabinonucléosides ;** la désacylation régiosélective enzymatique de deux arabinonucléosides le 2',3',5'-tri-O-acetyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil **1** et le 2',3',5'-tri-Oacetyl-9-β-D-arabinofuranosyladenine **2** catalysée par la lipase *Candida antarctica B (CAL-B)* a été étudier par **Sabaini.** <sup>69</sup> (*Schéma 22*)



<u>Schéma 22</u> : Désacylation régiosélective enzymatique de deux arabinonucléosides.

L'hydrolyse des composés 1 et 2 catalysée par la *CAL-B* dans l'isopropanol permettre des produits bi-acylés 3 et 4. En outre, l'hydrolyse catalysée par la même lipase en solution tampon à un pH 7 et 8 à conduire à des produits monoacylés 5 et 6 (le composé 6 a été décrit comme un précurseur pour le traitement des infections herpétiques), le temps de la réaction varié entre 12h et 24h. Contrairement la présence de la kiratinase rend possible la déacylation complète du Arabinonucléosides protégés.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> M. B. Sabaini, M. A. Zinni, M. Mohorcic, J. Friedrich, A. M. Iribarren, L.E. Iglesias, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2010**, <u>62</u>, 225–229.

#### II.5. CONCLUSION

La catalyse enzymatique joue un rôle important dans la chimie moderne et s'adapte totalement aux principes de la chimie verte avec de nouvelles voies plus durables réduisant efficacement les déchets, économes en atomes, peu toxiques, réalisée dans des conditions douces avec espèces catalytiques chimio-, régio- et énantio-sélectives qui sont renouvelables et dont le recyclage est aisé. Aujourd'hui, les applications des « enzymes » dans l'industrie chimique de synthèse organique présentent des avantages particulièrement intéressants par rapport à la chimie conventionnelle : d'une part, les réactions sont très souvent hautement sélectives, d'autre part, les procédés industriels impliquant ces biocatalyseurs sont plus performants et moins polluants, et participent donc au développement de la « chimie verte ».

Les avantages de l'utilisation des enzymes sont nombreux et constituent une nouvelle alternative catalytique dans les domaines de la chimie organique fine (agroalimentaire, flagrance et médicinale) avec essentiellement :

- $\cancel{}$  L'augmentation de la sélectivité des réactions.

Les hydrolases qui sont les enzymes catalysant les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification dans des solvants organiques constituent de nouveaux outils pour la catalyse organique et les lipases sont plus fréquemment utilisées en raison de leur compatibilité avec une large gamme de substrats avec une grande sélectivité qui leur permet d'être utilisées dans différents domaines. Par ailleurs, ces enzymes ont été particulièrement utilisées dans des réactions de dédoublement cinétique pour accéder aux molécules énantioenrichies. Cet important mode d'accès est présenté dans le prochain chapitre. PREMIÈRE PARTIE

## TROISIÈME CHAPITRE

# DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

#### III.1. INTRODUCTION

La synthèse énantiosélective des molécules sous forme optiquement pure reste un défi constant pour les chimistes dû à l'utilité majeure de ces composés dans plusieurs domaines et plus précisément dans les industries pharmaceutiques et agrochimiques. Le dédoublement, aussi appelés « résolutions », est l'une des stratégies les plus utilisés à l'échelle industrielle pour la production de composés énantiomériquement purs à partir de racémiques qui représentent une source importante. <sup>70</sup> Ils permettent de séparer les énantiomères au moyen d'une entité chirale qui peut être l'enzyme. L'efficacité du dédoublement cinétique est évaluée par des paramètres mathématiques.

#### III.2. Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique

L'efficacité et la réactivité enzymatique du dédoublement cinétique sont évaluées par des paramètres mathématiques, décrites par Sih et *coll* (**1982**)<sup>71</sup> ainsi que Kagan et Fiaud (**1988**).<sup>72</sup> Ces équations ne sont valides que si la réaction est irréversible et qu'il n'y a aucune inhibition de l'enzyme.

Enz + 
$$R \xrightarrow{k_1} [EnzR] \xrightarrow{k_3} [EnzP] \xrightarrow{k_4} Enz + P$$
  
Enz +  $S \xrightarrow{k_2} [EnzS] \xrightarrow{k'_3} [EnzQ] \xrightarrow{k'_4} Enz + Q$ 

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

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

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Réf 28: (a) R. Siedlecka, *Tetrahedron.*, 2013, <u>69</u>, 6331-6363 ; (b) A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby, Eds. *Chirality in Industry II*, Wiley, Chichester, 1997 ; (c) C. M. Monteiro, C. A. M. Afonso, *Journal of Chemical Education.*, 2010, <u>87(4)</u>, 423-425.

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> C. S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, J. Am. Chem. Soc., **1982**, <u>104</u>, 7294-7299.

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "Kinetic Resolution". Topics in Stereochemistry, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Eds; J. Wiley & sons, Inc. Newyork., **1988**, <u>18</u>, 249-330.

La conversion (C) : représente le taux d'avancement de la réaction d'une réaction de dédoublement cinétique qui dépend des excès énantiomériques du produit obtenu (*ee<sub>P</sub>*) et du substrat non réagi (*ee<sub>s</sub>*)

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$
 0

✓ 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. Ce facteur est mesuré par la vitesse des deux énantiomères dans une réaction de dédoublement cinétique.

$$E = \frac{K_R}{K_s}$$
 Equation.5.



Le taux d'avancement d'une réaction de dédoublement cinétique enzymatique (C) est directement lié aux excès énantiomériques du substrat non réagi (*ees*) et du produit obtenu (*eep*), ce qui influe directement sur le facteur de sélectivité (E). 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 substrat de départ augmente celle du produit de la réaction doit nécessairement diminuer. Deux cas extrêmes se visualisent (*Figure 14*) :

- <sup>Cas1</sup>: Facteur de sélectivité faible (E ≤ 10); l'énantiomère non réagi peut être obtenu avec un enrichissement optique élevé à une conversion très avancée et l'autre antipode optique avec un excès énantiomérique ridicule.
- Cas2 : Facteur de sélectivité élevé (E >100) ; on peut obtenir les deux énantiomères d'un racémique avec une haute pureté optique en un seul dédoublement.


*Figure 14* : Dépendance des excès énantiomériques  $(ee_p/ee_s)$  à la conversion.

## III.3. Les règles empiriques de kazlauskas sur l'énantiopréférence enzymatique

Plusieurs réactions organiques catalysées par des biocatalyseurs ont été étudiées en profondeur, II est maintenant possible de prédire la stéréosélectivité de certaines enzymes et leur sélectivité face à certains types de substrat. Les modèles de prédictions décrivent toujours l'énantiosélectivité préférentielle d'une enzyme, par contre ils ne permettent pas de prédire le degré d'énantiosélectivité. L'encombrement stérique est à la base de plusieurs de ces règles de prédiction et elle dirige généralement la distinction entre deux énantiomères. Plusieurs modèles ont été proposés, le premier est le modèle de Prelog (**1964**), <sup>73</sup> qui prédit l'énantiosélectivité de l'alcool déshydrogénase de *Curvularia falcata* lors de la réduction de cétones (*Figure 15*).



Figure 15 : Modèle de prédiction pour la bioréduction de cétone.

En 1991, Kazlauskas a décrit une règle concernant la reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et les énantiomères, cette reconnaissance est identifiée comme un paramètre clé

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> V. Prélog, *Pure Applied Chem.*, **1964**, <u>9</u>, 119.

responsable de l'énantiosélectivité. <sup>74</sup> De nature empirique, ce modèle (*Figure 16*) est fondé sur le criblage systématique de nombreux alcools secondaires et a permis d'établir que l'énantiopréférence 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 *B. cepacia* et de *C. rugosa*.



Figure 16 : Règle empirique de Kazlauskas pour le dédoublement des alcools secondaires.

D'autre part, Ottosson et Hult ont montré expérimentalement que la longueur de la chaîne acyle d'esters vinyliques employés comme donneurs d'acyle avait une grande influence sur le ratio énantiomérique. <sup>75</sup> Depuis, cette règle est applicable pour la majorité des lipases qui est généralement l'énantiomère R. On constate que la *Candida Antarctica B* (*CAL-B*), permet la même énantiosélection lipasique pour les alcools secondaires.



<u>Figure 17</u>: Modèle d'Orrénius pour l'énantiosélection de la CAL-B (A) énantiomère réagit rapidement. (B) énantiomère réagit lentement.

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, J. Org. Chem., 1991, <u>56</u>, 2656–2665.

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> J. Ottosson, K. Hult, Journal of Molecular Catalysis – B: Enzymatic., 2001, <u>11(4-6)</u>, 1025-1028.

## III.4. Les réactions catalysées par les lipases

Un dédoublement cinétique est réalisable par le biais de différentes réactions possibles avec les lipases. De nombreuses transformations synthétiquement utiles interviennent par dédoublement enzymatique comme *la transestérification, aminolyse, l'hydrolyse....* etc. et ces réactions sont initiés par la formation d'un intermédiaire « *acyl-enzyme* » (*Schéma 23*).



Schéma 23 : Réactions catalysées par des enzyme.

Dans ce travail, nous avons étudié la réactivité des lipases pour deux types de réactions qui sont les *réactions de transestérification* et *d'hydrolyse*, ces deux voies sont complémentaires (*Schéma 24*).



<u>Schéma 24</u> : Voies de transformation enzymatique complémentaire.

Lors du DCE, la sélectivité dépend de plusieurs facteurs susceptibles d'agir sur le site actif des lipases, <sup>76</sup> et il est nécessaire d'étudier les différents paramètres des réactions mises en jeu afin d'optimiser la sélectivité des lipases.

## III.4.1. La réaction d'hydrolyse enzymatique

Depuis la première utilisation de la réaction énantiosélective en présence des enzymes pancréatiques en **1900**, les conditions de la réaction d'hydrolyse enzymatique a beaucoup évolué surtout dans la production industrielle pour l'obtention de composés optiquement actifs. <sup>77</sup> Initialement, cette réaction était la plus utilisée avec les hydrolases, le schéma réactionnel est proposé dans le *schéma 25*. <sup>78</sup>



<u>Schéma 25</u> : Hydrolyse enzymatique.

Cette réaction est réalisée généralement en milieu aqueux (eau, solution tampon); ou en milieu aqueux-solvant organique (milieu biphasique) pour les produits qui sont peu solubles dans le milieu aqueux. La sélectivité de la réaction d'hydrolyse est très dépendante du milieu réactionnel. On présentera, dans ce qui suit les différentes conditions d'hydrolyse enzymatique, qui ont évolué progressivement pour améliorer la sélectivité.

#### Dans un milieu aqueux

Peu de composés organiques sont solubles dans l'eau, ce qui limite la réalisation des réactions d'hydrolyse enzymatique en milieu aqueux. Par ailleurs, une grande quantité d'eau peut dénaturer la structure de l'enzyme et la désactiver. On constate que dans ces conditions la réaction est généralement peu sélective. L'hydrolyse enzymatique du β-acétoxybutyronitrile

<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> (a) K. Faber, F S. Riva, J. Synth, Org. Chem., 1992, 895; (b) U. Hanefeld, Org. Biomol., 2003, 1, 2405; (c) Y. F. Wang, C. H. Wong, J. Org. Chem., 1988, 53, 3129; (d) D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, J. Org. Chem., 1988, 53, 5531.

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> (a) R. D. Schmid, R. Verger, Angew, *Chem., Int. Ed*, **1998**, <u>37</u>, 1608–1633 ; (b) **Réf49b:** A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, Curr. *Opin. Biotechnol.*, **2002**, <u>13(6)</u>, 548–556.

<sup>&</sup>lt;sup>78</sup> (a) Réf46(a): A.M. Klibanov, *Chemtech.*, 1986, <u>16</u>, 354-359 ; (b) C. E. Humphrey, M. Ahmed, A. Ghanem, N. J. Turner, *Synthetic Methods.*, 2014, 123-160.

dans l'eau <sup>79</sup> est catalysée par la lipase de *Pseudomonas sp.* La sélectivité obtenue est faible (E=10) et le taux d'avancement C = 31% montre une activité modérée de la lipase. (*Schéma* 26).



<u>Schéma 26</u> : Hydrolyse enzymatique du  $\beta$ -acétoxybutyronitrile dans un milieu aqueux.

## <u>Dans un milieu biphasique</u>

Dans un système biphasique (eau-solvant organique), les substrats hydrophobes sont solubilisés par le solvant organique et la lipase intervient à l'interface eau/substrat. <sup>80</sup>

L'acide (*S*)-(-)-2-(6-méthoxy-2-naphtyl) propionique, connu sous le nom de Naproxène, est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien. L'activité anti-inflammatoire de la forme *S* du Naproxène est 28 fois supérieure à celle de la forme *R*. <sup>81</sup> Akceylan et *coll* <sup>82</sup> ont étudié l'hydrolyse énantiosélective de (*R*, *S*)-Naproxène méthyle ester en utilisant la lipase de *Candida rugosa* (*CRL*). Après l'immobilisation de la lipase *CRL* avec des calixarènes (composés macrocycliques) et les employés dans un système biphasique (solution tampon/isooctane), l'hydrolyse a été effectué en atteint le seuil maximal de la conversion 50% et une sélectivité >500 avec un produit de >98% d'excès énantiomérique (*Schéma 27*).



<u>Schéma 27</u> : Hydrolyse énantiosélective de l'ester méthylique de Naproxène racémique utilisant la lipase CRL immobilisé dans un système biphasique.

<sup>&</sup>lt;sup>79</sup> T. Itoh, Y. Hiyama, A. Betchaku, H. Tsukube, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, <u>34</u>, 2617-2620.

<sup>&</sup>lt;sup>80</sup> P. Fickers, J. Destain, P.Thonart, *Biotechnol, Agron. Soc. Environ.*, 2008, <u>12(2)</u>, 119-130.

<sup>81</sup> O. Sahin, S. Erdemir, A. Uyanik, M. Yilmaz, Appl. Catal. A Gen., 2009, <u>369</u>, 36–41.

<sup>&</sup>lt;sup>82</sup> E. Akceylan, E. Akoz, O. Sahin, M. Yilmaz, J Incl Phenom Macrocycl Chem., 2015, <u>81</u>, 237–243.

#### Dans une solution tampon

La solution tampon est utilisée pour maintenir un certain pH et éviter à l'enzyme de se retrouver dans des conditions de dégradation due aux possibilités de dénaturation dans certaines milieux trop basiques ou acides. Deasy et coll<sup>83</sup> ont étudié la résolution cinétique par hydrolyse enzymatique de l'acides 3-aryl-alcanoïque (*Schéma 28*). Ils ont étudié l'hydrolyse enzymatique du (±)-éthyl-3-phénylbutanaoate par la lipase *Alcaligenes spp* (Hydrolase) dans une solution tampon à un pH=7. L'ester et l'acide ont été récupérés avec de bons excès énantiomériques 96% et 97% respectivement, La conversion a atteint 50% avec une valeur optimale de la sélectivité E > 200.



<u>Schéma 28</u> : Hydrolyse enzymatique du (±)-éthyl-3-phénylbutanaoate en solution tampon.

## With the second seco

Une nouvelle approche <sup>84</sup> a été récemment décrite par notre équipe. Elle concerne de nouvelles conditions d'hydrolyse en milieu non-aqueux avec des sels de carbonate catalysée par une lipase. L'utilisation de carbonate de sodium dans l'hydrolyse avec la lipase *CAL-B* pour le DCE des acétates benzyliques racémiques permet d'accéder une haute sélectivité et réactivité de cette lipase (*Schéma 29*).



Schéma 29 : Hydrolyse enzymatique en présence du carbonate de sodium.

<sup>83</sup> R. E. Deasy, M. Brossat, T. S. Moody, A. R. Maguire, Tetrahedron: Asymmetry, 2011, 22, 47-61

<sup>&</sup>lt;sup>84</sup> M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2012**, <u>23(11)</u>, 828-833.

L'étude de la résolution cinétique enzymatique d'une série d'acétates a été effectué par la réaction d'hydrolyse enzymatique/carbonate de sodium dans des conditions douces. Dans tous les cas, les acétates et les alcools résultants ont été obtenus des valeurs élevées ee (jusqu'à> 99%) tandis que les sélectivités atteintes  $\mathbf{E} > 500$ .

Afin d'étendre le champ d'application de cette réaction, des études sont en cours de développement dans notre laboratoire avec l'application de ces nouvelles conditions d'hydrolyse sur différents substrats d'intérêt. D'ailleurs, une partie des travaux de cette thèse est consacrée à l'étude cette réaction sur de nouveaux substrats.

#### III.4.2. La réaction de transestérification enzymatique

Le champ d'application de la réaction de transestérification avec des lipases est une réaction importante avec plusieurs applications industrielles telles que la production de lipides, <sup>85</sup> ou celle des biocarburants obtenus à partir d'huile végétale ou animale. <sup>86</sup>

Dans la réaction de DCE par transestérification, il est nécessaire d'étudier les paramètres réactionnels susceptibles d'agir sur le site actif de l'enzyme pour atteindre des énantiosélectivites enzymatiques élevées. Il est important de sélectionner convenablement le système agent acylant/lipase et examiner : la structure du substrat, <sup>87</sup> la nature de l'agent acylant, <sup>88</sup> du solvant, <sup>89</sup> ou l'introduction d'additifs. <sup>90</sup>

La transestérification enzymatique consiste à transférer un groupement acyle d'un agent acylant, vers un accepteur de qui est un énantiomère du mélange racémique de l'alcool en présence d'une lipase (*Schéma 30*).

<sup>&</sup>lt;sup>85</sup> W. K. Lancelot, M. Luke, S. R. John, N. Ignatious, Ind. Crops Prod., 2002, <u>16</u>, 237-244.

<sup>&</sup>lt;sup>86</sup> (a) Y. Xu, W. Du, D. Liu, J. Zeng, *Biotechnol. Lett.*, 2003, <u>25(15)</u>, 1239-1241; (b) H. Noureddini, X. Gao, R. S. Philkana, *Bioresour. Technol.*, 2005, <u>96(7)</u>, 769-777.

<sup>&</sup>lt;sup>87</sup> (a) L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, <u>41</u>, 4085-4088 ; (b) X. Daiwang, L. Zuyi, M. Shengming, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, <u>44</u>, 6343 ; (c) Q. Xu, Y. Xie, X. Geng, P. Chen, *Tetrahedron.*, 2010, <u>66</u>, 624 ; (d) J. H. Sun, R. J. Dai, W. W. Meng, Y. L. Deng, *Catal. Commun.*, **2010**, <u>11</u>, 987-991.

<sup>&</sup>lt;sup>88</sup> (a) M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2001**, <u>12</u>, 585-596 ; (b) T. Miyazawa, E. Kaito, T. Yukawa, T. Murashima, T. Yamada, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2005**, <u>37</u>, 63.

<sup>&</sup>lt;sup>89</sup> (a) A. M. Klibanov, Acc. Chem. Res., 1990, 23, 114 ; (b) P. A. Fitzpatrick, A. M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc., 1991, <u>113</u>, 3166.

<sup>&</sup>lt;sup>90</sup> (a) P. Berglund, *Biomol. Eng.*, 2001, <u>18</u>, 13-22; (b) T. Itoh, Y. Takagi, H. Tsukube, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 1997, <u>3</u>, 259; (c) Y. Takagi, R. Ino, H. Kihara, T. Itoh, H. Tsukube, *Chem. Lett.*, 1997, 26(12), 1247-1248; (d) B. K. Pchelka, A. Loupy, J. Plenkiewicz, L. Blanco, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2000, <u>11</u>, 2719; (e) M.

Boukachabia, J-C. Fiaud, N. Melais, M. Merabet, L. ZouiouecheAribi, J. Soc. Alg. Chim., 2007, <u>17</u>, 185-194; (f). M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, <u>19(20)</u>, 2378-2384.



<u>Schéma 30</u>: Transestérification enzymatique.

Pour obtenir une énantiosélectivité élevée dans cette réaction, l'emploi d'agents acylants adaptés est un élément clé dans ce processus. Les agents acylants activés utilisés pour la transestérification enzymatique se regroupent en trois catégories : <sup>91</sup> les réversibles, les quasi-irréversibles et les irréversibles

 $\Rightarrow$  *Agents acylants réversibles* : telle que les thioesters le méthoxyacétate d'éthyle ; ils ne sont pas très utilisés par rapport à ceux des autres catégories puisqu'ils libèrent des nucléophiles possédants la capacité d'attaquer le produit acylé (*Schéma 31*) et provoque la réaction inverse.



<u>Schéma 31</u>: Transestérification enzymatique d'alcools secondaires par un thioester comme donneur d'acyle.

⇒ Agents acylants quasi-irréversibles : cette catégorie consiste en des donneurs d'acyle assez nucléophiles (élément chimique de type halogène). Leur utilisation pour le dédoublement cinétique par transestérification enzymatique est très commode pour les amines et les alcools primaires (Schéma 32).

$$R \xrightarrow{O} X \xrightarrow{+} R' \xrightarrow{Hydrolase} R \xrightarrow{O} R' \xrightarrow{+} K'$$
$$X = CI_3C \xrightarrow{O} F_3C \xrightarrow{O}$$

<u>Schéma 32</u>: Transestérification enzymatique d'alcools primaires par des donneurs d'acyle quasi-irréversibles.

<sup>&</sup>lt;sup>91</sup> H. Hanefeld, Org. Biomol. Chem. 2003, <u>1</u>, 2405-2415.

⇒ Agents irréversibles : les agents irréversibles sont les plus utilisés et les plus performants pour effectuer des réactions de transestérification irréversible. Cette catégorie de donneurs d'acyle se subdivise en deux groupes : les anhydrides d'acides et les esters d'énols.

Dans cette partie nous nous intéresserons uniquement aux agents acylants irréversibles :

#### Les esters d'énols

Les esters d'énols <sup>92</sup> comme l'acétate d'isopropényle (**AI**) et l'acétate de vinyle (**AV**) font partie des agents acylants les plus utilisés dans le dédoublement cinétique enzymatique des alcools chiraux. Dans le cas d'un ester d'énol l'irréversibilité de cette réaction et est due à l'énol instable qui est libéré (*Schéma 33*) et converti aussitôt en cétone.



<u>Schéma 33</u> : Dédoublement cinétique enzymatique avec les esters d'énols.

#### <u>Les anhydrides d'acides</u>

Ce type d'agents acylants restent limité à cause de la difficulté de contrôler la concentration acide dans le mélange réactionnel qui peut causer une dénaturation de la lipase ou rendre la réaction enzymatique non sélective. Pourtant, leur utilisation est très intéressante au niveau industriel à cause de la facilité de l'isolement des deux énantiomères. Ces derniers sont obtenus, après une extraction liquide-liquide, dans deux phases différentes ; l'un sous forme d'ester acide (alcool réagi) soluble dans la phase aqueuse qui peut être directement récupéré sous forme d'alcool après une saponification, et l'autre énantiomère, l'alcool non réagi est retrouvé dans la phase organique (*Schéma 34*). Cela permet d'éviter la séparation par la chromatographie sur colonne et l'emploi importante des solvants organiques, ce qui est très avantageux pour une valorisation industrielle.

<sup>92</sup> Réf76c: Y. F. Wang, C.H. Wong, J. Org. Chem., 1988, 53, 3129.



Schéma 34 : Transestérification enzymatique avec l'anhydride succinique.

## III.5. Paramètres qui influent sur le DCE

Le dédoublement cinétique enzymatique permettant de séparer les deux énantiomères dans un mélange racémique par modification structurelle de l'un d'entre eux. La résolution enzymatique est une technique simple, verte, hautement sélective qui permet d'aboutir aux deux énantiomères parfaitement séparés. <sup>93</sup> Pour améliorer la sélectivité et la réactivité d'une réaction de dédoublement cinétique enzymatique un éventail de principaux paramètres met en jeu. Parmi ces facteurs, il convient de citer principalement : la nature du biocatalyseur, la structure du substrat, le solvant, l'ajout d'additif, la température de la réaction ainsi que le type d'agent acylant.

## III.5.1. Influence de la nature et la quantité de lipase

Dans la plupart des réactions de DCE l'étude de l'influence du biocatalyseur est indispensable afin de trouver l'enzyme appropriée pour donner les meilleurs sélectivités et réactivités. Nous citons ici l'exemple de la transestérification enzymatique d'un alcool allylique secondaire par le biais de la lipase *CAL-B*, et la lipase *CCL*, *Lipozyme*® et la *Lipozyme TL* 

<sup>93</sup> Réf43: D. Zhu, C. Mukherjee, L. Hua, Tetrahedron: Asymmetry., 2005, 16, 3275-3278.

*IM*, <sup>94</sup> ces lipases montrent des réactivités et des sélectivités différentes vis-à-vis du même substrat. La meilleure résolution du racémique (*E*)-4-(2',5'-diméthylphényl)-but-3-en-2-ol est obtenue avec la *CAL-B* qui est préférentiellement converti en énantiomère (*R*) au bout d'une heure avec un excès énantiomérique de **98%** pour une conversion de **53%** et une E> à 100 (*Schéma 35*).



<u>Schéma 35</u>: Influence de la lipase sur la transestérification enzymatique de (E)-4-(2',5'-diméthylphényl)-but-3-en-2-ol.

Le développement d'une voie chimioenzymatique efficace pour la synthèse des hydroxy cyclopenta[b]naphtalénones optiquement actives a été effectué par Özdemirhan et Sarıçelik. <sup>95</sup> Deux types de lipase sont testés : la lipase *CRL* et la *Pig Liver Esterase PLE* dans une solution tampon à pH=7 (*Schéma 36*). Une amélioration remarquable de la sélectivité lors de la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'acétates (±)-4a-hydroxy-2-oxo-2,4,4a,5,6,7,8,8a,9,9a-decahydro-Hcyclopenta[b]naphthalen-1-yl (±)-rac 1 a été trouvé avec un E=163 en utilisant la *CRL* tandis que **E= 5 avec** la *PLE*.

<sup>&</sup>lt;sup>94</sup> W. Gładkowski, A. Gliszczyńska, M. Siepka, M. Czarnecka, G. Maciejewska, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2015, <u>26(14)</u>, 702–709.

<sup>&</sup>lt;sup>95</sup> D. Özdemirhan, Ö. Sarıçelik, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2016**, <u>28(1)</u>, 118–124.



<u>Schéma 36</u>: Influence de la nature de lipase sur la résolution enzymatique d'un hydroxy cyclopenta[b]naphthalenylacétates.

La nature d'enzyme influe fortement sur la sélectivité et la réactivité de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique ; ainsi le taux catalytique « **la quantité de l'enzyme** » aussi à un effet important sur le déroulement de la réaction.

Une étude effectuée par notre équipe  $^{96}$  montre l'influence de la quantité de la lipase de la *CAL-B* sur la réactivité et la sélectivité de la réaction d'acylation enzymatique des arylalkylcarbinols.



<u>Schéma 37</u>: Acylation enzymatique des arylalkylcarbinols.

Dans le cas de l'indanol, une quantité minimale de **3 mg** de *CAL-B* est nécessaire pour obtenir l'acétate avec une bonne conversion (**C=48%**) et une sélectivité **E** >**500**. Cette sélectivité a diminué pour 150 mg de lipase (entrée 1) E = 60 pour C = 54 %.

<sup>&</sup>lt;sup>96</sup> M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, C. R. Chimie., 2011, <u>14</u>, 978–986.

## III.5.2. Influence de la structure du substrat

La structure du substrat est parmi les facteurs importants qui influent de manière considérable sur l'énantiosélectivité de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique. Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature qui mettent en évidence l'influence de la nature du substrat, pour accéder aux alcools chiraux d'intérêt majeur. Dans ce contexte, nous citons quelques exemples et plus spécialement ceux de dérivés alcools qui sont les substrats principaux étudiés dans ces travaux de thèse.

## <u>Alcools primaires</u>

L'accès aux alcools primaires énantiopurs par catalyse avec les lipases est difficile à réaliser par rapport aux autres alcools. La faible sélectivité des lipases vis-à-vis des alcools primaires est dû probablement à l'éloignement de la fonction hydroxyle du centre stéréogène. La stéréochimie du substrat a un impact primordial sur la sélectivité et la réactivité des lipases. <sup>97</sup>



<u>Schéma 38</u>: Résolution cinétique catalysée par la lipase PS des 2-benzyloxy- et 2-silyloxy-1propanols.

<sup>97</sup> C. Bijou, L. Aribi-Zouiouech, J-C. Fiaud, Tetrahedron letters., 2002, 43, 3025-2027.

Il est néanmoins possible de dédoubler ces alcools comme dans le cas de **Kawanami** et **Itoh** qui montrent que la modification de la structure d'un alcool primaire avec un groupe diméthylphénylsilyle augmentait l'énantiosélectivité de la résolution cinétique catalysé par la lipase Amano *PS* du 1,2-propanediol racémique. <sup>98</sup> (*Schéma 38*)

## Alcools secondaires

Les alcools secondaires sont les plus faciles à dédoubler par rapport aux alcools primaires et tertiaires dont la résolution est plus difficile. Cette catégorie est fréquemment la plus utilisée comme cibles dans les réactions de dédoublements cinétiques catalysées par les lipases.

Dans un travail récent (**Zhou 2015**), <sup>99</sup> décrit la résolution cinétique des dérivés chiraux de tétrahydroquinolin-4-ol et tétrahydro-1H-benzo[b]azepin-5-ol catalysée par la lipase *Novozyme 435*. Différentes substituants sur la position N1 du **rac-1** ont été testé dans la réaction d'acylation énantiosélective du rac-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b]azepin-5-ol en présence de la 2-chloroacétate de vinyle comme agent acylant (*Schéma 39*).



<u>Schéma 39</u> : Acylation énantiosélective du racémique 2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzo[b]azepin-5-ol par Novozyme 435.

Les substituants **Bz** et le **2-furoyle** ont permis de préparer les alcools (*S*)-1 et les esters (*R*)-2 correspondants avec excellents rendements et avec des énantiosélectivités élevés (ee = 98% et E > 200) (entrées 1 et 2).

<sup>98</sup> Y. Kawanami, K. Itoh, Chemistry Letters., 2005, <u>34(5)</u>, 682-683.

<sup>99</sup> X. Zhou, D. Zheng, B. Cui, W. Han, Y. Chen, *Tetrahedron.*, 2015, <u>71</u>, 4738-4744.

Dans l'exemple qui suit, la lipase *Novozyme 435* a catalysé un dédoublement cinétique enzymatique d'un alcool secondaire allylique dans l'hexane à  $32^{\circ}$ C<sup>100</sup> (*Schéma 40*). La présence d'un phényle augmente la sélectivité d'un E = 29 à E = 205 par rapport au groupement linéaire. Les deux énantiomères du (Z)-Undec-3-en-5-yn-2-ol (2a) et (Z)-6-Phenyl-hex-3-en-5-yn-2-ol (2b) dédoublé ont été récupérés avec une bonne énantiosélectivité.



<u>Schéma 40</u>: Novozym 435 catalyse le dédoublement des alcools secondaires allyliques.

## <u>Alcool tertiaire</u>

Le DCE des alcools tertiaires est peu décrit malgré l'utilité et l'importance de cette classe d'alcool et la sélectivité de cette réaction est généralement très faible. Ceci est essentiellement dû aux interactions stériques défavorables causées par les substituants de ces alcools.

**Krishna** et *coll*<sup>101</sup> ont effectué une transestérification hautement énantiosélective de l'alcool tertiaire 2-phénylbut-3-yn-2-ol catalysée par la lipase *Candida Antarctica A* (*CAL-A*) (*Schéma 41*).



<u>Schéma 41</u> : Transestérification énantiosélective du 2-phénylbut-3-yn-2-ol.

<sup>&</sup>lt;sup>100</sup> C. Raminelli, J. V. Comasseto, L. H. Andrade, A. L. M. Porto, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2004**, <u>15</u>, 3117–3122.

<sup>&</sup>lt;sup>101</sup> S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2002, <u>13</u>, 2693–2696.

L'acétate correspondant a été obtenu avec un excès énantiomérique de 94% à une conversion seulement de 25% avec une sélectivité de E = 65. Le cas des alcools de type propargylique est un peu particulier.

Un autre exemple montre l'utilité de la lipase *CAL-A-CLEA* dans la résolution cinétique des alcools tertiaires (allyliques, homoallyliques et homopropargyliques). <sup>102</sup> **Tanyeli** et **Özdemirhan** ont décrit une voie chimioenzymatique de synthèse de divers composés spirocycliques énantiomériquement enrichis (*Schéma 42*). Les deux alcools vinylcyclopent-2-énol (rac-1) et 1-allylcyclopent-2-enol (rac-2) ont été dédoublé par une acylation enzymatique en présence de l'AV dans le THF. Les résultats montrent l'influence de l'éloignement de la fonction allylique par rapport au carbone asymétrique influe sur la sélectivité et l'excès énantiomériques d'alcool et d'acétate correspondante.



<u>Schéma 42</u>: Acylation enzymatique des alcools tertiaires allyliques.

## <u>D'autre type de substrat</u>

Parmi de nombreux composés d'intérêts potentiel ; les amines sous forme énantiopures portent une grande importance dans différents domaines, <sup>103</sup> tel que : pharmaceutique, agroalimentaire etc...

<sup>&</sup>lt;sup>102</sup> C. Tanyeli, D. Özdemirhan, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2014**, <u>25</u>, 658–666.

<sup>&</sup>lt;sup>103</sup> (a) T. Toyo'oka, J. Biochem. Biophys. Methods., 2002, <u>54</u>, 25–56 ; (b) J. González-Sabin, V.Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2002, <u>13(12)</u>, 1315-1320.

Récemment, la résolution enzymatique des amines catalysées par une lipase immobilisée Novozyme 435 avec le diéthylmalonate comme donneur d'acyle par un processus sans solvant a été examiné par Uthoff et coll <sup>104</sup> (*Schéma 43*). La réaction à grande échelle (50 mmoles), conduisant à l'amide (*R*)-2 avec une conversion de 50%, un rendement de 43,5% et avec un excellent excès énantiomérique de produit  $ee_p = 99\%$ .



<u>Schéma 43</u>: Acylation enzymatique du phényléthylamine sans solvant.

Cette méthode, qui nécessite seulement un temps de réaction court (4h et demi), à ouvrir une perspective pour le développement d'un processus réalisable à grande échelle pour la synthèse énantiosélective catalysée par la lipase des amines chirales dans des conditions sans solvant utilisant le malonate de diéthyle comme donneur d'acyle.

La résolution cinétique enzymatique du *cis*-2-aminocycloheptane et de 2-aminocyclooctane sont effectuées avec la lipase *CAL-A* dans le diisopropyléther avec du 2,2,2-trifluoroéthyle butylate comme agent acylant, les deux énantiomères sont obtenus avec une énantiosélectivité élevée (E> 200). <sup>105</sup> (*Schéma 44*)



<u>Schéma 44</u> : Résolution cinétique enzymatique de cis-2-aminocycloheptane et 2aminocyclooctane.

<sup>&</sup>lt;sup>104</sup> F. Uthoff, A. Reimer, A. Liese, H. Gröger, *Sustainable Chemistry and Pharmacy.*, 2017, <u>5</u>, 42–45.
<sup>105</sup> Z. C. Gyarmati, A. Liljeblad, M. Rintola, G. Bernáth, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2003, <u>14</u>, 3805–3814.

#### III.5.3. Influence de la nature du solvant et co-solvant

Parmi les tests préliminaires sur une réaction de **DCE** : le choix de solvant reste une étude nécessaire pour améliorer la sélectivité lors de la résolution cinétique d'une enzymatique pour un substrat donné. La transestérification peut être contrôlée par la modification du solvant. La réversibilité de la réaction dépend généralement de la quantité d'eau présente dans le milieu organique. C'est pourquoi il est avantageux d'utiliser un milieu organique pauvre en eau. Toutefois, les solvants organiques employés doivent permettre à l'enzyme de conserver un degré d'hydratation suffisant car le retrait de la couche aqueuse vitale peut entraîner une désactivation complète de l'enzyme.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été réalisées pour comprendre l'effet du solvant sur la sélectivité des enzymes. Ces études montrent que, la nature du solvant et son hydrophobicité (représentée par les valeurs du log P) peuvent influencer la sélectivité du biocatalyseur. <sup>106</sup> Par ailleurs, *Klibanov* montre que la réactivité enzymatique dans un milieu organique pauvre en eau (milieu naturel des enzymes) peut s'amélioré. <sup>107</sup> La présence d'un excès de molécules d'eau (*wa*) autour du site actif lipasique peut engendrer une modification de la conformation de la lipase ce qui induit un inversement de l'énantiosélection et/ou réduire la sélectivité enzymatique. <sup>108</sup>

Par exemple, le (*S*)-Pindolol qui est **200 fois** plus active que le (*R*)-Pindolol. <sup>109</sup> C'est un médicament de type  $\beta$ -bloquant qui agit efficacement comme antiangineux, antihypertenseur et anti-arythmique ; <sup>110</sup> il est largement utilisé dans le traitement du glaucome. <sup>111</sup> Une synthèse chimioenzymatique du (*S*)-Pindolol a été décrite récemment par le groupe de **G.V.** Lima <sup>112</sup> par deux voies complémentaires, résolution cinétique par hydrolyse et acylation enzymatique en présence de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (*Schéma 45*).

<sup>&</sup>lt;sup>106</sup> (a) R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1991**, <u>2</u>, 931-938 ; (b) F. Srcundo, S. Riva, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1992**, <u>3(2)</u>, 267-280.

<sup>&</sup>lt;sup>107</sup> (a) G. Kirchner, M. P Scollar, A. M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc., 1985, <u>107</u>, 7072 ; (b) Réf46b: A. M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc., 1986, <u>108</u>, 2767-2768..

<sup>&</sup>lt;sup>108</sup> (a) Réf56: V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Cata B. Enz.*, 2006, <u>40</u>, 111-120 ; (b) R. N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis*. 2000, Dekker, New York; (c) Réf90a: P. Berglund, *Biomol. Engineering.*, 2001, <u>18</u>, 13-22.

<sup>&</sup>lt;sup>109</sup> R. Mehvar, D. R. Brocks, J. Pharm. Pharm. Sci., 2001, <u>4</u>, 185-200.

<sup>&</sup>lt;sup>110</sup> G. D. Plotnick, M. L. Fisher, J. H. Hamilton, B. P. Hamilton, Am. J. Med., 1983, <u>74</u>, 625-629.

<sup>&</sup>lt;sup>111</sup> G. D. Novack, Surv. Ophthalmol., **1987**, <u>31</u>, 307-327.

<sup>&</sup>lt;sup>112</sup> G. V. Lima, M. R. da Silva, T. de Sousa Fonseca, L. B. de Lima, M. da Conceic, F. de Oliveira, T. L. G. de Lemos, D. Zampieri, J. C. S. dos Santos, N. S. Rios, L. R. Barros Gonc, alves, F. Molinari, M. C. de Mattos, *Applied Catalysis A: General.*, **2017**, <u>546</u>, 7-14.



<u>Schéma 45</u> : Résolution cinétique enzymatique du **rac-a** par la réaction d'hydrolyse (**Voie a**) et du **rac-b** par la réaction d'acylation (**Voie b**).

Dans l'hydrolyse du rac-2-acétoxy-1-(1H-indol-4-yloxy)-3-chloropropane (**rac a**), le meilleurs résultats est enregistré dans le THF (**ees = 97%**, **eep = 96%**, **C = 50%**, **E > 200**). Cependant, son utilisation dans la réaction d'acylation du 2-acétoxy-1-(1H-indol-4-yloxy)-3-chloropropanol (**rac-b**) montre une diminution de l'activité enzymatique qui conduit à **2%** de conversion seulement, même si une sélectivité élevée **E > 200** (**entrée 2**) est conservée.

Cette étude montre que la synthèse chimioenzymatique du (S)-Pindolol par DCE était plus efficace dans l'hydrolyse plutôt que dans l'acylation enzymatique.

À titre d'illustration, les dérivés de 1,3-benzothiazoles sont des groupes extrêmement importants qui occupent une place prépondérante dans la chimie médicinale. Le groupe de **Borowiecki** a réalisé une étude sur le dédoublement cinétique de l'acétate 1-(1,3-Benzothiazol-2-ylsulfanyl)propan-2-yl ( $\pm$ )-1 : qui présente une activité antifongique en utilisant de la *Novozyme SP 435* comme biocatalyseur <sup>113</sup> (*Schéma 46*). Trois types de co-solvants : le PhMe, le DIPE et le TBME ont été expérimentés dans cette réaction. Le TBME a été le seul solvant approprié qui a permis la synthèse de l'alcool (*R*)-(+)-1a et l'acétate (*S*)-(-)-1 avec une haute sélectivité enzymatique.

<sup>&</sup>lt;sup>113</sup> P. Borowiecki, M. Fabisiak., Z. Ochal, *Tetrahedron.*, **2013**, <u>26(23)</u>, 4597-4602.



<u>Schéma 46</u>: Synthèse énantiosélective d'un dérivé de benzothiazoles.

## III.5.4. Influence d'additifs

Il est possible d'améliorer la sélectivité enzymatique d'une réaction de dédoublement de racémique par l'introduction d'additifs. Cet axe de recherche s'intéresse à l'étude de l'amélioration de la sélectivité et la réactivité enzymatiques par l'introduction d'additifs dans la réaction de DCE, et notamment les éthers couronnes, <sup>114</sup> ou les alcaloïdes. <sup>115</sup> A titre d'exemple, la réaction d'acylation du 2-hydroxyméthyl-1-phénylthioferrocène, alcool primaire à chiralité planaire <sup>116</sup> catalysée par la lipase de la *CRL* (*Schéma 47*) est améliorée par l'ajout d'un alcaloïde.



