



HAL
open science

Développement d'un procédé d'acylation en microréacteur à lit fixe adapté à la biocatalyse

Mélanie Faggin

► **To cite this version:**

Mélanie Faggin. Développement d'un procédé d'acylation en microréacteur à lit fixe adapté à la biocatalyse. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01770692

HAL Id: hal-01770692

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770692v1>

Submitted on 29 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement
le 27 octobre 2014 ,

sur un sujet dédié à :

**DEVELOPPEMENT D'UN PROCEDE D'ACYLATION EN
MICROREACTEUR A LIT FIXE ADAPTE A LA BIOCATALYSE**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Mélanie FAGGIN

née le 1 août 1987 à Sarreguemines

Membres du Jury

Président : Mr Maincent, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Nancy

Directeur : Mme Chevalot, Professeur des Universités, ENSAIA, Nancy

Juges : Mr Framboisier, Ingénieur de recherche, CNRS, Nancy

Mr Duval, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Brigitte LEININGER-MULLER

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Chantal FINANCE

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital :

Béatrice DEMORE

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Marianne BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POUCHON
Anne ROVEL

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Isabelle LARTEAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie

Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Hygiène sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

- Remerciements -

A mon président de jury,

M. Philippe Maincent, *Professeur des Universités en pharmacie galénique (Faculté de Pharmacie, Nancy)* de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

A ma directrice de thèse,

Mme Isabelle Chevalot, *Professeur des Universités (INPL-ENSAIA, Nancy) et responsable de l'équipe bioprocédés-biomolécules du LRGP*, d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir accompagné durant toutes les étapes de ce travail : de la réalisation des expériences en laboratoire à la rédaction de ce manuscrit. Merci également pour vos précieux conseils et votre regard expérimenté sur mon travail.

A mes juges,

M. Xavier Framboisier, *Ingénieur de recherche au sein du CNRS*, pour m'avoir soutenu durant la réalisation des expériences en microréacteur et prodigué des conseils avisés.

M. Raphaël Duval, *Professeur des Universités en microbiologie clinique (Faculté de Pharmacie, Nancy)* d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse

A mes proches,

Mes parents, pour avoir été à mes côtés durant toutes ces années, pour votre soutien sans faille et vos encouragements. Sans vous je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui, ni où je suis et je vous en remercierais jamais assez.

Ma sœur, Delphine, ma confidente. Merci d'être toujours là pour moi, que ce soit dans les bons moments comme dans les autres. Merci d'être toi-même et pour ces années de complicité.

Ma grand-mère, Nicole, pour m'avoir toujours soutenue et m'avoir transmis cette envie d'apprendre. Merci également d'avoir pris le temps de venir jusqu'à Nancy les années où j'y faisais mes études.

Mon grand-père, Jules, qui nous a quitté et à qui je dédie cette thèse.

Dorian, pour m'avoir poussé à toujours donner le meilleur de moi-même, pour m'avoir fait grandir. Pour nos longues discussions du vendredi soir, nos week-end bien trop courts et tous les merveilleux moments partagés et tous ceux qui restent à venir...

A mon parrain, Nathalie, Candice, la famille de Dorian,... pour avoir été à mes côtés durant toutes ces années de fac...

A mes amis de la faculté,

Tout d'abord, à mes rencontres de première année :

Merci à **Yann** pour sa première invitation si inattendue mais qui a été le début de pleins de bons souvenirs, merci à **Christelle** pour ses cheveux rouges qui ont permis notre rencontre. Enfin merci à vous deux et à **Popo** pour nos supers soirées.

A mes autres rencontres de la Faculté de Pharmacie :

Marie, la petite Marion, la grande Marion, Alain, Will, Julien, Geoffrey pour tous ces moments partagés à la faculté et en dehors.

Fanny, Camille et Thibault qui par leur présence ont adouci les mois passés à l'ENSIC.

Enfin, à toutes les personnes qui sont passées dans ma vie et mon permis d'avancer et de grandir je vous dis merci.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	15
I. Introduction générale	16
II. Généralités sur l'acylation enzymatique de peptides.....	19
1. Intérêt des peptides thérapeutiques.....	20
a. Peptides naturels.....	20
b. Peptides thérapeutiques	21
2. La réaction d'acylation	30
III. Utilisation et Intérêt de microréacteurs dans le domaine de la biocatalyse.....	36
1. Contexte général	37
c. Les avantages de la miniaturisation	41
d. Les limites de la miniaturisation	47
2. Applications des microréacteurs aux réactions catalysées par des biocatalyseurs	48
a. Les microréacteurs adaptés à des fins analytiques.....	48
b. Les microréacteurs adaptés à des fins catalytiques	53
IV. Matériel et méthode:	60
1. Biocatalyseur	61
2. Réactifs.....	61
3. Méthodes d'analyses	61
a. Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince	61

b.	Séparation et analyse quantitative par chromatographie liquide haute performance	62
c.	Séparation et analyse semi-quantitative par spectrométrie de masse.....	64
4.	Réaction mise en jeu	67
5.	Mise en œuvre de la réaction d'acylation en réacteur agité	72
a.	Expérience en réacteur agité par barreau magnétique.....	72
b.	Expérience en réacteur agité Wheaton	72
6.	Mise en œuvre de la réaction d'acylation en réacteur type piston	73
7.	Modélisation de la cinétique réactionnelle.....	75
V.	Résultats	76
1.	Réaction d'acylation en réacteur agité	77
2.	Réaction d'acylation en réacteur de type piston.....	81
a.	Réacteur en boucle fermé.....	81
b.	Réacteur continu : influence du débit.....	86
3.	Modélisation de la cinétique réactionnelle.....	90
VI.	Conclusion et perspectives	96

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : COMPARAISON DE L'ASSOCIATION CELLULAIRE DE DIFFERENTS PEPTIDES ACYLES. LES RESULTATS SONT LA MOYENNE DE DEUX EXPERIENCES INDEPENDANTES (PHAM ET AL. 2004).....	25
FIGURE 2 : ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA PHE-GLY ET DE CES TROIS DERIVES ACYLES DANS LA PEAU : PHE-GLY (●), C4-PHE-GLY (○), C6-PHE-GLY (▲), C8-PHE-GLY (□). LES RESULTATS REPRESENTENT LA MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES (YAMAMOTO ET AL. 2003).....	26
FIGURE 3 : RESISTANCE, DANS LE TEMPS, DU RC-160 ET DU PALMITOYL-RC-160 A LA DEGRADATION DU SERUM ET AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES.....	28
FIGURE 4 : LIAISON DE LA FL12 (COURBE INFERIEURE) ET DU COMPOSE ACYLE FL12-C12 (COURBE SUPERIEURE) AU LIPIDE A EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LIPIDE A (MAJERLE ET AL. 2003).	29
FIGURE 5 : MECANISME DE SCHOTTEN-BAUMANN	31
FIGURE 6 : SCHEMA GENERAL DE LA REACTION D'ACYLATION CATALYSEE PAR UNE ENZYME	31
FIGURE 7 : A - STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> . EN BLEU LES HELICES A ET EN ROUGE LES FEUILLETS B, B - ZOOM SUR LES SITES ACTIFS DE LA LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i>	34
FIGURE 8 : SCHEMA REACTIONNEL D'UNE REACTION ENZYMATIQUE SUIVANT UN MECANISME BI-BI PING-PONG	34
FIGURE 9 : NOMBRE DE PUBLICATIONS DEPUIS L'ANNEE 2000 DANS LES DOMAINES DE LA MICROFLUIDIQUE. STATISTIQUES OBTENUES AVEC ISI WEB OF KNOWLEDGE (VASCONCELOS, 2010)	37
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MICROREACTEUR MICROFLUIDIQUE (FERNANDES 2010)	38
FIGURE 11 : EXEMPLES DE JONCTIONS DANS DES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES: (A) JONCTION EN Y; (B) JONCTION T, (C) JONCTION Ψ. LES FLECHES INDIQUENT LA DIRECTION DE L'ECOULEMENT.....	38
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MICROREACTEUR A LIT FIXE	39
FIGURE 13 : COMPARAISON DU TAUX DE CONVERSION ET DU RENDEMENT EN PHENYLACETONITRILE ENTRE UN MICROREACTEUR ET DEUX REACTEURS AGITES. POINTS PLEINS : CONVERSION – POINTS VIDES : RENDEMENT (BOROVINSKAYA ET AL. 2009).....	43
FIGURE 14 : SCALE-UP ET NUMBERING-UP (HESSEL ET AL. 2006).....	45
FIGURE 15 : CLASSES DE REACTION CHIMIQUES (ROBERGE ET AL. 2009)	46
FIGURE 16: SCHEMA DES MODELES EN LIGNE POUR LA CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE (YE ET AL. 2004)	49
FIGURE 17 : DIAGRAMME DU MONTAGE DE LA DIGESTION DANS UN MICROREACTEUR DE TRYPSINE IMMOBILISEE (BONNEIL AND WALDRON 2000)	50
FIGURE 18 :REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE INITIALE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN BUTANOL EN MICROREACTEUR (A) ET EN REACTEUR (B).(RESULTATS EXPERIMENTAUX POUR DES CONCENTRATIONS EN ACIDE DE 0,18 M ,0,37 M ET 0,73 M) (SCHWARZ ET AL. 2009).....	53
FIGURE 19 : SCHEMA DU MICROREACTEUR ET DU MONTAGE EXPERIMENTAL (URBAN ET AL. 2006).....	54
FIGURE 20 : COMPARAISON DE DIFFERENTES LIPASES IMMOBILISEES PAR UNE ANALYSE EN FLUX CONTINU (SUBSTRAT: 50 VOL.% ISOPROPANOL, 10 VOL.% VINYL ACETATE DANS DE L'ACETONITRILE). CHAQUE DONNEE EST UNE MOYENNE D'AU MOINS DEUX	

DONNEES EXPERIMENTALES. ENZYMES TESTEES: —+— PS-C I; -o- PS-C II; —x— PS-D; —*— CA-AR (URBAN ET AL. 2006).....	55
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN DES MICROREACTEURS UTILISES POUR LA SYNTHESE DU 2-AMINO-1.3.4-BUTANETRIOL.....	56
FIGURE 22 : ESTERIFICATION ENZYMATIQUE DE DIFFERENTS ACIDES ET ALCOOLS. CONDITIONS DE REACTION : 0,2 M DANS DE L'HEXANE, 1/1 ACIDE/ALCOOL , DEBIT 1 µL/MIN (WOODCOCK ET AL. 2008).....	57
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MICROREACTEUR A LIT FIXE EN REGIME CONTINU (WOODCOCK ET AL. 2008).....	57
FIGURE 24: POURCENTAGE DE CONVERSION DU BUTYL HEXANOATE DANS UN REACTEUR BATCH (LOSANGE BLEU) ET DANS UN MICROREACTEUR EN FLUX CONTINU (CARRE JAUNE).....	58
FIGURE 25 : TRANGLYCOSYLATION DU B-D-GALACTOPYRANOSIDE : DANS UN MICROREACTEUR (CARRE) ET DANS UN REACTEUR BATCH (TRIANGLE) (KANNO ET AL. 2002).....	59
FIGURE 26 : SCHEMA D'UN DETECTEUR CAD.....	63
FIGURE 27 : GRADIENT UTILISE POUR L'HPLC. PHASE A: METHANOL/EAU/TFA 80/20/0,1 v/v/v, PHASE B : METHANOL//TFA 100/0,1 v/v.	64
FIGURE 28 : COURBES DE CALIBRATION POUR LE DOSAGE HPLC AVEC DETECTION UV A 214 NM DE L'ACIDE OLEIQUE ET DE L'OLEATE D'ETHYLE.....	64
FIGURE 29 : REPRESENTATION D'UN SPECTROMETRE DE MASSE EN MODE FRAGMENTATION.....	65
FIGURE 30 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE SOURCE D'ELECTRONEBULISATION (BOUCHOUX AND SABLIER 2005).	65
FIGURE 31 : SCHEMA GENERAL D'UN SPECTROMETRE DE MASSE	66
FIGURE 32 : INFLUENCE DU RAPPORT MOLAIRE 6-AMINO-1-HEXANOL/OLEATE D'ETHYLE SUR LE TAUX DE CONVERSION DU 6-AMINO-1-HEXANOL A L'EQUILIBRE LORS DE LA REACTION DE TRANS-ACYLATION CATALYSEE PAR NOVOZYM 435® DANS LE M2B2 A 55°C EN REACTEUR WHEATON® (HUSSON 2008).	69
FIGURE 33 : SUIVI CINETIQUE RELATIF A LA REACTION ENZYMATIQUE D'HYDROLYSE DU N,O-DIOLEYL AMINOHEXANOL PAR NOVOZYM 435® A 55°C DANS UN MELANGE M2B2/EAU (86/14, v/v) (HUSSON 2008).	71
FIGURE 34 : SCHEMA DU REACTEUR AGITE UTILISE POUR LA MISE EN ŒUVRE DE LA REACTION D'ACYLATION.	72
FIGURE 35 : SCHEMA DU REACTEUR WHEATON UTILISE POUR LA MISE EN ŒUVRE DE LA REACTION D'ACYLATION	73
FIGURE 36 : REPRESENTATION DE LA POMPE PERISTALTIQUE WATSON MARLOW 120U	74
FIGURE 37 : SCHEMA DU MONTAGE EXPERIMENTAL AVEC POMPE PERISTALTIQUE.....	74
FIGURE 38 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UNE POMPE A ENGRENAGE.....	75
FIGURE 39 : EXEMPLE DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE REALISE A PARTIR D'UNE EXPERIENCE EN REACTEUR AGITE PAR UN BARREAU MAGNETIQUE. LE TEMOIN ETANT UN REACTEUR LANCE DANS LES MEMES CONDITIONS QUE LE REACTEUR EXPERIMENTAL MAIS NE CONTENANT PAS D'ENZYME.....	77
FIGURE 40 : SPECTRE DE MASSE OBSERVE SUR UN PRELEVEMENT EFFECTUE EN REACTEUR AGITE PAR UN BARREAU MAGNETIQUE.	78
FIGURE 41 : CINETIQUE DE CONVERSION DE L'OLEATE D'ETHYLE ET DE SYNTHESE D'ACIDE OLEIQUE PRESENTE DANS UN REACTEUR AGITE PAR BARREAU MAGNETIQUE.....	80
FIGURE 42: EXEMPLE DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE REALISE A PARTIR D'UNE EXPERIENCE EN MICROREACTEUR A POMPE PERISTALTIQUE. LES PRELEVEMENTS DU MILIEU REACTIONNEL A 30 MIN, 1H, 2H, 3H ET 4H30 ONT ETE ANALYSES.....	82

FIGURE 43 : CHROMATOGRAMME AVEC DETECTION MS DES PRODUITS OBTENUS LORS DE LA REACTION D'ACYLATION DU 6-AMINO-1-HEXANOL PAR L'OLEATE D'ETHYLE DANS DU M2B2 EN MICROREACTEUR A POMPE PERISTALTIQUE APRES 5H.....	83
FIGURE 44 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA CONCENTRATION EN OLEATE D'ETHYLE ET EN ACIDE OLEIQUE PRESENTE DANS LE MILIEU REACTIONNEL EN FONCTION DU TEMPS. LE DEBIT DE LA POMPE PERISTALTIQUE A ETE REGLE A 23 μ L/MIN.	84
FIGURE 45 : EXEMPLE DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE REALISE A PARTIR D'UNE SERIE D'EXPERIENCES EN MICROREACTEUR A POMPE A ENGRENAGES A DIFFERENTS DEBITS UTILISES.	86
FIGURE 46 : CHROMATOGRAMME AVEC DETECTION MS DES PRODUITS OBTENUS LORS DE LA REACTION D'ACYLATION DU 6-AMINO-1-HEXANOL PAR L'OLEATE D'ETHYLE DANS DU M2B2 EN MICROREACTEUR A POMPE PERISTALTIQUE APRES 5H.....	87
FIGURE 47 : PROPORTION DE CHAQUE PRODUITS ACYLES PAR-RAPPORT AU TOTAL DES PRODUITS ACYLES EN FONCTION DE DIFFERENTS DEBITS APRES 55MIN DE REACTION DANS LE MICROREACTEUR EN CIRCUIT OUVERT.....	87
FIGURE 48 : (A) EVOLUTION DES AIRES SOUS LA COURBE EN DETECTION CAD DES TROIS PRODUITS : MONO-ACYLE1, MONO-ACYLE2 ET DI-ACYLE - EVOLUTION DES AIRES SOUS LA COURBE EN DETECTION CAD (B) ET EN DETECTION UV (C) DE L'OLEATE D'ETHYLE ET DE L'ACIDE OLEIQUE A 55MIN, EN FONCTION DU DEBIT.....	89
FIGURE 49 : MECANISME CINETIQUE BI-BI PING-PONG ADAPTE A L'ACYLATION DU 6-AMINO-1-HEXANOLE AVEC L'OLEATE D'ETHYLE DANS DU M2B2.....	90
FIGURE 50 : A) COMPARAISON DE L'EVOLUTION DE L'OLEATE D'ETHYLE SELON LE MODELE ET SELON LES DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES PAR HPLC - DETECTION UV. B) COMPARAISON DE L'EVOLUTION DE L'OLEATE D'ETHYLE SELON LE MODELE ET SELON LES DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES PAR DETECTION CAD C) COMPARAISON DE L'EVOLUTION DES DEUX PRODUITS MONO-ACYLES SELON LE MODELE ET SELON LES DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES PAR DETECTION CAD.....	94

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : DUREE DE VIE (EN MIN) DE LA CALCITONINE HUMAINE ET DE CES DEUX DERIVES, DANS LE PETIT ET DANS LE GROS INTESTIN. LES RESULTATS SONT LA MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES. *** P<0.001 COMPARE A LA HCT (FUJITA ET AL. 1996).....	27
TABLEAU II : DONNEES STATISTIQUES SUR LE NOMBRE DE DEMANDES DE BREVETS CONCERNANT DES MICROTECHNOLOGIES ET NANOTECHNOLOGIES. DONNEES FONDEES SUR LA DATE DE PUBLICATION.	39
TABLEAU III : RESULTATS COMPARATIFS OBTENUS LORS DE LA DIGESTION D'UN MELANGE DE 3 PROTEINES DANS UN REACTEUR CLASSIQUE ET DANS UN MICROREACTEUR. LES RESULTATS OBTENUS SONT UNE MOYENNE DE 5 EXPERIENCES REALISEES DANS LES MEMES CONDITIONS.	51
TABLEAU IV : LISTE DES 4 ENZYMES UTILISEES POUR CETTE ETUDE (URBAN ET AL. 2006).	54
TABLEAU V: SELECTIVITE ET EFFICACITE DE LA O ET/OU N,O-DIACYLATION DU 6-AMINO-1-HEXANOL PAR L'ACIDE OLEIQUE DANS DIFFERENTS MILIEUX. LA REACTION A ETE REALISEE DANS UN REACTEUR SYNCORE® A 55°C ET A ETE CATALYSEE PAR NOVOZYM 435®. LA DUREE DE LA REACTION ET LE TAUX DE CONVERSION DES SUBSTRATS CORRESPONDENT A L'ETAT D'EQUILIBRE (HUSSON 2008).....	70
TABLEAU VI : VALEUR DES AIRES SOUS LA COURBE DEFINIES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE SUR DES PRELEVEMENTS DE LA REACTION D'ACYLATION DU 6-AMINO-1HEXANOL ET DE L'ETHYLE OLEATE EN PRESENCE DE M2B2.	79
TABLEAU VII : TAUX DE CONVERSION DE LA REACTION D'ACYLATION DU 6-AMINO-1HEXANOL ET DE L'ETHYLE OLEATE EN PRESENCE DE M2B2. CES TAUX DE CONVERSION SONT DES TAUX GLOBAUX QUI PRENNENT EN COMPTE LA REACTION INVERSE D'HYDROLYSE.	81
TABLEAU VIII: VALEUR DES AIRES SOUS LA COURBE DEFINIES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE SUR DES PRELEVEMENTS DE LA REACTION D'ACYLATION DU 6-AMINO-1HEXANOL ET DE L'ETHYLE OLEATE EN PRESENCE DE M2B2 EN MICROREACTEUR A POMPE PERISTALTIQUE.	83
TABLEAU IX : TAUX DE CONVERSION DE L'OLEATE D'ETHYLE DANS LE MICROREACTEUR. CES TAUX DE CONVERSION SONT DES TAUX GLOBAUX QUI PRENNENT EN COMPTE LA REACTION INVERSE D'HYDROLYSE.	85

I. Introduction générale

Dans un contexte où la pression économique se fait de plus en plus forte, le marché pharmaceutique est en pleine évolution. Premièrement, les pouvoirs publics français veulent baisser le coût des soins de santé suite au déficit record de la sécurité sociale. Pour cela, ils réduisent le prix des médicaments, le nombre de médicaments remboursés et favorisent la substitution générique. Deuxièmement, les autorités de contrôle sont plus exigeantes en termes d'efficacité, de qualité et de sécurité du médicament lors de l'évaluation d'une demande de mise sur le marché, ce qui a conduit à une augmentation des coûts de recherche et développement. En effet, le coût de la recherche d'un nouveau médicament a été estimé à 1 milliard d'euro minimum, par un communiqué datant du 5 janvier 2011 du « *Tufts Center for the study of Drug Development* ».

Dans ce contexte, de plus en plus de laboratoires pharmaceutiques tentent de développer de nouvelles molécules médicamenteuses en utilisant des peptides comme agents thérapeutiques. En effet, de nouvelles méthodes de synthèse de dérivés de peptides, permettant d'améliorer la productivité tout en réduisant le métabolisme des peptides et en augmentant leur biodisponibilité, ont été développées au cours de ces dernières années, dont la N-acétylation ou la C-amidation (Sato et al. 2006). Un nombre croissant de médicaments à base de peptides a ainsi pu être commercialisé.

Etant donné la faible disponibilité de ces peptides biologiquement actifs, il s'avère nécessaire de pouvoir réaliser à l'échelle du micro-procédé, les études cinétiques nécessaires à l'optimisation d'une réaction ou encore son intensification et ainsi permettre la synthèse de molécules d'intérêt à plus grande échelle. Les objectifs principaux de cette étude sont ainsi de développer un procédé en microréacteur à lit fixe, adapté à la biocatalyse pour la dérivation de peptides en milieu organique et de comparer les performances dans ce microsysteme par rapport à la mise en œuvre classique en réacteur agité.

Il s'agira donc, de développer un montage expérimental innovant avec un microréacteur à lit fixe (volume : 500 μ L) en présence d'enzymes immobilisées. La réaction mise en œuvre sera la réaction d'acylation d'une molécule modèle bi-fonctionnelle ; le 6-amino-1-hexanol par de l'oléate d'éthyle catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*. En particulier, non seulement les performances de la réaction d'acylation de la molécule modèle seront évaluées mais également la sélectivité de la

réaction vis-à-vis des groupes réactionnels hydroxyles et amine constitutifs du 6-amino-1-hexanol avec la formation potentielle d'un ou de deux composés mono-acylés(s) et d'un composé di-acylé.

II. Généralités sur l'acylation enzymatique de peptides

1. Intérêt des peptides thérapeutiques

Les peptides sont formés par des enchaînements d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (– CO – NH –). Ils peuvent être classés en deux grandes catégories :

- les oligopeptides : dipeptides et tripeptides ne donnant pas la réaction caractéristique du biuret (condensation de deux molécules d'urée avec élimination de NH_3 ($\text{H}_2\text{N-CO-NH-CO-NH}_2$))
- les polypeptides à partir des tétrapeptides, qui donnent tous la réaction du biuret.

Les peptides sont des constituants importants des cellules vivantes, tant d'un point de vue quantitatif, que d'un point de vue qualitatif. En effet, il existe de nombreux peptides ayant un rôle biologique capital et donc éventuellement un pouvoir thérapeutique. Actuellement, les peptides médicamenteux ont trois origines :

- les peptides bioactifs naturels, produits par l'homme, les animaux ou les plantes
- les peptides isolés à partir de bibliothèques génétiques ou recombinantes
- les peptides isolés à partir de bibliothèques chimiques

a. Peptides naturels

Parmi les principales sources de peptides naturels on peut citer l'Homme chez qui de nombreux peptides fonctionnels ont été identifiés. Ce sont le plus souvent des hormones telles que la vasopressine, hormone antidiurétique, l'ocytocine, hormone responsable de la contraction du muscle utérin ou encore l'insuline. L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas suite à une augmentation du taux de sucre dans le sang. Cette hormone clé de la régulation du taux de glycémie a fait l'objet de nombreux travaux au sein de la communauté scientifique et notamment dans les laboratoires de recherche des industries pharmaceutiques. Ceci permis, dès 1923, la mise sur le marché de la première insuline animale extraite de pancréas de bœuf et purifiée par recristallisation pour le traitement

du diabète (Gonard 1995). Par la suite, le développement des technologies basées sur l'ADN recombinant (synthèse d'une protéine par le biais d'un organisme vivant transformé par génie génétique) a permis la commercialisation de la première insuline humaine recombinée (Ladisch and Kohlmann 1992), permettant ainsi de s'affranchir de la dépendance aux tissus animaux et donc de répondre à la demande croissante d'insuline. Ces travaux sur l'insuline ont ainsi permis d'ouvrir la voie aux recherches sur d'autres protéines et peptides à visée thérapeutique.

En plus de l'Homme, d'autres sources de peptides peuvent être utilisées telles que le lait, qui contient des dizaines de peptides bioactifs dont la lactotransferrine qui est un antithrombotique ou la lactoferrine qui est un peptide antimicrobien (Clare and Swaisgood 2000; Korhonen 2009). Certains micro-organismes peuvent également être à l'origine de peptides de grand intérêt thérapeutique, tels que les peptides antibiotiques. La pénicilline qui est composé de deux acides aminés (la valine et la cystéine) ou encore les tyrocidines qui sont des cyclo-décapeptides ont sont des exemples.

b. Peptides thérapeutiques

Depuis plusieurs années, les peptides biologiques ainsi que leurs fonctions dans l'organisme ont fait l'objet d'un fort intérêt de la part des équipes de recherche. Cela a permis de progresser dans la compréhension de leurs mécanismes de synthèse et de régulation et de définir leur rôle dans de nombreux procédés physiologiques que ce soit à l'échelle cellulaire où l'échelle moléculaire (Brasnjevic et al. 2009).