<u>Schéma 47</u>: Acylation lipasique d'un alcool ferrocènyl primaire à chiralité planaire.

<sup>&</sup>lt;sup>114</sup> **Réf90e:** M. Boukachabia, J-C. Fiaud, N. Mélais, M. Merabet, L. Aribi-Zouioueche, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, <u>17</u>, 185-194.

<sup>&</sup>lt;sup>115</sup> **Réf90e :** M. Merabet-Khalassi, L.Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron : Asymmetr.*, **2008**, <u>19(20)</u>, 2378-2384.

<sup>&</sup>lt;sup>116</sup> **Réf90e:** M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2008**, <u>19(20)</u>, 2378-2384.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant le toluène comme solvant organique, avec un contrôle de l'activité de l'eau dans le milieu par l'ajout du tamis moléculaire.

L'addition d'une amine aromatique achirale, la pyridine, lors de la réaction d'acylation enzymatique de  $(\pm)$ -2-(3,4-diméthoxyphényl)-5-hydroxy-2-isobutylpentanenétrile, avec l'acétate de vinyle en présence de la lipase de *Pseudomonas Fluoresces* (LAK), dans l'hexane, a jouée en faveur de l'énantiosélectivité. La sélectivité a passé de E= 16 à E= 335 en présence de la pyridine. <sup>117</sup> (*Schéma 48*)



<u>Schéma 48</u> : Hydrolyse enzymatique de (±)-2-(3,4-diméthoxyphényl)-5-hydroxy-2isobutylpentanenétrile.

## III.5.5. Influence de la température

La température est un paramètre sensible dans les réactions enzymatiques. Les marges de températures usuelles varient entre 25°C et 60°C. Chaque enzyme fonctionne le mieux à une température bien déterminée et voit son activité diminuer à des valeurs qui s'écartent de ce point. En fait, la température affecte le milieu réactionnel, sa viscosité, entraine l'activation ou la dénaturation de l'enzyme et influe également sur la solubilité des substrats et des produits.

Lorsque l'enzyme est dénaturée, son site actif perd sa forme et cesse de fonctionner à température élevée ou trop basse.

Dans le cas des lipases immobilisées qui sont plus robustes et supportent des températures de l'ordre de 100-120°C, il a été prouvé qu'elles sont plus sélectives à des températures relativement basses.<sup>118</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>117</sup> D. S. Im, C. S. Cheong, S. H. Lee, Bull. Korean Chem. Soc., 2005, <u>24</u>, 1269–1275.

<sup>&</sup>lt;sup>118</sup> (a) J. Ottosson, J. Rottici-Mulder, D. Rottici, K. Hult, *Protein Sci.*, 2001, <u>10</u>, 1769-1774; (b) T. Miyazawa, T. Yukawa, T. Koshiba, H. Sakamoto, S. Ueji, R. Yanagihara, T. Yamada, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2001, <u>12</u>, 1595-1602; (c) M. Persson, D. Costes, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Enzyme. Microb. Tech.*, 2002, <u>30</u>, 916-923; (d) D. Yu, Z. Wang, L. Zhao, Y. Cheng, S. Cao, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 2007, <u>48</u>, 64-69.

Souza *et coll* <sup>119</sup> ont montré que la lipase immobilisée *PS-C I*, garde une énantiosélectivité constante de 25°C à 50°C, et elle atteint la meilleure conversion entre 60°C et 70°C, et ce, lors du dédoublement cinétique par transestérification enzymatique du 1-phényléthanol (*Schéma 49*). La conversion est 31% à 25°C, en augmentant la température à 60°C la conversion atteint le seuil de 50%.



Schéma 49 : Influence de la température sur le DC du 1-phényléthanol par Amano PS-C I.

Schönstein et coll <sup>120</sup> ont étudié l'effet de la température sur le en DCE d'un alcool N-protégé (*R*, *S*)-1 ; cette réaction a été réalisée dans un système à reflux continu (*Schéma 50*). L'amino-alcool (*S*)-1 résultant et l'amino-ester (*R*)-2 sont obtenus avec un excès énantiomérique élevé (ee = 99%) à une conversion optimale de C=50% et une sélectivité E > 200. La variation de la température de 60°C à 40°C puis 25°C, fait apparaître une légère diminution de la conversion de 50% à 48% puis à 42%, respectivement tandis que la sélectivité est conservée (E > 200).



<u>Schéma 50</u> : Effet de la température dans l'acylation enzymatique de N-Boc-protection (6,7dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)methanol.

<sup>&</sup>lt;sup>119</sup> R. O. M. A. de Souza, O. A. C. Antunes, W. Kroutil, C. O. Kappe, J. Org. Chem., 2009, <u>74</u>, 6157–6162.

<sup>&</sup>lt;sup>120</sup> L. Schönstein, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2013, <u>24</u>, 202–206.

## III.5.6. Influence de l'agent acylant

La sélectivité des lipases dans l'acylation dépend également d'un autre paramètre important l'agent acylant. De nombreux exemples l'attestent et nous en présenterons certains dans cette partie.

L'exemple de la résolution cinétique d'un alcool primaire catalysé par la lipase *Amano PS*<sup>121</sup> montre l'influence de la longueur du radical de l'ester vinylique. La transestérification de l'alcool ( $\pm$ )-1 catalysée par la lipase *Amano PS* dans le cyclohexane est étudiée présence de deux agents acylants; le phénylpropanoate de vinyle 2b et l'AV 2a. L'allongement de la chaine amène la sélectivité d'une valeur de E=26 pour l'AV à E=145 pour le phénylpropanoate de vinyle. La synthèse de l'alcool 2-(4-méthylphényl)-6-heptene-1-ol et son acétate correspondant sous une forme optiquement active sont réalisés avec succès (*Schéma 51*).



<u>Schéma 51</u>: Transestérification du le vinyl-3-arylpropanoate.

Généralement, les énantiomères substrat non réagi et produit issus des DCE sont séparés par chromatographie sur colonne. L'utilisation d'agents acylants de type anhydrides d'acide est intéressant par la possibilité de récupérer les deux énantiomères par simple extraction liquide-liquide à l'issu de la réaction et d'éviter la chromatographie sur colonne. Ce type d'agent acylant est particulièrement attractif au niveau industriel pour la facilité de récupération des deux énantiomères et la diminution de l'utilisation des solvants en évitant la flash chromatographie.

<sup>&</sup>lt;sup>121</sup> M. Kawasaki, Y. Hayashi, H. Kakuda, N. Toyook, A. Tanaka, M. Goto, S. Kawabataa, T. Kometani, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2005**, <u>16</u>, 4065–4072.

Dans ce contexte, en **2004** <sup>122</sup> une l'influence significative de la nature de l'agent acylant a été montrée lors du dédoublement cinétique d'une série d'alcools benzyliques secondaires par transestérification avec des lipases. Trois types d'agent acylant ont été étudiés : AV, AI et AS et des différences importantes ont été montrées sur l'effet de la nature de l'AA avec différentes lipases. L'exemple le plus intéressant est celui d'un alcool hétérocyclique le 1- (quinolin-3-yl)éthanol avec la *CAL-B* où une sélectivité de E = 5 pour une conversion de C = 6%, est obtenue avec l'ai, en revanche, l'utilisation de l'anhydride succinique comme agent acylant permet de porter à C = 50% avec une sélectivité E = 85 (*Schéma 52*). Par ailleurs, l'utilisation de l'AS facilite la récupération des deux énantiomères qui a lieu par une simple extraction liquide-liquide.



<u>Schéma 52</u>: Transestérification du 1-(quinolin-3-yl)éthanol avec la CAL-B.

Les agents acylants <sup>123</sup> de type cyanoacétates d'alkyles ont également utilisés dans la résolution cinétique du 1-phényléthanamine 1 catalysée par la lipase *CAL-B* (*Schéma 53*). L'utilisation du 2-cyanoacétate d'éthyle a permis d'obtenir l'amide (*R*)-1 et l'amine (*S*)-2 avec 98% < ee < 99%, à une conversion de 50% et une sélectivité **E**>100.



<u>Schéma 53</u>: Résolution cinétique avec le 2-cyanoacétates d'éthyle comme agent acylant.

<sup>&</sup>lt;sup>122</sup> N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J.-C. Fiaud. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, <u>45</u>, 627-630.

<sup>&</sup>lt;sup>123</sup> P. Csuka, Z. Boros., L. Orfi, J. Dobos, L. Poppe, G. Hornyánszky, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2015**, <u>26(12–13)</u>, 644-649.

Les deux énantiomères ont été récupéré facilement après une extraction liquide-liquide [dichlorométhane et HCl (5%)] de la réaction. Le (R)-3 énantiomériquement enrichi a récupéré dans la phase organique ; tandis que l'énantiomère-(S) se trouve dans la phase aqueuse et après une saponification avec une solution NH<sub>3</sub> à 40% a donné lénantiomère (S)-phényléthanamine qui n'a pas réagi. Ces amides sont d'un grand intérêt, elles réagissent avec divers aldéhydes aromatiques par condensation de Knoevenagel pour donner les Tyrphostines qui sont des inhibiteurs de la protéine tyrosine kinase sur les lignées de cellules cancéreuses humaines.

#### III.6. Dédoublement cinétique et déracémisation

Le dédoublement cinétique est employé pour séparer les énantiomères d'un mélange racémique. Par conséquent, ce processus permet potentiellement d'obtenir séparément les deux énantiomères des composés ciblés avec un rendement maximal théorique de 50 %. Afin de parvenir jusqu'à 100 % de rendement du composé désiré et avec la même pureté énantiomérique ; il est possible de mettre en œuvre un processus qui s'appelle la « déracémisation ». Cette technique est amplement décrite dans la littérature depuis presque 20 ans.<sup>124</sup>

#### III.6.1. Principe de la déracémisation

La déracémisation est une méthode qui permet d'obtenir un seul énantiomère d'un mélange racémique avec un rendement optimal de 100%. Le recyclage de l'énantiomère indésirable après l'étape du dédoublement cinétique enzymatique est nécessaire, ce recyclage peut se faire via une racémisation (spontanée, catalysée par un catalyseur biologique ou chimique), par une stéréo inversion (réactif chimique ou biocatalyseur) ou par un autre type de déracémisation qui repose sur une séquence d'oxydoréduction cyclique. Toutes ces voies constituent les différents types de déracémisation qui seront développés ultérieurement. Donc c'est un processus qui intervient pour améliorer le rendement théorique d'un dédoublement cinétique classique (*Schéma 54*).

<sup>&</sup>lt;sup>124</sup> (a) H. Stercher, K. Faber, *Synthesis.*, **1997**, (<u>01</u>), 1-16; (b) U. T. Strauss, U. F. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1999**, <u>10</u>, 107-117; (c) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, <u>7</u>, 5005-5010; (d) N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology.*, **2003**, <u>14</u>, 401-406; (e) A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeeza, *Coordination Chemistry Reviews.*, **2008**, 569-592.



## <u>Schéma 54</u> : Principe d'une déracémisation.

Plusieurs méthodes de déracémisation sont décrites dans la littérature <sup>125</sup> consistent à aboutir à un seul énantiomère à partir d'un mélange racémique avec un rendement chimique théorique maximal :

- 1. Le dédoublement cinétique dynamique.
- 2. Le processus de stéréo inversion
- 3. La déracémisation par oxydoréduction cyclique.
- 4. Le dédoublement cinétique répété.
- 5. Le processus de l'énantioconvergence

Ces processus déracémisation se sont développés ces dernières années mais nous présenterons dans ce chapitre les deux premières méthodes qui ont été développées dans des travaux antérieurs de notre groupe de recherche.

## <u>Dédoublement cinétique dynamique (DCD)</u>

La combinaison de la résolution cinétique avec un processus de racémisation « *in situ* » conduit à une résolution cinétique dynamique ; cette voie permet au substrat de départ de se convertir en un seul énantiomère avec un rendement théorique proche de 100%. <sup>126</sup> (*Schéma* 55)

<sup>(</sup>a) J H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F G. Mutti, W. Kroutil, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2011, <u>15</u>, 249-256; (b) N J. Turner, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2010, <u>14</u>, 115-121; (c) R.Wohlgemuth, *Current Opinion in Microbiology.*, 2010, <u>13</u>, 283-292; (d) Y. Ahn, S-B. Ko, M-J. Kim, J. Park;Coordination, *Chemistry Reviews.*, 2008, <u>252</u>, 647-658, (e) B. Martín-Matute, J-E. Bäckvall, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2007, <u>11</u>, 226-232; (f) O. Pàmies, J-E. Bäckvall, *Trends in Biotechnology.*, 2004, <u>22</u>, 130-135; (g) N J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology.*, 2003, <u>14</u>, 407-413; (i) O. Pàmies, J-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* 2003, <u>103</u>, 3247-3262; (j) Réf124b: U T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1999, <u>10</u>, 107-117.

<sup>&</sup>lt;sup>126</sup> R. Noyori, M. Tokungaga, M. Kitamura, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1995, <u>68</u>, 36-56.



<u>Schéma 55</u> : Principe du dédoublement cinétique dynamique

Le dédoublement cinétique dynamique peut intervenir si ;

- Le substrat racémique de départ est rapidement racémisable dans les conditions de la réaction. Et cette racémisation peut être biocatalysée, réalisée chimiquement ou se produire spontanément *in situ*.
- > La racémisation au niveau du centre labile (Krac) doit être plus rapide que la consommation du substrat (K<sub>R</sub>, K<sub>S</sub>) : Krac > K<sub>R</sub>, K<sub>S</sub>.
- > Le réactif chiral doit être suffisamment sélectif vis à vis d'un des deux énantiomères du mélange racémique de départ :  $K_R >> K_S$ .
- La réaction doit être irréversible et les produits formés relativement stables dans les conditions de la réaction.

Le groupe **F. Javier Quijada** a développé une voie chimioenzymatique hautement efficace pour préparer des dérivés de *cis*-cyclopentane-1,2-diamine optiquement actifs catalysé par la lipase *CAL-B* (*Schéma 56*). L'acétamide optiquement actif correspondant est isolé avec de rendement élevé de 94% et une conversion C > 97.<sup>127</sup>



<u>Schéma 56</u> : Résolution cinétique dynamique du monocarbamate.

<sup>&</sup>lt;sup>127</sup> F. Javier Quijada, V. Gotor, F. Rebolledo, Org. Lett., 2010, <u>12(16)</u>, 3602-3605.

Nous citons un autre exemple du DCD réalisé par notre équipe de l'indanol en combinant la réaction d'acylation lipasique énantiosélective à une racémisation in situ par un complexe de ruthénium/Ligand. Le (*R*)-indényl acétate a été récupéré avec 98% d'excès énantiomérique. <sup>128</sup> (*Schéma* 57)



<u>Schéma 57</u>: Dédoublement cinétique dynamique du 1-indanol.

## <u>Le processus de stéréo inversion</u>

Ce processus basé sur l'inversion de configuration a fait l'objet de plusieurs travaux, notamment par notre équipe. Il consiste en deux étapes consécutives, la première est un dédoublement cinétique biocatalysé hautement énantiosélective (hydrolyse ou transestérification) suivi d'une réaction chimique dans laquelle il y aura une inversion de configuration de l'un des énantiomères (*Schéma 58*).



Schéma 58 : Déracémisation par stéréoinversion.

La réaction de Mitsunobu est la plus utilisées lors de ce processus pour la déracémisation des acétates et des alcools secondaires. <sup>129</sup> Notre équipe a étudié un processus de déracémisation par l'association du protocole de Mitsunobu à la réaction de dédoublement cinétique par transestérification et par hydrolyse lipasique d'une série d'alcools benzyliques secondaires

<sup>&</sup>lt;sup>128</sup> M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2011**, <u>22(18)</u>, 1790-1796.

 <sup>&</sup>lt;sup>129</sup> (a) O. Mitsunobu, M. Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1967, <u>40</u>, 2380; (b) E. Vanttinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1995, <u>6</u>, 1779-1786; (c) H. L. Liu, T. Anthonsen, Chirality., 2002, <u>14</u>, 25-27.

chiraux et leurs acétates correspondants. <sup>130</sup> Nous présentons l'exemple de la déracémisation de deux arylcarbinols, où les acétates correspondants de configuration (R), sont obtenus énantiopurs *via* l'acylation<sup>131</sup> lipasique et son antipode optique est obtenu énantiomériquement enrichi *via* une hydrolyse alcaline. Les énantiomères (R) et (S) sont récupérés avec de bons rendements chimiques (*Schéma 59*)



Schéma 59 : Déracémisation des alcools benzyliques par combinaison DCE/Mitsunobu.

## III.7. Conclusion

L'utilisation des lipases dans les réactions de **Dédoublement cinétique enzymatique** est une voie qui connait un développement important. Toutefois, une mise au point préalable est nécessaire afin de maîtriser les paramètres réactionnels et permettre que l'enzyme ait une sélectivité et réactivité optimales. Dans ce chapitre nous avons présenté de nombreux exemples de la littérature qui mettent en œuvre des lipases. L'utilisation des lipases dans ce type de réaction peut se faire notamment par l'acylation et/ou l'hydrolyse enzymatique afin d'accéder à des molécules énantiopures.

<sup>&</sup>lt;sup>130</sup> N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, *Catalysts.*, **2014**, <u>4(3)</u>, 215-225.

<sup>&</sup>lt;sup>131</sup> N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2006, <u>17(5)</u>, 797-800.

Nous avons présenté le mécanisme réactionnel de quelques biocatalyseurs et les facteurs qui influent sur la réactivité et la sélectivité : notamment, la nature de la lipase, du donneur d'acyle, du substrat, du solvant ou encore la température et la présence d'eau dans le milieu.

Ces études récentes permettent de mieux comprendre l'implication de la structure protéinique dans la reconnaissance des substrats et leur sélectivité.

L'utilisation dans la réaction d'acylation d'agent acylant spécifique tels que les anhydrides d'acides est un avantage pour une application à l'échelle industrielle. L'utilisation de l'anhydride succinique permet une séparation facile des deux énantiomères après la résolution enzymatique. Le développement de ces méthodes peut être très intéressante car leur mise en œuvre tient compte des divers principes de chimie verte. Nous avons également présenté quelques exemples qui développent des DCE suivis de méthodes de déracémisation. Cette optimisation du dédoublement cinétique permet d'accéder à un énantiomère unique avec un rendement maximal.

De nombreux travaux de notre laboratoire ont été présentés, ils constituent les résultats antérieurs récents du thème de recherche et une base à partir de laquelle nous avons développé ces travaux de thèse qui s'inscrivent dans la continuité. Les éléments présentés dans ce chapitre ont permis de mieux comprendre les paramètres réactionnels et structuraux qui intervient lors du « Dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de nouveaux substrats chiraux » afin d'aborder les études mise en œuvre dans ces travaux de thèse.

## Conclusion de la première partie

Cette première partie constitue une mise au point bibliographique consacré aux différents modes d'accès aux molécules chirales et plus précisément la voie du dédoublement cinétique enzymatique. L'usage d'enzymes offre une alternative valable aux réactifs conventionnels pour le contrôle de la chiralité dans les molécules organiques. La biocatalyse par des hydrolases permet le développement de méthodes de synthèse simples, efficaces et sécuritaires qui s'inscrivent totalement dans les principes de chimie verte. Cette nouvelle approche de la chimie impose de développer des procédés efficaces, sans perte d'atomes, avec des produits non toxiques, non dangereux, en utilisant des solvants verts et des catalyseurs recyclables. Les exemples présentés illustrent l'évolution des processus dans les méthodes d'accès aux molécules chirales. En chimie fine, le potentiel d'utilisation des biocatalyseurs est très important, qu'ils soient seuls ou combinés avec les catalyseurs chimiques classiques. Des synthèses énantiosélectives via des dédoublements cinétiques de racémique par biocatalyse ont été présentées par une variété de réactions récentes de la littérature. Cette voie est la plus sollicité pour la séparation des énantiomères et les réactions de transestérification et d'hydrolyse enzymatique sont les plus étudiés.

Cette mise au point sur le sujet permet de comprendre l'importance des conditions réactionnelles d'activation des enzymes. Nous avons montré que de nombreux paramètres influent sur la réactivité et la sélectivité des réactions enzymatiques tel que : la nature de l'enzyme, du solvant, de la température, l'effet du groupement partant ou de la nature de l'agent acylant. L'introduction des anhydrides d'acides comme agent acylant, par exemple, s'inscrit dans le contexte de la facilité de récupération des deux énantiomères après un dédoublement cinétique par une simple extraction liquide-liquide.

Dans ce contexte, l'utilisation de la biocatalyse, a aussi l'objectif d'effectuer des réactions de dédoublement enzymatique sélectives par acylation et déacylation dans des conditions qui répondent aux critères de la chimie verte.

**DEUXIÈME PARTIE** 

# ACCÈS AUX AXILLIAIRES ET SUBSTRATS NATURELS CHIRAUX

## Introduction de la deuxième partie

Le dédoublement cinétique enzymatique des racémiques est une voie alternative de synthèse très exploitée dans la production industrielle d'énantiomères purs via des procédés verts et respectueux de l'environnement. L'utilisation des lipases dans ce type de réactions a connu un essor considérable en raison de leurs très haute énantio-, régio et chimio-sélectivités et leurs applications sur un large éventail de substrats. Ces propriétés des lipases les rendent particulièrement intéressantes du point de vue industriel.

Dans cette deuxième partie, nous présentons les résultats de nos travaux de recherche qui concernent le dédoublement cinétique par deux approches acylation et déacylation enzymatique des alcools secondaires chiraux. Notre objectif est d'améliorer la sélectivité enzymatique dans ces réactions, et de comprendre l'effet des divers composants de la réaction (structure du substrat, solvant, agent acylant, additifs...) sur l'activité catalytique et la sélectivité des lipases en milieux dits « non-conventionnels ». Ce travail s'intègre dans la continuité des travaux de recherche de notre laboratoire.

Cette seconde partie est subdivisée en trois chapitres qui constituent l'ensemble des travaux de cette thèse de doctorat :

Un quatrième chapitre aborde le « Dédoublement cinétique d'un monoterpene: le menthol » qui a permis de réaliser un dédoublement cinétique d'un produit naturel « le menthol » par acylation avec des lipases. Différents paramètres pouvant moduler la réactivité et la sélectivité lipasiques sont examinés.

Un cinquième chapitre étudie le DCE de nouveaux substrats de type Whitesell, les arylcyclohexanols, sources chirales d'un intérêt considérable pour les transformations asymétrique. La séparation chirale est effectuée par deux approches complémentaires « Acylation/déacylation enzymatique des arylcyclohexanols ».

Un sixième chapitre consacré à l'étude de l'« Hydrolyse enzymatique des nouveaux esters aminés en milieu organique alcalin » avec comme substrat modèle : le 1-phényléthylester, cette étude est élargie ensuite sur des substrats de type aryl-alkyl-carbinols.

**DEUXIÈME PARTIE** 

## **QUATRIÈME CHAPITRE**

## DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE ENZYMATIQUE D'UN MONOTERPÈNE : LE MENTHOL

## IV.1. INTRODUCTION

Les terpènes sont des produits naturels présents particulièrement dans les plantes ; ce sont des hydrocarbures qui résultent de la combinaison de plusieurs unités isoprène. Ils peuvent être considérés comme des terpènes modifiés, avec des groupes méthyles et/ou des atomes d'oxygène ajoutés ou enlevés. Certains auteurs utilisent le terme « terpène » de façon plus large, en y incluant les terpénoides ; tout comme les terpènes, les terpénoïdes peuvent être classés selon leur nombre d'unités isoprène : <sup>132</sup> Monoterpénoïdes (2 unités isoprène) ; Sesquiterpénoïdes (3 unités isoprène) jusqu'aux Polyterpénoïdes avec un nombre plus important d'unités isoprène. Ils peuvent également être classés selon le nombre de structures cycliques qu'ils contiennent. <sup>133</sup> Plus de **30000** composés terpéniques ont été signalés et, malgré la similitude structurelle de beaucoup d'entre eux, leurs activités biologiques sont extrêmement diverses pour exemple, la puissance de anticancéreux de chaque texoïd (diterpénoïde) est différente et certains dérivés d'acyle naturels de triterpène glycosylé augmentent leur puissance antitumeur. <sup>134</sup>

## IV.2. Importance du substrat

Le menthol (*Figure 18*) est un composé organique cyclique appartient à la famille des alcools monoterpéniques ; il vient de l'huile essentielle de la menthe poivrée. <sup>135</sup> Ce composé aromatique est très important d'un point de vue industriel pour ses nombreuses propriétés bienfaisantes ; anti-inflammatoires et antivirales ou encore anesthésique local.



*Figure 18* : Le monoterpène menthol.

<sup>&</sup>lt;sup>132</sup> J. Gonzelez-Sbin, R. Moran-Ramallal, F. Rebolledo. Chem.Soc. Rev., **2011**, <u>40</u>, 5321-5335.

<sup>&</sup>lt;sup>133</sup> J. Gershenzon, R. Croteau, Secondary plant metabolites, 2E volume I: the chemical participants.

<sup>&</sup>lt;sup>134</sup> E. Breitmaier, Terpenes, Wiel-VCH Verlag GmbH, **2006**.

<sup>&</sup>lt;sup>135</sup> M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana, A. Ali. Drug Discovery Today, Numbers December 2007, <u>112</u>, 23/24.

L'énantiomère l-(-)-menthol a les meilleures performances organoleptiques alors que son antipode d-(+)-menthol n'a aucun goût. L'énantiomère l-(-)-menthol possède toute l'activité biologique, il est largement utilisé dans les industries des arômes et parfums, des aliments, des cosmétiques et des produits pharmaceutiques. <sup>136</sup>

**En médecine**, le menthol expose avec d'autre terpènes une activité inhibitrice des pathogènes fongiques d'origine alimentaire, <sup>137</sup> c'est aussi un constituant de produits médicaux tels que les médicaments contre le rhume, vapo-frottements, et les inhalations d'aromathérapie. Dans **l'industrie alimentaire**, c'est un additif aromatisant ou un composé de refroidissement qui se trouve dans une très large gamme de produits telle que les confiseries, bonbons, chewing-gum, dentifrices. <sup>138</sup> Il est ajouté dans les cigarettes pour son effet régulateur de la température corporelle. <sup>139</sup> Il est très important également dans l'industrie en tant qu'intermédiaire chiral.

Le menthol est l'un des produits le plus vendu au monde, sa demande mondiale est de **25 000** à **30 000** tonnes métriques par an, cela dépasse l'offre disponible et cette dernière ne cesse de croître. <sup>140</sup> Pour cela, l'obtention du *l*-(-)-menthol sous sa forme pure est une préoccupation importante sur le plan industriel, ce qui explique l'effort de recherche pour établir des voies efficaces pour le céder à une grande pureté. <sup>141</sup> Le *l*-(-)-menthol est obtenu synthétiquement via un certain nombre de voies. Parmi les voies décrites nous en citons deux :

Le procédé de Haarmann & Reimer/Symrise via l'hydrogénation du thymol. <sup>142</sup> Cette réaction génère un mélange de huit isomères : le (d) et (l)-menthol, le (d) et (l)-isomenthol, le (d) et (l)-néomenthol et le (d) et (l)-néoisomenthol (Schéma 60). Récemment, la lipase

<sup>&</sup>lt;sup>136</sup> (a) R. Eccles, Menthol and related cooling compounds., J. Pharm. Pharmacol. 1994, 46; (b) N. Galeotti, L. M. Di Cessani, Mannelli, G. Mazzanti, A. Bartolini, C. Ghelardini, Neurosci. Lett., 2002, <u>322</u>, 145–148; (c) Brenna, E., Fuganti, C., Serra, S. Comptes Rendus Chimie., 2003, <u>6(5)</u>, 529-546; (d) E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, Chemical reviews., 2011, <u>111(7)</u>, 4036-4072.

<sup>&</sup>lt;sup>137</sup> S. Abbaszadeh, A. Sharifzadeh, H. Shokri, A.R. Khosravi, A. Abbaszadeh, *Journal de Mycologie Médicale.*, **2014**, <u>24(2)</u>, 51-56.

<sup>&</sup>lt;sup>138</sup> (a) M. Kamal, N. Iimura, T. Nabekura, S. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, <u>54</u>, 481 ; (b) M. Minato, T. Kaneko, S. Masauji, T. Ito, *J. Organomet. Chem.*, **2006**, <u>691</u>, 2483. (c) Z. Schelz, J. Molnar, J. Hohmann, *Fitoterapia.*, **2006**, <u>77</u>, 279-285.

<sup>&</sup>lt;sup>139</sup> D. N. Ruskin, R. Anand, G. J. LaHoste, European Journal of Pharmacology., 2007, <u>559</u>,161–164.

<sup>&</sup>lt;sup>140</sup> New Process for Menthol Production, *ChemistryViews*. **30 June 2012**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, BASF SE Ludwigshafen, German.

<sup>&</sup>lt;sup>141</sup> (a) M. McCoy, *Chem Eng News.*, **2010**, <u>88(35)</u>, 30 ; (b) R. A. Sheldon. *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press, **1993** ; (c) R. Noyori, Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture), *Angewandte Chemie International Edition.*, **2002**, <u>41(12)</u>, 2008-2022.

<sup>&</sup>lt;sup>142</sup> D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L.H. Steenkamp, A.L. Rousseau, C.J. Parkinson, J. Chaplin, R.K. Mitra, T. Moutlana, S.F. Marais, N.S. Gardiner, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2012**, <u>75</u>, 1–10.
*Stenotrophomonas maltophilia SML* a été choisie comme biocatalyseur potentiel pour l'acylation diastéréosélective du *l*-menthol.<sup>143</sup>



Schéma 60 : Synthèse du menthol à partir de l'hydrogénation de thymol.

• Un autre processus synthétique du *l*-(-)-menthol est le processus de Takasago (*Schéma 61*). <sup>144</sup> Cette synthèse stéréosélective à partir du myrcène utilise une synthèse asymétrique catalysée par le complexe Rh-BINAP comme étape clé (étape 1). Après cette étape, le (+)-citronellal est transformé en (-)-menthol. Cette transformation est réalisée par cyclisation du (+)-citronellal en (-)-isopulegol (étape 2) suivie d'une simple hydrogénation asymetrique (étape 3).



<u>Schéma 61</u> : Synthèse du (-)-menthol à partir du Myrcène utilisée par Takasago.

<sup>&</sup>lt;sup>143</sup> M. Li, L-R. Yang, G. Xu, J-P. Wu, *Biochemical Engineering Journal.*, **2016**, <u>109</u>, 81–87.

<sup>&</sup>lt;sup>144</sup> (a) H. Mimoun, *Chimia.*, **1996**, <u>50</u>, 620 ; (b) S. Akutagawa, *Appl. Catal. A.*, **1995**, <u>128</u>, 171-207 ; (c) J-P. Genet, *l'actualité chimique.*, **2003**, 25-33.

Un autre moyen efficace pour obtenir le *l*-(-)-menthol sous sa forme optiquement actif est le processus biocatalytique. <sup>145</sup> La résolution cinétique enzymatique des racémates est l'un des modes pratiques pour la séparation des deux énantiomères, en particulier ceux qui utilisent des lipases (EC3.1.1.3) qui sont stables, moins chers, efficaces, ne nécessitent pas de cofacteurs et montrent des effets chimio, régio- et énantiosélectivité vis-à-vis d'un large panel de substrats, en particulier les alcools secondaires. <sup>146</sup>

#### IV.3. Mise au point bibliographique

De nombreux travaux de recherche sont consacrés à l'étude de la résolution cinétique du *dl*menthol en utilisant des lipases. Dans les données de la littérature rapportée, les lipases libres ne présentent pas une bonne réactivité ou sélectivité et c'est l'utilisation de lipases immobilisées qui améliore généralement l'efficacité des diverses lipases libres disponibles dans le commerce. La majorité des résolutions cinétiques décrites exploitent la lipase *Candida rugosa (CRL)* immobilisée sur plusieurs supports dans des réactions d'estérification, de transestérification ou d'hydrolyse. Dans ce contexte nous présentons ci-dessous quelques exemples de DCE du menthol racémique en employant des lipases.

Le (-)-menthol énantiomériquement enrichi est synthétisé par l'hydrolyse énantiosélective du  $(\pm)$ -benzoate de menthyle commerciale <sup>147</sup> catalysée par la lipase *CRL* dans une solution tampon à 40°C. (*Schéma 62*)

<sup>&</sup>lt;sup>145</sup> (a) S. Serra, C. Fuganti, E. Brenna, *TRENDS in Biotechnology*. 2005, <u>23(4)</u>, 193-198; (b) H. Itoh, H. Maeda, S. Yamada, Y. Hori, T. Mino, M. Sakamoto, *Organic Chemistry Frontiers*. 2014, <u>1(9)</u>, 1107-1115; (c) (Réf:142a) D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L.H. Steenkamp, A.L. Rousseau, C.J. Parkinson, J. Chaplin, R.K. Mitra, T. Moutlana, S.F. Marais, N.S. Gardiner, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012, <u>75</u>, 1–10; (d) M. Li, L.R. Yang, G. Xu, J.P Wu, *Biochemical Engineering Journal*. 2016, <u>109</u>, 81-87; (e) S. Serra, E. Brenna, C. Fuganti, F. Maggioni, *Tetrahedron: Asymmetry*. 2003, <u>14(21)</u>, 3313-3319; (f) L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X. Yu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2017, <u>47(3)</u>, 149-154.

<sup>&</sup>lt;sup>146</sup> (a) G. Grogan, *Biotransformations, Ann. Rep. Prog. Chem. Sect B: Org. Chem.* **2013**, <u>109</u>, 15-42; (b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2005**; (c) K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 6<sup>th</sup> ed. **2011**; (d) A. Mehta, U. Bodh, R. Gupta, *Fungal lipases: a review. Journal of Biotech Research.* **2017**, <u>8</u>, 58-77.

<sup>&</sup>lt;sup>147</sup> S. Vorlová, U. T. Bornscheuer, I. Gatfield, J. M. Hilmer, H. J. Bertram, R. D. Schmid. *Advanced Synthesis & Catalysis.* **2002**, <u>344(10)</u>, 1152-1155.



Schéma 62 : Résolution cinétique du dl-menthyl benzoate catalysé par la CRL.

Après 8h, la lipase recombinante de la *CRL* a montré une sélectivité élevée **E** >100 tandis que la forme libre du *CRL* a présenté une faible sélectivité **E** = 14. Les mêmes résultats ont été obtenus récemment en utilisant l'esterase de *Bacillus subtilis BSE* <sup>148</sup> pour l'hydrolyse énantiosélective de *dl*-menthyl benzoate.

Une autre type d'immobilisation de la *CRL* s'est révélée être plus approprié dans la transestérification du (R, S)-menthol <sup>149</sup> avec de l'acétate de vinyle dans le toluène (*Schéma* 63).



<u>Schéma 63</u> : Résolution cinétique du menthol racémique en présence de la lipase Candida rugora AYL.

Les résultats ont montré que lorsque la réaction est effectuée à  $35^{\circ}$ C dans le toluène, la lipase immobilisée (*AYL*) est plus active que la forme libre de la *CRL*. Toutefois, une conversion maximale de C =33.6% est enregistrée avec la lipase immobilisée.

<sup>&</sup>lt;sup>148</sup> Y. Gong, G-C. Xu, Q. Chen, J-G. Yin, C-X. Li, J-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, <u>6</u>, 2370-2376.

<sup>&</sup>lt;sup>149</sup> J. C. D. Silva, M. D. G. Nascimento, Journal of the Brazilian Chemical Society., 2016, <u>27(12)</u>, 2226-2233.

D'autres travaux ont été menées sur la résolution du *dl*-menthol avec la forme libre de la lipase *Candida cylindracea* (*CCL*) et l'énantiodiscrimination affichée par les lipases de *CCL* (Sigma Type VII) et *CRL* (Sigma Type VII et Amano AY) était généralement modérée. <sup>150</sup> Pourtant, ces lipases hydrolytiques sont les plus couramment utilisées en raison de leur activité élevée et de leurs effets non génotoxiques ou cancérigènes sur la santé humaine. <sup>151</sup> Pour cette raison, l'espèce est généralement considérée comme sûre (elle a le statut GRAS), et classée à un niveau biologiquement sûr. <sup>152</sup> La *CCL* (même source que la *CRL*) a également été étudiée sous la forme immobilisée en résolution cinétique du (±)-menthol via l'estérification <sup>153</sup> et la transesterification, <sup>154</sup> Plus récemment pour la réaction d'estérification entre le *1*-octanol et les trois dérivés de l'acide butyrique dans les systèmes sans solvant à faible teneur en eau. <sup>155</sup>

Un système spécifique a été utilisé par **Lijuan Yu** <sup>156</sup> pour l'hydrolyse enzymatique du *dl*menthyl acétate. La réaction a été effectuée dans un mélange d'une solution tampon/DMSO catalysée par une lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 dans une cellule entière à 30°C (*Schéma 64*).



Schéma 64 : Hydrolyse du dl-menthyl acétate par la lipase BCL (cellule entière).

Cette étude montre que le *l*-menthol a été obtenu dans ce système avec une pureté optique de 96%, une conversion optimale de 50% et une sélectivité E=170 lorsque 15% du co-solvant

<sup>155</sup> T. Kuroiwa, K. Hamazaki , M. Katayama, S. Sato, T. Matsui, *Process Biochemistry.*, **2016**, <u>51(12)</u>, 2047-2054.

<sup>&</sup>lt;sup>150</sup> Z. Lü, Y. Chu. Y. Han, Y. Wang, J. Liu. *Journal of chemical technology and biotechnology.*, **2005**, <u>80(12)</u>, 1365-1370.

<sup>&</sup>lt;sup>151</sup> J. N. Trbojević, A. S. Dimitrijević, D. V. Veličković, M. Gavrović-Jankulović, N. B. Milosavić. *Hemijska industrija.*, **2013**, <u>67(5)</u>, 703-706.

<sup>&</sup>lt;sup>152</sup> (a) S. Benjamin, A. Pandey, *Yeast.*, **1998**, <u>14</u>, 1069–1087 ; (b) M. T. Flood, M. Kondo. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **2001**, 33, 157–164.

<sup>&</sup>lt;sup>153</sup> W-H. Wu, C. C. Akoh, RS. Phillips, Enzyme and Microbial Technology., 1996, <u>18</u>, 538-539.

<sup>&</sup>lt;sup>154</sup> C. J. Gray, J. S. Narang, S. A. Barker, *Enzyme and microbial technology.*, **1990**, <u>12(10)</u>, 800-807.

<sup>&</sup>lt;sup>156</sup> L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X. Yu, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic., 2007, <u>47</u>, 149–154.

DMSO a été ajouté. L'énantiosélectivité était environ trois fois plus élevée que celle sans cosolvant.

Les lipases mentionnées ci-dessus sont les lipases les plus populaires dans la résolution du  $(\pm)$ menthol, toutefois en général le DCE de ce substrat avec les lipases les plus accessibles présentent des sélectivités décevantes.<sup>157</sup> A notre connaissance, aucune étude n'a été rapportée sur l'action d'additifs sur la réactivité et la sélectivité des lipases pour ce substrat. Notre étude porte sur l'examen de l'effet d'additifs pour améliorer la sélectivité du DCE du menthol.

#### IV.4. Dédoublement cinétique par acylation enzymatique du Menthol

Vu l'importance du menthol sur le marché et l'utilisation des biocatalyseurs comme outil pour obtenir le (-)-menthol. Nous avons étudié le DCE du menthol par transestérification avec diverses lipases, peu onéreuses et disponibles dans le commerce. Des paramètres de la réaction de DC par acylation enzymatique du *dl*-menthol sont étudiés tels que : la nature des lipases et le taux catalytique, les donneurs d'acyle, l'hydrophobicité du solvant ainsi que l'introduction de plusieurs additifs (*Schéma 65*). L'utilisation d'additifs pour améliorer les sélectivités et la réactivité des lipases n'est pas nouvelle, cette alternative a été utilisée dans des travaux précédents et a montré que l'activité de certaines lipases en résolution cinétique pouvait être fortement influencée par des additifs de type alcaloïdes. <sup>158</sup> Dans ce contexte, nous avons envisagé l'étude d'additifs de type alcaloïdes ainsi que d'autre type d'additifs comme des bases organique ou minérales.



<u>Schéma 65</u> : Réaction d'acylation enzymatique du (dl)-menthol.

<sup>&</sup>lt;sup>157</sup> (**Réf153**) W-H. Wu, C. C. Akoh, RS. Phillips, *Enzyme and Microbial Technology.*, **1996**, <u>18</u>, 538-539.

<sup>&</sup>lt;sup>158</sup> M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2008**, <u>19</u>, 2378-2384.

#### IV.4.1. <u>Résultats et discussion</u>

L'acétate de menthyle racémique est obtenu par une acylation chimique du menthol racémique qui a lieu en présence d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), de la triéthylamine ( $Et_3N$ ) et de l'anhydride acétique ( $Ac_2O$ ) dans l'éther diéthylique anhydre, selon le schéma réactionnel suivant :



Schéma 66 : Synthèse de l'acétate de menthyle racémique.

L'acétate de menthyle racémique **1a** est obtenu avec un bon rendement chimique, **Rdt = 95%**, et les caractéristiques structurales sont établies par les méthodes spectroscopiques : la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H) et la résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN 13C).

Pour mener cette étude nous avons sélectionné quatre lipases d'origine microbienne, la *Candida antarctica B (CAL-B)*, la *Pseudomonas cepacia (PCL)* ou PS Amano, la *Candida cylindracea (CCL)* fournie par *Fluka*, la *Candida rugosa (CRL type VII*, ATCC14830) fournie par *Sigma* et une lipase d'origine animale, la **lipase** *pancréatique de porc* **type II** *PP*. Les caractéristiques de ces lipases sont détaillées dans le tableau 3.

Entrée	Nom de la lipase	Nature	Activité lipasique
1	Candida antarctica B (CAL-B)	Immobilisée sur résine acrylique	>10000 U/g
2	<i>Pseudomonas cepacia (PCL)</i> ou PS Amano	Forme libre	>30000 U/g
3	<i>Candida cylindracea (CCL)</i> fournie par <i>Fluka</i> ,	Forme libre	2.8 U/g
4	Candida rugosa (CRL type VII, ATCC14830) Sigma,	Forme extra-purifiée de la <i>CCL</i>	1170 U/mg
5	Pancréatique de porc type II PPL	Forme libre	100-500 U/mg

**<u>Tableau 3</u>**: Lipases utilisées lors de la transestérification du *dl*-menthol.

Lors de l'étude de la résolution du *dl*-menthol nous avons choisis deux types d'agents acylants: des esters d'énols et un anhydride d'acide (*Figure 19*).



Figure 19 : Choix des agents acylants lors de DE du dl-menthol.

Les deux esters d'énols choisis sont : l'acétate de vinyle (**AV**) et l'acétate d'isopropényle (**AI**). Ce type de donneurs d'acyles assure l'irréversibilité de cette réaction, ce sont les agents acylation les plus largement employés pour le dédoublement des alcools racémiques. L'anhydride succinique (**AS**) : cette alternative d'utilisation des anhydrides d'acides présente l'avantage de la récupération facile des énantiomères par une simple extraction liquide-liquide.

#### - Etude de la nature et de la quantité d'enzyme

Lors de cette étude, on a testé l'influence de l'activité hydrolytique de différentes sources de lipases disponibles commercialement, ainsi que la charge catalytique optimale lors de l'acylation du *dl*-menthol **1** en utilisant l'AI comme donner d'acyle ; les réactions sont réalisées dans l'Et<sub>2</sub>O en présence et en absence du tamis moléculaire 4Å, afin de réguler l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel. Les conversions et les excès énantiomériques des acétates obtenus **1a** et des alcools restants **1** sont déterminés par chromatographie gazeuse chirale (GC) après leur séparation par flash chromatographie. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau 4.

Diverses lipases sont employées dans la transestérification du *dl*-menthol avec l'AI dans l'Et<sub>2</sub>O, seules la *CRL* et la *CCL* sont actives et sélectives (tableau 4) 38.5% > C > 54% et E > 200. Les lipases provenant de sources telles que la *PCL*, la *PPL* et la *CAL-B* sont totalement inactives même après un temps de réaction prolongé (entrée 1-5). D'autre part, les expériences réalisées avec et sans tamis moléculaire montrent un effet particulièrement intéressant de ce dernier sur l'activité lipasique.

L'augmentation de la quantité de la *CRL* est clairement en défaveur de la réactivité lipasique sans perturbation du facteur de sélectivité (E > 200) (**entrées 6, 8 et 10**), la conversion diminue de C = 41% à C = 17% lorsque la quantité du *CRL* passe de 150 mg à 200 mg respectivement (**entrée 8 vs 6**). La même observation a été faite dans une étude précédente sur l'influence de la quantité de *CCL* au cours de l'acylation du ferrocényléthanol. <sup>159</sup> L'explication est qu'une faible quantité de lipase met en jeu une faible quantité d'eau qui ne perturbe par le DCE de l'alcool racémique. Au contraire, une forte quantité de lipase apporte une quantité plus importante d'eau ce qui provoque une compétition entre l'alcool et l'eau pour la déacylation de la lipase. Une diminution importante de la réactivité de la *CRL* est observée par l'introduction du tamis moléculaire lorsque des quantités de 150 mg et 100 mg sont utilisées (**entrée 9 vs 8 et 11 vs 10**), cet effet est fortement diminué à 200 mg de *CRL* (**entrée 7 vs 9 et 11**).

<sup>&</sup>lt;sup>159</sup> **Réf90e:** M. Boukachabia, J-C. Fiaud, N. Mélais, M. Merabet, L. Aribi-Zouioueche, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, <u>17</u>, 185-194.

**Tableau 4** : Transestérification du dl-menthol en présence et en absence du tamis moléculaires4Å : Influence de la lipase.

$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$							
Entrée	Lipase <sup>a</sup> (mg)	MS4Å (mg)	Agent acylant	(-)-1a ee <sub>s</sub> % <sup>f</sup> (Rdt%) <sup>h</sup>	(+)-1 eep % <sup>f</sup> (Rdt%) <sup>h</sup>	C(%) <sup>g</sup>	E <sup>g</sup>
1	PCL (80)			-	-	NR	
2	PPL (100)	a a m a b		-	-	NR	-
3	CAL-B (200)	sans		-	-	NR	-
4	CAL-B (150)			-	-	NR	-
5	CAL-B (100)			-	-	NR	-
6	CPL(200)	sans <sup>b</sup>	-	20 (69)	>99 (10)	17	>200
7	CKL(200)	avec <sup>c</sup>		31 (61)	98 (18)	24	>100
8	CDI (150)	sans <sup>b</sup>		<b>68 (42)</b>	>99 (33)	41	>200
9	CRL(150)	avec <sup>c</sup>		31 (62)	97 (20)	24	89
10	CDI (100)	sans <sup>b</sup>	IA	62 (45)	>99 (30)	38.5	>200
11	CKL (100)	avec <sup>c</sup>		9 (ND)	>99 (ND)	8.3	>200
12	CCL(200)	sans <sup>b</sup>	-	54 (35)	98 (28)	35.5	>100
13	CCL (200)	avec <sup>c</sup>		56 (30)	98 (28)	36.4	>100
14	CCL(150)	sans <sup>b</sup>		44 (53)	98 (25)	31	>100
15	UUL(130)	avec <sup>c</sup>		43 (54)	98(23)	31	>100
16		sans <sup>b</sup>	-	39 (64)	>99 (14)	28	>200
17 <sup>d</sup>	CCL(100)	54115		66 (38)	>99 (32)	40	>200
18		avec c	_	39 (64)	>99 (14)	28	>200
19 <sup>d</sup>		avec		51 (40)	>99 (19)	34	>200

a. Lipase *Pseudomonas cepacia* Amano (>30000 U/g), lipase *Candida rugosa* type VII (1170 U/mg), lipase *Pancréatique de Porc* type II (100-500 U/mg), lipase *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique *CAL-B* (>10000 U/g). Lipase *Candida cylindracea* (2.8U/g). **b**. 1 mmole du *rac*-menthol, 3 mmoles d'acétate isopropényle, 2mL d'Et<sub>2</sub>O à température ambiante durant 24h, en présence de la lipase. **c**. Avec le tamis moléculaire (4 Å) (20mg). **d**. temps de réaction 48h. **f**. Les excès Énantiomériques sont mesurés par la GC chiral. **g**. Conversion :  $C=ee_S/ee_P+ee_s$ ; Sélectivité: E =Ln [(1-C) (1-ee<sub>(S)</sub>)]/Ln [(1-C) (1+ee<sub>(S)</sub>)]<sup>160</sup> **h**. Rendement trouvé après séparation du flash chromatographie. \***NR**. Pas de réaction.

<sup>&</sup>lt;sup>160</sup> Réf71,72: (a) C. S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, **1988**, <u>18</u>, 249-330.

Cependant, la présence du tamis moléculaire n'a pas un effet significatif sur la réactivité et la sélectivité de la *CCL*. La diminution de la quantité de lipase conduit à une optimisation de l'avancement d'acylation sans affecter la sélectivité (**entrées 12, 14, 16** par rapport aux **entrées 13, 15, 18**).

Dans cette étude, toutes les réactions enzymatiques sont déroulées au bout de 24 heures à température ambiante. On constate que la prolongation du temps avec la *CCL* et en absence du tamis moléculaire améliore la conversion qui passe de C = 28% à C = 40% et l'excès énantiomérique de l'alcool restant de ee<sub>s</sub> = 39% et ee<sub>s</sub> = 66% (entrée 17, 19) avec une haute sélectivité E > 200. Les lipases *CRL* et *CCL* utilisées sont commerciales et acquises auprès de deux fournisseurs différents, elles sont supposées se différencier uniquement par leur activité hydrolytique, cependant nous avons trouvé que seul la *CRL* est fortement influencé par l'addition du tamis moléculaire. Ce fait est probablement dû à la perturbation de la répartition moléculaire de l'eau ainsi qu'à la réduction de sa présence dans le milieu organique qui semble nécessaire pour la *CRL*. Ce résultat confirme des études <sup>161</sup> précédentes qui note la nécessité d'ajouter de l'eau pour améliorer la conversion de la *CRL*, et ce, même dans le cas de la lipase immobilisée. Les deux lipases *CRL* et *CCL* sont spécifiques du (*IR*, *2S*, *5R*)-1a, la configuration absolue de ce composé est bien connue et c'est l'énantiomère du *l*-menthyl acétate qui est obtenu.

En raison de la sensibilité de la forme libre de la *CRL*, **la** *CCL* est sélectionnée, elle est moins chère, plus stable et peu étudiée pour la résolution du *dl*-menthol, <sup>162</sup> le taux catalytique appropriée sélectionné pour la suite de l'étude est de m = 100 mg (280U).

#### - Etude de la nature et de l'agent acylant

La mise au point du taux catalytique est réalisée en utilisant l'AI lors de la réaction de transestérification du *dl*-menthol. Les autres agents acylants : l'AV et l'AS sont introduits dans les conditions optimisées. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 5.

<sup>&</sup>lt;sup>161</sup> (a) D. L. Wang, A. Nag, G. C. Lee, J. F. Shaw, *J. Agricul. Food Chem.*, **2002**, <u>50(2)</u>, 26 ; (b) S. Bai, Z. Guo, W. Liu, Y. Sun, *Food Chemistry.*, **2006**, <u>96</u>, 1–7.

<sup>&</sup>lt;sup>162</sup> (Ref150): Z. Lü, Y. Chu, Y. Han, Y. Wang, J. Liu, J. Chem. Technol. Biotechnol., 2005, <u>80(12)</u>, 1365-1370.

<u>**Tableau 5**</u> : Influence de l'agent acylant sur la transestérification du dl-menthol avec et sans tamis moléculaires 4Å.

$\begin{array}{c c} & & & \\ \hline \hline & & \\ \hline & & \\ \hline & & \\ \hline \\ \hline$								
Entrée	MS4Å (mg)	Agent acylant	$ee_{s}\%^{e}(Rdt\%)^{g}$	$ee_P \%^f (Rdt\%)^h$	C(%) <sup>f</sup>	$\mathbf{E}^{\mathbf{f}}$		
1	sans <sup>a</sup>		39 (64)	>99 (14)	28	>200		
2 °	Sans	ΔΙ	66 (38)	>99 (32)	40	>200		
3	avec <sup>b</sup>		39 (64)	>99 (14)	28	>200		
4 <sup>c</sup>	avee		51 (40)	>99 (19)	34	>200		
5	sans <sup>a</sup>	ΔV	64.4 (42)	95.2 (32)	40.3	80		
6	avec <sup>b</sup>		63.7 (38)	95.2 (30)	40	80		
7 <sup>d</sup>	sans	AS	25 (39)	53 (19)	32	4		

*a*. Conditions de réaction : 1 mmole de *rac*-menthol, 3 mmoles d'ester d'énol (IA ou AV), dans 2mL d'Et<sub>2</sub>O, à température ambiante durant 24 heures, en présence de 100mg de la lipase *CCL*. **b**. avec tamis moléculaire (4 Å) (20mg). **c**. temps de réaction 48h. **d**. 1 mmole du *rac*-menthol, 1 mmole d'anhydride succinique, 2mL d'Et<sub>2</sub>O durant 24h. **e**. L'excès énantiomérique des énantiomères est mesuré par GC chiral. **f**. Conversion : C=ee<sub>S</sub>/ee<sub>P</sub>+ee<sub>s</sub>; Sélectivité : E = Ln [(1-C) (1-ee<sub>(S)</sub>)]/Ln [(1-C) (1+ee<sub>(S)</sub>)]. <sup>163</sup> **g**. Rendement retrouvé après séparation par flash chromatographie. \***NR**. Pas de réaction. \***ND**. Non déterminé.

Avec l'AV, l'acétate de (-)-menthyle **1a** est récupérée avec 95% ee à 40% de conversion avec et sans tamis moléculaire, mais avec une légère diminution de la sélectivité de E > 200 à E = 80(**entrées 5-6**). D'autre part, une chute notable de la sélectivité est montrée en utilisant l'AS comme donneur d'acyle E = 4, indépendamment de la réactivité C = 32% (**entrée 7**). Ces résultats montrent que dans la réaction de transestérification du *dl*-menthol seuls les agents acylants de type esters énols (**AI et AV**) implique une haute sélectivité de **la lipase** *CCL* vis à vis du substrat.

#### - Etude de solvant

Sachant que l'énantiosélectivité des lipases dépend fortement de la polarité des solvants ; l'étude de la nature de solvant est réalisée avec les deux esters d'énols pour lesquels la réaction de dédoublement catalysée par la *CCL* est sélective. Pour ce faire, et dans les mêmes conditions, cinq solvants organiques avec différentes valeurs de LogP sont utilisés : le tétrahydrofurane

<sup>&</sup>lt;sup>163</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

(THF), l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O), le diisopropyléther (DIPE), le tertiobutylméthyléther (TBME) et l'heptane. Toutes les expériences sont réalisées sans tamis moléculaire pendant 48 heures. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Influence d'ester énol/solvant lors de la résolution du *dl*-menthol catalysée par la *CCL*.

$\frac{CCL, \text{ Ester d'enol}}{OH} \xrightarrow[(-)-1a]{} \xrightarrow[(+)-1]{\overline{CCL, \text{ Ester d'enol}}} \xrightarrow[(-)-1a]{} \xrightarrow[(+)-1]{} \xrightarrow[(+)-1]{$							
Entrée	Ester enol <sup>a</sup>	Solvant (logP)	$ee_S\% b (Rdt\%) d$	$ee_P\% \ ^b(\mathbf{Rdt}\%) \ ^d$	C(%) °	E <sup>c</sup>	
1		THF (0.48)	14 (55)	>99 (7)	12	>200	
2		Et <sub>2</sub> O (0.85)	64 (42)	95 (32)	40	76	
3	AV	<b>TBME</b> (1.35)	54 (36)	>99 (29)	35	>200	
4		DIPE (1.4)	69 (46)	91 (36)	43	44	
5		Heptane (4)	48 (40)	>99 (25)	33	>200	
6		THF (0.48)	3 (ND)	>99 (ND)	3	>200	
7		Et <sub>2</sub> O (0.85)	66 (38)	>99 (32)	40	>200	
8	AI	TBME (1.35)	4 (ND)	>99 (ND)	4	>200	
9		DIPE (1.4)	34 (ND)	>99 (ND)	26	>200	
10		Heptane (4)	4 (ND)	>99 (ND)	4	>200	

**a.** Conditions de réaction : 1 mmol *rac*-menthol, 3 mmoles ester d'énol, 2mL de solvant, à température ambiante durant 48 heures, en présence de 100 mg de *CCL* (**280U**). **b.** L'excès énantiomérique des énantiomères sont mesurés avec la GC chirale. **c.** Conversion :  $C=ee_S/ee_P+ee_s$ ; Sélectivité :  $E = Ln [(1-C) (1-ee_{(S)})]/Ln [(1-C) (1+ee_{(S)})]^{164}$  **d.** Rendement isolé après une séparation par flash chromatographie. \*ND: non déterminé.

Les résultats du tableau 6 montrent que les taux de conversion et les facteurs de sélectivité enregistrés dépendent de la nature de l'ester d'énol et du solvant utilisés. La *CCL* maintient une sélectivité élevée dans les cinq solvants en utilisant l'AI comme donneur d'acyle (E > 200), la meilleure conversion est obtenue dans l'Et<sub>2</sub>O C = 40% (**entrée 7**). Par ailleurs, un effet de dénaturation de cette lipase est noté avec l'AI dans le THF, le TBME et l'heptane. Où le taux

<sup>&</sup>lt;sup>164</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

de conversion n'excède pas 4% (**entrées 6, 8 et 10**) et une perte de réactivité dans DIPE C = 26% (**entrée 9**). On peut conclure que, dans ce cas, la nature du solvant organique avec l'AI inhibe la catalyse de l'acylation par la *CCL*. En revanche, un effet significatif de l'hydrophobicité du solvant sur la réactivité et la sélectivité de la *CCL* est révélé lorsque l'AV est utilisé. Dans l'Et<sub>2</sub>O, le TBME, le DIPE et l'heptane, la réactivité de la *CCL* reste stable et la conversion varie entre 33% < C <44% (**entrées 2-5**). Un avancement modéré est noté dans le THF C = 12% (**entrée 1**) tandis qu'une diminution notable du facteur de sélectivité est obtenue dans le DIPE, E = 44 (**entrée 4**). Il est à souligner que les meilleurs résultats en termes de réactivité et de sélectivité sont obtenus dans l'**Et<sub>2</sub>O** le **TBME**, le **DIPE** comme solvants lors de l'acylation du *dl*-Menthol par la *CCL* libre. En outre, la sélectivité et la réactivité les plus élevées sont obtenues avec l'AV en tant qu'agent d'acylation, l'histogramme 1 résume l'ensemble de ces résultats.



Histogramme 1 : Effet du solvant lors du DC du dl-menthol avec la CCL.

#### - Etude de l'ajout d'additifs

Le nouvel aspect de ce travail est l'utilisation d'additifs qui a pour but d'améliorer la sélectivité des lipases pour la résolution cinétique enzymatique du menthol. Dans ce contexte, nous avons sélectionné comme additifs : deux alcaloïdes (la cinchonidine et la quinidine) ainsi que d'autre type d'additifs ; un éther couronne (18-C-6), une base organique (NEt<sub>3</sub>) et une base minérale (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (*Figure 20*).



Figure 20 : Additifs sélectionnés pour le DE du dl-menthol.

L'utilisation d'additifs pour améliorer la sélectivité enzymatique est une alternative intéressante et des travaux antérieurs montré l'effet des alcaloïdes avec la CRL. <sup>165</sup> Une tentative d'optimisation de la résolution du menthol catalysée par la *CCL* est réalisée par l'introduction de certains additifs dans le milieu organique. Une quantité catalytique de ces additifs est introduite directement en suivant les procédures décrites précédemment. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7.

Les résultats de ce tableau font apparaitre que l'introduction du 30% mol de la quinidine dans l'acylation du *dl*-menthol catalysée par la *CCL* dans le TBME, conduit à une activation importante du processus catalytique. Le taux de conversion atteint une C= 49% et le *1*-(-)-menthyle acétate 1a est obtenu avec un excès énantiomérique élevé ee<sub>p</sub> = 93% (**entrée 3**) et une sélectivité de E = 80. Dans l'Et<sub>2</sub>O, la conversion enregistrée était de C = 56% avec une forte diminution de la sélectivité à E = 30. L'utilisation de l'heptane comme solvant organique provoque une augmentation significative de la réactivité de la *CCL* lors de l'acylation du *dl*-menthol, l'énantiodiscrimination de la *CCL* disparaît et la vitesse de réaction des deux énantiomères du menthol est quasi-égale (C = 75% et E = 1) (**entrée 2**).

<sup>&</sup>lt;sup>165</sup> (a) Réf158: M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2008, <u>19</u>, 2378-2384. (b) Réf90e: M. Boukachabia, J-C. Fiaud, N. Melaïs, M. Merabet, L. Aribi-Zouioueche, *J. Soc. Alger. Chim.*, 2007, <u>17</u>, 185-194.

$\begin{array}{c c} \hline \\ \\ \hline \\ \\ \hline \\ \\ \hline \\ \\ \\ \hline \\$							
Entrée	Additif <sup>a</sup>	Solvant (logP)	$ee_8\% b (Rdt\%) d$	ee <sub>P</sub> % <sup>b</sup> (Rdt%) <sup>d</sup>	C(%) <sup>c</sup>	E °	
1		Et <sub>2</sub> O (0.85)	97(42)	75(48)	56	30	
2	Quinidine	Heptane (4)	27(20)	9(55)	75	1	
3		<b>TBME(1.35)</b>	88(38)	<b>93(39)</b>	<b>49</b>	80	
4	Sans	<b>TBME</b> (1.35)	54(36)	>99 (29)	35	>200	
5		Et <sub>2</sub> O (0.85)	-	-	NR	-	
6	Cinchonidine	Heptane (4)	40(44)	>99(20)	30	>200	
7		TBME (1.35)	45.5(40)	98(22)	32	>100	
8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	TBME (1.35)	42(40)	98(20)	30	>100	
9	Et <sub>3</sub> N		24(57)	98(12)	19.6	>100	
10	19 C 6	Et <sub>2</sub> O (0.85)	61(52)	>99(21)	38	>200	
11	10-0-0	TBME (1.35)	24(52)	98(12)	20	>100	

Tableau 7 : DC du dl-menthol cata	lysée par la lipase	CCL : Influence d'additifs.
-----------------------------------	---------------------	-----------------------------

**a.** Conditions de la réaction : 1 mmole du *rac*-menthol, 3 mmole du vinyle acétate, 2 mL de solvant, 100mg *CCL* (280U) en présence d'additifs pendant 48 heures à température ambiante. **b.** L'excès énantiomérique est mesuré par la GC chirale. **c.** Conversion :  $C=ee_S/ee_P+ee_s$ ; Selectivité: E =Ln [(1-C) (1-ee<sub>(S)</sub>)]/ Ln [(1-C) (1+ee<sub>(S)</sub>)].<sup>166</sup> **d.** Rendement isolé après séparation par flash chromatographie.

En comparant avec la cinchonidine, aucun effet sur la performance de la *CCL* n'est observé à la fois dans l'heptane et le TBME (**entrée 6, 7**), alors que l'activité catalytique était totalement inhibée dans le diéthyléther (**entrée 5**). L'addition de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, base minérale faible, conduit à une légère diminution de la conversion de C = 35% sans additif à C = 30% en sa présence (**entrée 8**), cet effet est amplifié par l'addition de Et<sub>3</sub>N, une base organique, dans ce cas, la conversion chute à C = 19% (**entrée 9**). De plus, l'introduction d'un additif de type éther couronne *18-C-6*, conduit à une diminution plus importante du taux de la conversion avec le TBME comme solvant C = 20% que dans l'Et<sub>2</sub>O C = 38% (**entrées 10 et 11**).

<sup>&</sup>lt;sup>166</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

L'introduction d'une quantité catalytique d'additif issu du réservoir chiral naturel, tel que **la quinidine**, optimise significativement les performances catalytiques de **la** *CCL* lors de l'acylation du *dl*-menthol par l'AV dans **le TBME**. Par ailleurs, le choix de ce solvant est une alternative très intéressante à l'Et<sub>2</sub>O en terme d'exigences environnementales.<sup>167</sup>

Ces résultats montrent une nouvelle fois que les alcaloïdes utilisés comme additifs ont permis d'améliorer la sélectivité de la *CCL* et permettent d'accéder au *l*-menthol avec une grande pureté énantiomérique. Suite à ces résultats intéressants et vu l'intérêt industriel de menthol, nous avons réalisé la réaction à une échelle multi-gramme.

#### - Réaction à grande d'échelle

Nous avons appliqué à grande échelle cette méthodologie simple et facile qui a lieu dans des conditions douces. Les paramètres optimisés sont mis en œuvre sur **10 mmoles** (1,5 g) de menthol racémique ; **30 mmoles** de l'AV, **1g** de la *CCL* et en présence de **30 mol%** (0.97g) de quinidine comme additif dans **20 mL** du TBME à température ambiante durant **48 heures**. La réaction est reproductible et l'énantiomère *l*-(-)-**1a** le plus important est obtenu avec **ee = 94%** et un rendement de **39%** (0.75g).



Schéma 67 : Acylation catalysée par CCL du dl-menthol en présence de quinidine.

<sup>&</sup>lt;sup>167</sup> F. P. Byrne, S. Jin, G. Paggiola, T. H. M. Petchey, J. H. Clark, T. J. Farmer, A. J. Hunt, C. R. McElroy, J. Sherwood. *Chem. Process.*, **2016**, <u>4</u>, 7 ; (b) D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. McElroy, S. Abou-Shehada, P. J. Dunn, *Green Chem.*, **2015**, <u>18(1)</u>, 288-296.

Le chromatogramme 1 illustre le résultat obtenu lors de la transestérification du *dl*-menthol (réaction à grande d'échelle).



*Chromatogramme 1* : *Multigramme du* DCE du *dl*-menthol catalysé par la *CCL*.

#### IV.5. CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons étudié l'influence de plusieurs paramètres dans la réaction d'acylation enzymatique du *dl*-menthol. Les conditions de la résolution cinétique de cet alcool racémique à haute valeur catalysée par la lipase *CCL* avec **l'acétate de vinylique** et la **quinidine** comme additif dans le **TBME** comme solvant. La conversion est de C=49% avec une haute sélectivité de E=80.

Cette étude nous a permis de comparer le comportement de la *CRL* et la *CCL* pour l'acylation énantiosélective du  $(\pm)$ -menthol et de montrer que l'activité de la *CCL* ne dépend pas de la teneur en eau du milieu réactionnel. Un autre aspect intéressant de ces résultats est, de substituer l'Et<sub>2</sub>O par le TBME considéré comme un solvant hautement dangereux. On a montré que l'addition de quinidine influe d'une manière importante sure la réactivité et la sélectivité catalytique de la *CCL*. Les conditions optimales sont mises en œuvre avec la *CCL* 

Nous avons pu réaliser une transestérification énantiosélective du  $(\pm)$ -menthol à grande d'échelle, et montré la possibilité d'application dans une production préparative de menthol énantiopur. Cette alternative constitue un protocole simple pour la fabrication de l'énantiomère *l*-menthol optiquement actifs à l'échelle industriel. Ces résultats ont été publiés dans *Research on Chemical Intermediates*. <sup>168</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>168</sup> F.Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Research on Chemical Intermediates*. 2018, <u>44(11)</u>, 6847–6860.

# **DEUXIÈME PARTIE**

# **CINQUIÈME CHAPITRE**

# ACYLATION/DÉACYLATION ENZYMATIQUE DES ARYLCYCLOHEXANOLS

#### **V.1. INTRODUCTION**

L'importance des dérivés d'alcools secondaires énantiopurs est bien établie en tant qu'éléments constitutifs polyvalents pour la synthèse de composés biologiquement actifs.<sup>169</sup> Ce chapitre s'est orienté sur l'étude du DCE des alcools secondaires de type trans-2arylcyclohexanol, développés par Whitesell et coll.<sup>170</sup> qui sont d'un intérêt considérable comme sources chirales pour les transformations ou la fabrication asymétrique de substances physiologiquement actives telles que le diltiazem.<sup>171</sup> Leurs inductions asymétriques élevées sont attribuées au contrôle stéréosélectif élevé dû aux effets stériques et électroniques du fragment aryle. Les voies décrites dans la littérature pour accéder au trans-2phénylcyclohexanol énantio-enrichi utilisent des transformations asymétriques telles que l'hydroboration, <sup>172</sup> l'époxydation, <sup>173</sup> la dihydroxylation <sup>174</sup> du 1-phénylcyclohexène, ou encore par protonation/réduction énantiosélective à partir de l'acétate d'énol prochiral correspondant.<sup>175</sup> La résolution cinétique <sup>176</sup> a été également utilisée avec la silvlation diastéréo et énantiosélective des 2-arylcyclohexanols.<sup>177</sup>

#### V.2. Objectifs du travail

La recherche des conditions optimales de sélectivité enzymatique pour accéder aux alcools énantioenrichis à partir des racémiques est un axe majeur de nos travaux de recherche. Récemment, nous avons développé une voie verte et facile d'hydrolyse enzymatique en milieux organique avec du carbonate de sodium.<sup>178</sup> Cette nouvelle approche réactionnelle a

<sup>&</sup>lt;sup>169</sup> (a) Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions, Blaser, H. U., Federsel, H. J., Eds., 2nd ed; John Wiley & Sons: Weinheim, 2011; (b) Réf56: V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, J. Mol. Cata B. Enz., 2006, 40, 111-120; (c) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein. Tetrahedron: Asymmetry., 2004, <u>15</u>, 3331–3351. <sup>170</sup> J. K. Whitesell, H. H. Chen, R. M. Lawrence, *J. Org. Chem.*, **1985**, <u>50</u>, 4663–4664.

<sup>&</sup>lt;sup>171</sup> (a) M. L. Vasconcellos, D. Desmaële, P. R. Costa, J. D'Angelo, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, <u>33</u>, 4921–4922 ; (b) J. K. Whitesell, Chem. Rev., 1992, 92, 953-964; (c) D. J. J. Potin, Am. Chem. Soc., 1990, 112, 3483-3486; (d) I. Ojima, I. Habus, M. Zhao, M. Zucco, Y. H. Park, C. M. Sun, T. Brigaud, Tetrahedron., 1992, <u>48</u>, 6985–7012.

<sup>&</sup>lt;sup>172</sup> H. C. Brown, J. V. N. Vara Prasad, A. K. Gupta, R. k. Bakshi, J. Org. Chem., 1987, 52, 310–311.

<sup>&</sup>lt;sup>173</sup> B. D. Brandes, E. N. Jacobsen, J. Org. Chem., **1994**, 59, 4378–4380.

<sup>&</sup>lt;sup>174</sup> (a) Zhao, S. H. U.S. Patent No. 5,420,366. 1995. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office ; (b) S. B. King, K. B. Sharpless, Tetrahedron Lett., 1994, 35, 5611–5612

<sup>&</sup>lt;sup>175</sup> G. Asensio, A. Cuenca, N. Rodriguez, Tetrahedron: Asymmetry., 2003, 14, 3851–3855.

<sup>&</sup>lt;sup>176</sup> M. Matsugi, Y. Hagimoto, M. Nojima, Y. Kita, Synth. Commun., 2013, 43, 1425–1431.

<sup>&</sup>lt;sup>177</sup> L. Wang, R. K. Akhani, S. L. Wiskur, Org. Lett., 2015, <u>17</u>, 2408–2411.

<sup>&</sup>lt;sup>178</sup> Réf84: M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, Tetrahedron: Asymmetry., 2012, 23(11), 828-833.

été appliquée efficacement à la déracémisation d'une large gamme d'acétates benzyliques secondaires. <sup>179</sup> Plus récemment, cette procédure est utilisée à la déacylation chimiosélective des amino-alcools N, O-protégés. <sup>180</sup> Afin d'étendre le domaine d'application de l'approche d'hydrolyse alcaline catalysée par la *CAL-B*, nous avons appliqué ces nouvelles conditions d'hydrolyse au DC des dérivés du trans-2-arylcyclohexanol.

Dans cette partie, nous étudions la résolution cinétique des dérivés du trans-2arylcyclohexanol par deux voies complémentaires : hydrolyse alcaline/déacylation avec le carbonate de sodium et l'acylation enzymatique utilisant deux esters d'énols pour accéder à des arylcyclohexanols énantiomériquement enrichis (*Schéma 68*).



Schéma 68 : Réactions d'Acylation/Déacylation.

#### V.3. Mise au point bibliographique sur le sujet

Dans la littérature, on constate que les travaux de DC des  $(\pm)$ -*trans*-2-arylcyclohexanols sont décrits avec diverses lipases et essentiellement par acylation enzymatique. Nous en citerons quelques exemples ci après.

L'acylation cinétique enzymatique énantiospécifique du racémique *trans*-2-(lnaphtyl)cyclohexan-1-ol catalysée par la lipase *Pseudomonas amano sp* <sup>181</sup> avec l'AV (*Schéma 69*) a été réalisée. Cette réaction permet la synthèse de l'acétate (+)-(*1R*, *2S*) et de l'alcool (+)-(*1S*, *2R*) avec une excellente pureté énantiomérique de >99% et 98.8% respectivement. L'acétate énantiomériquement pur (+)-(*1R*, *2S*) obtenu peut être transformé en (-)-(*1R*, *2S*) par simple réaction d'hydrolyse chimique.

<sup>&</sup>lt;sup>179</sup> Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2013**, <u>24</u>, 290–296

<sup>&</sup>lt;sup>180</sup> A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2016**, <u>27</u>, 1253–1259.

<sup>&</sup>lt;sup>181</sup> M. Takahashi, K. Ogasawara, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1995**, <u>6</u>, 1617–1620.



<u>Schéma 69</u> : Acylation enzymatique du racémique trans-2-(1-Naphthyl)cyclohexan-1-ol.

Les même conditions réactionnelles ont été appliquées par **Carpenter** <sup>182</sup> pour une acylation enzymatique à grande échelle du racémique *trans*-2-(1-phényl)cyclohexanol (*Schéma 70*). Cette réaction a été catalysée avec **la lipase** *PS30* sur célite : les (+)-*trans*-2-(1-phényl)cyclohexanol et le (-)-*trans*-2-(1-phényl)cyclohexanol ont été obtenu avec un ee > 99% après un temps relativement court 48h.



<u>Schéma 70</u>: Acylation du trans-2-phényl-1-cyclohexanol catalysé par la lipase PS30.

Dans la réaction d'acylation du racémique *trans*-2-phényl-1-cyclohexanol et en présence d'acétate de vinyle (**AV**) en tant que donneur d'acyle à 40°C, **la lipase immobilisée** de *Candida rugosa* (*CRL*) <sup>183</sup> permet d'obtenir l'énantiomère (*1R*, *2S*)-*trans*-2-phényl-1-cyclohexanol avec une énantiosélectivité élevée (ee = 100%) (*Schéma 71*). Cette étude montre que l'utilisation d'hexane en présence de tamis moléculaire a amélioré la conversion jusqu'au 34% tandis que sans tamis la conversion est seulement de C=24%.

<sup>&</sup>lt;sup>182</sup> B. E. Carpenter, R. Hunt, B. A. Keay, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1996, <u>7</u>, 3107-3108.

<sup>&</sup>lt;sup>183</sup> E. C. Celia, E. Cernia, I. D'Acquarica, C. Palocci, S. Soro, J. Mol. Catal. B Enzym., 1999, <u>6</u>, 495–503.



Schéma 71 : Acylation du trans-2-phényl-1-cyclohexanol catalysé par CRL.

La *CRL* est également utilisée en 2000 par le groupe de Sanchez pour synthétiser (*1R*, *2S*)*trans*-phénylcyclohexanol énantioenrichi via une nouvelle méthodologie utilisant un système de bioréacteur par réaction de transestérification et en présence l'acide propionique comme agent acylant. La conversion obtenue était seulement proche de 35%.<sup>184</sup>

Par ailleurs, **la lipase** *Pseudomonas fluorescens AK* est efficace pour catalyser la réaction d'acylation cinétique des trans-arylcyclohexanols : le *trans-*phényl et le *trans-*naphtyl-cyclohexanol <sup>185</sup> en présence d'AV dans le TBME à 35°C et après 5 jours (*Schéma* 72). Les énantiomères (*R*, *S*)- et (*S*, *R*) du 2-phénylcyclohexanol et du 2-(1-naphtyl)cyclohexanol ont été préparés sous forme énantiomériquement pure et avec d'excellents rendements chimiques.



<u>Schéma 72</u> : Acylation des arylcyclohexanols catalysé par la lipase AK.

<sup>&</sup>lt;sup>184</sup> A. Sánchez, J. L. del Río, F. Valero, J.Lafuente, I. Faus, C. Solà, *Journal of Biotechnology.*, 2000, <u>84</u>, 1–12.

<sup>&</sup>lt;sup>185</sup> Y. H. She, C. F. Wu, K. S. Shia, J. D. Wu, R. K Peddinti, H. J. Liu, *Synthesis.*, **2005**, <u>5</u>, 749–752.

Suite à cette mise au point bibliographique, nous notons que la réaction de dédoublement cinétique enzymatique des arylcyclohexanols racémiques se fait généralement par une réaction d'acylation lipasique comme voie facile avec diverses lipases tels que : la *Pseudomonas amano sp*, la *PS30*, la *Candida rugosa (CRL)* et la *Pseudomonas fluorescens (AK)*. Le protocole standard rapporté pour cette réaction met en contact l'AV comme donneur d'acyle et le TBME comme solvant.

On constate que la réaction d'hydrolyse enzymatique est très peu rapportée pour le DC des dérivés *trans*-2-arylcyclohexyl acétates. Les rares exemples qui existent concernant ces dérivés acétates sont dédoublés avec l'estérase hépatique brute du foie de poulet (*CCLE*) utilisée dans les milieux biphasiques. <sup>186</sup>

Ce chapitre concerne le DC des dérivés arycyclohexanols racémiques et de leurs acétates correspondants par deux voies complémentaires l'acylation et l'hydrolyse enzymatique.

#### V.4. <u>Résultats et discussion</u>

L'étude des réactions d'acylation/déacylation est initialement réalisée sur le *trans-3* et son acétate correspondant **3a**. Ensuite, une exemplification est appliquée sur une série de divers alcools secondaires de type « *arylcyclohexanols* » : le (±)-*trans-2-phénylcyclohexanol-3*, le (±)-*trans-2-méthoxyphénylcyclohexanol-4*, le (±)-*trans-2-biphénylcyclohexnol-5*, le (±)-*trans-2-phénylcyclohexanol-6*. Les acétates correspondants sont le (±)-*trans-2-phénylcyclohexyl acétate-3a*, le (±)-*trans-2-metoxyphénylcyclohexyl acétate-4a*, le (±)-*trans-2-phénylcyclohexyl acétate-5a*, le (±)-*trans-2-naphtylcyclohexyl acétate-6a* et le mélange *cis/trans-2-phénylcyclohexanol-3a*. (*Figure 21*)

Par ailleurs, le DC des mélanges de diastéréoisomères *cis/trans-2-phénylcyclohexanol-***3** ainsi que des acétates *cis/trans-***3a** sont également étudiés.

<sup>186</sup> D. Basavaiah, P.O. Rao, Tetrahedron: Asymmetry., 1994, 5, 223-234.



Figure 21 : Alcools et acétates modèles de l'étude.

L'étude du DC des d'acylation et de déacylation lipasique des *arylcyclohexanols* est examinée avec la lipase *CAL-B* : en acylation sur les stéréoisomères *trans*-alcools (**3**, **4**, **5**, **6**) et en hydrolyse avec le carbonate de sodium sur les dérivés acétates (**3a**, **4a**, **5a**, **6a**). L'étude est ensuite réalisée sur les mélanges des stéréoisomère *cis/trans*-**3** alcool et *cis/trans*-**3a** acétate.

Le protocole d'hydrolyse avec le carbonate de sodium que nous étudions est efficace uniquement en présence de la lipase *Candida antarctica B (CAL-B)*. C'est une lipase d'origine microbienne, immobilisée sur résine acrylique d'activité lipasique > 10000 U/g. Pour l'acylation, nous avons choisis les deux esters d'énols (*Figure 22*) l'AV et l'acétate d'isopropényle (AI) qui sont les plus largement utilisé pour le dédoublement des alcools racémiques et assurent l'irréversibilité de la réaction.



Figure 22 : Esters d'énols.

# V.4.1. Préparation des arylcyclohexanols racémiques et de leurs acétates

• <u>Synthèse des alcools racémiques trans-2-arylcyclohexanol 4-6 (méthode de</u> <u>Whitesell</u>)

Le *trans*-2-phénylcyclohexanol **3** est disponible dans le commerce, tandis que le reste des alcools est préparé par ouverture de l'époxyde de cyclohexène en présence du réactif de Grignard et d'une quantité catalytique de sels de cuivre (I) (*Schéma 73*). Les alcools **4-6** sont obtenus avec de bons rendements chimiques **60-77%**.



<u>Schéma 73</u>: Mode de synthèse des trans-arylcyclohexanols 4-6.

# • <u>Préparation du mélange (±)-cis/trans-2-phény1-cyclohexanol 3</u>

Le mélange isomérique  $(\pm)$ -*cis/trans*-2-phény-1-cyclohexanol **3** est obtenu après une réduction de la cétone en utilisant le NaBH<sub>4</sub> dans (THF/H<sub>2</sub>O) à 0°C, avec un rapport diastéréoisomérique de *cis/trans*: 20/80 (*Schéma 74*). Le mélange d'isomères résultant de l'alcool est obtenu pur sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de **75%**.



<u>Schéma 74</u>: Synthèse du mélange des cis/trans-phénycyclohexanol 3.

# • <u>Préparation des acétates arylcyclohexyle racémiques 3a–6a</u>

Les acétates de arylcyclohexyle sont synthétisés par acylation chimique classique, par l'intermédiaire des alcools *trans*-arylcyclohexanols racémiques correspondants en utilisant l'anhydride acétique (Ac<sub>2</sub>O), de la triéthylamine (Et<sub>3</sub>N) et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine dans d'éther diéthylique (*Schéma 75*). Les produits finaux sont obtenus purs avec des bons rendements.



<u>Schéma 75</u> : Synthèse des acétates arylcyclohexyls 3a-6a.

# V.4.2. Dédoublement cinétique enzymatique des arylcyclohexanoles

La lipase *CAL-B* est un biocatalyseur robuste ayant une efficacité catalytique élevée dans les résolutions cinétiques, <sup>187</sup> nous l'avons utilisé avec succès dans nos travaux antérieurs. <sup>188</sup> Par

<sup>&</sup>lt;sup>187</sup> (a) E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, <u>39</u>, 4504–4523 ; (b) Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 6th ed., Springer: Berlin Heidelberg, **2011**.