Ainsi, les peptides se sont avérés être une réponse intéressante dans le traitement de nombreuses pathologies telles que l'hypertension, certains cancers où maladies neurodégénératives. Actuellement, de plus en plus d'entreprises pharmaceutiques concentrent donc leurs efforts sur le développement de peptides (ou pseudo-peptides) thérapeutiques.

Avantages des peptides thérapeutiques

Les peptides présentent plusieurs avantages liés à leur structure. En effet, les peptides, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, présentent une grande affinité et spécificité vis-à-vis de leur cible. De plus, en comparaison avec des protéines ou des anticorps, les peptides présentent une faible toxicité car leurs produits de dégradation sont des acides aminés. Ils possèdent également une capacité plus grande à pénétrer dans les tissus en raison de leur faible taille. De surcroît, leur conservation possible à température ambiante permet de faciliter le stockage et la distribution de tels médicaments (Sato et al. 2006).

Utilisation thérapeutique

Toutes ces avancées ont permis de développer l'utilisation de peptides dans différents domaines thérapeutiques tels que le traitement (Vlieghe et al. 2010) :

- du cancer de la prostate, du sein : Goserelin acetate - Zoladex®
- de l'hypertension : lisinopril - Zestril®
- de l'ostéoporose : calcitonine de saumon - Acticalcin®
- du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquisée) : Enfuvirtude – Fuzeon®
- des maladies neurodégénératives : taltirelin hydrate - Ceredist®
- du diabète : exenatide - Byetta®
- de résistance bactérienne : polymyxine E

De récentes recherches ont même étudié les propriétés immuno-modulatrices de la cathelicidin et defensins sur des patients atteints de fièvre méditerranéenne familiale (Tufan et al.).



Inconvénients des peptides thérapeutiques

Les principaux inconvénients des peptides thérapeutiques sont (Sato et al. 2006; Vlieghe et al. 2010) :

- une faible biodisponibilité orale
- une demi-vie courte à cause de leur dégradation rapide par des enzymes protéolytiques
- une élimination rapide de la circulation par le foie et les reins
- une faible capacité à traverser les barrières physiologique en raison de leur caractère hydrophile
- un risque éventuel d'effets immunogènes

Stratégies permettant de limiter les inconvénients de l'usage des peptides thérapeutiques

> voie d'administration

Une des stratégies développées par les équipes de chercheurs pour réduire ces inconvénients a été de s'affranchir de la voie d'administration orale classique. Des voies alternatives de délivrance ont ainsi été développées, telles que les voies sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse qui permettent de contourner la barrière intestinale. Ces voies étant inconfortables pour le patient, d'autres technologies de libération ont émergé, dont la voie muqueuse (spray nasal, sublinguale, pulmonaire) ou la voie transdermique (patchs). En parallèle, les recherches concernant la voie orale se poursuivent et se basent sur la formulation d'enrobages permettant le relargage retardé du peptide ou sur la co-administration d'inhibiteurs de protéases (Sato et al. 2006; Vlieghe et al. 2010).

> dégradation peptidique

En plus de ces travaux sur le mode d'administration des peptides, les chercheurs ont étudié les moyens de réduire la dégradation des peptides dans l'organisme. Cette dégradation est principalement due aux protéases ou peptidases localisées dans le

sang, le foie, le système digestif et les reins. Pour lutter contre cette action enzymatique, différentes méthodes ont été mises au point dont la cyclisation des peptides, l'insertion d'acides aminés non naturels, de N-méthyl- α -aminoacide, ou de β acides aminés et ceci afin de permettre l'augmentation de la stabilité plasmatique du peptide. Le remplacement de liaisons peptidiques par d'autres types de liaisons, comme par exemple : le remplacement de la fonction carbonyle de la liaison peptidique par CH_2 (liaison réduite : $-\text{CH}_2\text{-NH}-$), par $\text{C}=\text{S}$ (endothiopeptide : $-\text{C}(\text{=S})\text{-NH}-$) ou par PO_2H (phosphonamide : $-\text{P}(\text{=O})\text{NH-OH}-$) est également utilisé (Vlieghe et al. 2010).

Une autre stratégie d'amélioration de l'activité peptidique est basée sur l'acylation des extrémités C et N terminales des peptides. Le but de cette modification est d'augmenter leur capacité à traverser les barrières physiologiques et à lutter contre la dégradation peptidique. De nombreux travaux ont permis d'évaluer les conséquences de cette modification et notamment son rôle dans l'accroissement de la perméabilité cutanée, intestinale ou hémato-encéphalique des peptides.

On peut citer les travaux de Pham (Pham et al. 2004), qui se sont intéressés à l'étude de l'association d'une molécule modèle avec une membrane lipidique cellulaire. Cette étude est basée sur la comparaison de l'interaction d'une molécule modèle avec celle de ses analogues acylés. Pour ce faire, différents groupes d'acides gras dont l'acide hexanoïque, octanoïque, décanoïque, ou encore palmitoïque... ont été ajoutés à un peptide particulier : le 7-mer oligoarginine Tat-peptide mimétique (R7). Ces différents composés ont par la suite été marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, sur leurs chaînes latérales C-terminales, afin de quantifier leur pouvoir d'association cellulaire. Ainsi le composé acylé C14-R7 a démontré une association optimale, avec une l'intensité de fluorescence sept fois supérieure à celle obtenue avec le R7 non acylé, comme illustré dans la figure 1. Par-contre, l'allongement de la chaîne lipidique au-delà de 14 carbones entraîne une diminution de l'efficacité d'association du peptide, même si celle-ci demeure supérieure à celle obtenue avec le composé non acylé. Ces travaux mettent ainsi en évidence l'intérêt de l'acylation peptidique dans l'association cellulaire, tout en montrant l'importance de la longueur de la chaîne choisie.

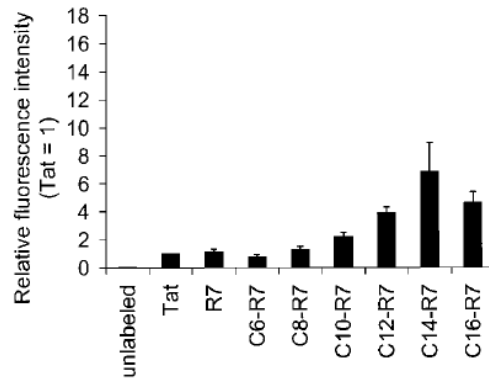


Figure 1 : Comparaison de l'association cellulaire de différents peptides acylés. Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes (Pham et al. 2004).

De la même manière, les travaux de Yamamoto (Yamamoto et al. 2003) ont démontré l'intérêt de l'acylation pour améliorer l'administration transdermique des peptides thérapeutiques. Ils ont été réalisés au travers de l'étude de trois dérivés lipophiles de la phenylalanyl-glycine (Phe-Gly) obtenus par ajout d'acide butyrique : C4-Phe-Gly, d'acide caproïque : C6-Phe-Gly et d'acide octanoïque : C8-Phe-Gly. L'effet de l'acylation sur la stabilité, la perméabilité et l'accumulation de la phenylalanyl-glycine dans la peau a été évalué grâce à des études *in vitro*. Ces études ont montré que :

- la perméabilité des dérivés acylés à travers une peau intacte est supérieure à celle de la Phe-Gly. Parmi les trois dérivés acylés étudiés, le dérivé C6-Phe-Gly est le plus perméable, ce qui conforte l'idée d'une longueur de chaîne optimale pour chaque peptide. D'autre-part, lorsque la peau est prétraité avec de l'éthanol afin d'inactiver les peptidases responsables de la dégradation du composé peptidique, la perméabilité du Phe-Gly est supérieure à celle de ces dérivés acylés. Ceci met en lumière l'implication des peptidases dans la perméabilité membranaire du Phe-Gly et par extension des peptides.
- la stabilité de la Phe-Gly est significativement améliorée grâce à l'acylation comme le montre la figure 2 :

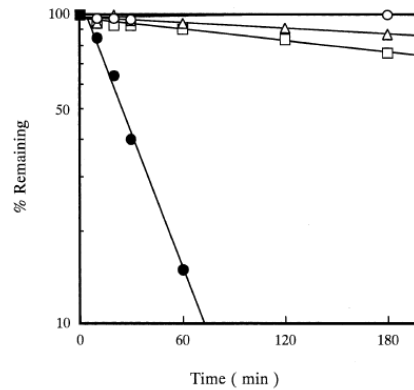


Figure 2 : Etude de la dégradation de la Phe-Gly et de ces trois dérivés acylés dans la peau : Phe-Gly (●), C4-Phe-Gly (○), C6-Phe-Gly (▲), C8-Phe-Gly (□). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences (Yamamoto et al. 2003)

Les travaux de Fujita (Fujita et al. 1996) ont, quant à eux, étudié l'amélioration de l'absorption intestinale d'un peptide particulier : la calcitonine humaine (hCt) grâce à sa lipophilisation. L'absorption et la stabilité intestinale de la calcitonine et de ses deux dérivés, l'acetyl-hCt (Ac-hCt) et le caproyl-hCt (Cap-hCt) ont donc été étudiées chez le rat.

Ainsi, l'étude de l'activité des dérivés de la calcitonine chez le rat a montré que l'acylation de la calcitonine entraîne une diminution de son activité : 70% de l'activité restante pour l'Ac-hCt et 40% pour la Cap-hCt. En revanche dans le même temps, l'acylation permet d'augmenter la biodisponibilité de la calcitonine (3,65% pour le composé Ac-Cht et 4,26% pour le composé Cap-hCt contre 0,29% pour la hCt dans le petit intestin) ce qui permet de compenser la perte d'activité due à l'acylation. L'augmentation de la biodisponibilité des composés acylés prouve, cette fois encore, l'intérêt de l'acylation dans l'augmentation de la perméabilité cellulaire des peptides et démontre l'intérêt de cette modification que ce soit pour une administration transdermique ou pour une administration intestinale comme dans le cas de la formulation d'un comprimé gastro-résistant ou à libération modifiée.

D'autre-part, les résultats obtenus lors de la comparaison de la demi-vie de la calcitonine humaine avec celle de ses homologues acylés amènent aux mêmes conclusions que celles des travaux de Yamamoto (Yamamoto et al. 2003) : l'acylation des composés permet d'améliorer la demi-vie, comme l'illustre le tableau I :

Tableau I : Durée de vie (en min) de la calcitonine humaine et de ces deux dérivés, dans le petit et dans le gros intestin. Les résultats sont la moyenne de trois expériences. *** P<0.001 comparé à la hCt (Fujita et al. 1996).

	Half-life (min)	
	Small intestine	Large intestine
hCT	3.98 ± 0.08	22.2 ± 0.29
Ac-hCT	13.5 ± 0.13***	78.7 ± 1.27***
Cap-hCT	43.6 ± 0.42***	118 ± 2.33***

En plus des recherches sur l'absorption transdermique ou intestinale des peptides, d'autres travaux ont étudié l'augmentation de la perméabilité des peptides thérapeutiques à travers la barrière hémato-encéphalique (Witt et al. 2001). Ces études ont été menées car les peptides thérapeutiques semblent pouvoir être une voie intéressante de recherche pour le traitement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

La lipophilie est un facteur clé dans la détermination de la vitesse avec laquelle un médicament traverse passivement la barrière hémato-encéphalique. La lipophilie est étroitement liée à la polarité d'une molécule et ce sont les acides aminés qui composent un peptide qui déterminent sa polarité. La balance entre les groupes polaires et non polaires peut être modifiée par l'élimination ou l'ajout d'un groupe polaire ou non polaire. Une méthode permettant l'augmentation du caractère lipophile des peptides est l'acylation ou d'alkylation de l'extrémité N-terminal. En effet, l'acylation de peptides est un moyen efficace pour augmenter leur perméabilité membranaire en limitant l'effet sur la liaison au récepteur comme prouvé dans les travaux précédemment décrits.

Ainsi, différentes équipes de recherche ont montré une amélioration de l'absorption à travers les membranes ainsi qu'une meilleure stabilité enzymatique des dérivés acylés de l'DADLE (un analogue de la Leucine enképhaline) (Uchiyama et al. 2000), DPDPE (un analogue de la [Met5]enképhaline) (Weber et al. 1993) et de la ribonucléase A (Chopineau et al. 1998). Cette optimisation permet de conserver l'activité pharmacologique du composé, dans la mesure où le site de fixation de ces acides gras est différent de la région pharmaco-active de la molécule.

Alors que certaines recherches se sont exclusivement intéressées à la perméabilité membranaire des peptides, d'autres travaux ont également étudiés l'influence de

l'acylation sur l'activité des peptides médicaments, comme les travaux de Fujita (Fujita et al. 1996) précédemment décrits. C'est le cas de l'étude de Dasgupta et al. (Dasgupta et al. 2002), qui s'est focalisée sur l'effet de l'acylation sur la demi-vie d'un analogue de la somatostatine : le composé RC-160. L'activité antiproliférative de cet analogue est limitée par sa faible demi-vie dans le sérum. Pour contourner cette limitation, plusieurs chaînes d'acides gras (de 4 à 8 carbones) ont été utilisées pour acyler l'extrémité N-terminale du RC-160.

En premier lieu, l'activité des différents analogues acylés sur des lignées de cellules d'adénocarcinome du sein (MCF-7) a été évaluée *in vitro*. Les composés acylés grâce à des chaînes d'acide gras, tels que les dérivés palmitoylés, présentent une activité antiproliférative supérieure au RC-160. Par contre, l'augmentation de l'hydrophobie de ce peptide, en dehors d'une gamme réduite d'acide gras (chaîne de 4 à 8 composés), entraîne une diminution de la bioactivité du RC-160. Deuxièmement, l'affinité de cet analogue avec les récepteurs à somatostatine n'est pas modifiée par l'ajout du groupement palmitoyle. Enfin, le palmitoyl-RC-160 a également démontré une plus grande résistance à la trypsine et à la dégradation dans le sérum que le RC-160 (figure 3).

Ainsi, ces observations, tendent à prouver, dans un contexte différent des précédentes études, l'intérêt de l'acylation dans l'amélioration des caractéristiques thérapeutiques d'un peptide.

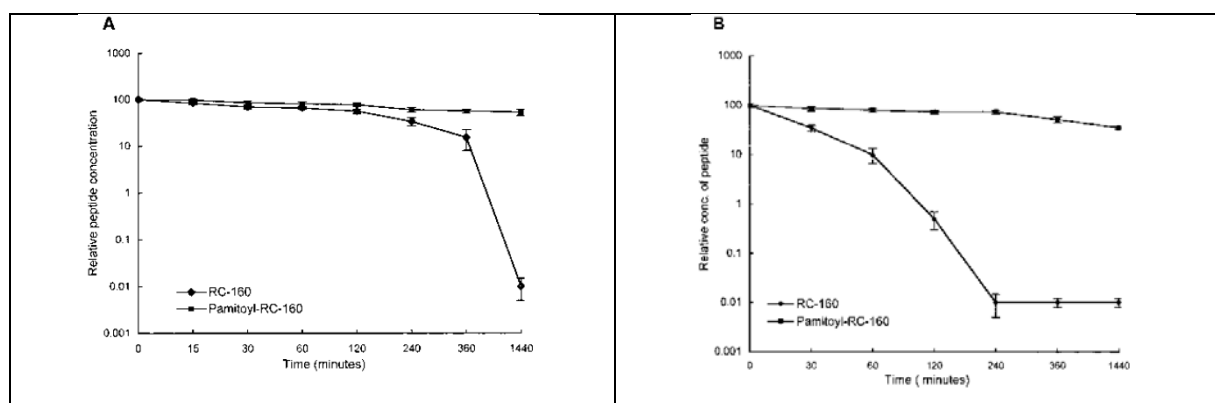


Figure 3 : Résistance, dans le temps, du RC-160 et du Palmitoyl-RC-160 à la dégradation du sérum et aux enzymes protéolytiques

- (A) Les peptides ont été incubés dans une solution brute de protéases pancréatiques bovines à 37 °C.
 (B) Les peptides ont été incubés dans le sérum de souris à 37 °C.

Enfin, d'autres travaux ce sont intéressés à une classe de peptides prometteuse : la classe des peptides anti-infectieux. Il existe de nombreux peptides antimicrobiens qui

peuvent permettre de répondre aux problématiques de résistances qui se sont fortement développés ces dernières années. Ils pourraient donc être utilisés pour traiter des maladies telle que la tuberculose (Tufan et al.; Andrès and Dimarcq 2007; Padhi et al. 2014).

Les travaux de Majerle (Majerle et al. 2003), se sont focalisés sur l'étude de l'acylation d'un peptide composé des résidus 21-31 de la lactoferrine humaine (LF12) par des chaines carbonées de longueurs différentes (de C6 à C18). Ainsi, la liaison d'une chaine de 12 carbones à la FL12 montre de meilleurs résultats en termes d'activités antimicrobiennes. L'acylation permet, en effet, d'augmenter considérablement la liaison de la LF12 avec le lipide A comme le montre la figure 4. Le lipide A étant l'élément de structure minimal entraînant l'activité endotoxique des lipopolysaccharides constituant majoritairement la paroi cellulaire des bactéries gram négatives.

De plus, l'activité antibactérienne de ce peptide antimicrobien (PAM) acylé est considérablement améliorée avec une activité multipliée par un facteur 50 contre *E. coli*, et par 75 contre *S. aureus* par rapport au peptide non acylé.

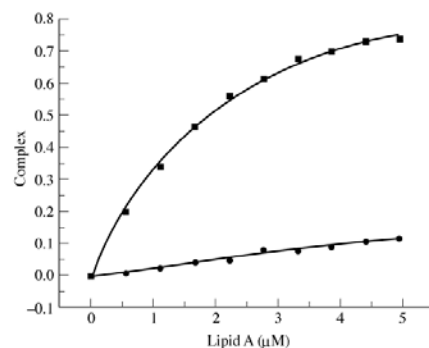


Figure 4 : Liaison de la FL12 (courbe inférieure) et du composé acylé FL12-C12 (courbe supérieure) au lipide A en fonction de la concentration en Lipide A (Majerle et al. 2003).

Remarque : La liaison entre les composés et le lipide A est définie par le suivi de la fluorescence intrinsèque du peptide. En effet, lors de la liaison du peptide avec le lipide A, le spectre d'émission de fluorescence est plus intense et décalé vers le bleu. Ainsi la formation du complexe est définie par l'expression : $(F-F_0)/F_{max}$ avec F_0 : l'intensité de fluorescence à 330 nm sans ligand, F_{max} : l'intensité de fluorescence à saturation du ligand (Majerle et al. 2003).

Ces résultats permettent une nouvelle fois de mettre en évidence le fort intérêt de l'acylation dans l'amélioration de la perméabilité des peptides médicaments ainsi que dans l'augmentation de l'activité thérapeutique de ces composés.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que même si l'acylation d'un peptide entraîne des changements considérables dans le comportement membranaire de celui-ci, ces changements peuvent entraîner une amélioration de l'affinité et de la sélectivité du composé mais également une diminution de ces caractéristiques lorsque le composé lipophile utilisé comporte une chaîne de longueur non adéquate. Ainsi, la balance entre l'hydrophobie et l'hydrophilie d'un peptide est un paramètre très important car elle est étroitement liée aux performances du peptide.

2. La réaction d'acylation

La réaction d'acylation est l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool.

Il existe deux voies d'acylation : l'acylation par voie chimique et l'acylation par voie enzymatique.

Dans les travaux présentés précédemment, sur l'intérêt de l'acylation des peptides thérapeutiques pour améliorer leur transfert membranaire et augmenter leurs propriétés thérapeutiques, l'acylation chimique est principalement utilisée par les équipes de chercheurs. Cette voie d'acylation parfaitement maîtrisée permet d'atteindre des rendements très élevés mais dans un monde où la préservation de l'environnement devient une préoccupation importante, l'utilisation de la voie enzymatique, présentant des avantages en terme de respect de l'environnement et de chimie verte, semble pouvoir être une alternative intéressante.

L'acylation chimique

Parmi les différentes réactions d'acylation chimique existantes, l'une des plus utilisées est la réaction de Schotten-Baumann qui permet de former une fonction amide à partir d'une fonction amine et d'un chlorure d'acyle (Figure 5) :

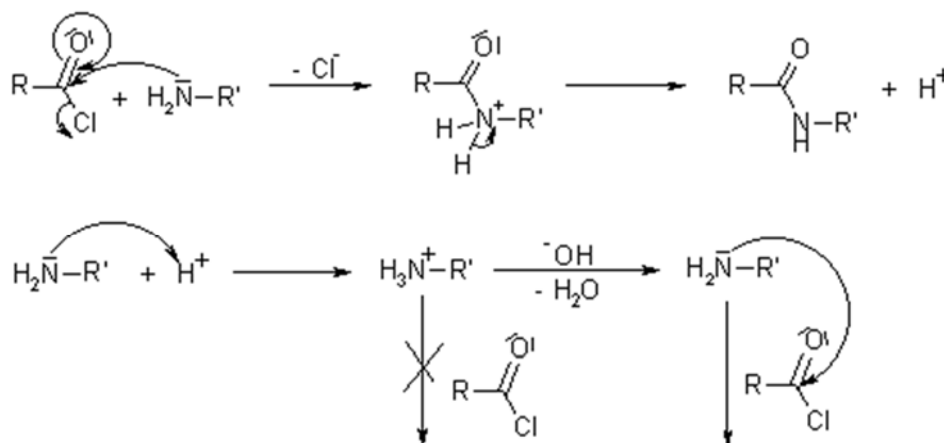


Figure 5 : Mécanisme de Schotten-Baumann

L'acylation enzymatique

L'acylation enzymatique peut se baser sur l'utilisation d'une enzyme hydrolytique dans un milieu non aqueux. En effet, l'utilisation d'un milieu non aqueux favorise la réaction inverse de l'hydrolyse et permet ainsi la formation d'une liaison covalente entre un groupement acyle et une fonction nucléophile.

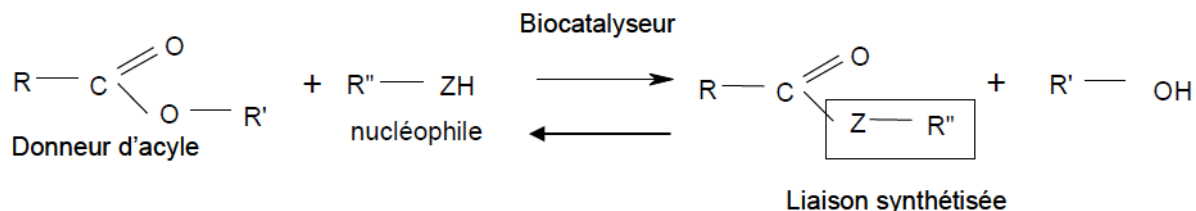


Figure 6 : Schéma général de la réaction d'acylation catalysée par une enzyme

L'utilisation de la voie enzymatique présente de nombreux avantages par rapport à la voie chimique. En effet, les enzymes sont des biocatalyseurs qui ont pour rôle

d'accélérer les réactions biochimiques en réduisant la barrière énergétique à franchir lors de l'état de transition. Elles permettent ainsi d'accélérer les vitesses de réaction. La seule limitation de ces réactions est alors la vitesse de diffusion du substrat dans le milieu. Ceci permet l'emploi d'une très faible quantité molaire d'enzymes par rapport à un catalyseur chimique standard. De plus, elles peuvent être utilisées dans des conditions réactionnelles douces (37°C, pH proche de la neutralité...) et permettent une meilleure spécificité de réaction.

Il faut également citer les inconvénients de l'utilisation d'un catalyseur enzymatique. Au-delà d'une certaine température, il y a un risque pour que l'enzyme soit dénaturée et qu'elle perde son activité. De plus, elle peut subir une inhibition par un des produits formés ou par un substrat de la réaction, à forte concentration. En outre, il ne faut pas perdre de vue que l'acylation par voie enzymatique ne permet pas toujours d'atteindre des rendements de réaction aussi élevés que ceux obtenus grâce à l'acylation par voie chimique et que ces rendements dépendent beaucoup des substrats et enzymes utilisés ainsi que du milieu réactionnel.

Les biocatalyseurs les plus couramment utilisés pour l'acylation de substrats et en particulier pour l'acylation des peptides appartiennent à la famille des hydrolases. Dans ce travail, nous nous intéresseront plus particulièrement aux lipases.

Ces biocatalyseurs sont la plupart du temps utilisés sous forme immobilisée afin de faciliter la purification des produits synthétisés et de permettre leur réutilisation. Cette possibilité de réutilisation permet de réduire le coût des recherches car les enzymes sont des composés onéreux. L'immobilisation permet également d'améliorer la stabilité de l'enzyme face à l'environnement réactionnel et au stress mécanique.

Les lipases

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques qui appartiennent à la classe des triacylglycérol hydrolases (EC 3.1.1.3). Elles sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux ainsi que dans de nombreux microorganismes et elles jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. En effet, le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol.

Lorsque les lipases sont placées dans un milieu aqueux, elles catalysent spécifiquement l'hydrolyse de liaisons esters à l'interface entre la phase aqueuse dans laquelle elles sont solubilisées et la phase apolaire composée d'esters d'acides gras non solubilisés.

Alors que lorsqu'elles sont dans un environnement pauvre en eau, les lipases catalysent la synthèse de liaisons esters (à savoir la réaction inverse à celle catalysée en milieu hydrophile).

La synthèse d'une liaison ester (R-COO-R') encore appelé estérification, est la plupart du temps décrit comme la réaction entre un acide carboxylique (R-COOH) et un alcool (R-OH) mais dans le cas des lipases la réaction peut également s'effectuer avec un acide sulfurique (H₂SO₄) ou de l'azote créant ainsi des liaisons thioesters (R-COS-R') et amides (R-CON-R') (Husson 2008).