 <sup>&</sup>lt;sup>188</sup> (a) Réf130: N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, *Catalysts.*, 2014, 4(3), 215–225 ; (b) A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, *Catal. Lett.* 2015, <u>145</u>, 1054–1061 ; (c) M. Merabet-Khellassi, L. Aribi-Zouioueche, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2009, <u>20</u>, 1371–1377.

ailleurs, le protocole catalytique de l'hydrolyse alcaline mis en jeu dans notre étude sur le dédoublement cinétique des arylcyclohexanol est réalisé, en milieu organique, en présence de la *CAL-B* immobilisée sur résine acrylique. Les deux approches : déacylation avec carbonate de sodium et acylation avec des esters d'énols sont comparées avec la même lipase (*Schéma* 76).



<u>Schéma 76</u> : Étude des voies d'Acylation/Déacylation enzymatique.

Les rendements isolés des produits et des substrats résiduels sont quantifiés après élimination de la lipase par simple filtration et séparation par flash chromatographie. Les excès énantiomériques sont déterminés par HPLC ou GC chirale.

# V.4.2.1. Déacylation enzymatique des acétates trans-arylcyclohexyls 3a-6a

Les expériences d'hydrolyse alcaline sont réalisées sur un mélange équimoléculaire d'acétate racémique **3a-6a** et de carbonate de sodium dans 3 mL de solvant organique, en présence de 200 mg de la lipase *CAL-B* (> 10 000 U/g), le mélange réactionnel est agité à 40°C pendant 72h. Les résultats de la résolution enzymatique par déacylation des dérivés  $(\pm)$ -*trans*-2-arylcyclohexyls sont résumés dans le **tableau 8**.

$(\pm)-trans \xrightarrow{OAc} \underbrace{CAL-B}_{Na_2CO_3} \xrightarrow{OH} \underbrace{OH}_{(1R,25)} \xrightarrow{(1S,2R)} (1S$							
Entrée	Substrat	Solvant	$ee_{s}(\%)^{(b)} Rdt (\%)^{(c)}$	$ee_P\%^{(b)} Rdt (\%)^{(c)}$	C(%) <sup>(b)</sup>	<b>E</b> <sup>(b)</sup>	
1	OAc	Toluène	43 (65)	> 99 (24)	30	> 200	
2	3a	TBME	86 (51)	> 99 (38)	46.5	> 200	
3	OAc	Toluène	20 (ND)	99 (ND)	17	> 200	
4	MeO 4a	TBME	38 (68)	>96 (20)	28.4	71	
5	ΟΑc 	TBME	96.5 (45)	>99 (44)	49.5	> 200	
6	OAc	TBME	44 (55)	> 99 (25)	31	> 200	

Tableau 8 : CAL-B	-catalyse la	déacylation o	du <i>trans</i> - <b>3a-6a.</b>
-------------------	--------------	---------------	---------------------------------

**a.** Conditions de la réaction: 1 mmole de l'acétate racémique, 1 mmole du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 mg de la *CAL-B*, dans 2 mL du solvant organique à 40°C au bout de 72 h. **b.** Conversion: C = eeS/eeP + eeS; Sélectivité:  $E = Ln[(1 \ C)(1 ee(S))]/Ln[(1 \ C)(1 + ee(S))]$ .<sup>189</sup> **c.** Rendement isolé après une séparation avec flash chromatographie. \*ND: Non déterminé.

Les résultats montrent une sélectivité élevée de la *CAL-B* lors de l'hydrolyse alcaline des acétates **3a-6a** (**Tableau 8**). La conversion dépend à la fois de l'encombrement du substituant aryle et de l'hydrophobicité du solvant. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant le TBME comme solvant. La *CAL-B* hydrolyse efficacement la désacylation des acétates **3a** et **5a** en faveur du (*IR*, *2S*)-énantiomère (**entrées 2 et 5**). Des conversions modérées  $17\% \le C \le$  30% sont notées dans le toluène pour **3a** et **4a** (**entrées 1 et 3**). La conversion atteint C = 46,5% pour le substrat **3a** avec le TBME comme solvant. La conversion diminue de C = 46,5% à C = 28,4% (**entrées 2 et 4**) dans le cas du substrat **4a** qui possède un *métoxy* en position ortho, ce substrat est plus encombré et moins soluble. Le même effet est noté dans le toluène pour ces composés **3a** et **4a** avec une conversion qui chute de moitié (**entrée 3 et 1**). Sur la base de ces résultats, les réactions d'hydrolyse de l'acétate **5a** et **6a** sont effectuées uniquement dans le TBME. Ainsi, les acétates **5a** et **6a** sont hydrolysés sélectivement (**E** > 200) avec des taux de conversion de C = 49,5% et C = 31% respectivement (**entrées 5 et 6**).

<sup>&</sup>lt;sup>189</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

Le chromatogramme 2 représente la réaction de DCE par déacylation du  $(\pm)$ -5a pour lequel les meilleurs résultats sont obtenus que ce soit pour la sélectivité ou la réactivité.



*Chromatogrammes 2* : *Déacylation enzymatique du* (±)-5*a dans le TBME*.

La préférence stéréochimique de la *CAL-B* est déterminée par corrélation avec la configuration absolue des alcools et des acétates restants après comparaison des rotations spécifiques avec celles rapportées dans la littérature. Dans les deux cas, la *CAL-B* a catalysé préférentiellement l'énantiomère (R) conformément à la règle de Kazlauskas.

# V.4.2.1. Acylation enzymatique des trans-arylcyclohexanols 3-6

La résolution du  $(\pm)$ -*trans*-2-arylcyclohexanol **3-6** est réalisée par l'acylation catalysée par la *CAL-B* en utilisant deux esters d'énol, les acétates de vinyle et d'isopropényle et dans les deux solvants utilisés pour l'hydrolyse alcaline, Le mélange réactionnel est agité pendant un jour à température ambiante. Les résultats obtenus de DCE par acylation des dérivés  $(\pm)$ -*trans*-2-arylcyclohexanols sont illustré dans le **tableau 9**.

Les résultats font apparaitre une sélectivité élevée de la *CAL-B* pour l'acylation des composés **3-6** avec les deux esters d'énol ; AV et AI (E > 97) quel que soit le solvant utilisé. Cependant, la réactivité de la *CAL-B* est modulée en fonction de la nature des substrats, l'encombrement stérique du substituant aryle combiné avec la nature de l'ester d'énol utilisé et celle du solvant.

		OH Aryl	CAL-B Ester d'énc		Aryl		
		(±)-trans	Solvant	(1R,25)	(15,2R)		
Entrée	Substrat	Agent acylant <sup>(a)</sup>	Solvant	ees(%) <sup>(b)</sup> Rdt (%) <sup>(c)</sup>	ee <sub>P</sub> % <sup>(b)</sup> Rdt (%) <sup>(c)</sup>	C(%) <sup>(b)</sup>	E <sup>(b)</sup>
1		AI	TBME	60 (50)	> 99 (30)	38	> 200
2	ОН		Toluène	89 (43)	> 99 (40)	47	> 200
3	3	ΔV	TBME	53.5 (60)	> 99 (33)	35	> 200
4		AV	Toluène	36.5 (70)	> 99 (20)	27	> 200
5	OH MeO	ΙA	TBME	6 (ND)	> 99 (ND)	6	> 200
6			Toluène	42 (55)	> 99 (20)	30	> 200
7		AV	TBME	32 (ND)	> 99 (ND)	25	> 200
8		AV	Toluène	6 (ND)	> 99 (ND)	6	> 200
9		ΔĪ	TBME	12 (ND)	98 (ND)	11	97
10		AI	Toluène	6 (ND)	98 (ND)	6	> 200
11	5	AV	TBME	24 (69)	> 99 (15)	19.5	> 200
12		AV	Toluène	5 (ND)	> 99 (ND)	5	> 200
13		ΔI	TBME	87 (40)	> 99 (41)	47	> 200
14	OH	AI	Toluène	73 (37)	> 99 (40)	42	> 200
15	6	AV	TBME	67 (40)	> 99 (32)	40	> 200
16	_		Toluène	38 (65)	> 99 (15)	28	> 200

Tableau 9 : .	Acylation des	(±)-trans-arylc	cyclohexanols-3-6	catalysé	par la CAL-B.
---------------	---------------	-----------------	-------------------	----------	---------------

**a.** Conditions de la réaction : 1 mmole du racémique alcool, 3 mmole de l'ester d'énol, 200 mg de la *CAL-B*, dans 2 mL du solvant organique à une température ambiante à 24 h. **b.** Conversion : C = eeS/eeP + eeS; Sélectivité: E = Ln[(1 C)(1 ee(S))]/Ln[(1 C)(1 + ee(S))].<sup>190</sup> **c.** Rendement isolé après une séparation par une flash chromatographie. \*ND: Non déterminé.

La présence d'un substituant naphtyle plus encombrant permet une meilleure réactivité par rapport phényle de la *CAL-B* lors l'acylation. Les meilleurs résultats (C = 47%) sont obtenus en utilisant l'AI comme donneur d'acyle dans le toluène pour le substrat **3** (entrée 2) ou dans le TBME avec le substrat **6** (entrée 13). Dans le cas du substrat **4**, l'AI montre un effet

<sup>&</sup>lt;sup>190</sup> (a) Réf71: C. S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

significatif de la nature du solvant, la conversion passe de C = 6% dans le TBME à C = 30% dans le toluène (**entrée 5 vs 6**). Cet effet de solvant n'est pas observé dans le cas des substrats **3** et **6** dans les mêmes conditions (**entrées 1-2** *vs* **13-14**). La présence d'un substituant *méthoxy* en position *ortho* du cycle aromatique entraîne une diminution significative de la conversion (de C = 38% à C = 6%) avec l'AI dans le TBME (**entrée 5** *vs* **1**) et cet effet est beaucoup moins prononcé dans le toluène (de C = 30% à C = 47%) (**entrée 6** *vs* **2**). Dans TBME, la conversion est légèrement diminuée de C = 35% à C = 25% (**entrées 3** *vs* **7**), alors que, dans le toluène, elle a subit une forte réduction de C = 27% à C = 6% (**entrées 4 et 8**). Lorsque l'AV est utilisé comme donneur d'acyle, ces effets de solvant sont inversés (**entrées 5** *vs* **8**).

Pour le substrat 5, la meilleure conversion est obtenue avec l'AV dans le TBME C = 19,5% (entrées 11). Un impact important de la nature du substrat sur la réactivité de la lipase intervient lors de l'acylation des alcools 5 et 6 avec l'AI (entrées 9 vs 13 et 10 vs 14) et respectivement avec l'AV (entrées 11 vs 15 et 12 vs 16) et cela quelque soit le solvant.

L'effet de la structure du substituant apparaît clairement lors de l'acylation de l'alcool **6**. La lipase *CAL-B* est très active et hautement sélective avec un groupement naphtyle (E > 200) (**entrées 13-16**), cette sélectivité révèle que la structure du substrat **6** s'adapte parfaitement au site actif de la *CAL-B* lors de l'acylation. Cela n'est pas le cas du substrat **5**, où la présence d'un groupement biphényle réduit fortement la réactivité de la lipase (**entrées 9-13**). Cela peut s'expliquer par les interactions stériques liées au groupe biphényle substitué, les rotations du phényl interfère probablement avec la conformation active de la lipase, cela n'est pas le cas avec le groupement naphtyle. Des observations similaires ont été précédemment observées ave la lipase *AK* et les arylalkycarbinols. <sup>191</sup> Le chromatogramme **3** présente le meilleur obtenu avec le substrat **6**.

<sup>&</sup>lt;sup>191</sup> Réf87a: L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, 2000, <u>41</u>, 4085–4088.



*<u>Chromatogrammes 3</u>* : *DCE* par acylation du (±)-6a dans le TBME.

L'étude du solvant en fonction des agents acylants utilisés dans le DCE des arylcyclohexanoles est présenté dans les histogrammes suivants :



<u>*Histogramme 2*</u> : Étude de solvant du DCE des arylcyclohexanols en présence de AI et AV.

Nous avons comparé deux approches de résolution cinétique pour les structures de type ractrans-2-arylcyclohexanols en milieu organique avec la lipase CAL-B: (i) l'hydrolyse alcaline avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et (ii) l'acylation en utilisant deux esters d'énols. On observe que la structure et les effets électroniques du substituant aryle influencent fortement à la fois la réactivité et la sélectivité de la *CAL-B*, par ailleurs, ils interagissent avec le nucléophile utilisé en fonction de l'hydrophobicité du solvant.

L'hydrolyse alcaline au moyen de la *CAL-B* en tant que biocatalyseur constitue une voie pratique pour la séparation des énantiomères de ces auxiliaires chiraux. Les deux approches

enzymatiques étudiées sont énantiocomplémentaires avec une (R)-énantiosélection du substrat. Sur la base des résultats obtenus lors de la résolution cinétique catalysée par la *CAL-B* des *trans*-arylcyclohexanols par hydrolyse alcaline et acylation, les meilleurs résultats sont appliqués à la résolution directe du mélange racémique d'isomères *cis/trans*-2-phényl-1-cyclohexanol.

#### V.4.2.3. Application des conditions sur le mélange cis/trans-phénylcyclohexanol 3

À notre connaissance, la résolution cinétique directe du mélange des diastéroisomères cis/trans-2-phényl-1-cyclohexanol et de ses dérivés est peu décrite.<sup>192</sup>

Afin d'examiner l'*énantio*- et la *diastéréos*électivité de la *CAL-B* pour les deux approches étudiées précédemment, nous avons appliqué les conditions optimisées pour la résolution cinétique par hydrolyse alcaline des acétates *cis/trans-3* a et également par acylation des alcools *cis/trans-3* avec l'AI.



<u>Schéma 77</u> : DCE des diastéréoisomères (±)-cis/trans-2-phényl-1-cyclohexanol et acétates.

L'acylation enzymatique est effectuée en utilisant l'AI comme donneur d'acyle dans le toluène à température ambiante, le suivi de la réaction est contrôlé par la GC chirale. Des échantillons du mélange réactionnel à 24h, 48h et 72h sont analysés. L'hydrolyse alcaline

<sup>&</sup>lt;sup>192</sup> (a) L. M. Levy, J. R. Dehli, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2003**, <u>14</u>, 2053–2058. (b) L. M. Levy, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, <u>2</u>, 2572–2577.

enzymatique est réalisée dans le TBME sous agitation pendant 72 heures à 40 °C. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 10.** 

<u>**Tableau 10**</u>: Acylation/déacylation catalysé par la lipase *CAL-B* du mélange racémique  $(\pm)$ -(*cis/trans*)-2-phenyl-1-cyclohexyl et son dérivé acétate.

Entrée	Approche	Solvant	ees(%) <sup>(e)</sup>	eep%(e)	C(%) <sup>(f)</sup>	$\mathbf{E}^{(\mathbf{f})}$
1 <sup>(a)</sup>			58	99	37	>200
2 <sup>(b)</sup>	Acylation	Toluène	71	99	42	>200
3 <sup>(c)</sup>			93	99	48	>200
4 <sup>(d)</sup>	Déacylation	TBME	57	99	36	>200

**a.** Conditions de la réaction: 1 mmole de l'alcool racémique, 3 mmole de l'acétate isopropényle, 200 mg de la *CAL-B*, dans 2 mL du toluène à une température ambiante à 24h. **b.** Conditions de la réaction: à 48 h. **c.** Conditions de la réaction: à 72 h. **d.** Conditions de la réaction: 1 mmole du racémique acétate, 1 mmole du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 mg de le *CAL-B*, dans 2 mL du solvant organique à 40°C à 72h. **e**) l'excès énantiomérique est mesuré par GC ou HPLC chirale. **f.** Conversion : C = eeS/eeP + ees; Sélectivité: E =Ln[(1 C)(1 ee(S))]/Ln[(1 C)(1 + ee(S))].<sup>193</sup>

On observe une *énantio* et *diastéréo*sélectivité importantes de la *CAL-B* sur les mélanges *cis/trans-***3** en acylation et *cis/trans-***3a** lors de la déacylation par hydrolyse alcaline. Les résultats obtenus montrent que seul le *trans-*stéréoisomère réagit avec une sélectivité E > 200.

Le *cis*-diastéréoisomère n'est pas transformé, et cela, très probablement, en raison de sa structure spatiale et des contraintes conformationnelles qui désavantagent l'approche du site actif de la *CAL-B*. Des observations similaires ont été rapportées lors de l'acylation du *cis*- $\beta$ -hydroxy-cyclohexanol catalysée par la *CAL-B*<sup>194</sup> et lors de l'acylation du c-4-tert-butyl-c-2éthynyl- $\gamma$ -1-cyclohexanol catalysé par la *PSL*. L'étude explique que l'isomère *cis* réagit plus lentement que le *trans*-analogue par des effets conformationnels sur la lipase qui affectent à la fois la réactivité et l'énantiosélectivité de cette lipase en fonction de la position équatoriale ou axiale de l'OH et de l'encombrement de la position 2. <sup>195</sup> (*Schéma* 78)

<sup>&</sup>lt;sup>193</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

<sup>&</sup>lt;sup>194</sup> Réf192a: L. M. Levy, J. R. Dehli, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2003, <u>14</u>, 2053–2058.

<sup>&</sup>lt;sup>195</sup> R. Tanikaga, Y. Matsumoto, M. Sakaguchi, Y. Koyama, K. Ono. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, <u>44</u>, 6781–6783.



<u>Schéma 78</u> : Equilibre conformationnel du cis/trans 1-phénylcyclohexanol 3.

Le DC par acylation du *cis/trans-***3** avec la *CAL-B* a montré une sélectivité élevée (E > 200) et une haute conversion de C = 48% après 72 h d'agitation (**entrée 3**), le *trans-(1R, 2S)-***3a** est récupéré avec  $ee_p > 99\%$ . Lors de l'acylation du stéréoisomère *trans-***3**, le temps de réaction est prolongé à 72h pour améliorer la même conversion obtenue après 24 h dans des conditions identiques (**tableau 9, entrée 2**). La *CAL-B* maintient une sélectivité optimale lors de l'hydrolyse alcaline du mélange *cis/trans-***3a** (E > 200) et la conversion a atteint C = 36% après 72 h, en faveur de *trans-(1R, 2S)-***3** qui est obtenu avec  $ee_p > 99\%$  (**entrée 4**). Pour le même temps de réaction, lors de l'hydrolyse de l'isomère *trans-***3a** la conversion obtenue est C = 46.5% (**tableau 8, entrée 2**) avec la même sélectivité (E > 200).

La séparation des huit isomères du *cis/trans*-alcool **3** et de *cis/trans*-acétate **3a** est réalisée par l'analyse GC chirale. Le premier chromatogramme (*Chromatogramme 4*) représente présente le mélange des 4 diastéréoisomères racémiques *cis/trans* alcools et acétates et donc les 8 énantiomères qui sont parfaitement séparés. Le chromatogramme qui suit (*Chromatogramme 5*) présente le résultat obtenu aprés l'hydrolyse du *cis/trans*-2-phénylcyclohexanol par la *CAL-B*.


Chromatogramme 4 : Chromatogramme du mélange racémique cis/trans-3 et 3a.



*<u>Chromatogramme 5</u>* : DCE par hydrolyse alcaline du mélange racémique cis/trans-3a.

#### V.5. CONCLUSION

La réaction de DC par hydrolyse alcaline avec la *CAL-B* est appliquée sur des dérivés de type *trans-*2-arylcyclohexanols et présente une sélectivité élevée (E > 200). La performance de cette réaction est améliorée avec différentes types de structure qui permet d'accéder directement à de nouveaux auxiliaires chiraux intéressants avec des excès énantiomériques très élevés, les alcools et les acétates énantiomériquement sont obtenus plus de 99% ee.

Nous avons comparé les deux approches de déacylation et d'acylation sur ces alcools et nous avons mis évidence une meilleure efficacité de la *CAL-B* en hydrolyse alcaline par rapport à l'acylation avec les deux esters d'énols dans les mêmes solvants organiques. On constate que la structure du groupe aryle a eu une influence significative sur la réactivité de la lipase *CAL-B*. La substitution du cycle aromatique par un groupement *méthoxy* en position ortho et l'hydrophobicité du solvant organique a provoqué une diminution de la réactivité et la sélectivité de la réaction.

Nous avons mis en œuvre les meilleures conditions pour le DC d'un mélange stéréoisomères de *cis/trans*-2-phényl-1-cyclohexanol et l'acétate correspondant par deux voies complémentaires l'acylation et la déacylation. Les résultats obtenus ont montré que la *CAL-B* a présenté un énantio- et diastéréosélectivité pour le *trans*-(R)-énantiomère au détriment de l'isomère *cis* qui ne réagit pas. La résolution catalysée par la *CAL-B* du mélange *cis/trans*-2-arylcyclohexanols est une approche facile et pratique pour fournir un seul stéréoisomère d'un mélange de quatre isomères avec un excès énantiomérique élevé. Ces résultats sont publiés dans *Tetrahedron : Asymmetry*. <sup>196</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>196</sup> F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2017**, <u>28</u>, 1644–1650.

## **DEUXIÈME PARTIE**

## SIXIÈME CHAPITRE

## HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE NOUVEAUX

## ESTERS AMINÉS EN MILIEU ORGANIQUE

### ALCALIN

#### VI.1. INTRODUCTION

L'un des défis majeur ces dernières années est d'utiliser de nouvelles méthodologies pratiques avec des voies faciles et plus respectueuses des principes de chimie verte pour accéder molécules énantiomériquement pures. Ce chapitre est consacré à l'étude de la réaction de dédoublement cinétique de composés de types esters aminés dérivés des « **aryl-alkyl-carbinols** » par hydrolyse avec des sels de carbonate et en présence de la lipase *Candida antarctica B (CAL-B)* en milieu organique. Cette approche bénéficie de nombreux avantages dont l'essentiel est de permettre la récupération facile des produits de la réaction après un simple lavage acide. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des travaux de Nedjma MELAÏS <sup>197</sup> où ce nouveau type d'agents acylants de type amino esters vinyliques a été développé pour la première fois et ensuite impliqué dans la résolution cinétique enzymatique du phényléthanol.

#### VI.2. Objectif de travail

Un aspect important de la chimie organique actuelle est la limitation de l'utilisation des solvants. Depuis plusieurs d'années, une des orientations des travaux de notre groupe de recherche est de parvenir à accéder aisément aux deux énantiomères (substrat et produit) avec de nouveaux agents acylants après une résolution cinétique, sans utiliser la chromatographie flash. Nous avons poursuivi le projet des amino esters vinyliques avec l'objectif d'améliorer les résultats antérieurs, de développer cette approche et de l'appliquer dans de nouvelles conditions avec de nouveaux substrats.

La première approche a été réalisée en 2004 <sup>198</sup> en utilisant l'AS comme agent acylant, dans ce cas, les énantiomères substrats et produits sont obtenus par simple lavage basique. En 2016, N. Melais a utilisé pour la première fois de nouveaux agents acylants de type amino esters vinyliques dans des réactions de dédoublement cinétique. Ce travail a abouti à la séparation facile des énantiomères par un simple lavage acide par une nouvelle approche. Les résultats obtenus lors de ce travail montrent que ces amino esters vinyliques sont réactifs mais peu sélectifs que ce soit en acylation ou en hydrolyse conventionnelle des esters benzyliques

<sup>&</sup>lt;sup>197</sup> N. Melais ; Dédoublement cinétique enzymatique d'alcools hétérocycliques d'intérêt potentiel par divers modes d'accès. Thèse de doctorat 2016.

<sup>&</sup>lt;sup>198</sup> Réf122: N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J-C. Fiaud, Tetrahedron Lett., 2004, <u>45</u>, 627–630.

racémiques, avec la *CAL-B*. Une approche basée sur le mode de déacylation lipasique en milieu organique alcalin <sup>199</sup> avec le carbonate de sodium va être appliquée sur des esters aminés dérivés des aryl-alkyl-carbinols qui ont un intérêt potentiel pour accéder aux alcools chiraux par une voie aisée.

L'emploie de nouveaux types des agents acylants permet de récupérer les deux antipodes par une simple extraction liquide-liquide ; nous avons envisagé l'étude de différentes possibilités de déacylation des esters aminés. L'examen des paramètres pouvant intervenir sur le processus catalytique de cette réaction, tels que la nature du nucléophile, l'hydrophobicité du solvant et la concentration du milieu réactionnel est essentiel pour accéder aux briques moléculaires énantiomériquement enrichies lors de l'hydrolyse enzymatique. L'avantage de cette dernière se présente dans la séparation de l'alcool-produit et l'ester-substrat par un lavage acide en évitant l'emploie de la chromatographie sur colonne, qui peut être coûteuse et dangereuse à grande échelle. Nous avons poursuivi ces travaux en utilisant l'hydrolyse alcaline en milieu organique des esters aminés dérivés des aryl-alkyl-carbinols avec la *CAL-B*. Le schéma suivant illustre la méthodologie du travail :



Schéma 79 : Méthodologie de l'hydrolyse enzymatique des esters amines en milieu alcalin.

<sup>&</sup>lt;sup>199</sup> Réf84: M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2012, 23(11), 828–833.

#### VI.3. Modes de synthèse des esters aminés

Comme nous l'avons déjà mentionné, les substrats sur lesquels nous avons travaillé sont des alcools benzyliques secondaires chiraux de type « *aryl-alkyl-carbinols* ». On présentera ici les processus synthétiques des esters aminés correspondants.

#### Synthèse des 1-phényl-éthyl ester aminés 9a-e

La première partie de travail sera réalisé sur des esters racémiques synthétisé à partir de l'alcool **1-phényl éthanol 7** et des diverses formes d'amine (cyclique et linéaire). Cette synthèse se fait en deux étapes  $^{200}$  (*Schéma 80*) :

- Etape A : synthétise du 1-phényléthyl 2-chloroacétate par traitement d'un mélange de phénylethanol rac-9 et de pyridine avec 1.2 équivalent du chlorure d'acyle pour donner du 1-phenyléthyl 2-chloroacétate avec un rendement de 92%.
- Etape B : faire réagir ce chlorure d'acide avec des différents types d'amines afin d'obtenir différents esters.



Schéma 80 : Procédure de synthèse des 1-phényl-éthyl esters amines.

> Le 1-phényléthyl diméthylglycinate ester 9e n'a pas pu être synthétisé à partir de ce protocole ; cela est dû probablement à la volatilité du diméthylamine. Par conséquent un autre mode de synthèse du (±)-9e est appliqué. Ce dernier consiste à traiter le N/, N/-

<sup>&</sup>lt;sup>200</sup> V. Fedi, M. Altamura, G. Balacco, F. Canfarini, M. Criscuoli, D. Giannotti, C. A. Maggi, *Journal of medicinal chemistry.*, **2004**, <u>47(27)</u>, 6935-6947.

Diméthylglycine avec le chlorure d'oxalyle, le phényléthanol est ensuite ajouté en un seul pot (*Schéma 81*). Le dérivé **9e** est obtenu avec un rendement chimique >65%.



<u>Schéma 81</u> : Modes de synthèse du 1-phényléthyl diméthylglycinate 9e.

#### Synthèse des esters aminés dérivé des arylakylcarbinols 10-15e

Le deuxième type des esters aminés sont synthétisés à partir des arylalkylcarbinol **10-15**. Lors de la synthèse de ces derniers en suivant le même protocole opératoire utilisé avec le 1-phényléthanol (substrat modèle) un problème de reproductibilité s'est révélé. Nous avons été obligés de trouver une nouvelle procédure opératoire pour synthétiser les esters désirés.

Plusieurs modes opératoires testés N,N'sont tels que : l'utilisation du Dicyclohexylcarbodiimide DCCI et la DMAP dans le dichlorométhane.<sup>201</sup> L'ajout du 1-Hydroxybenzotriazole HOBT pour défavoriser la formation des produits secondaires. Une autre tentative consiste à synthétiser l'ester en présence d'un agent de couplage <sup>202</sup> le 2-(1H-7azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate TATU dans le dichlorométhane pendant 24h. Toutes ces tentatives sont infructueuses et n'apportent aucune amélioration à la réaction, on obtient un produit final impur avec un faible rendement.

Finalement, l'utilisation du Boc<sub>2</sub>O <sup>203</sup> en présence d'une quantité catalytique de DMAP sans solvant à une température de 50°C a permis de récupérer le produit final avec de bons rendements chimiques 61-80% après une flash chromatographie (éluant : Éther de Pétrole/acétate d'éthyle : 60/40). Cette procédure de synthèse est validée et appliquée pour tous les autres motifs alcools (*Schéma 82*).

<sup>&</sup>lt;sup>201</sup> B. Neises, W. Steglich, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., **1978**, <u>17</u>, 522–524.

<sup>&</sup>lt;sup>202</sup> J-d'Amour. K. Twibanire, T. B. Grindley, Org. Lett., **2011**, <u>13(12)</u>, 2988–2991.

<sup>&</sup>lt;sup>203</sup> A. Sakakura, K. Kawajiri, T. Ohkubo, Y. Kosugi, K. Ishihara, J. AM. CHEM. SOC., 2007, <u>129</u>, 14775-14779.



Schéma 82 : Synthèse des esters racémiques via Boc<sub>2</sub>O.

Les esters racémiques sont obtenus avec de bons rendements chimiques. Les caractéristiques structurales des esters synthétisés sont établies par les méthodes spectroscopiques suivantes : résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H), du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C).

# VI.4. Étude de l'hydrolyse alcaline avec la *CAL-B* des phényléthyl esters aminés racémiques

Les substrats du 1-phényléthyl esters aminé racémiques **9a-e s**ont impliqués dans la réaction de dédoublement cinétique. La réaction d'hydrolyse alcaline en milieu non aqueux avec les sels de carbonate et la lipase *CAL-B* est réalisée selon le protocole opératoire mis au point. <sup>204</sup> (*Schéma 83*). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 11**.



<u>Schéma 83</u>: Hydrolyse alcaline des esters aminé racémiques 9a-e.

<sup>&</sup>lt;sup>204</sup> Réf84 : M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche. O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2012. 23(11), 828–833.

$ \begin{array}{c}                                     $					
Ph Solvant, 72h Ph Ph					
Entrée	Ester	Solvant	Lipase Qts (mg)	Carbonate	C (%) <sup>b</sup>
1		Toluène	40	N. CO	NR
2			80	$Na_2CO_3$	19
3			40	G. CO	NR
4			80	$Cs_2CO_3$	NR
5		Et <sub>2</sub> O	40	Na CO	26
6			80		14
7	0		40	CarCO	NR
8	Ŭ , N		80	$CS_2CO_3$	NR
9	or V \	TRMF	40		NR
10	Ph \		80		17
11	Ju	CH-CN	40		NR
12		CHI3CIN	80		NR
13		ТНЕ	40		NR
14		ППГ	80		NR
15		DIDE	40		NR
16		DILE	80		29
17		Diovane	40		NR
18		Dioxane	80		NR
19	o N N	Toluène	40		19
20			80	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	29
21		Et <sub>2</sub> O	40		36
22			80		34
23	Ph	TBME	40		26
24	9Ь		80		38
25		DIPE	40		23
26			80	4	37
27		Toluène	40	4	19
28			80	4	39
<b>29</b>		Et <sub>2</sub> O	40	4	31
30	<u> </u>		80		35
31		TBME	40	4	25
32			80	4	41
33	Phr > 9r		40	4	23
34	76	DIPE	80		54

<u>**Tableau 11**</u> : Hydrolyse avec la *CAL-B* de esters amines racémiques **9a-e**.

35		Toluàna	40	24
36	O Ph 9d	Toluene	80	30
37		Et <sub>2</sub> O	40	32
38			80	27
39		TBME	40	37
40			80	43
41		DIDE	40	40
42		DILE	80	44
43		TDME	40	37.1
44			80	40.8
45		DIPE	40	36.7
46			80	40.5
	9e			

a. Conditions de la réaction : 1 mmole d'ester racémique, 1 mmole carbonate de sodium, en présence de la *CAL-B*, dans 3 mL du solvant organique à 40°C au bout de 72 h.
b. Conversion calculée à partir du spectre RMN.
\*NR : pas de réaction.

On observe que la nature de l'amine, celles du solvant ou du sel de carbonate ont un impact important sur la réactivité de la lipase et que les meilleures conversions sont obtenues avec 80 mg de la *CAL-B*. Le carbonate de césium Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> inhibe complètement l'activité catalytique de la *CAL-B* (entrée 3, 4, 7 et 8) lors de l'hydrolyse de l'ester 1-phényléthyl diéthylglycinate contrairement au carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Cela est probablement dû à la taille importante du Césium (M = 132.9g/mol) qui réduit les interactions avec le substrat dans le site actif. Par ailleurs, l'utilisation de solvants tels que le CH<sub>3</sub>CN, le Dioxane ou le THF entraine une inhibition de la *CAL-B* (entrée 11-14 et 17-18).

A partir de l'hydrolyse de l'ester **9e**, l'étude de la déacylation des substrats est poursuivie avec le carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans quatre solvants : le Toluène, l'Et<sub>2</sub>O, le TBME et l'DIPE pour lesquels la conversion varie entre 14% < C < 29%.

La *CAL-B* montre une grande affinité envers les autres substrats en présence du TBME et l'DIPE. Elle est plus réactive avec 80mg de quantité avec les esters **9c**, **9d** et **9e** où la conversion est supérieure à 40% (**entrées 32, 40, 42, 44 et 46**). Cette étude a permis d'optimiser les conditions d'hydrolyse des esters aminés dérivés du phényléthanol catalysés par la *CAL-B*. Les résultats seront appliqués sur une série de nouveaux substrats modèles.

Suite à ces essais, les conditions réactionnelles optimales de l'hydrolyse alcaline sont 80 mg de *CAL-B* avec l'DIPE comme solvant. Le meilleur groupement partant est l'ester aminé substitué par un diméthylamine, ce choix est justifié par la facilité de synthèse de l'ester aminé de départ avec la diméthylglicine qui est réalisé en une seule étape.

La suite de l'étude est réalisée sur une série de réactions avec différents modèles d'esters aminés dont les alcools sont des briques moléculaires importantes.

#### VI.5. Application de l'hydrolyse alcaline avec la CAL-B : Exemplification

Afin de valider les résultats obtenus précédemment dans la réaction d'hydrolyse alcaline avec la *CAL-B* des racémiques phényléthyl esters. Cette nouvelle alternative permet de faciliter la récupération des deux énantiomères optiquement enrichis avec un simple traitement acide. Nous examinons l'influence de la partie acyle sur la réactivité et la sélectivité de la *CAL-B* dans la réaction d'hydrolyse.

#### - Les modèles choisis

Pour réaliser cette étude, les nouveaux esters aminés sont synthétisés à partir des alcools secondaires de type « aryl-alkyl-carbinols », qui sont des briques moléculaires intéressantes en raison de leur activité biologique. <sup>205</sup> Les alcools secondaires sélectionnés sont : 4- methoxyphényéthanol **10**, naphtyléthanol **11**, 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtol (l' $\alpha$ -tetralol) **12**, 2,3-dihydro-1H-inde-1-ol (1-indanol) **13**, 1-Acenaphthenol **14** et 4-bromophényléthanol **15**. Les alcools **11**; **12**; **13** et **14** sont commerciaux, tandis que le **10** et **15** sont synthétisés par une réduction des cétones correspondants avec LiAlH<sub>4</sub> (*Schéma 84*).



<u>Schéma 84</u> : Réduction des cétones benzyliques en alcools correspondants.

Les dérivés esters sont :4-methoxyphényéthyl-diméthylglycinate **10e**, naphtyléthyldiméthylglycinate **11e**, 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtyl-diméthylglycinate **12e**, 2,3-dihydro-1H inden-1-yl-diméthylglycinate **13e**, 1-Ac2naphthyl-diméthylglycinate **14e** et 4bromophényléthyl-diméthylglycinate **15e**. Les esters **10-15e** sont synthétisés à partir des alcools correspondants **10-15**. Le mode de synthèse sélectionné est l'estérification avec le

<sup>&</sup>lt;sup>205</sup> T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe, *tetrahedron letters.*, **1994**, <u>35</u>, 7997-8000.

Boc<sub>2</sub>O. <sup>206</sup> (Schéma 82). Le Schéma 85 présente l'ensemble des substrats utilisés lors de l'exemplification.



Schéma 85 : Substrats d'exemplification.

#### - Hydrolyse enzymatique des esters aminés dérivé des aryl-alkyl-carbinols

Le protocole opératoire optimisé est appliqué au DC des esters aminés par hydrolyse alcaline avec la *CAL-B* : 1 équivalent d'ester racémique **10-15e** avec 1 équivalent de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en présence de **80 mg** de la lipase *CAL B* et 3 mL du diisopropyléther (DIPE) (*Schéma 86*) la réaction se déroule à 40°C durant 72h.



<u>Schéma 86</u> : Hydrolyse enzymatique des esters aminés.

<sup>&</sup>lt;sup>206</sup> Réf 203: A. Sakakura, K. Kawajiri, T. Ohkubo, Y. Kosugi, K. Ishihara, J. Am. Chem. Soc., 2007, <u>129</u>, 14775-14779.

Le **tableau 12** présente l'ensemble des résultats obtenus lors de l'hydrolyse alcaline en milieu organique des esters aminés avec la *CAL-B*.

Entrée	Structure	ee <sub>p</sub> % (Rdt%) ( <i>R</i> )-enantiomer	ee <sub>s</sub> % (Rdt%) (S)- enantiomer	C(%)	Ε
1	OR 9e	98 (26)	75 (49)	43	>200
2	OR O 10e	ND (trace)	57 (78)	-	-
3	OR 11e	98 (33)	61 (53)	39	>100
4	OR 12e	98 (41)	98 (45)	50	>500
5	OR 13e	97 (21)	73 (59)	43	>100
6	OR 14e	26 (46)	28 (21)	52	2
7	OR Br 15e	88.4 (30)	98.5 (31)	53	79

Tableau 12 : Hydrolyse enzymatique du O-protégé aryl-alkyl-ester aminé

**a.** Conditions de la réaction : 1 mmole d'ester racémique, 1 mmole Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 80 mg de la *CAL-B*, dans 3 mL d'DIPE à 40°C au bout de72 h. **b.** Conversion : C = eeS/eeP + eeS; Sélectivité:  $E = Ln[(1 \ C)(1 \ ee(S))]/Ln[(1 \ C)(1 + ee(S))]$ .<sup>207</sup> **c.** Rendement isolé après une extraction liquide-liquide. **\*ND** : Non déterminé.

L'analyse des résultats de **tableau 12** a montré que l'hydrolyse alcaline de ces substrats avec la *CAL-B* a une activité très intéressante. Les dérivés **9e**, **11e**, **12e** et **13e** ont hydrolysés avec une haute sélectivité ( $\mathbf{E} > 100$ ) et une bonne conversion **39** <  $\mathbf{C} < 50$ . Le meilleur résultat est

<sup>&</sup>lt;sup>207</sup> (a) Réf71: C.S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299 ; (b) Réf72: H. B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution, Topics in stereochemistry*. E. L. Eliel, S. H. Wilen, Ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1988, <u>18</u>, 249-330.

observé avec l'ester **12e**, les deux énantiomères alcools sont obtenus énantiomériquement enrichis avec un ee = 98% (**entrée 4**). L'analyse HPLC chirale de l'entrée 5 est représentée dans le chromatogramme 6.



*Chromatogrammes* 6 : DCE par déacylation du (±)-12e.

La nature du l'alkyl du substrat affecte fortement à la sélectivité de la réaction (**entrée 3 vs** 6) ; La *CAL-B* a montré une faible sélectivité E = 2 vis-à vis de l'ester **14e** contrairement au substrat **11e** (E > 100) son analogue de structure. On a pu constater que la présence d'un groupe *metoxy*- en position 4 du substrat **10e** influe négativement sur l'activité lipasique de la *CAL-B* (**entrée 2**). En revanche, avec le substrat **15e** substitué par un halogène (Br) a donné une conversion C = 53% et une sélectivité importante de E=79 les alcools sont obtenus avec des excès énantiomérique de 88,4 % pour l'alcool (*S*) et de 98,5% pour l'alcool (*R*) (**entrée** 7).

Après plusieurs essais du mode de traitement de la réaction d'hydrolyse (HCl (2N), la résine amberlite), nous avons adopté le mode initial utilisé par **N. Melaïs** constitué d'un lavage acide par HCl (5M) suivi d'une extraction avec l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O) (*Schéma 87*). La phase organique contient l'alcool qui a réagi et la phase aqueuse l'ester aminé qui n'a pas réagi. Cette phase est lavée avec une solution de KOH puis l'extraction est faite à l'Et<sub>2</sub>O, l'alcool qui n'a pas réagi est récupéré dans la phase organique issue de cette extraction.



<u>Schéma 87</u> : Traitement de la réaction d'hydrolyse des esters aminés.

#### VI.6. CONCLUSION

La réaction de DC par hydrolyse alcaline avec la *CAL B* est appliquée sur une nouvelle série de substrats de type **Aryl-alkyl-**esters aminés. Les conditions de la réaction sont optimisées sur une variété des esters aminés **9a-e** dérivés de l'alcool **1-phényléthanol.** Les résultats obtenus sont appliqués sur des esters aminés **10-15e** dérivés des alcools secondaires de type « Aryl-alkyl-carbinol ».

La méthode mise au point pour synthèse des esters aminés **10-15e** est l'estérification avec le  $Boc_2O$  en présence d'une quantité catalytique de DMAP sans solvant. Les substrats sont obtenus avec de bons rendements chimiques 61% < Rdt < 80%.

L'optimisation des conditions d'hydrolyse des esters amines dérivés du phényléthanol catalysés par la *CAL-B* avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> montre un impact de la nature de l'amine, du type de solvant ou de la nature du sel de carbonate. Le meilleur groupement partant est l'ester aminé substitué par un diméthylamine, ce choix est justifié par la facilité de synthèse de l'ester aminé de départ avec la diméthylglycine qui est réalisé en une seule étape.

Les meilleures conditions d'hydrolyse alcaline avec la *CAL-B* sur les substrats de type 1phényléthyl esters aminés sont : 1mmole de racémique pour 1 mmole de carbonate de sodium avec 80mg de la *CAL-B* dans le DIPE durant 72h. Ces conditions sont sélectionnées pour l'exemplification de cette réaction sur une série de nouveaux substrats modèles. L'utilisation des esters en tant que fraction acylé présente permet d'éviter la séparation de l'ester (substrat) et l'alcool (produit) par chromatographie sur colonne. Les énantiomères alcools sont obtenus par simple extraction liquide-liquide. L'alcool (R) produit est récupéré dans la phase organique et l'alcool (S) est récupéré après traitement de la phase aqueuse par un lavage acide de l'ester aminé qui n'a pas réagi.

L'hydrolyse alcaline de ces nouveaux substrats avec la *CAL-B* est très intéressante, les dérivés **9e**, **11e**, **12e** et **13e** ont hydrolysés avec une haute sélectivité (E > 100) et de bonnes conversions qui varient entre 39% et 53% de l'ester racémique pour obtenir les (*R*)-alcools énantiomériquement enrichis. Le meilleur résultat est trouvé avec le substrat **12e** dédoublé avec une conversion maximale C= 50% et une excellente sélectivité E > 500, le substrat et le produit sont retrouvés avec 98% d'excès énantiomérique.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

L'axe principal de ces travaux de thèse est l'utilisation des lipases pour accéder aux briques moléculaires énantiopures par l'approche du dédoublement cinétique de racémiques. Dans ce contexte, le fil conducteur des cette recherche est la mise en œuvre de procédés propres, sûrs, peu couteux en matières premières, économe en énergie dans le respect des principes de chimie verte.

Au cours de ce travail, nous avons développé l'utilisation de lipases comme catalyseurs dans des dédoublement de molécules racémiques d'intérêt. Des réactions de dédoublement cinétique par acylation et/ou déacylation enzymatique ont été étudiées sur plusieurs alcools secondaires importants afin d'accéder aux énantiomères enrichis. Dans tous les cas, l'optimisation du DCE est réalisée par l'examen de divers paramètres réactionnels impactant l'activité et la sélectivité du système enzymatique (lipase, solvant, agent acylant, additif...etc.). Une attention particulière a été accordée à l'application de la nouvelle méthode d'hydrolyse enzymatique alcaline en milieu non conventionnel à de nouveaux substrats avec dans tous les cas, une meilleure compréhension des interactions et de l'environnement réactionnel. Par ailleurs, et dans le contexte de la facilité de récupération des énantiomères substrat et produits, nous avons développé de nouveaux types d'agents acylants.

**Dans la première partie de cette thèse**, une mise au point bibliographique récente expose la diversité d'utilisation des biocatalyseurs qui offrent une nouvelle alternative aux réactifs conventionnels pour le contrôle de la chiralité dans les molécules organiques. Les hydrolases, et les lipases particulièrement, sont de précieux outils catalytiques pour le développement de méthodes simples et efficaces qui s'inscrivent totalement dans la chimie durable qui s'impose aux chimistes du 21<sup>eme</sup> siècle. L'enzyme étant très sensible à son microenvironnement, il est impératif de maitriser les conditions réactionnelles d'activation de ces biocatalyseurs et de comprendre l'impact des nombreux paramètres influant sur la réactivité et la sélectivité des réactions enzymatiques.

✤ Dans la seconde partie de la thèse sont présentés les résultats des travaux de recherche qui sont répartis sur trois chapitres avec (i) l'étude du dédoublement cinétique du menthol racémique par la lipase de *Candida Cylindracea* (*CCL*). (ii) l'étude du

dédoublement par la lipase *candida antarctica B* (*CAL-B*) des alcools de type "**arylcyclohexanols**" en comparant deux approches réactionnelles. (iii) la synthèse de nouveaux **esters aminés** dérivés des alcools de type arylalkylcarbinols et leur utilisation comme nouveaux substrats à dédoubler en hydrolyse alcaline catalysé par la *CAL B*.

Dans la première partie, nous avons étudié le DC du (±)-menthol par transestérification catalysée par des lipases. L'obtention du l-(-)-menthol sous forme énantiopure est une préoccupation industrielle importante, c'est l'un des produits le plus vendu au monde dont la demande ne cesse de croitre. Cela justifie les efforts de recherche pour mettre en œuvre de nouvelles voies d'accès efficaces. Nous avons étudié l'influence de plusieurs paramètres dans la réaction d'acylation enzymatique du *dl*-menthol. Nous avons comparé le comportement de deux lipases libres, la CRL et la CCL pour l'acylation du (±)menthol et nous avons constaté que l'activité de la CCL ne dépend pas de la teneur en eau du milieu réactionnel. L'ajout d'un additif, la quinidine influe fortement sur la réactivité et la sélectivité catalytique de la CCL. Les conditions optimales sont mise en œuvre avec la CCL avec l'ester vinylique comme agent acylant et la quinidine comme additif dans le TBME comme solvant. La conversion obtenue est de C=49% avec une haute sélectivité de E=80. Un aspect intéressant de ces résultats est la substitution de TBME à Et<sub>2</sub>O considéré désormais, comme un solvant hautement dangereux. La réaction de transestérification du (±)-menthol avec la CCL a été ensuite réalisée à grande d'échelle et nous avons montré son application dans une production multi gramme. Cette alternative constitue un protocole simple pour la fabrication de l'énantiomère *l*-menthol optiquement actifs à l'échelle industriel. Ces résultats ont été publiés en 2018 dans Research on Chemical Intermediates. 208

Dans la seconde partie des travaux de recherche, nous avons appliqué le DC par hydrolyse avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et la lipase *CAL-B* et sur des dérivés de type *trans-*2arylcyclohexanols, molécules d'un intérêt considérable comme auxilaires chiraux pour les transformations asymétriques ou la synthèse asymétrique de substances physiologiquement actives. Deux approches réactionnelles complémentaires, catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*, sont comparées : la déacylation et l'acylation. L'étude structure-réactivité des arylcyclohexanols est réalisée pour les deux types de réaction dans deux solvants, le TBME et le toluène. Une meilleure efficacité de la *CAL-B* en hydrolyse alcaline est observée

<sup>&</sup>lt;sup>208</sup> Réf168: F.Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Research on Chemical Intermediates*. 2018, <u>44(11)</u>, 6847–6860.

par rapport à l'acylation avec les deux esters d'énols dans les mêmes solvants organiques étudiés. En acylation, les meilleures réactivités et les sélectivités enzymatiques sont obtenues en présence de l'AI comme agent acylant, le trans-arylcyclohexyl acétate (1R,2S)-3a et le *trans*-naphtylcyclohyl acétate (1R,2S)-6a sont obtenus avec 99% ee à C = 47%, la sélectivité étant optimale E > 200. En déacylation, la sélectivité est également excellente E > 200 pour les dérivés trans-phénylcyclohexyl acétate 3a et trans-biphénylcyclohexyl acétate 5a, les conversions varient entre 46,5% < C < 49,5%, les alcools produits (1R, 2S)-3 ou (1R, 2S)-5 présentent des excès énantiomériques élevés ee = 99% et sont obtenus avec de bons rendements. Nous constatons que l'énantiosélectivité de la lipase CAL-B est en faveur de l'énantiomère (1R, 2S) que ce soit en acylation des trans-arylcyclohexanols ou en déacylation et des trans-arylcyclohexyl acétates. Les meilleures conditions en acylation et en déacylation sont appliquées au mélange de stéréoisomères cis/trans-2-phényl-1-cyclohexanol et leurs acétates correspondants. Les résultats obtenus montrent que la CAL-B présente un énantio- et diastéréosélectivité pour le trans-(R)-énantiomère au détriment de l'isomère cis qui ne réagit Cette voie de synthèse est une approche facile et pratique pour fournir un seul pas. stéréoisomère à partir d'un mélange de quatre isomères avec un excès énantiomérique élevé. Ces résultats ont été publiés en 2017 dans Tetrahedron Asymmetry.<sup>209</sup>

Pour la troisième partie de ces travaux thèse, la réaction de DC par hydrolyse alcaline avec la *CAL B* est appliquée sur une nouvelle série de substrats de type **Aryl-alkyl-**esters aminés. L'utilisation d'esters aminés tant que fraction acylée est très intéressante et permet d'éviter la séparation de l'ester (substrat) et l'alcool (produit) par chromatographie sur colonne. Les énantiomères alcools sont obtenus par simple extraction liquide-liquide. Afin de réaliser cette étude, plusieurs méthodes de synthèse des nouveaux esters aminés **9e-15e** sont mises en œuvre et l'estérification est réalisée avec le Boc<sub>2</sub>O en présence d'une quantité catalytique de DMAP sans solvant, les substrats sont obtenus avec de bons rendements chimiques 61% > Rdt > 80%.

L'étude de plusieurs paramètres sur l'activité de la lipase *CAL-B* dans la réaction d'hydrolyse alcaline en milieu non aqueux avec des sels de carbonate a été réalisée sur une série de 1-phényléthyl esters aminé racémiques **9a-e**. La nature de l'amine, du solvant ou du sel de carbonate ont un impact important sur la réactivité de la lipase. L'optimisation des conditions d'hydrolyse des esters amines dérivés du phényléthanol catalysés par la *CAL-B* avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

 <sup>209</sup> Réf196: F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2017, <u>28</u>, 1644–1650.

montre un impact de la nature de l'amine, du type de solvant ou de la nature du sel de carbonate. Le meilleur groupement partant est l'ester aminé substitué par un diméthylamine, ce choix est justifié par la facilité de synthèse de l'ester aminé de départ avec la diméthylglicine qui est réalisé en une seule étape. Les meilleures conditions d'hydrolyse alcaline avec la CAL-B sur les substrats de type phényl-éthyl esters aminés sont sélectionnées pour la mise en œuvre de l'exemplification de la réaction sur une série de nouveaux esters aminés 10e-15e synthétisés à partir d'alcools secondaires de type « arylalkylcarbinols » briques moléculaires intéressantes en raison de leur activité biologique. L'hydrolyse alcaline de ces nouveaux substrats avec la CAL-B est très intéressante, les dérivés 9e, 11e, 12e et 13e ont hydrolysés avec une haute sélectivité (E > 100) et de bonnes conversions qui varient entre 39% et 53% de l'ester racémique pour obtenir les (R)-alcools énantiomériquement enrichis. Le meilleur résultat a été trouvé avec le substrat 12e dédoublé avec une conversion maximale C= 50% et une excellente sélectivité E > 500, les énantiomères substrat et produit sont obtenus avec 98% d'excès énantiomérique. L'alcool (R) produit est récupéré dans la phase organique et l'alcool (S) qui n'a pas réagi est récupéré après traitement de la phase aqueuse par un lavage acide de l'ester aminé qui n'a pas réagi.

Ainsi, la mise en œuvre de procédés propres et durables, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la réactivité/sélectivité des lipases et l'accès à des molécules chirales à haute valeur ajoutée ont été les objectifs de ces travaux de thèse. La sélectivité du dédoublement cinétique des alcools secondaires a été réalisée en ajustant les paramètres réactionnels afin d'impacter favorablement la différenciation énantiomérique des lipases. L'acylation sélective du (±)-menthol avec la *CCL* a été réalisée et ensuite transposée à grande d'échelle. Nous avons rapporté de nouvelles applications de l'hydrolyse avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> avec la lipase *CAL-B* en milieu organique pour deux séries substrats : (i) Les dérivés de type acétate de 2-aryl-1-cyclohexyle *cis/trans* pour lesquels la réaction est totalement *diastéréo* et *énantio*sélectivité. (ii) une nouvelle série de substrats de type Aryl-alkyl-esters aminés qui montre une grande réactivité et sélectivité de la lipase avec l'obtention des deux énantiomères par simple extraction liquide-liquide, sans utilisation de la chromatographie sur colonne.

CONCLUSION GÉNÉRALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### **Généralités**

#### <u>Appareillage et analyse</u>

La caractérisation et l'identification des produits synthétisés ou bien dédoublés ont été effectué par divers méthodes d'analyse :

#### Méthodes spectrales

Φ Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN<sup>1</sup>H) et de carbone (RMN<sup>13</sup>C) ont été enregistrés sur des spectromètres Brüker-300 dans des solutions de chloroforme deutéré (CDCl<sub>3</sub>) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard, ou de méthanol deutéré (CD<sub>3</sub>OD). Les déplacements chimiques "δ" sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne (1 seul pic à δ = 7,26 ppm en RMN<sup>1</sup>H et 3 pics à δ = 77 ppm en RMN<sup>13</sup>C pour le CDCl<sub>3</sub>, 1 seul pic à δ = 4.87 ppm en RMN<sup>1</sup>H et 7 pics à δ = 49 ppm en RMN<sup>13</sup>C pour le CD<sub>3</sub>OD). Les abréviations suivantes ont été utilisées : s = singulet, d = doublet, dd = doublet de doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Les constantes de couplage (J) (valeurs absolues) sont mentionnées en Hertz (Hz).

 $\cancel{P}$  Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre *Shimadzu* FTIR-8400S. Les nombres d'onde "n" 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 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

 $\cancel{P}$  Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse FINNIGAN-MAT TSQ-7000 ou FINNIGAN-MAT LCQ par le service spectroscopie de masse de l'Université Catholique de Louvain. Les masses correspondantes aux principaux pics sont suivies des pourcentages relatifs des fragments (m/z).

#### Méthodes d'analyse chromatographiques

 $\clubsuit$  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 (l = 254 nm) ou à l'aide d'un révélateur chimique KMNO<sub>4</sub> ou la ninhydrine.

*A* Les chromatographies liquides sur colonne ont été effectuées sur gel de silice Merck
 230-400 Mesh (0,04-0,063 mm). Les solvants utilisés sont de qualité technique mais distillés
 avant usage pour éliminer les graisses ou de qualité p.a.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre PerkinElmer 241 MC et les concentrations sont données en g/100mL.

#### Solvants et réactifs

#### A Solvants

Les solvants utilisés sont de qualité p.a. ou distillés avant emploi. Le toluène est distillé sur sodium sous atmosphère d'argon. L'Ether diéthylique (Et<sub>2</sub>O) est distillé sur sodium/benzophénone sous atmosphère d'argon. Le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) est distillé sur CaH<sub>2</sub> sous atmosphère d'argon. Les solvants utilisés pour les traitements sont des solvants techniques. Les solvants utilisés pour les chromatographies liquides sur colonne : l'éther de pétrole (EP) et l'acétate d'éthyle (EtOAc) est simplement distillés pour éliminer les graisses. Les solvants utilisés en HPLC sont de qualité HPLC, filtrés et dégazés avant usage.

#### A Produits

Les produits chimiques commerciaux utilisés dans ce travail proviennent des sociétés : Sigma-Aldrich, Acros, Fluka, TCI et Alfa Aesar.

#### 

Les enzymes utilisés dans les dédoublements cinétiques des mélanges racémiques sont commerciales et sont achetées de chez les Sigma-Aldrich, Fluka et Amano. Ils sont libres d'origine animale ou microbienne ou immobilisées sur un support acrylique.

#### Chapitre IV

Dédoublement cinétique enzymatique d'un monoterpène : le menthol

#### 1. <u>Synthèse de l'acétate de menthyle racémique</u>

L'acétate de menthyle a été synthétisé par une acylation chimique classique via le menthol racémique correspondant (1 équiv), en utilisant 2 équiv d'anhydride acétique, 2 équiv d' $Et_3N$  et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (0,2 équiv.) dans 5 mL d' $Et_2O$ . Le produit final a été obtenu pur après un traitement standard avec un excellent rendement. La structure a été confirmée par les spectres RMN 1H et 13C.



**Caractéristiques spectrales** 

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**250MHz, CDCl**<sub>3</sub>) :  $\delta$  (**ppm**) = 0.74-0.76 (m, 3**H, cycl**-C<u>H</u><sub>3</sub>), 0.79-0.83 (m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 0.87-0.90 (m, 6**H, 2**C<u>H</u><sub>3</sub>), 0.91-0.98 (m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 1.01-1.10 (m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 1.30-1.39 (m, 1**H, CH** cyclic), 1.41-1.53 (m, 1**H, CH** cyclic), 1.62-1.64(m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 1.66-1.69(m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 1.81-1.90 (m, 1**H, <u>CH</u>**), 1.94-2.00 (m, 1**H, CH**<sub>2</sub> cyclic), 2.02 (s, 3**H, O-C-C**<u>H</u><sub>3</sub>), 4.62-4.71 (m, 1**H**<sub>cycl</sub>, O-C**H**<sub>cycl</sub>).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**62.9MHz, CDCl**<sub>3</sub>): δ (**ppm**) = 170.8, 74.2, 47.1, 41.1, 34.4, 31.5, 26.2, 23.6, 22.1, 21.5, 20.9, 16.5.



Caractéristiques chromatographiques

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.72$ . *Eluant* ( $\mathbf{v}, \mathbf{v}$ ) : EP/Et<sub>2</sub>OAc (9/1). CPG Chirale : Chiralsil-Dex CB: Isotherme = 120°C, débit 1.2mL/min Temps de rétention :  $t_{d-(+)} = 9.587$  min ;  $t_{l-(-)} = 10.850$  min.

#### 2. La procédure générale de la résolution cinétique enzymatique

#### 2.1. L'acylation enzymatique avec les esters énols

1 équivalent du menthol racémique et 3 équivalents d'ester d'énol sont dissous dans 2 ml de solvant. Une quantité appropriée de lipase a été ajoutée et le mélange a été agité à température ambiante. Après élimination de l'enzyme par une filtration et une évaporation du solvant, les deux produits de la réaction l'alcool-substrat et l'acétate-produit ont été séparé par flash chromatographie (EP/EtOAc : 95/5). Les excès énantiomériques sont déterminés par des analyses GC chirales.

#### 2.2. L'acylation enzymatique avec l'anhydride succinique

Dans un schlenk muni d'un barreau aimanté, 1 équivalent du menthol racémique et (1 equivalent) de l'anhydride succinique sont dissous dans 2ml d'éther anhydre, on ajoute ensuite 100mg de la CCL. Le mélange est soumis à une agitation magnétique, à température ambiante, durant 48h. La solution est ensuite filtrée sur papier filtre et l'éther est évaporé. Le filtrat est lavé avec une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, et l'alcool qui n'a pas réagi et le succinate d'ester produit a été séparés par extraction liquideliquide. L'énantiomère qui n'a pas réagi a été récupéré de la phase organique ; la phase aqueuse est lavée avec un solvant organique et traitée en ajoutant une solution de NaOH 1M pour obtenir l'autre énantiomère. Les valeurs des excès énantiomériques ont été quantifiées par une analyse GC chirale.



#### 3. <u>Chromatogrammes de quelques résultats</u>



#### Chapitre V

Acylation/déacylation enzymatique des arylcyclohexanols

#### 1. Protocole opératoire de la réduction du 2-phény1-cyclohexanone par le NaBH4

Dans un bicol porté sous agitation magnétique et contenant une solution du 2-phény1cyclohexanone (10mmoles) dans 60 ml de THF est ajoutée, goutte à goutte, une solution de NaBH<sub>4</sub> (4 équivalents) dans un mélange de THF / H<sub>2</sub>O (4/1 : 80 ml/20 ml) à 0°C. Le suivi de la réaction est assuré par chromatographie sur couche mince, et la réaction est arrêtée après la disparition totale de la cétone de départ après, généralement, 1 heure de temps. Le mélange réactionnel est neutralisé en ajoutant, précautionneusement et à froid, une solution de HCl (1 N), avant que le solvant ne soit partiellement évaporé sous pression réduite et le résidu (dans l'eau) repris avec 3 x (90 ml) d'EtOAc. La phase organique est séchée sur MgSO4 et est ensuite évaporé.



#### **Caractéristiques spectrales**

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**250MHz, CDCl**<sub>3</sub>): δ (**ppm**) = 1.33-1.87 (m, 11H, cyclique+OH), 1.91-2.13(m, 1H, cyclique), 2.46-2.75 (m, 1H, HC-OH), 3.64-4.04 (m, 1H, HC-Ph), 7.02-7.61 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**62.9MHz, CDCl**<sub>3</sub>): δ (**ppm**) = 143.3, 128.8, 128.6, 128, 127.8, 126.9, 74.5, 53.2, 34.5, 33.4, 26.1, 25.1

Partie expérimentale





Caractéristiques chromatographiques

**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{f} = 0.5$ . *Eluant (v,v):* cyclohexane/ EtOAc (8/2). **CPG Chirale :** Chiralsil-Dex CB: Isotherme = 150°C, débit 1.2mL/min. **Temps de rétention** :  $t_{transR}$ = 13.45 min.  $t_{transS}$  = 14.17 min ;

 $t_{cisR} = 16.12 \text{ min}$ ;  $t_{cisS} = 16.52 \text{ min}$ .

#### 2. La synthèse du racémique trans-2-arylcyclohexanols 4-6

Une masse de 0,26 g de tournure de magnésium (10,7 mmole, 1 équivalent) est agitée à reflux dans 1,5 mL du THF anhydre sous d'argon, puis une solution de 10 mmole (1 équiv.) du bromoaryle approprié dilué dans 15 ml de THF a été ajouté goutte à goutte. Une goutte de dibromoéthane a également été additionnée pour initier la réaction. Après 1 heure d'agitation, la solution a été refroidie à -78°C et une quantité de chlorure de cuivre (I) (48 mg, 0,045 équiv.) a été ajoutée. Dix minutes plus tard, un mélange d'oxyde de cyclohexène (0,75 ml, 0,7 équiv.) dans 3 ml de THF a été ajouté goutte à goutte et agité pendant dix minutes à la même température. Ensuite, la température a été progressivement élevée jusqu'à la température ambiante. Après une nuit le mélange réactionnel a été traité avec 15 ml de NH<sub>4</sub>C1 saturé et 10 ml d'Et<sub>2</sub>O ont été ajoutés. La phase organique a été extraire et laver avec de la soude et séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et évaporé sous pression réduite. Le mélange réactionnel brut a été purifié par une flash chromatographie sur gel de silice (éluant : Et<sub>2</sub>O /EP : 50/50).

trans-2-(2-méthoxyphényl)-cyclohexanol 4		
	Formile brut: C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	
HO (±)- trans-4	Masse molaire: 206.28 g/mole	
	$\mathbf{Rdt} = 60\%$	
	Aspect: cristaux jaune	
	<b>Pf:</b> 56.7°C	

#### **Caractérisation spectrale**

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl**<sub>3</sub>) :  $\delta$  (**ppm**) = 1.74-1.94 (m<sub>a</sub>, 4H, cycle), 2.11-2.22 (m<sub>a</sub>, 4H, cycle), 2.51-2.53 (m<sub>a</sub>, 1H, OH), 3.35-3.43 (m<sub>a</sub>, 1H, CH<sub>cycle</sub>-Aryl), 4.08-4.16 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 4.21 (s, 3H, O-C<u>H</u><sub>3</sub>), 7.26-7.56 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques), 7.57-7.62 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques). **RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) :  $\delta$  (**ppm**) = 157.8, 131.6, 127.5, 127.4, 121.1, 110.9, 74.1, 55.6, 45.1, 35.3, 32.4, 26.3, 25.2. **SM (D ESL: m/z)**: 229.68 (IM+Nal<sup>+</sup>, 100%)

**SM (D-ESI ; m/z):** 229.68 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).





**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.67$ . *Eluant (v,v):* cyclohexane/ EtOAc: (80/20). **CPG Chirale :** *Chiralsil-DEX CB*. Isotherme : 170°C ; débit: 1.2 mL/min. **Temps de rétention** :  $t_1 = 7.86$  min.  $t_2 = 7.99$  min.



#### **Caractérisation spectrale**

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 1.43-1.63 (m, 4H, cycle), 1.85 (s, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>-CHOH), 1.93-1.98 (m, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>), 2.18-21 (m, 1H, **OH**), 2.50-2.58 (m, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 3.7-3.78 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>2cycle</sub>), 7.37-7.44 (m, 3H aromatiques), 7.48-7.05 (m, 2H aromatiques), 7.61-7.68 (m, 4H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)** = 144.6, 140.9, 139.7, 128.8, 128.4, 127.4, 127.2, 127, 74.4, 52.8, 34.6, 33.4, 26.1, 25.1.

**HRMS (D-ESI; m/z):** 275.14 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).





Caractéristiques chromatographiques

**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.69$ . *Eluant (v,v):* EP/ EtOAc: (80/20).

**Chiral HPLC:** Colonne : *Chiralpak* IA ; **Eluant** (v,v): iso-hexane/EtOH : 90/10 ; débit 1 mL/min.

**Temps de rétention** :  $t_R = 10.11 \text{ min}$ ;  $t_S = 18.43 \text{ min}$ .



#### Caractérisation spectrale

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.34-1.54 (m, 3H, cycle), 1.58-1.73 (m, 1H, CH<sub>cycle</sub>), 1.83-18 (m, 2H, CH<sub>2cycle</sub>), 1.92-1.99 (m, 2H, CH<sub>2cycle</sub>), 2.15-2.20 (m, 1H, OH), 2.59-2.68 (m, 1H-OH), 3.73-3.81 (m<sub>a</sub>, 1H, CH<sub>cycle</sub>), 7.41-7.45 (dd, 1H, aromatiques), 7.48-7.57 (m, 2H, aromatiques), 7.76-7.88 (m<sub>a</sub>, 4H, aromatiques).

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**75MHz, CDCl**<sub>3</sub>): δ (**ppm**) = 140.8, 133.6, 132.6, 128.4, 127.7, 126.6, 126.1, 126, 125.5, 74.2, 53.3, 34.5, 33.4, 26.1, 25.1.

**HRMS (D-ESI ; m/z):** 249.12 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).


**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.53$ . *Eluant (v,v):* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Chiral HPLC: Colonne : *Chiralpak* IA, Eluant (v,v): iso-hexane/-PrOH : 98/2 ; débit 0.7 mL/min.

**Temps de rétention** :  $t_R = 7.59 \text{ min}$ ;  $t_S = 7.99 \text{ min}$ .

#### 3. Synthèse des racémiques arylcyclohexyls acétates 3a-6a

Dans un petit ballon ; 1mmole d'alcool est additionné à 0,1 mmole de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 4ml d'éther anhydre et 1,2 mmole de triméthylamine (NEt<sub>3</sub>) ; puis 1,5 mmole d'anhydride acétique est ajouté goutte à goutte au mélange réactionnel. La réaction se déroule sous agitation magnétique à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). Lorsque l'acylation est totale, le mélange est dilué dans l'éther et lavé successivement avec une solution de HCl 1N (2x3ml), ensuite avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (2x3ml) et enfin avec une solution saturée de NaCl (5ml). La phase organique est séchée sur MgSO4, filtrée sur célite et évaporée sous vide. Les produits finaux ont été obtenu pur avec un excellent rendement. Les structures chimiques ont été confirmée par les spectres RMN 1H et 13C.



# **Caractérisation spectrale**

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**250MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ (**ppm**) = 1.39-1.9 (m<sub>a</sub>, 5 H cycle), 2.1-2.2 (m, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 2.11-2.23 (m<sub>a</sub>, 1**H**, **CH**<sub>cycle</sub>), 2.59 (s, 3H, -OC-C**H**<sub>3</sub>), 2.6-2.75 (m, 1H, HC-OH), 4.9-5.1 (m, 1H, HC-Ph), 7.1-7.3 (m, 5H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C (62.9MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)** = 170.4, 143.1, 128.2, 127.5, 126.4, 119.9, 75.9, 49.7, 33.8, 32.3, 25.8, 24.8, 21.

Partie expérimentale



**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.79$ . *Eluant (v,v):* cyclohexane/ EtOAc (8/2).

**CPG Chirale :** Chiralsil-Dex CB: Isotherme = 150°C, débit 1.2mL/min

**Temps de rétention** :  $t_{transR}$  = 11.95 min.  $t_{transS}$  = 12.31 min ;

 $t_{cisR} = 13.35 \text{ min}$ ;  $t_{cisS} = 15.77 \text{min}$ .

trans-2-phényl-cyclohexyl acétate 3a	
(±)- trans-3a	Formule brut : C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
	Masse molaire : 218.29 g/mole
	Aspect : huile visqueux

#### **Caractérisation spectrale**

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz**, **CDCl**<sub>3</sub>) :  $\delta$  (**ppm**)= 1.47-1.7 (m<sub>a</sub>, **4H**, cycle), 1.86 (s, 3**H**, O-C-C<u>H</u><sub>3</sub>), 1.91-2.21 (m<sub>a</sub>, 2**H**, **CH**<sub>2cycle</sub>), 2.21-2.25 (m<sub>a</sub>, 2**H**, **CH**<sub>2cycle</sub>), 2.72-2.81 (m, 1**H** cycle), 5.01-5.12 (m<sub>a</sub>, **1H** cycle), 7.19-7.31 (m<sub>a</sub>, 5**H** aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) δ (**ppm**) =170.4, 143.2, 128.3, 127.5, 126.4, 75.9, 49.8, 33.8, 32.4, 25.9, 24.8, 21.





**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.78$ , *Eluant (v,v) :* cyclohexane/ EtOAc (8/2). **CPG Chirale :** Chiralsil-Dex CB : Isotherme = 155°C, débit 1.2mL/min **Temps de rétention** :  $t_1 = 9.04$ min,  $t_2 = 9.61$  min.



# Caractérisation spectrale

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz**, **CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.76-1.93 (m<sub>a</sub>, 4H cycle), 2.19 (s, 4H-O-C-C<u>H</u><sub>3</sub>), 2.26-2.32 (m<sub>a</sub>, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>), 2.35-2.60 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 3.57-3.65 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 4.25 (s, 3H-O-C<u>H</u><sub>3</sub>), 5.54-5.63 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 7.26-7.34 (q, 2H aromatiques), 7.56-7.61 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques).

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) δ (**ppm**) = 170.4, 157.3, 131.3, 127.1, 127, 120.6, 110.6, 74.8, 55.4, 32.8, 32.4, 25.9, 24.8, 20.9.



**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.71$ , *Eluant (v,v):* cyclohexane/EtOAc : (80/20).

**Chiral HPLC:** Colonne : *Chirapak* AD : **Eluant** (**v**,**v**): hexane / EtOH : 97/3 ; débit 1mL/min. **Temps de rétention** :  $t_R = 10.33$  min.  $t_S = 14.37$  min



# Caractérisation spectrale

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 1.36-1.48 (m, 2H cycle), 1.49-1.62 (m, 2H cycle), 1.84 (s, CO-C<u>H</u><sub>3</sub>, 3H), 1.86 (m, 3H, cycle), 2.17 (m, 1H), 2.68-2.76 (m, 1H, cycle), 4.98-5.05 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 7.26-7.61 (m, 9H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)** = 170.5, 142.4, 141, 139.2, 128.2, 128, 127.1, 127, 75.9, 49.4, 34, 32.4, 25.9, 24.8, 21.1.

**HRMS (D-ESI ; m/z):** 317.151 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).

Caractéristiques chromatographiques

**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.92$ , *Eluant (v,v)*: EP/ EtOAc: (80/20).

**Chiral HPLC:** Colonne : *Chiralpak* IA, **Eluant** (v,v): iso-hexane/EtOH 90/10 ; débit1 mL/min.

**Temps de rétention** :  $t_R = 4.44 \text{ min}$ ;  $t_S = 5.06 \text{ min}$ .

Partie expérimentale







**RMN** <sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 1.05-1.08 (m<sub>a</sub>, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>), 1.11-1.27 (m<sub>a</sub>, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>); 1.29 (s, 3H-O-C<u>H</u><sub>3</sub>), 1.36-1.48 (m<sub>a</sub>, 2H, **CH**<sub>2cycle</sub>), 1.54-1.60 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 1.77-1.82 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 2.7-2.79 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 4.71-4.79 (m<sub>a</sub>, 1H, **CH**<sub>cycle</sub>), 6.96-7.06 (m<sub>a</sub>, 3H, aromatiques), 7.35-7.40 (m<sub>a</sub>, 4H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75MHz, CDCl**<sub>3</sub> δ (**ppm**) = 170, 140.5, 132.3, 132.2, 127.7, 127.5, 127.4, 125.8, 125.7, 125.1, 75.5, 49.6, 33.8, 32.2, 25.7, 24.6, 20.7.

**HRMS (D-ESI ; m/z):** 291.13 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).



# Partie expérimentale



#### Caractéristiques chromatographiques

**Rapport frontal :**  $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.86$ , *Eluant (v,v):* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Chiral HPLC: Colonne : Chiralpak IA, Eluant (v,v): iso-hexane/EtOH : 90/10 ; débit 1

mL/min.

**Temps de rétention** :  $t_R = 10.351 \text{ min.} t_S = 11.550 \text{ min.}$ 

# 4. <u>Procédures générales de dédoublement cinétique par acylation enzymatique des</u> (±)-*trans*-arylcyclohexanols 3-6

Dans un tube de schlenk muni d'un barreau aimanté, 1 mmole d'alcool racémique et 3mmoles d'ester d'énol (AV, AI) sont dissous dans 2ml du solvant, on ajoute ensuite 200mg de la *CAL-B*. Le mélange et soumis sous agitation magnétique à température ambiante durant 24h. La solution est ensuite filtrée sur célite sous pression réduite et l'éther est évaporé. Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates dédoublés sur une colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : EP/EtOAc (80/20).

# 5. <u>Procédures générales de dédoublement cinétique par Déacetylation Enzymatiue</u> des (±)-trans-arylcyclohexyl acétates 3a-6a

Dans un tube de schlenk on place 1 mmole d'acétate racémique dans 2 ml du solvant, puis on ajoute 200mg de l'enzyme *CAL-B* et 1 mmole du carbonate de sodium  $Na_2CO_3$ . Après agitation à 40°C durant 72h, le mélange est filtré sur célite. Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates dédoublés sur une colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : EP/ EtOAc : 80/20.

# 6. <u>Dédoublement cinétique par acylation enzymatique du (±)-cis/trans-</u> <u>phénylcyclohexanol 3</u>

Dans un tube de schlenk muni d'un barreau aimanté, 1 mmole d'alcool racémique et 3mmoles d'acétate d'isopropényle AI sont dissous dans 2ml du toluène, en présence de 200mg de la *CAL-B*. Le mélange et soumis sous agitation magnétique à température ambiante durant 72h. La solution est ensuite filtrée sur célite sous pression réduite et l'éther est évaporé. Les rendements chimiques sont évalués après séparation de l'alcool et l'acétate dédoublés sur une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : EP/EtOAc (80/20).

# 7. <u>dédoublement cinétique par déacetylation enzymatique du (±)-cis/trans-</u> <u>phénylcyclohexyl acétates 3a</u>

Dans un tube de schlenk on place 1 mmoles d'acétate racémique du  $(\pm)$ -cis/transphénylcyclohexyl dans 2 ml du TBME, puis on ajoute 200mg de la *CAL-B* et 1 mmole du carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Après agitation à 40°C durant 72h, le mélange est filtré sur célite. Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates par une chromatograpfie sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluants : EP/ EtOAc : 80/20.

Les excès énantiomériques des alcools et des acétates dédoublés sont déterminés par HPLC ou GC chirale. Les tableaux suivants montrent les chromatogrammes des résultats les plus significatifs du travail.



#### - Hydrolyse Enzymatique par le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> des arylcyclohexyls acétates 3a-6a

Partie expérimentale





# - Acylation enzymatique des arylcyclohexanols 3-6

Conditions des analyses	Chromato	grammes
(±)-trans-2-phényl-cyclohexyl acétate (3a)		
<b>CPG Chirale :</b> Chiralsil-Dex CB : Isotherme =		
155°C, débit 1.2mL/min.	(±)- <i>trans</i> -3a	(±)-trans-3
$t_{R1} = 9.04 \text{min}, t_{R2} = 9.61 \text{min}$	954 	8196 - <u></u>
(±)-trans-2-phényl-cyclohexanol (3)		
<b>CPG Chirale :</b> Chiralsil-Dex CB : Isotherme =		
155°C, débit 1.2mL/min.		
$t_{R1} = 8.56 \text{ min.} \ t_{R2} = 8.773 \text{ min.}$	9,599	7,199 9,599

# Partie expérimentale



# Partie expérimentale



# **Chapitre VI**

Hydrolyse enzymatique des nouveaux esters amines en milieu organique alcalin

#### 1. Procédures de synthèse des des esters aminés

#### 1.1. Procédure générale de la synthèse des 1-phényl-éthyl ester aminés 9a-e

La synthèse des phénylétyl ester aminés se fait en deux étapes :

#### <u>Etape A</u>: Synthèse du 1-phényléthyl 2-chloroacétate 8

Dans un bain de glace (0°C) on mélange une solution phénylethanol (10 mmole) et pyridine (12 mmol) dans l'Et<sub>2</sub>O (10 mL), le chlorure d'acyle (12 mmole) est ajouté goutte à goutte et le mélange est remué à la température ambiante pendant 24h. Après ce temps, le mélange réactionnel est dilué avec l'Et<sub>2</sub>O et lavé avec une solution aqueuse de HCl (0.1 M) ; et une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et finalement avec une solution saturée de NaCl. La phase éthérée est séchée avec MgSO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé dans le rotavapeur.



#### **Caractérisation spectrale**

**RMN <sup>1</sup>H** (**300MHz, CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.62-1.64 (d, 3H, <u>CH</u><sub>3</sub>-CH), 4.04-4.14 (m, 2H, Cl-<u>CH</u><sub>2</sub>-C=O), 5.97-6.03 (m, 1H, <u>CH</u>-CH<sub>3</sub>), 7.34-7.41 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 166.6, 140.7, 128.6, 128.3, 126.2, 77.6, 77.2, 76.7, 74.5, 41.2, 22.0.

# Partie expérimentale



## Etape B : Synthèse de 1-phényl-éthyl ester aminés 9a-e

Le 1-phényléthyl 2-chloroacétate ( $\pm$ )-2 (3.96g, 20 mmoles) est dissous dans CH<sub>3</sub>CN (25 ml) et la solution est traitée par l'addition goutte à goutte d'un mélange de dérivés aminé approprié (2.065ml, 20mmoles) et de triéthylamine (2.78ml, 20mmoles) ; la réaction est activée par le NaI. À la fin de l'addition de l'amine, le mélange est chauffé à reflux pendant 2h. Le mélange est refroidi à température ambiante et puis à 0°C. La suspension obtenue est séparée par une filtration sous vide ; le résidu semi-solide est lavé avec l' EtOAc (6ml) et l'eau (6ml). on récupère nos esters aminés ( $\pm$ )-3a-e après un séchage avec le MgSO<sub>4</sub> et évaporation sous vide.



#### **Caractérisation spectrale**

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.02-1.07 (t, 6H, <u>2CH</u><sub>3</sub>), 1.53-1.55 (d, 3H, <u>CH</u><sub>3</sub>-CH), 2.61-2.69 (m<sub>a</sub>, 4H, N-<u>2CH</u><sub>2</sub>-2CH<sub>3</sub>), 3.29-3.41 (S, 2H, O=C-<u>CH</u><sub>2</sub>-N), 5.91-5.97 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-CO), 7.23-7.370 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) ): δ (ppm) = 170.5, 141.4, 128.3, 127.7, 126.0, 72.1, 54.1, 47.5, 22.1, 12.2.







**RMN** <sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 1.46-1.49 (d, 3H, <u>CH<sub>3</sub>-CH-O</u>), 2.47-2.50 (1, 4H<sub>cyclique</sub>), 3.09-3.21 (t, 2H, O=C-CH<sub>2</sub>-N), 3,64-3.67 (m, 4H<sub>cyclique</sub>, <u>2CH<sub>2</sub>-N</u>), 5.83-5.90 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-O), 7.17-7.30 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75** MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 170.1, 159.4, 128.5, 128.0, 126.1, 72.7, 67.0, 59.7, 53.3, 22.2.



Partie expérimentale



**RMN** <sup>1</sup>**H** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.54-1.56 (d, 3H, <u>CH<sub>3</sub></u>-CH-O), 1.78-1.83 (m, 4H<sub>cyclique</sub>), 2.61-2.66 (m, 4H<sub>cyclique</sub>, <u>2CH<sub>2</sub></u>-N), 3.30-3.22 (q, 2H, O=C-CH<sub>2</sub>-N), 5.92-5.98 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-O), 7.26-7.32 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques).

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 2.1$ ; *Eluant* EP/EtOAc : 60/40

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 170.2, 141.5, 128.6, 128.0, 126.3, 72.6, 57.1, 53.9, 23.9, 22.3.



# 1.2. Synthèse de l'ester aminé (±)-3d

N/,N'/-Dimethylglycine (2.06 g, 20 mmol) dissout dans  $CH_2CI_2$  (25 ml) et traiter avec le chlorure d'oxalyle (1.69 mL, 20 mmol) et 12 gouttes de DMF. Après une heure ; la solution se met à température ambiante pour une deuxième heure. Une solution de 25 mL du phenyléthanol (0.771 g, 6.32 mmol) et triethylamine (5.56 mL, 40 mmol) est ajouté et la suspension résultante à rester sous agitation toute la nuit. On récupère notre produit pur après une chromatographie de gel de silice éluant : EP/ EtOAc (85/15).