Comme pour une grande partie des biocatalyseurs naturels, les lipases sont souvent immobilisées par inclusion, adsorption ou par liaison covalente. Cette immobilisation, permet, comme expliqué précédemment, leur réutilisation et par conséquent leur utilisation lors de la conception de procédés en continu.

La lipase B de Candida antarctica

La levure *Candida antarctica* produit deux types de lipases : CAL A et CAL B, nous ne nous intéresserons qu'à la lipase B.

Cette protéine globulaire présente un poids moléculaire de 33 kDa et est constituée de 317 acides aminés. Comme illustré ci-après, la structure de CAL B est constituée d'un corps central de 8 feuillets β autour duquel se répartissent au moins 6 hélices α des 10 qu'elle possède. Elle présente également dans sa structure un repliement α/β caractéristique des lipases ainsi que la triade catalytique Ser105 - Asp187 - His224.

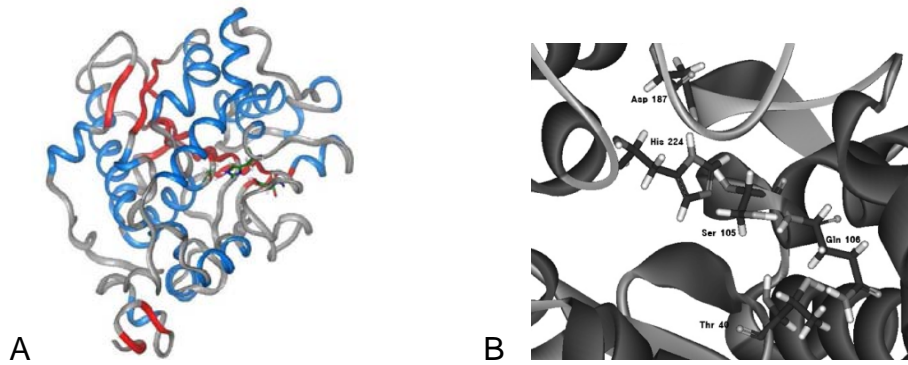


Figure 7 : A - Structure moléculaire de la lipase B de *Candida antarctica*. En bleu les hélices α et en rouge les feuillets β , B - Zoom sur les sites actifs de la lipase B de *Candida antarctica*.

L'activité catalytique des lipases et donc celle de la lipase B de *Candida antarctica* est souvent représentée grâce au mécanisme enzymatique à deux substrats appelé « bi-bi ping-pong ». Ce mécanisme a été proposé par Cygler et coll (1994) (Cygler et al.).

Les différentes étapes de ce mécanisme sont :

- L'enzyme E se combine au premier substrat S1
- Libération du premier produit P1
- L'enzyme est alors sous une forme modifiée E' capable de réagir avec le second substrat S2
- Le substrat S2 est transformé en un produit P2
- L'enzyme reprend sa forme initiale.

Enzymes à 2 substrats = cinétique non michaelienne $S1 + S2 \rightleftharpoons P1 + P2$

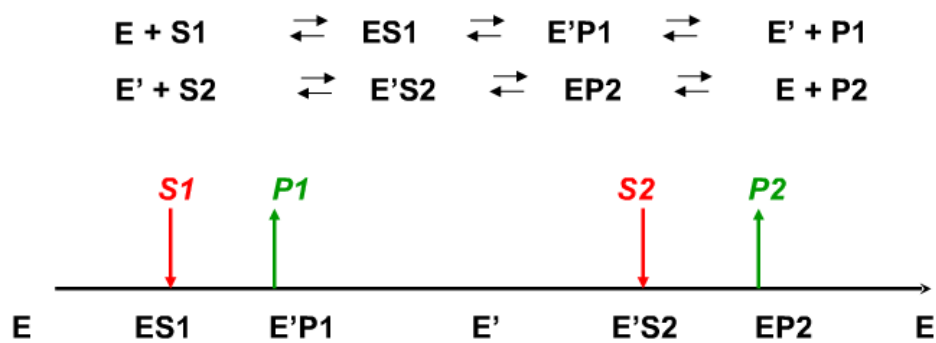


Figure 8 : Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ping-pong

Comme décrit précédemment, ces réactions d'acylation catalysées par des enzymes présentent des rendements de réaction souvent moindre que ceux réalisés par voie chimique. Il est donc nécessaire de résoudre cette problématique afin de permettre une généralisation de l'utilisation des biocatalyseurs plus éco-efficient que les catalyseurs chimiques. Une des solutions étudiée depuis plusieurs années, est l'utilisation de systèmes microstructurés qui permettent d'intensifier les réactions biocatalysées et donc d'améliorer leur rendement.

III. Utilisation et Intérêt de microréacteurs dans le domaine de la biocatalyse

1. Contexte général

En premier lieu, il est nécessaire de définir ce qu'est un microréacteur : un microréacteur est un réacteur miniature au sein duquel une réaction chimique peut se dérouler. Il en existe principalement deux types : les microréacteurs à lit fixe et les microréacteurs microfluidiques. Les microréacteurs à lit fixe sont semblables à leurs homologues de taille standard. La microfluidique a été quant à elle décrite par George Whitesides (Whitesides 2006) comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres), en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres ».

Ces systèmes micro-structurés sont développés depuis les années 80 et suscitent un attrait grandissant auprès des chercheurs depuis quelques années. L'illustration parfaite de cette tendance est l'augmentation du nombre de publications ayant pour thème la microfluidique ou les microréacteurs depuis les années 2000 comme décrit dans la figure 9 (Vasconcelos 2010) :

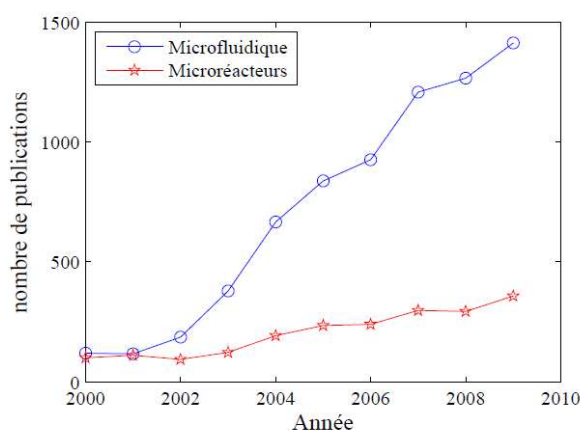


Figure 9 : Nombre de publications depuis l'année 2000 dans les domaines de la microfluidique. Statistiques obtenues avec ISI Web of Knowledge (Vasconcelos, 2010)

Comme illustré précédemment, les microréacteurs microfluidiques sont une voie de recherche importante depuis plusieurs années et sont beaucoup plus utilisés que les réacteurs à lit fixe. Il existe même à l'heure actuelle, des réacteurs microfluidiques commercialisés par des sociétés telles que Dolomite®, Chemtrix® ou Syrris®.

Un réacteur microfluidique peut être défini comme un réseau de microcanaux possédant au moins une dimension inférieure à 1 mm, intégré dans une structure

plane, communément appelé « chip » ou comme un dispositif de microcapillaires où les microcanaux représentent la zone de réaction (Figure 10).

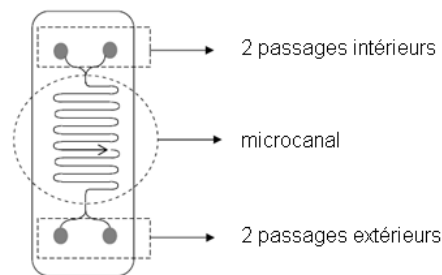


Figure 10 : représentation schématique d'un microréacteur microfluidique (Fernandes 2010)

De nombreux matériaux dont des polymères, des métaux et des céramiques peuvent être utilisés pour construire des réacteurs microfluidiques. L'utilisation de polymères tels que le poly(diméthylsiloxane), le SU-8 : époxy résine photosensible (Jensen 2006) (Strike et al. 2000) ou les polymères de silice, rend ces réacteurs peu coûteux et facilite l'intégration de systèmes de contrôle (vannes pneumatiques, capteurs). Par ailleurs, l'inconvénient majeur de ces systèmes est leur sensibilité aux solvants organiques.(Jensen 2006). Le verre est un autre matériau largement utilisé pour la construction de réacteurs microfluidiques et possède, quant à lui, l'avantage d'être chimiquement inerte à la plupart des réactifs et solvants et d'être transparent, ce qui permet l'observation de la réaction.

L'écoulement à l'intérieur des réacteurs microfluidiques peut être simple phase ou polyphasique mais il est principalement co-courant. Pour un écoulement polyphasique, les jonctions les plus couramment utilisées sont les jonctions en T, en croix, en Ψ et en Y (Skurtys and Aguilera 2008) (Hartman et Jensen2009) comme schématisé dans la figure 11.

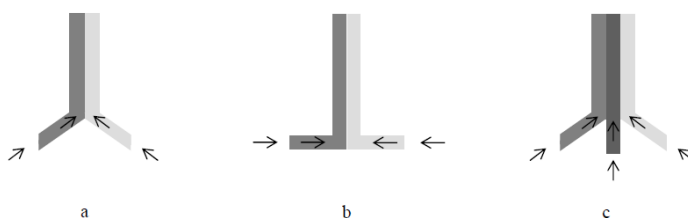


Figure 11 : Exemples de jonctions dans des dispositifs microfluidiques: (a) jonction en Y; (b) jonction T, (c) jonction Ψ . Les flèches indiquent la direction de l'écoulement.

L'hydrodynamique est un paramètre très important dans ce type de réacteur et compte tenu des faibles dimensions, le régime d'écoulement est laminaire. Ce type d'écoulement favorise le contrôle et la modélisation des réactions et entraîne un important rapport surface/volume.

Les forces interfaciales dominent donc les forces de gravité et le mélange repose sur la diffusion moléculaire (Hartman and Jensen 2009) (Watts and Wiles 2007). Dans un tel environnement, les nombres de Reynolds (rapport des forces inertielles sur les forces visqueuses) et de Bond (rapport entre les forces gravitationnelles et la tension de surface sur une interface entre deux fluides) sont faibles et le nombre de Péclet (rapport représentatif du transport par convection sur le transport par diffusion) est élevé (Mary et al. 2008) (Kralj et al. 2007).

Les réacteurs à lit fixe utilisés en recherche sont quant à eux, des réacteurs souvent artisanaux faits directement par les équipes de chercheurs. Ils se présentent sous la forme d'un tube de faible diamètre rempli d'une enzyme immobilisée comme présenté dans la figure 12.



Figure 12 : représentation schématique d'un microréacteur à lit fixe

Selon la revue annuelle 2012 du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), basée sur les données statistiques de l'organisation mondiale de la propriété intellectuelle (OMPI) on peut observer une progression constante des demandes de brevets concernant les technologies des microstructures et nanotechnologies (tableau II).

Tableau II : Données statistiques sur le nombre de demandes de brevets concernant des microtechnologies et nanotechnologies. Données fondées sur la date de publication.

Année	2007	2008	2009	2010	2011
Nombre de demandes de brevet	246	306	344	347	356

D'après un article publié par Hessel et al. (Hessel et al. 2008) les domaines d'application de ces brevets sont principalement la chimie organique, combinatoire et la biochimie et ils concernent des dispositifs de mélange, de séparation et bien évidemment de réaction. La plupart des brevets sont déposés par de grandes entreprises telles que Merck, Degussa,..., mais également par des institutions, notamment allemandes, ou des prestataires de services. Pour exemple, on peut citer la société Bayer qui en rachetant la startup Ehrfeld Mikrotechnik AG a prouvé l'intérêt qu'elle porte en cette nouvelle technologie (Vasconcelos 2010). Cette entreprise a mis sur le marché des microsystemes tels que le MMRS « Modulare MikroReaktionen System », un équipement créé pour la recherche et le développement ainsi que la production à petite échelle, qui permet de combiner facilement plus de 60 modules de microréacteurs. On peut également citer la gamme de microréacteur Lonza FlowPlate™ MikroReaktoren qui présente des solutions innovantes et modulaires pour les industries de la chimie fine et les industries pharmaceutiques dans le respect des contraintes GMP (« Good Manufacturing Practices » équivalent américain des « Bonnes Pratiques de Fabrication »).

Par ailleurs, des programmes nationaux et internationaux tels que le programme européen IMPULSE (Intregated Mutiscale Process Units with Locally structured Elements) ont permis de rassembler des universitaires et des industriels et ainsi de favoriser le développement de ces systèmes micro-structurés. En effet, l'objectif du projet de recherche collaborative IMPULSE était de promouvoir l'utilisation de composants microstructurés dans les industries chimiques et pharmaceutiques afin de développer des unités de production plus performantes et plus éco-efficientes. Le projet a d'ailleurs reçu le Prix du Meilleur Projet en Technologies Industrielles des 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} PCRD (Programmes Cadres de Recherche et Développement européens) en décembre 2012.

Les équipements microstructurés semblent donc être capables de répondre aux grands défis des secteurs de la chimie fine et de la pharmacie, que sont la sécurité et la chimie verte. En effet, dans ces secteurs toujours en quête de nouvelles molécules, notamment thérapeutique dans le cas de l'industrie pharmaceutique, la sécurité et la gestion du risque sont des préoccupations importantes. Ainsi, la substitution de solvants ou la réduction de la quantité de déchets produits sont des points importants...

De plus, en raison de la très forte valeur ajoutée des composés produits, l'amélioration de la qualité et l'augmentation des rendements de production sont des points cruciaux pour les entreprises. Le passage de procédés de type batch à des procédés continus grâce à l'utilisation de microréacteurs pourrait ainsi être une opportunité très intéressante. Malgré les avantages que pourrait apporter ce changement, de nombreux freins techniques, économiques et humains subsistent. Pour exemple, l'importance de la notion de lot dans le secteur pharmaceutique est plus facilement compatible avec une production de type batch.

C'est dans ce contexte, que des chercheurs français se sont intéressés à l'influence de la miniaturisation sur des procédés physico-chimiques courants. On peut notamment citer les travaux de JM. Commenge (Commenge 2001) qui à partir d'une représentation analytique simple d'un procédé comportant des opérations de transfert et/ou de réaction, relie l'efficacité du procédé au rapport de 2 constantes de temps : le temps de passage du fluide et le temps caractéristique d'opération. L'analyse de l'évolution du temps caractéristique d'opération en fonction des dimensions caractéristiques du système montre ainsi, en fonction de la nature de l'opération, comment l'utilisation de systèmes microstructurés permet d'améliorer les performances et/ou de miniaturiser un procédé (Commenge et al. 2004). En plus de cette notion de performance des réacteurs, ils abordent également les notions de sécurité de procédés, de coût de la maintenance ou de la structure du département recherche et développement...

c. Les avantages de la miniaturisation

Un rapport surface/volume très important

Les phénomènes de transferts de masse et d'énergie sont favorisés dans les systèmes microstructurés car ils possèdent de faibles dimensions et un rapport surface/volume élevé.

En effet, dans un microréacteur, il est possible d'atteindre des surfaces spécifiques allant de 10 000 à 50 000 m²/m³, contrairement à des configurations typiques de

laboratoire qui n'excèdent pas $1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ou à une colonne gaz/liquide qui n'excède pas $100 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Ehrfeld et al. 2000).

L'augmentation de la surface d'échange permet ainsi d'accroître le taux de conversion des réactions pour lesquelles les phénomènes de transfert sont prioritaires (par exemple, les réactions chimiques polyphasiques, hétérogènes, ...).

Un transfert de chaleur amélioré

L'important rapport surface/volume des microréacteurs ainsi que leur faible inertie thermique leur permet d'avoir des coefficients d'échange de chaleur élevés qui peuvent aller jusqu'à $25 \text{ kWm}^{-2}\text{K}^{-1}$ pour certains matériaux. Dans ces réacteurs, l'augmentation de la température peut être contrôlée et ainsi permettre la réalisation de réactions exothermiques tout en limitant le risque d'emballement thermique (Vasconcelos 2010).

Un transfert de masse amélioré

La caractéristique principale des microréacteurs étant la présence d'au moins une dimension inférieure au millimètre, ceci favorise la rencontre entre les molécules réactionnelles. Ceci peut être un atout pour les microréacteurs par rapport aux autres types de réacteurs lors de la mise en œuvre de réactions limitées par le transfert de masse.

→ L'amélioration du transfert de masse et de chaleur permet de réduire le temps de réaction tout en augmentant le taux de conversion des réactions mises en jeu (Pennemann et al. 2004).

Comme exemple de ces avantages des microréacteurs, les recherches de E. S. Borovinskayaa et V. P. Reshetilovskii (Borovinskaya and Reshetilovskii 2011) basées sur la catalyse chimique et utilisant le TEBA (benzyltriethylammonium chloride) comme catalyseur, peuvent être citées. Ces expériences ont montré que l'utilisation d'un

microréacteur permet, grâce au micromélange intensif, de diminuer significativement la durée de la réaction en comparaison avec un réacteur agité traditionnel. Elles montrent également que cela permet d'augmenter le taux de conversion du phénylacétonitrile sans affecter la qualité de la sélectivité. Ainsi, seulement 10 min ont été nécessaires pour atteindre un taux de conversion de plus de 80% en microréacteur alors que le temps minimum pour atteindre ce même taux de conversion est presque multiplié par trois dans un réacteur traditionnel (Figure 13).

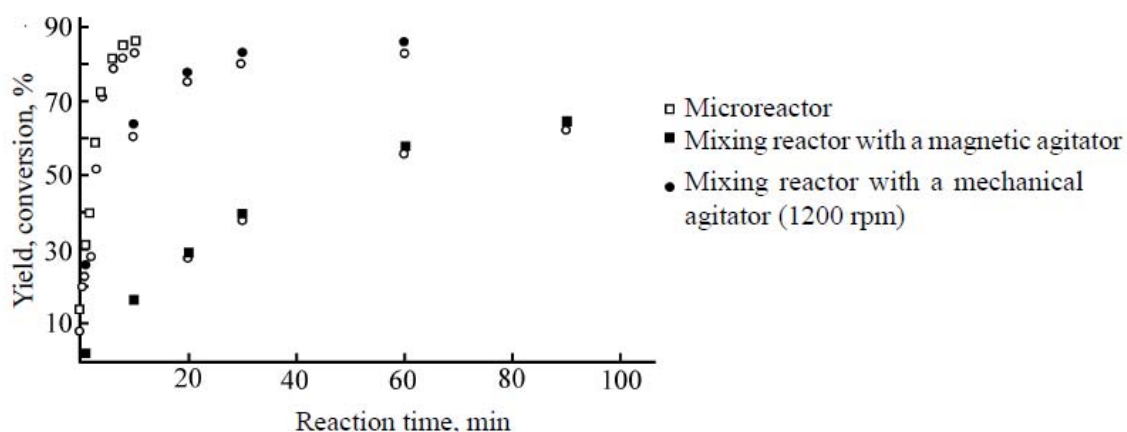


Figure 13 : Comparaison du taux de conversion et du rendement en phénylacétonitrile entre un microréacteur et deux réacteurs agités. Points pleins : conversion – points vides : rendement (Borovinskaya et al. 2009).

Faible consommation de réactifs

Le passage à la miniaturisation peut être avantageux lorsque l'un des composés mis en œuvre est disponible en faible quantité ou lorsqu'il est très coûteux, comme dans le cas de la synthèse de nouveaux médicaments à très forte valeur ajoutée.

On peut également citer le cas de dispositifs dédiés au diagnostic médical. En effet, il serait avantageux pour le confort du patient, de pouvoir analyser un prélèvement de sang de très faible volume, de l'ordre du microlitre, plutôt que de continuer à prélever des volumes importants comme c'est le cas actuellement (Aubin and Xuereb 2008).

L'utilisation de faibles volumes de réactifs est également un atout pour la sécurité de certains procédés. En effet, l'utilisation de microréacteurs rend possible la synthèse selon le besoin de faibles volumes de substances intermédiaires présentant un danger potentiel lors de leur stockage ou de leur transport. Citons par exemple le

phosphogène, réactif ayant de nombreuses applications mais étant dangereux (Aubin and Xuereb 2008).

Conception et flexibilité

Les dispositifs microfluidiques peuvent, dans certains cas, être très simples et ne comprendre qu'un système de pompage et un simple réseau de capillaires. Les microréacteurs à lit fixe sont quant à eux, la plupart du temps, des montages artisanaux faits par les équipes de recherche. Ces dispositifs sont donc peu onéreux, faciles à mettre en œuvre et facilement adaptables même s'ils ne permettent pas tous les types d'environnements réactionnels.

D'autre part, les faibles dimensions de ces réacteurs entraînent une infinité de possibilités lors de la conception de réseaux microfluidiques ou l'association de microréacteurs. Le microréacteur ainsi que ses périphériques tels que les capteurs de pression, de température, les éléments chauffants nécessitent moins de place et d'énergie que dans les configurations classiques. De ce fait, les microréacteurs peuvent être connectés en parallèle, ce qui permet de rationaliser l'utilisation des utilités ou des équipements d'analyse. (Aubin and Xuereb 2008).

Gain de temps

Le temps de séjour dans ces microsystèmes est court, généralement de quelques secondes, ce qui permet de réduire le temps nécessaire à l'étude de nombreuses conditions expérimentales afin de définir laquelle est la plus optimale (Fernandes, 2010). Ceci est particulièrement intéressant pour des applications de criblage ou pour l'étude de la synthèse chimique d'un nouveau composé ou d'une nouvelle voie réactionnelle.

L'utilisation de microréacteurs permet également de faciliter le changement d'échelle lors du développement d'un procédé. La voie classique pour le scale-up comprend 3 phases que sont le stade de la paillasse, puis le passage à une échelle pilote et enfin à l'échelle industrielle. L'utilisation de microréacteurs peut permettre de contourner ces

étapes grâce à la mise en parallèle d'un grand nombre de microréacteurs comme montré dans la figure 14 (Hessel et al. 2006).

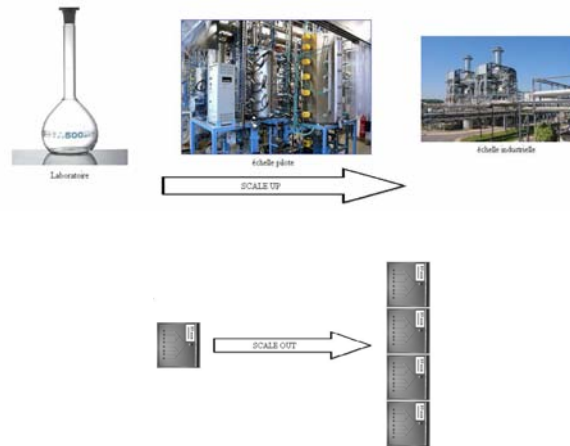


Figure 14 : Scale-up et numbering-up (Hessel et al. 2006)

L'utilisation de microréacteur permet ainsi de diminuer le temps nécessaire pour le changement d'échelle et donc de réduire la phase de recherche et développement habituellement très longue et très coûteuse pour les industries pharmaceutiques.

Moyen de passer d'un procédé batch à un procédé en continu

Dans le domaine pharmaceutique, les procédés batch sont principalement utilisés mais il pourrait être avantageux de passer d'un procédé batch à un procédé continu pour certaines réactions notamment si des microréacteurs sont utilisés.

3 classes de réactions chimiques peuvent être distinguées comme schématisé dans la figure 15 (Roberge et al. 2009) :

- Classe A : réactions très rapides (<1s) qui sont principalement contrôlées par les procédés de mélange. Généralement, le rendement de ces réactions est augmenté en utilisant un microréacteur car il y a une augmentation des échanges de chaleur et un mélange rapide.

- Classe B : réactions rapides (10 sec à 20 min) limitées par la cinétique. Dans ce cas, le rendement est accru par un contrôle précis du temps de séjour et de la température.
- Classe C : réactions lentes (> 20 min) pour lesquelles une forte accumulation de chaleur est observée. L'utilisation d'un procédé en continu permettrait alors d'augmenter la sécurité du procédé.

Des études ont été réalisées sur un nombre important de réactions et ont permis de définir que la moitié d'entre-elles pouvaient bénéficier du passage en procédé continu et ainsi bénéficier des avantages liés à l'utilisation de systèmes microstructurés (Roberge et al. 2009).

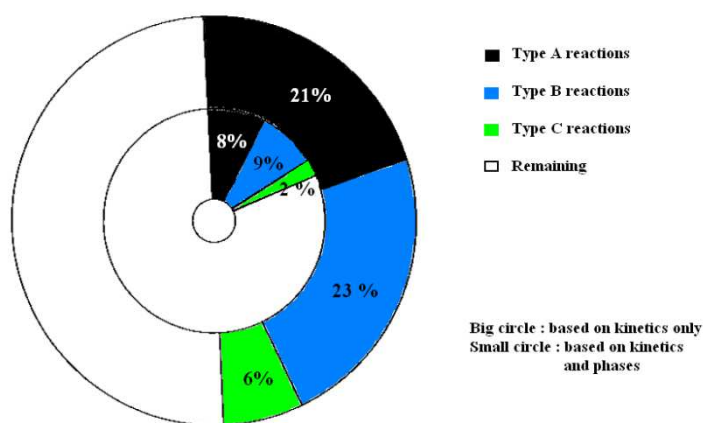


Figure 15 : classes de réaction chimiques (Roberge et al. 2009)

Partant de ce constat, l'équipe de Lomel (Lomel et al. 2006) a également évalué l'intérêt de l'utilisation des microréacteurs comme moyen pour passer des procédés batch à des procédés continus. L'étude s'est basée sur la réaction de Grignard et il a été montré qu'il est possible de réduire le temps de réaction de 5 h à 10 sec et qu'une productivité similaire à celle d'un réacteur agité de 6 m³ pouvait être atteinte en utilisant 5 microréacteurs en parallèle.

d. Les limites de la miniaturisation

Les dispositifs microstructurés peuvent cependant présenter quelques inconvénients et limitations.