(±)-1-phényléthyl diméthylglycinate 9e		
0 N (±)-9e	Formile brut: C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N	
	Masse molaire: 207.13g/mole	
	<b>Rdt</b> = 65%	
	Aspect: huile jaune	
	$\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.13$ ; <i>Eluant</i> EP/EtOAc : 60/40	

# Caractérisation spectrale

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.54-1.56 (d, 3H, <u>CH</u><sub>3</sub>-CH), 2.34 (S, 6H, N-<u>2CH</u><sub>3</sub>), 3.18-3.19 (d, 2H, O=C-<u>CH</u><sub>2</sub>-N), 5.93-5.99 (q, 1H, CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-CO), 7.25-7.34 (m<sub>a</sub>, 5H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>) δ (**ppm**) : 170.1, 141.5, 128.6, 128.07, 126.3, 72.6, 60.73 45.8, 22.3.

Partie expérimentale





# 1.3. Synthèse des esters aminés dérivé des arylakylcarbinols 10-15e

Dans un ballon muni d'un bareau émmenté 1 mmole de N/,N'/-Diméthylglycine se réagit avec 1.1 mmole de Boc<sub>2</sub>O et 1mmole d'alcool racémique 10-15 en présence de 5% de DMAP ; cette réaction se déroule à 50°C et sans solvant. Les produits finaux sont récuperés après une colonne de gel de silice EP/Et<sub>2</sub>OAc : 60/40.



# Caractérisation spectrale

**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 1.53-1.55 (d, 3H, <u>CH<sub>3</sub></u>-CH-O), 2.33 (S, 6H, <u>2CH<sub>3</sub></u>-N), 3.10-3.22 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.8 (S, 3H, <u>CH<sub>3</sub></u>-O), 5.9-5.97 (q, 1H, , CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-O), 6.85-6.9 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques), 7.26-7.32 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)** = 170.1, 159.4, 133.6, 127.8, 113.9, 72.3, 60.8, 55.4, 45.4, 22.1.

Partie expérimentale



(±)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl diméthylglycinate 12e		
	Formile brut: C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	
(±)-12e	Masse molaire: 219.13 g/mole	
	$\mathbf{Rdt} = 80\%$	
	Aspect: huile jaune	
	$R_{f} = 0.17$ ; <i>Eluant</i> EP/EtOAc : 60/40	

**RMN <sup>1</sup>H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  (**ppm**) = 2.08-2.18 (m, 1H, <u>CH2</u>-C<sub>aromatique</sub>), 2.54 (S, 6H, <u>2CH3</u>-N), 2.64-2.60 (m, 1H, <u>CH2</u>-C<sub>aromatique</sub>), 2.85-2.90 (m<sub>a</sub>, 1H, <u>CH2</u>-CHO), 2.91-3.17 (m<sub>a</sub>, 1H, <u>CH2</u>), 3.19 (S, 2H, <u>CH2</u>-N), 6.28-6.32 (q, 1H, <u>CH</u>-O), 7.26-7.41 (m<sub>a</sub>, 4H aromatiques). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : \delta (<b>ppm**) = 170.1, 159.4, 133.6, 127.8, 113.9, 72.3, 60.8, 55.4, 45.4, 22.1.







**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz**, **CDCl**<sub>3</sub>):  $\delta$  (**ppm**) = 1.81-2.04 (m, 4H, <u>2CH</u><sub>2</sub> cyclique), 2.39 (S, 6H, <u>2CH</u><sub>3</sub>-N), 2.77-2.92 (m<sub>a</sub>, 2H, **CH**<sub>2</sub>-**C**<sub>cycle\_aromatique</sub>), 3.21 (S, 2H, (CH<sub>3</sub>)N-<u>CH</u><sub>2</sub>-C=O), 6.10-6.13 (t, 1H, , CH<sub>2</sub>-<u>CH</u>-O), 7.13-7.28 (m<sub>a</sub>, 4H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl**<sub>3</sub>): δ (ppm) = 170.5, 138.1, 129.6, 129.2, 128.3, 126.2, 70.3, 60.8, 45.4, 29.3, 29.0, 18.9.

# Partie expérimentale





**RMN**<sup>1</sup>**H** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.38 (s, 6H, <u>2CH<sub>3</sub>-N</u>), 3.22 (s, 2H, N-<u>CH<sub>2</sub>-C=O</u>), 3.32-3.38 (d, 1H, <u>CH<sub>2</sub>cycle</u>), 3.83-3.93 (q, 1H, , <u>CH<sub>2</sub>cycle</u>), 6.71-6.74 (q, 1H, C<sup>\*</sup>), 7.26-7.80 (m<sub>a</sub>, 6H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ (**ppm**) = 170.9, 128.3, 128.2, 125.4, 123.1, 122.1, 119.9, 96.0, 60.6, 45.5, 38.8.







**RMN**<sup>1</sup>**H** (**300MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ (**ppm**) = 1.51-1.61 (d, 3H, <u>CH</u><sub>3</sub>-CH-O), 2.38 (S, 6H, <u>2CH</u><sub>3</sub>-N), 3.17-3.38 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.91-5.99 (q, 1H, , CH<sub>3</sub>-<u>CH</u>-O), 7.25-7.30 (m<sub>a</sub>, 2H aromatiques), 7.49-7.58(m<sub>a</sub>, 2H aromatiques).

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**75 MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ (**ppm**) = 170.0, 140.6, 131.8, 128.1, 122.0, 71.9, 60.7, 55.4, 45.4, 22.2.

Partie expérimentale



# 2. <u>Procédure générale de l'hydrolyse enzymatique par la *CAL-B* des esters aminés racémiques 9-15e</u>

Dans un tube de schlenk on place 1 mmoles d'ester aminé racémique dans 3 ml d'TBME, puis on ajoute l'enzyme et 1mmole de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Après agitation à 40°C pendent 72h, le mélange est filtré sur célite. On extrait avec de l'éther et une solution HCL (5M). La phase organique est séchée sur MgSO4 et l'éther est évaporé sous pression réduite. Les rendements chimiques sont évalués après séparation des alcools et des acétates dédoublés sur une extraction liquide-liquide. Les excès énantiomériques des alcools purs sont déterminés par HPLC sur une colonne chirale. La conversion est évaluée par RMN H1 et les excès énantiomeriques des asters résiduel sont évalués par HPLC chirale après une dérivation en l'alcool correspondant.

# 3. <u>Chromatogrammes et conditions de séparation de composés racémiques</u>



Partie expérimentale



Partie expérimentale



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES
1. B. Kasprzyk-Hordern, Chem. Soc. Rev., 2010, <u>39</u>, 4466–4503.

2. J. Sun, Alternative Medicine Review., 2007, <u>12</u>, 3.

3. J. Seyden-Penne, "Synthèse et Catalyse Asymétriques", 1994, Inter Edition / CNRS.

4. R. Yendapally, R. E. Lee. Bioorg, Med. Chem. Lett., 2008, 18(5), 1607-1611.

**5.** P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, **1998**, p.30. By permission of Oxford University Press from ACS Green Chemistry Istitute Wedpage.

6. (a) F. Hasan, A. Ali Shah, A. Hameed, Enzyme and Microbial Technology., 2006, 39, 235-

251 ; (b) C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, Organic Process Research & Development, 2000, <u>4</u>, 286-290 ; (c) A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, Applied Biochemistry & Biotechnology, 2004, 118, 155-170.

**7.** (a) K. Joeger, T. Eggert, *Cun. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 390 ; (b) A. Schmid, F. Hollman, J.B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, <u>13(4)</u>, 359.

8. (a) H. Kagan, M. Tabart, *L'Act. Chim*, 2015, <u>393-394</u>, 31-38 ; (b) A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News*, 14June2004, 47-62 ; (c) K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag: Berlin, 2011.

9. C. Gros, G. Boni, Le monde de la chiralité, mars 1995.

**10.** D. Enders, K-E. Jaeger, Asymmetric Synthesis with Chemical and Biological Method. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**, p415.

11. (a) Global Markets for Catalysts: Focus on Catalyst Regeneration Jun 2015 By BCCResearch ; (b) Market ReportGlobalCatalystMarket. ThirdEdition. Updated: March 2015Publisher : Acmite Market Intelligence.

12. RITMIR009: Chiral Chemical - A Market Insight Report, July 2013.

**13.** A. Berthod, "Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations: A General View, in Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications", (A. Berthod, ed), **2010**, Springer, pp. 1-32.

14. Chiral Chemicals Market Research Report- Forecast to 2023. ID: MRFR/CnM/3509-CRR, March 2018.

**15.** M. T. Barry, Asymmetric catalysis: An enabling science, The National Academy of Sciences of the USA, **2004**, 101(15), 5348–5355.

**16.** (a) H.-U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Appl. Catal. A: General.* **2001**, <u>221</u>, 119 ; (b) A. Hassner . "Advances In Asymmetric Synthesis", volume 1. JAI PRESS INC, **1995**, p214.

17. (a) Handbook of Chiral Chemicals, Ed 2 (David Ager) Taylor & Francis Group, New York 2006 ; (b) S. Hanessian, J. Franco, B. Larouche, *Pure & App. Chem.*, 1990, <u>62(10)</u>, 1887-19100 ; (c) ARI M.P. KOSKINEN. Asymmetric synthesis of naturel products. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2012, Second Edition, p51.

18. M. Shimazaki, J. Hasegawa, K. Kan, K. Nomura, Y. Nose, H. Kondo, T. Ohashi, K. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* 1982, <u>30</u>, 3139-3146.

**19.** J. Chen, M. Lu, Y. Jing, J. Dong. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **2006**, 14, 6539-6547.

**20.** A. A. Verstqen-Haaksma, Henk J. &arts, Ben J.M. Jansen, A. de Croot. *Tetrahedron.*, **1994**, <u>50(33)</u>, 10095-10106.

21. W.S. Knowles, M.J. Sabacky, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1968, 1445-1446.

22. M. Bulliard, B. Laboue, J. Lastennet, S. Roussiasse. Organic Process Research & Development. 2001, 5, 438-441.

**23.** (a) J. Jacques, M. Leclercq, M-J. Brienne, *Tetrahedron.*, **1981**, <u>17</u>, 3727-1733 ; (b) L. Pasteur, *Ann, Chim et Phys.*, **1848**, <u>24</u>, 442.

24. K. Kodama, N. Hayashi, Y. Yoshida, T. Hirose, Tetrahedron., 2016, 72, 1387-1394.

**25.** G-Q. Lin, Y-M. Li, A-S.C. Chan, "Principles and Applications of Asymmetric Synthesis", John Wiley & Sons, In, **2001**, p25.

**26.** A. Collet, J. Crassous, J-P. Dutasta, L. Guy, **Molécules chirales Stéréochimie et propriétés**. CNRS ÉDITIONS, **2006**, p144.

27. B.M. Trost Angew, Chem. Int. Ed, 1995, 34, 259-281.

**28.** (a) R. Siedlecka, *Tetrahedron.*, **2013**, <u>69</u>, 6331-6363 ; (b) A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby Eds. *Chirality in Industry II*, Wiley, Chichester, **1997**.

**29.** L. Mesas-Shánchez, A.E. Díaz-Ålvarez, P. Koukal, P. Dinér, *Tetrahedron.*, **2014**, <u>70</u>, 3807-3811.

**30.** S. Chen, F. Liu, K. Zhang, H. Huang, H. Wanga, J. Zhou, J. Zhang, Y. Gong, D, Zhang, Y. Chen, C. Lin, B. Wang, *Tetrahedron Letters*. **2016**, <u>57</u>, 5312–5314.

**31.** K. Matsumoto, K. Oohana, M. Hashimoto, K. Usuda, T. Shimoda, H. Ohshima, Y. Suzuki, T. Togawa, *Tetrahedron.*, **2018**, <u>74(29)</u>, 3981-3988.

**32.** P. T. Anastas, J. C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, Oxford, **1988**, p. 30.

**33.** J. Whittal, P. W. Sutton. "Practical methods for biocatalysis and biotransformations 2". lère édition, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**,

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

35. M. P. Marszall, T. Siódmiak, Catalysis Communications., 2012, 24, 80-84.

36. (a) G. Centi, P. Ciambelli, S. Perathoner, P. Russo, Cat. Today., 2002, 75, 3-15; (b) J. C.

Warner, A. S. Cannon K. M. Dye, Env. Imp. Asses. Rev., 2004, 24, 775.

37. P. A. Anastas, M.M. Kirchhoff, T.C. Williamson, App. Cat A: General., 2001, 221, 3.

38. A. Payen, J. F. Persoz, Ann, Chim, Phys., 1833, 53, 73-92.

**39.** A. Wells., H-P. Meyer, *ChemCatChem.*, **2014**, <u>6</u>, 918–920.

40. CK Savile, JM Janey, EC Mundorff, C.K. Savile, J.M. Janey, E.C. Mundorff, J.C. Moore,

S. Tam, W.R. Jarvis, J.C. Colbeck, A. Krebber, F.J. Fleitz, J. Brands, P.N. Devine, G.W. Huisman, G.J. Hughes, *Science.*, **2010**, 329, 305–309.

**41.** (a) Alejandro G. Marangoni, "ENZYME KINETICS A Modern Approach". A JOHN WILEY & SONS, INC, **2003** ; (b) V. Padma, P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry.*, **2008**, 43, 1019–1032.

**42.** C. Vollhardt, *"Traité de Chimie organique"*, DeBoeck université, Traduit par P. Depovere, 2ème édition, Bruxelles, **1994**.

43. D. Zhu, C. Mukherjee, L. Hua, Tetrahedron: Asymmetry., 2005, 16, 3275-3278

**44.** R. Azerad, Biotransformation of natural or synthetic compounds for the generation of molecular diversity. In Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industries. Patel R. ed. Boca Raton, CRC Press: **2006**, pp. 273-297.

45. H. Gröger, W. Hummel, Curr. Opin. Chem. Biol., 2014, 19, 171-179.

**46.** (a) A. M. Klibanov, *Chemtech.*, **1986**, <u>16</u>, 354-359 ; (b) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, <u>108</u>, 2767-2768.

**47.** R. J. Whitehurst, Maarten van Oort. "Enzymes in Food Technology", John Wiley & Sons, Ltd, 2nd ed, **2010**.

**48.** (a) W. V. Dashek, G. S. Miglani, "Plant Cells and their Organelles", John Wiley & Sons, Ltd **2017.** 1er édition ; (b) G. P. Moss, "*Enzyme Nomenclature*" (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), **2009**.

**49.** (a) S, Piccicuto, C. Blecker, J.C, Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Agron. Soc. Environ.*, **2001**, <u>5(4)</u>, 209–219 ; (b) A. J. J. Straathof., S. Panke., A. Schmid, *Current Opinion in biotechnology.*, **2002**, <u>13(6)</u>, 548-556.

**50.** (a) W.A.M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J-P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, <u>12(1)</u>, 57-68. (b) K-E. Jaeger., MT. Reetz. *Trends Biotechnol.*, **1998**, 16, 396-403.

51. M. T. Reetz, Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, 6, 145-150.

52. (a) R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, *Biotechnology Advances.*, 2001, <u>19</u>, 627–662 ;
(b) A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature.*, 1991, <u>351</u>, 491-494.

53. K.-E. Jaeger, T. Eggert, Current Opinion in Biotechnology., 2002, 13, 390–397.

54. A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, P. K. Arora, *Biological Procedures Online.*, 2016, 18:2.

56. V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic.*, 2006, <u>40</u>, 111-120.

**57.** (a) D. L. Nelson., M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman, New York, **2008**; (b) **Réf50b**: K-E. Jaeger, MT. Reetz, *Trends Biotechnol.*, **1998**, <u>16</u>, 396-403 ; (c) **Réf51**: M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, <u>6</u>, 145-150.

58. Ref50a (a) W.A.M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J.P. Wathelet,
P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2008, <u>12(1)</u>, 57-68. (b) AK. Chandel, R.
Rudravaram, LV. Rao, R. Pogaku, ML. Narasu, *J Comm Biotechnol.* 2007, <u>13</u>, 283–91.

**59.** P. Villeneuve., J.M. Muderhwa., J. Graille., M.J. Haas. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, <u>9</u>, 113–148.

60. M. Zheng, X. Xiang, S. Wang, J. Shi, Q. Deng, F. Huang, R. Cong, *Process Biochemistry.*, 2017, <u>53</u>, 102-108.

**61.** G. Angajala, P. Pavan, R.Subashini, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, **2016**, <u>7</u>, 257-270.

62. J.D. Rozzell, Bioorg. Med. Chem., 1999, 7, 2253-2261.

63. R. Wohlgemuth, Curr. Opin. Biotechnol., 2010, 21, 713-724

64. G. Angajala, P. Pavan, RSC Adv., 2015, 5, 45599-45610.

65. S. Armenta, S. Garrigues, M, Guardia, Trends Anal. Chem., 2015, 71, 2-8.

66. (a) J.L. Adrio, A.L. Demain, Microbial Enzymes and Biotransformations., 2005, 17, 1-

27; (b) T.W. Johannes, H. Zhao, Curr. Opin. Microbiol., 2006, 9, 261–267.

67. U.T. Bomcheuer, K. Buchholz, Eng. Life Sci., 2005, 5, 309-323.

68. J. Tao, J.H. Xu, Curr. Opin. Chem. Biol., 2009, 13,43-50.

**69.** M.B. Sabaini, M.A. Zinni, M. Mohorcic, J. Friedrich, A.M. Iribarren, L.E. Iglesias, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2010**, <u>62</u>, 225–229.

70. (a) R. Siedlecka, Tetrahedron., 2013, 69, 6331-6363 ; (b) A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J.

Crosby, Eds. Chirality in Industry II, Wiley, Chichester, 1997; (c) C. M. Monteiro, C. A. M.

Afonso, Journal of Chemical Education., 2010, 87(4), 423-425.

71. C.S. Chen, Y. Fujimoto, C.J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 1982, <u>104</u>, 7294-7299.

72. H. B. Kagan, J.C. Fiaud, "Kinetic Resolution". Topics in Stereochemistry, E. L. Eliel, S.

H. Wilen, Eds; J. Wiley & sons, Inc. Newyork., 1988, 18, 249-330.

73. V. Prélog, Pure Applied Chem., 1964, 9, 119.

74. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, J. Org. Chem., 1991, <u>56</u>, 2656–2665.

**75.** J. Ottosson., K. Hult, *Journal of Molecular Catalysis – B: Enzymatic.*, **2001**, <u>11(4-6)</u>, 1025-1028.

76. (a) K. Faber, F S. Riva, J. Synth, Org. Chem., 1992, 895 ; (b) U. Hanefeld, Org. Biomol.,

**2003,** 1, 2405 ; (c) Y.F. Wang, C.H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1988**, <u>53</u>, 3129 ; (d) D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.*, **1988**, <u>53</u>, 5531.

**77.** (a) R.D. Schmid, R. Verger, Angew, *Chem., Int. Ed*, **1998**, <u>37</u>, 1608–1633 ; (b) A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, Curr. *Opin. Biotechnol.*, **2002**, <u>13</u>, 548–556.

**78.** (a) A.M. Klibanov, *Chltech.*, **1986**, <u>16</u>, 354-359 ; (b) C. E. Humphrey, M. Ahmed, A. Ghanem, N. J. Turner, *Synthetic Methods.*, **2014**, 123-160.

79. T. Itoh, Y. Hiyama, A. Betchaku, H. Tsukube, Tetrahedron Lett., 1993, <u>34</u>, 2617-2620.

80. P. Fickers, J. Destain, P.Thonart, Biotechnol, Agron. Soc. Environ., 2008, 12(2), 119-130.

81. O. Sahin, S. Erdemir, A. Uyanik, M. Yilmaz, Appl. Catal. A Gen., 2009, 369, 36-41.

**82.** E. Akceylan, E. Akoz, O. Sahin, M. Yilmaz, *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, **2015**, <u>81</u>, 237–243.

**83.** R. E. Deasy, M. Brossat, T. S. Moody, A. R. Maguire, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2011**, <u>22</u>, 47–61

84. M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron : Asymmetry.*, 2012, 23(11), 828-833.

85. W.K. Lancelot, M. Luke, S.R. John, N. Ignatious, Ind. Crops Prod., 2002, 16, 237-244.

**86.** (a) Y. Xu, W. Du, D. Liu, J. Zeng, *Biotechnol. Lett.*, **2003**, <u>25(15)</u>, 1239-1241 ; (b) H. Noureddini, X. Gao, R.S. Philkana, *Bioresour. Technol.*, **2005**, <u>96(7)</u>, 769-777.

87. (a) L. Aribi-Zouioueche, J.C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, 2000, <u>41</u>, 4085 ; (b) X. Daiwang,
L. Zuyi, M. Shengming, *Tetrahedron Lett.*, 2003, <u>44</u>, 6343 ; (c) Q. Xu, Y. Xie, X. Geng, P.
Chen, *Tetrahedron.*, 2010, <u>66</u>, 624 ; (d) J.H. Sun, R.J. Dai, W.W. Meng, Y.L. Deng, *Catal. Commun.*, 2010, <u>11</u>, 987.

88. (a) M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2001, 12, 585; (b) T. Miyazawa, E. Kaito, T. Yukawa, T. Murashima, T. Yamada, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 2005, <u>37</u>, 63.

89. (a) A.M. Klibanov, Acc. Chem. Res., 1990, <u>23</u>, 114; (b) P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc., 1991, <u>113</u>, 3166.

90. (a) P. Berglund, *Biomol. Eng.*, 2001, <u>18</u>, 13; (b) T. Itoh, Y. Takagi, H. Tsukube, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 1997, <u>3</u>, 259; (c) Y. Takagi, R. Ino, H. Kihara, T. Itoh, H. Tsukube, *Chem. Lett.*, 1997, 1247; (d) B.K. Pchelka, A. Loupy, J. Plenkiewicz, L. Blanco, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2000, <u>11</u>, 2719; (e) M. Merabet, N. Melais, M. Boukachabia, J.C. Fiaud, L. ZouiouecheAribi, *J. Soc. Alg. Chim.*, 2007, <u>17</u>, 185; (f) M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2008, 19, 2378.

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

92. Y.F. Wang, C.H. Wong, J. Org. Chem., 1988, 53, 3129.

93. D. Zhu, C. Mukherjee, L. Hua, Tetrahedron: Asymmetry., 2005, 16, 3275-3278.

**94.** W. Gładkowski, A. Gliszczynska, M. Siepka, M. Czarnecka, G. Maciejewska, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2015**, <u>26(14)</u>, 702–709.

95. D. Özdemirhan, Ö. Sarıçelik, Tetrahedron: Asymmetry., 2016, 28(1), 118-124.

96. M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, C. R. Chimie., 2011, <u>14</u>, 978–986.

97. C. Bijou, L. Aribi-Zouiouech, J-C. Fiaud, Tetrahedron letters., 2002, <u>43</u>, 3025-2027.

98. Y. Kawanami, K. Itoh, Chemistry Letters., 2005, 34(5), 682-683.

99. X. Zhou, D. Zheng, B. Cui, W. Han, Y. Chen, Tetrahedron., 2015, 71, 4738-4744.

**100.** C. Raminelli., J. V. Comasseto, L. H. Andrade, A. L. M. Porto, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2004**, <u>15</u>, 3117–3122.

**101.** S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2002**, <u>13</u>, 2693–2696.

102. C. Tanyeli, D. Özdemirhan, Tetrahedron: Asymmetry., 2014, 25, 658–666.

103. (a) T. Toyo'oka, J. Biochem. Biophys. Methods., 2002, <u>54</u>, 25–56; (b) J. González-Sabın,
V.Gotor, F. Rebolledo, Tetrahedron: Asymmetry., 2002, <u>13(12)</u>, 1315-1320.

**104.** F. Uthoff, A. Reimer, A. Liese, H. Gröger, *Sustainable Chemistry and Pharmacy.*, **2017**, <u>5</u>, 42–45.

105. Z. C. Gyarmati, A. Liljeblad, M. Rintola, G. Bernáth, L. T. Kanerva, *Tetrahedron:* Asymmetry., 2003, <u>14</u>, 3805–3814.

106. (a) R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1991, <u>2</u>, 931-938; (b) F. Srcundo, S. Riva, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1992, <u>3(2)</u>, 267-280.

**107.** (a) G. Kirchner, M. P Scollar, A. M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc. **1985**, <u>107</u>, 7072 ; (b) A. M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc., **1986**, <u>108</u>, 2767.

108. (a) V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, J. Mol. Cata B. Enz., 2006, <u>40</u>, 111-120;
(b) R. N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis.*, 2000, Dekker, New York; (c) P. Berglund, *Biomol. Engineering.*, 2001, <u>18</u>, 13-22.

109. R. Mehvar, D. R. Brocks, J. Pharm. Pharm. Sci., 2001, 4, 185-200.

110. G. D. Plotnick, M. L. Fisher, J. H. Hamilton, B. P. Hamilton, Am. J. Med., 1983, <u>74</u>, 625-629.

111. G. D. Novack, Surv. Ophthalmol., 1987, 31, 307-327.

**112.** G. V. Lima, M. R. da Silva, T. de Sousa Fonseca, L. B. de Lima, M. da Conceic, F. de Oliveira, T. L. G. de Lemos, D. Zampieri, J. C. S. dos Santos, N. S. Rios, L. R. Barros Gonc, alves, F. Molinari, M. C. de Mattos, *Applied Catalysis A: General.*, **2017**, <u>546</u>, 7-14.

113. P. Borowiecki., M. Fabisiak., Z. Ochal, *Tetrahedron.*, 2013, <u>26(23)</u>, 4597-4602.

**114.** M. Boukachabia, J-C. Fiaud, N. Mélais, M. Merabet, L. Aribi-Zouioueche, *J. Soc. Alger. Chim.*, **2007**, <u>17</u>, 185-194.

115. M. Merabet-Khalassi, L.Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron : Asymmetry.*, 2008, 19, 2378-2384.

116. Y. Kitamoto, Y. Kuruma, K. Suzuki, T. Hattori, J. Org. Chem., 2015, 80 (1), 521-527.

117. (a) J. Ottosson, J. Rottici-Mulder, D. Rottici, K. Hult, *Protein Sci.*, 2001, <u>10</u>, 1769-1774; (b) T. Miyazawa, T. Yukawa, T. Koshiba, H. Sakamoto, S. Ueji, R. Yanagihara, T. Yamada, *Tetrahedron : Asymmetry.*, 2001, <u>12</u>, 1595-1602. (c) M. Persson, D. Costes, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Enzyme. Microb. Tech.*, 2002, <u>30</u>, 916-923. (d) D. Yu, Z. Wang, L. Zhao, Y. Cheng, S. Cao, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 2007, 48, 64-69.

**118.** R. O. M. A. de Souza, O. A. C. Antunes, W. Kroutil, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2009**, <u>74</u>, 6157–6162.

119. L. Schönstein, E. Forró, F. Fülöp, Tetrahedron: Asymmetry., 2013, 24, 202–206.

120. M. Kawasaki, Y. Hayashi, H. Kakuda, N. Toyook, A. Tanaka, M. Goto, S. Kawabataa, T. Kometani, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2005, <u>16</u>, 4065–4072.

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

**122.** P. Csuka, Z. Boros., L. Orfi, J. Dobos, L. Poppe, G. Hornyánszky, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2015**, <u>26(12–13)</u>, 644-649.

**123.** (a) H. Stercher, K. Faber, *Synthesis.*, **1997**, 1-16 ; (b) U. T. Strauss, U. F. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1999**, <u>10</u>, 107-117 ; (c) K. Faber, *Chem. Eur. J.*, **2001**, <u>7</u>, 5005-5010 ; (d) N. J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology.*, **2003**, <u>14</u>, 401-406 ; (e) A.

Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. H. Malik, S. Azeeza, *Coordination Chemistry Reviews.*, 2008, 569-592.

124. (a) J H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F G. Mutti, W. Kroutil, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2011, <u>15</u>, 249-256 ; (b) N J. Turner, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2010, <u>14</u>, 115-121 ; (c) R.Wohlgemuth, *Current Opinion in Microbiology.*, 2010, <u>13</u>, 283-292 ; (d) Y. Ahn, S-B. Ko, M-J. Kim, J. Park;Coordination, *Chemistry Reviews.*, 2008, <u>252</u>, 647-658 ; (e) B. Martín-Matute, J-E. Bäckvall, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 2007, <u>11</u>, 226-232 ; (f) O. Pàmies, J-E. Bäckvall, *Trends in Biotechnology.*, 2004, <u>22</u>, 130-135 ; (g) N J. Turner, *Current Opinion in Biotechnology.*, 2003, <u>14</u>, 401-406 ; (h) O. Pàmies, J-E. Bäckvall, *Current Opinion in Biotechnology.*, 2003, <u>14</u>, 407-413 ; (i) O. Pàmies, J-E. Bäckvall, *Chem. Rev.*, 2003, <u>103</u>, 3247-3262 ; (j) U T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1999, 10, 107-117.

125. R. Noyori, M. Tokungaga, M. Kitamura, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1995, <u>68</u>, 36-56.

126. F. Javier Quijada, V. Gotor, F. Rebolledo, Org. Lett., 2010, 12(16), 3602-3605.

127. M. Merabet-Khelassi, N. Vriamont, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2011, <u>22(18)</u>, 1790-1796.

128. (a) O. Mitsunobu, M. Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1967, <u>40</u>, 2380; (b) E. Vanttinen,
L. T. Kanerva, Tetrahedron: Asymmetry., 1995, <u>6</u>, 1779-1786; (c) H. L. Liu, T. Anthonsen,
Chirality. 2002, <u>14</u>, 25-27.

129. N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, Catalysts., 2014, 4(3), 215-225.

**130.** N. Bouzemi, L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2006**, <u>17(5)</u>, 797-800.

**131.** J. Gonzelez-Sbin, R. Moran-Ramallal, F. Rebolledo, *Chem.Soc. Rev.*, **2011**, <u>40</u>, 5321-5335.

**132.** J. Gershenzon, R. Croteau, SECONDARY PLANT METABOLITES, 2E volume I: THE CHEMICAL PARTICIPANTS.

133. E. Breitmaier, Terpenes, Wiel-VCH Verlag GmbH, 2006.

**134.** M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana, A. Ali, *Drug Discovery Today.*, **2007**, <u>12</u>, 23/24.REVIEWS.

135. (a) R. Eccles, Menthol and related cooling compounds., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46; (b) N. Galeotti, L. M. Di Cessani, Mannelli, G. Mazzanti, A. Bartolini, C. Ghelardini, *Neurosci. Lett.*, 2002, <u>322</u>, 145–148. (c) E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Comptes Rendus Chimie.*, 2003, <u>6(5)</u>, 529-546; (d) E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, *Chemical reviews.*, 2011, <u>111(7)</u>, 4036-4072.

**136.** S. Abbaszadeh, A. Sharifzadeh, H. Shokri, A.R. Khosravi , A. Abbaszadeh, *Journal de Mycologie Médicale.*, **2014**, <u>24(2)</u>, 51-56.

137. (a) M. Kamal, N. Iimura, T. Nabekura, S. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, <u>54</u>, 481.
(b) M. Minato, T. Kaneko, S. Masauji, T. Ito, *J. Organomet. Chem.*, 2006, <u>691</u>, 2483 ; (c) Z. Schelz, J. Molnar, J. Hohmann, *Fitoterapia.*, 2006, <u>77</u>, 279-285.

**138.** D.N. Ruskin, R. Anand, G.J. LaHoste, *European Journal of Pharmacology.*, **2007**, <u>559</u>, 161–164.

**139.** New Process for Menthol Production, *ChemistryViews*. **30 June 2012**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, BASF SE Ludwigshafen, German.

140. (a) M. McCoy, *Chem Eng News.*, 2010, <u>88(35)</u>, 30 ; (b) R. A. Sheldon. *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press. 1993 ; (c) R. Noyori, Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition.*, 2002, <u>41(12)</u>, 2008-2022.

**141.** D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L.H. Steenkamp, A.L. Rousseau, C.J. Parkinson, J. Chaplin, R.K. Mitra, T. Moutlana, S.F. Marais, N.S. Gardiner, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2012**, <u>75</u>, 1–10.

142. M. Li, L-R. Yang, G. Xu, J-P. Wu, *Biochemical Engineering Journal.* 2016, <u>109</u>, 81–87.
143. (a) H. Mimoun, *Chimia*, 1996, <u>50</u>, 620 ; (b) S. Akutagawa, *Appl. Catal., A.* 1995, <u>128</u>, 171-207 ; (c) J-P. Genet, *l'actualité chimique.*, Avril-mai 2003, 25-33.

144. (a) S. Serra, C. Fuganti, E. Brenna, *TRENDS in Biotechnology.*, 2005, 23(4), 193-198;
(b) H. Itoh, H. Maeda, S. Yamada, Y. Hori, T. Mino, M. Sakamoto, *Organic Chemistry Frontiers.*, 2014, 1(9), 1107-1115;
(c) Réf:142 a) D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L.H. Steenkamp, A.L. Rousseau, C.J. Parkinson, J. Chaplin, R.K. Mitra, T. Moutlana, S.F. Marais, N.S. Gardiner, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 2012, 75, 1–10;
(d) M. Li, L.R. Yang, G. Xu, J.P Wu, *Biochemical Engineering Journal.*, 2016, 109, 81-87;
(e) S. Serra, E. Brenna, C. Fuganti, F. Maggioni, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2003, 14(21), 3313-3319;
(f) L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X. Yu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 2007, 47(3), 149-154.

145. (a) G. Grogan, *Biotransformations, Ann. Rep. Prog. Chem. Sect B: Org. Chem.*, 2013, 109, 15-42; (b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
2005; (c) K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 6<sup>th</sup> ed. 2011; (d) A. Mehta, U. Bodh, R. Gupta, *Fungal lipases: a review. Journal of Biotech Research.*, 2017, <u>8</u>, 58-77.

146. S. Vorlová, U. T. Bornscheuer, I. Gatfield, J. M. Hilmer, H. J. Bertram, R. D. Schmid. *Advanced Synthesis & Catalysis.*, 2002, <u>344(10)</u>, 1152-1155.

147. Y. Gong, G-C. Xu, Q. Chen, J-G. Yin, C-X. Li, J-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.*, 2016, <u>6</u>, 2370-2376.

**148.** J. C. D. Silva, M. D. G. Nascimento, *Journal of the Brazilian Chemical Society.*, **2016**, <u>27(12)</u>, 2226-2233.

149. Z. Lü, Y. Chu. Y. Han, Y. Wang, J. Liu, *Journal of chemical technology and biotechnology.*, 2005, <u>80(12)</u>, 1365-1370.

**150.** J. N. Trbojević, A. S. Dimitrijević, D. V. Veličković, M. Gavrović-Jankulović, N. B. Milosavić. *Hemijska industrija*. **2013**, <u>67(5)</u>, 703-706.

**151.** (a) S. Benjamin, A. Pandey, *Yeast.*, **1998**, <u>14</u>, 1069–1087 ; (b) M.T. Flood, M. Kondo. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, **2001**, <u>33</u>, 157–164.

**152.** W-H. Wu., C. C. Akoh., RS. Phillips, *Enzyme and Microbial Technology.*, **1996**, <u>18</u>, 538-539.

**153.** C. J. Gray, J. S. Narang, S. A. Barker, *Enzyme and microbial technology*., **1990**, <u>12(10)</u>, 800-807.

**154.** T. Kuroiwa, K. Hamazaki, M. Katayama, S. Sato, T. Matsui, *Process Biochemistry.*, **2016**, <u>51(12)</u>, 2047-2054.

**155.** L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X. Yu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2007**, <u>47</u>, 149–154.

156. M. Merabet, N. Melaïs, M. Boukachabia, JC. Fiaud, L. Aribi-Zouioueche, J Soc Alg Chim., 2007, <u>17(2)</u>,185-194.

157. (a) D. L. Wang, A. Nag, G. C. Lee, J. F. Shaw, J. Agricul. Food Chem., 2002, <u>50(2)</u>, 26;
(b) S. Bai, Z. Guo, W. Liu, Y. Sun, Food Chemistry., 2006, <u>96</u>, 1–7.

158. (a) Réf115 : M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant *tetrahedron: Asymmetry.* 2008, <u>19</u>, 2378-2384. (b) M. Merabet, N. Melaïs, M. Boukachabia, J. C. Fiaud, L. Aribi-Zouioueche. *J. Soc. Alg. Chim.*, 2007, <u>17(2)</u>, 185-194.

**159.** F. P. Byrne, S. Jin, G. Paggiola, T. H. M. Petchey, J. H. Clark, T. J. Farmer, A. J. Hunt, C. R. McElroy, J. Sherwood. *Chem. Process.*, **2016**, <u>4</u>, 7 ; (b) D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. McElroy, S. Abou-Shehada, P. J. Dunn, *Green Chem.*, **2015**, <u>18(1)</u>, 288-296.

**160.** F.Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Research on Chemical Intermediates.* **2018**, 44(11), 6847–6860.

161. (a) Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions, Blaser, H. U., Federsel, H. J., Eds., 2nd ed; John Wiley & Sons: Weinheim, 2011 ; (b) V.

Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, J. *Mol. Catal. B Enzym.*, **2006**, <u>40</u>, 111–120 ; (c) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2004**, <u>15</u>, 3331–3351.

162. J. K. Whitesell, H. H. Chen, R. M. Lawrence, J. Org. Chem., 1985, 50, 4663-4664.

163. (a) M. L. Vasconcellos, D. Desmaële, P. R. Costa, J. D'Angelo, *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 4921–4922 ; (b) J. K. Whitesell, *Chem. Rev.*, 1992, 92, 953–964 ; (c) D. J. J. Potin, *Am. Chem. Soc.*, 1990, <u>112</u>, 3483–3486 ; (d) I. Ojima, I. Habus, M. Zhao, M. Zucco, Y. H. Park, C. M. Sun, T. Brigaud, *Tetrahedron.*, 1992, <u>48</u>, 6985–7012.

**164.** H. C. Brown, J. V. N. Vara Prasad, A. K. Gupta, R. k. Bakshi, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 310–311.

165. B. D. Brandes, E. N. Jacobsen, J. Org. Chem., 1994, 59, 4378-4380.

**166.** (a) Zhao, S. H. U.S. Patent No. 5,420,366. **1995**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office ; (b) King, S. Bruce; K. Barry Sharpless, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, <u>35</u>, 5611–5612

167. G. Asensio, A. Cuenca, N. Rodriguez, Tetrahedron: Asymmetry., 2003, 14, 3851-3855.

168. M. Matsugi, Y. Hagimoto, M. Nojima, Y. Kita, Synth. Commun., 2013, 43, 1425-1431.

169. L. Wang, Ravish K. Akhani, Wiskur, Sheryl L. Org. Lett., 2015, <u>17</u>, 2408–2411.

**170.** M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2012**, <u>23</u>, 828–833.

171. Z. Houiene, M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2013, <u>24</u>, 290–296

**172.** A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2016**, <u>27</u>, 1253–1259.

173. M. Takahashi, K. Ogasawara, Tetrahedron: Asymmetry., 1995, <u>6</u>, 1617–1620.

174. B. E. Carpenter, R. Hunt, B. A. Keay, Tetrahedron: Asymmetry., 1996, 7, 3107-3108.

175. E. C. Celia, E. Cernia, I. D'Acquarica, C. Palocci, S. Soro, J. Mol. Catal. B Enzym., 1999, <u>6</u>, 495–503.

176. A. Sánchez, J. L. del Río, F. Valero, J.Lafuente, I. Faus, C. Solà, *Journal of Biotechnology.*, 2000, <u>84</u>, 1–12.

**177.** Y. H. She, C. F. Wu, K. S. Shia, J. D. Wu, R. K Peddinti, H. J. Liu, *Synthesis.*, **2005**, <u>5</u>, 749–752.

178. D. Basavaiah, P.O. Rao, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 1994, <u>5</u>, 223–234.

179. (a) E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 4504-4523 ; (b)

Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 6th ed., Springer: Berlin Heidelberg, 2011.

180. (a) N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, Catalysts., 2014, 4, 215-225 ;

(b) A. Zaïdi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, Catal. Lett., 2015, 145, 1054-1061;

(c) M. Merabet-Khellassi, L. Aribi-Zouioueche, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2009, <u>20</u>, 1371–1377.

181. L. Aribi-Zouioueche, J. C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, 2000, <u>41</u>, 4085–4088.

**182.** (a) L. M. Levy, J. R. Dehli, *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2003**, <u>14</u>, 2053–2058. (b) L. M. Levy, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, <u>2</u>, 2572–2577.

**183.** R. Tanikaga, Y. Matsumoto, M. Sakaguchi, Y. Koyama, K. Ono. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, <u>44</u>, 6781–6783.

**184.** Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2017, 28, 1644–1650.

**185.** N. Melais ; Dédoublement cinétique enzymatique d'alcools hétérocycliques d'intérêt potentiel par divers modes d'accès. Thèse de doctorat 2016.

186. N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J.-C. Fiaud, *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 627–630.

187. M. Merabet-Khelassi, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2012, 23, 828–833.

**188.** V. Fedi, M. Altamura, G. Balacco, F. Canfarini, M. Criscuoli, D. Giannotti, C. A. Maggi, *Journal of medicinal chemistry.*, **2004**, <u>47(27)</u>, 6935-6947.

198. B. Neises, W. Steglich, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1978, 17, 522-524.

190. J-d'Amour. K. Twibanire, T. B. Grindley, Org. Lett., 2011, 13(12), 2988-2991.

**191.** A. Sakakura, K. Kawajiri, T. Ohkubo, Y. Kosugi, K. Ishihara, *J. AM. CHEM. SOC.*, **2007**, <u>129</u>, 14775-14779.