Les microréacteurs microfluidiques sont souvent limités par les lois de l'hydrodynamique. En effet, les faibles dimensions caractéristiques de ces réacteurs entraînent forcément une augmentation des pertes de charges par frottement. Il existe donc des dimensions critiques au-delà desquelles les pertes de charges sont trop élevées pour permettre une réaction.

Le colmatage du microsystème par cristallisation des composés ou augmentation de la viscosité peut également être un inconvénient majeur (Vasconcelos 2010).

L'étanchéité de ces systèmes, présentant des réseaux complexes de canaux de très faibles dimensions, est également un point critique de leur conception. Il est en effet difficile d'assembler de manière étanche ces différents canaux, surtout lorsqu'ils ont des dimensions très faibles, avec les outils actuellement disponibles sur le marché.

Une autre difficulté, réside dans le fait que le mélange se fasse essentiellement par diffusion (Weigl and Yager 1999). Pour contourner ce problème, certaines équipes de chercheurs ont expérimenté plusieurs techniques permettant d'améliorer le mélange dont l'utilisation de flux segmentés (Song et al. 2003), de mélangeurs statiques (Johnson et al. 2002; Stroock et al. 2002) ou actifs (Dodge et al. 2005).

D'autre part, les quantités réduites de réactifs et de produits présentes dans ces réactions peuvent être un inconvénient lors de l'étape d'analyse. En effet, même si de nombreuses avancées ont été réalisées, le manque d'appareils analytiques adaptés aux volumes et aux débits utilisés dans ces systèmes microstructurés rend difficile l'étude des produits de réaction et du microsystème lui-même.

2. Applications des microréacteurs aux réactions catalysées par des biocatalyseurs

Contrairement aux réactions chimiques, les réactions biocatalytiques sont plus lentes et peu dépendantes des phénomènes de transfert de chaleur ou de masse. C'est pourquoi, seul un nombre limité de réactions enzymatiques peuvent bénéficier des avantages de l'utilisation d'un système microstructuré (Karande et al. 2011).

a. Les microréacteurs adaptés à des fins analytiques

Les microréacteurs biocatalytiques peuvent être utilisés afin de transformer un analyte difficile à mesurer en une forme plus facilement analysable. En effet, une des applications très répandue des microsystèmes et leur utilisation pour la digestion des protéines en peptides.

Peptide mapping

La cartographie peptidique, utilisant une enzyme protéolytique, est un outil d'analyse fréquemment utilisé pour la caractérisation des protéines. Elle permet notamment d'identifier des modifications post-traductionnelles ou des anomalies de la chaîne peptidique. Une modification de la cartographie peptidique, même minime, peut engendrer une maladie et sa détection devient alors primordiale pour l'établissement du diagnostic médical. Comme exemple, on peut citer les études faites par Ingram (Ingram 1958, 1959) qui ont démontré que la carte peptidique de l'hémoglobine d'un patient atteint d'une anémie était différente de celle d'un patient sain.

La cartographie peptidique comporte trois étapes (Nguyen 2008) :

- la dénaturation de la protéine
- le clivage de cette protéine par une enzyme (digestion enzymatique)
- la séparation des peptides obtenus

La digestion enzymatique consiste à fragmenter de manière localisée une protéine au moyen d'une protéase. Les enzymes étant très sensibles aux conditions de température et de pression, le milieu doit être adapté et contrôlé. Le plus souvent, le pH optimal d'activité d'une enzyme est proche de celui de son environnement physiologique et sa température optimale proche de la température physiologique de 37°C (Cingöz 2009). L'enzyme la plus utilisée dans ce procédé est la trypsine, une endoprotéase qui hydrolyse la liaison peptidique côté C-terminal après les acides aminés : lysine et arginine sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline.

Plusieurs modèles de microréacteurs ont été développés pour la cartographie peptidique, couplés à l'électrophorèse capillaire et à des méthodes analytiques telles que la chromatographie liquide ou la spectrométrie de masse. Ces microréacteurs sont constitués d'enzymes immobilisées et sont appelés IMER « IMmobilized Enzyme Reactor » (Nguyen 2008). Les modèles en ligne sont généralement constitués des éléments présentés figure 16 :

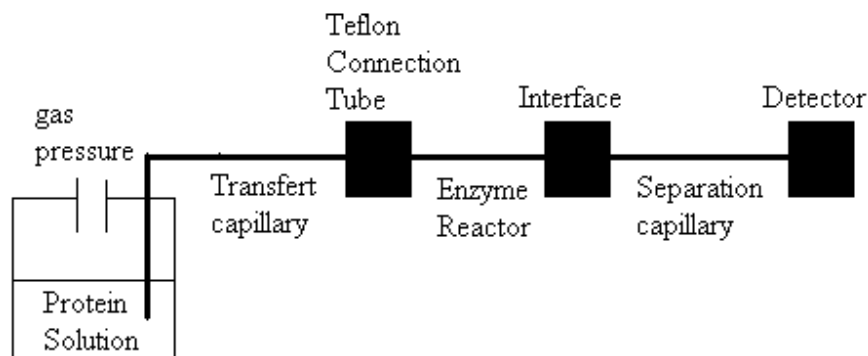


Figure 16: schéma des modèles en ligne pour la cartographie peptidique (Ye et al. 2004)

L'échantillon protéique est injecté à l'aide d'un gaz sous pression (les gaz utilisés sont inertes et sont généralement l'azote ou l'argon) dans un capillaire de transfert puis est amené vers le microréacteur contenant l'enzyme immobilisée. C'est dans cet IMER que s'effectue la digestion enzymatique. Les peptides ainsi créés sont alors séparés dans un système d'électrophorèse capillaire pour ensuite être analysés par spectrométrie de masse.

Un des supports les plus utilisés dans les microréacteurs est le monolithe. Un monolithe a une structure poreuse bimodale assurant une grande perméabilité et un transfert de masse rapide. Le transfert du substrat vers les sites catalytiques est ainsi

facilité et le temps de digestion réduit (Cingöz 2009). La composition des monolithes est très variable, on retrouve toutefois, souvent les GMA : glycidyl méthacrylate et EDMA : éthylène diméthacrylate.

L'immobilisation de l'enzyme se fait généralement par liaison covalente avec un groupement fonctionnel présent dans la structure du monolithe.

Parmi les travaux réalisés en peptide mapping, on peut citer ceux de Bonneil (Bonneil and Waldron 2000; Bonneil et al. 2000) qui a développé un microréacteur composé de trypsine immobilisée.

Une solution protéique a été injectée sous faible pression, au travers d'un capillaire de silice de 30 cm de long garni de trypsine immobilisée sur des billes de verres poreuses et maintenu à une température constante de 37°C (figure 17). Les peptides hydrolysés ont été recueillis à la sortie du microréacteur et les fragments tryptiques ont été séparés par électrophorèse capillaire et détectés par absorbance UV. Les cartes peptidiques ainsi obtenues ont été comparées à celles obtenues par des méthodes traditionnelles, ce qui a permis de prouver la reproductibilité de l'utilisation du microréacteur pour l'étude d'une cartographie peptidique. De plus, ces travaux montrent que l'activité enzymatique est assez élevée pour permettre la réutilisation de l'enzyme pour minimum 10 expériences.

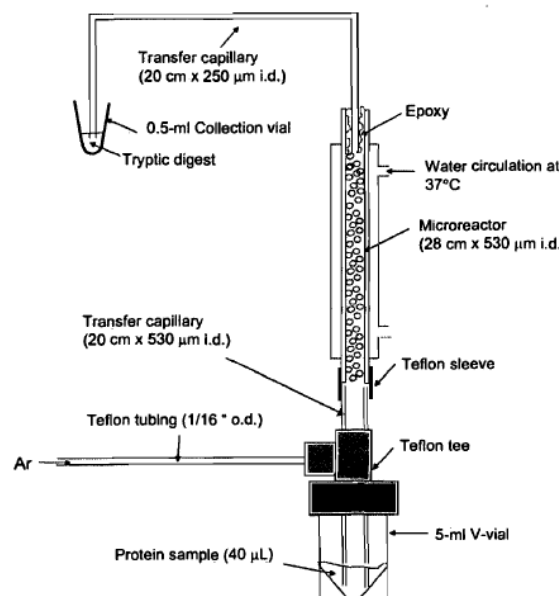


Figure 17 : Diagramme du montage de la digestion dans un microréacteur de trypsine immobilisée (Bonneil and Waldron 2000)

On peut également citer les récents travaux de Peng Xiao (Xiao et al. 2013), qui a, quant à lui, développé un microréacteur fait à partir de chymotrypsine immobilisée grâce à des aptamères sur des billes de silice et non pas par liaison covalente comme dans la plupart des IMER. Un aptamère est un oligonucléotide synthétique, le plus souvent un ARN (Acide Ribonucléique), capable de fixer un ligand spécifique. Il est isolé *in vitro* à partir de banques combinatoires par une méthode sélective et itérative appelée SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel).

Cet IMER a permis de réaliser la digestion d'une solution composée de 3 protéines (sérum albumine bovine, myoglobine et cytochrome c) en seulement 40 min à une température de 37°C et avec un débit de 2 µl/min alors que cette même digestion nécessite 16 h dans un réacteur agité classique. Les résultats finaux de ces deux systèmes sont comparables comme le montre le tableau III. De plus, l'utilisation d'aptamères pour l'immobilisation de la chymotrypsine rend le microréacteur réutilisable pour plusieurs digestions protéiques.

Tableau III : Résultats comparatifs obtenus lors de la digestion d'un mélange de 3 protéines dans un réacteur classique et dans un microréacteur. Les résultats obtenus sont une moyenne de 5 expériences réalisées dans les mêmes conditions.

Protein	MW (Da)	pI	In-solution digestion (16 h)		On-column digestion (40 min)	
			Peptide matched	Sequence coverage (%)	Peptide matched	Sequence coverage (%)
Cyt.c	11702	9.6	5.6 ± 0.6	39.7 ± 2.2	4.8 ± 0.9	37.2 ± 2.5
Mb	16953	7.4	8.5 ± 1.7	52.1 ± 3.2	7.3 ± 2.6	50.2 ± 4.5
BSA	66430	4.7	25.8 ± 3.2	42.8 ± 2.3	24.6 ± 3.7	41.0 ± 4.7

Autres aspects analytiques

En plus de la digestion peptidique, les montages en ligne comprenant des microréacteurs enzymatiques peuvent être utilisés à des fins de détection. En effet, après séparation des analytes, ceux-ci peuvent être transformés grâce à un microréacteur, en des produits plus facilement analysables.

Lorsque le microréacteur est placé après un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) on parle de système post-colonne. Dans ces systèmes, les

analytes sont d'abord séparés dans l'équipement, puis sont transformés dans un IMER sous forme de produits ayant une meilleure absorption, détection par fluorescence ou électrochimique.

Pour exemple, on peut citer la détermination de la teneur en acétylcholine, choline et en oxalate dans les fluides et les tissus (Girelli and Mattei 2005).

L'acétylcholine et la choline peuvent être séparés de leur milieu grâce à une colonne et être ensuite convertis en peroxyde d'hydrogène dans un microréacteur post-colonne contenant un couple oxydase acétylcholinestérase / choline. La concentration en peroxyde d'hydrogène étant corrélée aux concentrations d'acétylcholine et de choline, celles-ci peuvent être facilement déterminées par des électrodes modifiées de noir de platine.

L'oxalate, quant à lui, est déterminé au sein de matrices complexes telles que le plasma et l'urine (Hönnow et al. 1997) (Yamato et al. 1994) en utilisant l'oxalate oxydase comme enzyme immobilisée. Cette fois encore, la simplicité de la détection électrochimique du peroxyde d'hydrogène rend cette méthode d'analyse moins chère et permet l'étude d'un très grand nombre d'échantillons.

Enfin, ces montages peuvent également s'appliquer à l'analyse de certains aldéhydes tels que l'acétaldéhyde, le furfural (Schultheiss et al. 2000) et le formaldéhyde qui ont un intérêt dans le contrôle qualité de certains aliments, de boissons et de produits cosmétiques. En effet, un microréacteur composé de l'aldéhyde déshydrogénase couplée à la NADH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide) permet de déterminer la concentration de ces aldéhydes.

D'autre part, lorsque le microréacteur est placé avant la colonne HPLC on parle de système pré-colonne. Ces dispositifs peuvent être utilisés quand il est nécessaire de transformer des analytes en composés plus facilement séparables du milieu complexe dans lequel ils sont présents (tels que les liquides biologiques). Cette modification permet de faciliter l'analyse du composé et d'obtenir des résultats plus précis.

L'utilisation d'un microréacteur pré-colonne peut également être intéressante dans le cas des procédés stéréochimiques, de purification de molécules chirales ou pour l'étude des conditions optimales de réactions énantiosélectives. Actuellement, certaines enzymes au comportement stéréosélectif telles que les lipases (Calleri et al.

2003), la pénicilline G acylase (Massolini et al. 2003) et la chymotrypsine ont prouvé leur intérêt dans ce type d'application.

b. Les microréacteurs adaptés à des fins catalytiques

Aspect cinétique

Des études (Swarts et al. 2008) ont comparé l'évolution d'une cinétique enzymatique dans un réacteur de taille classique et dans un microréacteur. Elles se basent sur la réaction d'estérification de l'acide propionique et du n-butanol dans une phase eau / n-décane en présence de la lipase B de *Candida antarctica* (Figure 18).

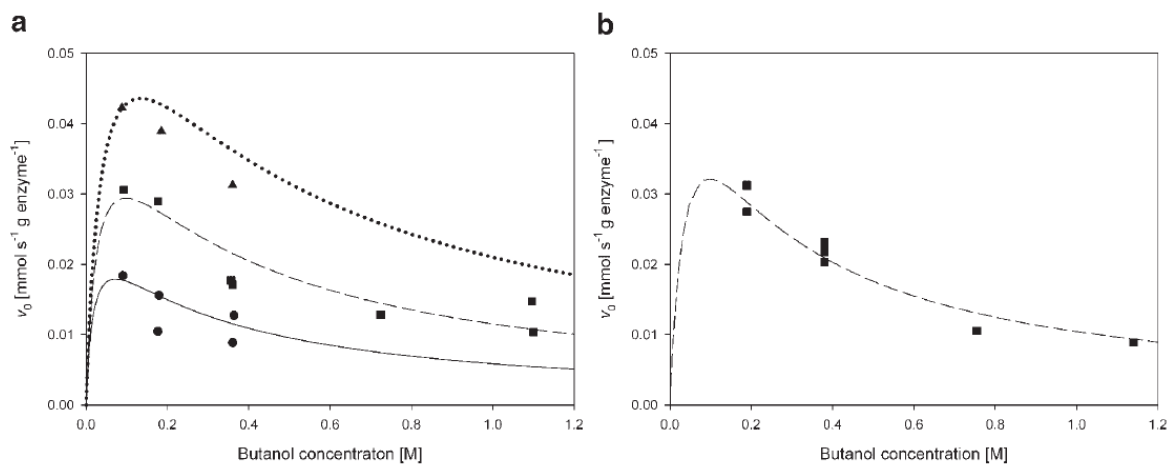


Figure 18 : Représentation graphique de l'activité enzymatique initiale en fonction de la concentration en butanol en microréacteur (a) et en réacteur (b). (résultats expérimentaux pour des concentrations en acide de 0,18 M ● 0,37 M ■ 0,73 M ▲ Schwarz et al. 2009).

L'intervalle de confiance entre les courbes en réacteur classique et en microréacteur étant de 95%, ceci indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les paramètres cinétiques des réactions dans les deux types de réacteurs.

Il est donc possible de mener des études cinétiques sur des microréacteurs afin d'extrapoler les résultats obtenus à des réacteurs batch classiques, tout en économisant les réactifs et le temps de recherche cinétique.

D'autre part, Seong et al. (Seong et al. 2003) ont montré que la valeur de la constante de Michaelis déterminée grâce à un réacteur microfluidique (avec immobilisation de la horseradich peroxidase) est similaire à celle obtenue grâce à une réaction catalytique homogène en réacteur batch.

De plus, les travaux de Urban (Urban et al. 2006) ont montré qu'il est possible de comparer différents biocatalyseurs grâce à l'utilisation d'un microréacteur (Figure 19).

L'étude se base sur le montage expérimental suivant :

- Une seringue en plastique ou en verre de 1 ml + une pompe à seringue
- Un capillaire en silice fondue avec un débit de 0,8 à 20,0 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Un détecteur UV-visible équipé d'une lampe au deutérium réglé pour détecter le changement d'absorbance dans les capillaires du microréacteur.

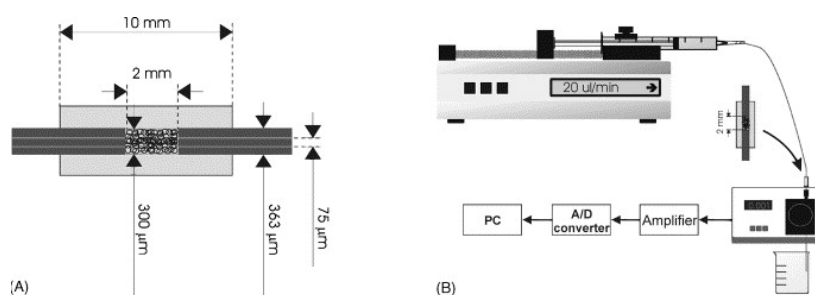


Figure 19 : schéma du microréacteur et du montage expérimental (Urban et al. 2006).

Ce système est appliqué à une étude comparative de quatre lipases immobilisées commerciales sur trois supports différents (céramique, diatomées, résine acrylique) comme décrit dans le tableau 4.

Tableau IV : Liste des 4 enzymes utilisées pour cette étude (Urban et al. 2006).

Lipase	Manufacturer	Species	Support	Activity (u g^{-1})
PS-C I	Amano	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Ceramic particles	≥ 1000
PS-C II	Amano	<i>P. cepacia</i>	Ceramic particles	≥ 600
PS-D I	Amano	<i>P. cepacia</i>	Diatomaceous earth	≥ 500
CA-AR (isoenzyme B)	Novozyme	<i>Candida antarctica</i>	Acrylic resin	≥ 10000

Les quatre lipases immobilisées commercialisées ont été mises en œuvre avec une composition de solution réactive constante (50 %vol. d'isopropanol, 10 %vol. d'acétate de vinyle dans de l'acétonitrile). Les résultats sont présentés dans la figure 20.

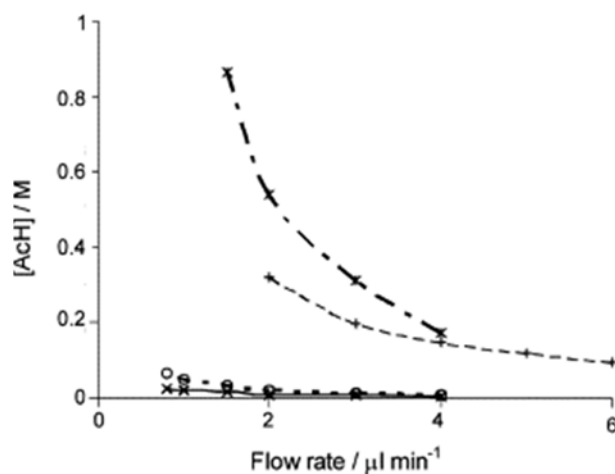


Figure 20 : Comparaison de différentes lipases immobilisées par une analyse en flux continu (substrat: 50 vol.% isopropanol, 10 vol.% vinyl acetate dans de l'acétonitrile). Chaque donnée est une moyenne d'au moins deux données expérimentales. Enzymes testées: ---+--- PS-C I; - -o- - PS-C II; —x— PS-D; —*— CA-AR (Urban et al. 2006)

Cette étude a permis de déterminer que la lipase B de *Candida antarctica* (aussi appelée CAL-B) immobilisée sur une résine acrylique donne les taux de conversion les plus élevés. Il faut noter que cette enzyme présente une très forte activité pour une large gamme d'alcools, tandis qu'elle présente peu ou pas d'activation interfaciale (Kazlauskas et Bornscheuer, 1998). De plus, les rendements de conversion déterminés grâce au montage expérimental sont cohérents avec les activités enzymatiques spécifiées par les fournisseurs.

Sur la base de ces observations, les activités de différentes enzymes immobilisées semblent donc être facilement comparables grâce à un microréacteur. De surcroît, la réduction du temps de préparation à ~5 min et du temps de collecte des données à ~100 sec ainsi que la faible consommation d'enzyme immobilisée ~0,2 mg font de cette méthode un moyen optimal pour la détermination du meilleur biocatalyseur.

Enfin, les récents travaux d'Abdu Halim (Abdul Halim et al. 2013) ont permis de montrer qu'un microréacteur peut être utilisé pour la synthèse enzymatique de molécules complexes nécessitant plusieurs étapes réactionnelles, telles que des molécules chirales (composés ne présentant pas de symétrie intrinsèque).

Un diastéréoisomère intéressant et souvent utilisé dans les synthèses pharmaceutiques est le 2-amino-1.3.4-butanetriol (ABT). Cet amino-alcool chiral peut être synthétisé à partir de substrats achiraux en utilisant deux enzymes : une transkétolase et une transaminase.

Dans un premier temps, les paramètres cinétiques de ces deux enzymes ont été déterminés grâce à un seul microréacteur à lit fixe tel que celui schématisé dans la figure 22. Puis, une série de plusieurs microréacteurs a été utilisée pour permettre la réalisation des différentes étapes de synthèse.

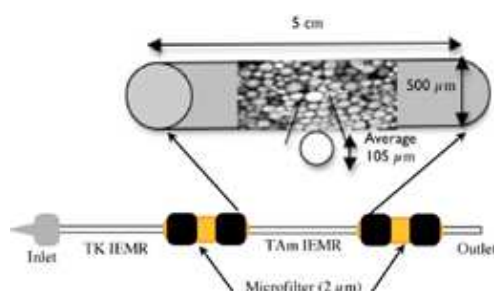


Figure 21 : représentation schématique d'un des microréacteurs utilisés pour la synthèse du 2-amino-1.3.4-butanetriol.

Ce système a ainsi permis la conversion de 83% de substrat en 20 minutes au plus faible débit.

→ En conclusion, un microréacteur semble donc pouvoir synthétiser un grand nombre de composés utilisés dans l'industrie pharmaceutique, et notamment des molécules complexes telles que les molécules chirales.

Aspect intensification

Comme montré précédemment, la cinétique de réaction peut être la même dans un réacteur classique et dans un microréacteur et ainsi permettre l'étude des conditions optimales de réactions à petite échelle. Dans certains cas, ceci n'est plus vrai car il y a un phénomène d'intensification mis en jeu dans le microréacteur qui entraîne une augmentation du taux de conversion de la réaction (Borovinskaya and Reshetilovskii 2011).

En effet, des études (Woodcock et al. 2008) basées sur une réaction d'estérification catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435®) ont montré des cinétiques de réaction différentes d'un réacteur batch à un microréacteur.

La réaction mise en jeu est présentée dans la figure 22 :

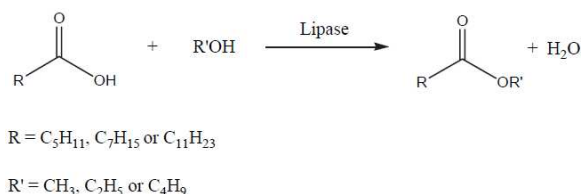


Figure 22 : Estérification enzymatique de différents acides et alcools. Conditions de réaction : 0,2 M dans de l'hexane, 1/1 acide/alcool , débit 1 µL/min (Woodcock et al. 2008).

Le microréacteur est constitué d'un fin capillaire en verre rempli de billes de Novozyme 435® comme le montre la figure 23 :

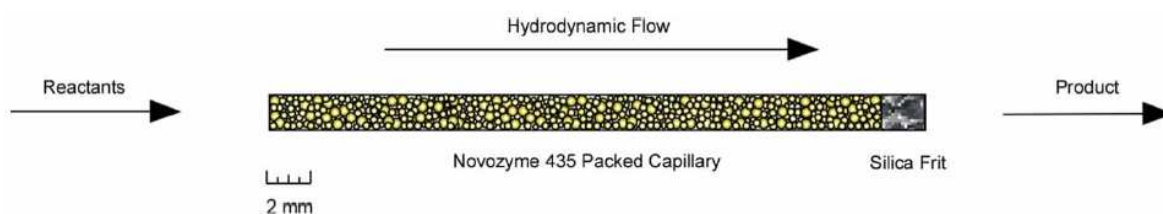


Figure 23 : représentation schématique du microréacteur à lit fixe en régime continu (Woodcock et al. 2008)

La figure 24 montre que la miniaturisation de la réaction d'estérification est avantageuse au niveau de la vitesse de réaction. En effet, après seulement 10 min de réaction, 3,3% d'ester ont été convertis dans le réacteur batch alors que 92,7% ont été convertis dans le microréacteur. Le taux de conversion augmente dans le réacteur batch pour atteindre une valeur de 92,7% aux environs de 70 min de réaction seulement.

De plus, on peut voir que dans le réacteur batch, le taux de conversion diminue après avoir atteint son maximum aux environs de 90 min, phénomène non observé dans le microréacteur. Ceci peut être expliqué par le fait que la réaction produit de l'eau, or la lipase B de *Candida antarctica* catalyse la réaction dans les deux sens. Dans le microréacteur en flux continu, l'eau est continuellement éliminée du système d'où un

temps de contact minimum entre l'eau et le biocatalyseur contrairement au réacteur de type batch.

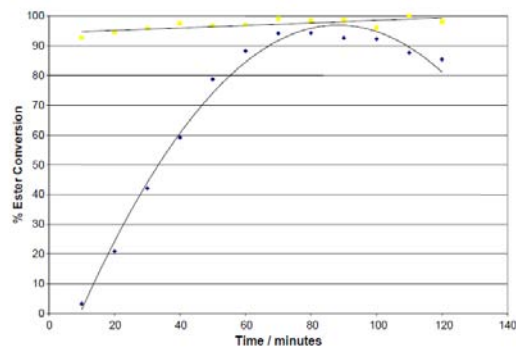


Figure 24: Pourcentage de conversion du butyl hexanoate dans un réacteur batch (losange bleu) et dans un microréacteur en flux continu (carré jaune).