192. T. Nishikawa, M. Yoshikai, K. Obi, M. Isobe, tetrahedron letters., 1994, 35, 7997-8000.

**PRODUCTION SCIENTIFIQUE** 



# Production of *I*-menthyl acetate through kinetic resolution by *Candida cylindracea* lipase: effects of alkaloids as additives

Fatima Zohra Belkacemi<sup>1</sup> · Mounia Merabet-Khelassi<sup>1</sup> · Louisa Aribi-Zouioueche<sup>1</sup> · Olivier Riant<sup>2</sup>

Received: 11 May 2018/Accepted: 2 July 2018/Published online: 9 July 2018  $\circledcirc$  Springer Nature B.V. 2018

## Abstract

Enzymatic transesterification of *dl*-menthol with vinyl acetate in *tert*-Butyl methyl ether (TBME) catalyzed by *Candida cylindracea* lipase (CCL) was carried out in the presence of cinchona alkaloid as additive. The effects of various reaction parameters, such as lipase nature and loading, acylating agent, molecular sieves, solvents and various additives, on the reactivity as well as on the enantioselectivity were investigated. A significant improvement of CCL reactivity has been recorded after using cinchona alkaloid as additive in TBME. A high enantiomeric ratio (E = 80) was achieved when 30 mol% of quinidine was added, and *l*-(-)-menthyl acetate was obtained with 93% optical purity and 49% conversion. This process was easily applied to gram-scale quantities, using commercially inexpensive lipase, providing high yield optically active menthol under mild experimental conditions.

Louisa Aribi-Zouioueche louisa.zouioueche@univ-annaba.dz; louisa.zouioueche@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

**Electronic supplementary material** The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s11164-018-3525-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

### Graphical abstract



**Keywords** *l*-Menthyl acetate · Kinetic resolution · *Candida cylindracea* lipase · Alkaloids · Additives

## Introduction

Menthol is the world's most-sold flavor ingredient and can be found in countless products in common use. The worldwide demand of 25,000-30,000 metric tons per year already exceeds the available supply and is constantly growing [1]. *l*-(-)-Menthol has the best organoleptic performance, since it is widely used in flavor and fragrance, food, cosmetics and pharmaceutics industries due to its refreshing flavor and cooling effects, whereas d(+) menthol has an undesirable taste [2–4]. The demand for the pure form of l-(-)-menthol is an important preoccupation at an industrial level, which explains the research efforts to establish efficient routes for yielding it at high purity [5-7]. One of the efficient routes to obtain it as optically active is the biocatalytic process [8-15]. The enzymatic kinetic resolution of racemates is one of the practical modes used for the separation of the two enantiomers, and lipases (E.C.3.1.1.3) are the most used biocatalysts with considerable industrial potential. Lipases can act under mild conditions, are cheap, stable, and efficient, and present a remarkable chemo-, regio- and enantioselectivity to a large panel of substrates, in particular secondary alcohols [16–19].

In kinetic resolution involving lipases, various parameters have to be taken into account for controlling both reactivity and enantioselectivity. For instance, in the kinetic resolution of racemic alcohols with lipases, several parameters such as the nature of the enzyme [20, 21], the solvent [22–24], the effect of additives [25, 26], the residual water in the reaction media [27, 28], the amount of lipase [29, 30] and the nature of the acetylating agent [31–34] are often examined for the optimization of selectivity and conversion. Some research is still dedicated to the study of the kinetic resolution of dl-menthol using lipases. In all the reported literature data, the use of free lipases exhibits no good reactivity or selectivity,

and it is the use of immobilization techniques that generally improve the efficiency of the various commercially available free lipases. The majority of the described kinetic resolutions exploit *Candida rugosa* lipase (CRL) immobilized on several supports in esterification, transesterification or hydrolysis reactions. The recombinant CRL was used for the enantioselective hydrolysis of *dl*-menthyl benzoate with high selectivity as opposed to the free lipase which showed a low selectivity [35]. Another immobilization of *Candida rugosa* lipase (AYL) was found to be the most appropriate in transesterification of *dl*-menthol with vinyl acetate; the conversion recorded was of at least 34% [36]. The lipase from *Candida cylindracea* (CCL), from the same source as CRL, was also investigated in an immobilized form: in kinetic resolution of dl-menthol via esterification [37] and transesterification [38], more recently for esterification reaction between 1-octanol and three butyric acid derivatives in low-water solvent-free systems [39]. Few studies have been carried out on the resolution of *dl*-menthol with free CCL and the enantio-discrimination displayed by lipases from Candida cylindracea (Sigma Type VII) and Candida rugosa (Sigma Type VII and Amano AY) was generally moderate [40]. Moreover, these yeast hydrolytic lipases are the most commonly used due to their high activity and non-genotoxic or cancerogenic effects on human health [41]. Hence, the species is generally regarded as safe (it has GRAS status), and classified as a biologically safe level [42, 43]. The abovementioned lipases are most popular lipases and but, to date, no studies have focused on the effects of some additives on the reactivity and selectivity of these lipases.

In this paper, we report the optimization of the reactivity and selectivity of free commercially available lipases by modulation of several parameters influencing the catalytic process during the enzymatic kinetic resolution via acylation of dl-menthol. The reaction parameters, such as the amount and hydrolytic activity of the lipase sources, the nature of the acyl donors, solvent hydrophobicity, lipase amount and introduction of several additives, were optimized to achieve the ideal conversions and enantioselectivities during the enzymatic acylation of dl-menthol (Scheme 1). The use of additives to improve the selectivity of the lipases for the kinetic resolution of menthol is the innovative aspect in this work.



Scheme 1 Enzymatic acylation reactions

# Materials and methods

# Chemicals and materials

All reagents and solvents were of analytical grade and were used as purchased from Sigma-Aldrich. Lipases of different sources were used as purchased without any pre-treatment. CRL type VII (specific activity = 1170 U/mg), lipase from *Porcine pancreatic* type II (PPL) (specific activity  $\approx$  100–500 U/mg) and *Candida antarctica* lipase immobilized on acrylic resin (CAL-B) (specific activity > 10,000 U/g) were purchased from Sigma-Aldrich. The *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL) was purchased from Amano (specific activity > 30,000 U/g). The CCL was purchased from Fluka (specific activity = 2.8 U/ g). CRL is an extra-purified form of CCL, but these forms have very distinctive hydrolytic activities. The outcome of the reactions was monitored using TLC on Silica gel 60F<sub>254</sub> plates (type MERCK5179), 250 mesh. After stirring for the appropriate time, the lipase was removed by simple filtration. The separation of the resulting acetates and the remaining alcohols was performed by column chromatography using silica gel 60 Å, 70–230 mesh, 63–200 µm using petroleum ether/ethyl acetate (v/v: 80/20) as eluent.

# Instrumentation

The spectroscopic characterisation was performed with Brüker spectrometers (300 MHz for <sup>1</sup>H, 75 MHz for <sup>13</sup>C). Chemical shifts were reported in  $\delta$  ppm from tetramethylsilane with solvent resonance as an internal standard for <sup>1</sup>H NMR and chloroform-d ( $\delta$  77.0 ppm) for <sup>13</sup>C NMR. Enantiomeric excesses were measured by gas chromatography on a ThermoFinnigan Trace GC, equipped with an automatic auto sampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 µm). Retention times are reported in minutes. Optical rotations were determined using a Perkin-Elmer 241 Polarimeter at room temperature using a cell of 1 dm length and  $\lambda = 589$  nm.

# **Experimental setup**

# Synthesis of racemic 2-isopropyl-5-methylcyclohexyl acetate (1a)

The menthyl acetate (1a) was synthesized by classical chemical acylation via the corresponding racemic menthol (1 equiv.), using 1.5 equiv. of acetic anhydride, 1.2 equiv. of Et<sub>3</sub>N, and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (0.2 equiv.) in 5 mL of diethyl ether. The final products were obtained pure after standard work-up in excellent yield. The structure was confirmed by <sup>1</sup>H and 1<sup>3</sup>C NMR spectra. Molecular formula: C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>. Crude oil. yield = 78%.  $R_{\rm f} = 0.72$ . Eluent (*v*,*v*): petroleum ether/ethyl acetate (90/10).

<sup>1</sup>**H** NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.74–0.76 (m, 3H, cycl-CH<sub>3</sub>), 0.79–0.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>cyclic), 0.87–0.90 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.91–0.98 (m, 1H,

CH<sub>2</sub>cyclic), 1.01–1.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>cyclic), 1.30–1.39 (m, 1H,CHcyclic), 1.41–1.53 (m, 1H,CHcyclic), 1.62–1.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>cyclic), 1.66–1.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>cyclic), 1.81–1.90 (m, 1H,<u>CH</u>), 1.94–2.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>cyclic), 2.02 (s, 3H,O–C–C<u>H<sub>3</sub></u>), 4.62–4.71 (m, 1H<sub>cycl</sub>, O-CH<sub>cycl</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.82, 74.2, 47.14, 41.06, 34.39, 31.50, 26.25, 23.63, 22.15, 21.47, 20.87, 16.52.

### General procedures of enzymatic kinetic resolutions

### Enzymatic acylation with enol esters

To 1 mmol of racemic alcohol (1), 3 mmol of the appropriate enol ester (isopropenyl acetate or vinyl acetate) and a catalytic amount of lipase were dissolved in 2 mL of organic solvent. The suspension was stirred at room temperature for the indicated time. The reaction mixture was filtered on Celite and concentrated in vacuum. The remaining alcohol and the produced acetate were separated by chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 95/5) and analyzed by chiral GC. The same procedure was followed for the reactions in the presence of 30 mol% of additives.

### Enzymatic acylation with succinic anhydride

A dry Schlenk tube was charged with rac-alcohol (1 equivalent) and succinic anhydride (1 equiv.) dissolved in 2 mL of diethyl ether. The reaction was initiated by the addition of 100 mg of CCL. The reaction mixture was shaken at room temperature for 24 h. After removal of the lipase by filtration, the filtrate was shaken with 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, and the remaining alcohol and the produced monoester succinate were separated by liquid–liquid extraction. The remaining enantiomer was obtained from the organic layer and the aqueous phase was washed with an organic solvent and treated by adding 1 M NaOH solution to obtain the other enantiomer. The enantiomeric excesses values were quantified by chiral GC analyses.

**Chiral GC:** Chiralsil-DEX CB:  $(T_{\text{column}} = 120 \text{ °C. flow: } 1,2 \text{ mL/min}); \text{ dl-}(\pm)$ menthyl acetate:  $t_{d-(+)} = 9.58 \text{ min}; t_{l-(-)} = 10.85 \text{ min}. \text{ dl-}(\pm)-\text{menthol: } t_{d-(+)} = 13.25 \text{ min}; t_{l-(-)} = 13.69 \text{ min}.$ 

## **Results and discussion**

First, we have examined the influence of hydrolytic activity of some lipase's source commercially available, as well as the catalytic loading during the acylation of dl-menthol **1** using isopropenyl acetate (IA) as acyl donor. All the experiments were carried out in diethyl ether as organic solvent, both in the presence and the absence of molecular sieves 4 Å, in order to regulate the water in the reaction medium. The conversions and the enantiomeric excesses of obtained acetates **1a** and the remaining alcohols **1** were quantified by chiral gas chromatography after their separations by flash chromatography. The results are summarized in Table 1.

Entry	Lipase <sup>a</sup> (mg)	MS4 Å (mg)	Acyl donor	$\stackrel{ee_s}{{}^{f}}(\!\! \text{Yield } \%)^h$	$ee_p \ \%^f (Yield \ \%)^h$	C(%) <sup>g</sup>	E <sup>g</sup>
1	PCL (80)	Without <sup>b</sup>	IA	_	_	NR	_
2	PPL (100)			-	-	NR	-
3	CAL-B (200)			-	-	NR	-
4	CAL-B (150)			-	-	NR	-
5	CAL-B (100)			-	-	NR	-
6	CRL (200)	Without <sup>b</sup>		20 (69)	> 99 (10)	17	> 200
7		With <sup>c</sup>		31 (61)	98 (18)	24	> 100
8	CRL (150)	Without <sup>b</sup>		68 (42)	> 99 (33)	41	> 200
9		With <sup>c</sup>		31 (62)	97 (20)	24	89
10	CRL (100)	Without <sup>b</sup>		62 (45)	> 99 (30)	38.5	> 200
11		With <sup>c</sup>		9 (ND)	> 99 (ND)	8.3	> 200
12	CCL (200)	Without <sup>b</sup>		54 (35)	98 (28)	35.5	> 100
13		With <sup>c</sup>		56 (30)	98 (28)	36.4	> 100
14	CCL (150)	Without <sup>b</sup>		44 (53)	98 (25)	31	> 100
15		With <sup>c</sup>		43 (54)	98 (23)	31	> 100
16	CCL (100)	Without <sup>b</sup>		39 (64)	> 99 (14)	28	> 200
17 <sup>d</sup>				66 (38)	> 99 (32)	40	> 200
18		With <sup>c</sup>		39 (64)	> 99 (14)	28	> 200
19 <sup>d</sup>				51 (40)	> 99 (19)	34	> 200
20		Without <sup>b</sup>	VA	64.4 (42)	95.2 (32)	40.3	80
21		With <sup>c</sup>		63.7 (38)	95.2 (30)	40	80
22 <sup>e</sup>		Without <sup>e</sup>	SA	25 (39)	53 (19)	32	4

Table 1 Transesterification of *dl*-menthol with various lipases in the presence and the absence of molecular sieves 4 Å

NR no reaction, ND not determined

Bold is to highlight the most important results

<sup>a</sup>*Pseudomonas cepacia* lipase from Amano (> 30,000 U/g), *Candida rugosa* lipase type VII (1170 U/mg), *Porcine pancreatic* lipase type II (100–500 U/mg), *Candida antarctica* lipase immobilized on acrylic resin (> 10,000 U/g) from Sigma-Aldrich. *Candida cylindracea* lipase from Fluka (2.8U/g)

<sup>b</sup>Reaction conditions : 1 mmol*dl*-menthol, 3 mmolenol ester (IA or VA), 2 mL diethyl ether with lipase for 24 h at room temperature

<sup>c</sup>With molecular sieve (4 Å) (20 mg)

<sup>d</sup>48 h at room temperature

 $^{\rm e1}$  mmoldl-menthol, 1 mmol succinic anhydride, 2 mL diethyl ether with lipase for 24 h at room temperature

<sup>f</sup>Enantiomeric excess measured by chiral GC

<sup>g</sup>Conversion:  $C = ee_s/ee_p + ee_s$ ; Selectivity:  $E = Ln [(1 - C) (11 - ee_{(S)})]/Ln [(11 - C) (1 + ee_{(S)})]$ [44, 45]

<sup>h</sup>Isolated yield quantified after separation by flash chromatography

Among all the lipases screened, CRL and CCL gave the best conversions and high enantiomeric excesses as shown in Table 1. The transesterification of *dl*menthol with IA in diethyl ether by employing lipases from sources such as PCL, PPL, CAL-B showed no progress even after prolonged reaction time (Table 1, entry 1-5). However, the lipases from CRL and CCL provided moderate to good enantioselectivity for *l*-menthyl acetate. Experiments carried out with and without molecular sieves illustrated its effect on the catalytic process, and this effect is particularly interesting. An increase in the amount of CRL was clearly in disfavor of the lipase reactivity without any perturbation of selectivity factor (E > 200)(Table 1, entries 6, 8 and 10), and the conversion decreased from c = 41% to c = 17% when the loading amount of the CRL was 150 and 200 mg, respectively (Table 1, entry 8 vs. 6). The same observation was made in our previous investigation on the influence of CCL amount during the acylation of ferrocenylethanol [29]. A drastic decrease of CRL reactivity by the introduction of the molecular sieves was observed when amounts of 150 and 100 mg were used (Table 1, entry 9 vs. 8 and 11 vs. 10). This effect strongly declined at 200 mg of CRL (Table 1, entry 7 vs. 9 and 11). In the case of CCL, no significant effects were observed in the presence of the molecular sieves either on reactivity or on selectivity. The decrease of the lipase amount exhibits optimization of the acylation advancement without affecting the selectivity (Table 1, entries 12, 14, 16 vs. entries 13, 15, 18).

The CRL and CCL lipases used are commercial and acquired from two different suppliers, and they are supposed to be differentiated solely by their hydrolytic activity; however, we found that only CRL was strongly influenced by the addition of the molecular sieves. This is probably due to the perturbation of the molecular water partition as well as to the reduction of its presence in the organic media which seems necessary for CRL. This result confirms the results of previous studies [46, 47] which note the need to add water to improve CRL conversion, and this even in the case of immobilized lipase. Both lipases are specific to (1R,2S,5R)-1a; the absolute configuration of these compounds is well known and *l*-menthyl acetate enantiomer is obtained. Due to the sensitivity of the free CRL, we have selected CCL as being less expensive and more stable as well as modestly studied for the resolution of the *dl*-menthol [40], with the appropriate catalytic load of m = 100 mg(280U). All the enzymatic reactions dedicated to the study of several parameters affecting the catalytic process were stirred for 48 h at room temperature (Table 1, entry 17). Other acetylating agents were used under optimized conditions: vinyl acetate (VA) and succinic anhydride (SA). With the first one, (-)-menthyl acetate 1a was recovered with 95% eep at 40% of conversion with and without molecular sieves, but with a slight diminution of selectivity in the first case (Table 1, entries 20–21). On the other hand, a drastic decrease in the selectivity was shown using succinic anhydride as acetyl donor E = 4, regardless of the reactivity c = 32%(Table 1, entry 22). Since it is well known that the enantioselectivity of enzymes depends essentially on the polarity of the solvents, we have envisaged studying the dependence of both enol esters to the hydrophobicity of the employed organic solvent, and its impact on the CCL-catalyzed resolution of this  $\alpha$ -substituted cycloalkanol. For that, the same optimum conditions were undertaken, using five

organic solvents with different LogP values: tetrahydrofuran (THF), diethylether ( $Et_2O$ ), diisopropylether (DIPE), *tert*-butylmethylether (TBME) and heptane. All experiments were conducted without molecular sieves for 48 h. The obtained results are summarized in Table 2.

The results in Table 2 show very good enantioselectivity for *l*-(-)-menthyl acetate. The conversion and selectivity factors recorded depend on the nature of the enol ester and the solvent used (Fig. 1). The CCL maintains its high selectivity in the five solvents used using IA as acetyl donor (E > 200), the best conversion being achieved in diethylether c = 40% (Table 2, entry 7). Unfortunately, a denaturation effect of this yeast was noted in THF, TBME and heptane, where the conversion rate does not exceed 4% (Table 2, entries 6, 8 and 10), and a loss of reactivity is noted in DIPE, c = 26% (Table 2, entry 9).

We can conclude here that in some cases the nature of the organic solvent acts as an inhibitor factor of the CCL-catalyzed acylation using IA, whereas, a significant effect of the solvent hydrophobicity on the CCL reactivity and selectivity was revealed when vinyl acetate was used. In diethyl ether, TBME, DIPE and heptane, the CCL reactivity was still stable and the conversion varied between 33% < c < 44% (Table 2, entries 2–5). Moderate advancement was noted in THF c = 12% (Table 2, entry 1), while a drastic decrease of the selectivity factor was obtained in DIPE, E = 44 (Table 2, entry 4). It is to be underlined that the best results in terms of reactivity and selectivity are obtained with diethyl ether, TBME, DIPE as solvents during the acylation of *dl*-menthol by means of the free CCL. In

Enor ester	Solvent (log P)	$ee_S \%^b$ (Yield %) <sup>d</sup>	$ee_P \%^b$ (Yield %) <sup>d</sup>	$C (\%)^{c}$	$E^{c}$
VA	THF (0.48)	14 (55)	> 99 (7)	12	> 200
	Et <sub>2</sub> O (0.85)	64 (42)	95 (32)	40	76
	<b>TBME (1.35)</b>	54 (36)	> 99 (29)	35	> 200
	DIPE (1.4)	69 (46)	91 (36)	43	44
	Heptane (4)	48 (40)	> 99 (25)	33	> 200
IA	THF (0.48)	3 (ND)	> 99 (ND)	3	> 200
	Et <sub>2</sub> O (0.85)	66 (38)	> 99 (32)	40	> 200
	TBME (1.35)	4 (ND)	> 99 (ND)	4	> 200
	DIPE (1.4)	34 (ND)	> 99 (ND)	26	> 200
	Heptane (4)	4 (ND)	> 99 (ND)	4	> 200
	VA	VA THF (0.48) Ett <sub>2</sub> O (0.85) TBME (1.35) DIPE (1.4) Heptane (4) IA THF (0.48) Et <sub>2</sub> O (0.85) TBME (1.35) DIPE (1.4) Heptane (4) Heptane (4)	End estel       Solvent ( $103$ F) $ee_S$ is (11ed is)         VA       THF (0.48)       14 (55)         Et <sub>2</sub> O (0.85)       64 (42)         TBME (1.35)       54 (36)         DIPE (1.4)       69 (46)         Heptane (4)       48 (40)         IA       THF (0.48)       3 (ND)         Et <sub>2</sub> O (0.85)       66 (38)         TBME (1.35)       4 (ND)         DIPE (1.4)       34 (ND)         Heptane (4)       4 (ND)	End estel       Solvent ( $103$ f) $eeg x$ ( $11ett x$ ) $eep x$ ( $11ett x$ )         VA       THF (0.48)       14 (55)       > 99 (7)         Et <sub>2</sub> O (0.85)       64 (42)       95 (32)         TBME (1.35)       54 (36)       > 99 (29)         DIPE (1.4)       69 (46)       91 (36)         Heptane (4)       48 (40)       > 99 (25)         IA       THF (0.48)       3 (ND)       > 99 (ND)         Et <sub>2</sub> O (0.85)       66 (38)       > 99 (32)         TBME (1.35)       4 (ND)       > 99 (ND)         DIPE (1.4)       34 (ND)       > 99 (ND)         Heptane (4)       4 (ND)       > 99 (ND)	End ester       Solvent (log 1)       eeg 3/ (11eh 3/)       eep 3/ (11eh 3/)       ee (3/)         VA       THF (0.48)       14 (55)       > 99 (7)       12         Et <sub>2</sub> O (0.85)       64 (42)       95 (32)       40         TBME (1.35)       54 (36)       > 99 (29)       35         DIPE (1.4)       69 (46)       91 (36)       43         Heptane (4)       48 (40)       > 99 (25)       33         IA       THF (0.48)       3 (ND)       > 99 (ND)       3         Et <sub>2</sub> O (0.85)       66 (38)       > 99 (32)       40         TBME (1.35)       4 (ND)       > 99 (ND)       4         DIPE (1.4)       34 (ND)       > 99 (ND)       4

 Table 2
 Influence of enol ester and solvent hydrophobicity on the CCL-catalyzed resolution of dl-menthol

ND not determined

Bold is to highlight the most important results

<sup>a</sup>Reaction conditions: 1 mmol*dl*-menthol, 3 mmolenol ester, 2 mL organic solvent with *CCL* (280U) for 48 h at room temperature

<sup>b</sup>Enantiomeric excess are measured by chiral GC

<sup>c</sup>Conversion :  $C = ee_S/ee_P + ee_{s}$ ; selectivity:  $E = Ln [(1 - C) (1 - ee_{(S)})]/Ln [(1 - C) (1 + ee_{(S)})]$ [44, 45]

<sup>d</sup>Isolated yield quantified after separation by flash chromatography



Fig. 1 Effect of the solvent on the CCL performance in kinetic resolution of *dl*-menthol

addition, it was found that the highest selectivity and reactivity were obtained with vinyl acetate as the acylating agent. To the best of our knowledge, these results are the first to have been described.

Finally, an attempt at optimization of the CCL-catalyzed resolution of menthol was carried out by the introduction of some additives directly into the organic medium. This alternative used in our previous works has shown that the activity of some lipases in kinetic resolution could be highly influenced by the alkaloid additives [25]. Therefore, we selected the acylation conditions, using vinyl acetate as acetyl donor and as additives: crown ether (18-C-6), a mineral base (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and organic base (NEt<sub>3</sub>), as well as two chiral Lewis bases, alkaloids type (cinchonidine and quinidine). A catalytic amount of those additives were introduced directly following the previously described procedures [25, 26]. The obtained results are summarized in Table 3.

Introduction of quinidine (30 mol%) in CCL-catalyzed acylation of *dl*-menthol in TBME, exhibited a large activation of the catalytic process. The conversion rate achieve the threshold of 49% and *l*-(-)-menthyl acetate **1a** was obtained at high enantiomeric excess,  $e_P = 93\%$  (Table 3, entry 3) and E = 80. In diethyl ether, the recorded conversion was 56% with a drastic decrease of selectivity, E = 30, and the remaining alcohol, *d*-(+)-menthol was recovered at  $ee_S = 97\%$  (Table 3, entry 1). The use of heptane as an organic solvent causes a significant enhancement of the CCL reactivity during the acylation of *dl*-menthol, as the enantiodiscrimination of CCL disappears and the reaction velocity of both menthol enantiomers are quasi-

Entry	Additive <sup>a</sup>	Solvent (log P)	$ee_S \ \%^b (Yield \ \%)^d$	$ee_P \ {\%}^b (Yield \ {\%})^d$	$C(\%)^{c}$	$E^{c}$
1	Quinidine	Et <sub>2</sub> O (0.85)	97 (42)	75 (48)	56	30
2		Heptane (4)	27 (20)	9 (55)	75	1
3		<b>TBME (1.35)</b>	88 (38)	93 (39)	49	80
4	Cinchonidine	Et <sub>2</sub> O (0.85)	_	_	NR	_
5		Heptane (4)	40 (44)	> 99 (20)	30	> 200
6		TBME (1.35)	45.5 (40)	98 (22)	32	> 100
7	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	TBME (1.35)	42 (40)	98 (20)	30	> 100
8	Et <sub>3</sub> N		24 (57)	98 (12)	19.6	> 100
9	18-C-6	Et <sub>2</sub> O (0.85)	61 (52)	> 99 (21)	38	> 200
10		TBME (1.35)	24 (52)	98 (12)	20	> 100

Table 3 Influence of the additives on the outcome of the CCL-catalyzed resolution of *dl*-menthol

Bold is to highlight the most important results

<sup>a</sup>Reaction conditions: 1mmol*dl*-menthol, 3 mmol vinyl acetate, 2 mL organic solvent with *CCL* (280U), 30 mol% additive for 48 h at room temperature

<sup>b</sup>Enantiomeric excesses are measured by chiral GC

<sup>c</sup>Conversion :  $C = ee_S/ee_P + ee_s$ ; selectivity:  $E = Ln [(1 - C) (1 - ee_{(S)})]/Ln [(1 - C) (1 + ee_{(S)})]$ [44, 45]

<sup>d</sup>Isolated yield quantified after separation by flash chromatography

equal (c = 75% and E = 1) (Table 3, entry 2). On the other hand, no effect was observed on the CCL performance when cinchonidine was added to both heptane and TBME (Table 3, entry 5, 6), whereas the catalytic activity was totally inhibited in diethyl ether (Table 3, entry 4). The addition of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a weak mineral base, led to a slight diminution of the conversion from c = 35% without additive to c = 30% with it (Table 3, entry 7), and this effect was amplified by the addition of Et<sub>3</sub>N, an organic base, c = 19% (Table 3, entry 8). Moreover, the introduction of an ether crown-type additive, 18-C-6, led to a more drastic decrease of the conversion rate with TBME as solvent, c = 20% than in diethylether, c = 38% (Table 3, entries 9, 10). Thus, the direct introduction of a catalytic amount of a natural additive, such as quinidine, significantly optimizes the catalytic performance of CCL during the acylation of *dl*-menthol using vinyl acetate in TBME, so that this solvent is an alternative to diethyl ether in terms of environmental exigencies [48, 49]. To the best of our knowledge, this result is the first described using such an additive to access *l*-menthol quantitatively at high enantiomeric purity. In order to valorize this simple and easy methodology under mild conditions, we have applied it at a larger scale (Scheme 2).

Optimal conditions were undertaken and applied to resolve 10 mmol (1.5 g) of racemic menthol using 30 mmol of vinyl acetate and 1 g of CCL in the presence of 30 mol% (0.97 g) of quinidine as additive and dissolved in 20 mL of TBME. The suspension was stirred at room temperature for 48 h. After filtration, the remaining alcohol and the produced acetate were separated by chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate: 95/5) and analyzed by chiral GC. The reaction



Scheme 2 Multigram scale of acylation of *dl*-menthol with quinidine



Fig. 2 Chromatograms of scale-up acylation of *dl*-menthol

results were reproduced, and the most important l-(-)-1a enantiomer was obtained quantitatively with  $ee_p = 94\%$  under mild conditions (Fig. 2).

# Conclusion

The kinetic resolution of dl-menthol by CCL-catalyzed acylation was optimized with vinyl acetate and quinidine as additives in TBME as solvent. Optimal conversion, c = 49%, and high selectivity, E = 80, were obtained under optimized conditions with quinidine as additive. The reaction parameters such as enzyme load, the nature of enol esters and organic solvents and water activity were found to have profound effects on the conversion and enantioselectivity. The comparison of the behavior of CRL and CCL for the enantioselective acylation of dl-menthol showed a greater stability of CCL activity and did not depend on the water content. The gramscale reaction was efficient and constitutes a new approach to the enantioselective transesterification of dl-menthol. Another interesting aspect of these results is the use of TBME as a substitute for diethyl ether, which is considered a highly hazardous solvent. We can expect to find this alternative in a preparative production of optically active *l*-menthol enantiomers which constitutes a simple protocol for the production of the enantiomerically enriched *l*-menthyl acetate.

Acknowledgements Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (FNR 2000 and PNR), Catholic University of Louvain, and the Fund for Scientific Research (FNRS) are gratefully acknowledged for financial support of this work. The Catholic University of Louvain is acknowledged for a grant "Cooperation development" awarded to Fatma-Zahra BELKACEMI. The authors knowledge Dr. N. GRINE for English reviewing of this manuscript.

### Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare no conflict of interest.

# References

- 1. Chemistry Views, New Process for Menthol Production. (Wiley-VCH VerlagGmbH & Co. KGaA, BASF SE Ludwigshafen, German. 30 June 2012)
- 2. R. Eccles, J. Pharm. Pharmacol. 46(8), 618 (1994)
- N. Galeotti, L.D.C. Mannelli, G. Mazzanti, A. Bartolini, C. Ghelardini, Neurosci. Lett. 322(3), 145 (2002)
- 4. E. Brenna, C. Fuganti, F.G. Gatti, S. Serra, Chem. Rev. 111(7), 4036 (2011)
- 5. M. McCoy, Chem. Eng. News 88(35), 30 (2010)
- R.A. Sheldon, Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds (CRC Press, Boca Raton, 1993)
- 7. R. Noyori, Angew. Chem. Inter. Ed. 41(12), 2008 (2002)
- 8. H. Itoh, H. Maeda, S. Yamada, Y. Hori, T. Mino, M. Sakamoto, Org. Chem. Front. 1(9), 1107 (2014)
- D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L.H. Steenkamp, A.L. Rousseau, C.J. Parkinson, J. Chaplin, R.K. Mitra, T. Moutlana, S.F. Marais, N.S. Gardiner, J. Mol. Catal. B Enzym. 75, 1 (2012)
- 10. M. Li, L.R. Yang, G. Xu, J.P. Wu, Biochem. Eng. J. 109, 81 (2016)
- 11. S. Serra, E. Brenna, C. Fuganti, F. Maggioni, Tetrahedron Asymmetry 14(21), 3313 (2003)
- 12. L. Yu, Y. Xu, X. Wang, X. Yu, J. Mol. Catal. B Enzym. 47(3), 149 (2007)
- 13. J. Pan, N.-D. Dang, G.-W. Zheng, B. Cheng, Q. Ye, J.-H. Xu, Bioresour. Bioprocess. 1(1), 12 (2014)
- 14. G.-W. Zheng, J. Pan, H.-L. Yu, M.-T. Ngo-Thi, C.-X. Li, J.-H. Xu, J. Biotechnol. 150(1), 108 (2010)

- 15. G.-W. Zheng, H.-L. Yu, C.-X. Li, J. Pan, J.-H. Xu, J. Mol. Catal. B Enzym. 70(3), 138 (2011)
- 16. G. Grogan, Ann. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem. 109, 15 (2013)
- 17. U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations* (Wiley, Weinheim, 2005)
- 18. K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, 6th edn. (Springer, Berlin, 2011)
- 19. A. Mehta, U. Bodh, R. Gupta, J. Biotechnol. Res. 8, 58 (2017)
- 20. C. Bidjou, L. Aribi-Zouioueche, J.-Y. Legros, J.-C. Fiaud, J. Soc. Alg. Chim. 9(2), 261 (1999)
- 21. A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, Chirality 17(1), 1 (2005)
- 22. A.M. Klibanov, Acc. Chem. Res. 23(20), 114 (1990)
- 23. P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc. 113(8), 3166 (1991)
- 24. Y. Kitamoto, Y. Kuruma, K. Suzuki, T. Hattori, J. Org. Chem. 80(1), 521 (2015)
- 25. M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, Tetrahedron Asymmetry 19, 2378 (2008)
- M. Merabet-Khelassi, N. Melaïs, M. Boukachabia, J.-C. Fiaud, L. Aribi-Zouioueche, J. Soc. Alg. Chim. 17(2), 185 (2007)
- 27. A. Zaks, A.M. Klibanov, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3192 (1985)
- 28. L. Chua, S.M.R. Sarmidi, Enzyme Microb. Technol. 38, 551 (2006)
- M. Merabet-Khelassi, N. Bouzemi, J.-C. Fiaud, O. Riant, L. Aribi-Zouioueche, C. R. Chimie. 14(11), 978 (2011)
- 30. N. Bouzemi, I. Grib, Z. Houiene, L. Aribi-Zouioueche, Catalysts 4, 215 (2014)
- 31. M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani, Tetrahedron Asymmetry 12, 585 (2001)
- 32. N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, J.-C. Fiaud, Tetrahedron Lett. 4(3), 627 (2004)
- T. Miyazawa, E. Kaito, T. Yukawa, T. Murashima, T. Yamada, J. Mol. Catal. B:Enzym. 37, 63 (2005)
- 34. N. Melais, L. Aribi-Zouioueche, O. Riant, C. R. Chimie 19(8), 971 (2016)
- S. Vorlová, U.T. Bornscheuer, I. Gatfield, J.M. Hilmer, H.J. Bertram, R.D. Schmid, Adv. Synth. Catal. 344(10), 1152 (2002)
- 36. J.C.D. Silva, M.D.G. Nascimento, J. Brazil. Chem. Soc. 27(12), 2226 (2016)
- 37. W.-H. Wu, C.C. Akoh, R.S. Phillips, Enzyme Microb. Technol. 18, 538 (1996)
- 38. C.J. Gray, J.S. Narang, S.A. Barker, Enzyme Microb. Technol. 12(10), 800 (1990)
- 39. T. Kuroiwa, K. Hamazaki, M. Katayama, S. Sato, T. Matsui, Process Biochem. 51(12), 2047 (2016)
- 40. Z. Lü, Y. Chu, Y. Han, Y. Wang, J. Liu, J. Chem. Technol. Biotechnol. 80(12), 1365 (2005)
- J.N. Trbojević, A.S. Dimitrijević, D.V. Veličković, M. Gavrović-Jankulović, N.B. Milosavić, HEM. IND. 67(5), 703 (2013)
- 42. S. Benjamin, A. Pandey, Yeast 14(12), 1069 (1998)
- 43. M.T. Flood, M. Kondo, Reg. Toxicol. Pharmacol. 33, 157 (2001)
- 44. C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, J. Am. Chem. Soc. 104(25), 7294 (1982)
- 45. H.B. Kagan, J-C. Fiaud, *Kinetic Resolution: Topics in stereochemistry*. ed. by E.L. Eliel, S.H. Wilen, vol 42 (Wiley, New York, 1988), p. 249
- 46. D.L. Wang, A. Nag, G.C. Lee, J.F. Shaw, J. Agricul, Food Chem. 50(2), 262 (2002)
- 47. S. Bai, Z. Guo, W. Liu, Y. Sun, Food Chem. 96, 1 (2006)
- F.P. Byrne, S. Jin, G. Paggiola, T.H.M. Petchey, J.H. Clark, T.J. Farmer, A.J. Hunt, C.R. McElroy, J. Sherwood, Sustain. Chem. Process. 4, 7 (2016)
- D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C.R. McElroy, S. Abou-Shehada, P.J. Dunn, Green Chem. 18(1), 288 (2015)

## Affiliations

# Fatima Zohra Belkacemi<sup>1</sup> • Mounia Merabet-Khelassi<sup>1</sup> () • Louisa Aribi-Zouioueche<sup>1</sup> () • Olivier Riant<sup>2</sup> ()

Fatima Zohra Belkacemi

zahrachimorg@live.com; fatimazohra.belkacemi@univ-annaba.org; http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957416617303877

Mounia Merabet-Khelassi mounia.merabet@univ-annaba.dz

Olivier Riant olivier.riant@uclouvain.be

- <sup>1</sup> Ecocompatible Asymmetric Catalysis Laboratory (LCAE), Badji Mokhtar Annaba-University, Annaba, Algeria
- <sup>2</sup> Institute of Condensed Matter and Nanosciences Molecules, Solids and Reactivity (IMCN/ MOST), Université Catholique de Louvain, Louvain La Neuve, Belgium

### Tetrahedron: Asymmetry 28 (2017) 1644-1650

Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron: Asymmetry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetasy

# Diastereoselective and enantioselective alkaline-hydrolysis of 2-aryl-1-cyclohexyl acetate: a CAL-B catalyzed deacylation/acylation tandem process





<sup>a</sup> Ecocompatible Asymmetric Catalysis Laboratory (LCAE), Badji Mokhtar Annaba-University, B.P. 12, 23000 Annaba, Algeria <sup>b</sup> 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

### A R T I C L E I N F O

Article history: Received 13 August 2017 Accepted 12 September 2017 Available online 7 October 2017

### ABSTRACT

*Candida antarctica* lipase proved to be a particularly efficient lipase for the resolution of racemic 2-arylcyclohexyl acetate in hydrolysis reaction with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in an organic medium. The (1*R*,2*S*)-*trans*-2-arylcyclohexanols **2a–2d** were obtained with high ee values (up to >99%) and the selectivity reached *E* > 200. The influence of the enol ester and the solvent on ( $\pm$ )-*trans*-2-arylcyclohexanol in the CAL-B catalyzed acylation was also studied and compared with the deacylation. The CAL-B exhibits a better affinity for the alkaline hydrolysis reaction compared with acylation with the enol esters in the same organic solvents. The best conditions were applied to resolve a stereoisomeric mixture *cis/trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol and its corresponding acetate by acylation and deacylation. The obtained results show a highly enantio- and diastereoselectivity of the CAL-B during the acylation and the deacylation in favor of the *trans*-(*R*)-enantiomer product. The resolution of a mixture of *cis/trans*-2-arylcyclohexanols was an easy, convenient approach to provide only one stereoisomer of a mixture of four with high enantiomeric excess.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The importance of enantiopure secondary alcohols derivatives as versatile building blocks for the synthesis of biologically active compounds is well established.<sup>1</sup> The *trans*-2-arylcyclohexanol derivatives, developed by Whitesell et al.,<sup>2</sup> are important as chiral sources for asymmetric transformations or chiral materials for the asymmetric manufacture of physiologically active substances such as diltiazem.<sup>3</sup> Their high asymmetric inductions are attributed to the high stereoselective control due to both steric and electronic effects of the aryl moiety. The routes reported in the literature to access enantioenriched trans-2-phenylcyclohexanol use asymmetric transformations such as hydroboration,<sup>4</sup> epoxidation<sup>5</sup> or dihydroxylation<sup>6</sup> of 1-phenylcyclohexene, or also by enantioselective protonation/reduction starting from the corresponding prochiral enol acetate.<sup>7</sup> Other routes have also used kinetic resolutions<sup>8</sup> such as the diastereo- and enantioselective silvlation of 2-arylcyclohexanols.9 The enzymatic acylation of the rac-trans-2-arylcyclohexanols has been used as an easy route with various lipases: Pseudomonas amano sp.,<sup>10</sup> PS30 lipase,<sup>11</sup> Candida rugosa lipase (CRL)<sup>12</sup> and Pseudomonas fluorescens lipase (AK).<sup>13</sup> The standard protocol reported for these reactions engages vinyl acetate as acyl donor and *tert*-butylmethylether (TBME) as solvent. The enzymatic hydrolysis of trans-2-arylcyclohexyl derivatives is less reported, to the best of our knowledge, with only the Crude *Chicken Liver* Esterase (*CCLE*) being used in biphasic media.<sup>14</sup> The lipase from Candida antarctica fraction B is a very robust biocatalyst in an organic medium, with high catalytic efficiency in kinetic resolutions.<sup>15</sup> In our previous work, CAL-B was successfully used for the resolution of arylakylcarbinols<sup>16</sup> and primary 1,2-disbstituted ferrocene derivatives.<sup>17</sup> Furthermore, we have developed a green and easy pathway for the enzymatic hydrolysis in non-aqueous organic media, in the presence of sodium carbonates.<sup>18</sup> We have also effectively applied this procedure to the deracemization of a large range of aromatic acetates<sup>19</sup> and the chemoselective deacylation of *N*,*O*-protected amino alcohols.<sup>20</sup>

In order to extend the field of application of the CAL-B catalyzed alkaline hydrolysis approach, we applied it to some *trans*-2-arylcyclohexyl derivatives. Herein we describe the kinetic resolution via alkaline hydrolysis mediated by CAL-B of four compounds:





Tetrahedron

Corresponding author.
 *E-mail addresses:* louisa.zouioueche@univ-annaba.dz, louisa.zouioueche@gmail.
 com (L. Aribi-Zouioueche).