D'autre part, les travaux de Kan-ichi Kanno et al. (Kanno et al. 2002) mettent en évidence que la synthèse enzymatique d'oligosaccharides catalysés par la β -galactosidase est accélérée dans un microréacteur en flux continu comparé à un réacteur batch comme le montre la figure 25. Les auteurs avancent deux hypothèses pour expliquer la différence entre les vitesses de réaction. La première raison peut être la différence du nombre de Reynolds. Il est en effet, connu que la constante de diffusion dans un microréacteur est supérieure à celle dans un réacteur de type batch, car le nombre de Reynolds est plus faible dans un système microstructuré. Ceci suggère que la diffusion des molécules d'enzyme dans le milieu réactionnel est plus rapide dans le microréacteur. D'autre part, la transglycosylation étant la réaction inverse de l'hydrolyse, un solvant organique a été utilisé afin de rendre le milieu le plus anhydre possible et il semble que la réaction inverse d'hydrolyse soit mieux contrôlée et donc moins intense dans le microréacteur....

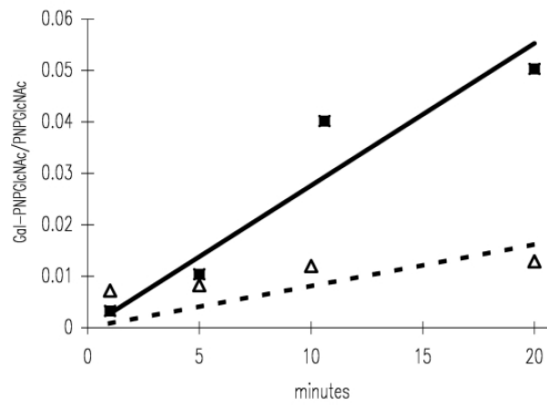


Figure 25 : Transglycosylation du β -D-galactopyranoside : dans un microréacteur (carré) et dans un réacteur batch (triangle) (Kanno et al. 2002).

→ Cette première partie, basée sur l'étude de la littérature, permet de comprendre l'intérêt de l'acylation des peptides pour améliorer leur performance et donc leur potentiel thérapeutique. De plus, au vu du caractère éco-efficace des synthèses catalysées par des enzymes, le développement de procédés d'acylation en microréacteurs semble être une voie d'avenir pour l'industrie pharmaceutique.

Mon projet se base donc sur ces données afin d'étudier l'influence de l'utilisation d'un microréacteur sur la réaction d'acylation par biocatalyse d'une molécule modèle bi-fonctionnelle.

IV. Matériel et méthodes

1. Biocatalyseur

Le biocatalyseur utilisé est une préparation industrielle produite par Novozyme Corporation et commercialisée par Sigma : Novozym 435®. Il est issu de l'immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica* sur une résine acrylique macroporeuse et se présente sous la forme de granules blanches dont le diamètre est compris entre 0,3 et 0,9 mm. Ainsi préparée, l'enzyme fournit une activité de 7000 PLU.g⁻¹ (Propyl Laurate Synthesis) où une unité PLU est définie comme la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'1 µmol d'acide laurique en laurate de propyle par minute dans des conditions standards et équimolaires. Sa teneur en eau est de 1 à 2% (p/p) et sa teneur en protéine enzymatique est comprise entre 1 et 10%.

2. Réactifs

Le substrat à acyler est le 6-amino-1-hexanol ($M = 117,19 \text{ g.mol}^{-1}$) de la société Sigma-Aldrich et dont la pureté est de 97%.

L'agent acylant est quant à lui, l'oléate d'éthyle ($M=310,53 \text{ g.mol}^{-1}$) de la société Sigma-Aldrich et dont la pureté est de 98%.

Le milieu réactionnel est composé de 2-méthyl-2-butanol (M_2B_2) de la société Carlo Erba et dont la pureté est compatible avec une utilisation en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).

3. Méthodes d'analyses

a. Analyses qualitative par chromatographie sur couche mince

Toutes les réactions mises en œuvre ont tout d'abord été analysées par chromatographie sur couche mince. Les plaques de silice utilisées sont des plaques

Silica gel 60® de la société Merck. Les dépôts de prélèvements réactionnels effectués ont un volume de 5 µl.

L'éluant utilisé est un mélange de butanol/acide acétique/eau à 60% / 20% / 20%. Cet éluant permet de séparer les substrats polaires et leurs dérivés monoacylés.

La révélation s'effectue par pulvérisation d'une solution éthanolique de Ninhydrine à 0,1 % (de la société Fluka). Cette solution réagit spécifiquement avec les fonctions amines primaires et conduit à l'apparition d'un chromophore violet après 5 minutes à 110 °C.

b. Séparation et analyse quantitative par chromatographie liquide haute performance

Principe

Les échantillons sont, dans un premier temps, analysés par spectroscopie UV à 214 nm puis par CAD « charged aerosol detector ». Ces méthodes permettent de séparer et de quantifier l'oléate d'éthyle et l'acide oléique.

Un détecteur CAD est composé de plusieurs étapes (Figure 26) :

- Nébulisation et séchage de la phase mobile grâce à un courant de gaz inerte (azote)
- Une autre partie du flux de gaz inerte se charge positivement
- Au contact de l'azote chargé, les particules qui étaient présentes dans la phase mobile se chargent d'une seule charge
- Détermination de la charge des particules par un électromètre

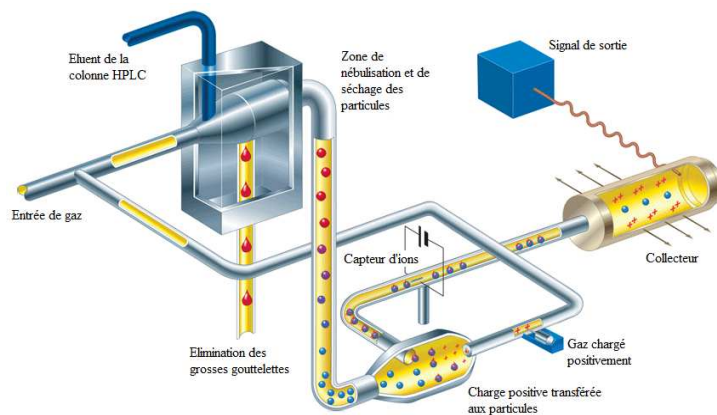


Figure 26 : Schéma d'un détecteur CAD

Description de la chaîne utilisée

Le système CLHP utilisé est une chaîne Shimadzu UFLC équipée de :

- Une colonne ALLtima HP C18 « amide » munie d'une précolonne Alltima HP C18 « amide »
- Un four de colonne CTO-10 AC
- Un injecteur automatique d'échantillon SIL-20 AC HT
- Une pompe LC-20 AD
- Un détecteur UV à barrette de diode SPD-M20 A
- Un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogrammes « LC solution soft »

Une méthode de chromatographie liquide haute performance par gradient a été utilisée pour séparer les différents constituants du milieu de synthèse à une température de 25°C avec un débit d'élution de 0,2 mL/mn pour un volume injecté de 10µL. La colonne utilisée est une colonne ALLtima HP C18 « amide » 5µ 150 mm x 2.1 mm de Grace Davison Discovery Sciences. Elle permet de séparer les composés grâce à des interactions hydrophobes et des interactions avec les groupes amides insérés dans la phase stationnaire.

Pour chaque analyse, le débit de phase mobile suit le profil présenté dans la figure 27:

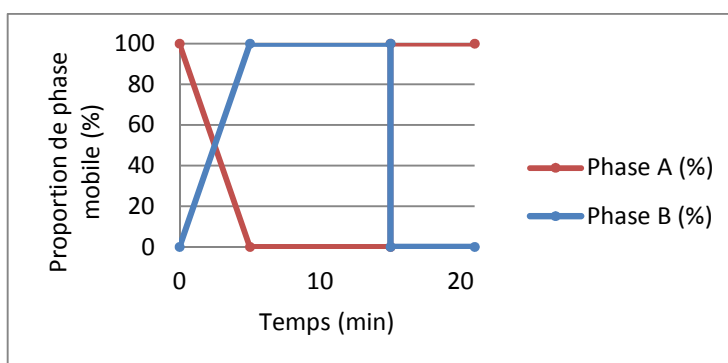


Figure 27 : Gradient utilisé pour l'HPLC. Phase A: Methanol/eau/TFA 80/20/0,1 v/v/v, Phase B : methanol/TFA 100/0,1 v/v.

Cette technique permet de doser l'acide oléique et l'oléate d'éthyle dans l'UV à 214 nm. Les courbes de calibration respectives des deux composés sont présentées figure 28.

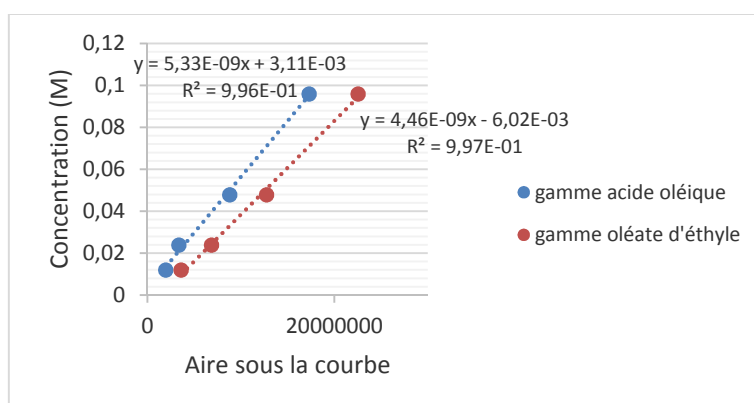


Figure 28 : Courbes de calibration pour le dosage HPLC avec détection UV à 214 nm de l'acide oléique et de l'oléate d'éthyle.

c. Séparation et analyse semi-quantitative par spectrométrie de masse

Principe

Le fonctionnement d'un spectromètre de masse est basé sur la séparation de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge par l'application et le balayage d'un champ magnétique. Une étape d'ionisation de l'échantillon à l'état gazeux est donc nécessaire. Le plus souvent, cette étape est précédée d'une étape

de séparation réalisée grâce à une technique chromatographique, comme dans notre cas, ou électrophorétique. Ainsi, l'espèce à l'origine du pic chromatographique peut être identifiée par couplage de ces deux méthodes.

Le spectromètre de masse utilisé en mode fragmentation permet d'analyser l'échantillon en deux étapes. Une première étape d'ionisation permet de former des ions à partir de la solution initialement injectée dans le système. Parmi ces ions, les ions d'intérêt sont sélectionnés grâce à leur rapport masse/charge (m/z) et analysés : ces ions sont appelés ions parents et l'on parle d'analyses MS. Dans un deuxième temps, les ions sélectionnés précédemment sont fragmentés dans une chambre de collision afin de former des ions fils qui sont à leur tour analysés par mesure de leur rapport m/z (Figure 29). On parle cette fois d'analyses MS-MS ou MS². La fragmentation peut être obtenue soit directement dans le cas de l'ionisation par bombardement électronique, soit par collision des ions sélectionnés en masse avec un gaz neutre (Bouchoux and Sablier 2005).

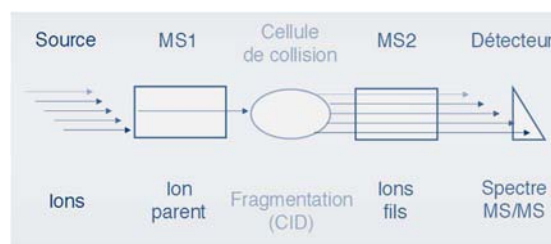


Figure 29 : représentation d'un spectromètre de masse en mode fragmentation

Dans notre cas, l'ionisation s'effectue grâce à l'électronébulisation électrospray. C'est une technique basée sur la formation d'un nébulisat contenant des ions solvatés à la sortie d'un tube capillaire (Figure 30).

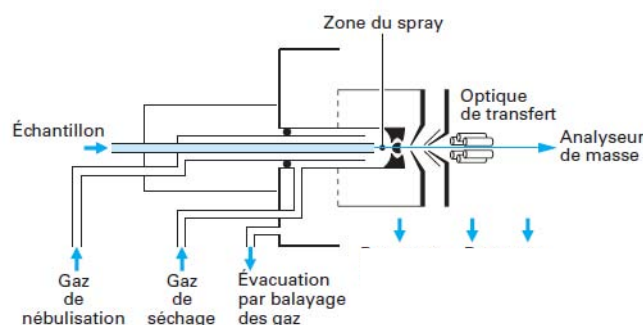


Figure 30 : représentation schématique d'une source d'électronébulisation (Bouchoux and Sablier 2005).

Un champ électrique est établi pour permettre l'entrée du soluté à analyser. Ce champ électrique intense charge les gouttelettes de liquide qui se forment à la sortie du capillaire. Dans le même temps, le solvant contenu dans ces gouttelettes est évaporé par collisions avec un gaz inerte. Au fur et à mesure de cette évaporation, la taille des gouttelettes diminue, augmentant ainsi la répulsion électrostatique entre charges de même signe. Lorsque cette répulsion électrostatique devient supérieure aux forces de tension superficielle, la gouttelette se divise en gouttelettes de plus petites tailles et le processus peut se reproduire jusqu'à formation d'ions totalement désolvatés. Une partie de ces ions est alors extraite et introduite dans l'analyseur du spectromètre de masse (Bouchoux and Sablier 2005) (Figure 31).

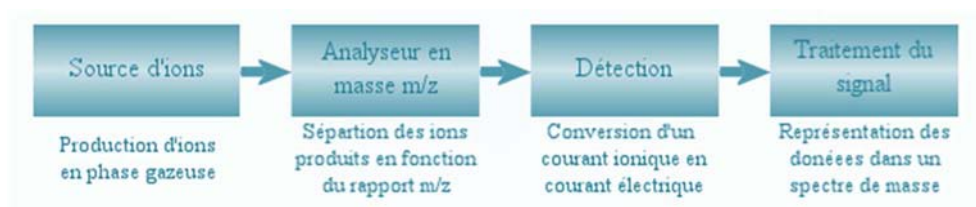


Figure 31 : schéma général d'un spectromètre de masse

Description de la chaîne de couplage HPLC-MS

Le système d'analyse utilisé est composé d'une chaîne HPLC Surveyor® du fabricant Thermo Fisher Scientific avec :

- une pompe Surveyor MS® : pompe spécialement conçue pour la LC/MS
- un passeur automatique d'échantillons Surveyor plus®.

Il comporte également un détecteur N°1 : Spectromètre de masse (LTQ) composé :

- d'une source API : Atmospheric pressure ionization, Haute Performance universelle « Ion Max »
- d'une source ESI : sonde électrospray.
- d'un détecteur de masses : à ions positifs et négatifs
- d'un système de pompage pour le système LTQ

Ainsi qu'un détecteur N°2 : CAD (Charge Aerosol Detector)

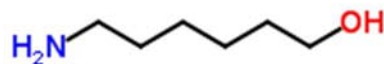
L'exploitation des données se fait grâce au logiciel Xcalibur v. 2.1

Remarque : Les échantillons ont été dilués, dans un premier temps, dans un mélange méthanol/eau 80/20 v/v (correspondant à la phase A) lors de leur préparation pour analyse mais il s'est avéré que la présence d'eau perturbait la réponse. Il a alors été décidé de préparer les échantillons dans du méthanol pur (correspondant à la phase B).

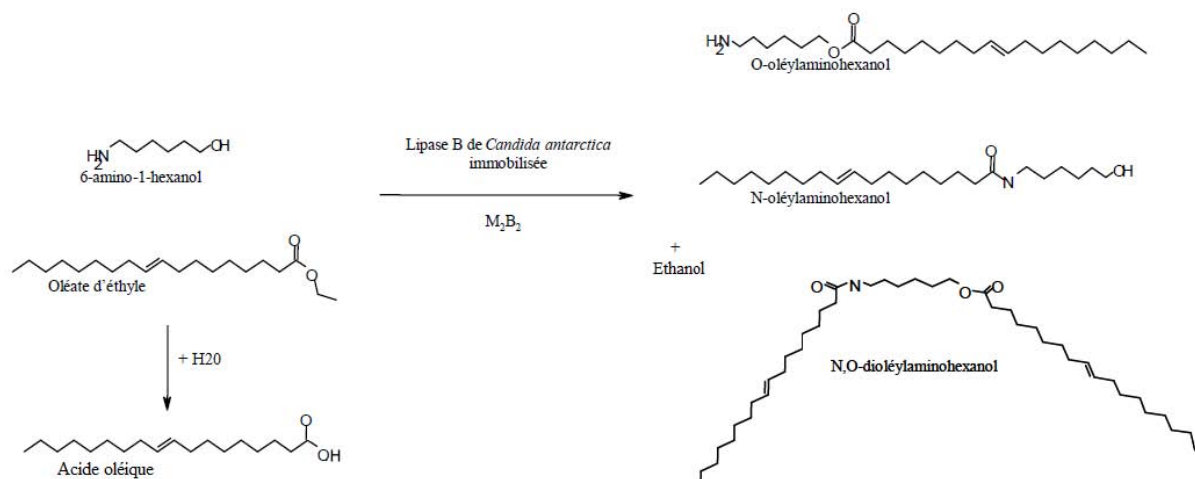
4. Réaction mise en jeu

Généralités

L'objectif de ce projet est d'étudier l'acylation de la molécule bifonctionnelle, le 6-amino-1-hexanol dont la structure moléculaire est la suivante :



La structure particulière de cette molécule entraîne soit une O et/ou N-acylation comme illustré ci-après:



Une préparation commerciale de la lipase B de *Candida antarctica* a été utilisée car la capacité de cette enzyme à catalyser la réaction de N et O-acylation du 6-amino-1-hexanol a largement été illustrée dans la littérature.

La mise en œuvre de cette réaction a été effectuée suivant 4 montages expérimentaux différents : 2 montages comprenant un réacteur agité avec des systèmes d'agitation différents et 2 montages basés sur l'utilisation d'un réacteur de type piston.

Le choix des conditions opératoires utilisées dans cette étude se base sur des travaux réalisés précédemment au laboratoire LRGP (Husson 2008). Ainsi, il a été choisi de mettre en œuvre un procédé d'acylation du 6-amino-1-hexanol dans du 2-méthyl-2-butanol à 37°C sous agitation en présence d'oléate d'éthyle comme agent acylant et de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozyme 435®). Il a été vérifié qu'aucune réaction ne se produisait en l'absence du biocatalyseur.

Pour chaque réaction, les composés ont été introduits dans les quantités suivantes :

Composé	Concentration
6-amino-1-hexanol	0,12 mol/L
Oléate d'éthyle	0,24 mol/L

Le suivi de la réaction a été réalisé par l'analyse d'échantillons prélevés directement dans le milieu réactionnel au cours de temps ou par recueil en continu à la sortie du microréacteur. Une première étape analytique qualitative a été réalisée par chromatographie sur couche mince puis une analyse par chromatographie liquide haute performance et par spectroscopie de masse ont été réalisées.

Etudes précédentes

Cette réaction a déjà fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques dont notamment ceux menés par E. Husson (Husson 2008) au sein du laboratoire dans lequel j'ai travaillé.

Ces travaux ont permis dans un premier temps de définir le rapport molaire aminohexanol / donneur d'acyle (oléate d'éthyle) optimal. Un rapport 0,12M / 0,24 M permet ainsi d'obtenir un bon taux de conversion tout en évitant l'utilisation d'un large excès d'oléate d'éthyle (Figure 32).

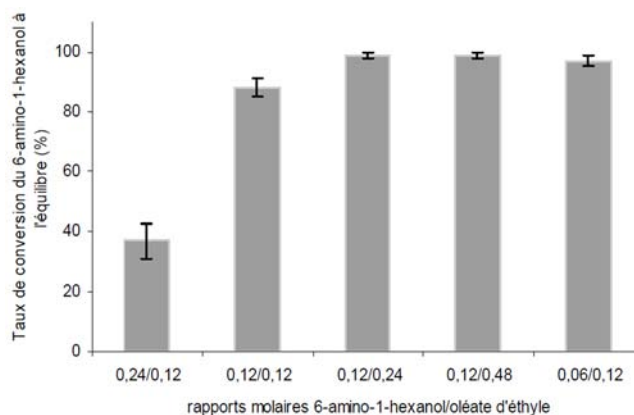


Figure 32 : Influence du rapport molaire 6-amino-1-hexanol/oléate d'éthyle sur le taux de conversion du 6-amino-1-hexanol à l'équilibre lors de la réaction de trans-acylation catalysée par Novozym 435® dans le M2B2 à 55°C en réacteur Wheaton® (Husson 2008).

Ce rapport permet également de maintenir une proportion importante de molécules d'acide gras sous forme carboxylique et ainsi de conserver un bon rendement de réaction. En effet, lorsqu'un substrat aminé et un acide gras libre sont mis en présence, comme dans le cas de la réaction étudiée, il peut y avoir formation d'un complexe d'ions par modification de l'état d'ionisation des composés. Ce complexe diminue donc la proportion de donneur d'acyle disponible dans le milieu et entraîne donc un taux de conversion plus faible.

L'influence du milieu réactionnel sur les performances et la sélectivité de cette réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique en présence de CAL B a également été étudiée par E. Husson (Husson 2008).

Cette étude a montré que l'acylation enzymatique d'une molécule bi fonctionnelle telle que le 6-amino-1-hexanol par la lipase B de *Candida Antarctica* en solvant organique n'est pas chimiosélective et entraîne majoritairement la formation du composé N,O-diacylé. Par contre, la mise en œuvre de cette même réaction dans un milieu fondu composé d'acides gras libres favorise la formation du composé O-acylé. En outre, lorsque le milieu fondu est composé d'esters d'acides gras libres, il y a également absence de sélectivité comme dans le cas du milieu solvant organique. De plus, des

études ont été menées en remplaçant le solvant organique par différents liquides ioniques. Ceci a permis de mettre en évidence que certains liquides ioniques sont plus adéquats pour améliorer l'efficacité de cette réaction, tels que ceux de type 1-butyl-3-méthylimidazolium à anions faiblement nucléophiles. En effet, ils permettent d'obtenir des vitesses initiales de réaction plus élevées et un taux de conversion supérieur à 90% après 25h de réaction contrairement à 70h dans un milieu solvant organique (tableau V). Un dernier milieu réactionnel testé composé de CO₂ supercritique a permis d'orienter la chimiosélectivité de la réaction en faveur de la O-acylation tout en améliorant les performances cinétiques de la réaction.

Tableau V: Sélectivité et efficacité de la O et/ou N,O-diacylation du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique dans différents milieux. La réaction a été réalisée dans un réacteur Syncore® à 55°C et a été catalysée par Novozym 435®. La durée de la réaction et le taux de conversion des substrats correspondent à l'état d'équilibre (Husson 2008).

Reaction Media	Selectivity (%)		Reaction duration (h)	6-Amino-1-hexanol conversion (%)
	O-acylation	N,O-acylation		
2-Methyl-2-butanol	7.9	92.1	70	86 ± 5
Hexane	1.2	98.8	70	69 ± 3
Solvent-free system (oleic acid)	91.5	8.5	25	99 ± 1
Solvent-free system (ethyl oleate)	2.5	97.5	50	98 ± 2
[Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	13.3	86.7	25	92 ± 2
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	2.7	97.3	25	97 ± 2

Ces travaux ont également permis de mettre en évidence que la réaction semble se dérouler en deux étapes, avec dans un premier temps, une mono-acylation en O suivie d'une di-acylation de la molécule. Lors de ces travaux, l'acylation en N du 6-amino-1-hexanol n'avait pas été observée.

D'autres travaux menés par Le Joubioux (Le Joubioux et al. 2013), ont permis de montrer que la lipase B de *Candida antarctica* peut catalyser la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en N et en O. Toutefois, il y a une importante différence de cinétique entre ces deux réactions. En effet, la N-acylation du 6-amino-1-hexanol

présente une vitesse de réaction maximale 10 fois inférieure à celle de la O-acylation soit une $v_{\max,app}$ de O-acylation de $10,1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ et une $v_{\max,app}$ de N-acylation de $1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

De plus, une étude a été menée par E. Husson afin d'obtenir la synthèse sélective du composé N-acylé à partir de l'hydrolyse du composé N,O-diacylé par la réaction inverse à celle souhaitée. Une réhydratation du milieu réactionnel a donc été mise en place, en fin d'expérience, afin d'orienter la réaction catalytique dans le sens inverse mais aucune hydrolyse n'a été observée. Ceci prouve l'incapacité de la lipase B de *Candida antarctica* à catalyser l'hydrolyse de la liaison ester du composé diacylé. La formation du composé diacylé peut ainsi être considérée comme une réaction irréversible (figure 33).

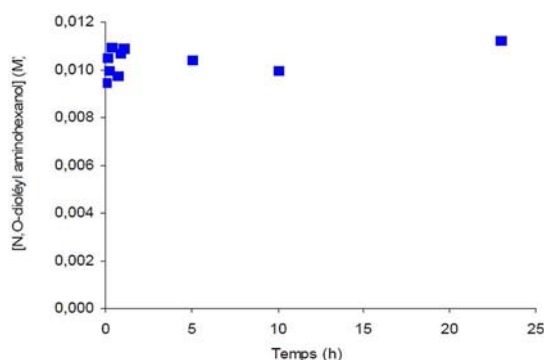


Figure 33 : Suivi cinétique relatif à la réaction enzymatique d'hydrolyse du N,O-dioléyl amino hexanol par Novozym 435® à 55°C dans un mélange M2B2/eau (86/14, v/v) (Husson 2008).

Enfin, l'influence du système d'agitation a également été étudiée. Cette étude a permis de comparer un réacteur Wheaton® (agitation mécanique par une pale magnétique) et un réacteur Syncore® (agitation orbitale). Les vitesses de disparition des substrats se sont révélées beaucoup plus élevées dans le réacteur Wheaton et le taux de conversion meilleur au bout d'un temps plus court. Le procédé d'acylation paraît donc être ralenti dans le réacteur Syncore® où le transfert de matière est moins efficace.