Scheme 1. Acylation/deacylation tandem approaches.

*trans*-2-phenyl-cyclohexyl acetate **3a**, *trans*-2(2-methoxyphenyl)-cyclohexyl acetate **3b**, *trans*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclohexyl acetate **3c**, *trans*-2-(naphthalen-2-yl)-cyclohexyl acetate **3d**. The efficiency of CAL-B as a biocatalyst used in the alkaline hydrolysis approach is comparable to the acylation reaction using two different enol esters in various solvents (Scheme 1). We also studied the isomeric mixture of *cis*-*trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol. The optimized conditions of both approaches are applied to the direct diastereo- and enantioselective resolution of racemic *cis*-*trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol.

#### 2. Results and discussion

Herein we focused on four substrates:  $(\pm)$ -trans-2-arylcyclohexyl derivatives **2a–2d** and **3a–3** including aryl groups with different steric and electronic environments. The first one  $(\pm)$ -trans-2-phenyl-1-cyclohexanol **2a** is commercially available, while the last three **2b**, **2c**, **2d** are obtained via copper(I) catalyzed ring opening of cyclohexane oxide **1** by means of the appropriate arylmagnesium bromide with satisfactory yields (Scheme 2A). The  $(\pm)$ -trans-2-arylcyclohexyl acetates **3a–3d** were obtained via standard chemical acylation (Scheme 2B).



Scheme 2. Synthesis of trans-2-arylcyclohexyl derivatives.

The *Candida antarctica* lipase fraction B, immobilized on acrylic resin, was used as the catalyst for the kinetic resolution of acetates **3a–3d** via alkaline hydrolysis. The same lipase was used for the acylation of alcohols **2a–2d** by two enol esters in organic solvents with different hydrophobicities, the *tert*-butylmethylether (TBME,  $\log P = 1.35$ ) and toluene (PhMe,  $\log P = 2.5$ ).

# 2.1. CAL-B catalyzed deacylation/ acylation of (±)-*trans*-2-Arylcyclohexyl derivatives

The alkaline hydrolysis experiments are established on an equimolecular mixture of racemic acetates **3a–3d** and sodium carbonate (1 mmol/1 mmol), diluted in 2 mL of organic solvent, in the presence 200 mg of CAL-B (>10,000 U/g). The acylation experiments were performed on 1 mmol of racemic alcohols **2a–2d** with 3 equiv of enol esters:vinyl acetate (VA) and isopropenyl acetate in 2 mL of organic solvent with the same loading amount of CAL-B. The reaction mixture of the alkaline hydrolysis was stirred at 40 °C for three days and that of the acylation was stirred for one day at room temperature. The isolated yields of the products and the residual substrates were quantified after removing the lipase by simple filtration and their separation by flash chromatography. Their enantiomeric excesses were determined by chiral HPLC or GC



**Scheme 3.** Enzymatic deacylation/acylation approaches of *trans*-2-arylcyclohexyl derivatives.

(Scheme 3). The stereochemical preference of the CAL-B was determined by establishing the absolute configuration of the remaining alcohols and acetates after comparison of the specific rotations with those reported in the literature. In both cases CAL-B preferentially catalyzed the (1*R*)-enantiomer following Kazlauskas rule.<sup>21</sup> The results of both enzymatic resolution approaches of *rac-trans*-2-arylcyclohexyl derivatives are summarized in Table 1.

All the experiments show a high enantioselectivity of the CAL-B during the alkaline hydrolysis of acetates 3a-3d (Table 1). The conversions essentially depend on both the bulkiness of the aryl substituent and the solvent hydrophobicity. The best results are recorded using TBME as the solvent in deacylation where the CAL-B hydrolyze efficiently the acetates 3a and 3c in favor of the (1R,2S)-enantiomer (entries 2 and 5). Moderate conversions are noted in toluene for **3a** and **3b** 17% < c < 30% (entries 1 and 3). In TBME as solvent, a conversion of 46.5% was reached for 3a, while the conversion strongly decreases in the case of more hindered and less soluble substrate **3b** (entry 2 and 4): the same effect being noted in toluene (entry 3 vs. 1). Based on those results, the hydrolysis reactions of 3c and 3d are performed only in TBME. The recorded results are in the same lines, the acetates 3c and 3d are hydrolyzed selectively (E > 200) with conversion rates of *c* = 49.5% for **3c** and *c* = 31% for **3d** (entries 5 and 6).

Using the same guidelines, the resolution of (±)-trans-2-arylcyclohexanol 2a-2d was carried through CAL-B catalyzed acylation using both enol esters and the two solvents used in alkaline hydrolysis. In all cases, high selectivity for the acylation was observed with vinyl and isopropenyl acetates (E > 97) in both solvents always with a (R)-enantiopreference. However, the CAL-B reactivity was modulated according to the reaction partners: the steric effects of the aryl-substituent's, the enol ester used as well as the solvent. Thus, the presence of either a phenyl or naphthyl substituent contributes in favor of the CAL-B acylation reactivity, and the best results were obtained (c = 47%) using isopropenyl acetate as acyl donor in toluene for 2a or in TBME with 2d (entries 7-10 and 19-22). Moreover, isopropenyl acetate shows a significant effect of the solvent for the resolution of **2b**, as the conversion jump from c = 6% in TBME to c = 30% in toluene (entry 11 vs. 12). This solvent effect is not observed in the case of the substrates **2a** and **2d** under the same conditions (entries 7–8, and 19–20) while for **2c**, the activity of CAL-B is low c < 11% (entries 15–16). Furthermore, the presence of a methoxy-substituent at the orthoposition of the aromatic ring causes a significant decrease in the conversion using isopropenyl acetate in TBME (entry 11 vs 7); this fact is less pronounced in toluene (entry 12 vs 8). The same moderate activity of CAL-B lipase occurs during the alkaline hydrolysis of the acetate **3b**.

#### Table 1

CAL-B catalyzed deacylation of 3a-3d versus acylation of 2a-2d

Entry	Substrate	Nucleophile	Solvent	$ee_{S}^{c}$ (%) Yield <sup>d</sup> (%)	$ee_{P}^{c}$ % Yield <sup>d</sup> (%)	C <sup>c</sup> (%)	E <sup>c</sup>
1 2	OAc		Toluene TBME	43 (65) 86 (51)	>99 (24) >99 (38)	30 46.5	>200 >200
3 4	3a OAc MeO		Toluene TBME	20 (ND) 38 (68)	99 (ND) >96 (20)	17 28.4	>200 71
5	3b OAc 3c OAc	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ª	TBME	96.5 (45)	>99 (44)	49.5	>200
6			TBME	44 (55)	>99 (25)	31	>200
7 8 9 10	3d OH	lsopropenyl acetate <sup>b</sup> Vinyl acetate <sup>b</sup>	TBME Toluene TBME Toluene	60 (50) 89 (43) 53.5 (60) 36.5 (70)	>99 (30) >99 (40) >99 (33) >99 (20)	38 47 35 27	>200 >200 >200 >200
11 12 13 14		lsopropenyl acetate <sup>b</sup> Vinyl acetate <sup>b</sup>	TBME Toluene TBME Toluene	6 (ND) 42 (55) 32 (ND) 6 (ND)	>99 (ND) >99 (20) >99 (ND) >99 (ND)	6 30 25 6	>200 >200 >200 >200
15 16 17 18		lsopropenyl acetate <sup>b</sup> Vinyl acetate <sup>b</sup>	TBME Toluene TBME Toluene	12 (ND) 6 (ND) 24 (69) 5 (ND)	98 (ND) 98 (ND) >99 (15) >99 (ND)	11 6 19.5 5	97 >200 >200 >200
19 20 21 22	2c OH	lsopropenyl acetate <sup>b</sup> Vinyl acetate <sup>b</sup>	TBME Toluene TBME Toluene	87 (40) 73 (37) 67 (40) 38 (65)	>99 (41) >99 (40) >99 (32) >99 (15)	47 42 40 28	>200 >200 >200 >200

ND: No determined.

<sup>a</sup> Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 1 mmol of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 mg of CAL-B, in 2 mL of organic solvent at 40 °C for 72 h.

<sup>b</sup> Reaction conditions: 1 mmol of racemic alcohol, 3 mmol of enol ester, 200 mg of CAL-B, in 2 mL of organic solvent at room temperature for 24 h.

<sup>c</sup> Conversion:  $C = ee_S/ee_P + ee_S$ ; Selectivity:  $E = Ln[(1 - C)(1 - ee(S))]/Ln[(1 - C)(1 + ee(S))]^{22}$ 

<sup>d</sup> Isolated yield after separation by flash chromatography.

When the vinyl acetate was employed as the acyl donor, these results were inverted. In TBME, the conversion was slightly diminished from c = 35% to c = 25% (entries 9 and 13), while it was strongly reduced in toluene from c = 27% to c = 6% (entries 10 and 14). The use of vinyl acetate as the acyl donor in TBME gave the best CAL-B activity in the acylation of the four substituted-cyclic alcohols  $19.5\% \le C \le 40\%$  (entries 9, 13, 17 and 21). A drastic decrease of the lipase activity was observed during the acylation of **2c**, and the best conversion c = 19.5% was obtained using the

vinyl acetate in TBME (entry 17). The effect of the structure of the aryl-substituent appeared more clearly in the acylation of **2d**. The lipase CAL-B was still active and selective with a naphthyl group (entries 19–22); the high E value indicates that the spatial structure of substrate **2d** fits nicely in the active site of the enzyme for acylation. This is not the case for substrate **2c**, where the presence of a biphenyl moiety strongly reduces the reactivity of the lipase (entries 15–18). The biphenyl group would undergo steric interactions related to the substituted phenyl, which probably

interferes with the active conformation of the lipase. Similar observations were previously described by the *Pseudomonas fluorescens* lipase with arylalkycarbinols.<sup>23</sup> The impact of the steric effect completely declined during the alkaline hydrolysis, where the recorded conversions for **3c** and **3d** are c = 49.5% and c = 31%, respectively (entries 5–6). Such results highlight the steric and the spatial requirements for both the reactivity and selectivity of the CAL-B catalyzed acylation of substituted cyclohexanol.

Herein, we have compared two kinetic resolution approaches for *rac*-2-arylcyclohexanols of different structures in an organic medium with CAL-B: the alkaline hydrolysis by  $Na_2CO_3$  and the acylation using two enol esters. The structure and the electronic effects of the aryl-substituent strongly impact both the reactivity and selectivity of the CAL-B and they mutually with the nucleophile used according to the solvent hydrophobicity. The alkaline hydrolysis by means of CAL-B as a biocatalyst constitutes a practical route for the separation of both antipodes of those chiral auxiliaries. Both enzymatic studied approaches are enantiocomplementary with (*R*)-enantioselection of the substrate. Based on the obtained results from the CAL-B catalyzed kinetic resolution of the *trans*-substituted cyclohexanols via alkaline hydrolysis and acylation, the best results were applied to the direct resolution of the racemic isomeric mixture *cis/trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol.

# 2.2. CAL-B catalyzed Acylation/Deacylation of (±)-*cis/trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol

To the best of our knowledge, the direct kinetic resolution of the isomeric *cis/trans* mixture of 2-phenyl-1-cyclohexanol and derivatives is very modestly reported.<sup>24</sup> At this stage of our investigation, we applied the optimized conditions for the kinetic resolution of the racemic *cis/trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol in order to examine the CAL-B enantio- and diastereoselectivity during the approaches, alkaline hydrolysis and acylation with enols esters. The isomeric

mixture ( $\pm$ )-*cis*/*trans*-2-pheny-1-cyclohexanol **2a** was obtained via reduction of the corresponding ketone using NaBH<sub>4</sub> in THF/ water, with a diastereoisomeric ratio of *cis*/*trans*: 20/80 (Scheme 4A). The corresponding acetate mixture was prepared via standard chemical acylation (Scheme 4B). The separation of all eight isomers of both *cis*/*trans*-alcohol et *cis*/*trans*-acetate was performed by chiral CG analysis (Fig. 1).

The enzymatic acylation was performed using isopropenyl acetate as the acyl donor in toluene at room temperature, and monitored by chiral GC. Aliquots from the reaction mixture at 24 h, 48 h and 72 h were analyzed. The enzymatic alkaline hydrolysis was carried out in TBME and stirred for 72 hours at 40 °C. The obtained results are given in Table 2.

The CAL-B catalyzed acylation and deacylation was performed and showed that only the *trans*-stereoisomer was transformed, with (*R*)-enantioselection and high E-values achieved (*E* > 200, Table 2). The *cis*-stereoisomer remained untransformed due to its spatial structure, which disadvantages the approach to the active site of CAL-B. Similar observations have been reported during the acylation of *cis*- $\beta$ -hydroxy-cyclohexanol catalyzed by the CAL-B<sup>24a</sup> and during the acylation of *cis*-4-*tert*-butyl-c-2-ethynylr-1-cyclohexanol catalyzed by *PSL*. The study explains that the *cis*-isomer reacts more slowly than the *trans*-analogue by conformational effects on the lipase, which affect both the reactivity and enantioselectivity of this lipase depending on the equatorial or axial position of OH and the bulkiness of the substituent at the 2-position.<sup>25</sup>

In our case, the acylation of *cis*/*trans-2a* using CAL-B showed a high selectivity (E > 200), and a conversion of C = 48% after 72 h of stirring was achieved (entry 3); and the *trans-*(1*R*,2*S*)-**3a** was obtained with ee >99%. The reaction time was prolonged compared to the acylation of the stereoisomer *trans-***2a** where the same conversion was achieved after 24 h under identical conditions (Table 1: entry 8). Otherwise, the CAL-B maintains a high selectivity during



Scheme 4. Enzymatic deacylation versus acylation of isomeric mixture of cis/trans (±)-2-phenyl-1-cyclohexyl derivatives.



Figure 1. Chromatogram of the isomeric mixtures cis/trans 2a and 3a.

Table 2
CAL-B catalyzed acylation/deacylation of isomeric mixture (±)- <i>cis/trans</i> -2-phenyl-1-cyclohexyl derivatives

Entry	Approach	Solvent	ees <sup>e</sup> (%)	ee <sub>P</sub> <sup>e</sup> %	C <sup>f</sup> (%)	$E^{f}$
1 <sup>a</sup>	Acylation	Toluene	58	99	37	>200
2 <sup>b</sup>			71	99	42	>200
3 <sup>c</sup>			93	99	48	>200
4 <sup>d</sup>	Deacylation	TBME	57	99	36	>200

<sup>a</sup> Reaction conditions: 1 mmol of racemic alcohol, 3 mmol of isopropenyl acetate, 200 mg of CAL-B, in 2 mL of toluene at room temperature for 24 h.

<sup>b</sup> Reaction conditions: for 48 h.

<sup>c</sup> Reaction conditions: for 72 h.

<sup>d</sup> Reaction conditions: 1 mmol of racemic acetate, 1 mmol of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 mg of CAL-B, in 2 mL of organic solvent at 40 °C for 72 h.

<sup>e</sup> Enantiomeric excess are measured by chiral GC or chiral HPLC.

<sup>f</sup> Conversion:  $C = ee_S/ee_P + ee_s$ ; Selectivity:  $E = Ln[(1 - C)(1 - ee_{(S)})]/Ln[(1 - C)(1 + ee_{(S)})]^{22}$ 

the alkaline hydrolysis of the *cis/trans*-**3a** (E > 200) and the conversion achieves the threshold of C = 36% after 72 h, in favor of *trans*-(1*R*,2*S*)-**2a** with ee >99% (entry 4). For the same reaction time, a conversion of c = 46% was recorded during the hydrolysis of *trans*-**2a**-isomer (Table 1: entry 2). The CAL-B catalyzed kinetic resolutions of the isomeric mixtures of either *cis/trans*-**2a** or *cis/trans*-**3a** are also slowed down. Finally, the kinetic resolution of the isomeric mixture of ( $\pm$ )-*cis/trans*-**2a** and ( $\pm$ )-*cis/trans*-**3a** by means of CAL-B was enantio- and diastereoselective using the both tandem process: alkaline hydrolysis/acylation.

### 3. Conclusion

A novel hydrolysis process in TBME with sodium carbonate catalyzed by CAL-B has been successfully extended to a set of *trans*-2arylcyclohexanols derivatives. The performance of this reaction was improved with various types of *trans*-2-phenylcyclohexanol and this allows direct access to a number of interesting chiral auxiliary with high ee values (up to >99%) and high selectivities E > 200, allowing us to isolate enantiomerically pure alcohols and acetates.

The effectiveness of CAL-B in alkaline hydrolysis was compared to acylation with two enol esters in the same solvents. The CAL-B exhibited a better affinity for the alkaline hydrolysis reaction compared with acylation with the enol esters in the same organic solvents. The structure of the aryl group had a significant influence on both the reactivity of the CAL-B lipase. The substitution of the aromatic ring with a methoxy moiety at the *ortho*-position and the hydrophobicity of the organic solvent caused a decrease in the reactivity and selectivity.

The best conditions were applied to resolve a stereoisomeric mixture *cis/trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol and its corresponding acetate in acylation and deacylation. The obtained results showed the highly enantio- and diastereoselectivity of the CAL-B during the acylation and the deacylation in favor of the *trans*-(*R*)-enantiomer product to the detriment of the *cis*-isomer which does not react. The CAL-B catalyzed resolution of mixture *cis*-*trans*-2-arylcy-clohexanols is an easy and convenient approach to provides only one stereoisomer of a mixture of four with high enantiomeric excess.

### 4. Experimental

### 4.1. General

All reagents purchased from either: Aldrich, Acros, TCI or Alfa Aesar were used as received. The *Candida antarctica lipase* immobilized on acrylic resin CAL-B was purchased from Aldrich. Specific activity >10,000 U/g used without any pre-treatment. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on Silica gel  $60F_{254}$  plates type *MERCK* 5179, 250 *mesh*, using UV light (254 nm) as the visualizing agent. NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers (300 MHz for <sup>1</sup>H, 75 MHz for <sup>13</sup>C) instrument and calibrated using residual deuterated solvent as an internal reference (peak at 7.26 ppm in <sup>1</sup>H NMR and 3 peaks at 77 ppm in <sup>13</sup>C NMR in the case of CDCl<sub>3</sub>). The following abbreviations were used to designate multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad, dd = doublet-doublet. Chemical shifts were expressed in ppm and coupling constant (1) in Hz. Melting points were measured using BÜCHI MELTING POINT B-545. The mass spectra were obtained using FINNIGAN-MAT TSQ 7000 and FINNIGAN-MAT LOC spectrometers. The enantiomeric excesses were measured by a chiral stationary phase HPLC: Chiralpak<sup>®</sup>AD ( $4.6 \times 250$  mm) and Chiralpak<sup>®</sup>IA ( $4.6 \times 250$  mm) column; or by gas chromatography (ThermoFinnigan Trace GC) equipped with an automatic autosampler and using a CHIRALSIL-DEX CB column (25 m; 0.25 mm; 0.25 µm). Retention times are reported in minutes. Optical rotations were determined using a Perkin-Elmer 341 Polarimeter at room temperature using a cell of 1 dm length and  $\lambda$  = 589 nm.

# 4.2. Synthesis procedures of all racemic compounds and their NMR data

The *trans*-2-phenylcyclohexanol **2a** is commercially available, whereas the rest of the alcohols were prepared by opening of cyclohexene oxide in the presence of Grignard reagent and a catalytic amount of copper salts (I).

# 4.2.1. Synthesis procedure of racemic *trans*-2-arylcyclohexanols 2b–2d

To a stirred refluxing suspension of 0,26 g of Magnesium turning (10.7 mmol, 1 equiv) in 1.5 mL of dry THF, under an argon atmosphere, was added dropwise a solution of 10 mmol (1 equiv) of the appropriate bromoaryl diluted in 15 mL of THF. A drop of dibromoethane was also added to initiate the reaction. After 1 h of stirring, the solution was cooled to -78 °C and a suspension of copper chloride(I) (48 mg, 0.045 equiv) was added. Ten minutes later, a mixture of cyclohexene oxide (0.75 ml, 0.7 equiv) in 3 mL of THF was added dropwise and stirred for ten minutes at the same temperature. The temperature was then gradually raised to ambient temperature with stirring overnight. For the treatment, the reaction mixture was quenched with 15 mL of saturated NH<sub>4</sub>Cl and 10 mL of diethyl ether were added. The organic layer was washed with brine and dried over magnesium sulphate, filtered and concentrated in vacuo. The crude reaction mixture was purified by flash chromatography on silica gel (50/50 diethyl ether/petroleum ether).

**4.2.1.1.** *trans*-**2-(2-Methoxyphenyl)-cyclohexanol 2b.** Molecular formula:  $C_{13}H_{18}O_2$  206.28 g/mol; white crystals; yield = 60% Melting point: 56.7 °C;  $R_f$  = 0.67. (Cyclohexane/Ethyl acetate: 80/20). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 1.33–1.54 (m<sub>a</sub>, 4H,

cycle), 1.97–1.85 (m<sub>a</sub>, 4H, cycle), 2.14–2.17 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 2.98– 3.07 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 3.72–3.8 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 3.85 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 6.9–7.01 (m<sub>a</sub>, 2H aromatics), 7.2–7.3 (m<sub>a</sub>, 2H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 157.8, 131.6, 127.5, 127.4, 121.1, 110.9, 74.1, 55.6, 45.1, 35.3, 32.4, 26.3, 25.2; MS (D-ESI; *m/z*): 229.68 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).

**4.2.1.2.** *trans*-2-Biphenyl-4-yl-cyclohexanol 2c. Molecular formula:  $C_{18}H_{20}O$  252.15 g/mol; white crystal, yield = 69%; Melting point: 131.2 °C;  $R_f$  = 0.69 (Petroleum ether/Ethyl acetate: 80/20). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.38–1.67 (m, 4H, cycle), 1.85 (s, 2H, cycle), 1.93–1.98 (m, 2H, cycle), 2.17–2.21 (m, 1H, OH), 2.50–2.58 (m<sub>a</sub>, 1H cycle), 3.70–3.78 (m<sub>a</sub>, 1H, cycle), 7.37–7.44 (m, 3H aromatics), 7.48–7.05 (m, 2H aromatics), 7.61–7.68 (m, 4H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 144.6, 140.9, 139.7, 128.8, 128.4, 127.4, 127.2, 127, 74.4, 52.8, 34.6, 33.4, 26.1, 25.1; HRMS (D-ESI; *m/z*): 275.14 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).

**4.2.1.3.** *trans*-2-(Naphthalen-2-yl)-cyclohexanol 2d. Molecular formula:  $C_{16}H_{18}O$  226.14 g/mol; yellow solid, yield = 77%; Melting point: 93.8 °C;  $R_f$  = 0.53 (Dichloromethane); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.34–1.54 (m, 3H cycle), 1.58–1.73 (m, 1H cycle), 1.83–187 (m, 2H cycle), 1.92–1.99 (m, 2H cycle), 2.15–2.20 (m, 1H cycle), 2.59–2.68 (m, 1H-OH), 3.73–3.81 (m, 1Hcycle), 7.41–7.45 (dd, *J* = 8.5 & 1.6 Hz, 1Haromatics), 7.48–7.57 (m, 2H aromatics), 7.76–7.88 (m, 4H aromatics). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 140.8, 133.6, 132.6, 128.4, 127.7, 126.6, 126.1, 126, 125.5, 74.2, 53.3, 34.5, 33.4, 26.1, 25.1; HRMS (D-ESI; *m/z*): 249.12 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).

# 4.2.2. Synthesis of isomeric mixture *cis/trans*-2-phenyl-1-cyclo-hexanol 2a

The racemic alcohol mixture was obtained after reduction of 1 equiv of the corresponding ketone (1 g, 5.7 mmol diluted in 35 mL of THF), using 6 equiv of NaBH<sub>4</sub> (1.3 g, 34.4 mmol) in (THF/H<sub>2</sub>O, 4/1 v/v, 52 mL/13 mL). The reaction mixture was stirred under at 0 °C. The evolution of the reactions was monitored by TLC. After the total consumption of the ketone, the reaction mixture was neutralized by HCl (1 M), and the THF was evaporated. Then, the alcohol was extracted from water by ethyl acetate and the organic layers was dried with MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The resulting isomeric mixture of the alcohol was obtained pure as white solid in 75% yield.

**4.2.2.1.** *cis/trans*-2-Phenyl-1-cyclohexanol 2a. Molecular formula:  $C_{12}H_{16}O$  176.12 g/mol. Melting point: 53.3 °C.  $R_f$  = 0.5 (Cyclohexane/Ethyl acetate 80/20). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.33–1.87 (m, 11H, cycle + OH), 1.91–2.13 (m, 1H, cycle), 2.46–2.75 (m, 1H, HC-OH), 3.64–4.04 (m, 1H, HC-Ph), 7.02–7.61 (m<sub>a</sub>, 5H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 143.3, 128.8, 128.6, 128, 127.8, 126.9, 74.5, 53.2, 34.5, 33.4, 26.1, 25.1

# 4.2.3. Procedure for the synthesis of racemic 2-arylcyclohexyl acetates 3a-3d

The arylcyclohexyl acetates were synthesized by classical chemical acylation via the corresponding *racemic trans*-arylcyclohexanol alcohol (1 equiv), using 2 equiv of anhydride acetic, 2 equiv of  $Et_3N$ , and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (0.2 equiv) in 1 mL of diethyl ether. The final products were obtained pure after standard work-up in excellent yields. All structure was confirmed by the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra.

**4.2.3.1.** *cis/trans*-**2**-**Phenyl-cyclohexyl acetate 3a.** Molecular formula:  $C_{14}H_{18}O_2$  218.29 g/mol; crude oil, yield = 77%;  $R_f$  = 0.79 (Cyclohexane/Ethyl acetate 80/20). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.2–1.9 (m<sub>a</sub>, 10H cycle + 3H—OC—CH<sub>3</sub>), 2.1–2.2 (m, 1H,

cycle), 2.6–2.75 (m, 1H, HC–OAc), 4.9–5.1 (m, 1H, HC–Ph), 7.1–7.3 (m, 5H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 170.4, 143.1, 128.2, 127.5, 126.4, 119.9, 75.9, 49.7, 33.8, 32.3, 25.8, 24.8, 21.

**4.2.3.2.** *trans*-2-Phenyl-cyclohexyl acetate 3a. Molecular formula:  $C_{14}H_{18}O_2$  218.29 g/mol; crude oil, yield = 77%;  $R_f$  = 0.79 (Cyclohexane/Ethyl acetate 80/20). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl3):  $\delta$  (ppm) = 1.3–1.66 (ma, 4H cycle), 1.99 (s, 3H, O—C—CH<sub>3</sub>), 1.82–1.98 (ma, 1H, cycle), 2.11–2.23 (ma, 1H cycle), 2.63–2.93 (m, 1H cycle), 4.95–5.03 (ma, 1H cycle), 7.19–7.31 (ma, 5H aromatic); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl3)  $\delta$  (ppm) = 170.4, 143.2, 128.3, 127.5, 126.4, 75.9, 49.8, 33.8, 32.4, 25.9, 24.8, 21.

**4.2.3.3.** *trans*-2-(2-Methoxy-phenyl)-cyclohexyl acetate **3b.** Molecular formula:  $C_{15}H_{20}O_3$  248,32 g/mol; white crystals, yield = 78%; Melting point: 71.2 °C;  $R_f$  = 0.71, cyclohexane/Ethyl acetate: (80/20); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.28–1.55 (m<sub>a</sub>, 5H cycle), 1.77 (s, 3H, O—C—CH<sub>3</sub>), 1.83–1.93 (m<sub>a</sub>, 2H cycle), 2.10–2.26 (m<sub>a</sub>, 1H cycle), 3.15–3.22 (m<sub>a</sub>, 1H cycle) 3.82 (s, 3H, O—CH<sub>3</sub>), 5.12–5.20 (m<sub>a</sub>, 1H cycle), 6.73–6.82 (q, *J* = 8.7 Hz, 2H aromatics), 7.03–7.09 (m<sub>a</sub>, 2H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 170.4, 157.3, 131.3, 127.1, 127, 120.6, 110.6, 74.8, 55.4, 32.8, 32.4, 25.9, 24.8, 20.9.

**4.2.3.4.** *trans*-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-cyclohexyl acetate **3c**. Molecular Formula:  $C_{20}H_{22}O_2$  294.16 g/mol; yellow crystal, yield = 90%; Melting point: 98.5 °C;  $R_f$  = 0.92, (Petroleum ether/ Ethyl acetate: 80/20). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.36– 1.48 (m, 2H cycle), 1.49–1.62 (m, 2H cycle), 1.84 (s, CO–CH<sub>3</sub>, 3H), 1.86 (m, 3H, cycle), 2.17 (m, 1H, cycle), 2.68–2.76 (m, 1H cycle), 4.98–5.05 (m, 1H, cycle), 7.26–7.61 (m, 9H aromatics); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.5, 142.4, 141, 139.2, 128.8, 128, 127.1, 127, 75.9, 49.4, 34, 32.4, 25.9, 24.8, 21.1. HRMS (D-ESI; *m/z*): 317.151 ([M+Na]\*, 100%).

**4.2.3.5.** *trans*-2-(Naphthalen-2-yl)-cyclohexyl acetate 3d. Molecular formula:  $C_{18}H_{20}O_2$  268.15 g/mol; yellow solid, yield = 92%;  $R_f$  = 0.86 (Dichloromethane). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.99–1.08 (m<sub>a</sub>, 2H cycle), 1.11–1.27 (m<sub>a</sub>, 2H cycle); 1.29 (s, 3H, O–CH<sub>3</sub>), 1.36–1.48 (m<sub>a</sub>, 2H cycle), 1.54–1.60 (m<sub>a</sub>, 1H cycle), 1.77–1.82 (m<sub>a</sub>, 1H cycle), 2.7–2.79 (m, 1H cycle), 4.71–4.79 (m, 1H cycle), 6.96–7.06 (m<sub>a</sub>, 3H, aromatic), 7.35–7.40 (m<sub>a</sub>, 4H aromatic); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 170, 140.5, 132.3, 132.2, 127.7, 127.5, 127.4, 125.8, 125.7, 125.1, 75.5, 49.6, 33.8, 32.2, 25.7, 24.6, 20.7; HRMS (D-ESI; *m/z*): 291.13 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%).

### 4.3. Enzymatic kinetic resolutions procedures

### 4.3.1. Enzymatic acylation

All enzymatic acylation reactions were performed using 1 equiv of racemic alcohol and 3 equiv of the appropriate acetyl donor dissolved in 2 mL of solvent. Next, 200 mg of CAL-B were added and the mixture was shaken at room temperature for 24 h. After removal of the enzyme by filtration and evaporation of the solvent, the reaction mixture was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc: 8/2) to separate the obtained arylcyclohexylacetate and the furnished *trans*-aryl cyclohexyl acetate. The two optically active compounds were analyzed by chiral HPLC or CG.

#### 4.3.2. Enzymatic hydrolysis using carbonate salts

In a typical procedure, 1 mmol of racemic aryl cyclohexyacetate was dissolved in 2 mL of solvent before the addition of 1 mmol of sodium carbonate and 200 mg of CAL-B. The mixture was shaken at 40 °C for 72 h. After removal of the enzyme by filtration and evaporation of the solvent, the reaction mixture was purified by flash

chromatography (Petroleum ether/EtOAc: 8/2) to separate the residual arylcyclohexylacetate and the furnished trans-arylcyclohexanol alcohol. The two optically active compounds were analyzed by chiral HPLC or CG.

### 4.4. Chiral GC analysis and/or chiral HPLC analysis

The absolute configurations of all chiral compounds (isolated after chromatography) were determined by polarimetry by comparison with literature's data. The conditions for the analysis of alcohols and acetates are reported below:

## 4.4.1. (1S,2R)-(+)-2-Phenyl-1-cyclohexanol 2a

(Chiralsil-Dex CB,):  $t_1 = 9.04 \text{ min},$  $t_2 = 9.61 \text{ min}$ GC  $(T_{\text{column}} = 155 \text{ °C}, \text{ flow } 1.2 \text{ mL/min}). \ [\alpha]_{D}^{20} = +45 \ (c \ 0.1, \text{ CH}_2\text{Cl}_2) \text{ for}$ 89% ee, [Lit.  $[\alpha]_{D} = -58.6$  (c 1.19, MeOH) for 99% ee (1R,2S)].<sup>1</sup>

## 4.4.2. (1R,2S)-(-)-2-Phenylcyclohexyl acetate 3a

(Chiralsil-Dex CB,): GC  $t_1 = 8.56 \text{ min},$  $t_2 = 8.77 \text{ min}$  $(T_{column}=155 \text{ °C}, \text{ flow } 1.2 \text{ mL/min}). \ [\alpha]_D^{20} = -7 \ (c \ 0.1, \ CH_2Cl_2) \text{ for}$ 99% ee, [Lit.  $[\alpha]_{D} = -6.5$  (c 0.32, EtOH) for 99% ee (1R,2S)].<sup>1</sup>

#### 4.4.3. (1S,2R)-(+)-2-(2-Methoxyphenyl)-cyclohexanol 2b

Chiral HPLC: Chiralpak AD column,  $t_R = 10.33$  min;  $t_s$  = 14.37 min. Eluant (v,v): hexane/EtOH: 97/3; flow 1 mL/min.  $[\alpha]_D^{20}$  = +20 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>) for 42% ee, [Lit.  $[\alpha]_D$  = -5 (*c* 1.52, MeOH) for 15% ee (1R,2S)].<sup>26</sup>

#### 4.4.4. (1R,2S)-(-)-2-(2-Methoxyphenyl)-cyclohexyl acetate 3b

GC (Chiralsil-Dex CB,): t<sub>1</sub> = 7.86 min,  $t_2 = 7.99 \text{ min}$  $(T_{\text{column}} = 170 \text{ °C, flow } 1.2 \text{ mL/min}). \ [\alpha]_D^{20} = -2.4 \ (c \ 0.1, \text{ CHCl}_3) \text{ for}$ 99% ee

## 4.4.5. (1R,2S)-(-)-2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-cyclohexanol 2c

Chiral HPLC: Chiralpak IA column, t<sub>RD</sub>10.11 min; t<sub>SD</sub>18.43 min. Eluant (v,v): iso-hexane/EtOH: 90/10; flow 1 mL/min.  $[\alpha]_{D}^{20} = -41$ (c 0.03, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for 99% ee.

### 4.4.6. (1*R*,2*S*)-(-)-2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-cyclohexyl acetate 3c

Chiral HPLC: Chiralpak IA column,  $t_R = 4.44$  min;  $t_S = 5.06$  min. Eluant (v,v): iso-hexane/EtOH: 90/10; flow 1 mL/min.  $[\alpha]_{D}^{20} = -5$ (c 0.05, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for 99% ee.

#### 4.4.7. (1R,2S)-(-)-2-(Naphthalen-2-yl)-cyclohexanol 2d

Chiral HPLC: Chiralpak IA column,  $t_R = 10.11$  min;  $t_S = 18.43$  min. Eluant (v,v): iso-hexane/EtOH: 90/10; flow 1 mL/min.  $[\alpha]_D^{20} = -24$ (*c* 0.05,  $CH_2Cl_2$ ) for 99% ee, [Lit.  $[\alpha]_D = -7.8$  (*c* 1.05,  $CHCl_3$ ); 33% ee (1R, 2S)].<sup>27</sup>

### 4.4.8. (1R,2S)-(+)-2-(Naphthalen-2-yl)-cyclohexyl acetate 3d

Chiral HPLC: Chiralpak IA column,  $t_R = 7.59$  min;  $t_S = 7.99$  min. Eluant (v,v): iso-hexane/-PrOH: 98/2; flow 0.7 mL/min.  $[\alpha]_D^{20}$  = +32.8 (*c* 0.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for 99% ee, [Lit.  $[\alpha]_D$  = +32.6 (*c* 1.05, CHCl<sub>3</sub>); 99% ee (1*R*,2*S*)].<sup>10</sup>

## Acknowledgments

The Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (FNR 2000 and PNR), the Catholic University of Louvain. and FNRS are gratefully acknowledged for financial support of this work. Wallonie-Bruxelles International (WBI) is acknowledged for a grant to Fatma-Zahra BELKACEMI.

### A. Supplementary data

Supplementary data (all experimental details, characterization spectra (NMR and chiral chromatography) of all synthesized product) associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.09.010.

#### References

- 1. (a)Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions; Blaser, H. U., Federsel, H. J., Eds., 2nd ed; John Wiley & Sons: Weinheim, 2011; (b) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. J. Mol. Catal. B Enzym. 2006, 40, 111–120; (c) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Tetrahedron: Asymmetry 2004, 15, 3331-3351.
- 2. Whitesell, J. K.; Chen, H. H.; Lawrence, R. M. J. Org. Chem. 1985, 50, 4663-4664. (a) Vasconcellos, M. L.; Desmaële, D.; Costa, P. R.; D'Angelo, J. Tetrahedron Lett.
- **1992**, 33, 4921–4922; (b) Whitesell, J. K. Chem. Rev. **1992**, 92, 953–964; (c) Potin, D. J. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 3483-3486; (d) Ojima, I.; Habus, I.; Zhao, M.; Zucco, M.; Park, Y. H.; Sun, C. M.; Brigaud, T. Tetrahedron 1992, 48, 6985-7012
- 4. Brown, H. C.; Vara Prasad, J. V. N.; Gupta, A. K.; Bakshi, R. J. Org. Chem. 1987, 52, 310-311.
- 5. Brandes, B. D.; Jacobsen, E. N. J. Org. Chem. 1994, 59, 4378-4380.
- (a) Zhao, S. H. U.S. Patent No. 5,420,366, 1995. Washington, DC: U.S. Patent and 6. Trademark Office.; (b) King, S. Bruce; Barry Sharpless, K. Tetrahedron Lett. 1994, 35. 5611-5612.
- 7. Asensio, G.; Cuenca, A.; Rodriguez, N. Tetrahedron: Asymmetry 2003, 14, 3851-3855.
- Matsugi, M.; Hagimoto, Y.; Nojima, M.; Kita, Y. Synth. Commun. 2013, 43, 1425-8 1431.
- Wang, Li.; Akhani, Ravish K.; Wiskur, Sheryl L. Org. Lett. 2015, 17, 2408-2411. 9
- 10. Takahashi, Michiyasu.; Ogasawara, Kunio. Tetrahedron: Asymmetry 1995, 6, 1617-1620.
- 11. Carpenter, Bryon E. Tetrahedron: Asymmetry 1996, 7, 3107–3108.
- Celia, E. C.; Cernia, E.; D'Acquarica, I.; Palocci, C.; Soro, S. J. Mol. Catal. B Enzym. 12. 1999. 6. 495-503.
- 13. She, Y. H.; Wu, C. F.; Shia, K. S.; Wu, J. D.; Peddinti, R. K.; Liu, H. J. Synthesis 2005, 5.749-752.
- 14. Basavaiah, D.; Rao, P. Tetrahedron: Asymmetry 1994, 5, 223-234.
- 15. (a) Busto, E.; Gotor-Fernandez, V.; Gotor, V. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 4504-4523; (b) Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 6th ed.; Springer: Berlin Heidelberg, 2011.
- 16. (a) Bouzemi, N.; Grib, I.; Houiene, Z.; Aribi-Zouioueche, L. Catalysts 2014, 4, 215-225; (b) Zaïdi, A.; Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouioueche, L. Catal. Lett. 2015. 145. 1054-1061.
- 17. Merabet-Khellassi, M.; Aribi-Zouioueche, L. Tetrahedron: Asymmetry 2009, 20, 1371-1377
- 18. Merabet-Khelassi, M.; Houiene, Z.; Aribi-Zouioueche, L. Tetrahedron: Asymmetry 2012, 23, 828-833.
- 19. Houiene, Z.; Merabet-Khelassi, M.; Bouzemi, N.; Riant, O. Tetrahedron: Asymmetry 2013, 24, 290-296.
- 20. Alalla, A.; Merabet-Khelassi, M.; Riant, O. Tetrahedron: Asymmetry 2016, 27, 1253-1259.
- 21. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. J. Org. Chem. 1991, 56, 2656-2665.
- 22 (a) Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Sih, C. J. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 7294-7299; (b) Kagan, H. B.; Fiaud, J.-C. Kinetic Resolution. In Topics in Stereochemistry; Eliel, E. L., Wilen, S. H., Eds.; ; J. Wiley & Sons: New York, 1988; Vol. 18, pp 249–330. 23. Aribi-Zouioueche, L.; Fiaud, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4085–4088.
- 24. (a) Levy, L. M.; Dehli, J. R. Tetrahedron: Asymmetry 2003, 14, 2053-2058; (b) Levy, L. M.; Lavandera, I.; Gotor, V. Org. Biomol. Chem. 2004, 2, 2572-2577
- 25. Tanikaga, R.; Matsumoto, Y.; Sakaguchi, M.; Koyama, Y.; Ono, K. Tetrahedron Lett. 2003, 44, 6781-6783.
- 26. Vrancken, E.; Alexakis, A.; Mangeney, P. Synlett 2005, 1354–1366.
- 27. Mizuno, M.; Kanai, M.; Iida, A.; Tomioka, K. Tetrahedron 1997, 53, 10699-10708.