Ces études n'ont pas abordé l'influence de différentes agitations mécaniques telles que le barreau magnétique ou la pale sur la sélectivité, ni sur les performances réactionnelles. De même, l'impact du type d'écoulement (agité ou piston) n'a pas non plus été étudié.

5. Mise en œuvre de la réaction d'acylation en réacteur agité

Pour cela, 2 types de réacteurs ont été mis en jeu :

- a) un réacteur agité par un barreau magnétique,
- b) un réacteur Wheaton agité par une pâle magnétique.

a. Expérience en réacteur agité par barreau magnétique

La réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol a été réalisée dans un réacteur agité par un barreau magnétique. Ce réacteur est chauffé par une plaque chauffante thermorégulée (IKA) à 37°C par l'intermédiaire d'un bain d'huile thermostaté (figure 34). Le milieu réactionnel est composé de 5 mL de M2B2, 428 μ L d'oléate d'éthyle et de 0,0702 g de 6-amino-1-hexanol. A ce milieu réactionnel 200 mg d'enzyme immobilisée ont été ajoutés.

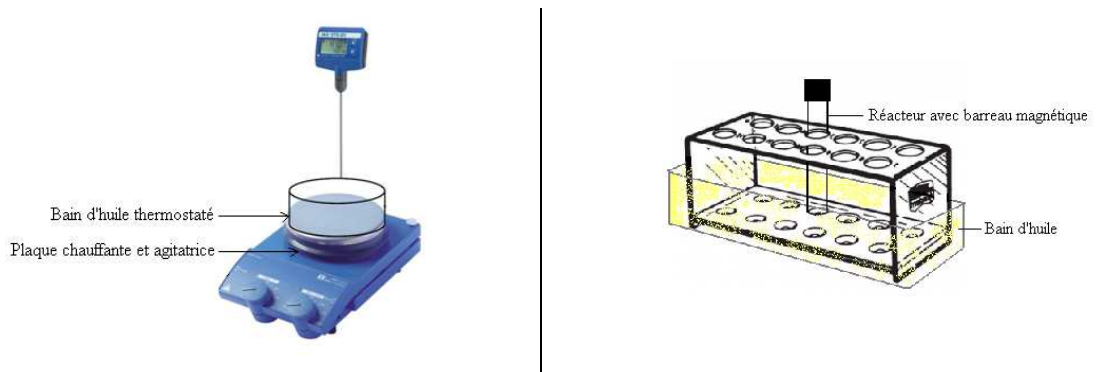
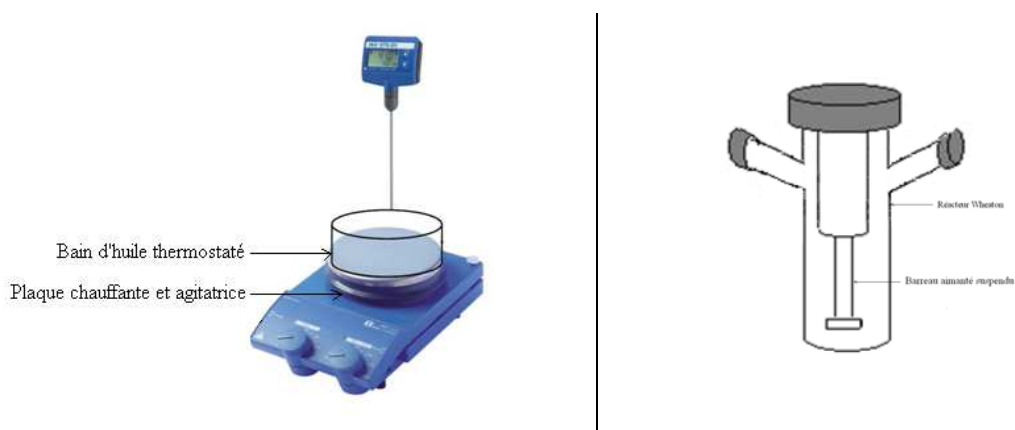


Figure 34 : Schéma du réacteur agité utilisé pour la mise en œuvre de la réaction d'acylation.

b. Expérience en réacteur agité Wheaton

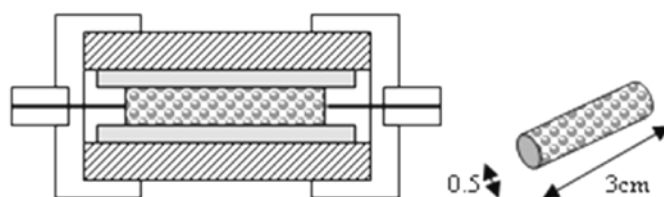
L'acylation du 6-amino-1-hexanol a été réalisée dans un réacteur Wheaton d'une capacité de 50 mL. Le réacteur est équipé d'un barreau aimanté suspendu qui évite l'érosion des billes d'enzymes au cours des synthèses. Il est chauffé par une plaque chauffante thermorégulée (IKA) à 37°C par l'intermédiaire d'un bain d'huile thermostaté (figure 35). Pour permettre la comparaison des différents modes

d'agitation le milieu réactionnel est le même que pour le réacteur agité par un barreau magnétique.



6. Mise en œuvre de la réaction d'acylation en réacteur type piston

Dans un troisième temps, la réaction a été effectuée dans un microréacteur à lit fixe en circuit fermé. Le microréacteur utilisé est un réacteur artisanal de 0,5 cm de diamètre et 3 cm de long soit un volume à vide de 500 μL et un volume rempli de 235 μL . Il est fermé par deux bouchons de téflon percés d'un faible diamètre. Le tout est inséré dans un système en inox assurant l'étanchéité de l'ensemble.



Le microréacteur est maintenu à 37 °C, durant toute l'expérience, grâce à un four de colonne HPLC. Le milieu réactionnel est quant à lui, agité en permanence grâce à un barreau magnétique et est à température ambiante.

Dans un premier temps, le microréacteur a été alimenté grâce à une pompe péristaltique (figure 37) puis celle-ci a été remplacée par une pompe à engrenages qui permet d'assurer un meilleur contrôle du débit d'entrée dans le réacteur.

Le premier montage expérimental étudié est composé comme schématisé figure 37 :

- d'une pompe péristaltique Watson Marlow 120U® réglée à 1 rpm (rotation par minute) avec une précision de $\pm 1\%$,
- d'un tuyau d'alimentation en Marprène/Bioprène certifié de 0,5 mm de diamètre de la société Watson Marlow.



Figure 36 : Représentation de la pompe péristaltique Watson Marlow 120U

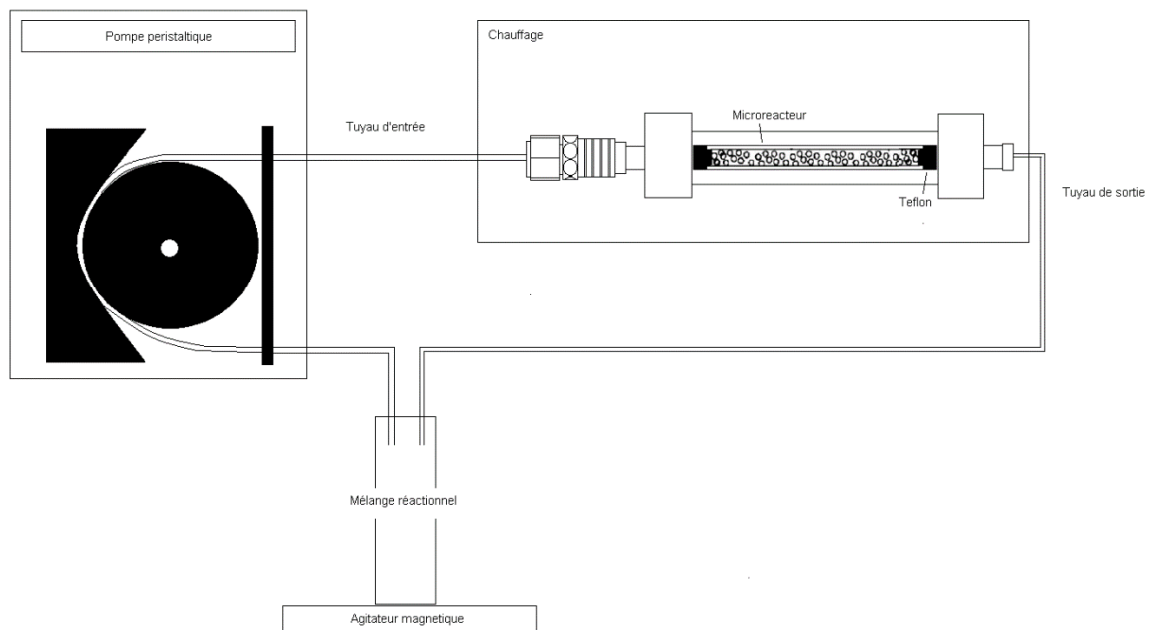


Figure 37 : schéma du montage expérimental avec pompe péristaltique

Dans un second temps, une pompe à engrenage mZR-2542[®] de la société HNP Mikrosysteme GmbH, dont le mécanisme d'action diffère de celui précédemment utilisé, a été mise en place. C'est une pompe volumétrique rotative constituée d'un rotor externe à engrenages internes et d'un rotor interne à engrenages externes, les rotors étant légèrement excentrés l'un par rapport à l'autre (figure 39). Par la rotation des rotors autour de leur axe déplacé, les engrenements s'agrandissent du côté du refoulement. Un débit homogène et constant est généré entre les orifices d'admission et de refoulement.

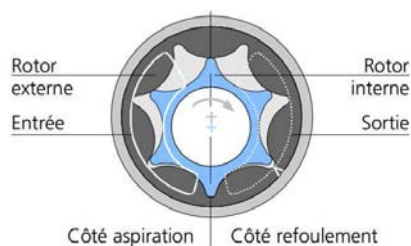


Figure 38 : Schéma de principe d'une pompe à engrenage

Enfin, afin d'étudier l'influence du débit sur la cinétique réactionnelle, le montage précédent contenant le microréacteur et la pompe à engrenages a été utilisé. Différents débits entre 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 115 $\mu\text{L}/\text{min}$ ont été instaurés et un prélèvement en continu à la sortie du microréacteur a été fait toutes les 5 minutes.

7. Modélisation de la cinétique réactionnelle

Les résultats obtenus suite à l'étude de l'influence du débit sur la cinétique de la réaction ont permis d'établir une modélisation de la cinétique réactionnelle grâce au logiciel Matlab. Cette modélisation est basée sur les travaux d'Eric Husson réalisés sur la même réaction enzymatique dans un réacteur parfaitement agité (Husson et al. 2010).

Selon la littérature et les travaux réalisés par Eric Husson (Husson et al. 2010), un modèle bi-bi ping-pong a été choisi pour modéliser la cinétique réactionnelle.

V. Résultats

1. Réaction d'acylation en réacteur agité

Dans cette première partie, la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'oléate d'éthyle comme agent acylant dans du 2-méthyl-2-butanol a été réalisée en réacteur agité classique afin d'identifier les produits.

Les réactions en réacteur agité par un barreau magnétique et dans le réacteur Wheaton ont été menées en simultanément pendant 48h afin d'avoir les mêmes conditions environnementales et de permettre une véritable comparaison des systèmes.

Les prélèvements effectués sont dans un premier temps analysés par une méthode qualitative : la chromatographie sur couche mince (CCM) afin de mettre en évidence la synthèse d'un ou de plusieurs produits.

En réacteur agité, quel que soit le type d'agitation, l'allure des CCM (figure 39) obtenus grâce aux prélèvements réactionnels effectués est similaire.

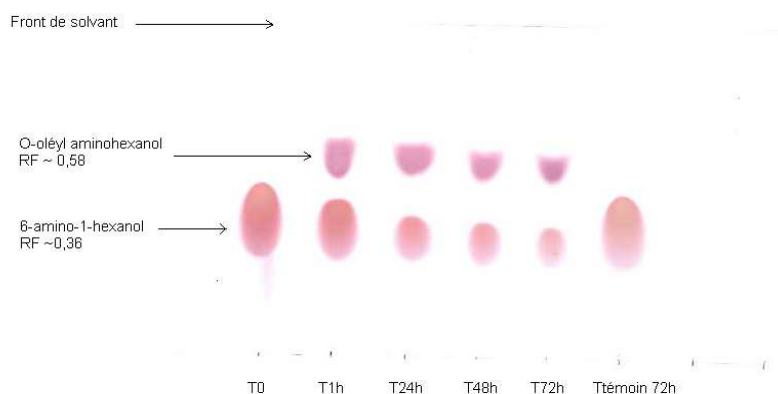


Figure 39 : Exemple de chromatographie sur couche mince réalisé à partir d'une expérience en réacteur agité par un barreau magnétique. Le témoin étant un réacteur lancé dans les mêmes conditions que le réacteur expérimental mais ne contenant pas d'enzyme.

Ainsi, il est possible de mettre en évidence la formation d'au moins un produit de réaction dès la première heure et qui avec un rapport frontal de 0,6 correspond au O-oléyl aminohexanol (seul produit possédant une fonction amine primaire libre pouvant être révélée par la ninhydrine).

Pour vérifier la formation éventuelle d'autres produits tels que le N-oléyl aminohexanol et le di-oléyl aminohexanol, des analyses par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse ont été réalisées.

L'analyse par spectrométrie de masse montre la formation d'une molécule d'une masse molaire de 646.5 g/mol correspondant au produit di-acylé. La fragmentation de cette molécule permet de retrouver la molécule mono-acylé de 382.3 g/mol.

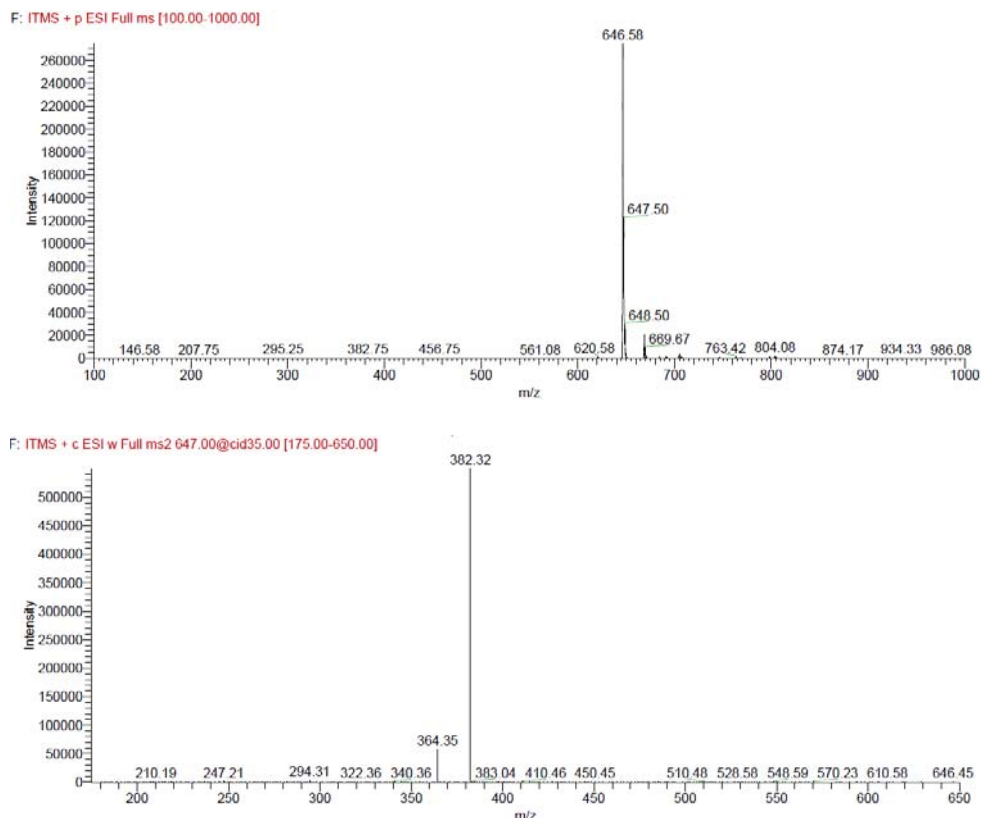


Figure 40 : Spectre de masse observé sur un prélèvement effectué en réacteur agité par un barreau magnétique.

De plus, le chromatogramme suivant montre la synthèse de 3 produits majeurs ayant des temps de rétention de 6.45, 7.71 et 12.27 min.

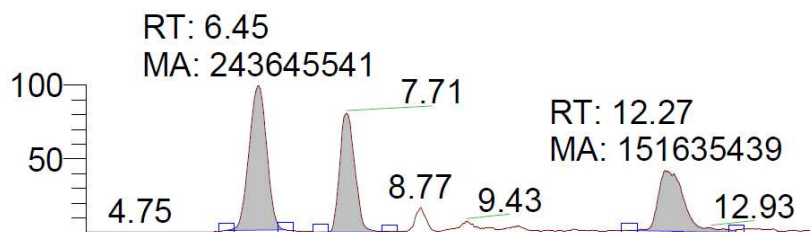


Figure 41 : Chromatogramme avec détection MS des produits obtenus lors de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle dans du M2B2 en réacteur agité par un barreau magnétique après 48h d'expérience (exp2).

Ces analyses ont ainsi permis de révéler la formation de deux composés mono acylés de masse molaire 382,6 g/mol qui ont des temps de rétention d'environ 6.45 min et 7.7 min. Ainsi, les conditions réactionnelles ont permis la formation d'un composé O-acylé comme lors des expériences de E.Husson (Husson 2008) mais également celle d'un composé N-acylé ce qui est en accord avec d'autres travaux (Le Joubioux et al. 2013). De plus, on observe la présence d'un composé diacylé de masse molaire 646 g/mol qui a un temps de rétention d'environ 12.3 min.

Dans un deuxième temps, les analyses par spectrométrie de masse ont permis une détermination semi-quantitative des échantillons par évaluation des aires sous la courbe. Les valeurs sont données dans le tableau ci-après.

En effet, les résultats obtenus par la méthode spectrométrie par détection MS peuvent être utilisés pour comparer les deux produits mono-acylés entre eux mais ne permet pas de les comparer au produit di-acylé qui présente une réponse différente.

Tableau VI : Valeur des aires sous la courbe définies par spectrométrie de masse sur des prélèvements de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol et de l'éthyle oléate en présence de M2B2.

		Réacteur agité par barreau magnétique				Réacteur Wheaton			
		expérience1		expérience2		expérience1		expérience2	
		1h	24h	1h	48h	1h	24h	1h	48h
LC-MS Aire sous la courbe (x10 ⁶)	mono-acylé 1	27,3	23,2	26,1	24,9	14,8	13,1	19,6	12,9
	mono-acylé 2	9,04	22,1	8,84	17,1	5,89	14,2	9,7	13,5
	di-acylé	6,69	14,1	8,82	13,7	2,8	9,48	8,76	11,2

Cette étude a permis de mettre en évidence une différence dans la cinétique de réaction des trois produits. En effet, le premier mono-acylé voit son aire sous la courbe diminuer entre le temps 1h et le temps 24h ou 48h (en fonction de l'expérience) alors que celle du deuxième mono-acylé et du di-acylé augmente au cours du temps. Le premier mono-acylé ayant, de surcroit, une aire sous la courbe beaucoup plus importante que celle du 2ème mono-acylé après 1h de réaction, on peut faire l'hypothèse qu'il correspond au composé O-acylé. En effet, si l'on se base sur les travaux de Joubioux (Le Joubioux et al. 2013), qui ont montré que la vitesse maximale apparente de la réaction de O-acylation est 10 fois plus importante que celle de la N-acylation, cette hypothèse semble cohérente. De plus, les travaux d' Husson (Husson

2008) montre qu'il y a une consommation du produit O-acylé formé pour produire le composé di-acylé d'où la diminution du composé mono-acylé 1 après 24 ou 48h de réaction. La vitesse de formation du composé mono-acylé 2 étant plus faible, sa consommation pour former le composé di-acylé se produira probablement après des temps de réaction beaucoup plus importants.

Par ailleurs, des analyses par chromatographie liquide haute performance des échantillons ont permis de quantifier les performances réactionnelles et de calculer les taux de conversion de la réaction d'acylation dans les différents réacteurs en fonction du temps.

Dans un premier temps, le tracé de l'évolution des concentrations en acide oléique et en oléate d'éthyle en fonction du temps (figure suivante) permet de confirmer que l'éthyle oléate est bien consommé et que la réaction inverse d'hydrolyse est non négligeable.

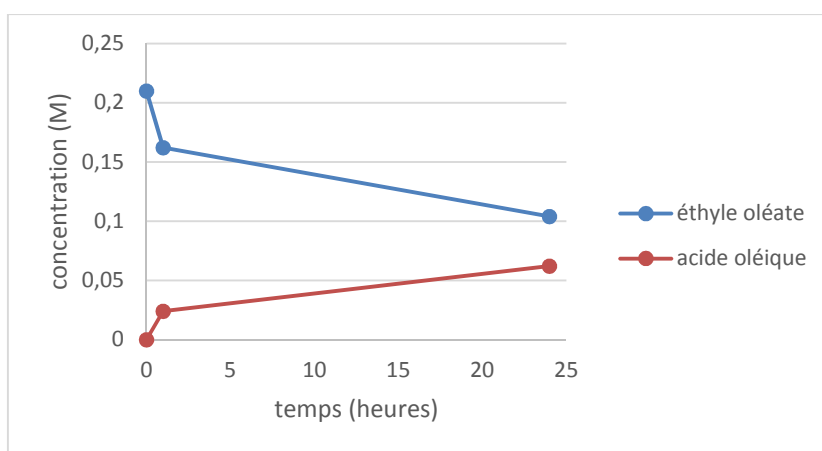


Figure 42 : Cinétique de conversion de l'oléate d'éthyle et de synthèse d'acide oléique présente dans un réacteur agité par barreau magnétique.

Dans un second temps, les taux de conversion de la réaction ont été calculés selon la formule suivante :

$$T_{global} = \frac{[oleate\ d'ethyle]_i - [oleate\ d'ethyle]_t}{[oleate\ d'ethyle]_i}$$

$$T_{synth} = \frac{([oleate\ d'ethyle]_i - [oleate\ d'ethyle]_t) - [acide\ oleique]_t}{[oleate\ d'ethyle]_i}$$

Avec « i » correspondant à la concentration au temps initiale et « t » à celle après un temps d'expérience. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau VII : Taux de conversion de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol et de l'éthyle oléate en présence de M2B2. Ces taux de conversion sont des taux globaux qui prennent en compte la réaction inverse d'hydrolyse.

	Taux de conversion global (%)		Taux de conversion de la réaction de synthèse (%)	
	Temps		Temps	
	1h	24h	1h	24h
Réacteur Wheaton-1	46	73	29	30
Réacteur Wheaton-2	65	68	0	1
Réacteur agité par un barreau-1	23	50	11	21
Réacteur agité par un barreau-2	46	73	37	38

Les taux de conversion observés lors de ces différentes expériences présentent une certaine disparité notamment si l'on compare le taux de conversion d'une réaction effectué dans le même dispositif expérimental et à un temps d'expérience identique. Il est toutefois possible de conclure que les résultats ne permettent pas de différencier les deux modes d'agitation étudiés (agitation par un barreau magnétique et agitation par une pale magnétique). La réaction d'acylation et la réaction inverse d'hydrolyse semblent donc se dérouler avec la même intensité dans les deux réacteurs agités.

2. Réaction d'acylation en réacteur de type piston

a. Réacteur en boucle fermé

Dans cette première partie, la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'oléate d'éthyle comme agent acylant dans du 2-méthyl-2-butanol a été réalisée en réacteur

piston. Elle a été conduite sur une durée maximale de 6h, en boucle fermée afin de se rapprocher des conditions des réacteurs agités dans lesquels les produits ne sont pas soutirés au cours de la réaction.

Comme précédemment, une chromatographie sur couche mince est réalisée sur chaque expérience afin de vérifier son bon déroulement. Les prélèvements ont été effectués tout au long de la réaction dans le milieu réactionnel. L'allure des CCM obtenus grâce aux prélèvements effectués est similaire à celle obtenue lors de l'étude en réacteur agité.

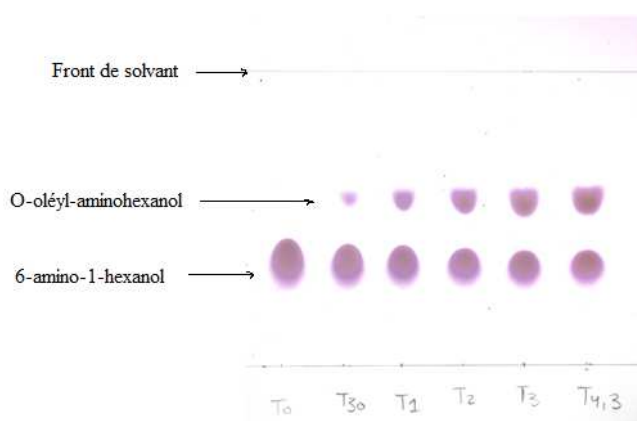


Figure 43: Exemple de chromatographie sur couche mince réalisé à partir d'une expérience en microréacteur à pompe péristaltique. Les prélèvements du milieu réactionnel à 30 min, 1h, 2h, 3h et 4h30 ont été analysés.

Il est à nouveau possible de mettre en évidence la formation d'au moins un produit de réaction dès 30min de réaction et qui correspond au produit O-oléyl aminohexanol.

Pour vérifier la formation du N-oléyl aminohexanol et du di-oléyl aminohexanol comme lors de la réaction en réacteur agité, des analyses par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse ont été réalisées (un exemple est présenté figure 44).

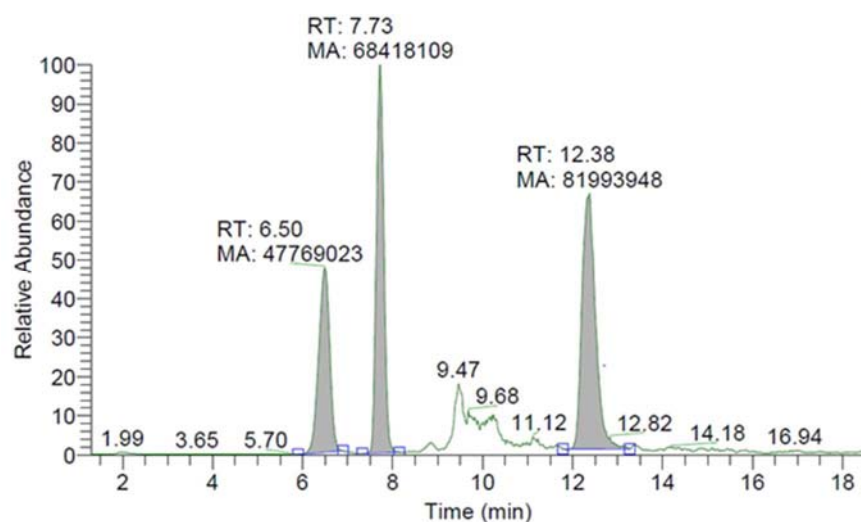


Figure 44 : Chromatogramme avec détection MS des produits obtenus lors de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle dans du M2B2 en microréacteur à pompe péristaltique après 5h.

Ces analyses ont permis de montrer qu'il y a également formation de deux composés mono-acylés (en O et en N) ainsi que la présence d'un composé di-acylé. Les temps de rétention de ces trois produits sont semblables à ceux observés lors des expériences en réacteurs agités.

La spectrométrie de masse a permis, dans un deuxième temps, une analyse semi-quantitative des échantillons.

Tableau VIII: Valeur des aires sous la courbe définies par spectrométrie de masse sur des prélèvements de la réaction d'acylation du 6-amino-1hexanol et de l'éthyle oléate en présence de M2B2 en microréacteur à pompe péristaltique.

		Microréacteur		
		1h	4h	5h
LC-MS Aire sous la courbe $\times 10^6$	mono-acylé 1	29,6	40,7	47,8
	mono-acylé 2	6,9	63,7	68,4
	di-acylé	50,1	72,4	82

L'aire sous la courbe du premier mono-acylé est plus importante que celle du 2^{ème} mono-acylé après 1h de réaction. De plus, il y a une augmentation des aires sous la courbe des trois produits au cours du temps ce qui semble indiquer une modification de la cinétique réactionnelle en microréacteur à écoulement piston. La vitesse de formation du deuxième mono-acylé semble être très rapide entre 1h et 4h de réaction puis stagner. Ceci peut indiquer une consommation de ce mono-acylé pour former le

diacylé, ce qui est également observé avec le premier mono-acylé. Ainsi, le produit diacylé est très rapidement synthétisé.

D'autre part, des analyses par chromatographie liquide haute performance des échantillons ont permis de quantifier les performances réactionnelles du microréacteur et de calculer les taux de conversion de la réaction d'acylation en fonction du temps.

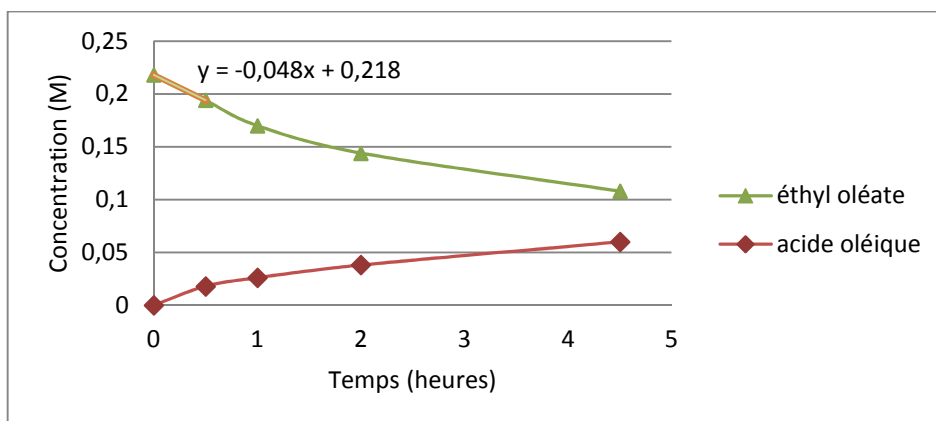


Figure 45 : Représentation graphique de la concentration en oléate d'éthyle et en acide oléique présente dans le milieu réactionnel en fonction du temps. Le débit de la pompe péristaltique a été réglé à 23 µl/min.

Dans un premier temps, le tracer de l'évolution des concentrations en acide oléique et en oléate d'éthyle en fonction du temps permet de confirmer que l'éthyle oléate est bien consommé et que la réaction inverse d'hydrolyse est une nouvelle fois non négligeable.

Dans un second temps, les taux de conversion de l'oléate d'éthyle ont été calculés selon la même formule que précédemment : $T = \frac{[oleate\ d'ethyle]_i - [oleate\ d'ethyle]_t}{[oleate\ d'ethyle]_i}$

Avec « i » correspondant à la concentration au temps initiale et « t » à celle après un temps d'expérience.

Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Taux de conversion de l'oléate d'éthyle dans le microréacteur. Ces taux de conversion sont des taux globaux qui prennent en compte la réaction inverse d'hydrolyse.

taux de conversion global (%)	temps (h)				
	0,5	1	2	4,5	6
microréacteur pompe péristaltique-1	15	21	31	32	-
microréacteur pompe péristaltique-2	11	22	34	50	-
microréacteur pompe à engrenage-1	23	28	39	-	77
microréacteur pompe à engrenage-2	16	22	34	50	57

Les taux de conversion observés lors de ces différentes expériences en microréacteur présentent une disparité notamment au-delà de 2h de réaction. Il est toutefois possible de dire que la réaction d'acylation s'effectue rapidement car après seulement 30 min de réaction, du produit est formé et le taux de conversion de la réaction est en moyenne de 15 %. De plus, après 6h de manipulation on peut atteindre un taux de conversion de 77%.

→ Enfin, il est possible de comparer la cinétique de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par de l'oléate d'éthyle dans du M2B2 en réacteur agité et en réacteur piston. L'étude des taux de conversion de la réaction ne semble pas montrer de différences dans la consommation de l'oléate d'éthyle au cours du temps entre le microréacteur à écoulement piston et les réacteurs agités. Par-contre, l'analyse semi-quantitative des aires sous la courbe des trois produits, obtenues en spectrométrie de masse, semble montrer qu'il y a une différence de cinétique de réaction. En effet, dans le microréacteur il y a une augmentation de tous les produits acylés au cours du temps alors que dans les deux types de réacteurs agités il y a une diminution du premier produit mono-acylé. De plus, il y a une différence notable au niveau de la production du composé di-acylé dans le microréacteur à écoulement piston comparativement au réacteur agité.

b. Réacteur continu : influence du débit

Dans cette deuxième partie, la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'oléate d'éthyle comme agent acylant dans du 2-méthyl-2-butanol a été réalisée dans le système présenté précédemment constitué du microréacteur et de la pompe à engrenages mais la réaction a été effectuée en circuit ouvert. Ceci implique un recueil en continu à la sortie du microréacteur. Différents débits ont été testés par journée de manipulation avec pour chaque débit une durée d'expérience de 1h. Cette durée a été choisie car elle permet d'atteindre l'état d'équilibre pour la quasi-totalité des débits. L'état d'équilibre se définit comme 5 temps de passage, sachant qu'un temps de passage est défini par l'expression : $T = \text{volume} / \text{débit}$.

Comme précédemment, une chromatographie sur couche mince est réalisée sur chaque expérience afin de vérifier qualitativement son bon déroulement. Les prélèvements à 30min et 60min, soit au milieu et à la fin de la réaction ont été choisis. L'allure des CCM obtenues grâce aux prélèvements réactionnels effectués est similaire à celle obtenue lors de l'étude de l'influence de l'agitation sur la cinétique réactionnelle.

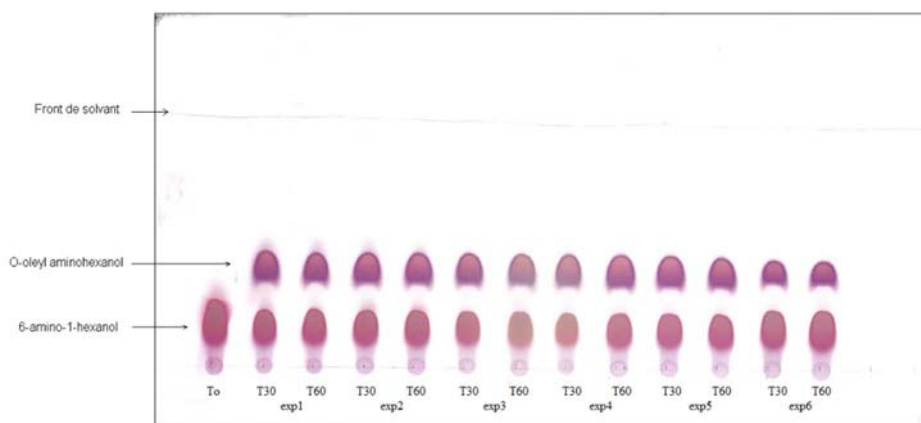


Figure 46 : Exemple de chromatographie sur couche mince réalisé à partir d'une série d'expériences en microréacteur à pompe à engrenages à différents débits utilisés.

La formation d'au moins un produit de réaction peut être à nouveau mise en évidence. En effet, le deuxième chromophore correspond à l'O-oléyl aminohexanol. De plus, une intensité relativement similaire des chromophores peut être observée pour les différentes expériences.

Des analyses par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse ont une nouvelle fois été réalisées et ont permis de confirmer la présence de trois produits acylés comme attendu (figure 42).

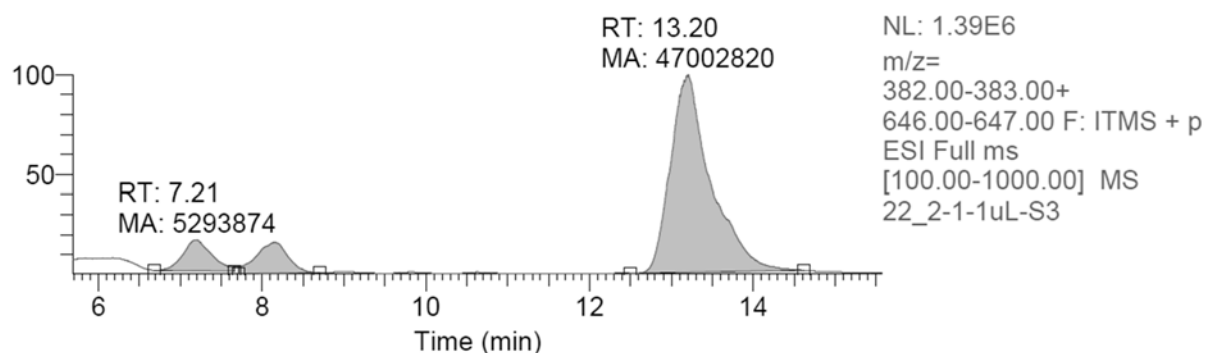


Figure 47 : Chromatogramme avec détection MS des produits obtenus lors de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle dans du M2B2 en microréacteur à pompe péristaltique après 5h.

La chromatographie à détection MS est une méthode qui ne permet pas de comparer les proportions des deux mono-acylés avec le di-acylé car ils répondent de manière différente à l'ionisation et donc à la détection MS.

Des analyses par chromatographie liquide haute performance basée sur une détection CAD (Charged Aerosol Detector), ont alors été réalisées afin de pouvoir comparer la proportion de chaque composé acylé par-rapport au total des produits acylés (figure 48).

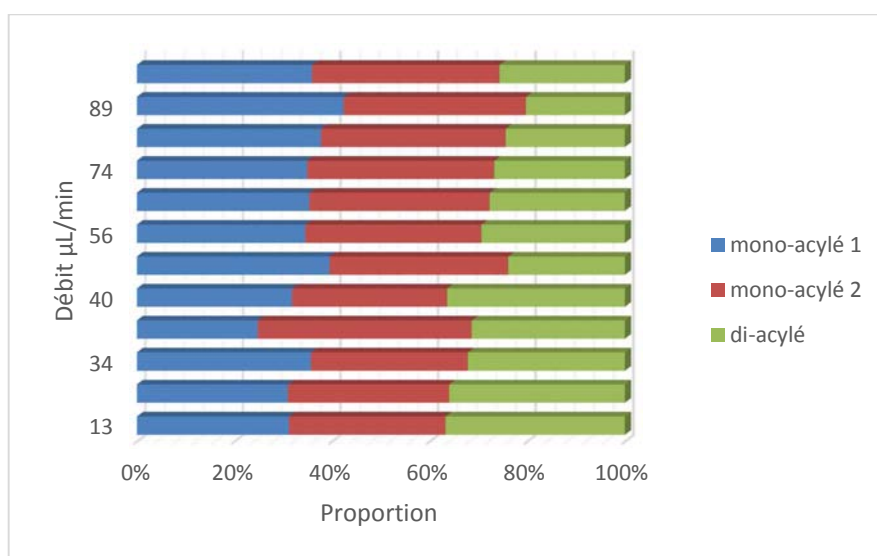
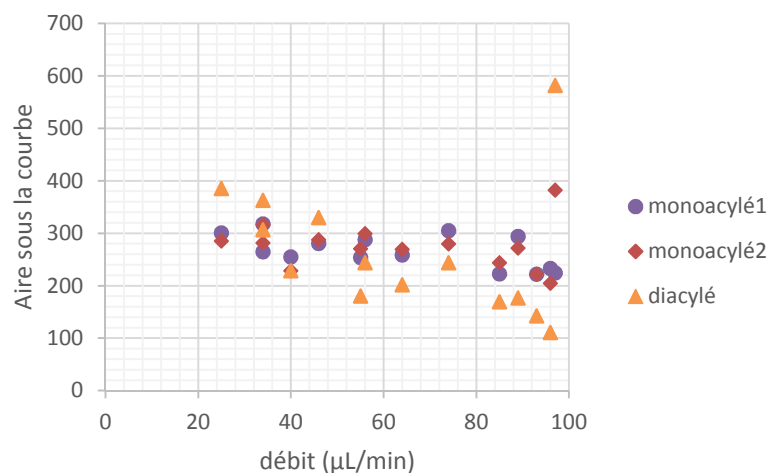


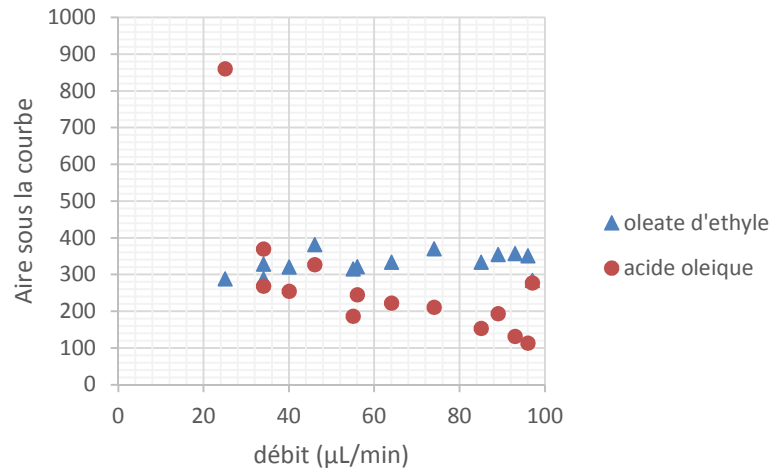
Figure 48 : Proportion de chaque produits acylés par-rapport au total des produits acylés en fonction de différents débits après 55min de réaction dans le microréacteur en circuit ouvert.

Ces résultats ne semblent pas montrer de différence significative entre la proportion de chaque composé acylé après 1 heure de réaction en fonction des différents débits mis en œuvre. Ceci semble contraster avec les résultats obtenus en systèmes discontinus (systèmes en réacteurs agités et en microréacteur à circuit fermé) où le premier mono-acylé semblait prépondérant sur le deuxième après une heure de réaction. Il est toutefois possible d'observer une diminution de la proportion de composé di-acylé avec l'augmentation du débit accompagné semble-t-il d'une augmentation des deux mono-acylés. Ceci peut s'expliquer par le fait que, plus le débit est élevé, plus le temps de passage dans le réacteur est court et donc moins il y a de temps pour que les produits mono-acylés soient transformés en produits di-acylés.

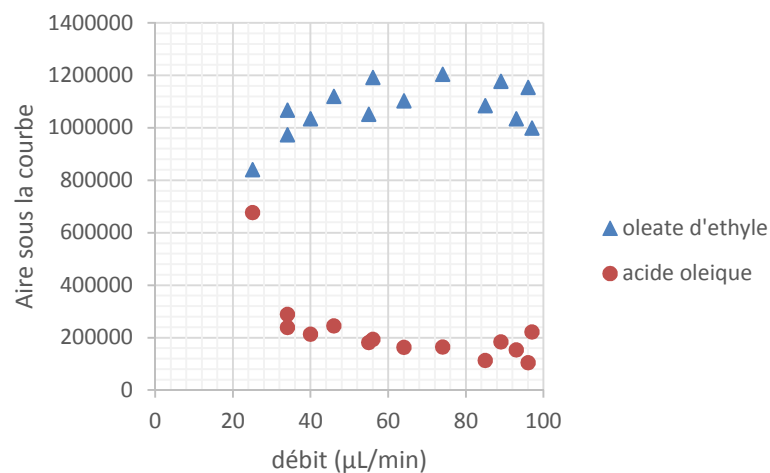
Les analyses par chromatographie ont également permis de suivre l'évolution de l'aire sous la courbe de l'oléate d'éthyle, de l'acide oléique ainsi que des trois produits à 55min de réaction en fonction du débit comme le montre la figure suivante.



a)



b)



c)

Figure 49 : (a) Evolution des aires sous la courbe en détection CAD des trois produits : mono-acylé1, mono-acylé2 et di-acylé - Evolution des aires sous la courbe en détection CAD (b) et en détection UV (c) de l'oléate d'éthyle et de l'acide oléique à 55min, en fonction du débit.

Le tracé de l'évolution des aires sous la courbe de l'oléate d'éthyle et de l'acide oléique en détection UV et CAD tend à prouver que la concentration en oléate d'éthyle augmente avec le débit ce qui peut s'expliquer par le fait que plus le temps de passage dans le microréacteur est court, moins il y a de temps de contact entre les réactifs et l'enzyme et donc moins il y a de produits formés. L'acide oléique a, quant à lui, une allure inverse à celle de l'oléate d'éthyle.

Pour les produits, il semble que les deux mono-acylés suivent la même allure. D'autre part, il semble y avoir un débit critique (80µL/min) pour lequel la formation du produit di-acylé diminue. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à ce débit les mono-acylés n'ont pas le temps d'être consommés.

3. Modélisation de la cinétique réactionnelle

Selon la littérature et les travaux E.Husson (Husson et al. 2010), un modèle bi-bi ping-pong a été choisi pour modéliser la cinétique réactionnelle.

Dans ce mécanisme les concentrations des différents constituants sont exprimées en mol/L et un symbole leur est attribué :

- concentration en 6-amino-1-hexanol : B
- concentration en oléate d'éthyle : AR
- concentration en O-oléyl aminohexanol : AB
- concentration en O-oléyl aminohexanol : AB2
- concentration en N,O-dioléyl aminohexanol : ABA
- concentration en éthanol : R

La concentration en enzyme active (E) est, quant à elle, exprimée en UA. Les premières étapes de la réaction sont réversibles et décrites par les constantes cinétiques suivantes : k_{1B} , k_{1F} , k_{2B} , k_{2F} , k_{22B} , k_{22F} , k_{3B} , k_{3F} . Selon de précédentes études, l'étape de la formation du composé diacylé est, contrairement aux autres, irréversible et sera décrite par les deux constantes cinétiques k_4 et k_{42} . De plus, il est considéré que le microenvironnement de l'enzyme peut influencer l'étape de formation du complexe acyl-enzyme d'où la prise en compte du 6-amino-1-hexanol (B) dans l'étape 1 et du composé monoacylé (AB ou AB2) dans l'étape 3.

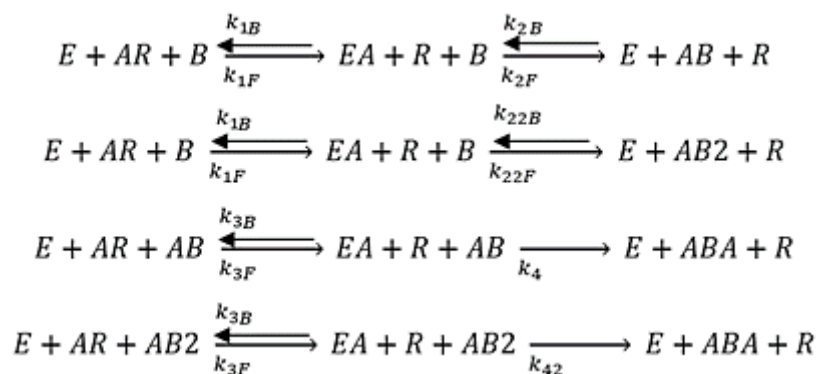


Figure 50 : Mécanisme cinétique bi-bi ping-pong adapté à l'acylation du 6-amino-1-hexanole avec l'oléate d'éthyle dans du M2B2.

Pour chaque réaction, un modèle de premier ordre a été utilisé :

$$\begin{aligned}
 r_{1F} &= k_{1F} (E \cdot AR \cdot B) & r_{1B} &= k_{1B} (EA \cdot R \cdot B) \\
 r_{2F} &= k_{2F} (EA \cdot R \cdot B) & r_{2B} &= k_{2B} (E \cdot AB \cdot R) \\
 r_{22F} &= k_{22F} (EA \cdot R \cdot B) & r_{22B} &= k_{22B} (E \cdot AB_2 \cdot R) \\
 r_{3F} &= k_{3F} (E \cdot AB \cdot AR) & r_{3B} &= k_{3B} (EA \cdot R \cdot AB) \\
 k_4 &= k_4 (EA \cdot R \cdot AB) & r_{42} &= k_{42} (EA \cdot R \cdot AB_2)
 \end{aligned}$$

Le système d'équations différentielles qui décrivent la réaction d'acylation en réacteur piston continu est le suivant :

$$\frac{dB}{d\Gamma} = -r_{2F} + r_{2B}$$

$$\frac{dABA}{d\Gamma} = +r_4 + r_{42}$$

$$\frac{dAR}{d\Gamma} = -r_{1F} + r_{1B} - r_{3F} + r_{3B}$$

$$\begin{aligned} \frac{dEA}{d\Gamma} &= +r_{1F} - r_{1B} - r_{2F} - r_{2B} + r_{22F} - r_{22B} \\ &\quad + r_{3F} - r_{3B} - r_4 - r_{42} \end{aligned}$$

$$\frac{dR}{d\Gamma} = +r_{1F} - r_{1B} + r_{3F} - r_{3B}$$

$$\frac{dE_d}{d\Gamma} = +k_d \cdot E_d$$

$$\frac{dAB}{d\Gamma} = +r_{2F} - r_{2B} - r_4$$

$$E = E_s + E_d$$

$$\frac{dAB_2}{d\Gamma} = +r_{22F} - r_{22B} - r_{42}$$

D'autre part, l'activité résiduelle de Novozyme 435® a été séparée en deux contributions :

$$E = E_s + E_d$$

Avec E correspondant à l'activité enzymatique totale,

E_s l'activité enzymatique stable,

E_d l'activité enzymatique décroissante durant l'utilisation.

La dénaturation de l'enzyme au cours du temps est supposée suivre une réaction de premier ordre de la forme : $E_d = E_{d0}.e^{(-k_d.t)}$

L'étude de cette dénaturation au cours du temps a été menée par (Husson 2008) à 55°C et permet de fixer les constantes : $E_s = 0.61$ et $k_d = 0.174 \text{ h}^{-1}$. Les expériences effectuées ont été réalisées à 37°C et non à 55°C comme lors de la détermination de la valeur de la constante k_d mais faute de données, on fera l'approximation que la dénaturation de l'enzyme est semblable à ces deux températures (ce qui n'est cependant guère réaliste).

Pour effectuer la modélisation, il a fallu, dans un premier temps, définir la valeur prise par les constantes cinétiques présentées précédemment. Le choix s'est basé sur des travaux (Husson 2008; Le Joubioux et al. 2013) et sur les résultats expérimentaux.

Ainsi :

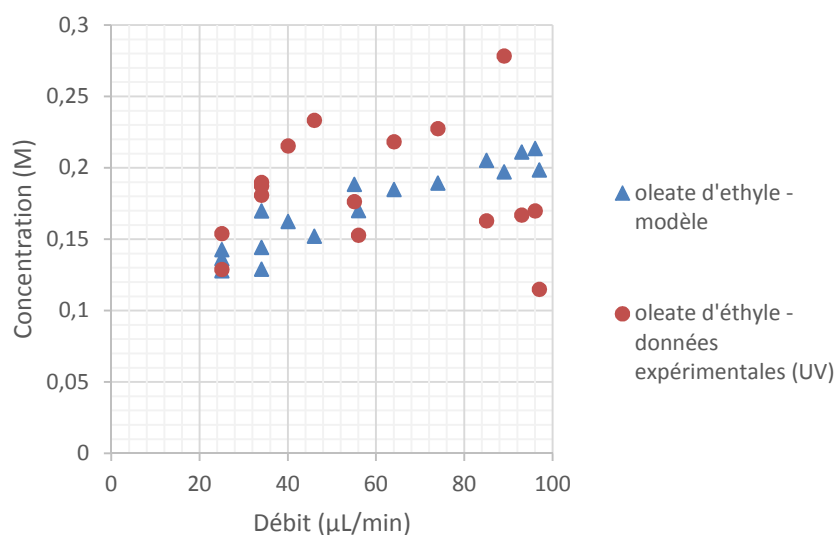
- la valeur des constantes : k_{1B} , k_{1F} , k_{2F} , k_{3B} , k_{3F} est identique à celle définie lors des travaux d'optimisation de (Husson 2008)
- La constante k_{22B} a été définie égale à la valeur définie par (Husson 2008) pour k_{2B}
- La constante k_{22F} a été définie égale à la valeur définie par (Husson 2008) pour k_{2F}
- La constante k_{42} a été définie égale à la valeur définie par (Husson 2008) pour k_4
- La constante k_{2B} a été multipliée par 2 par-rapport à la constante défini par (Husson 2008) pour se rapprocher de l'expérience et des travaux de (Le Joubioux et al. 2013) qui indique une différence entre les cinétiques en faveur de la O-acylation par rapport à la N-acylation.

- La constante k_4 a été multipliée par 3 par-rapport à la constante défini par (Husson 2008) pour se rapprocher de l'expérience
- Les constantes K_{iF} et K_{iB} ont été définies égales à la valeur définie par (Husson 2008)

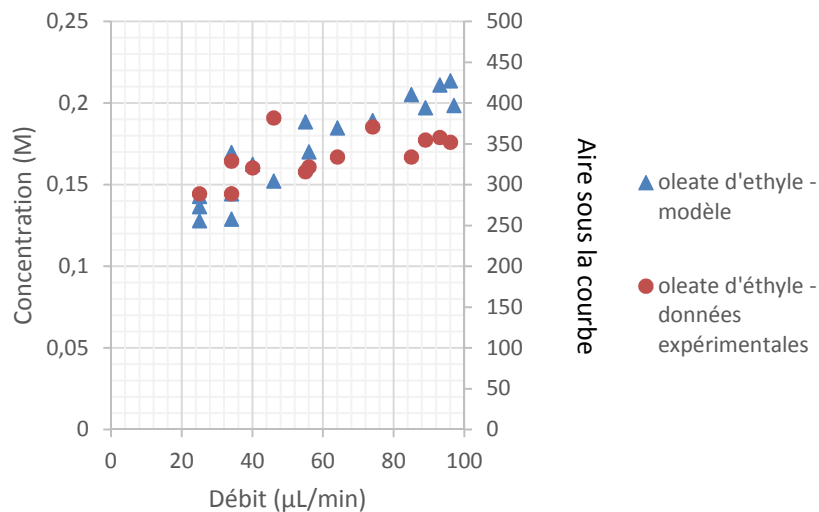
D'où les valeurs suivantes :

Constante	k1F	k1B	k2F	k2B	k22F	k22B	k3F	k3B	k4	k42	kiF	kiB
Valeurs	1,29	8303	8147	19,619	4073	19,619	22,679	4234	701,6	233,9	7542,4	1067,8

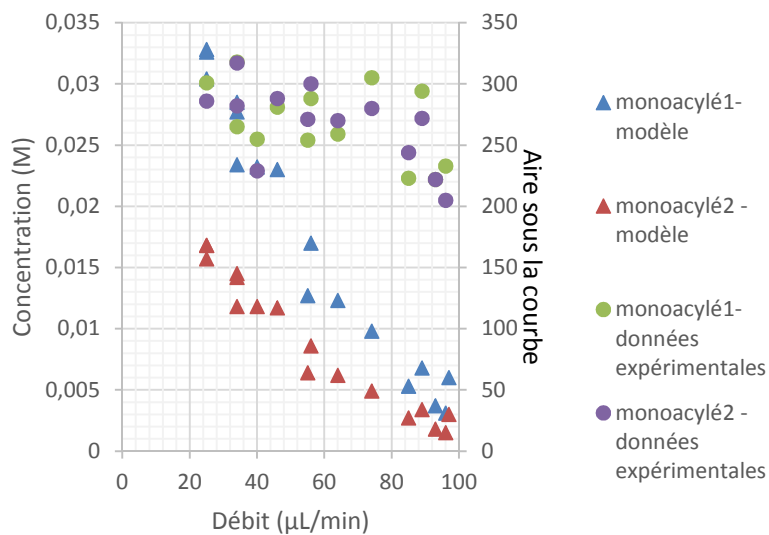
Cette modélisation nous a permis de tracer l'évolution de la concentration de l'oléate d'éthyle et des trois produits : les deux mono-acylés et le di-acylé en fonction du débit. Pour chaque débit, les données expérimentales ont été prises après 55 min de réaction, l'équilibre est supposé atteint. Des expériences ont été réalisées pour des débits inférieurs à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ mais au bout de l'heure de réaction l'équilibre n'a pas été atteint. Ces résultats n'ont donc pas été utilisés pour cette modélisation.



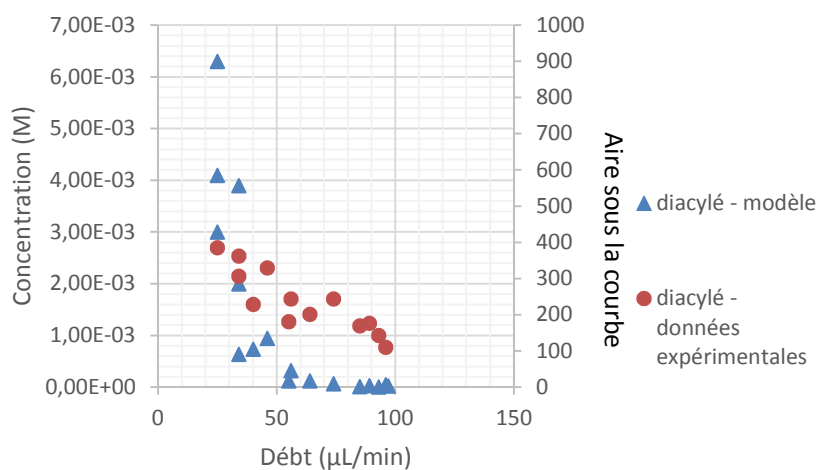
a)



b)



c)



d)

Figure 51 : a) Comparaison de l'évolution de l'oléate d'éthyle selon le modèle et selon les données expérimentales obtenues par HPLC - détection UV. B) Comparaison de l'évolution de l'oléate d'éthyle selon le modèle et selon les données expérimentales obtenues par détection CAD c) Comparaison de l'évolution des deux produits mono-acylés selon le modèle et selon les données expérimentales obtenues par détection CAD

Au vu de la comparaison des données expérimentales et de celles issues de la modélisation, il semble que le modèle puisse prédire de manière assez juste l'évolution de la concentration de l'oléate d'éthyle (figure a et b) et du composé di-acyle (figure d) en fonction du débit. On peut notamment observer sur la figure a que les concentrations modélisées et expérimentales sont relativement proches.

Par-contre, pour les composés mono-acylés le modèle présente une décroissance plus importante avec le débit que ce qui est observé par l'expérience. Cette différence peut s'expliquer par l'approximation faite lors de l'estimation de la décroissance enzymatique. En effet, au vu de ces résultats, l'hypothèse d'une décroissance plus faible de l'enzyme à 37°C peut être soulevée.

Remarque : Le programme Matlab est en Annexe 1.

VI. Conclusion et perspectives

Les années d'abondance en nouveaux principes actifs étant terminées dans le secteur de l'industrie pharmaceutique, les équipes de recherche se tournent vers des voies non conventionnelles pour l'élaboration de principes actifs telles que l'étude de molécules connues dans le monde vivant et non plus synthétisées par voie chimique comme jusqu'à présent.

Dans ce contexte, les travaux sur les peptides thérapeutiques se sont avérés être des voies de recherche très prometteuses dans de nombreux domaines thérapeutiques tels que l'hypertension, le diabète ou encore en cancérologie. Ces molécules possèdent d'importants avantages tels que leur faible toxicité et leur haute spécificité ce qui en font des principes actifs intéressants. Cependant, les peptides ont un inconvénient majeur qui est leur forte dégradation dans l'organisme sous l'action des protéases. Cet inconvénient doit être contrecarré pour permettre une utilisation plus aisée des peptides par voies classiques d'administration. Ainsi, plusieurs stratégies ont été mises au point par les équipes de chercheurs dont l'acylation des extrémités C et N terminales des peptides. Cette modification permet d'augmenter significativement la perméabilité des peptides aux membranes biologiques et d'accroître leur stabilité.

Ainsi, ces travaux constituent une première approche de l'étude d'un procédé en microréacteur à lit fixe, adapté à la biocatalyse pour la dérivation de peptides. L'étude concernait l'établissement des cinétiques de réaction de l'acylation d'une molécule modèle : le 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle en présence de la lipase B de *Candida antarctica*.

Cette réaction a notamment été étudiée dans un microréacteur à écoulement piston car cette technologie permet de réduire le temps nécessaire au changement d'échelle (passage de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle) tout en optimisant les performances réactionnelles.

Des premiers résultats ont permis de voir qu'il semble y avoir une différence de cinétique de réaction entre le réacteur agité et le microréacteur à écoulement piston mais des études complémentaires doivent être menées afin de confirmer ce résultat notamment au travers de la mise en place des deux systèmes en parallèle afin de travailler dans les mêmes conditions expérimentales.

Un résultat contraire à nos attentes est la forte proportion d'hydrolyse dans le système constitué du microréacteur. En effet, le temps de séjour étant court, il aurait paru logique d'avoir un taux d'hydrolyse plus faible en microréacteur à écoulement piston. De la même manière que précédemment, des expériences complémentaires avec une enzyme et des réactifs frais dans un milieu à teneur en eau contrôlée doivent être menées afin de limiter cette hydrolyse secondaire. Un moyen de s'affranchir de ce problème d'hydrolyse est d'utiliser l'acide oléique au lieu de l'oléate d'éthyle comme agent acylant. L'utilisation de tamis moléculaires pour le système avec recyclage, pourrait également être envisagée.

L'influence du débit sur la cinétique réactionnelle en microréacteur a été étudiée grâce au montage constitué de la pompe à engrenages qui permet d'assurer un débit plus constant que la pompe péristaltique de par son mode d'action. Ces études ont révélé une influence du débit sur la formation de produits, le long du microréacteur. A partir de ces résultats, une modélisation de la cinétique réactionnelle a pu être menée en se basant sur les précédents travaux de (Husson et al. 2010). Globalement, cette modélisation se rapproche de l'expérience mais il sera nécessaire de réaliser une optimisation des constantes cinétiques à partir des résultats observés pour ce nouveau système et ainsi de simuler la réaction avec des données adaptées.

D'autre part, ce travail a permis d'aborder une autre difficulté qui est l'analyse de composés amphiphiles ; il a été nécessaire d'optimiser les conditions analytiques en chromatographie en phase inverse pour séparer les différents produits mono- et di-acylés. Ainsi, il a été montré une grande variabilité des résultats en chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse selon les différents modes de détection utilisés. Ainsi, la détection CAD a été préférée car son mode de fonctionnement permet de comparer les composés mono-acylés et di-acylés sans induire de véritable biais lié à la différence de réponse des composés comme il peut être observé en détection MS (capacité d'ionisation différente en fonction de la structure de la molécule) ou UV (coefficient d'extinction molaire différent en fonction de la molécule). Ainsi, ce travail a permis de développer des méthodes analytiques plus adaptées à la quantification des produits de cette réaction d'acylation.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer la faisabilité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle en présence de la lipase B de *Candida antarctica* dans un microréacteur à écoulement piston. Les technologies microstructurées peuvent ainsi s'inscrire parmi les voies de recherche possibles pour la synthèse de dérivés de peptides bioactifs et/ou thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul Halim A, Szita N, Baganz F. Characterization and multi-step transketolase- ω -transaminase bioconversions in an immobilized enzyme microreactor (IEMR) with packed tube. *Journal of Biotechnology*. 2013 décembre;168(4):567–75.
- Andrès E, Dimarcq J-L. Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. *Mise à jour. Médecine et Maladies Infectieuses*. 2007 avril;37(4):194–9.
- Aubin J, Xuereb C. Microréacteurs pour l'industrie | *Techniques de l'Ingénieur*. 2008 Sep 10 [cited 2013 Feb 8];TIB610DUO(ref. article : in94). Available from: <http://www.techniques-ingenieur.fr.bases-doc.univ-lorraine.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/developpement-de-solvants-alternatifs-et-intensification-des-procedes-42492210/microréacteurs-pour-l-industrie-in94/>
- Bonneil E, Mercier M, Waldron KC. Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 2000 Jan 10;404(1):29–45.
- Bonneil E, Waldron KC. On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations. *Talanta*. 2000 Dec 4;53(3):687–99.
- Borovinskaya ES, Mammitzsch L, Uvarov VM, Schael F, Reschetilowski W. Experimental Investigation and Modeling Approach of the Phenylacetonitrile Alkylation Process in a Microreactor. *Chemical Engineering & Technology*. 2009;32(6):919–25.
- Borovinskaya ES, Reshetilovskii VP. Microreactors as the new way of intensification of heterogeneous processes. *Russ J Appl Chem*. 2011 Jun;84(6):1094–104.
- bouchoux guy, sablier michel. spectrométrie de masse - principe et appareillage. *techniques de l'ingénieur*. 2005 juin;les sélections:2645.
- Brasnjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C, Martinez-Martinez P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier. *Progress in Neurobiology*. 2009 avril;87(4):212–51.
- Calleri E, Temporini C, Furlanetto S, Liodice F, Fracchiolla G, Massolini G. Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003 août;32(4–5):715–24.
- Chopineau J, Robert S, Fénart L, Cecchelli R, Lagoutte B, Paitier S, et al. Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Control Release*. 1998 Dec 4;56(1-3):231–7.
- Cingöz A. Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques. [Paris]: Pierre et Marie Curie (Paris VI); 2009.

- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*. 2000 juin;83(6):1187–95.
- Commenge J-M. Réacteurs microstructurés: hydrodynamique, thermique, transfert de matière et applications aux procédés. 2001.
- Commenge J-M, Falk L, Corriou J-P, Matlosz M. Intensification des procédés par microstructuration. *Comptes Rendus Physique*. 2004 Jun;5(5):597–608.
- Cygler M, Grochulski P, Kazlauskas RJ, Schrag JD, Bouthillier F, Rubin B, et al. A STRUCTURAL BASIS FOR THE CHIRAL PREFERENCES IN LIPASES. *Journal of the American Chemical Society*. 116(8):3180–6.
- Dasgupta P, Singh A, Mukherjee R. N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2002 Jan;25(1):29–36.
- Dodge A, Hountondji A, Jullien MC, Tabeling P. Spatiotemporal resonances in a microfluidic system. *Phys Rev E*. 2005 Nov;72(5).
- Ehrfeld W, Hessel V, Lowe H. *Microreactors : New Technology for Modern Chemistry*. Wiley Online Library; 2000.
- Fernandes P. Miniaturization in Biocatalysis. *Int J Mol Sci*. 2010 Mar;11(3):858–79.
- Fujita T, Fujita T, Morikawa K, Tanaka H, Iemura O, Yamamoto A, et al. Improvement of intestinal absorption of human calcitonin by chemical modification with fatty acids: Synergistic effects of acylation and absorption enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996 mai;134(1–2):47–57.
- Girelli AM, Mattei E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J Chromatogr B*. 2005 May 5;819(1):3–16.
- Gonard T. Stratégie et innovation technologique: Le cas de l'insuline humaine. 1995. Available from: <http://www.strategie-aims.com/events/conferences/17-vieme-conference-de-l-aims/communications/1056-strategie-et-innovation-technologique-le-cas-de-l-insuline-humaine/download>
- Hartman RL, Jensen KF. Microchemical systems for continuous-flow synthesis. *Lab Chip*. 2009;9(17):2495–507.
- Hessel V, Hardt S, Löwe H. *Chemical Micro Process Engineering*. John Wiley & Sons; 2006.
- Hessel V, Knobloch C, Lowe H. Review on patents in microreactor and micro process engineering. *Recent patents on Chemical Engineering*,. 2008;1(1):1–16.
- Hönow R, Bongartz D, Hesse A. An improved HPLC-enzyme-reactor method for the determination of oxalic acid in complex matrices. *Clinica Chimica Acta*. 1997 mai;261(2):131–9.

- Husson E. Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. [Nancy]: institut national polytechnique de lorraine; 2008.
- Husson E, Garcia-Matilla V, Humeau C, Chevalot I, Fournier F, Marc I. Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modelling. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010 avril;46(5):338–46.
- Ingram VM. Abnormal human haemoglobins: I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting.” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1958;28:539–45.
- Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. III the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1959 décembre;36(2):402–11.
- Jensen KF. Silicon-based microchemical systems: Characteristics and applications. *MRS Bull*. 2006 Feb;31(2):101–7.
- Johnson TJ, Ross D, Locascio LE. Rapid Microfluidic Mixing. *Anal Chem*. 2002 Jan 1;74(1):45–51.
- Le Joubioux F, Henda YB, Bridiau N, Achour O, Graber M, Maugard T. The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013 Jan;85–86:193–9.
- Kanno K, Maeda H, Izumo S, Ikuno M, Takeshita K, Tashiro A, et al. Rapid enzymatic transglycosylation and oligosaccharide synthesis in a microchip reactor. *Lab Chip*. 2002 Feb 7;2(1):15–8.
- Karande R, Schmid A, Buehler K. Miniaturizing Biocatalysis: Enzyme-Catalyzed Reactions in an Aqueous/Organic Segmented Flow Capillary Microreactor. *Adv Synth Catal*. 2011 Sep;353(13):2511–21.
- Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*. 2009 avril;1(2):177–87.
- Kralj JG, Sahoo HR, Jensen KF. Integrated continuous microfluidic liquid-liquid extraction. *Lab Chip*. 2007;7(2):256–63.
- Ladisich MR, Kohlmann KL. Recombinant human insulin. *Biotechnol Prog*. 1992 Nov 1;8(6):469–78.
- Lomel S, Falk L, Commenge JM, Houzelot JL, Ramdani K. The Microreactor: A Systematic and Efficient Tool for the Transition from Batch to Continuous Process? *Chemical Engineering Research and Design*. 2006 mai;84(5):363–9.
- Majerle A, Kidrič J, Jerala R. Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J Antimicrob Chemother*. 2003 May 1;51(5):1159–65.
- Mary P, Studer V, Tabeling P. Microfluidic droplet-based liquid-liquid extraction. *Anal Chem*. 2008 Apr 15;80(8):2680–7.

- Massolini G, Calleri E, Lavecchia A, Loiodice F, Lubda D, Temporini C, et al. Enantioselective hydrolysis of some 2-aryloxyalkanoic acid methyl esters and isosteric analogues using a penicillin G acylase-based HPLC monolithic silica column. *Anal Chem.* 2003 Feb 1;75(3):535–42.
- Nguyen QV. Développement d'un microréacteur à base d'enzyme protéolytique réticulée avec le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique. 2008.
- Padhi A, Sengupta M, Sengupta S, Roehm KH, Sonawane A. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects. *Tuberculosis.* 2014 juillet;94(4):363–73.
- Pennemann H, Hessel V, Löwe H. Chemical microprocess technology—from laboratory-scale to production. *Chemical Engineering Science.* 2004 Nov;59(22–23):4789–94.
- Pham W, Kircher MF, Weissleder R, Tung C-H. Enhancing Membrane Permeability by Fatty Acylation of Oligoarginine Peptides. *ChemBioChem.* 2004 août;5(8):1148–51.
- Roberge DM, Gottsponer M, Eyholzer M, Kockmann N. Industrial design, scale-up, and use of microreactors. *Chim Oggi-Chem Today.* 2009 Aug;27(4):8–11.
- Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology.* 2006 décembre;17(6):638–42.
- Schultheiss J, Jensen D, Galensa R. Determination of aldehydes in food by high-performance liquid chromatography with biosensor coupling and micromembrane suppressors. *J Chromatogr A.* 2000 Jun 2;880(1-2):233–42.
- Schwarz A, Thomsen MS, Nidetzky B. Enzymatic Synthesis of beta-Glucosylglycerol Using a Continuous-Flow Microreactor Containing Thermostable beta-Glycoside Hydrolase CelB Immobilized on Coated Microchannel Walls. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Aug 1;103(5):865–72.
- Seong GH, Heo J, Crooks RM. Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system. *Anal Chem.* 2003 Jul 1;75(13):3161–7.
- Skurtys O, Aguilera JM. Applications of microfluidic devices in food engineering. *Food Biophys.* 2008 Mar;3(1):1–15.
- Song H, Tice JD, Ismagilov RF. A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time. *Angewandte Chemie International Edition.* 2003;42(7):768–72.
- Strike DJ, Fiaccabrino G-C, Koudelka-Hep M, Rooij NF de. Enzymatic Microreactor Using Si, Glass and EPON SU-8. *Biomedical Microdevices.* 2000 Jun 1;2(3):175–8.
- Stroock AD, Dertinger SK, Whitesides GM, Ajdari A. Patterning Flows Using Grooved Surfaces. *Anal Chem.* 2002 Oct 1;74(20):5306–12.

- Swarts JW, Vossenbergh P, Meerman MH, Janssen AEM, Boom RM. Comparison of two-phase lipase-catalyzed esterification on micro and bench scale. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Mar 1;99(4):855–61.
- Tufan A, Mercan R, Pasaoglu OT, Pasaoglu H, Ozturk MA, Goker B, et al. Serum antimicrobial peptides in patients with familial Mediterranean fever. *Peptides* [Internet]. [cited 2014 May 4]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978114000825>
- Uchiyama T, Kotani A, Tatsumi H, Kishida T, Okamoto A, Okada N, et al. Development of Novel Lipophilic Derivatives of DADLE (Leucine Enkephalin Analogue): Intestinal Permeability Characteristics of DADLE Derivatives in Rats. *Pharm Res*. 2000 Dec 1;17(12):1461–7.
- Urban PL, Goodall DM, Bergstrom ET, Bruce NC. On-line low-volume transesterification-based assay for immobilized lipases. *J Biotechnol*. 2006 Dec 1;126(4):508–18.
- Vasconcelos I. Développement d'outils millifluidiques pour l'acquisition de données physico-chimiques sur des systèmes de polycondensation. Bordeaux 1; 2010.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*. 2010 Jan;15(1–2):40–56.
- Watts P, Wiles C. Recent advances in synthetic micro reaction technology. *Chem Commun*. 2007 Jan 24;(5):443–67.
- Weber SJ, Abbruscato TJ, Brownson EA, Lipkowski AW, Polt R, Misicka A, et al. Assessment of an in vitro blood-brain barrier model using several [Met⁵]enkephalin opioid analogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Sep;266(3):1649–55.
- Weigl BH, Yager P. Microfluidics - Microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science*. 1999 Jan 15;283(5400):346–7.
- Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006 Jul 26;442(7101):368–73.
- Witt KA, Gillespie TJ, Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides*. 2001 décembre;22(12):2329–43.
- Woodcock LL, Wiles C, Greenway GM, Watts P, Wells A, Eyley S. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novozyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor. *Biocatal Biotransform*. 2008;26(6):501–7.
- Xiao P, Lv X, Man Y, Qing H, Li Q, Deng Y. Rapid and Efficient Proteolysis for Protein Analysis by an Aptamer-Based Immobilized Chymotrypsin Microreactor. *Analytical Letters*. 2013;46(5):868–78.
- Yamamoto A, Setoh K, Murakami M, Shironoshita M, Kobayashi T, Fujimoto K, et al. Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical


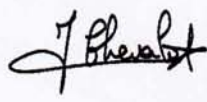


modification with various fatty acids. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003 Jan 2;250(1):119–28.

Yamato S, Wakabayashi H, Nakajima M, Shimada K. Amperometric determination of oxalate in plasma and urine by liquid chromatography with immobilized oxalate oxidase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1994 juin;656(1):29–35.

Ye ML, Hu S, Schoenherr RM, Dovichi NJ. On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2004 May;25(9):1319–26.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27 octobre 2014

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Mélanie Faggin</p> <p><u>Sujet</u> : Développement d'un procédé d'acylation en microréacteur à lit fixe adapté à la biocatalyse</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. MAINCENT, Professeur des Universités Directeur : Mme CHEVALOT, Professeur des Universités Juges : M. FRAMBOISIER, Ingénieur de recherche M. DUVAL, Professeur des Universités</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 24/09/014</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p> </p> <p>M. MAINCENT Mme CHEVALOT</p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 10.10.2014</p> <p><i>P.O.</i> Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p> Francine PAULUS FACULTE DE PHARMACIE</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 14 OCT. 2014</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine, Pour le Président et par délégation Le Vice-Président</p> <p> MUTZENHARDT Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 6735.</p>

N° d'identification : 6735

TITRE

Développement d'un procédé d'acylation en microréacteur à lit fixe adapté à la biocatalyse

Thèse soutenue le 27 octobre 2014

Par Mélanie FAGGIN

RESUME :

Dans un contexte où la pression économique se fait de plus en plus ressentir sur l'industrie pharmaceutique, celle-ci opère une véritable mutation dans tous les secteurs clés. Le secteur de la recherche et du développement n'échappe pas à cette réalité. Ainsi, alors que le coût de la recherche d'un nouveau médicament ne cesse d'augmenter, les chercheurs s'orientent vers des voies alternatives pour la mise au point de nouvelles thérapeutiques. Parmi ces alternatives, l'utilisation de peptides comme agents thérapeutiques est en plein essor. En effet, de nouvelles méthodes de synthèse des dérivés de peptides permettent d'améliorer la productivité tout en réduisant le métabolisme des peptides et en augmentant leur biodisponibilité, dont la N-acétylation ou la C-amidation.

Les objectifs principaux de cette étude sont ainsi de développer un procédé en microréacteur à lit fixe, adapté à la biocatalyse pour la dérivation de peptides en milieu organique et de comparer les performances dans ce microsystème par rapport à la mise en œuvre classique en réacteur agité. La réaction mise en œuvre sera la réaction d'acylation d'une molécule modèle bi-fonctionnelle ; le 6-amino-1-hexanol par de l'oléate d'éthyle catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*. Les performances de la réaction d'acylation de la molécule modèle seront évaluées ainsi que la sélectivité de la réaction avec la formation potentielle d'un ou de deux composés mono-acylés(s) et d'un composé di-acylé.

MOTS CLES : peptide thérapeutique, microréacteur, acylation, catalyseur enzymatique, lipase B de *Candida antarctica*, sélectivité, intensification réactionnel, dégradation peptidique

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Isabelle Chevalot	LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés)	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème 1

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle