



HAL
open science

Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques : synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*

Estelle Enaud

► **To cite this version:**

Estelle Enaud. Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques : synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2004. Français. NNT : 2004INPL020N . tel-01749748

HAL Id: tel-01749748

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749748>

Submitted on 29 Mar 2018

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-theses-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>

136036 6038

011 NPL 020

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Ecole doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement

[M] 2004 ENAUD, E.

THESE

présentée à l'INPL par

Estelle ENAUD

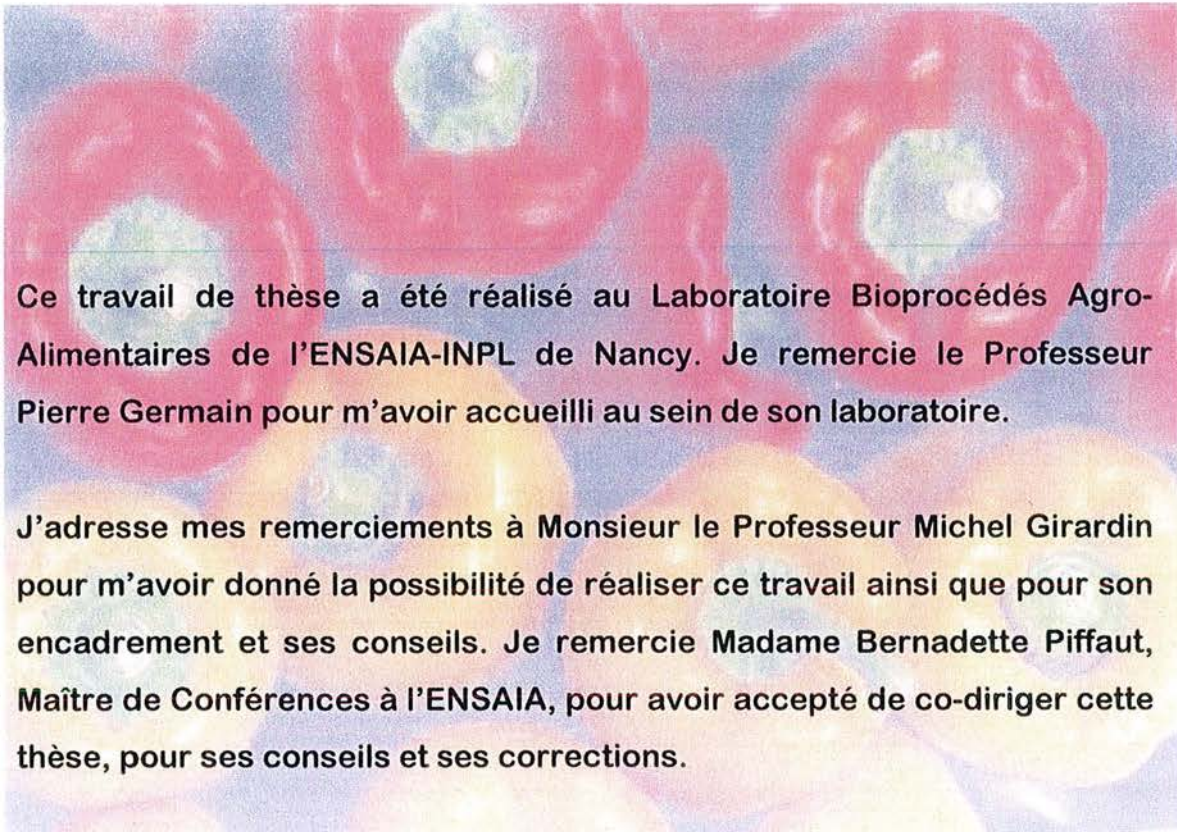
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Spécialité : Procédés et biotechnologies alimentaires

**Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques :
synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées
par la lipase B de *Candida antarctica***

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

soutenue publiquement le 5 mai 2004 devant la commission d'examen

Rapporteurs : Mme **M.D. LEGOY** Professeur à l'Université de La Rochelle
M. **D. COMBES** Professeur à l'INSA de Toulouse
Examineurs : Mme **B. PIFFAUT** Maître de conférence à l'ENSAIA de Nancy
M. **F. BOURGAUD** Professeur à l'ENSAIA de Nancy
M. **M. GIRARDIN** Professeur à l'ENSAIA de Nancy



Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire Bioprocédés Agro-Alimentaires de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie le Professeur Pierre Germain pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Michel Girardin pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail ainsi que pour son encadrement et ses conseils. Je remercie Madame Bernadette Piffaut, Maître de Conférences à l'ENSAIA, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour ses conseils et ses corrections.

Je remercie Madame Marie-Dominique Legoy, Professeur à l'Université de La Rochelle et Monsieur Didier Combes, Professeur à l'INSA de Toulouse, qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également M. Frédéric Bourgaud, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse aussi mes remerciements aux stagiaires qui ont participé à ce travail : Marie, Barbora, Alpha et Hélène ainsi qu'aux membres du LABIAL pour leur soutien au cours de ces années.

Merci aux lorrains, véritables et d'adoption, de m'avoir montré les beaux côtés de leur région. Merci en particulier à Delph, Fred, Manu et ses filles, Stéphane, Fafoise, Mumu, Cath, Lionel ...

Je tiens également à associer à ce travail mes parents, mon frère et ma « petite belle sœur » pour leur soutien. Et enfin, merci à Jocelyn et pas seulement pour les oranges pressées.

Introduction	1
Chapitre 1 : étude bibliographique	5
I. Les flavonoïdes	5
II. La synthèse d'esters par voie enzymatique	45
III. Acylation des flavonoïdes	67
Objectifs du travail expérimental	85
Chapitre 2 : matériel et méthodes	87
I. Matériel	87
II. Protocoles des synthèses enzymatiques	93
III. Protocoles de purification des produits de synthèse	97
IV. Méthodes analytiques	104
Chapitre 3 : résultats	113
I. Recherche de donneurs d'acyle acceptés par la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	113
II. Etude de la faisabilité de la synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes	128
III. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu solvant	141
IV. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle »	161
Chapitre 4 : discussion	191
Influence du milieu réactionnel	191
Sélectivité de l'enzyme	193
Les moyens de contourner la sélectivité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	197
les enzymes spécifiques de l'estérification des acides phénoliques	202
Propriétés des esters synthétisés	205
Conclusion	209
Annexes	211
Structure des dérivés de phloridzine	211
Structure des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone	216
Structure des dérivés de l'isoquercitrine	221
Publication	226
Bibliographie	233

Liste des abréviations

Asp	aspartate
ATP :	adénosine triphosphate
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
CoA :	Coenzyme A
DCC :	N,N'dicyclohexylcarbodiimide
DMAP :	4-(diméthylamino)pyridine
DMF :	diméthyl formamide
DMSO:	diméthyl sulfoxyde
FAE	férule estérase
Gly	glycine
His	histidine
HMP :	4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one
M ₂ B ₂ :	2-méthylbutan-2-ol
NHDC :	néohespéridine dihydrochalcone
Rf	rappports frontaux
RMN :	résonance magnétique nucléaire
rpm :	rotation par minute
Ser	sérine
Tf :	température de fusion
TFA :	acide trifluoroacétique
THF :	tétrahydrofurane
tr :	temps de rétention
UV	ultraviolet

introduction

Introduction

Les polyphénols ou composés phénoliques constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires chez les végétaux supérieurs et ils se localisent généralement dans tous les organes de la plante.

Ils présentent de multiples structures par la diversité des fonctions chimiques et des groupes substituants qui composent ces molécules. Plus de 8000 sont actuellement connus.

Etant donné cette diversité structurale, le classement précis de tous les polyphénols est difficile. On peut cependant distinguer quatre grandes classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins et les lignines qui regroupent la majorité des structures.

Parmi ces quatre classes, les flavonoïdes, à eux seuls, représentent près de la moitié des composés polyphénoliques connus. Ils sont très présents dans notre alimentation, notamment dans les céréales, les légumes, et les boissons (thé, café, vin) d'où une consommation d'environ 1 g par jour (Hertog *et al.*, 1993b). Cet apport chez l'homme constitue un potentiel majeur d'exploitation de ces composés d'origine naturelle à des fins nutritionnelles, thérapeutiques ou de prévention vis-à-vis d'un certain nombre de pathologies humaines (Cook & Samman, 1996).

En effet, les flavonoïdes, outre leur rôle dans les qualités organoleptiques des aliments, possèdent un certain nombre de propriétés qui justifient l'intérêt que leur portent de nombreux chercheurs. Ils sont avant tout de puissants antioxydants car la plupart possèdent une structure idéale pour piéger les radicaux libres et/ou chélater certains métaux promoteurs de ces phénomènes d'oxydation comme le fer (Rice-Evans *et al.*, 1996).

De ce fait, les flavonoïdes peuvent être des additifs « naturels » capables de protéger les aliments du rancissement ou d'intervenir dans les produits cosmétiques contre le vieillissement cutané et la dépigmentation de la peau ou pour favoriser l'amincissement.

Mais ce sont surtout d'autres effets biologiques présumés des flavonoïdes qui font l'objet à l'heure actuelle de recherches intenses, notamment leur rôle protecteur contre cancers et maladies cardiovasculaires.

Ainsi, les flavonoïdes pourraient limiter le développement de cancer tant au stade de l'initiation, de la promotion que de la progression.

Ils pourraient aussi inhiber la formation de carcinogènes à partir de procarcinogènes ou encore former des adduits inactifs avec certains d'entre eux.

Enfin, certains d'entre eux comme les isoflavones pourraient aussi, de par leurs propriétés œstrogéniques, limiter le développement des cancers hormono-dépendants.

En ce qui concerne la prévention des maladies cardiovasculaires, le rôle présumé des flavonoïdes pourrait s'expliquer par la protection des lipoprotéines de faible densité contre l'oxydation.

Cependant, les très nombreux résultats expérimentaux déjà acquis ne constituent encore que des présomptions de ces rôles protecteurs.

Une chose est cependant sûre, c'est que les effets biologiques supposés des flavonoïdes passent avant tout par leur biodisponibilité.

On sait aujourd'hui que les flavonoïdes sont en partie métabolisés et donc que leurs formes actives ne sont pas nécessairement les formes ingérées.

De la même façon, la structure native des flavonoïdes peut-être un handicap pour leur utilisation en tant qu'additif anti-radicalaire dans certains produits à cause de leur faible solubilité.

En effet, les flavonoïdes ont une polarité intermédiaire (par rapport aux glucides et aux lipides) qui est modulée par la présence dans leur structure de groupes substituants non phénoliques plus ou moins polaires. Ils sont donc souvent peu solubles en phases aqueuses et encore plus faiblement dans les phases lipidiques, ce qui peut restreindre leur efficacité ou leur biodisponibilité. C'est une des raisons pour lesquelles la modification structurale des flavonoïdes naturels et notamment l'acylation sont étudiés depuis maintenant une quinzaine d'années.

Cette fonctionnalisation peut aussi avoir pour but de renforcer leurs propriétés natives ou de leur conférer de nouvelles propriétés en fonction de l'utilisation recherchée qu'elle soit alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

En ce qui concerne l'acylation, le greffage d'un groupement phénolique peut entraîner une modification importante de la solubilité des flavonoïdes ou de leur stabilité comme pour les anthocyanes (Giusti & Wrolstrad, 2003).

Par exemple, un groupement de type acide gras devrait favoriser la solubilisation dans les phases lipidiques alors qu'un diacide favorisera la solubilisation dans l'eau.

Dans ce contexte, nous avons mis en œuvre l'étude de la synthèse d'esters de flavonoïdes glycosylés ayant des propriétés physico-chimiques modifiées.

Le nombre important de positions acylables et les pré-requis en matière d'additifs alimentaires et cosmétiques nous ont conduits à envisager un procédé enzymatique plutôt qu'un procédé chimique, en général moins sélectif et nécessitant des catalyseurs et des solvants souvent toxiques.

Ce travail est présenté en quatre chapitres.

Au cours de l'étude bibliographique nous décrirons les structures des flavonoïdes, leur répartition dans le règne végétal, leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Chaque fois que cela sera possible nous illustrerons l'exposé par des exemples de flavonoïdes acylés naturels. Puis les grands principes de la synthèse d'esters par voie enzymatique seront évoqués pour nous permettre de choisir un catalyseur approprié à la synthèse d'esters de flavonoïdes. Enfin l'étude bibliographique se terminera par une revue des méthodes mises en œuvre précédemment pour la synthèse de ces composés.

Nous nous appuierons sur cette étude pour choisir les substrats (flavonoïdes et donneurs d'acyles) et le biocatalyseur (Novozym 435® : forme immobilisée de la lipase B de *Candida antarctica*) à utiliser pour orienter notre étude expérimentale.

Le deuxième chapitre indiquera le matériel ainsi que les protocoles utilisés au cours de l'étude expérimentale. Les résultats, consignés dans un troisième chapitre, seront organisés en quatre parties : dans un premier temps nous étudierons la sélectivité du Novozym 435® vis-à-vis des donneurs d'acyle. Nous nous attacherons ensuite à étudier la faisabilité de la synthèse d'esters de flavonoïdes sans avoir recours à un donneur d'acyle activé. L'étude de la synthèse sera enfin plus approfondie pour chacun des milieux les plus performants. Pour finir, la discussion et les perspectives de ces travaux tiendront lieu de quatrième chapitre.

Chapitre 1 :

étude bibliographique

I. Les flavonoïdes	5
<i>I.1. Nature et origine des flavonoïdes</i>	5
I.1.1. Structure des flavonoïdes	5
I.1.2. Les sources de flavonoïdes	8
I.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes	14
<i>I.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes</i>	18
I.2.1. Solubilité des flavonoïdes	18
I.2.2. Interactions avec la lumière	20
I.2.3. Stabilité des flavonoïdes	23
I.2.4. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires	26
I.2.5. Interaction avec les protéines	34
I.2.6. Inhibition d'enzymes	35
<i>I.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes</i>	37
I.3.1. Activité antimicrobienne et antivirale	37
I.3.2. Activité œstrogénique et anti-œstrogénique	38
I.3.3. Action sur le système cardio-vasculaire	39
I.3.4. Activité anticarcinogénique	40
I.3.5. Action sur la peau	40
I.3.6. Propriétés organoleptiques	41
I.3.7. Conclusion	42
II. La synthèse d'esters par voie enzymatique	45
<i>II.1. L'estérification</i>	45
II.1.1. La catalyse chimique	45
II.1.2. La catalyse enzymatique	47
II.1.3. Les enzymes catalysant la synthèse d'esters	48
<i>II.2. Les lipases</i>	48
II.2.1. Structure des lipases	48
II.2.2. Mécanisme catalytique	50
II.2.3. Utilisations	52
II.2.4. Paramètres influençant la réaction de synthèse	57
<i>II.3. La lipase B de Candida antarctica (CALB)</i>	62
II.3.1. Structure	62
II.3.2. Applications	65
III. Acylation des flavonoïdes	67
<i>III.1. Acylation chimique des flavonoïdes</i>	67
III.1.1. Acylation chimique non spécifique	68
III.1.2. Acylation chimique régiosélective	70
<i>III.2. Acylation chimio-enzymatique des flavonoïdes</i>	72
<i>III.3. Acylation enzymatique de flavonoïdes</i>	74
III.3.1. Acylation de flavonoïdes aglycones	74
III.3.2. Acylation de flavonoïdes glycosylés	74
<i>III.4. Conclusion</i>	82

I. Les flavonoïdes

I.1. Nature et origine des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe de composés chimiques la plus caractéristique des plantes supérieures. Ils y sont distribués universellement ainsi que dans les mousses et les fougères. Plus de 4000 flavonoïdes naturels différents ont été identifiés.

Ces composés polyphénoliques, notamment les anthocyanes (couleur rouge orangée à bleu), les flavonols (jaunes) et les chalcones (jaunes), participent à la pigmentation des fleurs et des fruits. Une de leurs fonctions biologiques est ainsi d'attirer les animaux impliqués dans la reproduction des plantes. Mais ils participent aussi à la protection contre le rayonnement ultraviolet et contre les organismes phytopathogènes (Hahlbrock, 1981).

I.1.1. Structure des flavonoïdes

I.1.1.1. Le noyau en C₁₅

La structure chimique des flavonoïdes comporte, la plupart du temps, un squelette carboné en C₁₅ de type benzo- γ -pyrone constitué de deux cycles benzéniques : les noyaux A et B et d'un hétérocycle oxygéné : le cycle C (figure 1).

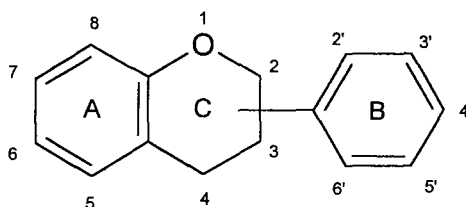


figure 1 : structure de base des flavonoïdes (Hahlbrock, 1981).

Le classement chimique des flavonoïdes est basé sur le degré d'insaturation et d'oxydation du noyau C. Les groupes majeurs sont les suivants (figure 2) :

- Chalcones : 1,3-diphényl-prop-2-ène-1-one (ex : naringénine chalcone, butéine...)
- Flavanones : 2-phényl-2,3-dihydro-chromones (ex : naringénine, hespéridine, néohespéridine, narirutine...)

- Flavanol : 2-phényl-2,3-dihydro-3-hydroxy-chromones (ex : catéchine)
- Flavones : 2-phényl-chromones (ex : apigénine, lutéoline)
- Flavonols : 2-phényl-3-hydroxychromones (kaempférol, quercétine, myricétine)
- Dihydroflavonols : 2-phényl-3-hydroxy-2,3-dihydro-chromones (ex : fustine, taxifoline)
- Anthocyanines : 2-phényl-1-benzopyrilium (ex : pélargonidine, delphinidine, cyanidine, malvidine, péonidine, pétunidine...)
- Isoflavones : 3-phényl-chromones (ex : génistéine)
- Aurones : benzo-furones (ex : leptosidine, maritimétine)

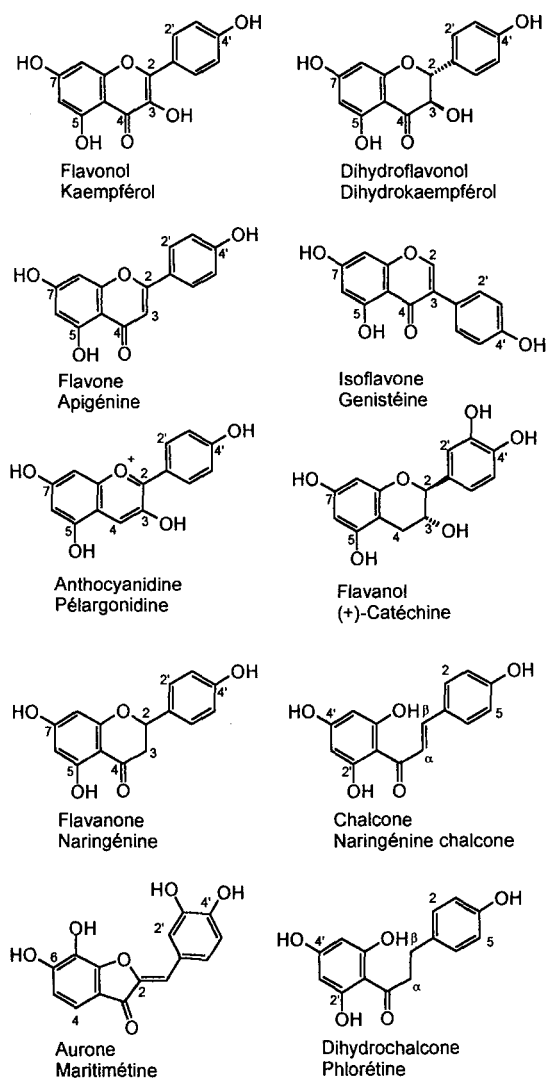


figure 2 : structure et numérotation de quelques flavonoïdes (Mabry *et al.*, 1970).

Pour chaque catégorie de flavonoïdes, il existe plusieurs formes aglycones qui diffèrent par la distribution sur le squelette en C₁₅ des substituants hydroxyles et méthoxyles. Un exemple est donné tableau 1 pour la famille des anthocyanidines.

tableau 1 : variation dans les substituants présents sur les anthocyanidines.

Anthocyanidine	Substituants (R)							Couleur
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigéninidine	H	OH	H	OH	H	OH	H	orange
Cyanidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	orange-rouge
Delphinidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	rouge-bleu
Lutéolinidine	H	OH	H	OH	OH	OH	H	orange
Malvidine	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	rouge-bleu
Pélagonidine	OH	OH	H	OH	H	OH	H	orange
Péonidine	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	orange-rouge
Pétunidine	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	rouge-bleu

I.1.1.2. Les formes glycosylées

Les flavonoïdes sont le plus souvent présents dans les plantes sous forme de glycosides.

Les positions couramment glycosylées sont toujours au moins l'hydroxyle en 3 pour les anthocyanes et l'hydroxyle en 3 et/ou en 7 pour les flavones et flavonols (figure 3).

Les sucres les plus souvent rencontrés sont le glucose, le rhamnose et les disaccharides comme le rutinose (6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucose) et le néohespéridoside (2-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucose) (Ryan *et al.*, 1999).

Il existe aussi des flavonoïdes C-glycosylés (violanthine par exemple) où les glycosyles sont liés au carbone 6 ou 8 du noyau A (Markham, 1989) (figure 3).

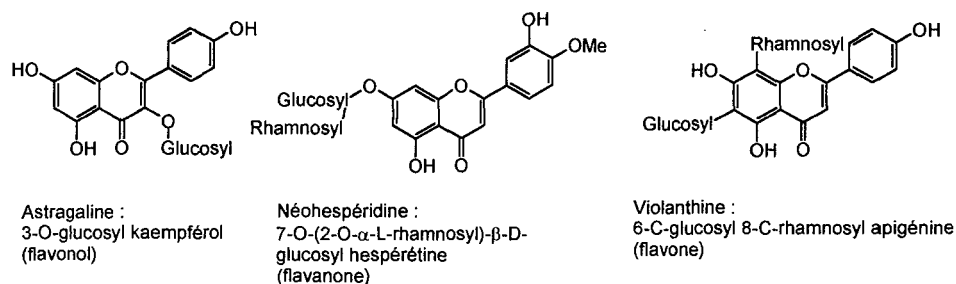


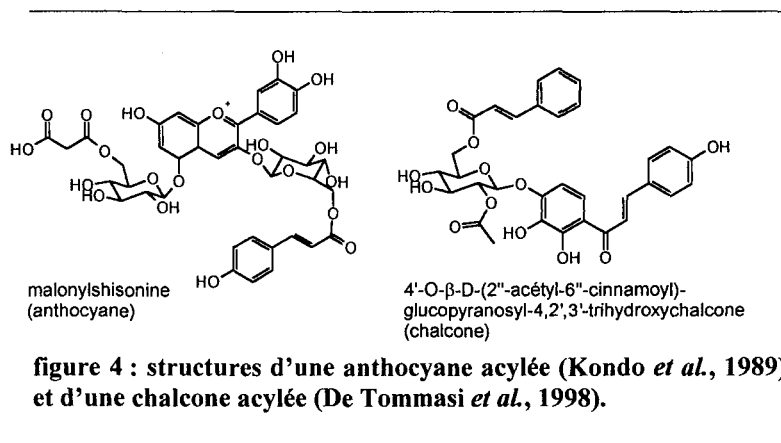
figure 3 : structure de quelques flavonoïdes glycosylés.

I.1.1.3. Les formes acylées

Les formes acylées des flavonoïdes glycosylés sont particulièrement fréquentes dans le groupe des anthocyanines. Mais on trouve aussi des flavonols, des flavones, des isoflavones et des chalcones acylées. Le groupement acyle est toujours lié à la partie glycosidique du flavonoïde, à l'exception des flavanols qui peuvent porter un gallate sur la position 3 du noyau C.

Les groupements acyles les plus communs sont les acides phénoliques tels que l'acide 4-hydroxycinnamique, l'acide caféique et l'acide férulique et plus rarement les acides hydroxybenzoïques. Les groupements aliphatiques peuvent être les acides acétique, oxalique, succinique, malique mais surtout l'acide malonique qui est le plus courant (Strack & Wray, 1989).

La structure de ces flavonoïdes acylés est parfois complexe puisque l'aglycone peut porter plusieurs glycosyles, éventuellement, eux-mêmes porteurs d'un ou plusieurs groupements acyles. Deux exemples sont montrés figure 4.



I.1.2. Les sources de flavonoïdes

Les flavonoïdes apparaissent dans tous les organes des végétaux et de ce fait sont largement répandus dans notre alimentation. Ainsi, ils sont très présents dans les fruits, les légumes, le vin, le thé et le cacao.

Toutes les familles de flavonoïdes ne sont pas représentées dans chaque plante. Alors que les flavones, flavonols, anthocyanes et flavanols sont largement répandues, les autres familles de flavonoïdes sont restreintes à quelques végétaux.

I.1.2.1. Flavonols et flavones

Les flavonols (figure 5) et flavones (figure 6) sont en général retrouvés sous forme O-glycosylés et parfois C-glycosylés. Ils sont présents dans presque tous les végétaux à l'exception des algues et des champignons (Markham, 1989).

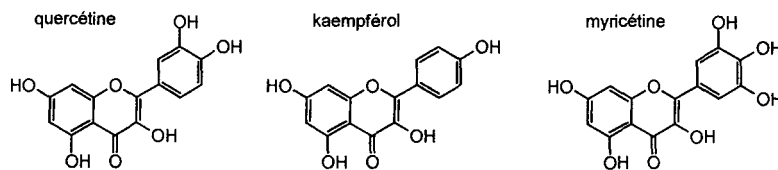


figure 5 : structure des flavonols couramment présents dans l'alimentation humaine.

Parmi les flavonols, les dérivés de la quercétine sont présents dans de nombreux fruits et légumes (abricot, brocoli, laitue, raisin, tomate). Les teneurs sont de l'ordre de 10 mg d'aglycone par kilogramme de matière fraîche à l'exception de l'oignon qui en contient 280 à 490 mg.kg⁻¹ (Hollman & Arts, 2000). On peut noter que la peau sèche, externe de l'oignon contient 2,5 à 6,5 % de quercétine (Shahidi & Naczki, 1995), et représente donc une source intéressante de flavonol. Le kaempférol est moins souvent détecté (chou frisé, endive, brocoli, poireau) à des teneurs variant de 1 à 470 mg.kg⁻¹. La myricétine est plus rare, on en trouve environ 5 mg.kg⁻¹ dans le thé noir et dans le vin rouge.

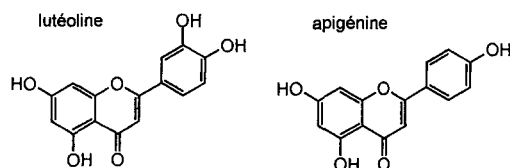


figure 6 : structure des flavones couramment présentes dans l'alimentation humaine.

Les flavones, représentées par la lutéoline et l'apigénine sont particulièrement concentrées dans le céleri feuille (200 et 750 mg.kg⁻¹ respectivement) et le poivre rouge (Hollman & Arts, 2000).

I.1.2.2. Flavanols et procyanidines

Contrairement aux autres familles de flavonoïdes, les flavanols sont rarement glycosylés. Ils sont surtout représentés par la catéchine, l'épicatéchine (figure 7) et leurs esters galliques.

Dans de nombreux pays, le thé est la source alimentaire de flavanols la plus importante. En effet, il combine un taux important de flavanols, soit 20 à 30% du poids sec dans le thé vert (Wang *et al.*, 2000), avec un niveau de consommation élevé. Les taux de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine dans les vins rouges sont très importants contrairement aux vins blancs. Les vins fabriqués à partir de Pinot noir, cépage couramment utilisé en Bourgogne, contiennent jusqu'à 287 mg.l⁻¹ de flavanols. Certaines pommes, particulièrement les variétés à cidre, sont très riches en épicatéchine, jusqu'à 1400 mg.kg⁻¹ de matière fraîche (Sanoner *et al.*, 1999). Les légumes et le cacao en contiennent aussi beaucoup.

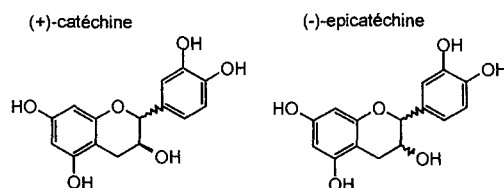


figure 7 : structure des flavanols couramment présents dans l'alimentation humaine.

Il est à noter qu'au cours des procédés de transformation du thé et du cacao, l'oxydation et la polymérisation des flavanols réduit leur concentration de 90% (Hollman & Arts, 2000).

La polymérisation de flavanols conduit aux proanthocyanidines (figure 8). Elles sont abondantes dans les pépins de raisin, le cacao et le thé noir. On les trouve aussi dans les pommes où elles sont majoritaires par rapport aux autres polyphénols : elles sont présentes dans le cortex à une teneur de 0,5 à 4,7 g.kg⁻¹ sous forme de polymères de 4 à 50 unités (Sanoner *et al.*, 1999).

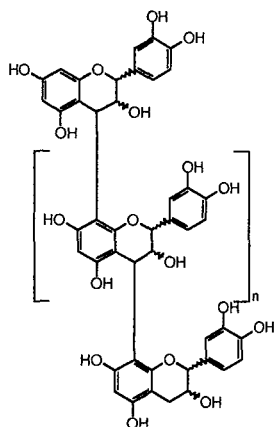


figure 8 : structure générale des proanthocyanidines les plus courantes, ici une procyanidine de type B.

I.1.2.3. Anthocyanes

Les anthocyanes (tableau 1) sont des colorants universels chez les végétaux supérieurs : fruits rouges, fleurs et légumes (Strack & Wray, 1989).

Les sources majeures d'anthocyanes sont les raisins noirs, les carottes noires, les baies de sureaux et les choux rouges. Elles sont utilisées en tant que colorant alimentaire (E163), principalement dans les boissons non alcoolisées. La source commerciale la plus importante est le marc de raisin. Le tableau 2 rassemble les teneurs en anthocyanes de quelques fruits rouges.

tableau 2 : teneurs en anthocyanes de quelques fruits, adapté de Heinonen & Meyer, 2002

Fruits	Anthocyanes en mg.kg ⁻¹ de matière fraîche
Cassis	130-8100
Cerise	31-4500
Fraise	202-790
Framboise	200-2200
Myrtille	3900-4850
Raisin rouge	72-765

I.1.2.4. Flavanones et dihydrochalcones

Ces composés (figure 9) s'accumulent dans de nombreuses fougères et gymnospermes ainsi que dans les angiospermes. Ils sont cependant moins répandus que les flavones et flavonols.

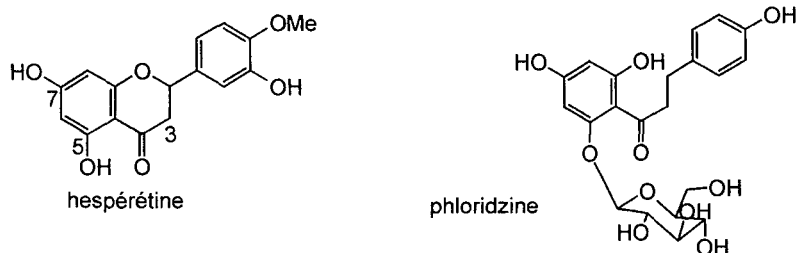


figure 9 : structure des flavanones (exemple de l'hespérétine) et des dihydrochalcones (exemple de la phloridzine).

Les flavanones sont présentes dans les compositae, les leguminosae, les labiatae et rutacae ; elles sont abondantes dans les espèces de *Prunus* mais rares dans les autres espèces de Rosacae (Grayer, 1989). Ces composés sont caractéristiques des agrumes (rutacae). Leur partie glycosidique est le plus souvent un disaccharide lié à l'hydroxyle phénolique en 7 sur le noyau A du flavonoïde.

Les citrons, citrons verts, mandarines et oranges douces contiennent surtout des rutinosides, alors que dans les pamplemousses, et oranges amères, on trouve des néohespéridosides.

Les dérivés glucosylés de flavanones sont rares. Cependant, ils sont retrouvés dans la menthe, le pamplemousse, le citron et l'orange douce en tant que composés mineurs (Tomas-Barberan & Clifford, 2000).

Les agrumes et leurs produits dérivés sont la source alimentaire majeure de flavanones ; ils contiennent environ 5,5 g d'hespéridine par kg de poids sec (Heinonen & Meyer, 2002). Cependant, la répartition des flavanones dans le fruit est très hétérogène : les parties les moins consommées en contiennent le plus (figure 10).

structures	Contenu en naringine
flavedo	2,7-4,3 g.kg ⁻¹
albedo	13-16 g.kg ⁻¹
pulpe	0,3 g.kg ⁻¹
membrane arrière	18-27 g.kg ⁻¹
membrane latérale	11-18 g.kg ⁻¹
Jus de pamplemousse	295-377 mg.kg ⁻¹

figure 10 : répartition des flavanones dans les agrumes, exemple de la naringine du pamplemousse (McIntosh & Mansell, 1997).

Les dihydrochalcones sont présentes dans de nombreuses fougères et dans quelques angiospermes. Une grande variété de structure est retrouvée dans les léguminosae, les compositae et les annonaceae. Dans les autres familles, la présence de dihydrochalcones est sporadique.

Les glycosides de phlorétine (figure 9, phloridzine) sont caractéristiques de la pomme. Leurs concentrations varient fortement d'un cultivar à l'autre et dans les différents tissus du fruit (figure 11). Dans la peau et la pulpe, les dihydrochalcones peuvent représenter 3% des polyphénols totaux contre 75% dans les graines (Lu & Foo, 1998). La peau est 5 à 10 fois plus riche en dihydrochalcones que la chair. Ce sont donc les parties les plus riches en dihydrochalcones qui sont écartées lors de la consommation courante.

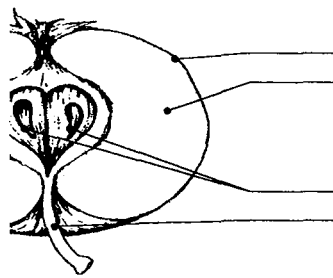
structures	Contenu en dihydrochalcones
	24 mg.kg ⁻¹ phloridzine ^{a)}
	10-98 mg.kg ⁻¹ phlorétine xyloglucoside ^{b)} 15-102 mg.kg ⁻¹ phloridzine ^{b)}
pépins	75% des polyphénols totaux ^{c)}
pédoncule	Jusqu'à 10% du poids sec ^{d)}
Pomme entière	115-435 mg.kg ⁻¹ ^{e)}
marc	1500 mg.kg ⁻¹ phlorétine glycosides ^{e)}

figure 11 : répartition des dihydrochalcones dans la pomme.

a) Tomas-Barberan & Clifford, 2000 ; b) Sanoner *et al.*, 1999 ; c) Lu & Foo, 1998, d) Ridgway *et al.*, 1997 ; e) Bandoniène & Murkovic, 2002.

Le processus industriel de fabrication des jus de pommes augmente considérablement le taux de dihydrochalcones ingérées pour deux raisons. D'une part, l'intégralité de la pomme est pressée et d'autre part, les polyphénoloxydases sont inactivées au cours de la pasteurisation.

I.1.2.5. Isoflavones

La principale source d'isoflavones est le soja avec pour représentants la génistéine et la daidzéine (figure 12). Ces flavonoïdes sont présents dans les produits alimentaires non fermentés en tant que glycosides et dans les produits fermentés sous leur forme aglycone (Messina, 1999). Ils peuvent aussi être acylés par un acétate ou un malonate. La teneur en isoflavone du soja est de l'ordre de 2 g par kilogramme de matière fraîche.

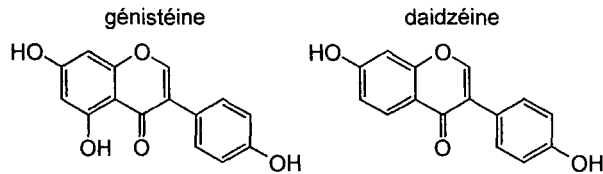


figure 12 : structure des isoflavones couramment retrouvées dans l'alimentation humaine.

Liggins *et al.*, 2000 ont déterminé la teneur en isoflavones (daidzéine plus génistéine) dans les fruits et noix de consommation courante. Quelques valeurs sont montrées tableau 3.

tableau 3 : contenu en isoflavones des fruits et noix de consommation courante (Liggins et al., 2000)

Fruits	Concentration moyenne en isoflavone en μg par Kg de matière fraîche
Cacahuète fraîche	235
Corinthe	2250
Fruit de la passion	174
Noisette	240
Orange	Non détecté
Pomme	Non détecté
Raisin sec	1835

I.1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Le noyau A du squelette est formé par enchaînement de 3 unités malonyl-CoA (voie de l'acétate) tandis que le reste de la molécule en C3-C6 (B) provient de la voie de l'acide shikimique. En ce qui concerne cette dernière, l'étape clef est la désamination oxydative de la phénylalanine, catalysée par la phénylalanine ammonia lyase. L'acide trans-cinnamique qui en résulte subit ensuite une hydroxylation en para par une enzyme de type cytochrome P450 : la cinnamate 4-hydroxylase. Le 4-hydroxycinnamate produit est converti en 4-hydroxycinnamate-coenzyme A par une CoA ligase (figure 13).

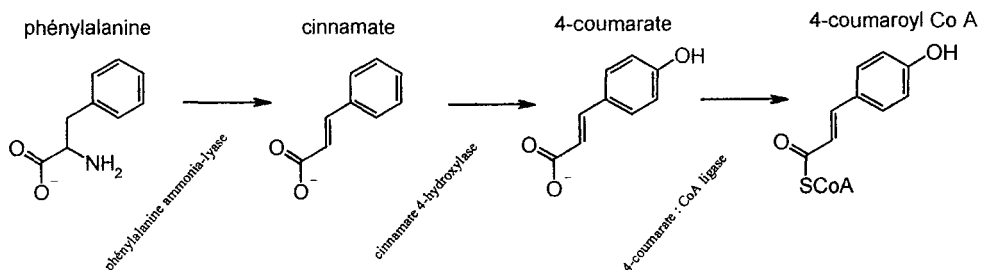


figure 13 : métabolisme des phénylpropanoïdes

La formation des flavonoïdes résulte de la condensation d'un 4-coumaroyl-coenzyme-A et de trois malonyl-coenzyme-A. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthase et cette étape est commune à la formation de tous les flavonoïdes. L'incorporation de dérivés cinnamiques autres que le 4-hydroxyhydroxycinnamate (caféate, férulate) par la chalcone synthase a déjà été observée dans quelques espèces végétales mais il semble que ce soit un phénomène minoritaire (Forkmann, 1993). La chalcone peut subir différentes transformations, variables suivant le type de flavonoïde.

Pour la plupart des flavonoïdes, la biosynthèse se poursuit par la formation d'une flavanone catalysée par la chalcone isomérase (figure 14).

A partir de la flavanone, une flavonol synthase et une flavone synthase forment les flavonols et flavones respectivement, la flavanone-3-hydroxylase forme les dihydroflavonols et le complexe enzymatique isoflavone synthase (comprenant deux activités : une migration oxydative de l'aryle suivie d'une déshydratation) conduit aux isoflavones (Akashi *et al.*, 1999). Les proanthocyanidines, anthocyanidines et flavanols sont synthétisés à partir des flavanonols.

Certaines étapes de la biosynthèse des flavonoïdes, notamment celles menant aux aurones, ne sont pas encore élucidées.

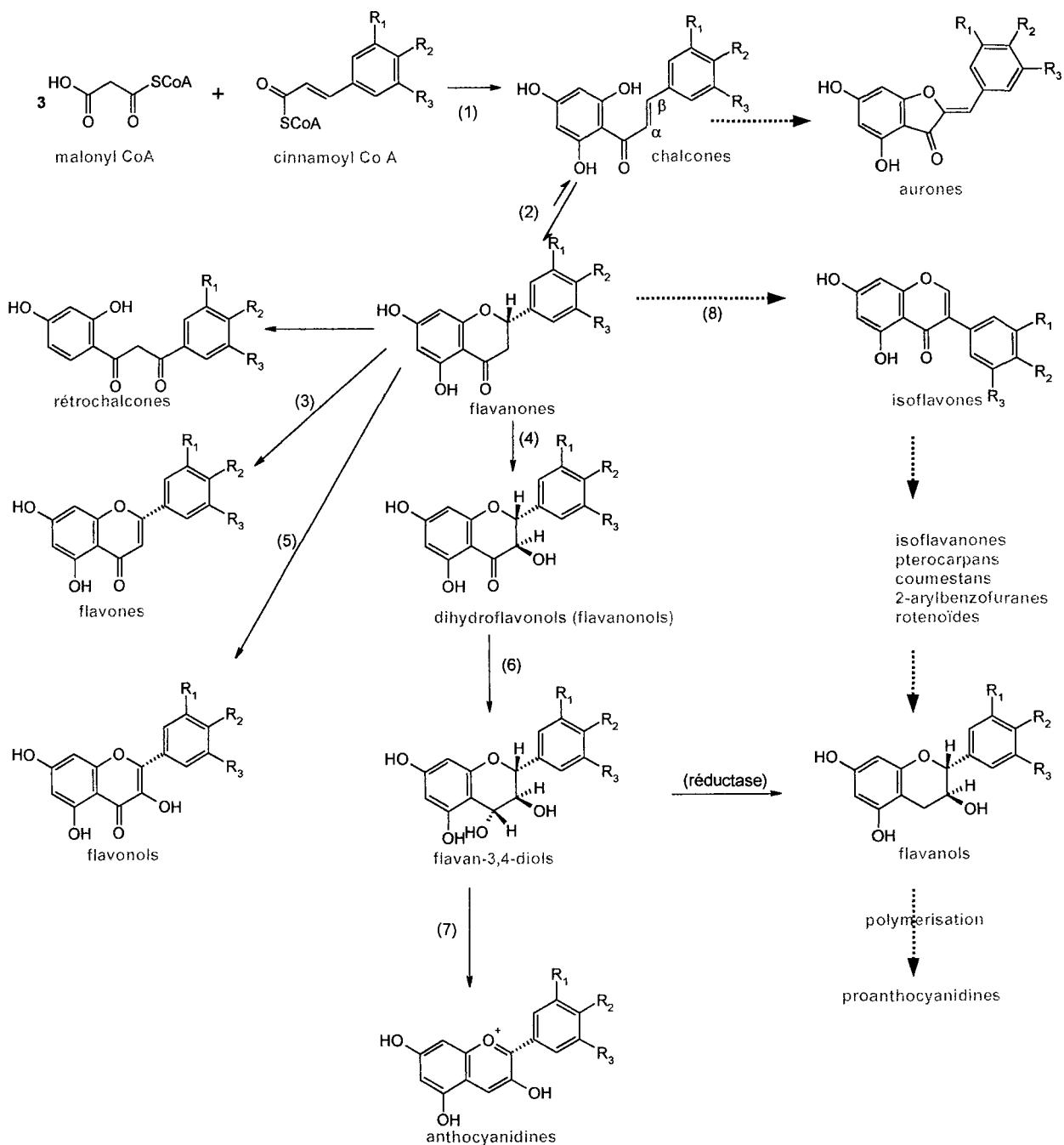


figure 14 : Formation des groupes les plus importants de flavonoïdes (adapté de Luckner, 1990 et Dixon & Steele, 1999).

(1) chalcone synthase ; (2) chalcone isomérase ; (3) flavone synthase ; (4) flavanone 3-hydroxylase ; (5) flavonol synthase ; (6) dihydroflavonol réductase ; (7) anthocyanidine synthase, (8) isoflavone synthase comprenant une 2 hydroxyisoflavanone synthase et une 2-hydroxyisoflavanone déshydratase.

La flavanone 3-hydroxylase, la flavone synthase, et l'anthocyanidine synthase sont des dioxygénases 2-oxoglutarate dépendantes. La dihydroflavonol réductase est une réductase NADPH dépendante. La 2-hydroxyisoflavanone synthase est un cytochrome P450.

I.1.3.1. Substitution des cycles A et B

Les hydroxylations supplémentaires et méthylations du noyau B sont dues à des modifications intervenant après la formation du noyau en C₁₅ du flavonoïde (Forkmann, 1993) et plus particulièrement au niveau des dihydroflavonols (Dixon & Steele, 1999).

Les hydroxylations sont catalysées par des oxygénases de type cytochrome P450 telles que la flavonoïde-3'-hydroxylase et la flavonoïde-3', 5'-hydroxylase. Les méthoxylations sont catalysées par des S-adénosyl-L-méthionine méthyl transférases.

Ces types de modifications sont plus rares sur le noyau A. On peut citer l'action de la chalcone réductase, parallèlement à celle de la chalcone synthase qui entraîne la formation d'une flavanone dépourvue d'hydroxyle en position 5 (Dixon & Steele, 1999).

Toutes les enzymes intervenant sur le noyau central du flavonoïde ont une spécificité stricte pour le flavonoïde (famille, nature et position des substituants) et la position à modifier.

I.1.3.2. Glycosylation

Comme il a été indiqué § I.1.1.2, les flavonoïdes sont majoritairement présents dans la nature sous forme de glycosides.

La glycosylation des hydroxyles de l'aglycone est catalysée par des UDP-glycosyl transférases spécifiques de la famille du flavonoïde, de la nature et de la position des substituants présents sur l'aglycone et de la position sur laquelle le sucre est transféré. Bien que tous les flavonoïdes d'une même famille puissent être substrats pour la même transférase, les vitesses de transformation sont très différentes (Hahlbrock, 1981).

La synthèse des flavonoïdes diglycosides, notamment parmi les flavonols, les anthocyanines et les flavones, est séquentielle. Le glucose, le plus souvent, est greffé par une glycosyl-transférase spécifique, puis le deuxième sucre est greffé par une enzyme ayant une spécificité plus faible (Forkmann, 1993).

La glycosylation des flavonoïdes influe essentiellement sur leur solubilité sauf dans le cas des anthocyanes où la glycosylation en position 3 est indispensable à leur stabilité. *In vitro*, la cyanidine (aglycone) a une demi-vie de 12 heures, alors que la cyanidine-3-rutinoside a une demi-vie de 65 jours (Mazza & Miniati, 1993).

I.1.3.3. Acylations

L'acylation des flavonoïdes est la dernière étape de la biosynthèse. Elle est catalysée par des acyl-CoA-transférases. Les aromatique-acyl-transférases ont une spécificité faible vis-à-vis de l'acyle aromatique et des flavonoïdes glycosides. Par exemple, l'anthocyanine 3-aromatique acyle transférase de *Perilla frutescens* n'est pas sensible au nombre d'hydroxyles présents sur le noyau B de l'anthocyane. Elle transfère le dérivé cinnamique sur le glucosyle en 3 des 3-monoglucosyl anthocyanines et des 3,5-diglucosyl anthocyanines. Elle peut utiliser le caféate-CoA et le 4-hydroxycinnamate-CoA comme donneur d'acyle mais pas le malonyl-CoA (Fujiwara *et al.*, 1998).

Les plantes possédant ce type d'enzyme ont des couleurs vives (bleu-violet) dues à leurs pigments polyacylés.

I.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés hautement réactifs. Ils sont impliqués dans différents types de réactions telles que les réactions rédox, les réactions acido-basiques, les réactions avec les radicaux libres, les interactions hydrophobes, les phénomènes de tautomérie et d'isomérisation (Havsteen, 2002).

Ces différentes réactivités sont modulées par les substituants présents sur le flavonoïde. Les substituants exercent leur influence par induction électronique, hyperconjugaison, résonance, encombrement stérique et complexation avec les métaux lourds.

I.2.1. Solubilité des flavonoïdes

Les cycles A et B des flavonoïdes sont hydrophobes, ils peuvent cependant interagir avec les molécules polaires grâce à leurs hydroxyles phénoliques. En effet, la capacité d'un composé à former des liaisons hydrogènes avec le solvant est le principal facteur influençant la solubilité de ce composé (Saidman *et al.*, 2002).

tableau 4 : solubilité relative des flavonoïdes dans quelques solvants en relation avec leur structure (Lide, 2001-2002).

Flavonoïde (famille)	substitution	Eau	Ethanol	Acide acétique	Acétone	Pyridine	Benzène	Chloroforme	Ether éthylique
Hespérétine (flavanone)	3,5,7,3'-OH,4'-OMe		4						4
Hespéridine (flavanone)	3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinosé		4	4		4			
Naringénine (flavanone)	5,7,4'-OH		4				4		4
Naringine (flavanone)	5,4'-OH, 7-néohespéridosé	2	2				1		1
Quercétine (flavonol)	3,5,7,3',4'-OH	2	3		3				3
Quercitrine (flavonol)	5,7,3',4'-OH, 3-rhamnosé	1	3	3					1
Malvidine (anthocyanines)	3,5,7-OH, 3',4',5'-OMe	2	3						
Daidzéine (isoflavone)	7,4'-OH		3						3
Apigénine (flavone)	3,5,4'-OH	1	3			3			

1-insoluble
 2-légèrement soluble
 3-soluble
 4-très soluble

La présence d'un résidu glycosyle les rend moins solubles, voire insolubles dans les solvants apolaires (tableau 4, cas de la naringénine et naringine). Par contre, les dérivés hautement méthoxylés, tels que la nobilétine, la sinensétine et la tangéretine (Malterud & Rydland, 2000), sont particulièrement solubles dans ces solvants.

La solubilité des flavonoïdes dans l'eau est en général très faible. Par exemple, la solubilité de la rutine (flavonol disaccharide) avoisine 125 mg.l⁻¹. Benavente-Garcia *et al.*, 2001 ont testé la solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de la NHDC à 20°C est de 0,4 g.l⁻¹ dans l'eau, de 12 g.l⁻¹ dans l'éthanol et passe à 126 g.l⁻¹ dans un mélange 50/50 : éthanol/eau. D'autre part, Li *et al.*, 1997 ont montré que l'apigénine, comme de nombreux autres flavonoïdes, est soluble dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à plus de 100 g.l⁻¹ mais dans les autres solvants sa solubilité est inférieure à 1,63 g.l⁻¹.

Cette faible solubilité en milieux biologiques pose un problème de biodisponibilité, à la fois dans les phases aqueuses et dans les phases lipidiques. La métabolisation de ces composés passe par leur modification. Au cours de la digestion, la partie glycosyle est en général hydrolysée, les aglycones résultantes sont alors conjuguées à des groupements polaires tels que le sulfate, l'acide glucuronique ou la glycine (Hollman & Arts, 2000).

D'autre part, la modification par voie chimique des flavonoïdes a été depuis longtemps envisagée notamment pour améliorer leur solubilité. Par exemple, le Venoruton®, médicament traitant les insuffisances veineuses, contient un dérivé hydroxyéthylé de la rutine : 7-monoxyéthylrutoside (Abou El Hassan *et al.*, 2000).

I.2.2. Interactions avec la lumière

La coloration des fleurs, des fruits et des légumes est due pour une part importante à la présence de flavonoïdes colorés tels que les flavonols, chalcones (jaunes), et les anthocyanes (rouges). Une autre de leurs fonctions est de protéger les végétaux des rayonnements ultraviolets.

I.2.2.1. Absorption des rayonnements UV

Les composés possédant une activité « écran solaire » sont généralement porteurs d'un groupement aromatique conjugué avec un carbonyle et portant souvent un groupement donneur d'électron en position ortho ou para (figure 15).

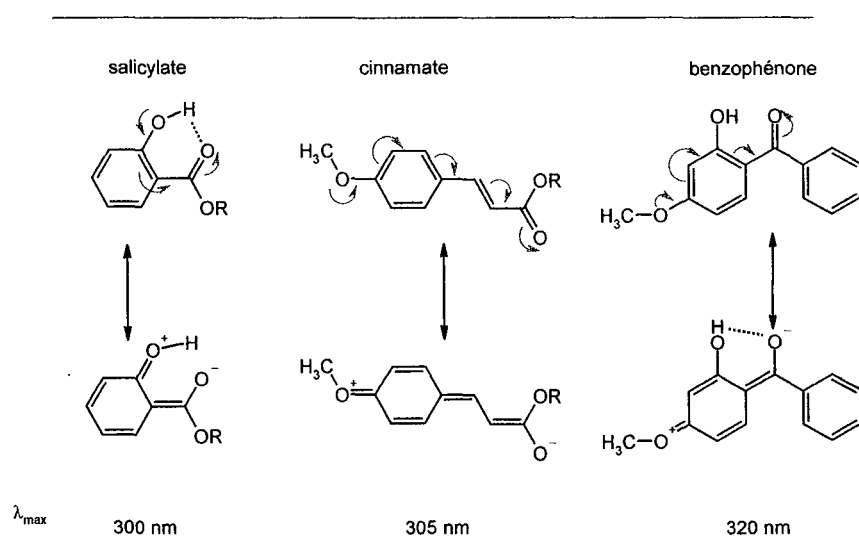


figure 15 : exemples d'écrans solaires et leur délocalisation électronique d'après Shaath, 1997b.

L'énergie des radiations UVA et UVB est du même ordre de grandeur que l'énergie de résonance pour la délocalisation d'un électron aromatique. L'absorption d'une radiation UV par un composé, le fait passer de l'état fondamental à l'état excité (figure 15). Le retour à l'état fondamental se fait par émission d'un rayonnement de moindre énergie, de longueur d'onde supérieure à 380 nm (Shaath, 1997a).

La plupart des flavonoïdes possèdent une fonction carbonyle conjuguée avec l'un ou les deux noyaux aromatiques A et B. Ils protègent, par cette structure, contre les rayonnements ultraviolets.

I.2.2.2. Effet de la structure du flavonoïde sur l'absorption UV

La plupart des flavones et flavonols présentent deux bandes majeures d'absorption dans la zone UV-visible (figure 16). La bande I, dans l'intervalle 320-395 nm, représente l'absorption du noyau B et la bande II, dans l'intervalle 250-285 nm est due à l'absorption du noyau A.

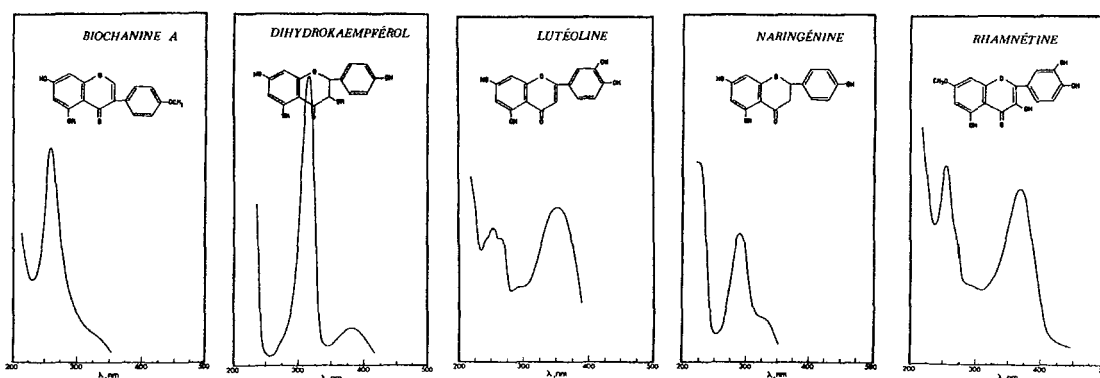


figure 16 : spectres UV-visible de quelques flavonoïdes (Mabry *et al.*, 1970).

L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur l'aglycone provoque un déplacement bathochrome, vers les grandes longueurs d'ondes (tableau 5). Lorsque l'hydroxyle en 3 est absent, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. Les méthylations comme les glycosylations provoquent un déplacement hypsochrome, vers les longueurs d'ondes plus courtes.

tableau 5 : absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol *

Classe de flavonoïdes	Absorption UV-visible, λ_{max}	
	Bande II	Bande I
Anthocyanes	270-280, 315-325 ^{a)}	450-560
Pélagonidine		505
Pélagonidine 3-glucoside		497
Pélagonidine-3-sophoroside-5-glucoside		496
Pélagonidine-3-(2-glucosyl-6-féruoyl-glucoside)-5-glucoside		506
Flavonols	250-270, 330 ^{b)}	350-380
Kaempférol	266-294 ^{b)} - 322	367
Quercétine	255-269 ^{b)} -301	371
Flavan-3-ol	270-280	—
Flavones	250-270	330-350
Chrysin	247 ^{b)} -268	313
Apigénine	267-296 ^{b)}	337
Flavanone, Flavanols	270-295	300-330 ^{b)}
Naringénine	289	326 ^{b)}
Taxifoline	290	327 ^{b)}
Chalcones	220-270, 300-320,	340-390
Dihydrochalcone	271-289	300-340
Phlorétine	286	—
Phloridzine	285	330 ^{b)}
Aurones	240-270	—
Isoflavones	245-270	300-350

* : + 0,01%HCl pour les anthocyanes

Macheix et al., 1990, Grayer, 1989, Markham, 1989 et Giusti & Wrolstrad, 2003.

a) si acylation par un acide cinnamique

b) épaulement

Lorsque la double liaison 2,3 est absente (cas des flavanones, flavanols et dihydrochalcones) les noyaux A et B ne sont pas conjugués, la bande II est très intense alors que la bande I n'est plus qu'un épaulement (Grayer, 1989).

I.2.2.3. Cas des anthocyanes

En ce qui concerne les anthocyanes la bande d'absorption I est très déplacée vers les grandes longueurs d'ondes et peut l'être encore plus si l'anthocyane est acylée (tableau 5).

La glycosylation en 3 sur l'anthocyanine diminue l'intensité de la couleur et le maximum d'absorption est décalé vers les longueurs d'ondes plus courtes (Giusti & Wrolstrad, 2003). Les glycosylations supplémentaires ont l'effet inverse (tableau 5). L'absorption dans le visible est aussi améliorée par les groupements acyles lorsqu'il y a

copigmentation. Ce phénomène est discuté chapitre 1, § I.2.3 en parallèle avec l'amélioration de la stabilité des anthocyanes.

I.2.3. Stabilité des flavonoïdes

La plupart des flavonoïdes (flavones, isoflavones flavanols, flavonols, dihydrochalcones), sont des composés relativement stables. Cependant, leur dégradation est favorisée par les milieux alcalins, les hautes températures, les oxydants et la lumière.

Par exemple, en milieu alcalin le cycle des flavanones peut s'ouvrir pour produire la chalcone correspondante (Gonzalez *et al.*, 2002). Inversement, les traitements acides ou basiques à chaud, provoquent la cyclisation des chalcones en flavanones (Bohm, 1989).

Les chalcones sont ainsi transformées au cours des procédés de fabrication agro-alimentaires. Par exemple, les tomates contiennent de la naringénine chalcone qui n'est retrouvée qu'à l'état de trace dans le ketchup (Tomas-Barberan & Clifford, 2000).

Les anthocyanes (chapitre 1, § I.1.2.3, figure 17, figure 18) sont des pigments très répandus dans la nature et présentant des couleurs variées allant du jaune-orangé au bleu-violet. Particulièrement solubles dans les phases aqueuses acides, elles sont utilisées comme colorant alimentaire. Cette utilisation est cependant restreinte par leur faible stabilité à la lumière, à la température et aux pH élevés (Giusti & Wrolstrad, 2003).

En effet, aux pH acides, les anthocyanes sont majoritairement présentes sous forme cation flavylum A⁺, stable (figure 17). A un pH supérieur à 3, le cation flavylum peut perdre un proton ou s'hydrater. La perte de proton engendre des bases quinoniques A plus ou moins stabilisées par mésomérie, ces composés ont une teinte bleue. Par hydratation, les anthocyanes prennent la forme pseudobase carbinol B, cette forme incolore peut s'isomériser en chalcone C par ouverture du cycle et c'est cette molécule qui est très instable (figure 17).

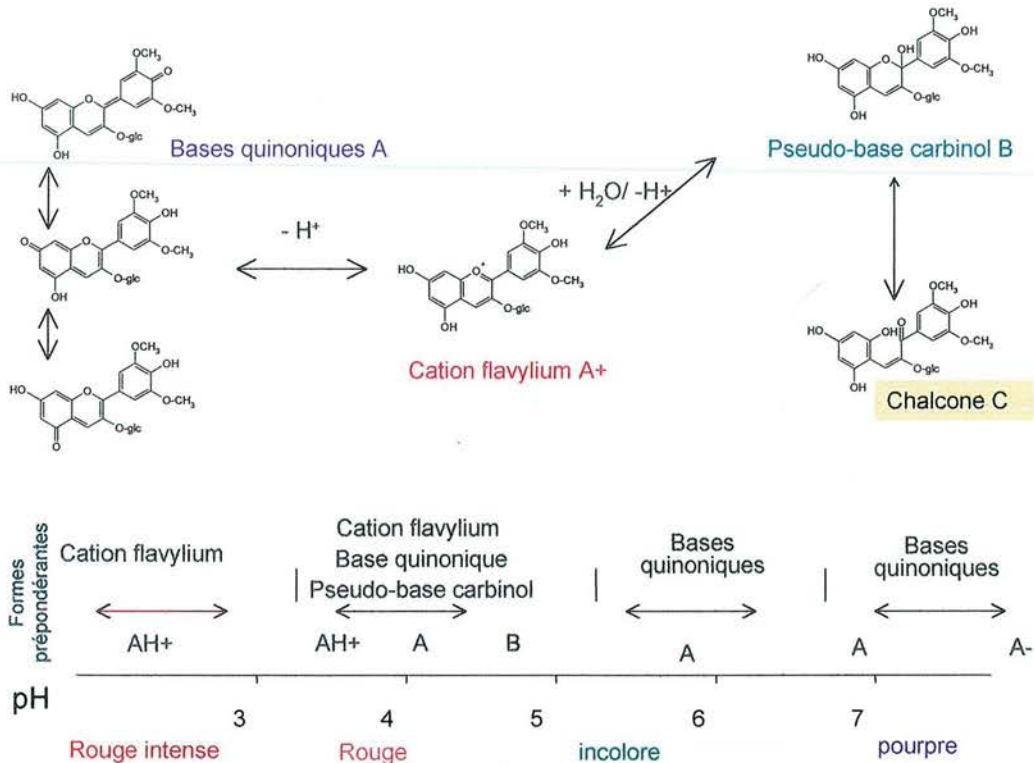


figure 17 : les différentes formes de la malvidine-3-glucoside (oenine) en milieu aqueux (Houbiers *et al.*, 1998).

L'étude des couleurs chatoyantes des fleurs de nombreuses plantes a permis de dégager plusieurs informations sur les règles régissant la stabilité de ces composés.

La glycosylation en 3 de l'anthocyanidine est indispensable à la stabilité du pigment. L'augmentation du nombre de résidus glycosides liés au sucre en 3 ou à un autre hydroxyle phénolique améliore la stabilité.

Les acides hydroxycinnamiques greffés sur les sucres peuvent aussi améliorer la stabilité avec un effet hyperchrome et un effet bathochrome (figure 18). Cependant, pour apporter ces propriétés, ils doivent être positionnés de façon précise sur l'anthocyane. En effet, le noyau aromatique du groupement acyle doit entrer en interaction hydrophobe avec le noyau C afin de protéger la molécule, et principalement le carbone 2, de l'hydratation (Dougall *et al.*, 1997). Ce phénomène est appelé copigmentation.

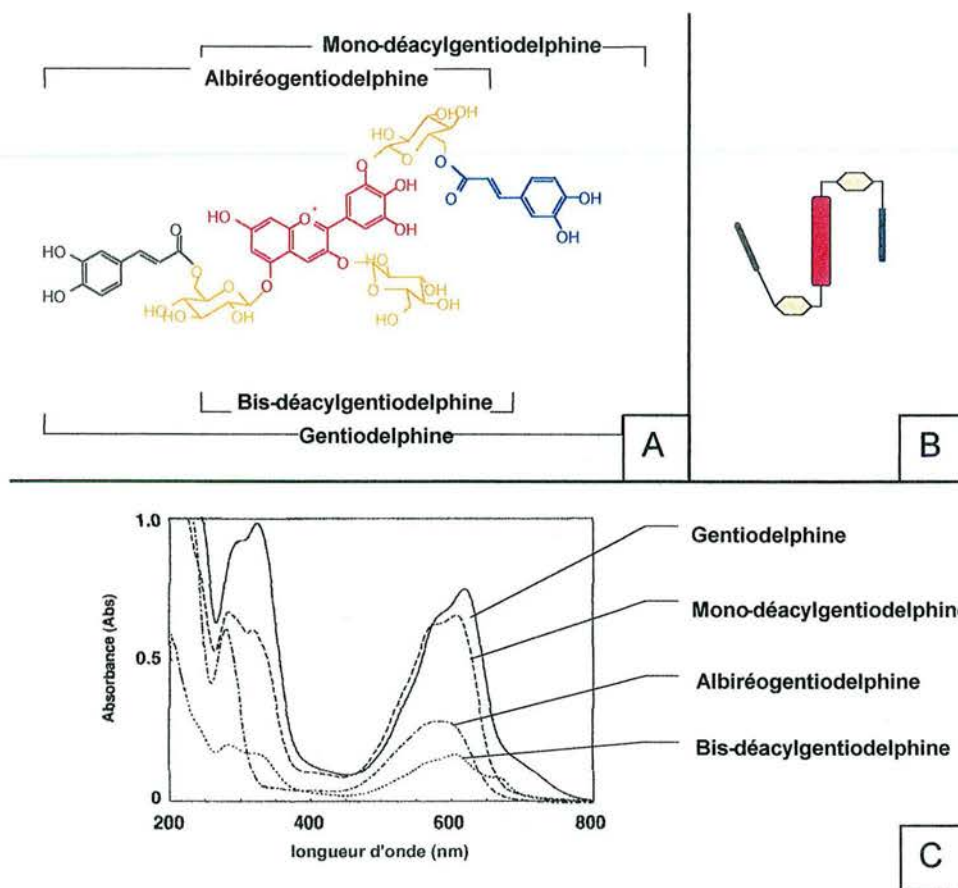


figure 18 : exemple d'anthocyane stable, la gentiodelphine.

3-O-(β -D-glucopyranosyl)-5-O-(6-O-(E)-caféate- β -D-glucopyranosyl)-3'-O-(6-O-(E)-caféate- β -D-glucopyranosyl)-delphinidine (Yoshida *et al.*, 2000). A) structure de la gentiodelphine et de ses dérivés, B) structure schématisée de la gentiodelphine. C) absorption UV-visible de la gentiodelphine et de ses dérivés.

La copigmentation peut avoir lieu entre l'anthocyane et un des groupements acyles qui lui sont liés, on parle alors de copigmentation intramoléculaire (figure 18) ou entre le pigment et une autre molécule (anthocyane, flavonoïde, alcaloïde, etc), on parlera alors de copigmentation intermoléculaire. La copigmentation intramoléculaire entre une anthocyane acylée et un autre flavonoïde a même été rapportée par Bloor & Falshaw, 2000 et Figueiredo *et al.*, 1996. L'anthocyane et le flavonoïde sont liés de façon covalente par un pont diester malonique ou succinique. Ce pont est formé entre les hydroxyles primaires des parties glycosidiques de l'anthocyane et du flavonoïde.

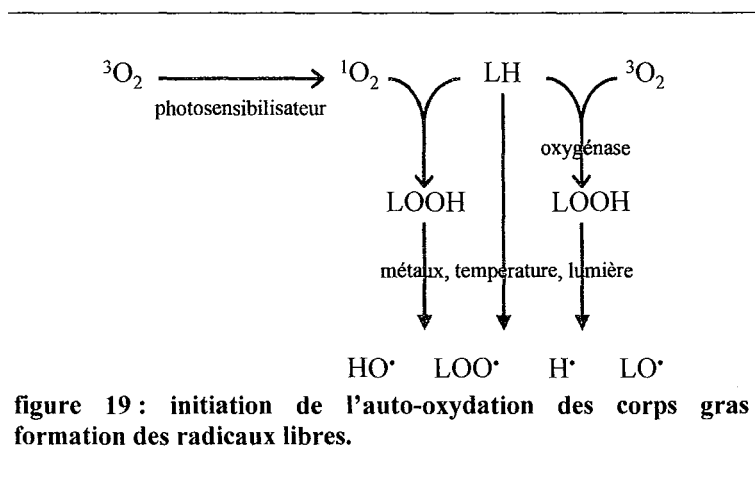
Ainsi, les fleurs aux couleurs vives et bleues possèdent des anthocyanes hautement glycosylées et acylées (Yoshida *et al.*, 1991).

Récemment, la commercialisation d'anthocyanes extraites de carottes noires par Overseal Foods Ltd. a rencontré un certain succès car les pigments extraits de ce végétal sont fortement acylés et donc plus stables à la chaleur, à la lumière, au pH et aux sulfites que ceux extraits du raisin et du sureau, ils peuvent de plus être produits toute l'année (Downham & Collins, 2000).

I.2.4. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

Dans de nombreuses préparations alimentaires et cosmétiques, l'utilisation d'antioxydants est de mise. En effet, les matières grasses, les molécules aromatiques, les protéines et l'ADN sont sujets à l'oxydation. Ce phénomène néfaste entraîne des modifications de couleur, de texture, de saveur (goût rance) et une perte de la valeur nutritionnelle du produit. Il peut même engendrer des produits toxiques.

Les réactions d'oxydation en chaîne commencent par une étape dite d'initiation ou d'induction au cours de laquelle sont formés des radicaux libres (figure 19). Cette étape d'initiation peut-être catalysée par la lumière, la température, les métaux et certaines oxygénases ; elle est aussi favorisée par la présence de photosensibilisateurs tels que certains pigments naturels comme les chlorophylles.



Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron non apparié. Ces électrons cherchent en général à former une paire. Ainsi, les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et alcooxyles sont en général hautement réactifs et ils donnent lieu à la deuxième étape de la réaction : la propagation. Au cours de cette étape, on assiste à des réactions de transfert d'hydrogène, d'addition, de substitution aromatique et de β -scission.

La terminaison de la réaction a lieu lors de réactions de couplage entre deux radicaux libres ou lorsque le radical est désactivé par réaction avec un composé donnant lieu à un radical plus stable. En effet, certains radicaux sont relativement stables tels que les radicaux tocophéryles et déhydroascorbyle.

I.2.4.1. Antioxydants : définition

Un antioxydant est un composé qui, ajouté à faible dose à une substance naturellement oxydable à l'air, permet de ralentir le phénomène d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit : rancissement, décoloration.

Un antioxydant alimentaire parfait doit être non toxique, incolore, inodore, efficace à faible concentration, facilement incorporable, stable en cours de fabrication et dans le produit fini. Les mêmes principes sont retenus pour l'utilisation des antioxydants en industrie cosmétique.

L'activité antioxydante (figure 20) repose sur les propriétés chimiques du composé telles que les propriétés oxydoréductrices, de partition, chélatantes, de donneur d'hydrogène ou d'agents séquestrants de radicaux (Williamson *et al.*, 1999).

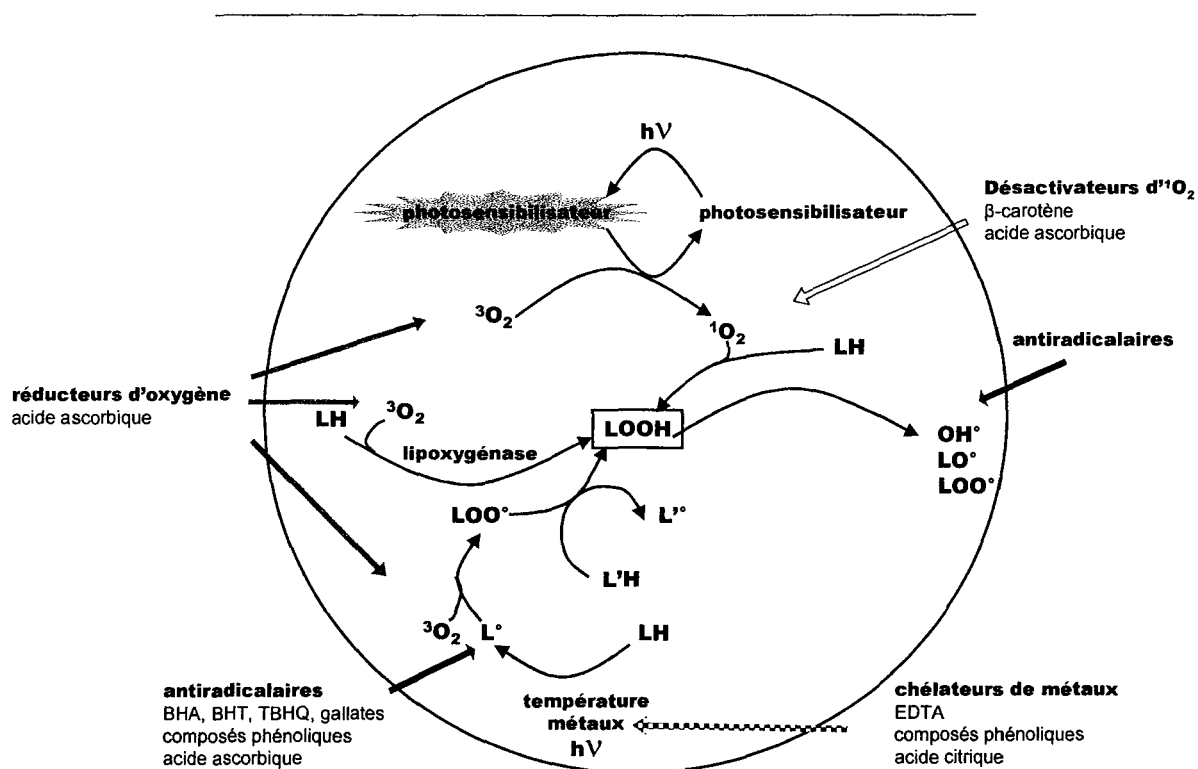


figure 20 : action des antioxydants

Les antioxydants primaires désactivent les radicaux libres hautement réactifs en se transformant en radicaux thermodynamiquement plus stables.

Les antioxydants préventifs ou antioxydants secondaires retardent l'initiation de la réaction en chaîne.

I.2.4.2. Modes d'action des antioxydants phénoliques

Les composés phénoliques peuvent céder rapidement un proton aux radicaux lors d'une réaction exothermique. Considérant ce type de réaction, l'efficacité de l'antioxydant phénolique est forte lorsque la force de liaison antioxydant – proton est faible. Le radical formé lorsque le phénol cède un proton est stabilisé par délocalisation autour du noyau aromatique (figure 21A).

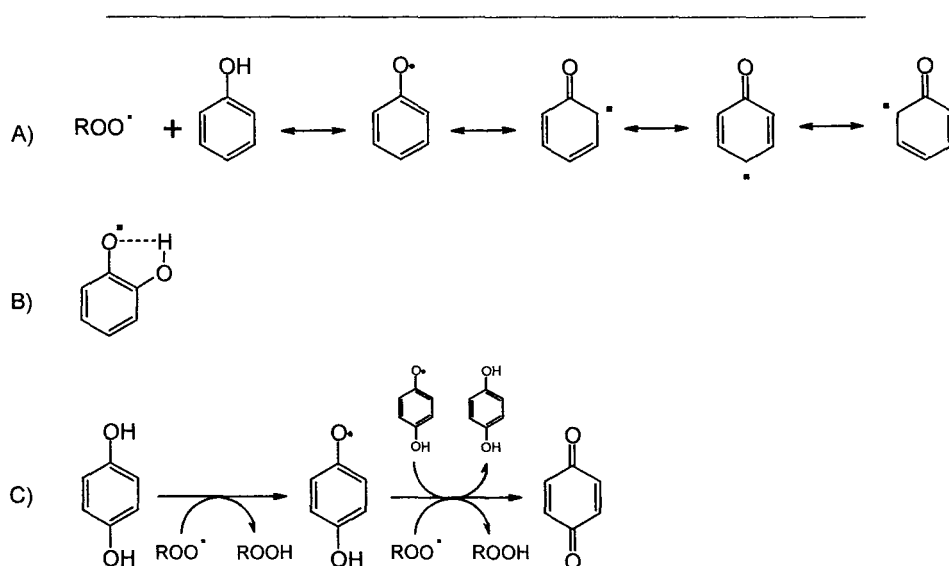


figure 21 : stabilisation du radical par un composé phénolique.
A) par délocalisation, B) par liaison hydrogène, C) par formation de quinones.

Les substituants alkyles en ortho et en para augmentent la densité électronique au niveau de l'hydroxyle par un effet inductif. Le radical phénoxy est d'autant plus stable que le groupement en ortho est encombrant. On peut citer les antioxydants phénoliques de synthèse tels que le 3-ter-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), et le 3,5-di-ter-butyl-4-hydroxytoluène (BHT), qui possèdent des groupements ter-butyles en ortho (Shahidi & Wanasundara, 1992). D'autre part, la présence d'un deuxième hydroxyle en ortho, formant le groupement catéchol, permet la stabilisation du radical par liaison hydrogène (figure 21B). Les composés phénoliques possédant deux hydroxyles en ortho ou en para peuvent capter un deuxième électron et former une quinone (figure 21C).

Les flavonoïdes exercent leur action antioxydante comme les autres antioxydants phénoliques de structure plus simple.

I.2.4.3. Les flavonoïdes en tant qu'antioxydants primaires : relation structure-activité

Grâce à leur potentiel d'oxydoréduction bas, de 0,23 à 0,75 V, les flavonoïdes peuvent réduire tous les radicaux ayant un potentiel supérieur à 1 V (Pietta, 2000, tableau 6).

tableau 6 : Potentiels de réduction (volts) de quelques couples radicalaires.

<i>A</i>		<i>B</i>		<i>C</i>	
HO [•] , H ⁺ / H ₂ O	2,310	Dihydroquercétine	0,083	Hespéridine	0,720
RO [•] , H ⁺ / ROH (alkoxyde)	1,600	Kaempférol	0,209	Rutine	0,600
ROO [•] , H ⁺ / ROOH (peroxyde)	1,000	Lutéoline	0,299	Catéchine	0,570
PUFA [•] , H ⁺ / PUFA-H	0,600	Fiséline	0,214		
HU [•] , H ⁺ / UH ₂ (urate)	0,590	Quercétine	0,398		
TO [•] , H ⁺ / TOH (tocopherol)	0,480	Rutine	0,275		
Ascorbate ^{•-} , H ⁺ / ascorbate ⁻	0,282				

Colonne A : à pH 7 (Buettner G. R., 1993), colonne B : à pH 8.5 (Bors *et al.*, 1995), colonne C : à pH 7 (Jovanovic *et al.*, 1994).

L'activité antioxydante d'un composé est déterminée par sa capacité à former un radical stable. Dans le cas des flavonoïdes, le nombre et la position des hydroxyles phénoliques jouent un rôle primordial sur cette activité (Shahidi & Wanasundara, 1992).

Le test TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity) permet de comparer l'activité antioxydante des flavonoïdes. Ce test reflète la capacité qu'a l'antioxydant à céder un proton au cation radicalaire ABTS (acide 2,2'-azinobis-[3-éthyl] benzothiazoline-6-sulphonique).

La présence d'un groupement catéchol sur le noyau B du flavonoïde améliore considérablement le pouvoir antioxydant (Williamson *et al.*, 1999, Dugas *et al.*, 2000). L'influence d'un troisième hydroxyle phénolique adjacent à ce groupement catéchol, formant un groupe pyrogallol, est dépendante des conditions réactionnelles (Rice-Evans *et al.*, 1996, Furuno *et al.*, 2002). Le pouvoir antioxydant des composés porteurs de la fonction pyrogallol peut être accru, cas de la catéchine, ou diminué, cas de la myricétine.

Les flavonoïdes ayant un maximum d'activité antioxydante sont les flavonols. En effet, la présence combinée de la double liaison en 2,3, de l'hydroxyle en 3 et du carbonyle en 4 permet la délocalisation de l'électron radicalaire sur toute la molécule.

L'insaturation entre les carbones 2 et 3 permet la délocalisation électronique du noyau B au noyau A (figure 22). Ainsi, la même activité anti-oxydante est obtenue pour la

quercétine et la cyanidine, toutes deux supérieures à la catéchine pour un même nombre d'hydroxyles (Rice-Evans *et al.*, 1995). Cependant cette insaturation contribue peu au pouvoir antioxydant lorsqu'il n'y a qu'un hydroxyle sur le noyau B. En effet, la naringénine, flavonoïde 2,3 saturé a une activité antioxydante équivalente à celle de l'apigénine, flavonoïde 2,3 insaturé (figure 22).

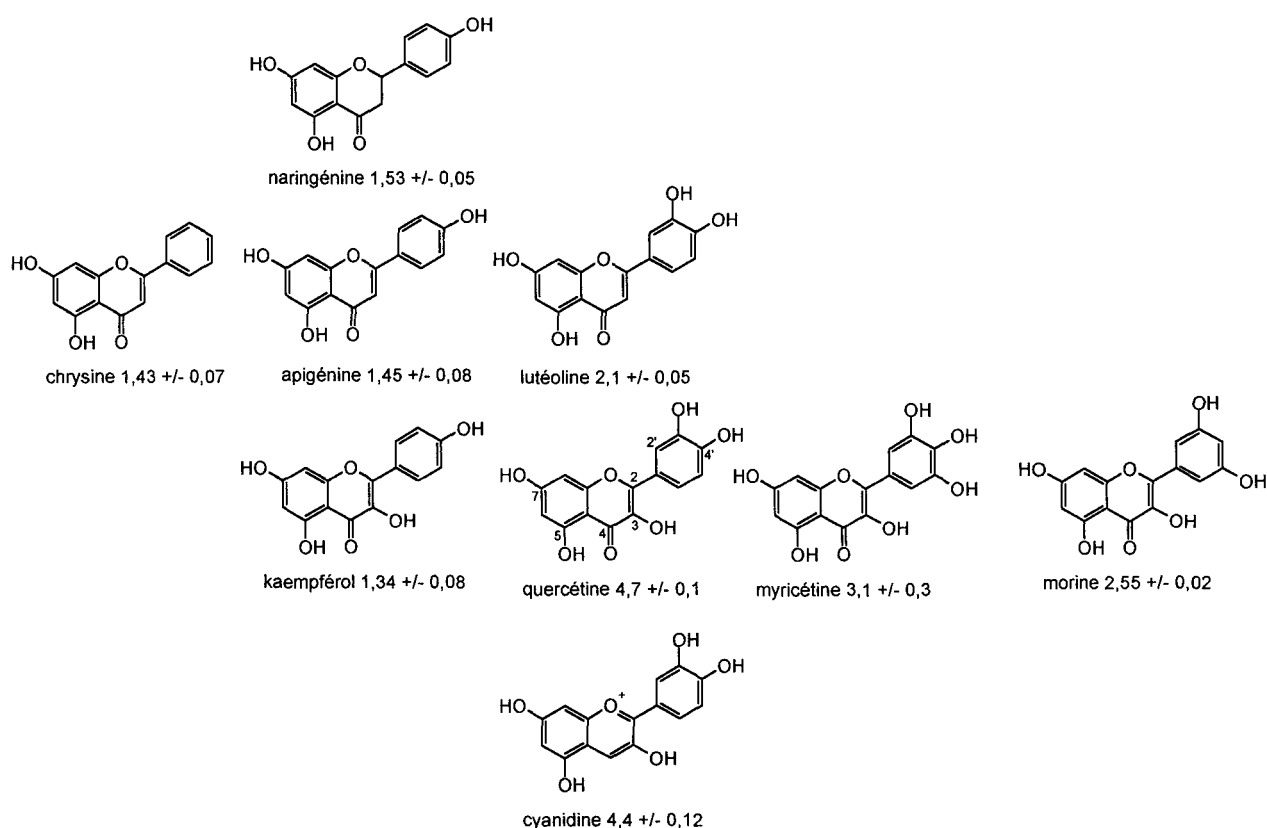


figure 22 : relation structure, pouvoir antioxydant de quelques flavonoïdes mise en évidence au moyen du test TEAC

La valeur indiquée représente la concentration d'une solution de Trolox (équivalent hydrosoluble de la vitamine E) ayant un potentiel antioxydant équivalent à une solution contenant 1 mM du composé à tester (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Il est important que l'hydroxyle en 3 soit présent et libre, c'est à dire, non glycosylé pour avoir un maximum d'activité. La diminution d'activité due à la glycosylation en 3 est particulièrement importante pour les flavonoïdes porteurs d'un catéchol sur le noyau B. La rutine porteuse d'un rutinose sur cette position est moins efficace que la quercétine. La glycosylation du noyau B des flavonols diminue aussi fortement leur activité antioxydante (Williamson *et al.*, 1999, Russo *et al.*, 2000).

Le noyau A porte généralement des hydroxyles en position 5 et 7 et participe au pouvoir antioxydant en milieu aqueux, mais peu en phase lipidique. La présence de l'hydroxyle en 5 avec la fonction céto en 4 (figure 23) permet la stabilisation du radical par liaison hydrogène (Heim *et al.*, 2002, Rice-Evans *et al.*, 1996).

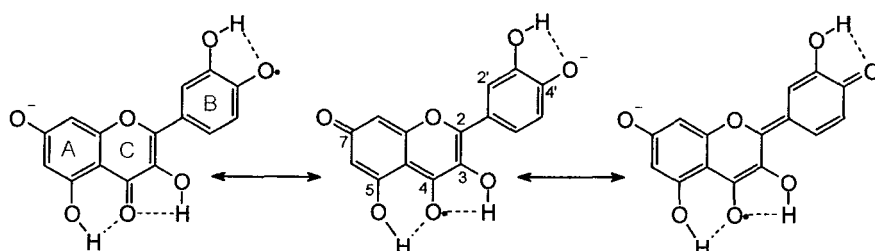
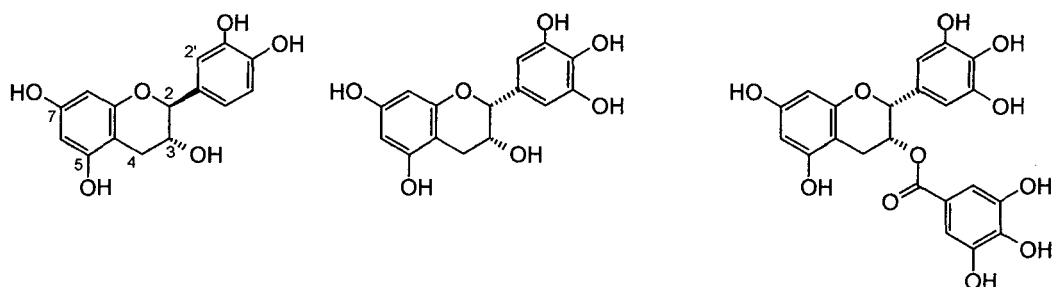


figure 23 : les différentes formes du radical de la quercétine, à pH 11,5 (Fougerousse *et al.*, 1996).

Les catéchines gallates sont parmi les meilleurs antioxydants en phase aqueuse grâce à leur nombre élevé d'hydroxyles (Furuno *et al.*, 2002), bien que leur structure (figure 24) ne permette pas la délocalisation sur toute la molécule. La galloylation de flavanols augmente leur efficacité en phase aqueuse, mais la diminue en phase lipidique (Williamson *et al.*, 1999).



(+)-catéchine 2,40 +/- 0,05 (-)-épigallocatechine 3,82 +/- 0,02 (-)-épigallocatechine gallate 4,75 +/-

figure 24 : test TEAC appliqué aux flavanols (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Tamura & Yamagashi, 1994 ont mesuré la formation de malonaldéhyde produit par l'oxydation de linoléate en présence d'acide 4-hydroxycinnamique, de malvidine 3-O-glucoside, de malvidine 3-O-(6-O-(4-hydroxycinnamate)-glucoside) ou d'un mélange acide 4-hydroxycinnamique / malvidine 3-O-glucoside. Ils ont trouvé que le mélange acide 4-hydroxycinnamique / malvidine 3-O-glucoside a un pouvoir antioxydant équivalent à celui de la malvidine 3-O-glucoside alors que l'anthocyane acylée protège plus efficacement le

linoléate de l'oxydation. En effet, le groupement 4-hydroxycinnamate n'est qu'un faible antioxydant mais il agit comme un synergiste intramoléculaire.

I.2.4.4. Les flavonoïdes en tant qu'antioxydants préventifs

Les flavonoïdes exercent leurs fonctions d'antioxydants secondaires en partie, par l'absorption des rayonnements UV (chapitre 1, § I.2.2). Par exemple, Bonina *et al.*, 1996 ont testé l'effet photoprotecteur de la quercétine, de l'héspéridine et de la naringénine sur des liposomes de phosphatidylcholine et ont conclu qu'ils agissaient non seulement grâce à leur activité de séquestration de radicaux mais aussi par leur forte capacité d'absorption des radiations UV.

En outre, les flavonoïdes préviennent l'initiation de la réaction d'oxydation par chélation des métaux. En effet, les cations métalliques tels que Fe^{3+} et Cu^{2+} sont capables d'initier la réaction en chaîne d'oxydation des lipides. La réaction de l'ion ferreux avec du peroxyde d'hydrogène donne lieu à la formation du radical hydroxyde et de l'ion ferrique. Ce type de réaction est connu sous le nom de réaction de Fenton. Au cours de ce processus, la production de radical hydroxyle est directement reliée à la concentration en fer ou en cuivre (Heim *et al.*, 2002). Les cations métalliques sont ainsi les catalyseurs de la décomposition des hydroperoxydes en radicaux libres.

Le groupement phénolique seul, sous sa forme protonée, n'est pas un très bon ligand pour les cations métalliques. Le groupement catéchol permet une chélation très efficace aux pH physiologiques (Hider *et al.*, 2001). En effet, bien que le pKa des phénols soit de l'ordre de 9 à 10, en présence de certains métaux tels que Fe^{3+} et Cu^{2+} le proton est déplacé à des valeurs de pH plus faibles : de 5 à 8. Cette propriété est due à la stabilisation par effet mésomère. Les flavonols sont aussi en mesure de chélater les métaux au moyen de leurs groupements 3-hydroxy / 4-céto et 4-céto / 5-hydroxy (figure 25).

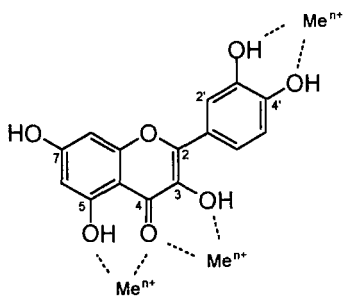


figure 25 : chélation des métaux par les flavonols (Pietta, 2000, Hider *et al.*, 2001).

On note que le complexe flavonoïde/métal, comme le flavonoïde non complexé, peut s'avérer capable de séquestrer les espèces réactives d'oxygène (Arora *et al.*, 1998, Cheng & Breen, 2000).

Lorsque les flavonoïdes possèdent plusieurs groupements chélateurs de métaux, il peut y avoir polymérisation comme le montre la figure 26.

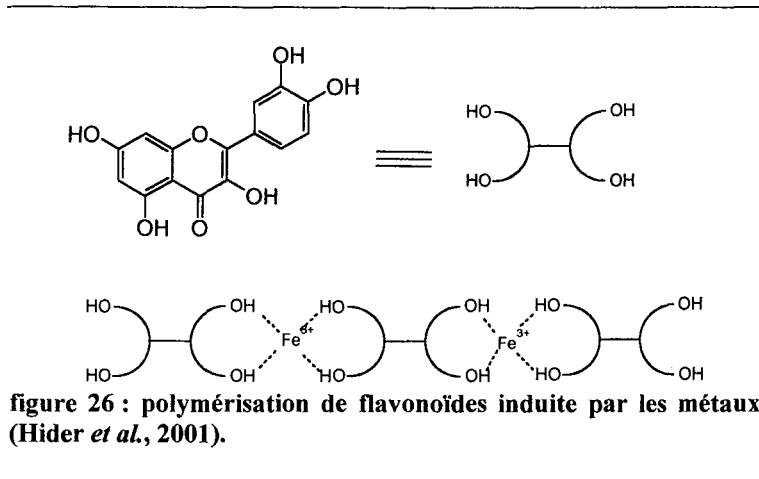


figure 26 : polymérisation de flavonoïdes induite par les métaux (Hider *et al.*, 2001).

La co-polymérisation des flavonoïdes et du fer est responsable d'un type d'anémie chez les grands consommateurs de thé. En effet, les flavonoïdes du thé forment des complexes insolubles avec le fer, ce qui empêche son absorption au niveau de l'intestin (Wang *et al.*, 2000).

I.2.4.5. Synergie avec d'autres antioxydants

Certains flavonoïdes sont en mesure de réduire les radicaux formés par d'autres antioxydants sur la base de leur potentiel rédox (tableau 6, page 29).

Ainsi, les flavonoïdes ont une action synergique avec l'acide ascorbique (Bors *et al.*, 1995), l'urate (Filipe *et al.*, 2001) et la vitamine E. Les flavones ont d'ailleurs été nommées vitamine P en raison de la protection qu'elles exercent sur l'acide ascorbique.

I.2.4.6. Notion d'antioxydant structural

Bien qu'étant des molécules hydrophobes, les flavonoïdes peuvent interagir avec les têtes polaires des phospholipides par liaisons hydrogènes. Grâce à leur noyau hydrophobe, ils peuvent s'introduire dans les bicouches lipidiques particulièrement s'ils possèdent une conformation plane comme c'est le cas pour la quercétine (Saija *et al.*, 1995).

Arora *et al.*, 2000 ont montré que l'insertion dans la bicouche lipidique de flavonoïdes tels que la naringénine, la génistéine, l'équol et la dihydrodaïdzéine diminue la fluidité membranaire ce qui contribue à la protection contre la peroxydation par ralentissement des réactions radicalaires.

Les flavanols et leurs polymères, les proanthocyanidines, quant à eux, ne modifient pas les propriétés physiques des membranes (Verstraeten *et al.*, 2003). Les proanthocyanidines interagissent avec les têtes polaires des phospholipides gênant l'accès à la membrane des oxydants liposolubles ainsi que des agents tensioactifs. Ces propriétés permettant le maintien de l'intégrité des membranes pourraient être responsables de la diminution de l'hémolyse des érythrocytes de rats soumis à un régime riche en flavanols et proanthocyanidines.

I.2.5. Interaction avec les protéines

I.2.5.1. Complexation réversible

La complexation polyphénols / protéines a lieu par interactions hydrophobes et par liaisons hydrogènes à la surface ou dans les cavités de la protéine (Shahidi & Naczki, 1995).

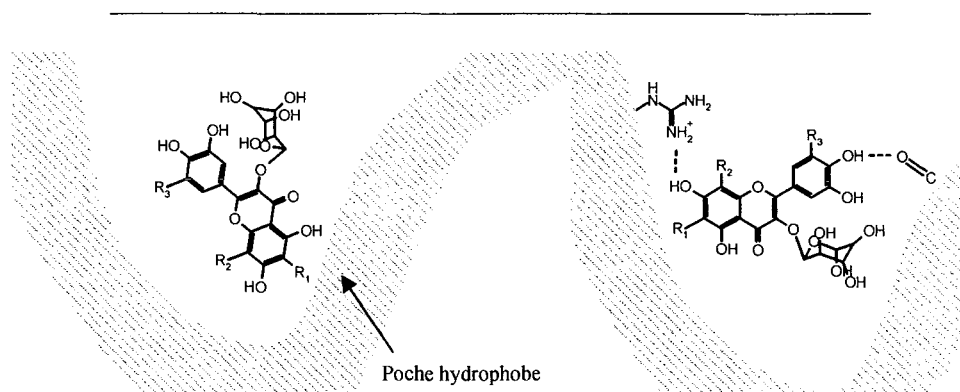


figure 27 : complexation réversible flavonoïdes-protéines (Shahidi & Naczki, 1995).

La liaison avec des protéines permettrait de maintenir des concentrations plasmatiques significatives en flavonoïdes, prolongeant ainsi leur action antioxydante (Dangles *et al.*, 2001). Alluis & Dangles, 1999 ont étudié le phénomène de liaison entre un flavonoïde (la chrysrine-7- β -D-O-glucoside) et la sérum albumine bovine. Les auteurs ont montré que le flavonoïde acylé par un groupement 4-méthoxycinnamate possède une capacité accrue à lier les protéines.

I.2.5.2. Complexation irréversible

Les polyphénols présentant une fonction catéchol sont oxydables sous l'action d'enzymes, de métaux, ou spontanément en milieu basique, ils forment des ortho-quinones. Ces quinones réagissent rapidement avec les groupes nucléophiles, amines et thiols des protéines pour former un complexe polyphénol/protéine lié de façon covalente.

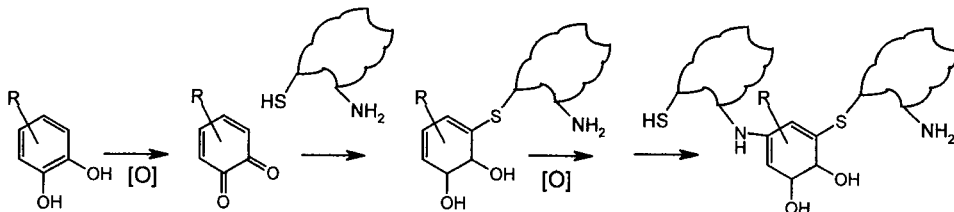


figure 28 : complexation irréversible flavonoïdes-protéines (Haslam *et al.*, 1992).

Ce type de réaction est largement répandu, on peut citer par exemple le brunissement enzymatique et non enzymatique des fruits, la formation du trouble de la bière, la maturation des vins, la formation de l'humus, le durcissement de l'exosquelette des insectes et le tannage du cuir. La complexation covalente des dérivés oxydés de flavonoïdes est aussi observée sur l'ADN (Walle *et al.*, 2003).

I.2.6. Inhibition d'enzymes

L'inhibition par les flavonoïdes concerne toutes les classes d'enzymes. Les quelques inhibitions décrites ci-dessous ne représentent qu'une petite partie des modulations enzymatiques attribuées aux flavonoïdes connues à ce jour. De plus, actuellement, de nombreuses publications mentionnent de nouvelles inhibitions enzymatiques par les composés phénoliques.

I.2.6.1. Inhibition d'oxydoréductases

Certaines oxydoréductases sont inhibées par les flavonoïdes. Ce sont celles qui utilisent les pyridines et flavines nucléotides comme cofacteur de transfert d'électron. En effet, ces cofacteurs possèdent des ressemblances structurales avec les flavonoïdes, et cofacteurs et flavonoïdes peuvent donc entrer en compétition pour l'accès au site actif. Ces

enzymes catalysent des réactions radicalaires (Havsteen, 2002). Les radicaux produits peuvent être séquestrés par les flavonoïdes.

Les propriétés chélatantes des polyphénols peuvent s'exercer au sein du site actif des métalloenzymes telles que les oxydoréductases à cuivre ou à fer, inhibant ainsi leur activité. Xie *et al.*, 2003 ont étudié l'inhibition d'une tyrosinase fongique par les flavonoïdes. Ces auteurs ont montré que le cuivre catalytique de cette enzyme est chélaté par la fonction 3-hydroxy, 4-céto des flavonols. Ce phénomène est aussi impliqué dans l'inhibition des lipoxygénases (Formica & Regelson, 1995).

Les cytochromes P450 jouent un rôle clef dans le métabolisme des xénobiotiques : médicaments et carcinogènes. Les flavonoïdes peuvent soit inhiber, soit activer les cytochromes P450, *in vitro*, et leur action dépend de leur structure, de leur concentration et des conditions expérimentales (Chao *et al.*, 2002).

Grâce à leur fonction 4-oxo, ils entrent en compétition avec la xanthine pour l'entrée dans le site actif de la xanthine oxydase (Russo *et al.*, 2000), le meilleur inhibiteur de type flavonoïde de cette enzyme est la lutéoline (Cos *et al.*, 1998).

L'inhibition des oxydoréductases peut aussi être de type allostérique. C'est le cas, par exemple, de la cholestérol 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase impliquée dans la biosynthèse du cholestérol.

Les flavonoïdes acylés inhibent les cyclo-oxygénases par transfert de leur groupement acyle sur la sérine du site actif de l'enzyme, mode d'action identique à celui de l'aspirine. Seule l'isoenzyme responsable de la réaction inflammatoire est inhibée par les flavonoïdes et pas celle qui participe au mécanisme de réparation des tissus. La sélectivité des flavonoïdes rend leur action plus efficace que celle de l'aspirine dans le traitement des ulcères (Havsteen, 2002).

I.2.6.2. Inhibition d'enzymes des autres classes

La modulation des kinases et phosphoryl-transférases par les flavonoïdes a des répercussions sur le métabolisme cellulaire (Christensen *et al.*, 1987, Akiyama *et al.*, 1987)

D'autres transférases, telles que la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT), peuvent utiliser les flavonoïdes comme substrat. Zhu & Liehr, 1996 ont montré que la quercétine inhibe la COMT *in vitro* par mécanisme compétitif et non compétitif. Elle provoque ainsi l'accumulation de catécholestrogènes dans le rein pouvant induire une tumeur.

Au cours d'une réaction d'inflammation, le tissu conjonctif est protégé par l'action antioxydante des flavonoïdes mais aussi par l'inhibition qu'ils exercent sur la hyaluronidase qui dégrade les tissus conjonctifs (Havsteen, 2002).

Les anthocyanes inhibent l'élastase, la trypsine, l' α -chymotrypsine. Certains flavonoïdes inhibent la HIV-1 protéinase, des protéases microbiennes (Schramm & German, 1998). Les flavonoïdes inhibent aussi certaines lipases (Kawaguchi *et al.*, 1997), des phospholipases qui sont impliquées dans le métabolisme des eicosanoïdes et des phosphatases.

En ce qui concerne les isomérases, l'inhibition des topoisomérases I, II et IV par les flavonoïdes a été rapportée par de nombreux auteurs (Austin *et al.*, 1992, Boege *et al.*, 1996, Constantinou *et al.*, 1995). Cette propriété pourrait être impliquée dans l'activité antibactérienne des flavonoïdes (Bernard *et al.*, 1997).

Les flavonoïdes inhibent les ligases grâce à leur ressemblance structurale avec l'ATP co-substrat de ces enzymes (Havsteen, 2002).

I.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes

L'ensemble des propriétés décrites ci-dessus a d'importantes répercussions en santé humaine. Outre les « médiatiques » bienfaits des composés polyphénoliques contre les maladies cardio-vasculaires (Kafatos, 1999, Hertog *et al.*, 1993a), les propriétés des flavonoïdes ont des répercussions sur d'autres domaines physiologiques, tels que la lutte contre les infections, la carcinogenèse (Hertog *et al.*, 1993b) et le métabolisme hormonal.

I.3.1. Activité antimicrobienne et antivirale

Les activités antibactériennes et antivirales des flavonoïdes ont souvent été mises en évidence par des auteurs qui cherchaient à poser des bases biologiques à l'utilisation des remèdes de médecine traditionnelle.

Les flavonoïdes exercent leur activité antivirale en inhibant les enzymes de la synthèse des acides nucléiques telles que les topoisomérases (chapitre 1, § I.2.6.2), les polymérases à ADN et ARN dont la transcriptase inverse du virus HIV, ou par liaison avec les protéines virales (Formica & Regelson, 1995). Les flavonoïdes protègent les cellules contre de nombreux autres virus tels que le virus d'Epstein-Barr, les virus des hépatites, les mengovirus

(Schramm & German, 1998). La quercétine est notamment capable d'inactiver l'herpès simplex de type I et le virus de la polio de type I (Shahidi & Naczki, 1995).

Au cours d'une infection virale ou bactérienne, les flavonoïdes renforcent les mécanismes de défense de l'organisme en stimulant la production et l'action des interférons et du TNF (tumor necrosis factor) (Schramm & German, 1998).

Dès 1986, un effet antimicrobien a été attribué aux proanthocyanidines et aux flavonols extraits des aires. Marvan & Nagel, 1986 ont, de plus, mis en évidence une action synergique entre proanthocyanidines et acide benzoïque et entre flavonols et acide benzoïque.

Autres exemples : les flavonoïdes de la réglisse (la licochalcone A, la licoricidine et la gancanone) exercent leur activité contre des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles ou résistantes à la méthicilline (Fukai *et al.*, 2002). La baicaline est efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Ng *et al.*, 1996).

Un exemple intéressant de flavonoïde acylé à activité antibactérienne est rapporté par Liu *et al.*, 1999. Ces auteurs ont extrait de *Stenochlaena palustris* des dérivés de kaempférol glycosylés et acylés agissant contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*. Ils ont relié l'activité antibactérienne de ces composés à la configuration cis des groupements acyles. En effet, le 3-O-(3'', 6''-di-O-cis-4-hydroxycinnamate) de kaempferol- β -D-glucopyranoside avec ses deux groupements hydroxycinnamates en cis a un pouvoir antibactérien sur ces souches proche du chloramphénicol, antibiotique classique.

I.3.2. Activité œstrogénique et anti-œstrogénique

Les isoflavones du soja possèdent une activité œstrogénique faible environ 1000 à 10000 fois plus faible que celle du 17- β -œstradiol *in vitro*. Cependant, les consommateurs de soja ont des concentrations sanguines en isoflavones beaucoup plus hautes que les œstrogènes. Il a été montré que ces flavonoïdes, aussi appelés phytoœstrogènes, exercent une activité œstrogénique quand ils sont placés dans un environnement à faible concentration en œstrogènes et que leur activité est anti-œstrogénique dans un environnement à haute concentration en œstrogènes (Messina, 1999). Les isoflavones entrent en compétition avec les œstrogènes endogènes pour la liaison aux récepteurs à œstrogènes.

Ces propriétés ont des incidences sur la densité osseuse et sur plusieurs types de cancers. Par exemple, Valente *et al.*, 1994 ont montré qu'une isoflavone de synthèse : la 7-isopropoxyisoflavone augmente la masse osseuse des femmes postménopausées.

I.3.3. Action sur le système cardio-vasculaire

Les recherches sur les flavonoïdes se sont multipliées depuis la découverte du paradoxe français selon lequel le taux de mortalité lié aux maladies cardiovasculaires est faible pour une consommation importante d'acides gras saturés lorsqu'elle est associée avec la consommation de vin rouge (Nijveldt *et al.*, 2001). Dans le vin rouge, à la fois l'éthanol et les flavonoïdes sont impliqués dans les mécanismes de protection contre les maladies cardio-vasculaires.

Plusieurs phénomènes permettent le maintien de l'intégrité vasculaire par les flavonoïdes.

Ils diminuent la cholestérolémie en agissant sur le métabolisme du cholestérol (§ I.2.6.1).

Les flavonoïdes inhibent les cyclooxygénases et lipoxygénases (I.2.6.1), enzymes responsables de la cascade oxydative menant à la réaction inflammatoire notamment au niveau du système vasculaire (Friesenecker *et al.*, 1995, Nijveldt *et al.*, 2001). Une récente étude a mis en évidence ce type d'activité pour un flavonoïde acylé : le tiliroside : 6''-(4-hydroxycinnamate) de kaempférol 3-O-β-D-glucoside (Sala *et al.*, 2003).

De plus, par leur action sur la phosphodiesterase cyclique et les kinases (Schoene & Guidry, 1999), les flavonoïdes inhibent l'agrégation plaquettaire.

Les flavonoïdes inhibent l'oxydation des LDL (low density lipoproteins), grâce à leurs propriétés antioxydantes et aux inhibitions qu'ils exercent sur les enzymes telles que les lipoxygénases, cyclo-oxygénases, phospholipases (Formica & Regelson, 1995). Or, les LDL modifiées chimiquement, et notamment les LDL oxydées, sont reconnues responsables de la formation de plaques athérosclérotiques (Cook & Samman, 1996).

Ils inhibent, également, la synthèse de vasoconstricteurs et diminuent le flux transmembranaire de calcium par inhibition des protéines kinases (Formica & Regelson, 1995), provoquant ainsi une vasodilatation.

Les extraits de rutacées ou citroflavonoïdes sont couramment utilisés en allopathie pour leur activité phlébotonique. Particulièrement, la diosmine, l'héspéridine, l'héspéridine

méthyl chalcone et la rutine sont utilisées dans des médicaments. Ces flavonoïdes augmentent la résistance de la paroi vasculaire et diminuent sa perméabilité.

I.3.4. Activité anticarcinogénique

Il a été démontré que de nombreux flavonoïdes ont la faculté d'inhiber le développement des tumeurs. Leur effet s'exerce par différents modes d'actions (Shahidi & Naczki, 1995) :

- l'inactivation de carcinogènes
- la réduction de la biodisponibilité des carcinogènes
- leurs propriétés d'antioxydants primaires et secondaires
- l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique
- l'inhibition de kinases et plus particulièrement de la protéine kinase C
- l'inhibition de l'angiogénèse (Cao *et al.*, 2002)

Un des facteurs déclenchant de la carcinogénèse est la dégradation du matériel génétique des cellules. Russo *et al.*, 2000 ont démontré que les flavonoïdes protègent l'ADN de l'oxydation. Par la suite, Morel *et al.*, 2001 ont étudié les mécanismes de protection de l'ADN par le flavonol myricétine. Ils ont montré que ce flavonoïde prévient l'oxydation de l'ADN cellulaire et active les mécanismes de réparation du matériel génétique.

D'autre part, Akiyama *et al.*, 1987 ont montré que les phytoœstrogènes (chapitre 1, § I.3.2) modulent le cycle, la différenciation et la prolifération des cellules cancéreuses.

I.3.5. Action sur la peau

Les flavonoïdes sont utilisés dans les produits cosmétiques du fait de leurs propriétés anti-UV, antioxydantes et amincissantes (Lanzenhofer *et al.*, 2002).

Les rayonnements UV sont divisés en trois groupes. Les UVC de 200 à 290 nm sont des rayonnements à haute énergie, germicides, ils sont stoppés avant l'entrée dans l'atmosphère par la couche d'ozone. Les UVB (280 à 320 nm) sont nocifs pour la santé, ils provoquent des érythèmes ou coups de soleil. Les UVA (320 à 400nm) sont responsables du tannage de la peau ou bronzage, cependant leur innocuité est maintenant largement remise en cause. En effet, les UVA provoquent les réactions de photosensibilisation. Ils sont aussi impliqués dans la photopolymérisation de nombreuses substances chimiques telles que les

polymères dentaires, les plastiques etc... Les flavonoïdes, suivant leur structure, présentent des maxima d'absorption dans la zone de 270 à 350 nm, c'est-à-dire qu'ils absorbent les UVB et une partie des UVA (chapitre 1, § I.2.2).

Plusieurs brevets relatent l'utilisation de flavonoïdes en tant que principe anti-UV. Il peut s'agir de chalcones (Forestier *et al.*, 1989), de flavanones et de flavones extraites d'agrumes (Plaschke, 2002) ou encore d'extraits phénoliques de pomme riches en phloridzine (Gaudout *et al.*, 2003). Gers-Barlag & Scheel, 1999 ont breveté l'utilisation des flavonoïdes dans les crèmes solaires comme protecteurs du dibenzoylméthane qui est le réel principe anti-UV de la formulation.

On peut noter que les flavonoïdes sont aussi incorporés dans de nombreuses autres formulations telles que les crèmes anti-rides (Barrett *et al.*, 2002, Robinson *et al.*, 2002) et les crèmes pour peau hyper-réactive, sujette aux inflammations, ou hypo-active (Lanzenhofer *et al.*, 2001).

Certains flavonoïdes inhibent le transport du glucose au sein des adipocytes entraînant une diminution de la lipogénèse. Il a aussi été démontré que la phloridzine inhibe la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Trebosc *et al.*, 1999). Ces propriétés concernent particulièrement l'application cosmétique amincissante. La société Galénic a mis sur le marché un produit revendiquant les propriétés amincissantes de la phloridzine : Elancyl Cellu-stop. La phloridzine y est présente à hauteur de 5% en association avec la caféine 7% et l'héspéridine méthyl chalcone.

I.3.6. Propriétés organoleptiques

Les polyphénols présents en quantités importantes dans le thé, le café et le vin sont responsables du caractère amer et astringent. Ce goût est attribué aux catéchines (Wang *et al.*, 2000), ainsi qu'à leurs oligomères les proanthocyanidines (Shahidi & Naczk, 1995). Cette propriété est liée au phénomène de précipitation des protéines de la salive et de la paroi buccale par les phénols.

Il est surprenant de noter que de légères modifications structurales de ces composés engendrent une perception totalement différente. Par exemple, la néohespéridine et la naringine sont responsables du goût amer intense de l'orange amère et du pamplemousse. L'amertume dépend de la structure de la partie glycosyle. Ces flavanones portent un néohespéridoside lié au groupement 7 de l'aglycone. Ce disaccharide est composé d'un

rhamnose lié en 1, 2 avec un glucose. Les flavanones-7-rutinosides, qui ne sont pas amères, portent les mêmes sucres liés en 1, 6.

Par hydrogénation de la néohespéridine en milieu basique, il y a formation de la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC). Ce flavonoïde, acariogène et hypocalorique, a un pouvoir sucrant très élevé, environ 1500 fois plus que le saccharose. Sa saveur sucrée est persistante et s'accompagne d'un arrière goût mentholé ou de réglisse.

La NHDC a été acceptée en Europe (E959) et par la FDA comme additif alimentaire (Von Rymon Lipinsk, 2001). Elle est utilisée en confiserie, dans les desserts et dans les boissons non alcoolisées à une concentration maximale de 400 mg.kg⁻¹. Sa saveur mentholée et persistante pose des problèmes d'incompatibilité avec de nombreux aliments, elle est donc utilisée en mélange avec d'autres édulcorants. Le mélange NHDC/saccharine/cyclamate est communément utilisé dans les proportions 25/ 64/ 11% (Linden & Lorient, 2001). Elle participe au renforcement du pouvoir sucrant et masque les notes amères.

tableau 7 : quantités de néohespéridine dihydrochalcone autorisées par l'Union Européenne dans divers produits alimentaires (Von Rymon Lipinsk, 2001).

Produits alimentaires	NHDC en mg.kg ⁻¹ ou mg.l ⁻¹
Boissons	30 à 50
Desserts	50
Sucreries, confiseries	100 à 400
Gommes à mâcher	400
Crèmes glacées	50
Confitures et marmelades	50
Fruits confits	50
Suppléments diététiques	50 à 400

I.3.7. Conclusion

Les flavonoïdes sont des composants incontournables de l'alimentation. Leurs propriétés biologiques *in vitro* se révèlent nombreuses. Cependant, leur solubilité est faible et il semble que leur biodisponibilité soit également faible. Il est donc difficile de corrélérer leurs propriétés *in vitro* avec les effets bénéfiques observés au cours d'études épidémiologiques (Hertog *et al.*, 1993a).

Les flavonoïdes ont un rôle à jouer en tant qu'additif alimentaire ou cosmétique. Ils peuvent être des agents conservateurs grâce à leurs activités antioxydantes (Rice-Evans *et al.*,

1996) et antibactériennes (Fukai *et al.*, 2002), des agents de saveur (Von Rymon Lipinsk, 2001) ou encore des colorants (Downham & Collins, 2000).

L'importance des flavonoïdes va plus loin que leur présence dans l'alimentation. Certains flavonoïdes ont un potentiel en tant que matériel de départ pour le développement de nouveaux principes actifs (Havsteen, 2002). D'ailleurs, quelques médicaments et préparations cosmétiques contenant un mélange de flavonoïdes ou de leurs dérivés sont actuellement commercialisés.

Cependant, le manque de solubilité et de stabilité de certaines de ces molécules est un frein à leur utilisation. Il est envisagé, depuis quelques années, de modifier la structure de ces composés pour permettre leur solubilisation. En effet, l'augmentation de la solubilité dans l'eau des flavonoïdes peut être réalisée par l'introduction de groupements glycosyles ou hydroxyéthyles tandis que le greffage d'un acide gras sur les flavonoïdes va augmenter leur solubilité dans les phases lipidiques.

D'autre part, la présence d'un groupement acyle de type cinnamique sur les flavonoïdes améliore leurs propriétés physico-chimiques. Ces molécules ont une stabilité renforcée ; c'est particulièrement le cas pour les anthocyanes. Cette acylation provoque une modification du spectre d'absorption du flavonoïde : on observe souvent un effet bathochrome et hyperchrome. L'activité antioxydante peut aussi être améliorée. La solubilité et l'affinité pour les protéines sont modifiées et devraient augmenter la biodisponibilité du flavonoïde. Il arrive même que de nouvelles propriétés apparaissent comme par exemple l'activité antibactérienne (Liu *et al.*, 1999).

II. La synthèse d'esters par voie enzymatique

II.1. L'estérification

La réaction d'estérification nécessite la présence d'un catalyseur de nature chimique ou enzymatique.

II.1.1. La catalyse chimique

En synthèse chimique, on utilise soit des catalyseurs acides ou basiques soit des substrats activés tels que les chlorures d'acyles. La synthèse de polyesters textiles tels que le Tergal et le Dacron, ou encore la fabrication de carburants « verts » comme le « diester » sont des exemples de réactions d'estérification à l'échelle industrielle.

II.1.1.1. Mécanisme de la réaction en milieu acide

Lors de la réaction d'estérification (figure 29), le carbonyle de l'acide carboxylique est attaqué par l'alcool pour former un intermédiaire tétraédrique. L'attaque nucléophile par un alcool est possible car la protonation en milieu acide rend le carbonyle suffisamment électrophile. Le réarrangement interne conduit à l'élimination d'une molécule d'eau et l'ester est obtenu après déprotonation.

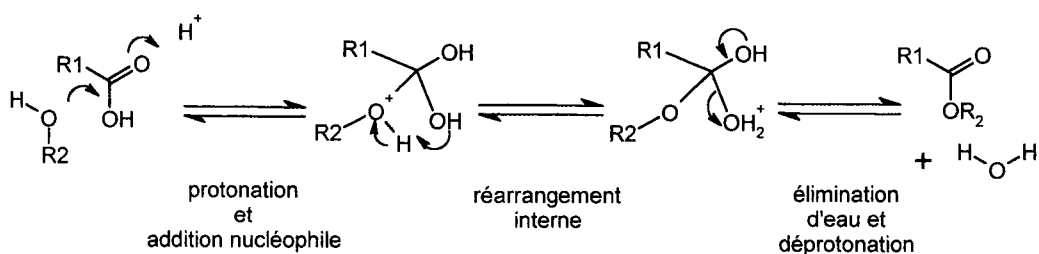


figure 29 : mécanisme de la réaction d'estérification sous catalyse acide, réaction de Fischer.

II.1.1.2. Les différents donneurs d'acyle

La réaction d'estérification est fortement facilitée par l'utilisation de substrats activés. Les dérivés d'acides carboxyliques possèdent un groupement Y électronégatif avoisinant un carbonyle et peuvent être représentés de la façon suivante :



pour les amides, Y = NHR

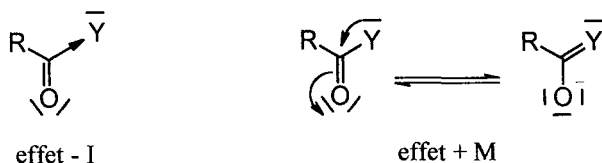
pour les acides, Y = OH

pour les esters, Y = OR

pour les anhydrides d'acides, Y = OCOR

pour les chlorures d'acyles, Y = Cl

Ces groupements Y présentent deux types d'effets contraires : un effet inductif électroattracteur (-I) et un effet mésomère électrodonneur (+M).



La réactivité est d'autant plus forte que l'effet inductif attracteur est plus marqué : Y est alors un meilleur groupement partant. Ce sont donc les chlorures d'acyle et les anhydrides d'acide qui sont les plus efficaces. En ce qui concerne les esters et les amides, l'effet mésomère l'emporte sur l'effet inductif, la réactivité est donc plus faible. La réactivité de ces espèces est aussi influencée par le groupement R.

II.1.1.3. Les différents accepteurs d'acyle

L'équilibre de la réaction est indépendant des conditions expérimentales (température et pression) mais fortement dépendant de la nature de l'alcool.

Plus le composé est basique, plus il est nucléophile et plus il est réactif. Les pKa de quelques composés sont donnés tableau 8.

tableau 8 : pKa de quelques alcools d'après Hart & Conia, 1987.

Alcool	Pka	Alcool	pKa
Eau	15,7	alcool trifluoroacétique	12,4
Méthanol	15,5	Phénol	10
Ethanol	15,9	4-nitrophénol	7,2
alcool ter-butylque	18	alcool picrique	0,25

Cependant, la réactivité de l'alcool ne repose pas seulement sur la nucléophilie, mais aussi sur l'encombrement stérique de la molécule. Ainsi la réactivité d'un alcool tertiaire est bien inférieure à celle d'un alcool primaire (figure 30). Les hydroxyles phénoliques, plus acides, ne peuvent être acylés que par des chlorures d'acyles ou anhydrides d'acides.

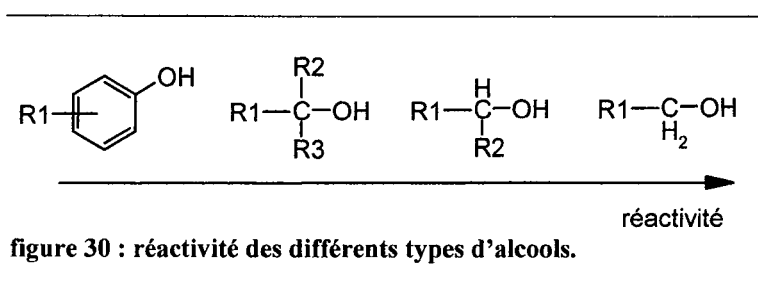


figure 30 : réactivité des différents types d'alcools.

La synthèse chimique d'esters utilise souvent des conditions drastiques (pH, température) conduisant à des dégradations importantes des substrats (en oléochimie par exemple). De plus, l'utilisation des substrats activés implique ensuite une élimination des dérivés toxiques produits dans le milieu réactionnel. Enfin l'estérification chimique n'est pas toujours sélective et c'est le besoin croissant de réactions chimio, régio et énantiosélectives qui a entraîné le développement de la catalyse enzymatique.

II.1.2. La catalyse enzymatique

Le choix d'appliquer un procédé enzymatique en complément ou en remplacement d'un procédé chimique est en partie motivé par un souci de l'environnement et de la législation qui s'y rapporte. En effet, la sélectivité des enzymes et les conditions réactionnelles liées à leur utilisation, diminuent les coûts énergétiques et le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention d'un produit.

Au cours de cette étude, seule la classe des hydrolases sera étudiée, et plus particulièrement, les enzymes capables d'hydrolyser ou de synthétiser les liaisons esters parmi lesquelles on peut citer les acyles transférases, les estérases, les lipases et certaines protéases.

Actuellement, environ 80% des procédés industriels ayant recours à des enzymes utilisent des hydrolases (Hari Krishna, 2002). Parmi ces applications, nombreuses sont celles qui concernent les lipases (détergents, oléochimie).

De plus en plus, les domaines de la chimie fine et de l'industrie pharmaceutique s'intéressent à la production de molécules complexes au niveau de leurs groupements chimiques avec une configuration stéréochimique précise nécessaire à leur activité biologique

(Zaks, 2001). De plus, ces molécules d'intérêt ont très souvent une solubilité réduite en phase aqueuse. C'est pourquoi la découverte du maintien de l'activité des enzymes en milieu non aqueux a stimulé l'intérêt de nombreux chercheurs.

II.1.3. Les enzymes catalysant la synthèse d'esters

Dans les organismes vivants, les enzymes responsables de la synthèse des esters sont des acyles transférases. Ces enzymes permettent de greffer sur une fonction alcool un groupement acyle provenant d'un substrat activé : un acyl-CoA.

Dans un procédé industriel, on évitera a priori l'utilisation des dérivés du coenzyme A, en partie en raison de leurs coûts élevés. Certains chercheurs ont malgré tout réussi à recycler ce coenzyme mais les rendements restent faibles (Nakajima *et al.*, 2000). Les lipases et les estérases catalysent naturellement l'hydrolyse des liaisons esters sans qu'il y ait besoin de coenzyme. Classiquement, les lipases sont différenciées des estérases par le phénomène d'activation interfaciale. En effet, l'adsorption des lipases à l'interface huile/eau provoque une augmentation de leur pouvoir catalytique. Dans un milieu à faible teneur en eau, estérases et lipases peuvent catalyser la synthèse d'esters notamment par hydrolyse inverse.

Les protéases ont également été utilisées en milieu organique pour l'hydrolyse et parfois la synthèse d'esters. Parmi les « sérine-protéases », on peut citer l' α -chymotrypsine, la subtilisine, la papaïne (Wong & Whitesides, 1994). Ces activités ont aussi été mises en évidence pour certaines thiol-protéases. Récemment, Pedersen *et al.*, 2002 ont pu synthétiser des esters de saccharose à l'aide d'une métalloprotéase, la thermolysine.

II.2. Les lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature : elles sont produites par de nombreux organismes végétaux, animaux, fongiques et bactériens.

II.2.1. Structure des lipases

Les premières études cristallographiques des lipases ont permis d'élucider les structures de la lipase pancréatique de l'homme (Winkler *et al.*, 1990) et de la lipase de *Rhizomucor miehei* (Derewenda *et al.*, 1992). Depuis, de nombreuses autres lipases et

estérases, actuellement plus de 54 (Pleiss *et al.*, 1998), ont été cristallisées et étudiées dont la lipase B de *Candida antarctica* en 1994 (Uppenberg *et al.*, 1994).

La masse moléculaire des lipases est comprise entre 21400 et 300000 Da. Elles sont formées d'une (monomère) ou plusieurs chaînes polypeptidiques (dimère ou tétramère) et leur pH optimum varie entre 4 et 9 (Protein Data Bank, Bernstein *et al.*, 1977).

La structure tridimensionnelle des lipases consiste en un repliement α/β typique des hydrolases : un noyau constitué de feuilletts parallèles β hydrophobes entourés par des hélices α amphiphiles (figure 31). La triade catalytique des lipases est composée des mêmes acides aminés que celle des sérine-protéases Ser-Asp-His (Ollis *et al.*, 1992). Dans certains cas, le glutamate remplace l'aspartate. Souvent la séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly est présente autour de la sérine du site actif. Ces caractéristiques sont celles de toutes les hydrolases à sérine.

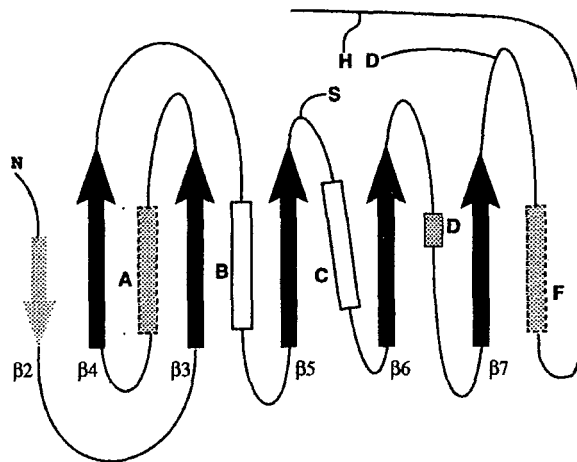


figure 31 : schéma typique de repliement α/β , d'après Schrag & Cygler, 1997.

Les flèches indiquent les feuilletts β , les rectangles les hélices α , les éléments en noir et blanc sont retrouvés dans toutes les lipases, les éléments en gris dans la plupart des lipases.

D'une manière générale, les géométries des sites de fixation des groupements acyles diffèrent entre les lipases et les estérases : ces sites sont grands et de nature hydrophobe pour les lipases mais sont plus petits pour les estérases.

II.2.2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme d'action des hydrolases à sérine a été étudié de façon intensive dès les années 1960 sur différentes protéases telles que la chymotrypsine (Hubbard & Shoupe, 1977).

La première étape de la catalyse d'hydrolyse est l'approche de l'ester qui va subir une attaque nucléophile du résidu sérine du site actif. Ce résidu est activé par le relais de charge formé en amont par l'histidine et l'acide aspartique ou l'acide glutamique du site catalytique. Il se forme un intermédiaire tétraédrique portant une charge négative sur l'oxygène. Cet intermédiaire est désigné sous le terme d'oxyanion. Cette charge est stabilisée par les liaisons hydrogène formées avec les groupes N-H peptidiques de deux acides aminés proches de la sérine. Pour certaines lipases, l'oxyanion peut en plus, être stabilisé par l'hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine si ces acides aminés sont présents dans la poche oxyanionique (Kazlauskas, 1994).

Par retour de la charge portée par l'oxyanion, le groupement alcool est libéré et le groupe acyle reste lié à l'enzyme pour former l'intermédiaire acyle/enzyme (figure 32C).

Cet intermédiaire subit alors l'attaque du nucléophile : l'eau ($R''=H$) ou un autre alcool. Il y a donc formation d'un deuxième complexe tétraédrique qui se dissocie ensuite en libérant le groupement acyle d'une part et l'enzyme sous sa forme native d'autre part.

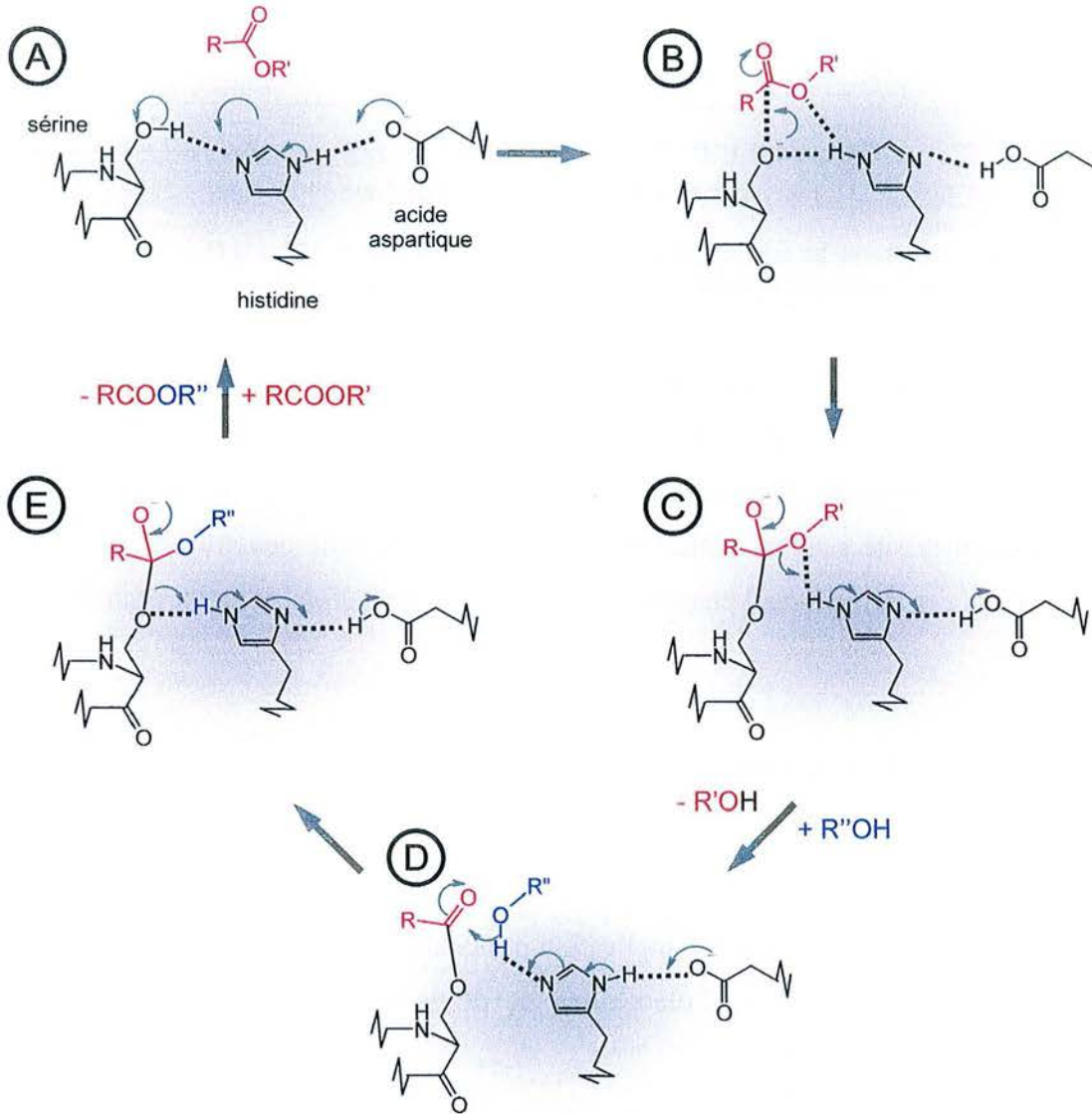


figure 32 : mécanisme général des hydrolases à sérine (Horvath *et al.*, 1998).

Estérfication	R' = H	et	R'' = alkyle
Hydrolyse	R' = alkyle	et	R'' = H

Au cours de l'hydrolyse, le groupement acyle est libéré sous forme chargée négativement, l'environnement de la sérine catalytique étant aussi chargé négativement au pH optimum d'activité, le départ de l'acyle du site catalytique est accéléré par répulsion électrostatique. Ce phénomène a été appelé catapulte électrostatique (Peterson *et al.*, 2001).

Les hydrolases à sérine agissent selon un mécanisme catalytique nommé bi-bi ping-pong confirmé par de nombreuses études cinétiques à la fois en mode hydrolyse (Malcata *et al.*, 1992) et en mode transestérfication (Chulalaksananukul *et al.*, 1990). Il peut être représenté de la façon suivante (figure 33).

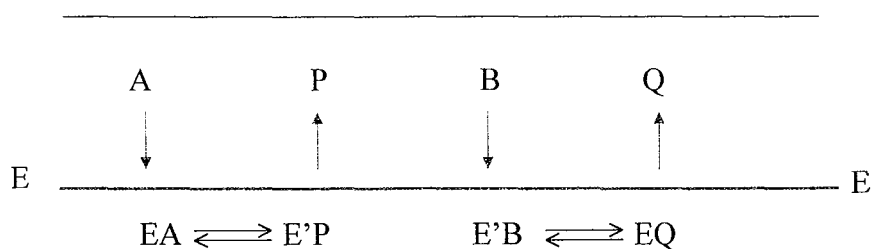


figure 33 : représentation de Cleland du mécanisme bi-bi ping-pong.

A et B sont les substrats, P et Q sont les produits. EA, E'B, E'P et E'Q sont les complexes formés entre les substrats/produits et l'enzyme.

Enfin, les études cristallographiques ont permis d'expliquer le phénomène d'activation interfaciale des lipases. En solution, le site actif de la plupart des lipases est obturé par une hélice α , nommée couvercle. En présence de lipides ou de solvant hydrophobe, ce couvercle s'ouvre, exposant le site actif au milieu réactionnel. De plus, cette ouverture s'accompagne d'un changement conformationnel plaçant certains résidus en position adéquate pour stabiliser l'oxyanion.

II.2.3. Utilisations

II.2.3.1. Domaines d'application

Actuellement, trois domaines d'application principaux ont recours aux lipases. Il s'agit de l'industrie des détergents, de l'oléochimie et de la chimie fine (pour la synthèse d'énantiomères purs).

Les lipases sont incorporées directement dans certains produits ménagers avec des protéases et des amylases pour améliorer l'efficacité du détergent. Elles sont également à l'étude pour la synthèse de tensioactifs non ioniques, biodégradables : les sucroesters (Cao *et al.*, 1999; Ducret *et al.*, 1995; Yan, 2001).

En oléochimie, l'utilisation des enzymes par rapport à la synthèse chimique est étudiée depuis les années 1980. Elle permet d'économiser de l'énergie, évite les dégradations ou isomérisations observées dans les procédés d'alcoolyses et d'hydrolyses classiques et permet un meilleur contrôle des produits (Vulfson, 1994). De plus, les procédés mettant en jeu l'hydrolyse et/ou l'interestérification permettent de synthétiser des produits aux propriétés nutritionnelles intéressantes (Al-Zuhair *et al.*, 2003 ; Sovova & Zarevucka, 2003 ; Zorn *et al.*, 2003 ; Shimada *et al.*, 2001).

La synthèse d'énantiomères purs fait appel de plus en plus aux enzymes et en particulier aux lipases. Elles sont ainsi utilisées pour la résolution de mélanges racémiques, car elles sont capables d'hydrolyser sélectivement certains énantiomères d'esters, d'amides (Gotor, 1999) ou encore de thioesters (Ohrner *et al.*, 1996). La résolution de mélanges racémiques est une étape de la synthèse de nombreuses drogues anti-inflammatoires comme le naproxen, l'ibuprofen et d'agents anti-hypertenseurs (Sharma *et al.*, 2001).

Le grand nombre de lipases isolées et caractérisées à ce jour offre un large panel d'activités spécifiques permettant la multiplication des applications industrielles (tableau 9).

tableau 9 : Applications industrielles des lipases (Vulfson, 1994).

Industries	Activités	Produits ou applications
produits ménagers	hydrolyse des graisses	détergents
produits laitiers	hydrolyse des graisses maturation des fromages, modification des graisses du beurre	développement des agents de flavour dans le lait, le fromage, et le beurre
boulangerie	amélioration de la flavour	prolongation de la durée de consommation
huiles et graisses	transestérification, hydrolyse	beurre de cacao, margarine, glycérol, mono et diglycérides, savons
pharmaceutique	transestérification, hydrolyse	lipides spéciaux, aides digestives
cosmétique	synthèse	émulsifiants, agents mouillants, surfactants

II.2.3.2. Les différents types de réactions catalysées par les lipases

Plusieurs types de réactions peuvent être catalysées par les lipases : l'hydrolyse, l'estérification, les transestérifications (acidolyse, alcoololyse, aminolyse, thiololyse), l'interestérification et l'amidation. Ces types de réactions sont représentées figure 34.

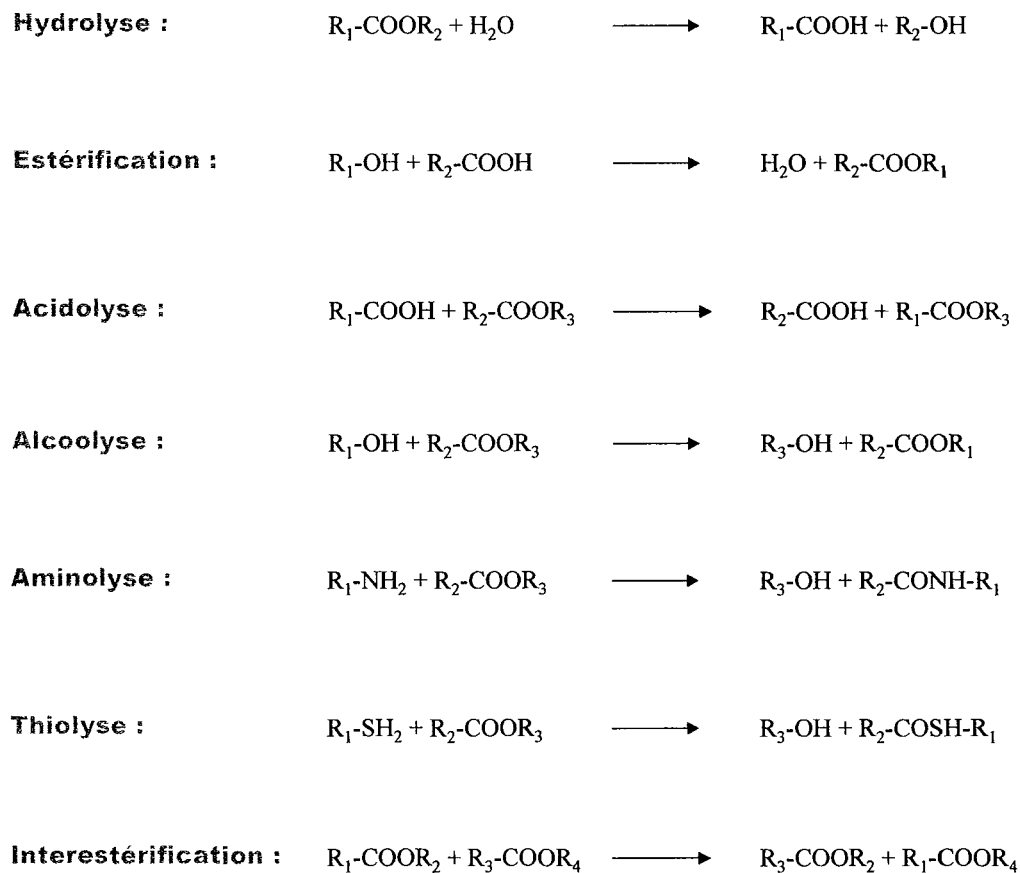


figure 34 : les réactions catalysées par les lipases

II.2.3.2.1. Les réactions d'hydrolyse

Les réactions d'hydrolyse sont principalement mises en œuvre dans l'oléochimie et pour la résolution de mélanges racémiques. On peut aussi mentionner leur utilisation dans les produits laitiers pour le développement des agents de flaveur (figure 35).

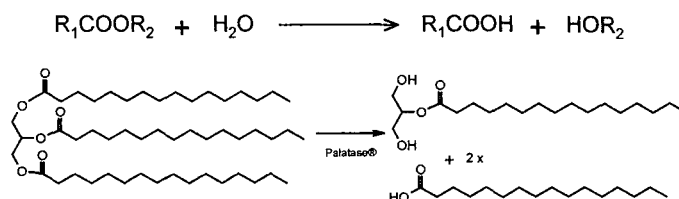


figure 35 : schéma de la réaction d'hydrolyse

Exemple de l'hydrolyse d'un triglycéride par la préparation lipasique Palatase ® utilisée dans la maturation des fromages (Vulfson, 1994).

II.2.3.2.2. Les réactions de synthèse

Les réactions de synthèse peuvent avoir lieu par estérification directe, par alcoololyse, acidolyse ou par interestérification. De plus, alors que la réaction d'estérification désigne la synthèse d'ester à partir d'un alcool et d'un acide, il a été montré que les lipases étaient en mesure de transférer des groupements acyles sur d'autres nucléophiles tels que les amines, les thiols et les hydroperoxydes.

Estérifications directes

Par estérification directe, les lipases peuvent catalyser la synthèse de glycérides (Giacometti *et al.*, 2001), d'esters d'acides et d'alcools aliphatiques (Garcia *et al.*, 2000, Hari Krishna *et al.*, 2001, Güvenç *et al.*, 2002), mais aussi d'esters d'oses (Akoh & Mutua, 1994, Chamouleau *et al.*, 2001, figure 36), de composés apparentés (Humeau, 1998) et de nombreux autres produits naturels (Weber *et al.*, 2001, Riva, 2001).

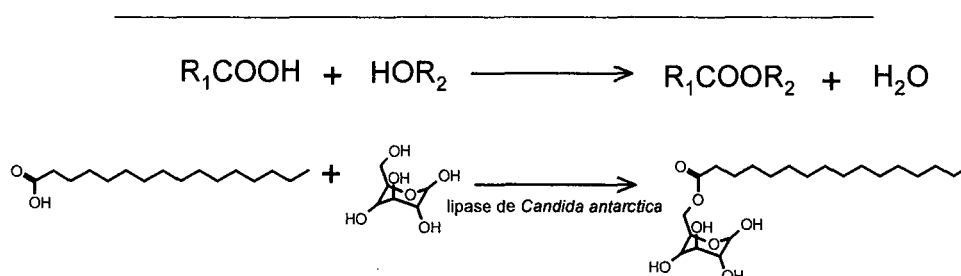


figure 36 : schéma de la réaction d'estérification
Exemple de la synthèse de sucroesters par la lipase B de *Candida antarctica* (Chamouleau, 2002).

Un procédé industriel d'estérification directe catalysé par la lipase de *Mucor miehei* est utilisé par Unichem International pour synthétiser des émoullients incorporés dans des crèmes solaires et bains moussants (Vulfson, 1994).

Transestérifications et interestérifications

Parmi les alcoolyses, on peut citer l'éthanololyse des triglycérides de thon par le Novozym 435®, qui est une étape de la purification des acides gras polyinsaturés (Shimada *et al.*, 2001), la synthèse de l'acétate de géranol (Chulalaksananukul *et al.*, 1991, figure 37) : ester qui ne peut être synthétisé par estérification directe en raison de la forte dissociation des acides à courtes chaînes. L'alcoololyse d'esters vinyliques est très souvent utilisée car la tautomérisation du groupement vinyle libéré permet aussi de déplacer l'équilibre vers la

synthèse (Ferrer *et al.*, 2000, Athawale & Manjrekar, 2000...). Enfin, l'alcoolyse est employée pour la résolution de mélanges racémiques (Kawasaki *et al.*, 2001).

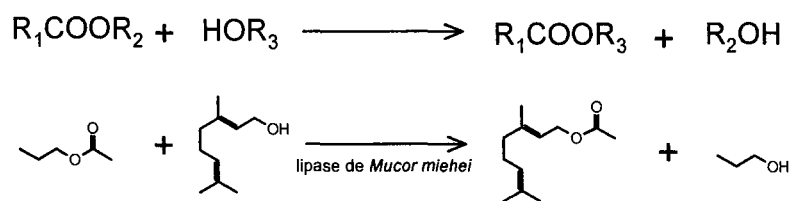


figure 37 : schéma de la réaction d'alcoolyse.
Exemple de la synthèse d'acétate de géranol
(Chulalaksananukul *et al.*, 1991).

L'acidolyse et l'interestérisation sont surtout employées pour modifier la composition en acides gras des triacylglycérols par exemple pour la fabrication d'équivalents de beurre de cacao à partir d'huile végétale (Undurraga *et al.*, 2001) ou d'équivalents de laits infantiles (Yang *et al.*, 2003, Peng *et al.*, 2002).

Amidation

La synthèse et l'hydrolyse de liaisons amides catalysées par les lipases a récemment fait l'objet d'une revue bibliographique (Gotor, 1999). Cette activité se révèle très utile en synthèse organique, particulièrement dans le cadre de la résolution d'amines racémiques.

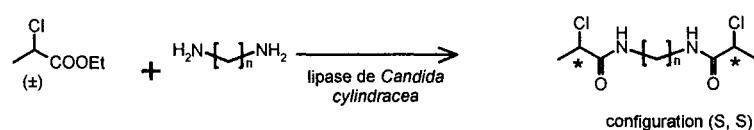


figure 38 : schéma de la réaction d'amidation.
exemple de la synthèse de diamides chiraux (Gotor, 1999).

II.2.4. Paramètres influençant la réaction de synthèse

Du fait de la structure, du mécanisme catalytique et de l'activation des lipases, la réaction de synthèse va être modulée par différents paramètres, tels que le milieu réactionnel, la nature de l'enzyme, l'activité de l'eau et les substrats.

II.2.4.1. Le milieu réactionnel

II.2.4.1.1. Les milieux « non conventionnels »

Naturellement, les enzymes sont retrouvées dans les systèmes biologiques donc aqueux. Par opposition aux milieux aqueux, les milieux organiques pauvres en eau sont appelés milieux « non conventionnels ».

L'activité des enzymes en milieu non aqueux a été rapportée dès la fin du XIX^e siècle, par Hill, 1898, Kastle & Loevenhart, 1900 et Bourquelot & Bridel, 1913. Cependant, les recherches n'ont réellement commencé qu'au cours des années 1980, avec la mise au point des premiers procédés enzymatiques industriels et la mise en évidence du maintien de l'activité de nombreuses enzymes en milieu organique. Zaks & Klivanov, 1985 ont mené leur étude sur des lipases d'origines différentes et ont déduit qu'une très faible quantité d'eau était nécessaire pour le maintien de l'activité enzymatique.

La faible teneur en eau des milieux non conventionnels est particulièrement intéressante dans le cadre de l'utilisation des hydrolases. Alors qu'en milieu aqueux, les hydrolases catalysent des réactions d'hydrolyse, une teneur en eau suffisamment faible permet d'orienter l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse (figure 39).

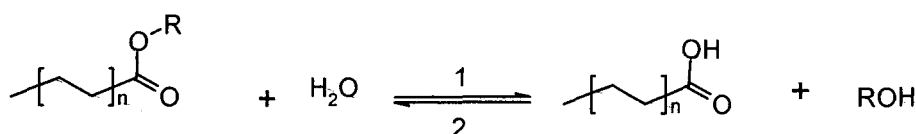


figure 39 : réactions catalysées par une acyle hydrolase en fonction du milieu

1 : milieu riche en eau : hydrolyse ; 2 : milieu pauvre en eau : synthèse

Il existe différents types de milieux dits « non conventionnels » tels que :

- les milieux organiques et hydroorganiques pour lesquels substrats et enzymes sont solubilisés ou suspendus dans un solvant organique. Suivant la miscibilité du solvant organique avec l'eau, la teneur en eau devra être ajustée pour obtenir l'activité enzymatique.
- les milieux biphasiques où substrats, enzymes et produits se retrouvent dans plusieurs phases. Suivant les propriétés physico-chimiques des substrats et produits ces milieux peuvent se montrer d'un grand intérêt. En effet, le plus souvent, l'enzyme est en solution dans la phase aqueuse, la phase organique sert de réservoir pour les substrats hydrophobes et permet l'extraction des produits formés.
- les milieux sans solvant évitent l'utilisation de solvants coûteux et parfois toxiques et inflammables. Les réactions peuvent s'effectuer sans solvant si les réactifs sont miscibles ou solubles l'un dans l'autre. Ce système est notamment utilisé pour la modification de triglycérides (Borg *et al.*, 2001, Selmi *et al.*, 1998).
- les systèmes en phase gazeuse peuvent être mis en œuvre pour faire réagir des substrats de faible masse moléculaire, vaporisables à faible température (Lamare & Legoy, 1993, Lamare *et al.*, 1996).
- les systèmes supercritiques : les gaz supercritiques ont une faible viscosité et d'excellentes propriétés solvantes. Le CO₂ supercritique est apprécié dans les industries alimentaire et pharmaceutique grâce à sa non toxicité (Cernia & Palocci, 1997).
- les milieux ioniques sont actuellement en plein développement. Ils améliorent l'activité, la stabilité et la sélectivité des préparations enzymatiques (Madeira-Lau *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001).

II.2.4.1.2. Les solvants organiques

Lors de la mise au point d'un procédé biocatalytique en milieu organique pour la synthèse de molécules à visée agro-alimentaire, le choix du solvant à utiliser est un des points cruciaux.

Le solvant doit être non toxique et facilement séparable des autres constituants du milieu. Il doit surtout être compatible avec l'activité enzymatique. C'est à dire, qu'il ne doit affecter ni la structure tridimensionnelle de la protéine ni la couche d'hydratation

indispensable à l'activité enzymatique. Pour finir, le solvant doit permettre la solubilisation du substrat. En effet, plus la concentration en substrat est importante plus la réaction sera rapide dans le cadre de l'utilisation d'enzymes michaeliennes.

Les différentes propriétés des solvants telles que la constante diélectrique, le moment dipolaire, la polarité sont à prendre en compte. La polarité est mesurée par le log P (logarithme du coefficient de partage entre l'eau et l'octanol). En général, la solubilité des substrats et l'activité de l'eau dans un solvant donné sont reliées au log P.

Valivety *et al.*, 1991 ont proposé qu'un solvant ayant un log P supérieur à 3,5 est favorable à la catalyse lipasique. Cependant, les résultats obtenus par Humeau *et al.*, 1998 montrent que l'hydrophobicité du milieu n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. De plus les lipases se sont montrées efficaces dans des solvants polaires (log P < 1,5) comme par exemple le ter-butanol, le 2-méthylbutan-2-ol, l'acétone, le butan-2-one et l'acétonitrile (Yan *et al.*, 1999, Watanabe *et al.*, 2000).

II.2.4.2. L'enzyme

Le choix de l'enzyme à mettre en œuvre se fera suivant la structure des substrats impliqués. La sélectivité des lipases vis-à-vis des acides gras est déterminée par deux facteurs : d'une part, par les interactions stériques entre le site actif de l'enzyme et le substrat, et d'autre part par l'induction électronique dans la molécule c'est-à-dire que la nature et la position des atomes du substrat doivent lui permettre d'établir les liaisons électrostatiques adéquates avec l'enzyme pour permettre la catalyse.

Des méthodes de criblage d'activité enzymatique à haut débit sont actuellement développées et devraient permettre de cerner au mieux la bonne enzyme pour le bon substrat (Wahler & Reymond, 2001).

La forme libre ou immobilisée sous laquelle l'enzyme va être ajoutée au milieu réactionnel joue aussi un rôle très important sur son activité, sa stabilité et parfois sur sa spécificité.

En milieu aqueux ou biphasique, on se place généralement au pH optimum d'activité. En milieu organique, la lyophilisation ou l'immobilisation conduites au pH optimum permettent la conservation par effet mémoire de l'ionisation optimale de la protéine. L'état d'ionisation de la protéine peut être modifié en présence d'espèces acides ou basiques présentes dans le milieu réactionnel (Halling, 1994).

L'immobilisation améliore la stabilité thermique des biocatalyseurs (de Oliveira *et al.*, 2000), permet de les séparer facilement du milieu réactionnel et éventuellement de les recycler (Coulon *et al.*, 1997).

Il existe principalement 6 types d'immobilisation (Villeneuve *et al.*, 2000) : l'adsorption, la liaison covalente, l'inclusion, l'encapsulation, la granulation et la réticulation. Actuellement, les techniques d'immobilisation par adsorption et par liaison covalente sont les plus utilisées. Arroyo *et al.*, 1999 ont comparé ces deux types de méthodes pour l'immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica* et ont trouvé que l'adsorption conduit aux meilleurs résultats.

II.2.4.3. La teneur en eau

L'activité thermodynamique de l'eau gouverne les niveaux d'hydratation des différents acteurs de la synthèse à savoir l'enzyme, les substrats et le solvant.

L'eau joue le rôle de plastifiant, lubrifiant, permettant à l'enzyme d'avoir la mobilité fonctionnelle nécessaire à une activité catalytique optimale. La présence d'eau est thermodynamiquement défavorable à la synthèse d'esters, mais il est reconnu que les lipases nécessitent une quantité minimale d'eau pour leur fonctionnement. Cette quantité d'eau est variable suivant la lipase considérée et le solvant utilisé. A titre d'exemple, l' a_w nécessaire au fonctionnement de la lipase de *Rhizopus oryzae* est inférieure à 0,1 en transestérification alors que celle de la lipase de *Candida rugosa* est de 0,33 (Ma *et al.*, 2002).

Bien qu'indispensable au fonctionnement de l'enzyme, la présence d'eau est défavorable à la stabilité thermique de l'enzyme. En effet, Turner *et al.*, 1995 ont montré que les lipases de *Candida antarctica*, *Candida rugosa* et *Mucor miehei* présentaient une activité optimale à une a_w supérieure à celle où la thermostabilité est la plus grande.

La présence d'eau dans le milieu va aussi influencer le déroulement de la réaction enzymatique en modifiant la solubilité de certains substrats. C'est par exemple le cas lors des réactions de synthèse de sucroesters. D'après Watanabe *et al.*, 2000, la présence d'eau en début de réaction est favorable à la synthèse d'esters car elle augmente la solubilisation du glucose dans les solvants miscibles à l'eau, ce qui peut mener à une augmentation de la vitesse initiale mais à une diminution des rendements de conversion.

II.2.4.4. La nature des substrats

La réaction d'estérification est réversible. Une façon d'améliorer les rendements de conversion est d'utiliser des donneurs d'acyles activés. De nombreux esters activés ont été utilisés en synthèse enzymatique : les esters de chloroéthyle, de trichloroéthyle, de cyanométhyle, les esters énoïques, les anhydrides d'acide, les thioesters, les oximes et les carbonates de vinyle.

L'utilisation des donneurs d'acyle activés rend la réaction irréversible (figure 40). De plus, ils réagissent plus vite que leurs homologues éthylés ou méthylés. Cependant, une inhibition enzymatique causée par les groupements relargués au cours de la réaction a été observée avec tous ces types de produits (Wong & Whitesides, 1994).

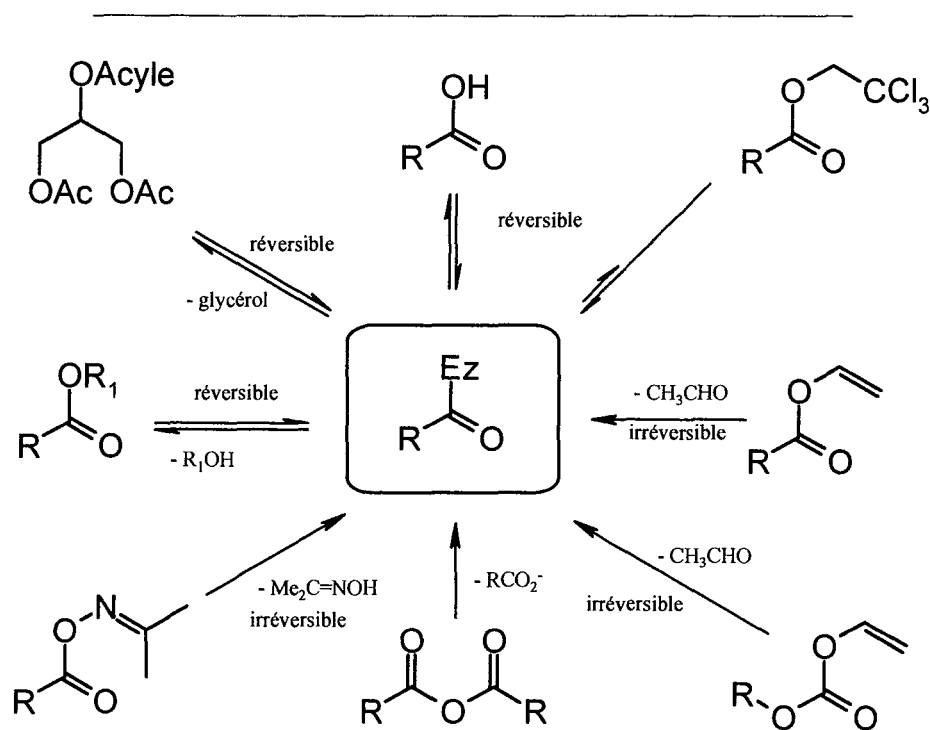


figure 40 : réactivité de différents donneurs d'acyles en catalyse enzymatique (Andersch *et al.*, 1997).

Pour améliorer le rendement de conversion d'un des deux substrats, il est aussi possible de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction en utilisant l'un des substrats en excès (Coulon *et al.*, 1996, Humeau *et al.*, 1998), ou en éliminant un des produits formés. L'élimination de produits peut être faite par évaporation à pression atmosphérique (Fregapane

et al., 1991), par évaporation sous pression réduite (Weber *et al.*, 2001), par distillation azéotropique (Yan *et al.*, 1999) ou encore par pervaporation (Bartling *et al.*, 2001). Dans quelques cas précis, le produit formé précipite (Virto & Adlercreutz, 2000).

II.3. La lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

II.3.1. Structure

Uppenberg *et al.*, 1994 ont élucidé la structure tridimensionnelle de la lipase B de *Candida antarctica* par cristallographie. Leur étude a été réalisée sur la lipase produite par le micro-organisme source. Cependant, les préparations de CALB commercialisées actuellement sont produites par *Aspergillus niger*, organisme dans lequel le gène de la lipase a été cloné. De plus, dans certaines préparations cette enzyme est immobilisée sur célite (résine polyamide) et donc sa structure, sa spécificité, sa stabilité et ses performances sont modifiées.

Les dimensions de la lipase B de *Candida antarctica* sont de 30 Å x 40 Å x 50 Å et sa masse est de 33 kDa. La chaîne polypeptidique comporte 317 acides aminés, son pH isoélectrique est de 6 et son pH optimum est de 7 à 8 (Peterson *et al.*, 2001). La protéine présente 3 ponts disulfures et un site de glycosylation. La séquence consensus environnant la sérine catalytique 105 n'est pas présente dans cette lipase ; en effet, la première glycine est remplacée par une thréonine. Le seul résidu histidine de la protéine se trouve en position 224. L'acide aspartique de la triade catalytique est en position 187.

La région entourant la sérine catalytique est remarquablement polaire, on y trouve les résidus His 224, Thr 40, Asp 134 et Gln 157 (figure 41).

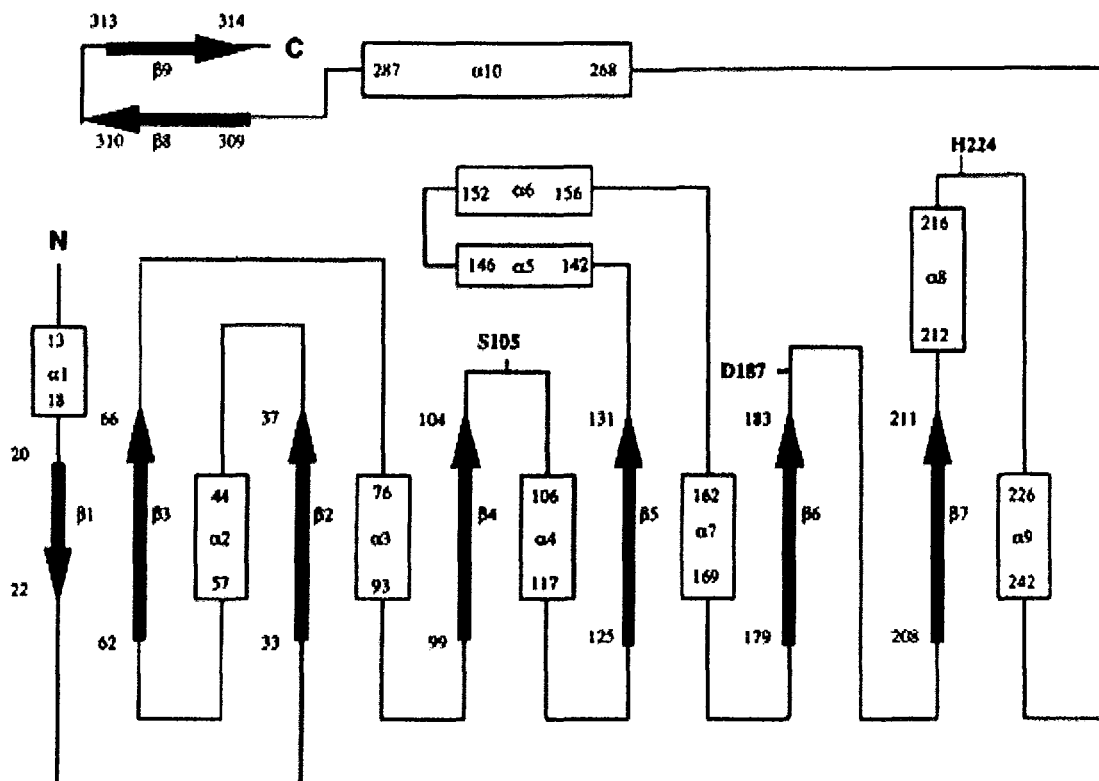


figure 41 : structure secondaire de la lipase B de *Candida antarctica* (Uppenberget al., 1994).

Au sein du site actif, la thréonine 40 stabilise l'oxyanion formé en cours de catalyse (Pleiss et al., 1998).

D'après les études cristallographiques menées par Uppenberget al., 1994 et Uppenberget al., 1995, la lipase B de *Candida antarctica* présente deux tunnels parallèles partant de la surface et se rejoignant au niveau de la sérine catalytique. L'un, assez grand, est destiné aux substrats acyles, l'autre, plus petit est réservé aux alcools (figure 42). La forme de celui-ci est responsable de l'excellente stéréospécificité de la lipase B de *Candida antarctica* envers les alcools secondaires.

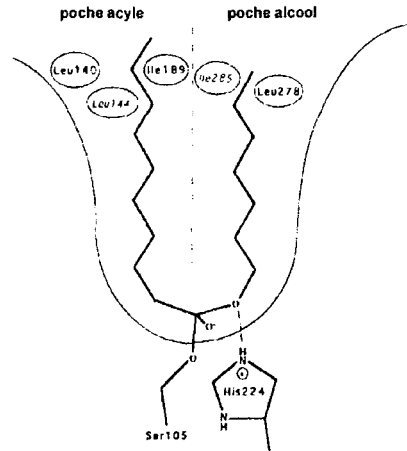


figure 42 : schéma du site actif divisé en deux parties : le tunnel acyle et le tunnel alcool (Uppenberg *et al.*, 1995).

Les travaux de modélisation moléculaire menés par Pleiss *et al.*, 1998 ont permis de « visualiser » le positionnement des acides gras au sein du tunnel réservé aux acyles. Il semble que le tunnel ne puisse recevoir l'acide gras dans son intégralité que si la longueur de sa chaîne hydrocarbonée n'excède pas 13 carbones. Au-delà de cette taille, les carbones sont maintenus en surface de la protéine par interaction hydrophobe.

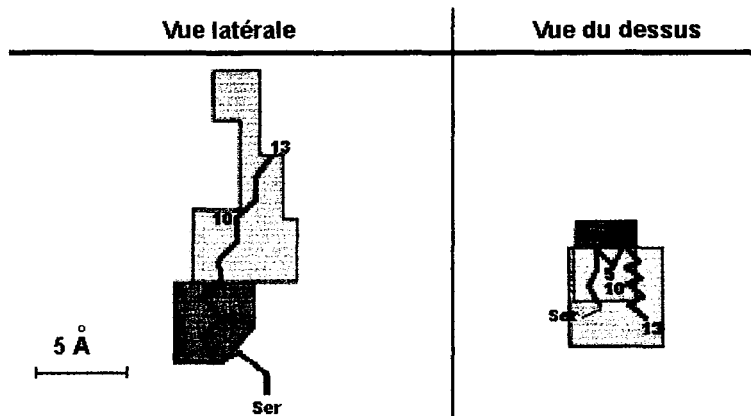


figure 43 : forme du site de liaison de la lipase B de *Candida antarctica*.

Vues schématisées du positionnement modélisé des acides gras, un nombre indique la longueur maximale (13 carbones) d'un acide gras intégralement lié au site de liaison (Pleiss *et al.*, 1998).

Le couvercle de la lipase B de *Candida antarctica* est très petit et a été difficile à identifier. L'hélice $\alpha 5$ (figure 41) est la partie la plus probable de l'enzyme pouvant assurer cette fonction. Les études cristallographiques (Uppenberg *et al.*, 1994) ont montré que cette

hélice est mobile mais ne masque cependant pas le site actif. L'hélice $\alpha 10$ est une autre structure qui pourrait réguler l'accessibilité au site actif.

La faible activité de la lipase B de *Candida antarctica* sur les triglycérides d'acides gras à longue chaîne, due à l'étroitesse de son site actif, et sa facilité à maintenir une conformation ouverte en font un intermédiaire évolutif entre les estérases et les lipases.

II.3.2. Applications

La lipase B de *Candida antarctica* ne trouve, à l'heure actuelle, qu'un nombre restreint d'applications industrielles. Par exemple, elle est utilisée au cours d'un procédé Hoffmann-La Roche (figure 44) pour une étape intermédiaire de la synthèse d'un nouvel agent anti-fongique (Zaks, 2001).

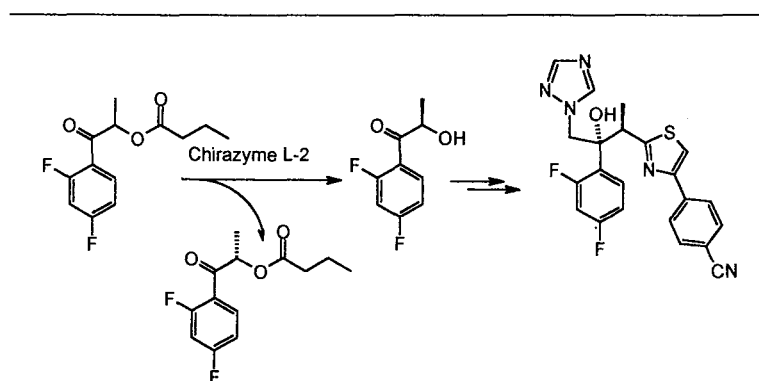


figure 44 : Résolution énantiosélective catalysée par une forme commerciale de lipase B de *Candida antarctica* : le Chirazyme L-2. Procédé Hoffmann-La Roche (Zaks, 2001).

Cependant, les études menées avec cette lipase à l'échelle du laboratoire montrent qu'elle accepte des substrats de structures très variées. On peut noter que, dans la majorité des cas, cette enzyme est utilisée sous sa forme commerciale immobilisée : Novozym 435®.

- ✓ En oléochimie, le Novozym 435® pourrait être particulièrement intéressant. Par exemple, Borg *et al.*, 2001 ont pu synthétiser des triglycérides d'acides gras polyinsaturés par estérification directe en absence de solvant organique. Shimada *et al.*, 2002, ont étudié l'alcoolyse enzymatique des déchets d'huiles comestibles dans le but d'en faire du carburant.
- ✓ Le Novozym 435® accepte d'autres substrats que les triglycérides. On peut citer la synthèse de sucroesters (Cao *et al.*, 1999), de composés antioxydants (Humeau *et*

al., 1998, Guyot *et al.*, 2000) et de composés identiques nature tels que l'oléate de cétyle (Garcia *et al.*, 2000).

- ✓ Cette préparation enzymatique est également très utile pour la résolution de composés racémiques. On peut obtenir soit une hydrolyse sélective d'esters racémiques (Ohrner *et al.*, 1996) soit une synthèse sélective à partir d'un mélange d'alcools secondaires (Quieros *et al.*, 2001).
- ✓ Cette enzyme est aussi capable de catalyser des réactions de thiolysse (Ohrner *et al.*, 1996), d'ammoniolyse (Madeira-Lau *et al.*, 2000), de perhydrolyse (Biermann *et al.*, 2000) ou encore d'amidation (Kobata *et al.*, 1999).

Ces réactions sont effectuées dans des milieux réactionnels divers. Le Novozym 435® est utilisé en milieu organique dans des solvants tels que l'hexane (Chulalaksananukul *et al.*, 1991), le 2-méthylbutan-2-ol (Chamouleau *et al.*, 2001), l'acétone (Yan *et al.*, 1999)... Kim *et al.*, 2001 l'utilisent dans les solvants ioniques et Graber *et al.*, 2003 en phase gazeuse. Cette préparation enzymatique catalyse aussi des synthèses en milieu sans solvant (Oguntimein *et al.*, 1995, Gryglewicz *et al.*, 2000, Borg *et al.*, 2001).

Turner & Vulfson, 2000 ont montré que cette lipase sous sa forme immobilisée est particulièrement thermostable, et ne serait instantanément inactivée qu'à 140°C. Il a aussi été démontré que la réutilisation de cette préparation enzymatique est possible une dizaine de cycle de 24 h à 60°C, sans diminution de rendement (Coulon *et al.*, 1997). Un autre avantage de cette lipase a été rapporté par Weber *et al.*, 1997 : la lipase B de *Candida antarctica* porte peu de groupements lysine à sa surface et ne forme donc pas de base de Schiff au contact de l'acétaldéhyde (ce qui conduirait à son inactivation). Or l'acétaldéhyde est produit lors des réactions de transestérification mettant en jeu des donneurs d'acyles vinyliques. Les dérivés vinyliques ont donc été largement employés pour synthétiser des esters de structure éloignée des substrats naturels des lipases. Ainsi, plusieurs auteurs (Danieli *et al.*, 1997, Nakajima *et al.*, 1999b, Gao *et al.*, 2001) ont mis en œuvre l'alcoolyse d'esters vinyliques pour la synthèse de flavonoïdes acylés.

III. Acylation des flavonoïdes

Les différentes propriétés des flavonoïdes et principalement leur pouvoir anti-oxydant (chapitre 1, § I.2.4) ont attiré l'intérêt des industriels dans les secteurs cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques. Cependant, les chercheurs ont été amenés à modifier ces molécules afin de pallier leur principal défaut, à savoir leur manque de solubilité dans les phases aqueuses ou lipophiles (chapitre 1, § I.2.1).

L'augmentation de la solubilité en milieu aqueux peut être réalisée soit par glycosylation, soit par incorporation de substituants hydroxylés ou acides. La synthèse de flavonoïdes glycosylés a été étudiée et brevetée de façon intensive au cours des années 1990 (Suzuki *et al.*, 1992, Nishimura *et al.*, 1992, Meulenbeld *et al.*, 1999, Nakajima *et al.*, 1999a, Cho *et al.*, 2000). Les dérivés obtenus par transglycosylation à l'aide de cyclodextrine glucanotransférases sont aujourd'hui utilisés comme additifs alimentaires au Japon (Akiyama *et al.*, 2000). Des dérivés hydroxyéthylés (chapitre 1, § I.2.1) sont utilisés comme principe actif de préparations pharmaceutiques (Abou El Hassan *et al.*, 2000). Enfin, des flavonoïdes « aquaphiles » ont été obtenus par acylation avec des dérivés hydrophiles tels que les diacides et les phosphates (Calias *et al.*, 1996, Alluis *et al.*, 2000).

L'augmentation de la solubilité en milieu hydrophobe s'effectue essentiellement par acylation. On a pu ainsi synthétiser des antioxydants phénoliques lipophiles (Beck *et al.*, 1990, Giorno *et al.*, 1997). Puis on a cherché à augmenter les potentialités des flavonoïdes en introduisant certains groupements acyles de type cinnamique (Nakajima *et al.*, 1997).

III.1. Acylation chimique des flavonoïdes

Les méthodes d'acylation chimique appliquées aux flavonoïdes sont des méthodes classiques, préalablement utilisées pour d'autres composés polyhydroxylés.

L'acylation chimique de flavonoïdes aglycones a été rapportée depuis les années 1950 (Mabry *et al.*, 1970) : elle était alors utilisée pour localiser la position des groupements méthoxyles sur les flavonoïdes. En 1990, Natoli *et al.*, 1990 utilisaient cette technique comme une étape dans la synthèse de flavonoïdes rares d'intérêt médical. Par la suite, une méthode

d'acylation chimique des flavonoïdes a été brevetée par Mariotte *et al.*, 2001, dans le but de les incorporer à des préparations cosmétiques.

Ces synthèses chimiques sont effectuées sous catalyse basique. Les catalyseurs utilisés sont le K_2CO_3 , la triéthylamine, le pyridinium ou le 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP). En ce qui concerne les solvants, le toluène et le ter-butyl-méthyl ether permettent la solubilisation des flavonoïdes aglycones. La pyridine est utilisée avec les flavonoïdes glycosylés. Les donneurs d'acyles sont présents en large excès et sous forme de dérivés d'acides carboxyliques hautement réactifs, tels que les chlorures d'acyles et les anhydrides d'acides. Les températures et les durées des réactions varient de 0 à 100°C et de 1 à 100h, respectivement.

III.1.1. Acylation chimique non spécifique

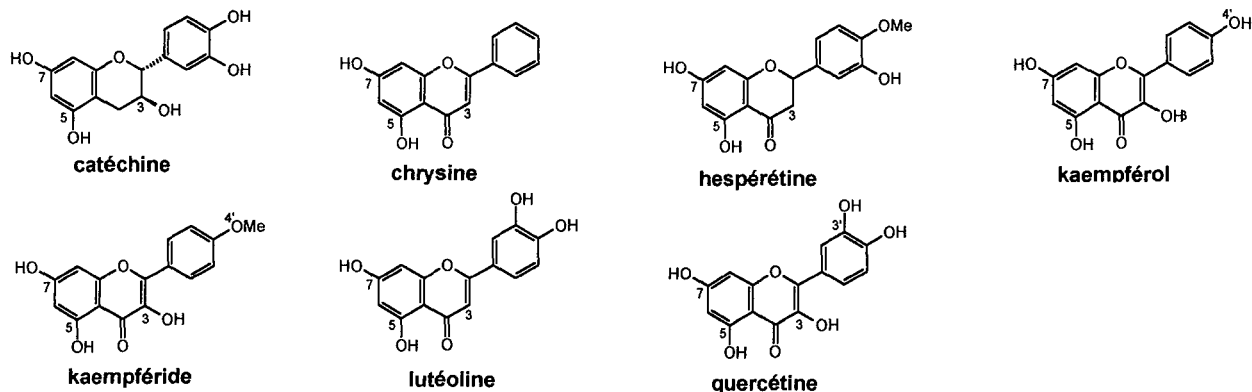
Les réactions d'estérification chimique ne sont pas sélectives ; en effet, dans des conditions d'estérification drastiques, la totalité des hydroxyles présents sur les flavonoïdes sont acylés, qu'ils soient de nature phénolique, aliphatique ou glycosidique.

Pour les synthèses rapportées tableau 10, la concentration en donneurs d'acyle est beaucoup plus importante que celle du flavonoïde. Ainsi, tous les groupements hydroxyles étant acylés, on obtient un seul produit.

Les rendements sont excellents car en général supérieurs à 90%.

Du fait de l'acylation totale de leurs fonctions phénoliques, les produits ainsi obtenus perdent une grande partie de leurs propriétés natives (activité antioxydante en particulier). D'autres méthodes d'acylation plus sélectives ont alors été envisagées.

tableau 10: exemples d'acylations chimiques non sélectives des flavonoïdes



Réf.	Substrats	Conditions	Produits
Natoli <i>et al.</i> , 1992	flavonoïdes : lutéoline, kaempférol, kaempféride, quercétine donneur d'acyle : (1/4 à 1/6) ^{a)} anhydride acétique	pyridine anhydre	<ul style="list-style-type: none"> tétraacétate de lutéoline tétraacétate de kaempférol triacétate de kaempferide pentaacétate de quercétine
Giorno <i>et al.</i> , 1997	flavonoïde : chrysine donneur d'acyle : (1/2 à 1/3) ^{a)} anhydride acétique	pyridinium (catalyseur), pyridine anhydre, 2h à température ambiante	<ul style="list-style-type: none"> diacétate de chrysine
Nicolosi <i>et al.</i> , 1999	flavonoïde : quercétine donneur d'acyle : (1/3 à 1/4) ^{a)} chlorure de palmitate	ter-butyl méthyl ether, triéthanolamine, 12h, température ambiante	<ul style="list-style-type: none"> pentapalmitate de quercétine (96%)^{d)}
Patti <i>et al.</i> , 2000	flavonoïde : (+)-catéchine donneurs d'acyle : (1/10) ^{a)} anhydride ou chlorure d'acyle	ter-butyl méthyl ether, triéthanolamine, température ambiante	<ul style="list-style-type: none"> pentapropionate de catéchine (94%)^{d)} pentavalérate de catéchine (92%)^{d)} pentapalmitate de catéchine (90%)^{d)}
Mariotte <i>et al.</i> , 2001	flavonoïdes : quercétine, hespérétine, apigénine, naringénine, hespéridine, naringine, diosmine, rutine donneurs d'acyle : (1/10) ^{a)} chlorure de laurate, chlorure de palmitate, chlorure de stéarate, chlorure d'oléate, chlorure de linoélate, chlorure de linoléate, chlorure d'heptanoate, anhydride butyrique, anhydride succinique	pyridine, 100°C, 6h ou toluène K ₂ CO ₃ , reflux, 1h	<ul style="list-style-type: none"> pentaacyle de quercétine (48 à 61%)^{d)} triacyle d'hespérétine (55 à 59%)^{d)} octaacyle d'hespéridine

a) rapport molaire flavonoïde/donneur d'acyle

d) pourcentage de conversion du flavonoïde

III.1.2. Acylation chimique régiosélective

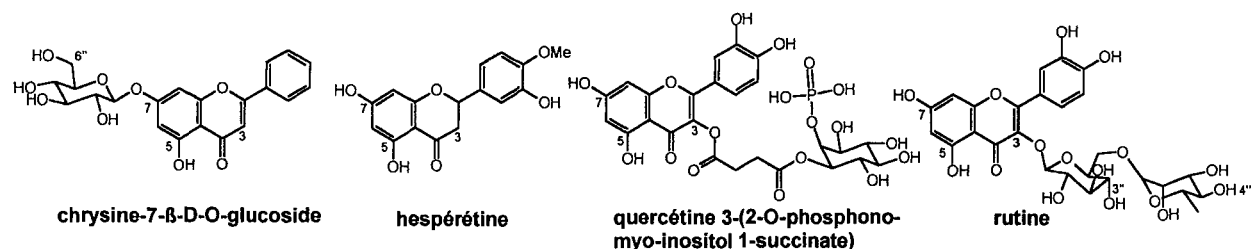
L'utilisation de catalyseurs plus doux (le DMAP par exemple) a permis d'obtenir une certaine chimiosélectivité. Ainsi, Alluis & Dangles, 1999 et Alluis *et al.*, 2000 ont obtenu des esters de chryisine glucosylée et de rutine sélectivement acylés sur tous les hydroxyles glucidiques, laissant libres les hydroxyles phénoliques moins réactifs. Les rendements ainsi obtenus sont excellents, supérieurs à 90%.

Une autre méthode consiste à protéger chimiquement les fonctions qui ne doivent pas être acylées. Ainsi, Calias *et al.*, 1996 ont synthétisé un dérivé de quercétine hydrosoluble en couplant ce flavonoïde aglycone à l'inositol-phosphate au moyen d'un pontage par un diacide, le succinate (tableau 11). Avant l'estérification proprement dite, les groupements hydroxyles de la quercétine et de l'inositol-phosphate ont tous été protégés à l'exception des deux sites de fixation. Des mono et diesters succiniques de rutine ont été obtenus de manière similaire par Alluis *et al.*, 2000.

Enfin, à température ambiante, Alluis & Dangles, 1999 ont obtenu des monoesters de flavonoïdes sélectivement acylés sur la partie glucidique en position 6''. Les rendements obtenus sont cependant faibles, moins d'un tiers du flavonoïde étant transformé (tableau 11).

Quelques résultats se rapportant à l'acylation chimique sélective des flavonoïdes sont rassemblés dans le tableau 11.

tableau 11 : exemples d'acylations chimiques sélectives des flavonoïdes.



Réf.	Substrats	Conditions	Produits
Calias <i>et al.</i> , 1996	<u>flavonoïde</u> : quercétine protégée (3,3',4',7-tétra-O-benzylquercétine et 3,3',4'-tri-O-benzylquercétine) <u>donneur d'acyle</u> : (2/1) ^{a)} chlorure de 1,4,5,6-tétra-O-benzyl-2-O-(dibenzylxyphosphoryl)-myo-inositol 3-succinate	DMAP (catalyseur), 1,2-dichloroéthane, 15 min	produits obtenus après hydrogénation catalytique sur Pd/C pour déprotection <ul style="list-style-type: none"> ● 62%^{d)} 5-(2-O-phosphono-myo-inositol 1-succinate de quercétine ● 71%^{d)} 3-(2-O-phosphono-myo-inositol 1-succinate de quercétine
Alluis & Dangles, 1999	<u>flavonoïde</u> : chrysin glucoside (5,7-dihydroxyflavone-7-β-D-O-glucoside) <u>donneur d'acyle</u> : (1/4) ^{a)} , anhydride succinique	DMAP (catalyseur), pyridine, 96 h à 70°C, sous azote	● 2'',3'',4'',6''-tétra-O-succinate de chrysin glucoside (90%) ^{d)}
Alluis & Dangles, 1999	<u>flavonoïde</u> : chrysin glucoside (5,7-dihydroxyflavone-7-β-D-O-glucoside) <u>donneurs d'acyle</u> : (1/2) ^{a)} chlorure de p-méthoxycinnamate, chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoate, anhydride succinique	DMAP (catalyseur), pyridine, 96 h à température ambiante, sous azote	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-O- p-méthoxycinnamate de chrysin glucoside (31%)^{d)} ● 6''-O- (3'',4'',5''-triméthoxybenzoate) de chrysin glucoside (30%)^{d)} ● 6''-O-succinate de chrysin glucoside (16%)^{d)}
Alluis <i>et al.</i> , 2000	<u>flavonoïde</u> : rutine <u>donneur d'acyle</u> : (1/10) ^{a)} , anhydride succinique	DMAP (catalyseur), pyridine, 24 h à température ambiante, sous azote	● 2'',3'',4'',2''',3''',4'''- hexasuccinate de rutine (95%) ^{d)}
Alluis <i>et al.</i> , 2000	<u>flavonoïde</u> : rutine protégée <u>donneur d'acyle</u> : (1/3 à 2/3) ^{a)} , anhydride succinique	DMAP (catalyseur), pyridine, 6 à 7 h à 0°C, sous azote	<ul style="list-style-type: none"> ● disuccinate de rutine (28%)^{d)} 3 isomères ● 4'''-succinate de rutine (21%)^{d)}
Mariotte <i>et al.</i> , 2001	<u>flavonoïde</u> : hespérétine <u>donneurs d'acyle</u> : (1/1) ^{a)} chlorure de laurate, chlorure de palmitate, chlorure de stéarate, chlorure d'oléate, chlorure de linoléate, chlorure de linoléate, chlorure d'heptanoate, anhydride butyrique, anhydride succinique	pyridine, 1 h, température ambiante	<ul style="list-style-type: none"> ● diacycle d'hespérétine (64%)^{d)} ● mélanges diacycle d'hespérétine (18 à 25%)^{d)}, monoacycle d'hespérétine (10 à 12%)^{d)}

a) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle

d) pourcentage de conversion du flavonoïde

Les méthodes d'acylation ayant recours à la protection / déprotection des composés nécessitent un grand nombre d'étapes de synthèse et de purification. Les méthodes chimiques mises en œuvre pour synthétiser des monoesters à partir de flavonoïdes non protégés mènent à des rendements inférieurs à 35%. Les produits obtenus nécessitent d'être purifiés, d'une part, pour la séparation des différents esters formés (mono, diesters et leurs isomères) et d'autre part, pour l'élimination des solvants et catalyseurs basiques incompatibles avec une utilisation en industrie cosmétique par exemple.

III.2. Acylation chimio-enzymatique des flavonoïdes

Pour pallier la non sélectivité de la synthèse chimique, l'utilisation de catalyseurs enzymatiques tels que les hydrolases est une technique de choix.

Deux démarches ont été développées selon que le flavonoïde est ou non glycosylé.

En ce qui concerne les flavonoïdes aglycones tous les hydroxyles sont acylés chimiquement, puis, au cours d'une deuxième étape, les produits sont soumis à une hydrolyse enzymatique sélective.

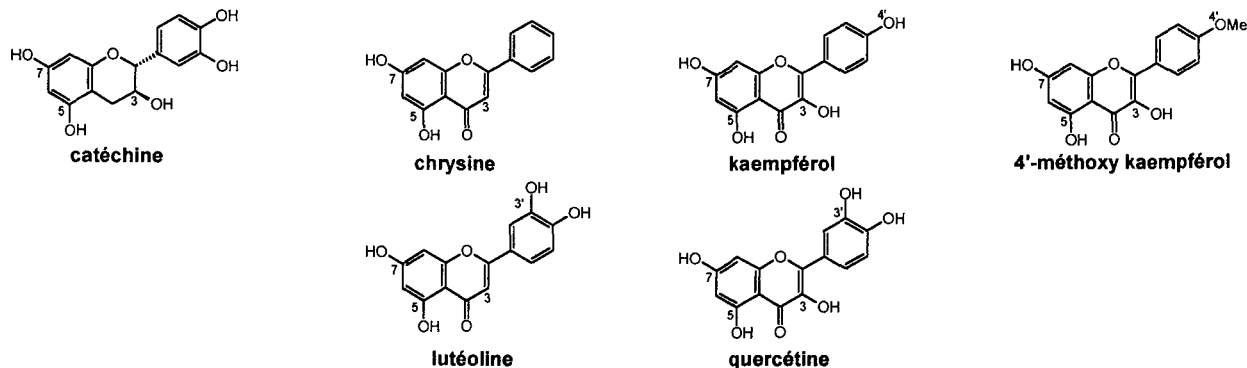
Ainsi, une équipe italienne (Giorno *et al.*, 1997; Natoli *et al.*, 1990; Natoli *et al.*, 1992) a utilisé la lipase de *Pseudomonas cepacea* pour effectuer des alcoolyses partielles à partir de flavonoïdes acétylés sur toutes les positions.

La sélectivité de la lipase de *Pseudomonas cepacea* s'est montrée hautement dépendante de la structure du flavonoïde mis en jeu. Les produits obtenus sont des mélanges de flavonoïdes dans des proportions variables (tableau 12).

Plus tard, une autre équipe italienne (Nicolosi *et al.*, 1999; Patti *et al.*, 2000) a utilisé la préparation enzymatique Lipozyme IM®, lipase immobilisée de *Mucor miehei*, pour catalyser la déacylation sélective d'un flavonol (quercétine) et d'un flavanol (catéchine). Le Lipozyme IM® donne des résultats satisfaisants. En effet, tous les hydroxyles phénoliques sont libérés, seul reste acylé l'hydroxyle en position 3. Les flavonoïdes acylés en position 3 sont obtenus avec des taux de conversion importants, de l'ordre de 90%.

En ce qui concerne les flavonoïdes glycosylés, les résultats sont regroupés avec ceux de l'acylation enzymatique (chapitre 1, § III.2).

tableau 12: exemples d'acylations chimio-enzymatiques des flavonoïdes aglycones.



Ref.	Substrats	Conditions expérimentales	Produits
Natoli <i>et al.</i> , 1992	● tétraacétate de lutéoline	butan-1-ol (1/5) ^{a)} , THF anhydre, 24h, 42°C	● 5,7,3'-triacétate de lutéoline (90%) ^{d)} , 5,7-diacétate de lutéoline (10%) ^{d)}
	● tétraacétate de kaempférol	<u>enzyme</u> : lipase de <i>Pseudomonas cepacea</i> (2 à 20 g.l ⁻¹)	● 3,5,7-triacétate de kaempférol (52%) ^{d)} , 3,5-diacétate de kaempférol (48%) ^{d)}
	● triacétate de 4'-méthoxy kaempférol		● 3,5-diacétate de 4'-méthoxy kaempférol (75%) ^{d)} , 3-acétate de 4'-méthoxy kaempférol (25%) ^{d)}
	● pentaacétate de quercétine		● 3,5,3',4'-tétraacétate de quercétine (49%) ^{d)} , 3,5,3'-triacétate de quercétine (28%) ^{d)} , 3,3',4'-triacétate de quercétine (13%) ^{d)} , 3-acétate de quercétine (10%) ^{d)}
Giorno <i>et al.</i> , 1997	● diacétate de chryisine	butan-1-ol (1/5) ^{a)} , THF anhydre <u>enzyme</u> : lipase de <i>Pseudomonas cepacea</i> libre ou immobilisée	● acétate de chryisine et chryisine obtenues avec enzyme libre ● acétate de chryisine uniquement avec enzyme immobilisée
Nicolosi <i>et al.</i> , 1999	● pentapalmitate de quercétine	butan-1-ol (1/4) ^{a)} , terbutyl méthyl ether, 5jours, 45°C <u>enzyme</u> : lipozyme IM® : lipase immobilisée de <i>Mucor miehei</i>	● 3-O-palmitate de quercétine (92%) ^{d)}
Patti <i>et al.</i> , 2000	● pentapropionate de catéchine	butan-1-ol (1/4) ^{a)} , terbutyl méthyl ether, 36-96h, 45°C	● 3-O-propionate de catéchine (94%) ⁱ⁾
	● pentavalérate de catéchine	<u>enzyme</u> : lipozyme IM® : lipase immobilisée de <i>Mucor miehei</i>	● 3-O-valérate de catéchine (90%) ⁱ⁾
	● pentapalmitate de catéchine		● 3-O-palmitate de catéchine (70%) ⁱ⁾
	● 5,7,3',4'-tétraacétate-3-palmitate de catéchine		● 3-O-palmitate de catéchine (90%) ⁱ⁾

a) rapport molaire flavonoïde acylé / accepteur d'acyle

d) rendement de conversion du flavonoïde

e) rendement de purification

III.3. Acylation enzymatique de flavonoïdes

L'acylation enzymatique des flavonoïdes est très intéressante par rapport à la synthèse chimique, car elle permet d'obtenir avec certaines enzymes des produits acylés sélectivement en une seule étape.

III.3.1. Acylation de flavonoïdes aglycones

Peu d'études ont trait à l'acylation des flavonoïdes aglycones.

Lambusta *et al.*, 1993 ont obtenu du 5-O-acétate et du 7-O-acétate de catéchine par transestérification avec l'acétate de vinyle, à l'aide de la lipase de *Pseudomonas cepacea*. Ces auteurs ont également montré que l'alcoolyse enzymatique du pentaacétate de catéchine conduisait au 3-O-acétate de catéchine.

Un brevet rapporte l'acylation de la catéchine par une carboxyl-estérase de *Streptomyces rochei* ou d'*Aspergillus niger*. Les auteurs (Sakai *et al.*, 1994) obtiennent ainsi en milieu biphasique, des esters acétiques et propioniques de catéchine où les acyles sont sélectivement greffés sur la position 3 du flavanol. Signalons que l'hydroxyle situé en 3 sur la catéchine est de nature aliphatique contrairement aux autres hydroxyles (phénoliques), ce qui explique la sélectivité de la synthèse.

III.3.2. Acylation de flavonoïdes glycosylés

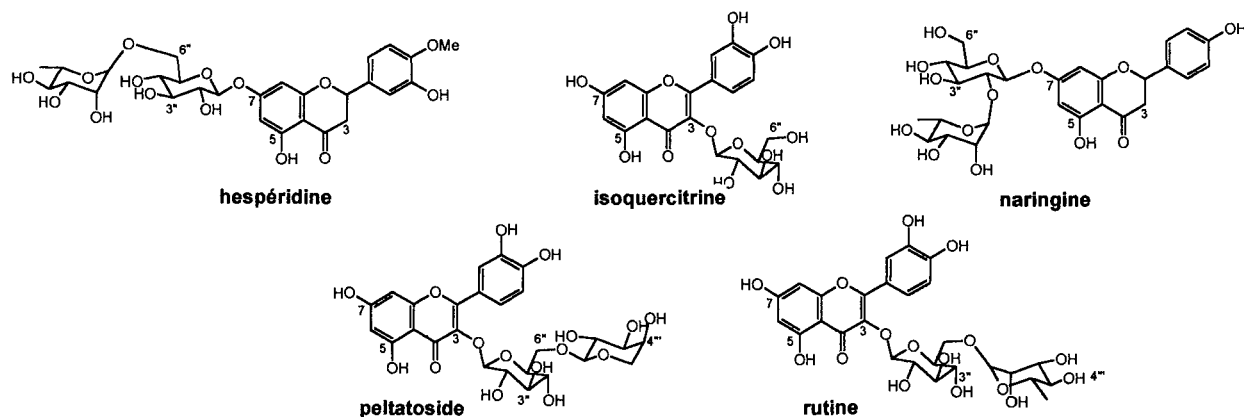
Les premières enzymes disponibles pour catalyser des synthèses d'esters en milieu non conventionnel furent des protéases. Puis avec l'augmentation du nombre d'enzymes disponibles commercialement, les essais réalisés avec les lipases et particulièrement celle de *Candida antarctica* isoenzyme B ont été menés avec succès (Danieli *et al.*, 1997, Gao *et al.*, 2001). Cependant, les résultats insuffisants obtenus avec certains donneurs d'acyle ont conduit Nakajima *et al.*, 2000 à tester une acyl-transférase, enzyme impliquée dans la biosynthèse *in vivo* des flavonoïdes acylés.

Il est à noter que l'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés conduit toujours à l'acylation sélective des hydroxyles glycosidiques, primaires de préférence, quand ils sont libres. Les hydroxyles phénoliques ne sont pas touchés.

III.3.2.1. Acylation catalysée par la subtilisine

Les premières acylations enzymatiques de flavonoïdes ont été rapportées par Danieli *et al.*, 1990. Ces réactions ont été conduites en milieu pyridine anhydre, en présence de subtilisine, protéase produite par le micro-organisme *Bacillus licheniformis*. Le donneur d'acyle (butyrate) est utilisé sous forme activée : butyrate de trifluoroéthyle, ce qui a permis à ces auteurs d'obtenir des rendements de conversion variant de 33 à 78% en 48h, selon le flavonoïde utilisé. On note une bonne sélectivité de l'enzyme pour la rutine, la naringine et l'hespéridine. Cependant, l'acylation du peltatoside mène à la formation de plusieurs produits (tableau 13).

tableau 13 : exemples d'acylations de flavonoïdes catalysées par la subtilisine.



Réf.	Substrats	Solvants, enzymes	Produits
Danieli <i>et al.</i> , 1990	flavonoïdes : (33,3 g.l ⁻¹) ^a rutine, hespéridine, peltatoside, naringine donneur d'acyle : (1/10) ^b butyrate de trifluoroéthyle	pyridine anhydre (45°C, 48h) enzyme : subtilisine de <i>Bacillus licheniformis</i> (26,6 g.l ⁻¹) ^c	<ul style="list-style-type: none"> ● 3''-O-butanoate de rutine (67%)^d ● 3''-O-butanoate d'hespéridine (65%)^d ● esters de peltatoside (78% de consommation du substrat)^d ● 3''-O-butanoate de peltatoside; 4''-O-butanoate de peltatoside; 3'',4''-O-dibutanoate de peltatoside ● 3''-O-butanoate de naringine (33%)^d
Danieli <i>et al.</i> , 1993	flavonoïde : (20 g.l ⁻¹) ^a isoquercitrine donneur d'acyle : (1/30) ^b 2-chloroéthyl méthyl succinate	pyridine anhydre (45°C, 7 jours) enzyme : subtilisine de <i>Bacillus licheniformis</i> (16 g.l ⁻¹) ^c	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-O-méthyl malonate d'isoquercitrine (45%)^d, 3''-O-méthyl malonate d'isoquercitrine (5%)^d, 3'', 6''-O-di(méthyl malonate) d'isoquercitrine (5%)^d
Kodelia <i>et al.</i> , 1994	flavonoïde : (180 g.l ⁻¹) ^a rutine donneur d'acyle : (1/9) ^b butyrate de trifluoroéthyle	pyridine anhydre (45°C, 8h) enzyme : subtilisine de <i>Bacillus subtilis</i> (Sigma) (100 g.l ⁻¹) ^c	<ul style="list-style-type: none"> ● 3''-O-butanoate de rutine (90%)^d

a) concentrations en flavonoïdes

b) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle

c) concentration en enzyme

d) pourcentage de conversion du flavonoïde

Ces conditions ont été reprises pour synthétiser le butyrate de rutine, en présence de la subtilisine de *Bacillus subtilis*, dans le but d'étudier les propriétés cytogénétiques d'un flavonoïde acylé (Kodelia *et al.*, 1994). Cette enzyme semble catalyser la réaction de transestérification beaucoup plus rapidement que la subtilisine de *Bacillus licheniformis* (tableau 13).

Après avoir réussi l'estérification de différents flavonoïdes glycosylés par des acides aliphatiques, Danieli *et al.*, 1993 n'ont pas pu acyler l'isoquercitrine avec des dérivés cinnamiques activés. Ils ont attribué leur échec au trop fort encombrement stérique de ces dérivés dans le site actif de la subtilisine, qui empêcherait l'accès du second substrat (l'isoquercitrine), lui aussi encombrant.

Ils ont donc procédé en trois étapes. La première étape, enzymatique, consiste à acyler le flavonoïde par un ester mixte d'acide malonique, le trifluoroéthyle méthyle malonate, en présence de subtilisine. Cette réaction conduit à l'acylation préférentielle du flavonoïde en position 6'' du glucose (10% du flavonoïde est acylé en 3'' ou en 3''-6''). Le groupement méthyle est ensuite sélectivement hydrolysé par la biophine estérase. Pour finir, le flavonoïde malonylé subit une réaction chimique de condensation avec le benzaldéhyde ou le 4-hydroxybenzaldéhyde, dite condensation de Knoevenagel, pour produire l'ester cinnamique correspondant (figure 45).

Cette équipe a ensuite amélioré son procédé (Riva *et al.*, 1996) en remplaçant le donneur d'acyle par un diacide malonique homogène (dibenzyle malonate) plus aisé à produire que le diester mixte. L'utilisation de la lipase B de *Candida antarctica* a permis d'améliorer le rendement de conversion du flavonoïde ainsi que la sélectivité de la réaction : seule la forme 6''-O-méthyl malonate d'isoquercitrine est synthétisée. De plus, le retrait du deuxième groupement benzyle réalisé par hydrogénation catalytique est plus aisé et surtout plus efficace que l'hydrolyse enzymatique par la biophine estérase (figure 45).

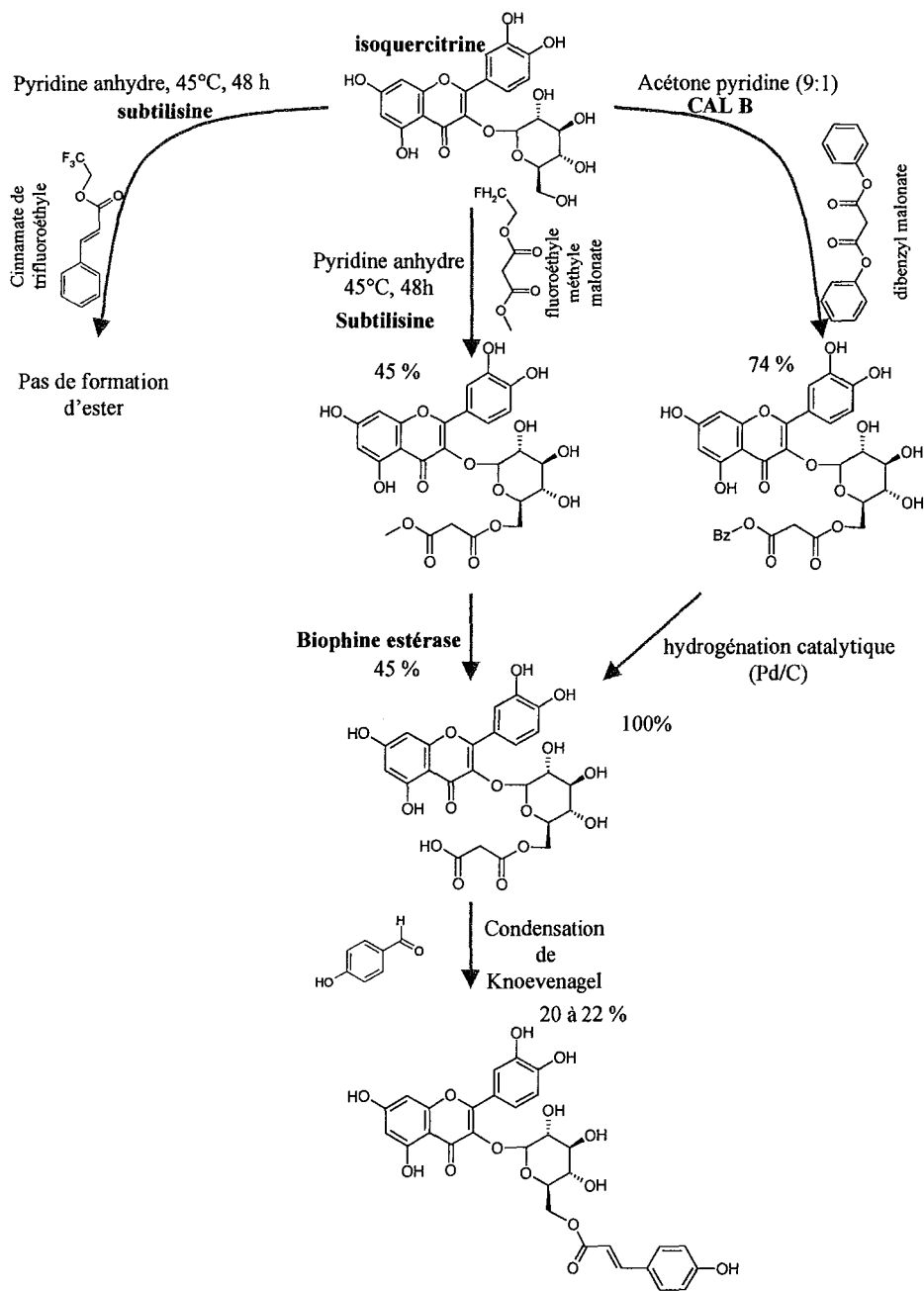


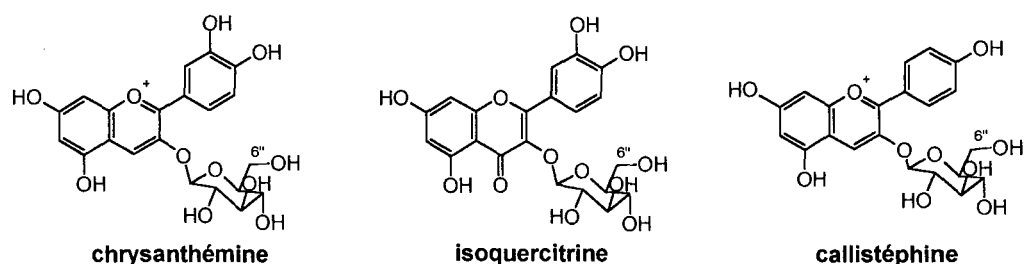
figure 45: acylation chimio-enzymatique de flavonoïdes glycosides.
Les pourcentages indiqués sont les rendements de conversion des dérivés d'isoquercitrine (Danieli et al., 1993, Riva et al., 1996).

III.3.2.2. Acylation catalysée par des transférases

Les enzymes responsables de la synthèse naturelle d'esters de flavonoïdes sont des acyl-CoA transférases. Il existe des transférases spécifiques des acides aromatiques et des transférases spécifiques des diacides (chapitre 1, § I.1.3.3). Leur spécificité est plus faible au sein de ces deux familles de donneurs d'acyles et vis-à-vis des flavonoïdes (Fujiwara *et al.*, 1998).

Ces transférases fonctionnent avec des donneurs d'acyle activés par le coenzyme A. La synthèse de telles molécules est bien trop coûteuse pour être mise en œuvre dans un procédé industriel. Nakajima *et al.*, 2000 ont donc testé un système enzymatique issu d'*Ipomoea batatas* permettant la régénération de l'acyl Co-A. La réaction d'acylation est à la fois sélective et rapide puisque l'équilibre est atteint en 3 h. Les rendements vont croissant quand on passe du cinnamate au 4-hydroxycinnamate puis au caféate et au férulate mais ne dépassent pas 40% de conversion (tableau 14).

tableau 14 : exemples d'acylations des flavonoïdes catalysées par des acyl-CoA transférases.



Réf.	Substrats	Solvants, enzymes	Produits
Fujiwara <i>et al.</i> , 1998	flavonoïde : anthocyanine-3- glucosides donneurs d'acyle : 4- hydroxycinnamate-CoA, caféate-CoA	tampon Tris, pH 7,5, 10mn, 30°C, 0,4 g.l ⁻¹ d'extrait protéique de <i>Perilla frutescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-O-(4-hydroxycinnamate) d'anthocyanine-3- glucoside ● 6''-O-caféate d'anthocyanine-3- glucoside-
Nakajima <i>et al.</i> , 2000	flavonoïdes : (2,3 g.l ⁻¹) ^{a)} isoquercitrine, callistéphine, chrysanthémine donneurs d'acyle : (1/2) ^{b)} acide caféique, acide férulique, acide 4- hydroxycinnamique, acide cinnamique	tampon Tris-HCl (pH 7,8), 30°C, 3h. enzyme : Système enzymatique d' <i>Ipomoea batatas</i> . (6,4 g de protéines.l ⁻¹) ^{c)}	<ul style="list-style-type: none"> ● caféate d'isoquercitrine (38%)^{d)} ● 4-hydroxycinnamate d'isoquercitrine (28%)^{d)} ● férulate d'isoquercitrine (19%)^{d)} ● cinnamate d'isoquercitrine (0%)^{d)} ● caféate de callistéphine (12%)^{d)} ● caféate de chrysanthémine (12%)^{d)}

a) concentrations en flavonoïdes

b) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle

c) concentration en enzyme

d) pourcentage de conversion du flavonoïde

III.3.2.3. Acylations catalysées par les lipases

Après avoir utilisé la subtilisine comme catalyseur d'estérification en milieu organique, l'équipe italienne (Riva *et al.*, 1996) a testé, avec succès, la lipase B de *Candida antarctica*. Ils ont pu synthétiser des esters maloniques d'isoquercitrine, de rutine et de naringine en deux étapes (figure 45).

Nakajima *et al.*, 1999b ont testé 9 lipases : Amano-A (lipase d'*Aspergillus niger*), Amano-AY (lipase de *Candida rugosa*), Amano-F (lipase d'*Aspergillus oryzae*), Amano-M

(lipase de *Mucor javanicus*), Amano-PS (lipase de *Pseudomonas cepacea*), CALB, PPL (lipase pancréatique de porc), CRL (lipase de *Candida rugosa*), LPL-typeA (lipoprotéine lipase de type A). Parmi ces 9 lipases seules CALB (lipase de *Candida antarctica*) et Amano-PS se sont montrées efficaces pour la synthèse d'esters cinnamiques de flavonoïdes glucosides. D'autre part, Gao *et al.*, 2001 ont testé le Lipozyme IM®, lipase immobilisée de *Mucor miehei*, en parallèle avec le Novozym 435®, lipase B immobilisée de *Candida antarctica*, et ont conclu que les deux préparations enzymatiques étaient intéressantes pour l'acylation des flavonoïdes glycosides, le Novozym 435® étant le plus efficace.

III.3.2.3.1. Acylation par des acides aliphatiques

Les catalyses avec le Novozym 435® sont menées dans le ter-butanol, l'acétone, le THF (tétrahydrofurane) ou dans le mélange acétone/pyridine (9/1 : v/v), à des températures variant de 45 à 65°C. La durée des réactions varie de 45 à 200h en fonction du donneur d'acyle utilisé.

Dans un premier temps, Danieli *et al.*, 1997 ont utilisé l'acétate de vinyle dans le but d'étudier la sélectivité de CALB sur différents flavonoïdes glycosylés. Ils ont obtenu des mono ou diacétates de flavonols avec des taux de conversion supérieurs à 75% pour des temps réactionnels variant de 45 à 150 h (tableau 15). Cependant, la pyridine, utilisée pour augmenter la solubilité des flavonoïdes dans le milieu réactionnel, et l'acétaldéhyde produit par isomérisation du groupement vinylique libéré par l'alcoolyse, sont des molécules toxiques.

Par la suite, d'autres chercheurs ont étudié des conditions réactionnelles plus douces et plus compatibles avec une éventuelle utilisation des esters en industrie cosmétique ou alimentaire. Un procédé d'estérification directe en présence de solvants peu toxiques a ainsi conduit au dépôt d'un brevet (Geers *et al.*, 2001).

Kontogianni *et al.*, 2001, ont déterminé que l'estérification directe est plus efficace dans le ter-butanol que dans l'acétone, le THF ou sans solvant (tableau 15). Les rendements obtenus sont inférieurs à ceux observés par Danieli *et al.* 1997. La sélectivité de la réaction est excellente puisque seul l'hydroxyle primaire de la naringine et la position 3'' de la rutine sont acylées.

Gayot *et al.*, 2003 ont réussi la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïde et d'acide gras à longue chaîne. Leur étude montre l'importance de l'activité de l'eau dans le milieu

réactionnel : les rendements obtenus sont nettement améliorés lorsque le milieu réactionnel est déshydraté au cours de la synthèse par l'addition de tamis moléculaire.

tableau 15 : exemples de synthèses d'esters aliphatiques de flavonoïdes catalysées par des lipases.

Réf.	Substrats	Solvants, enzymes	Produits
Danieli et al., 1997	flavonoïdes : (18 à 25 g.l ⁻¹) ^{a)} isoquercitrine, quercitrine, rutine donneur d'acyle : (1/10) ^{b)} acétate de vinyle	acétone/pyridine (9/1 :v/v, 45°C) enzyme :Novozym 435® (30 g.l ⁻¹) ^{c)}	<ul style="list-style-type: none"> ● 3'',6''-diacétate d'isoquercitrine (79% en 60 h)^{d)} ● 4''-acétate de quercitrine (77% en 150h)^{d)} ● 3'',4''-diacétate de rutine (91% en 45h)^{d)}
Geers et al., 2001	flavonoïde : (133 g.l ⁻¹) ^{a)} naringine donneurs d'acyle : (environ 1/4) acide stéarique, palmitique, laurique, oléique, caprique, 12-hydroxy-stéarique, linoléique	ter-butanol, 60 à 65°C, 40h enzyme :Novozym 435® (333 g.l ⁻¹) ^{c)}	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-stéarate de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-palmitate de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-laurate de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-oléate de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-caprate de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-(12-hydroxy-stéarate) de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-linoléate de naringine (<15%)^{d)}
Kontogianni et al., 2001; Kontogianni et al., 2003	flavonoïdes : (10 à 80 g.l ⁻¹) ^{a)} rutine, naringine donneurs d'acyle : (1/3 à 1/8) ^{b)} acide octanoïque, acide décanoïque, acide dodécanoïque	acétone, ter-butanol, THF, sans solvant, 45°C ^{f)} enzyme : Novozym 435® (5 à 20 g.l ⁻¹) ^{c)}	<ul style="list-style-type: none"> ● 3''-acyle de rutine ● 6''-acyle de naringine Nb : - le taux de conversion ne dépend pas de la longueur de chaîne de l'acyle - milieu ter-butanol (60% en 220h) ^{d)} - milieu THF : maximum 4% ^{d)} - milieu acétone : maximum 30% ^{d)} - milieu sans solvant : maximum 13% ^{d)}
Gayot et al., 2003	flavonoïde : (29 g.l ⁻¹) ^{a)} naringine donneur d'acyle : (1/5) ^{b)} acide palmitique	M ₂ B ₂ (60°C, 56h) enzyme :Novozym 435® (10 g.l ⁻¹) ^{c)}	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-palmitate de naringine 25%^{d)} en séchant solvant et substrat ● 45%^{d)} en séchant milieu réactionnel par addition de tamis moléculaire

a) concentrations en flavonoïdes

b) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle

c) concentration en enzyme

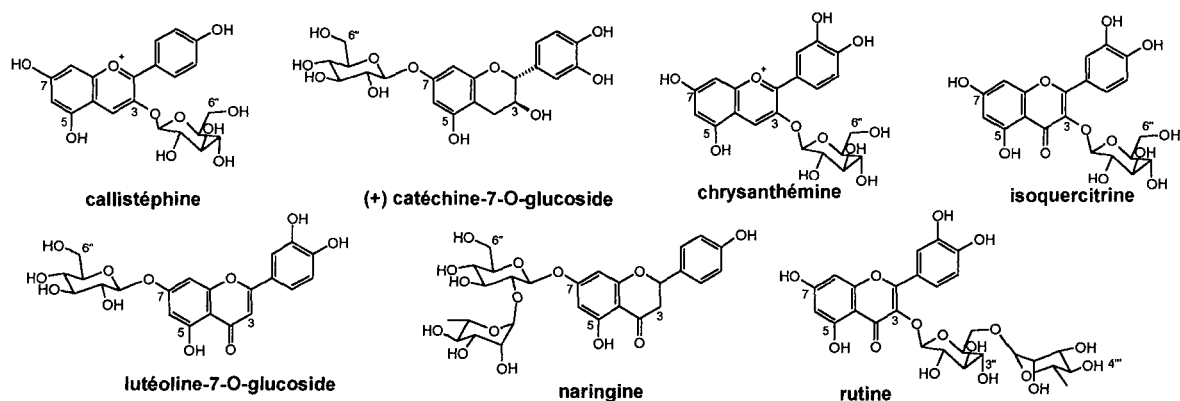
d) pourcentage de conversion du flavonoïde (substrat limitant)

f) temps réactionnel non mentionné par les auteurs

III.3.2.3.2. Acylation par des acides aromatiques

Les résultats des études portant sur l'acylation de flavonoïdes glycosylés par des acides aromatiques sont reportés tableau 16.

tableau 16 : exemples de synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes catalysées par des lipases.



Réf.	Substrats	Solvants, enzymes	Produits
Nakajima <i>et al.</i> , 1997, Nakajima <i>et al.</i> , 1999b	<p><u>flavonoïdes</u> : (10 à 46 g.l⁻¹)^{a)} isoquercitrine, callistéphine, naringine, rutine, chrysanthémine</p> <p><u>donneurs d'acyle</u> : (1/5)^{b)} cinnamate de vinyle, 4-hydroxycinnamate de vinyle, caféate de vinyle, férulate de vinyle</p>	<p>acétonitrile, acétone ou acétone/DMF (10/1 ; v/v) à 37 ou 40°C pendant 2 à 7 jours</p> <p><u>enzyme</u> : CAL-B (poudre lyophilisée 10 à 12,5g.l⁻¹)^{c)}, Amano PS (lipase de <i>Pseudomonas cepacea</i>) (10 g.l⁻¹)^{c)}</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● cinnamate d'isoquercitrine (68%)^{e)} ● 4-hydroxycinnamate d'isoquercitrine (>40%)^{d)} ● caféate d'isoquercitrine (>0%)^{d)} ● férulate d'isoquercitrine (>0%)^{d)} ● cinnamate de naringine ● cinnamate de rutine ● cinnamate de callistéphine ● cinnamate de chrysanthémine
Gao <i>et al.</i> , 2001	<p><u>flavonoïdes</u> : (10 à 30 g.l⁻¹)^{a)} (+)-catéchine-7-O-α-D-glucoside, naringine, isoquercitrine, lutéoline-7-glucoside</p> <p><u>donneurs d'acyle</u> : (1/4)^{b)} cinnamate de vinyle, 4-hydroxycinnamate de vinyle, caféate de vinyle</p>	<p>ter-butanol/pyridine (10/1 ; v/v) 37°C, 5 jours</p> <p><u>enzyme</u> :Novozym 435® (15 à 44 g.l⁻¹)^{c)}</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-cinnamate de catéchine 7-O-α-D-glucosyl (70%)^{e)} ● 6''-férulate de naringine (25%)^{e)} ● 6''-(4-hydroxycinnamate) de naringine (30%)^{e)} ● 6''-cinnamate de naringine (30%)^{e)} ● 6''-(4-hydroxycinnamate) d'isoquercitrine (32%)^{e)} ● 6''-cinnamate d'isoquercitrine (45%)^{e)} ● 6''-férulate d'isoquercitrine (15%)^{e)} ● 6''-cinnamate de lutéoline-7-O-glucosyl (30%)^{e)}
Geers <i>et al.</i> , 2001	<p><u>flavonoïdes</u> : (133 g.l⁻¹)^{a)} naringine</p> <p><u>donneurs d'acyle</u> : (environ 1/4) acide 4-hydroxycinnamique, 4-chlorophénylacétique, cinnamique, 4-hydroxyphénylacétique, 5-phénylvalérique, 4-phénylbutyrique, 3-phénylpropionique</p>	<p>ter-butanol, 60 à 65°C, 40h</p> <p><u>enzyme</u> :Novozym 435® (333 g.l⁻¹)^{c)}</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 6''-(4-hydroxycinnamate) de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-(4-chlorophénylacétate) de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-cinnamate de naringine (<15%)^{d)} ● 6''-(4-hydroxyphénylacétate) de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-(5-phénylvalérate) de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-(4-phénylbutyrate) de naringine (>15%)^{d)} ● 6''-(3-phénylpropionate) de naringine (>15%)^{d)}

a) concentrations en flavonoïdes

b) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle

c) concentration en enzyme

d) pourcentage de conversion du flavonoïde

e) rendement de purification

Les réactions sont effectuées dans l'acétonitrile, l'acétone, le ter-butanol, dans des mélanges acétone/DMF (10/1 ; v/v) ou ter-butanol/pyridine (10/1 ; v/v), de 37 à 65°C. Mis à part les travaux de Geers *et al.*, 2001, les donneurs d'acyle mis en jeu sont des esters vinyliques.

Nakajima *et al.*, 1999b ont tenté avec succès l'acylation de l'isoquercitrine par le cinnamate de vinyle et ont pu isoler 68% de cinnamate d'isoquercitrine après 3 jours de réaction. Ces auteurs ont ensuite étendu cette réaction à la synthèse d'esters d'autres flavonoïdes avec d'autres donneurs d'acyles (4-hydroxycinnamate, caféate et férulate). La sélectivité est bonne puisqu'une seule position du flavonoïde est concernée par cette acylation. Cependant, les rendements vont en décroissant en passant du cinnamate au 4-hydroxycinnamate puis au caféate et au férulate. Ces types d'esters ont aussi été synthétisés par Gao *et al.*, 2001 avec des résultats équivalents à ceux de Nakajima *et al.*, 1999b.

Quelques inconvénients sont liés à l'utilisation des dérivés vinyliques. Non seulement, ils conduisent à la formation d'acétaldéhyde dans le milieu réactionnel mais aussi certains dérivés (caféate de vinyle) sont difficilement synthétisés (Nakajima *et al.*, 2000).

La seule étude concernant la synthèse enzymatique d'esters aromatiques de flavonoïdes par estérification directe est rapportée dans le brevet déposé par la société Henkel/Cognis (Geers *et al.*, 2001). Les rendements obtenus avec les dérivés cinnamiques sont faibles, inférieurs à 15%. Pour les autres dérivés aromatiques (tableau 16), les rendements sont supérieurs à 15%.

III.4. Conclusion

Les premières tentatives d'acylation enzymatique de flavonoïdes ont été conduites en milieu non conventionnel en présence de subtilisine (protéase). Cette enzyme n'a permis de fixer sur la structure flavonoïde que des acides à courte chaîne (Danieli *et al.*, 1993).

Par la suite, les lipases et en particulier la lipase B de *Candida antarctica* sous sa forme immobilisée ont permis l'acylation des flavonoïdes soit avec des acides gras à courte et longue chaîne (Gayot *et al.*, 2003), soit avec des acides aromatiques (Nakajima *et al.*, 1997, Gao *et al.*, 2001).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des donneurs d'acyle aromatiques activés sous forme vinylique (Nakajima *et al.*, 1999b). Une seule étude à ce jour fait état d'une estérification directe par des acides cinnamiques (Geers *et al.*, 2001).

Dans tous les cas les rendements restent modestes et les temps réactionnels longs (40 h à plusieurs jours). Au mieux, Nakajima *et al.*, 1999b isolent le cinnamate d'isoquercitrine avec un rendement de 68%. L'hydroxyle en 6'' du glucose est acylé préférentiellement par la CALB lorsque ce résidu est présent. De plus, certains auteurs (Nakajima *et al.*, 1999b, Gao *et al.*, 2001) ont observé que la présence de substituants hydroxyles ou méthoxyles sur le noyau aromatique des acides de la série cinnamique ralentit la réaction de synthèse.

**objectifs du travail
expérimental**

Objectifs du travail expérimental

En ce qui concerne les flavonoïdes, l'acylation par des donneurs d'acyle aromatiques semble être une modification des plus intéressantes. Elle ne modifie pas seulement la solubilité des flavonoïdes mais elle peut aussi augmenter voire faire apparaître de nouvelles propriétés biologiques.

Nous avons donc envisagé d'étudier l'acylation de certains flavonoïdes abondants dans les produits alimentaires à cause de leur disponibilité et de leur intérêt en santé humaine.

Ainsi, les deux principaux flavonoïdes modèles que nous avons choisis sont :

- l'isoquercitrine (flavonol) qui possède des propriétés antioxydantes parmi les plus puissantes dans la famille des flavonoïdes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

- la phloridzine dont le pouvoir antioxydant est bien plus modeste, mais qui est employée en dermocosmétique pour ses propriétés amincissantes. Elle possède en outre une structure beaucoup moins rigide que l'isoquercitrine (figure 46).

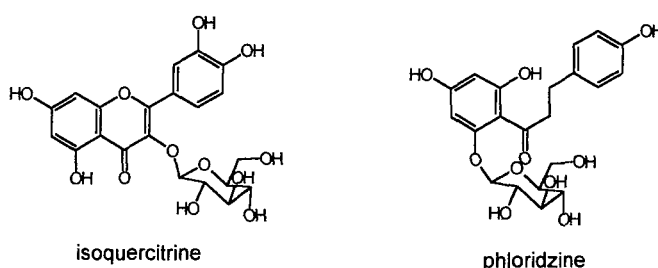


figure 46 : structures chimiques de l'isoquercitrine et de la phloridzine.

Les autres flavonoïdes étudiés ici ont notamment des propriétés antioxydantes (rutine, peltatoside), veinotoniques (rutine, diosmine, hespéridine), sucrantes (néohespéridine dihydrochalcone) ou amincissantes (naringine).

Les travaux faisant état de l'acylation des flavonoïdes par des acides aromatiques font apparaître que :

- à ce jour, l'enzyme commercialement disponible la plus adaptée pour ces synthèses est la lipase B de *Candida antarctica*
- certains donneurs d'acyles aromatiques sont mieux acceptés que d'autres par la lipase B de *Candida antarctica*
- jusqu'ici, seule l'utilisation des donneurs d'acyles sous forme vinylique a permis d'obtenir des rendements de conversion conséquents (>15%)

En conséquence, le travail expérimental a été organisé dans le but :

- ❧ dans un premier temps d'établir la spécificité de la lipase B de *Candida antarctica* vis-à-vis des donneurs d'acyle aromatiques. Un criblage des donneurs d'acyles a été réalisé pour sélectionner les molécules à greffer sur les flavonoïdes ainsi que pour mieux comprendre les mécanismes régissant la sélectivité de la lipase.
- ❧ d'étudier ensuite la faisabilité de la synthèse enzymatique de flavonoïdes acylés à partir d'un produit modèle : le cinnamate d'isoquercitrine. Il a été fait un choix délibéré de ne pas utiliser de donneurs d'acyles activés et de solvants trop toxiques. De cette étude préalable ressortent deux voies efficaces de synthèse :
 - la synthèse en présence de solvant tel que le 2-méthylbutan-2-ol est étudiée dans la troisième partie.
 - la synthèse sans ajout d'un tiers solvant qui fait l'objet de la quatrième partie.

Ces deux dernières parties suivent la même approche. Dans chaque milieu, l'influence des conditions opératoires sur la synthèse d'un produit modèle est d'abord étudiée, ensuite, le flavonoïde modèle (la phloridzine) est acylé par différents donneurs d'acyles puis les réactivités de différents flavonoïdes sont étudiées.

Chapitre 2 :

matériel et méthodes

I. Matériel	87
I.1. L'enzyme	87
I.2. Les produits chimiques	87
I.3. Dispositifs expérimentaux utilisés pour les synthèses	89
II. Protocoles des synthèses enzymatiques	93
II.1. Synthèses en milieu solvant	93
II.2. Synthèses avec le donneur d'acyle comme solvant	94
II.3. Synthèses où l'accepteur d'acyle joue le rôle du solvant :	95
II.4. Exploitation des résultats	96
III. Protocoles de purification des produits de synthèse	97
III.1. Séparation par chromatographie sur couche mince	97
III.2. Purification sur colonne de silice	101
III.3. Purification par extraction liquide-liquide	102
IV. Méthodes analytiques	104
IV.1. Analyses des réactants par chromatographie liquide haute performance	104
IV.1.1. Appareillage, mode d'éluion	104
IV.1.2. Protocole d'étalonnage	105
IV.1.3. Préparation des échantillons	108
IV.2. Mesures de la solubilité des flavonoïdes	109
IV.3. Dosages de l'eau dans les milieux réactionnels	109
IV.3.1. Détermination de la teneur en eau	109
IV.3.2. Mesure de l'activité de l'eau	110
IV.4. Méthodes utilisées pour la caractérisation des esters	112
IV.4.1. Spectrométrie ultraviolet-visible	112
IV.4.2. Spectrométrie infrarouge	112
IV.4.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire	112

I. Matériel

I.1. L'enzyme

Le Novozym 435® a été utilisé tout au long de cette étude. C'est une préparation enzymatique commercialisée par Novozymes A/S. Il s'agit de la lipase B de *Candida antarctica*, exprimée dans *Aspergillus niger*. Elle est immobilisée par adsorption sur une résine acrylique macroporeuse. Elle est fournie avec une teneur en eau de 1 à 2% (p/p) et une teneur en protéine enzymatique comprise entre 1 et 10%. Son activité est de 7000 PLU : cette activité enzymatique fait référence à la synthèse du laurate de propyle à 60°C (1 PLU = 1 µmol de laurate de propyle synthétisée en 1 min par 1 g de Novozym 435®). La préparation enzymatique se présente sous forme de granules de couleur blanc cassé, d'un diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm.

I.2. Les produits chimiques

Les nombreuses substances utilisées sont répertoriées dans les trois tableaux suivants.

tableau 17 : liste des flavonoïdes utilisés au cours de cette étude.

flavonoïdes	famille (sucre)	fournisseur	masse molaire (g.mol ⁻¹)	pureté
diosmine	flavone (rutinose)	Extrasynthèse	608,56	Nm
hespéridine	flavone (rutinose)	Extrasynthèse	610,57	Nm
isoquercitrine	flavonol (glucose)	Extrasynthèse	464,38	Nm
lutéoline-7-O-glucoside	flavone (glucose)	Extrasynthèse	448,38	Nm
naringine	flavanone (néohespéridose)	Extrasynthèse	580,55	Nm
néohespéridine	dihydrochalcone (néohespéridose)	Extrasynthèse	612,59	Nm
peltatoside	flavonol (arabinoglucose)	Extrasynthèse	596,50	Nm
phlorétine	dihydrochalcone	Fluka	274,28	>98%
phloridzine	dihydrochalcone (glucose)	Extrasynthèse	436,41	Nm
quercétine dihydrate	flavonol	Fluka	302,25	99%
rutine trihydrate	flavonol (rutinose)	Fluka	664,55	90%

Nm : non mentionnée

La pureté des flavonoïdes fournis par Extrasynthèse n'est pas mentionnée. Cependant, les analyses CLHP de chacun de ces produits révèlent la présence d'un unique composé absorbant à 280 nm (le flavonoïde). De plus, les analyses RMN réalisées sur 3 de ces composés montrent la grande pureté de ces substrats.

tableau 18 : liste des donneurs d'acyle utilisés au cours de cette étude.

donneurs d'acyle	fournisseur	masse molaire (g.mol ⁻¹)	pureté
2-hydroxybenzoate de méthyle (salicylate de méthyle)	Fluka	152,15	>99%
3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle	Fluka	184,15	98%
4-aminobenzoate d'éthyle	Fluka	165,19	>99%
4-hydroxybenzoate de méthyle	Fluka	152,15	99,5%
4-hydroxyphénylacétate de méthyle	Aldrich	166,18	99%
4-hydroxyphénylpropionate de méthyle	Aldrich	180,20	97%
acide 2,3-dihydroxybenzoïque	Aldrich	154,22	99%
acide 2,5-dihydroxyphénylacétique (homogentisique)	Aldrich	168,14	98%
acide 2,6-dihydroxybenzoïque	L. Light & Co. Colnbrook	154,22	Nm
acide 2-hydroxybenzoïque (salicylique)	Prolabo	138,12	>99,8%
acide 2-hydroxycinnamique (o-coumarique)	Fluka	164,16	>97%
acide 2-hydroxyphénylacétique	Fluka	152,15	>97%
acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (gallique)	L. Light & Co. Colnbrook	170,13	Nm
acide 3,4,5-triméthoxycinnamique	Aldrich	238,24	98%
acide 3,4-dihydroxybenzoïque (protocatéchique)	Fluka	154,22	>97%
acide 3,4-dihydroxycinnamique (caféique)	Fluka	180,16	>99%
acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	Fluka	168,15	98%
acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique	Fluka	182,18	>98%
acide 3,4-diméthoxybenzoïque (vératrique)	L. Light & Co. Colnbrook	182,18	Nm
acide 3,4-diméthoxycinnamique	Fluka	208,22	99%
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque (syringique)	Merck	198,18	98%
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (sinapique)	Fluka	224,22	>97%
acide 3-aminobenzoïque	Fluka	137,13	>97%
acide 3-caféoylquinique (chlorogénique)	Aldrich	354,31	>90%
acide 3-hydroxybenzoïque	Fluka	138,12	>99%
acide 3-hydroxycinnamique (m-coumarique)	Fluka	164,16	>98%
acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque (vanillique)	Fluka	168,15	>97%
acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (férule)	Fluka	194,19	>98%
acide 3-nitrocinnamique	Merck	193,16	97%
acide 4-aminobenzoïque	Prolabo	137,13	99%
acide 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (homovanillique)	Fluka	182,18	99%
acide 4-hydroxybenzoïque	Fluka	138,13	>99,8%
acide 4-hydroxycinnamique (p-coumarique)	Fluka	164,16	>98%
acide 4-hydroxyphénylacétique	Fluka	152,15	>98%
acide 4-hydroxyphénylpropionique	Aldrich	166,18	98%
acide benzoïque	Prolabo	122,12	>99,7%
acide cinnamique	Prolabo	148,16	>99,7%
acide quinique	Fluka	192,17	>98%
benzoate de méthyle	Fluka	136,15	>98%
cinnamate d'éthyle	Aldrich	176,22	99%
cinnamate de méthyle	Merck	162,19	>99%
malonate de diéthyle	Aldrich	136,15	99%

Nm : non mentionnée

tableau 19 : liste des produits divers utilisés au cours de cette étude.

produits divers	fournisseur	masse molaire en g.mol ⁻¹ (température d'ébullition)	pureté
butan-1-ol	BDH	74,12 (117,6°C)	99,5%
2,6-diméthoxyphénol	Fluka	154,17	>97%
2-méthylbutan-2-ol (M ₂ B ₂)	Merck	88,15 (102°C)	>99%
biphényl-4,4'-diol	Merck	186,21	99%
4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one (HMP)	Fluka	116,16 (158-162°C)	99%
acétone	Prolabo	58,08 (56°C)	>99,5%
acide acétique	BDH	60,05 (117,9°C)	99,8%
acide trifluoroacétique (TFA)	Sigma	114,02 (71,8°C)	98%
chloroforme	Merck	119,38 (61,7°C)	>99%
diméthylsulfoxyde-d ₆ (DMSO-d ₆)	Merck	84,17	>98%
hexane	Carlo Erba	86,18 (68,5°C)	>96%
méthanol	BDH	32,04 (64,6°C)	>96%
tamis moléculaire UOP 4 Å	Fluka		

I.3. Dispositifs expérimentaux utilisés pour les synthèses

a) Les **synthèses effectuées sous pression atmosphérique** ont été menées dans un réacteur de 25 ml (Wheaton®) parfaitement agité, placé dans un bain d'huile de silicone thermostaté. La régulation de la température et l'agitation sont assurées par un agitateur magnétique chauffant (RTC basic : IKA Labortechnik).

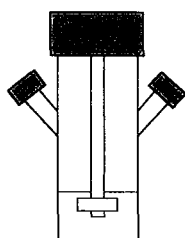


figure 47 : réacteur à barreau aimanté suspendu type Wheaton.

b) Les **synthèses sous pression réduite** ont été effectuées soit dans un ballon d'évaporation fixé sur un évaporateur rotatif soit dans un réacteur Syncore Polyvap.

* Les évaporateurs rotatifs (R-144 et R-205 Büchi) utilisés sont composés d'une pompe : KNF Neuberger Laboport ou Büchi Vac ® V-500, d'un régulateur de pression : Switch-box B-745 ou V-800 et d'un bain thermostaté : Büchi Heating Bath B-490 ou Büchi Water Bath B-480 contenant de l'huile de silicone Rhodorsil® 47V20 (Prolabo).

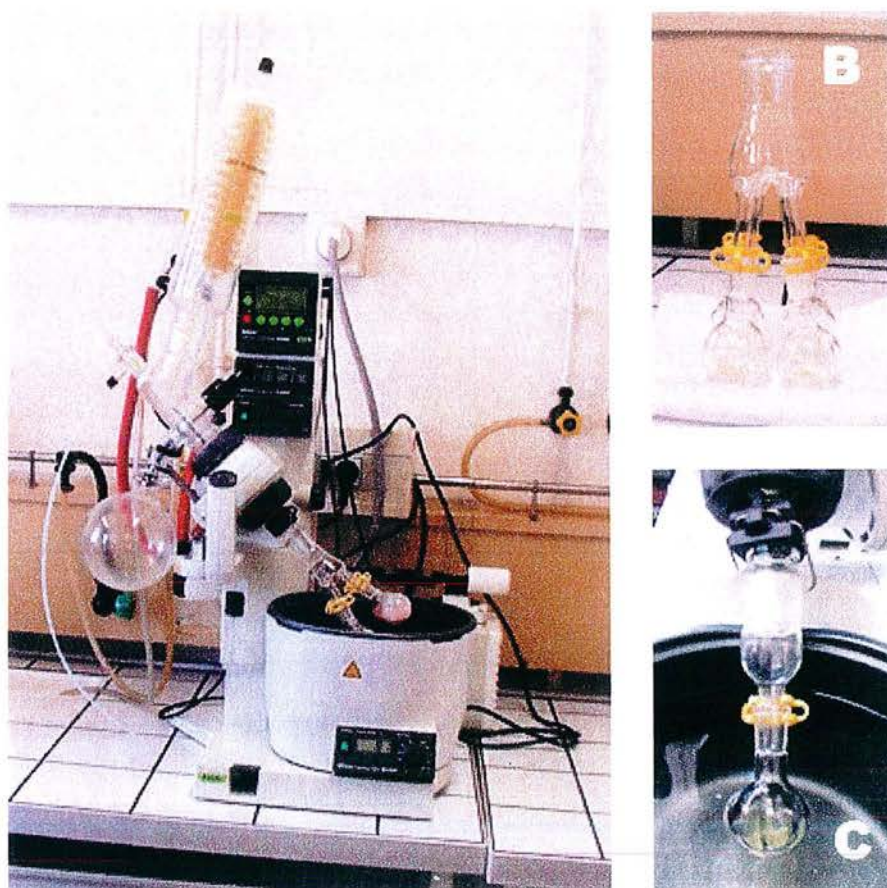


figure 48 : évaporateur rotatif utilisé pour la synthèse sous pression réduite
(A) évaporateur rotatif, (B) adaptateur 4 pis, (C) adaptateur un ballon.

Les réactions ont lieu dans des ballons d'évaporation de 25 ml munis de chicanes (figure 48 C) pour assurer l'homogénéisation du milieu réactionnel.

Eventuellement, un adaptateur, 4 pis, permettant de fixer 4 ballons simultanément a pu être utilisé (figure 48 B).

* Le réacteur Syncore Polyvap (Büchi), présenté figure 49, est composé :

- d'une unité de base chauffante (de température ambiante à 100°C) avec une agitation orbitale jusqu'à 600 rotation par minutes (rpm).
- d'un rack à 24 puits pour tubes de 30 ml (Duran Schott).
- d'un couvercle chauffant (de température ambiante à 70°C) à 24 prises de vide.
- d'un condenseur avec récipient de récupération des solvants.
- d'une pompe à vide (Büchi Vac ® V-500).

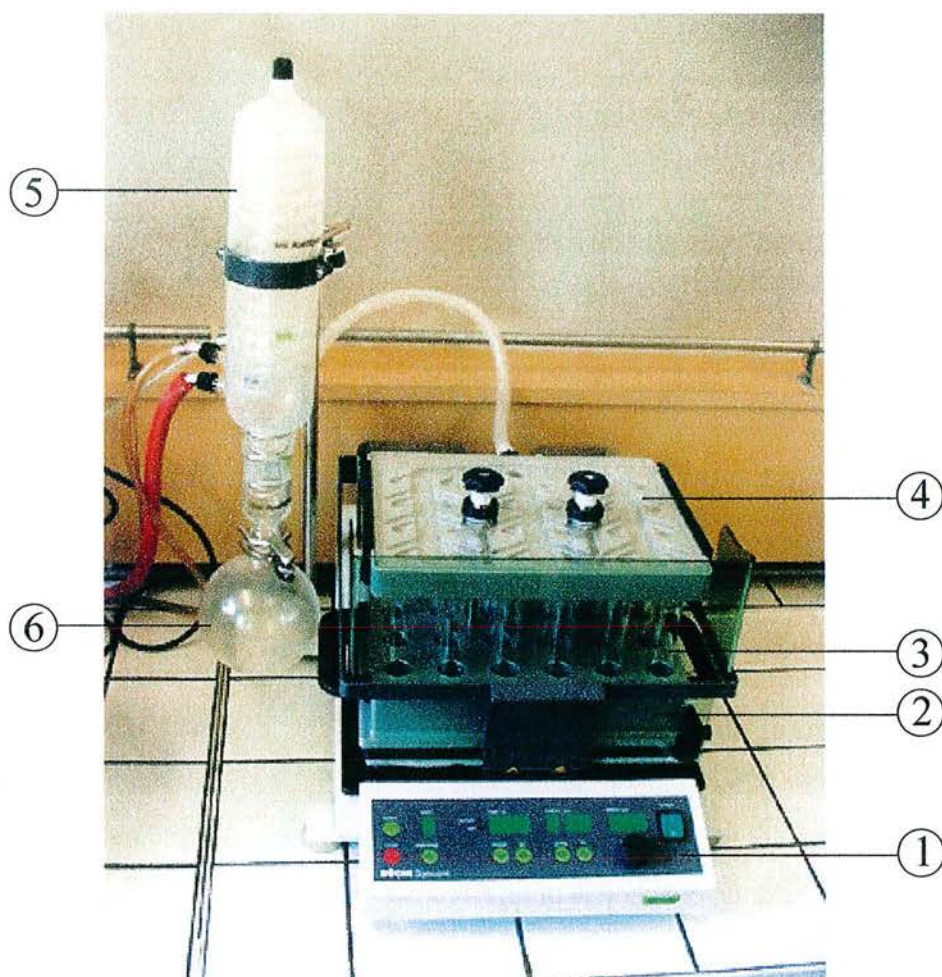


figure 49 : le Syncore polyvap.

1) unité de base, 2) rack chauffant avec mouvement de vortex horizontal, 3) tubes en verre de contenance 30ml, 4) prise de vide, 5) condenseur, 6) récipient de récupération des solvants.

Préalablement à toute synthèse, l'homogénéité de la température dans les 24 puits du réacteur a été vérifiée. Pour cela 10 ml d'eau ont été introduits dans les 24 tubes. Leur température a été mesurée à l'aide d'un thermomètre après 1 h d'agitation à la température de consigne, la température du couvercle chauffant étant fixée au maximum, à savoir 70°C.

D'après la figure 50, la température est homogène pour les basses températures (50°C). Cependant, lorsque la température augmente, on observe à 80°C jusqu'à 2,5°C d'écart entre les tubes du milieu du rack et ceux situés au bord.

De plus, la température affichée diffère de la température réelle dans les tubes. Cet écart est d'autant plus important que la température de consigne est élevée. Ainsi pour une température de consigne de 80°C, la température réelle avoisine 72°C seulement.

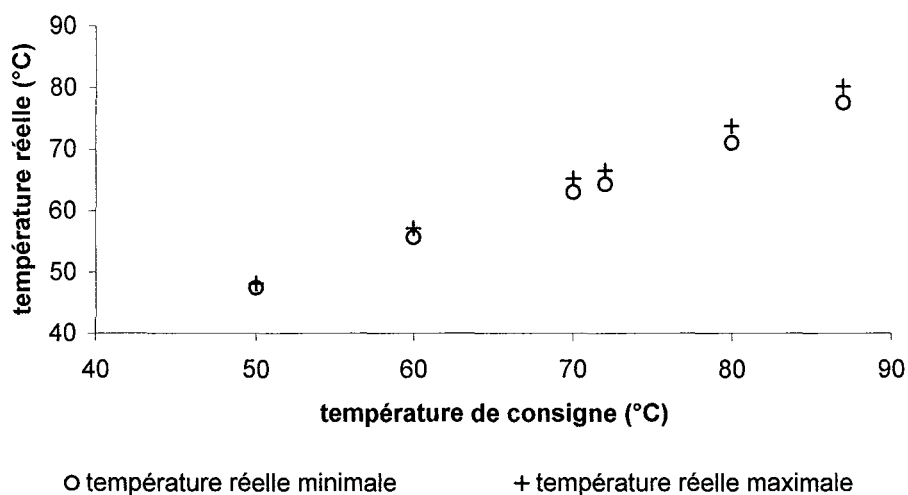


figure 50 : mesure de la température dans les différents tubes du Syncore Polyvap.

La température du couvercle chauffant ne peut dépasser 70°C. Le fabricant recommande de régler la température de la prise de vide 5 à 10°C au dessus de la plus haute température de vapeur de solvant. Une température de 65°C, correspondant à une température de consigne de 72°C, a donc été choisie pour effectuer les réactions.

Il doit être ici mentionné que ce dispositif n'est pas idéal pour les synthèses envisagées : principalement parce qu'il impose une température maximale de réaction de 65°C, qui comme il sera montré dans la partie résultats, n'est pas optimale. D'autre part, parce que l'agitation orbitale semble être moins efficace que celle obtenue par rotation dans les ballons branchés à un évaporateur rotatif.

II. Protocoles des synthèses enzymatiques

Une incubation de 16 h à la température réactionnelle est parfois nécessaire pour solubiliser au mieux le flavonoïde. Cependant, suivant la nature du flavonoïde et la quantité introduite dans le milieu réactionnel, ce substrat n'est parfois pas entièrement soluble. La synthèse est néanmoins tentée.

Pour tous les milieux de synthèse, le volume réactionnel initial est fixé à 5 ml. Cependant, lorsque le 2-méthylbutan-2-ol (M_2B_2) est utilisé comme solvant pour les synthèses sous pression réduite, il est sujet à une forte évaporation. Il est donc nécessaire d'ajouter régulièrement du solvant afin de maintenir un volume réactionnel compris entre 2 et 8 ml.

II.1. Synthèses en milieu solvant

L'utilisation d'un étalon interne est indispensable, du fait des importantes variations de volume du milieu réactionnel induites lors des synthèses sous pression réduite.

De manière générale, les solvants sont stockés sur tamis moléculaire 4 Å, au moins 4 jours avant utilisation.

Dans le souci de pouvoir comparer aisément les synthèses où le flavonoïde est entièrement solubilisé et les synthèses pour lesquelles une partie du flavonoïde reste sous forme de suspension, les quantités de substrats sont exprimées en quantités totales introduites dans 5 ml de milieu réactionnel et non en concentrations.

Composition d'un milieu réactionnel au cours des premiers essais (isoquercitrine) :

- 100 μmol de flavonoïde : isoquercitrine
- 160 μmol d'étalon interne : 2,6-diméthoxyphénol
- 20 équivalents molaires (2140 μmol) de donneur d'acyle par rapport au flavonoïde
- 5 ml de solvant

Les synthèses sont conduites à 80°C : soit dans les réacteurs Wheaton sous pression atmosphérique et sous une agitation de 200 rpm, soit dans un ballon fixé à un évaporateur rotatif sous pression réduite (200 mbar) et sous une agitation de 150 rpm.

Après 16 h de solubilisation de l'isoquercitrine, la réaction est initiée par l'ajout de 500 mg de Novozym 435®, préalablement séché pendant 16 h sur P₂O₅. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) pour permettre le suivi cinétique.

Composition typique d'un milieu réactionnel au cours de l'étude plus approfondie des synthèses en milieu solvant :

- 50 µmol de flavonoïde
- 80 µmol d'étalon interne : biphényl-4,4'-diol
- 5 équivalents molaires (250 µmol) de donneur d'acyle par rapport au flavonoïde
- 5 ml de M₂B₂

Les synthèses sont conduites dans les tubes du réacteur Syncore Polyvap à 65°C (température de consigne : 72°C), sous pression réduite, (180 mbar) et sous une agitation de 260 rpm.

Après 16 h de solubilisation à 65°C, la réaction est initiée par l'ajout de 100 mg de Novozym 435®. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et analysés par CLHP pour permettre le suivi cinétique.

II.2. Synthèses avec le donneur d'acyle comme solvant

Composition d'un milieu réactionnel au cours des premiers essais (isoquercitrine) :

- 100 µmol de flavonoïde : isoquercitrine
- 5 ml de donneur d'acyle (environ 275 équivalents molaires)

Les synthèses sont conduites, l'une après l'autre, à 80°C sous pression atmosphérique, sous une agitation de 200 rpm dans les réacteurs Wheaton ou sous pression réduite (200 mbar) et sous une agitation de 150 rpm dans le ballon d'évaporation d'un évaporateur rotatif.

Après 16 h de solubilisation à 80°C, la réaction est initiée par l'ajout de 500 mg de Novozym 435®. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et analysés par CLHP pour permettre le suivi cinétique.

Composition typique d'un milieu réactionnel au cours de l'étude plus approfondie des synthèses en « milieu donneur d'acyle » :

- 50 µmol de flavonoïde
- 5 ml de donneur d'acyle (600 à 800 équivalents molaires)

Quatre synthèses sont conduites en parallèle à 80°C, sous pression réduite (200 mbar) et sous une agitation de 40 rpm dans 4 ballons d'évaporation fixés sur un évaporateur rotatif grâce au dispositif « 4 pis ».

Après 16 h de solubilisation à 80°C, la réaction est initiée par l'ajout de 100 mg de Novozym 435®. Des prélèvements sont effectués au cours du temps et analysés par CLHP pour permettre le suivi cinétique.

II.3. Synthèses où l'accepteur d'acyle joue le rôle du solvant : recherche des donneurs d'acyles acceptés par la lipase B de *Candida antarctica*.

Composition d'un milieu réactionnel au cours de la recherche de donneurs d'acyle :

- 1 mmol de donneur d'acyle
- 5 ml de butan-1-ol (54 mmol)

Les synthèses sont conduites dans les tubes du réacteur Syncore Polyvap à 65°C (température de consigne : 72°C), sous pression réduite (500 mbar) et sous une agitation de 260 rpm.

Après 16 h de solubilisation à 65°C, la réaction est initiée par l'ajout de 150 mg de Novozym 435®. Des prélèvements sont réalisés après 24 et 48 h de réaction.

II.4. Exploitation des résultats

De fortes variations de volume peuvent intervenir au cours des synthèses en milieu solvant. Les dosages des composés effectués par CLHP sont alors corrigés grâce à l'étalon interne. Le calcul est donné par l'équation suivante :

$$\text{équation 1 : } Q_{Ct} = [C]_{MR} \times V_{MR}$$

Où Q_{Ct} : quantité de réactant au temps t

$[C]_{MR}$: concentration du composé au temps t dans le milieu réactionnel

V_{MR} : volume du milieu réactionnel au temps t

Avec

$$\text{équation 2 : } V_{MR} = \frac{[E]_0}{[E]_t} \times V_0$$

Où $[E]_0$: concentration initiale de l'étalon interne

$[E]_t$: concentration de l'étalon interne au temps t

V_0 : volume initial du milieu réactionnel (5 ml)

Sur les graphiques présentés au cours du chapitre résultats, les réactants seront donc exprimés en quantité (μmol).

Les vitesses initiales de transformation sont exprimées en quantité de produit formé par unité de temps ($\mu\text{mol.h}^{-1}$) et parfois par quantité de Novozym 435® ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$). Elles sont calculées par régression linéaire à partir des dosages des réactants en début de réaction : en général, pendant la première heure de réaction pour les milieux « donneur d'acyle » et pendant les 10 premières heures en milieu solvant.

Les rendements sont exprimés en pourcentage de conversion du substrat limitant, à savoir le flavonoïde dans la plupart des synthèses ou le donneur d'acyle pour les synthèses en milieu où le butan-1-ol est le solvant.

III. Protocoles de purification des produits de synthèse

En vue de mettre au point une méthode de purification sur colonne basse pression, un fractionnement préalable a été réalisé par chromatographie sur couche mince pour déterminer les solvants et les supports adéquats permettant la séparation des substrats (flavonoïdes et donneurs d'acyle) de l'ester de flavonoïde produit. Le mélange de solvants et le support sélectionnés ont ensuite été utilisés pour une purification sur colonne.

Par la suite, au vu des excellents rendements obtenus pour la synthèse d'esters de phloridzine, l'extraction liquide-liquide, méthode plus simple et plus rapide, a été mise en œuvre.

III.1. Séparation par chromatographie sur couche mince

Les milieux de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine et du cinnamate de phloridzine sont utilisés pour la mise au point de la méthode de séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).

La procédure est la suivante : environ 10 µl d'échantillon sont déposés sur une couche mince de silice ou de cellulose. Après 30 min à 3 h d'élution avec le mélange de solvants approprié, suivant la taille de la plaque, la chromatographie est séchée à l'air libre pendant 16 h avant d'être révélée.

La révélation des composés est obtenue par pulvérisation du réactif PAN : para-nitroaniline diazotée, spécifique des phénols. La première solution pulvérisée est composée de 8 ml d'acétate de sodium à 20% dans l'eau (p/v), 2 ml de 4-nitroaniline à 0.5% dans HCl 2N et de quelques gouttes de nitrite de sodium à 15% dans l'eau (p/v). La pulvérisation d'une deuxième solution composée de carbonate de sodium à 15% dans l'eau (p/v) permet d'accentuer la coloration. La réaction entre les phénols et la 4-nitroaniline produit une coloration jaune-orangée à rouge. Les donneurs d'acyle aromatiques non phénoliques sont visualisés sous UV avant révélation.

Les systèmes chromatographiques utilisés par d'autres auteurs pour séparer les différents esters cinnamiques de flavonoïdes se sont révélés peu satisfaisants. En effet le solvant chloroforme/propan-2-ol (5/1 ;v/v) utilisé par Nakajima *et al.*, 1999b sur support de

silice pour l'analyse du cinnamate d'isoquercitrine donne lieu à d'importantes traînées de tous les composés. Il en va de même pour la méthode utilisée par Gao *et al.*, 2001 : séparation sur support de silice avec le solvant acétate d'éthyle/méthanol/eau (9/0,06/0,4 ; v/v/v).

Nous avons donc mis au point un nouveau système en nous basant sur les systèmes utilisés par Dass & Weaver, 1971 (BAW : butan-1-ol, acide acétique, eau) pour la séparation des flavonoïdes et par Coulon *et al.*, 1995 (CAMW : chloroforme, acide acétique, méthanol, eau) pour la séparation des sucroesters. Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont détaillés tableau 20.

tableau 20 : séparation des réactants des milieux de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine et du cinnamate de phloridzine par CCM selon deux systèmes chromatographiques.

systèmes chromatographiques	BAW	CAMW
support	cellulose (0,25mm- Merck)	silice (0,25mm- Merck)
solvant	BAW (10/6/5 ; v/v/v)	CAMW (80/15/8/2 ; v/v/v)
révélation	PAN	PAN
	rapports frontaux (Rf)	
composés		
isoquercitrine	0,55	0,6
cinnamate d'isoquercitrine	0,9	0,85
phloridzine	0,75	0,65
cinnamate de phloridzine	0,9	0,9
cinnamate d'éthyle	1	1

Ces deux systèmes permettent une séparation des constituants des mélanges réactionnels suffisante pour une analyse qualitative, mais pas pour une purification. En effet, la proximité de l'ester de flavonoïde du front de migration n'est pas favorable à une purification correcte. De plus, les taches du produit et du substrat flavonoïde se chevauchent légèrement à cause d'un phénomène important de traînée.

En travaillant les proportions des constituants des éluants, une séparation satisfaisante des composés a été obtenue sur support de silice. Comme le montrent la figure 51 et la figure 52, avec l'éluant chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 ; v/v/v), les esters d'isoquercitrine et de phloridzine sont correctement séparés des substrats flavonoïdes et une purification sur colonne peut être envisagée.

La figure 51 représente le chromatogramme sur couche mince d'échantillons issus de différents milieux de synthèse d'esters de phloridzine comparativement à quelques composés standards. Pour chaque réaction on observe une tache majoritaire correspondant au monoester de flavonoïde.

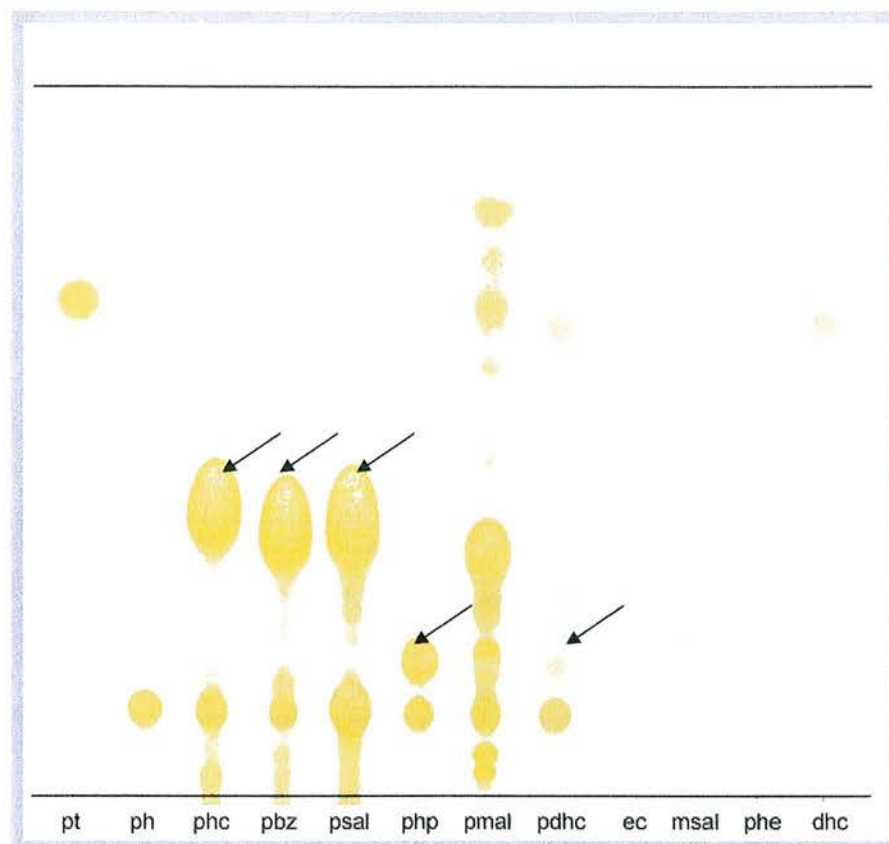


figure 51 : chromatographie sur couche mince de silice de différents milieux réactionnels mettant en jeu la phloridzine.
 Eluant chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 v/v/v), révélation PAN. Les flèches indiquent les taches correspondant au monoester de flavonoïde.

Standards : pt : phlorétine, ph : phloridzine, ec : cinnamate d'éthyle, msal : salicylate de méthyle, phe : 4-hydroxyphénylacétate de méthyle, dhc : acide dihydrocaféique.

Echantillons issus de milieux réactionnels « donneur d'acyle » : phc : phloridzine + cinnamate d'éthyle, pbz : phloridzine + benzoate de méthyle, psal : phloridzine + salicylate de méthyle, pmal : phloridzine + malonate de diéthyle.

Echantillons issus de milieux réactionnels en présence de M_2B_2 : php : phloridzine + p-hydroxyphénylacétate de méthyle, pdhc : phloridzine + acide dihydrocaféique.

La figure 52 représente les chromatogrammes sur couche mince d'échantillons issus de différents milieux de synthèse d'esters de flavonoïdes avant et après révélation. Comme on le constate sur cette figure, les flavonols (isoquercitrine et rutine) sont aussi bien visibles avant (taches jaunes sur fond blanc) qu'après révélation (taches oranges sur fond jaune). Ce n'est, cependant, pas le cas des autres flavonoïdes de cette étude tels que la phloridzine et la naringine ni des acides phénoliques qui n'absorbent pas dans le visible.

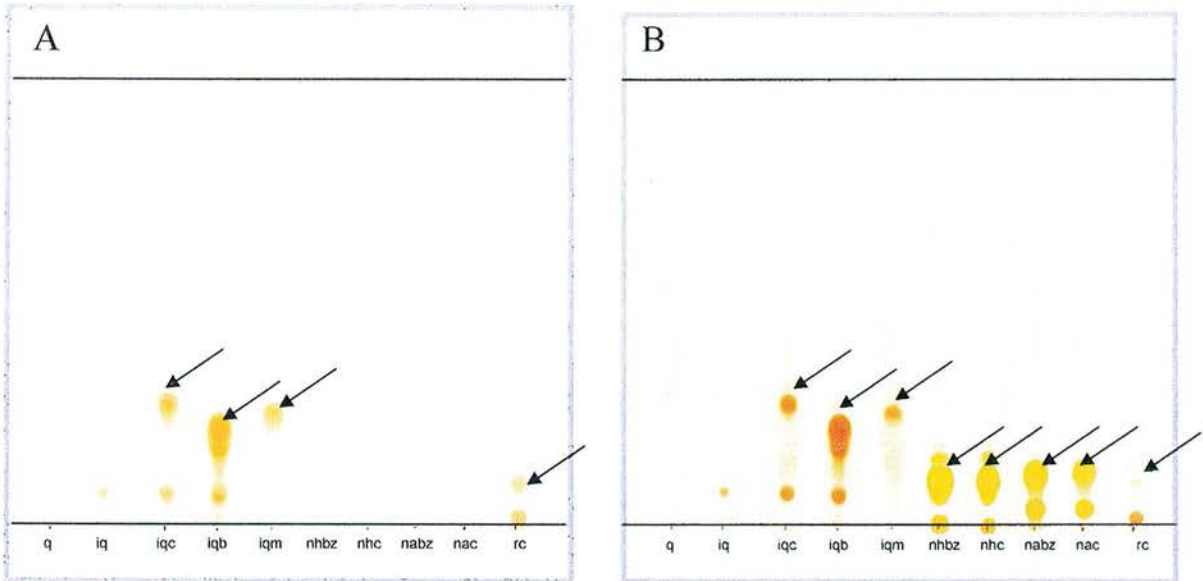


figure 52 : chromatographies sur couche mince de silice de différents milieux réactionnels avant révélation (A), après révélation (B).

Eluant chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 v/v/v), révélation PAN. Les flèches indiquent les taches correspondant au monoester de flavonoïde.

Standards : q : quercétine, iq : isoquercitrine.

Echantillons issus de milieux réactionnels « donneur d'acyle » : iqc : isoquercitrine + cinnamate d'éthyle, iqm : isoquercitrine + malonate de diéthyle, nhbz : néohespéridine dihydrochalcone + benzoate de méthyle, nhc : néohespéridine dihydrochalcone + cinnamate d'éthyle, nabz : naringine + benzoate de méthyle, nac : naringine + cinnamate d'éthyle, rc : rutine + cinnamate d'éthyle.

Echantillons issus de milieux réactionnels en présence de M_2B_2 : iqb : isoquercitrine + benzoate de méthyle.

Les rapports frontaux des différents produits sont présentés tableau 21.

tableau 21 : résultats des chromatographies sur couche mince de silice avec le mélange chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 v/v/v) comme éluant à 20°C.

Composés	Rf
cinnamate d'éthyle	1,00
benzoate de méthyle	1,00
4-hydroxyphénylacétate de méthyle	0,90
salicylate de méthyle	1,00
acide dihydrocaféique	0,60
phlorétine	0,65
phloridzine	0,12
benzoate de phloridzine	0,37
cinnamate de phloridzine	0,40
salicylate de phloridzine	0,40
4-hydroxyphénylacétate de phloridzine	0,20
dihydrocaféate de phloridzine	0,18
éthyle malonate de phloridzine	0,35
quercétine	0,38
isoquercitrine	0,05
benzoate d'isoquercitrine	0,20
cinnamate d'isoquercitrine	0,25
naringine	0,04
benzoate de naringine	0,10
cinnamate de naringine	0,11
néohespéridine dihydrochalcone	0,04
benzoate de néohespéridine dihydrochalcone	0,10
cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone	0,11
rutine	0,02
cinnamate de rutine	0,06
2,6-diméthoxyphénol	0,90
4,4-biphényldiol	0,90

Les résultats du tableau 21 montrent que ce système chromatographique est applicable pour l'analyse de nombreux esters de flavonoïdes glycosylés. Il devra cependant être adapté, notamment en augmentant la polarité de l'éluant, pour obtenir une séparation correcte des flavonoïdes diosides (rutine, naringine, néohespéridine dihydrochalcone).

III.2. Purification sur colonne de silice

L'éluant chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 ; v/v/v) est utilisé pour la chromatographie sur colonne de silice (Silica gel 60, Fluka) pour la purification du cinnamate d'isoquercitrine.

Le cinnamate d'isoquercitrine est synthétisé en milieu M_2B_2 . En fin de synthèse, le milieu réactionnel est filtré sur un creuset en verre fritté n°3 (Duran Schott) pour retirer le Novozym 435®. Le M_2B_2 est ensuite évaporé sous vide et le résidu obtenu est solubilisé dans 0,5 ml de méthanol, auquel on ajoute 2,5 ml de solvant d'éluant. Le mélange est alors

composé d'isoquercitrine, de cinnamate d'isoquercitrine, de cinnamate d'éthyle, d'acide cinnamique et de 2,6-diméthoxyphénol.

Ce mélange est déposé sur une colonne de silice (longueur 40 cm, diamètre 5 cm) puis élué avec le solvant chloroforme/acide acétique/méthanol (8/1/1 ; v/v/v). Des fractions de 20 ml sont recueillies puis analysées par CCM. Cette analyse montre que l'ester est élué par 500 à 750 ml de solvant. La pureté de ces fractions est ensuite vérifiée par CLHP et les fractions pures sont rassemblées. Une évaporation sous vide permet d'éliminer le chloroforme et le méthanol. Cette évaporation n'est pas conduite à sec pour éviter une trop grande concentration de l'acide acétique. De l'eau est ensuite ajoutée ainsi que de la résine polyacrylique non ionique Amberlite® XAD-7 20-60 mesh (Aldrich) sur laquelle l'ester s'adsorbe. La résine est rincée jusqu'à neutralisation. L'ester est ensuite désorbé par le méthanol.

Dans le but d'obtenir une poudre facilement manipulable, 1 volume d'eau est ajouté à 5 volumes de solution méthanolique d'ester de flavonoïde pour permettre une précipitation progressive du produit au cours de l'évaporation du méthanol. Le produit est récupéré sous forme d'une poudre jaune vif après congélation et lyophilisation.

III.3. Purification par extraction liquide-liquide

Cette méthode ne peut être utilisée que lorsque la conversion du flavonoïde est totale : c'est le cas de certaines réactions en milieu « donneur d'acyle ». A l'équilibre, ces milieux réactionnels sont composés de l'ester de flavonoïde, du donneur d'acyle en large excès et de quelques traces d'acide correspondant.

A l'issue des synthèses en milieu « donneur d'acyle », 10 volumes d'hexane sont ajoutés au milieu réactionnel entraînant la précipitation des flavonoïdes. Une filtration sur fritté n°3 Duran permet l'élimination de la phase hexane contenant la majeure partie du cinnamate d'éthyle. L'ester de flavonoïde est retenu sur le fritté avec la préparation enzymatique. Les flavonoïdes sont resolubilisés dans le méthanol et séparés de la préparation enzymatique par filtration (fritté n°3 Duran). L'analyse par CLHP de la solution méthanolique ne montre la présence avec l'ester que de traces de cinnamate d'éthyle et d'acide cinnamique.

Le méthanol est évaporé sous vide jusqu'à un petit volume (environ 5 ml) puis l'élimination des dérivés cinnamiques est effectuée par une extraction liquide/liquide, méthanol/hexane (1/10 ; v/v). La réussite de ce procédé repose sur le rapport volumique entre

ces deux solvants. Seul un large excès d'hexane permet de retenir les donneurs d'acyles dans la phase hexane. L'ester pur est récupéré dans la phase méthanol suivant le protocole décrit précédemment. Cette méthode a permis la purification du benzoate, du cinnamate, du salicylate de phloridzine ainsi que du cinnamate et du salicylate de néohespéridine dihydrochalcone.

IV. Méthodes analytiques

IV.1. Analyses des réactants par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le principe de la chromatographie en phase liquide repose sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles. L'une des phases, solide et poreuse, constitue la phase stationnaire, l'autre, liquide, constitue la phase mobile.

La phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes aliphatiques en C18. Elle est donc apolaire, alors que l'éluant (méthanol/eau) est polaire. Il s'agit donc d'une chromatographie dite de phase inverse.

IV.1.1. Appareillage, mode d'élution

L'installation chromatographique est composée d'un injecteur automatique modèle Basic+ Marathon (Spark Holland), d'une pompe Merck/Hitachi modèle L-6200 et d'un détecteur UV-visible L-3000. Les composés sont séparés sur une colonne Merck 50169, Purospher 100 RP 18 (250 x 4 mm, 5 µm). La colonne est dite end-capped, c'est-à-dire que le support de silice a subi un traitement permettant de recouvrir les groupements silanols qui ne seraient pas greffés, renforçant ainsi la nature hydrophobe du support. La détection des composés est effectuée à 280 et 325 nm. Le logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes utilisé est Winilab II (Perichrom).

Certains composés des milieux réactionnels ont des polarités proches, d'autres non. Deux gradients d'élution ont donc été utilisés : gradients A et B. L'évolution de leurs compositions est montrée tableau 22 et tableau 23.

tableau 22 : gradient d'élution (A), utilisé pour la séparation des composés de la plupart des milieux réactionnels.

Temps (mn)	Méthanol/eau/TFA (50/50/0,01 ; v/v/v)	Méthanol/TFA (100/0,01 ; v/v)
0	80	20
5	50	50
20	30	70
30	30	70
32	80	20
35	80	20

TFA : acide trifluoroacétique

tableau 23 : gradient d'élution (B), utilisé pour la séparation des composés « plus hydrophiles ».

Temps (mn)	Méthanol/eau/TFA (50/50/0,01 ; v/v/v)	Méthanol/TFA (100/0,01 ; v/v)
0	100	0
5	90	10
15	50	50
20	20	80
26	20	80
28	100	0
32	100	0

TFA : acide trifluoroacétique

Le gradient A permet la séparation des composés de presque tous les milieux réactionnels. Sauf indication contraire c'est ce gradient qui est utilisé.

Pour les composés plus polaires (la phloridzine en présence d'acide 4-hydroxyphénylacétique, d'acide 4-hydroxyphénylpropionique, d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, d'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique et le biphenyl-4,4'-diol), on obtient de meilleures séparations avec le gradient d'élution B.

Le débit d'élution est fixé à $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, et l'intervalle entre deux injections est de 37 min.

Une autre installation CLHP de marque Shimadzu est utilisée pour l'obtention en ligne des spectres UV-visible des substrats mis en jeu et des produits formés. Elle est composée d'un injecteur automatique SIL-10 ADVP, d'une pompe LC-10 ATVP, d'un détecteur UV-visible à barette de diode SPD-10 AVP et d'un contrôleur SCL-10 AVP. Le logiciel d'acquisition est CLASS-VP version 6.1. La colonne et les gradients utilisés sont ceux décrits ci-dessus. Les volumes d'injection sont de $50 \mu\text{l}$ avec cette installation.

IV.1.2. Protocole d'étalonnage

Les produits et les substrats ont été quantifiés à 280 nm, à l'aide de gammes d'étalonnage obtenues dans les mêmes conditions que les essais.

L'étalonnage des substrats est réalisé à l'aide des produits commerciaux ; l'étalonnage des produits est réalisé après purification.

Exemple de l'étalonnage de la rutine (figure 53) : trois solutions mères de rutine, à environ $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ dans le méthanol/TFA (100/0,1 ; v/v) sont préparées, elles subissent ensuite plusieurs dilutions, ici 10, 30, et 50 dans un mélange méthanol/eau/TFA (50/50/0,01 ; v/v/v).

D'après la loi de Beer Lambert, la proportionnalité entre l'aire du signal et la concentration du composé est représentée par la pente de la régression linéaire sur la représentation graphique $Aire = f(\text{concentration})_{280\text{nm}}$. Concernant la rutine, la relation est la suivante :

$$\text{équation 3 : } Aire = \varepsilon \times [rutine]$$

$$\text{équation 4 : } Aire = 5,10 \cdot 10^7 \times [rutine]$$

Avec Aire en UA (unité arbitraire)

ε en UA.l.mmol⁻¹

[rutine] en mmol.l⁻¹

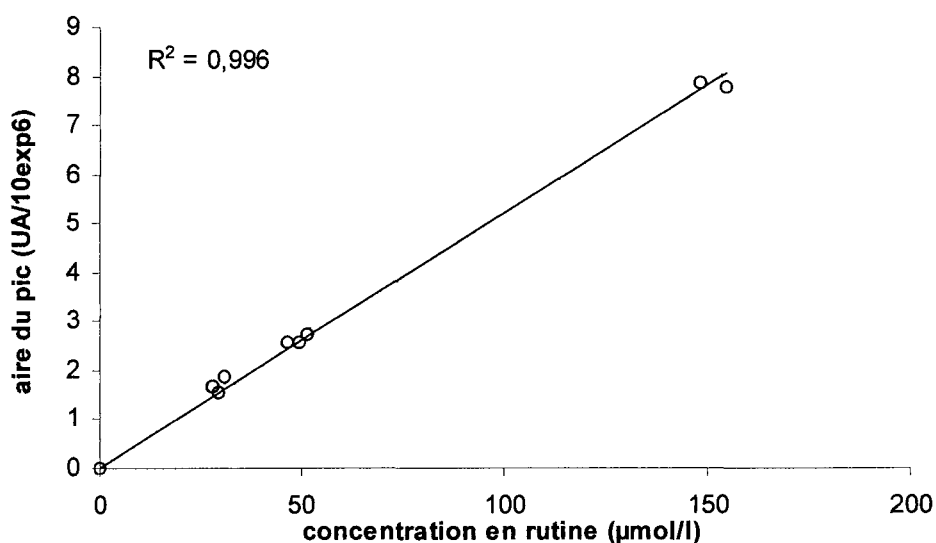


figure 53 : courbe d'étalonnage de la rutine par CLHP, à 280 nm.

Les coefficients de proportionnalité reliant la concentration en produit à l'aire du pic pour les produits analysés sont rassemblés tableau 24. Toutes les régressions linéaires ont un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,990.

On notera que le coefficient d'étalonnage est sensiblement le même avec les gradients A et B. Ceci est vérifié par exemple avec la phloridzine, le 4-4'-biphényldiol et l'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique. L'étalonnage n'a donc pas été réalisé avec les deux gradients pour tous les composés mis en jeu.

De plus, les coefficients d'étalonnage des formes acides, méthylées ou éthylées de l'acide cinnamique, par exemple, sont sensiblement les mêmes. Ainsi, nous émettrons l'hypothèse que les formes butylées ont un coefficient très proche.

tableau 24 : Récapitulatif des étalonnages effectués au cours de l'étude

Composés	gradient A		gradient B	
	tr (s)	ϵ_{280} (UA.l.mmol ⁻¹)	tr (s)	ϵ_{280} (UA.l.mmol ⁻¹)
flavonoïdes				
hespéridine	265	6,55 ^E +07		
isoquercitrine	315	3,59 ^E +07	550	
lutéoline-7-glucoside	260	4,90 ^E +07	470	
naringine	265	7,37 ^E +07		
néohespéridine dihydrochalcone	450	7,63 ^E +07	710	
phloridzine	380	7,74 ^E +07	580	7,75E+07
rutine	320	5,10 ^E +07		
donneurs d'acyle				
2-hydroxybenzoate de méthyle	907	5,76 ^E +06		
4-hydroxyphénylacétate de méthyle	355		504	5,82E+06
4-hydroxyphénylpropionate de méthyle	370		721	6,58E+06
acide 2-hydroxybenzoïque	590	5,74 ^E +06	566	
acide 3,4-dihydroxyphénylacétique			271	1,16E+07
acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique	255	1,27 ^E +07	296	1,30E+07
acide 4-hydroxyphénylacétique	295		311	5,57E+06
acide 4-hydroxyphénylpropionique	300		378	6,68E+06
acide benzoïque	486	4,13 ^E +06		
acide caféique	270	3,92 ^E +07		
acide chlorogénique			253	3,70E+07
acide cinnamique	650	1,47 ^E +08		
benzoate de méthyle	817	4,26 ^E +06		
cinnamate de méthyle	980	1,44 ^E +08		
cinnamate d'éthyle	1120	1,43 ^E +08		
flavonoïdes non glycosylés				
phlorétine	622	7,93 ^E +07		
quercétine	596	2,81 ^E +07		
esters de flavonoïdes				
benzoate de phloridzine	795	7,39 ^E +07		
cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone	980	1,40 ^E +08		
cinnamate de phloridzine	980	1,64 ^E +08		
cinnamate d'isoquercitrine	710	7,00 ^E +07		
salicylate de phloridzine	860	1,01E+08		
étalons internes				
2,6-diméthoxyphénol	360	3,20 ^E +06		
biphényl-4'4'-diol	390	7,52 ^E +07	610	7,58E+07

Certains produits n'ont pu être purifiés au cours de cette étude. La cinétique de la réaction est donc représentée par la disparition du substrat.

Le coefficient d'étalonnage du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine (hpap) a été estimé. Cette estimation est basée sur le principe qu'une mole de substrat flavonoïde

consommée est transformée en une mole d'ester de flavonoïde. Le coefficient d'étalonnage utilisé est la moyenne des estimations réalisées sur tous les échantillons de milieux réactionnels issus des différentes réactions. On note que la même estimation réalisée sur le cinnamate de phloridzine fournit une valeur très proche de la valeur obtenue par l'étalonnage à partir du composé purifié.

équation 5 : $\varepsilon_{280}(hpap) = 7,95 E+ 07 \text{ UA.l.mmol}^{-1}$

IV.1.3. Préparation des échantillons

La détection des composés aromatiques sur la base de leur absorption UV à 280 nm est très sensible. L'injecteur automatique de l'installation CLHP injecte une grande quantité d'échantillon : 100 μ l. Les prélèvements de milieux réactionnels ont donc dû être dilués : systématiquement dix fois dans le méthanol avec 0,1% de TFA (ou méthanol/DMSO/TFA : 90/10/0,01 ; v/v/v pour l'analyse des milieux réactionnels contenant de l'hésperidine ou de la diosmine), puis une deuxième dilution appropriée dans le méthanol/eau/TFA (50/50/0,01 ; v/v/v) a lieu avant analyse en CLHP.

En ce qui concerne les prélèvements de synthèse en milieux solvant, la dilution a lieu directement, alors que les échantillons issus des milieux « donneur d'acyle » doivent subir un traitement supplémentaire.

En effet, la présence de donneur d'acyle en grande quantité dans l'échantillon ne permet pas l'analyse CLHP : soit l'échantillon doit être très dilué et le flavonoïde et son ester sont à peine détectables, soit l'échantillon est trop concentré et le donneur d'acyle précipite dans l'éluant CLHP. Pour éviter cela, la méthode de purification des esters cinnamiques de flavonoïdes de Nakajima *et al.*, 1999b a été adaptée (chapitre 2, § III.3). Dix volumes d'hexane sont ajoutés aux prélèvements. Après 5 min de centrifugation à 15000 rpm (Centrifugeuse Sigma 112), le surnageant est éliminé. L'opération est répétée une fois. Le culot, une fois sec, est dilué suivant le même protocole que les échantillons issus de milieu solvant.

L'insolubilité totale dans l'hexane des flavonoïdes utilisés au cours de cette étude et des esters purifiés a été vérifiée de deux manières dans des proportions identiques à celles des milieux réactionnels : soit par introduction des flavonoïdes purs dans l'hexane, soit par introduction d'une solution méthanolique de flavonoïdes dans l'hexane. Après agitation et 4

heures de décantation, un prélèvement est réalisé sur la phase hexane et son analyse CLHP ne montre aucune trace de flavonoïde.

IV.2. Mesures de la solubilité des flavonoïdes

La solubilité de quelques flavonoïdes a été déterminée dans le cinnamate d'éthyle et dans le M₂B₂ à 65 et 80°C.

Le flavonoïde, en quantité saturante est incubé pendant 16 h à la température choisie dans le solvant choisi. Le milieu est alors filtré au moyen d'une membrane Fluoropore™ 0,2 µm (Millipore). L'ensemble membrane-porte filtre (Swinney stainless 13 mm, Millipore) est prééquilibré pendant 30 à 45 min dans le solvant à la température de consigne. Trois filtrations sont effectuées sur chaque milieu de solubilisation et deux déterminations de la concentration de flavonoïde sont effectuées sur chaque filtrat par analyse CLHP.

Cette manipulation s'est montrée délicate et la variabilité des dosages est importante. De plus, pour certains flavonoïdes particulièrement solubles tels que la phloridzine et la néohespéridine dihydrochalcone, la filtration à haute concentration s'est montrée impossible. En effet, une concentration saturante de ces flavonoïdes dans le cinnamate d'éthyle provoque une gélification du milieu. La solubilisation de ces flavonoïdes est donc déterminée de manière visuelle.

IV.3. Dosages de l'eau dans les milieux réactionnels

Les mesures de teneur et d'activité de l'eau sont effectuées rapidement après prélèvement (moins de trois heures après).

IV.3.1. Détermination de la teneur en eau

La mesure de la quantité d'eau dans les milieux est effectuée par la méthode dite de Karl Fisher. Cette technique met en jeu plusieurs réactions qui s'expriment par l'équation globale suivante :



Lors de cette réaction chimique, l'iode générée directement dans l'électrolyte par voie électrochimique réagit quantitativement avec l'eau.

Le titrage au point final s'effectue par voltamétrie : l'application d'un courant alternatif d'intensité constante à une électrode double en platine génère entre les deux fils de platine une tension. En présence d'une quantité infime d'iode libre, cette tension accuse une diminution notable, phénomène que l'on peut exploiter pour l'indication du point final du titrage.

L'appareillage utilisé (figure 54) est un coulomètre KF 737 II (Metrohm) et le réactif est l'Hydranal-coulomat AG-H (Riedel-de Haën).

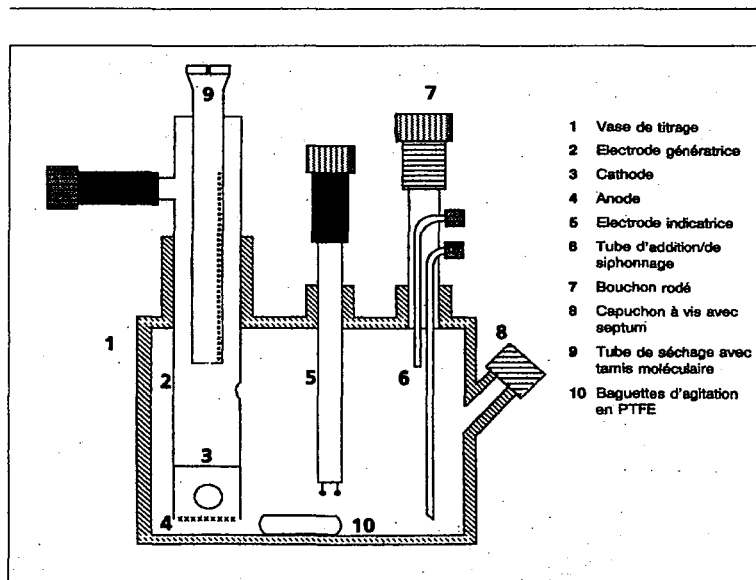


figure 54 : schéma du coulomètre KF 737 II (Metrohm).

Quelques milligrammes d'échantillon sont injectés, grâce à une seringue, dans l'appareil qui définit en quelques minutes la quantité d'eau présente (exprimée en ppm ou en pourcentage). En général, la quantité injectée varie entre 50 et 100 mg, mais pour les échantillons ayant une très faible teneur en eau, jusqu'à 500 mg ont été injectés. La limite de détection de cet appareil est de 10 µg d'eau.

Cette mesure ne peut cependant être réalisée en présence d'aldéhydes ou de cétones, en raison de la formation d'acétals ou de cétals qui libèrent de l'eau dans le milieu de dosage.

IV.3.2. Mesure de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau a_w est définie par l'équation suivante :

$$a_w = \gamma_w \times x_w$$

où γ_w est le coefficient d'activité de l'eau et x_w est la fraction molaire de l'eau dans le milieu. Elle représente la disponibilité de l'eau pour réagir dans le système.

L'activité de l'eau est mesurée par introduction de 500 μ l de milieu réactionnel dans la chambre de mesure d'un thermoconstanter TH200 de Novasina (Suisse).

Cet appareil, présenté figure 55, permet de déterminer à une température donnée l'activité de l'eau de l'échantillon introduit dans la chambre munie d'une cellule de mesure d'humidité électrolytique de précision. L'appareil est préalablement calibré entre 15 et 30°C (25°C au cours de cette étude) à l'aide des solutions salines saturées standards. L'introduction de solvants alcooliques, tels que le M₂B₂ et le 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one (HMP) dans la chambre de mesure nécessite l'utilisation d'un filtre à alcool (eVALC1) placé entre le filtre et le capteur.

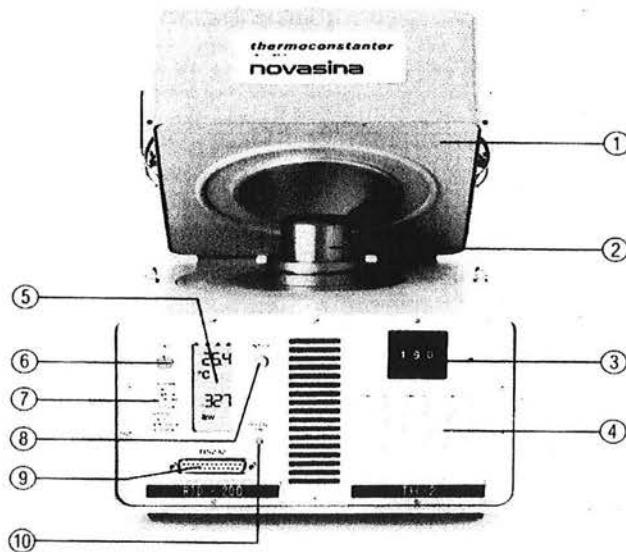


figure 55 : Schéma du Thermoconstanter TH200 (Novasina).

1) couvercle, 2) tête et sonde de mesure, 3) sélecteur de température, 4) tableau de température, 5) affichage de température et d'humidité, 6) sélecteur d'opération, 7) tableau des modes opératoires, 8) Bouton poussoir de validation, 9) connecteur interface, 10) Commutateur interface.

La mesure est effectuée dans la gamme d'activité de l'eau de 0,06 à 1 avec une précision de 0,002.

IV.4. Méthodes utilisées pour la caractérisation des esters

IV.4.1. Spectrométrie ultraviolet-visible

Les spectres UV-visibles ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre UV-visible (spectrometer Shimadzu). Des solutions d'esters (10 μM) ont été préparées dans le méthanol (0,1% TFA) en général ou dans le méthanol/DMSO (90/10 ; v/v) pour le cinnamate d'isoquercitrine.

IV.4.2. Spectrométrie infrarouge

Le domaine infrarouge s'étend de 5000 à 200 cm^{-1} . Trois grandes régions peuvent être distinguées : l'absorption d'un rayonnement de 4000 à 2000 cm^{-1} provoque une vibration d'élongation de la liaison, les vibrations de déformation sont provoquées par des rayonnements de 2000 à 1500 cm^{-1} et les signaux observés entre 1500 et 600 cm^{-1} correspondent à la zone d'empreinte.

Au cours de cette étude, la spectrométrie infrarouge est utilisée pour identifier les fonctions chimiques des composés et pour vérifier leur pureté.

Les spectres sont réalisés entre 4000 et 400 cm^{-1} à l'aide d'un spectromètre infrarouge (IR-470 Shimadzu). La résolution est de 2,7 cm^{-1} . Après une semaine de séchage sur P_2O_5 , les échantillons sont finement broyés dans une matrice de KBr (SpectronormTM, Prolabo). La proportion d'échantillon est de 0,5% par rapport au KBr. Le mélange est pressé à 1000 N pour former une pastille transparente. Les spectres obtenus sont exprimés en unités de transmittance.

IV.4.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est la seule technique spectroscopique permettant de déterminer l'hydroxyle glycosidique impliqué dans la liaison ester sur le flavonoïde.

La structure chimique des esters de flavonoïde est déterminée par ^1H -RMN (300MHz) et ^{13}C -RMN (75 MHz) dans le diméthylsulfoxyde- d_6 (environ 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ester) en utilisant le tétraméthylsilane comme référence à l'aide d'un spectromètre Avance Bruker 300 MHz.

L'attribution des signaux obtenus aux protons et aux carbones des différentes fonctions des molécules synthétisées figure en annexe.

Chapitre 3 :

étude expérimentale

I. Recherche de donneurs d'acyle acceptés par la lipase B	
de <i>Candida antarctica</i>	113
I.1. Estérification d'acides aromatiques non substitués :	
<i>acide benzoïque et acide cinnamique</i>	115
I.2. Estérification des acides aromatiques monosubstitués sur le cycle	117
I.2.1. Substitution par un hydroxyle	118
I.2.2. Substitution par un groupement azoté	122
I.3. Estérification des acides aromatiques plurisubstitués sur le cycle	123
I.4. Conclusion	126
II. Etude de la faisabilité de la synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes	128
II.1. Essais préliminaires de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine	129
II.2. Influence de la nature du donneur d'acyle	131
II.3. Effet de la pression	133
II.4. Effet du solvant	135
II.4.1. Synthèse en milieu 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one : HMP	135
II.4.2. Synthèse avec le donneur d'acyle comme solvant	136
II.5. Conclusion	139
III. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu solvant	141
III.1. Influence des conditions opératoires	141
III.1.1. Etude de la synthèse du 4-hydroxyphénylacétate et du cinnamate de phloridzine à 65°C, 180 mbar dans le M2B2	142
III.1.2. Influence de la quantité d'enzyme	145
III.1.3. Influence du ratio donneur / accepteur d'acyle	147
III.1.4. Etude de la stabilité du Novozym 435® dans le M2B2 à 65°C	149
III.2. Influence du donneur d'acyle	151
III.3. Influence de la structure du flavonoïde	154
III.3.1. Synthèse d'esters de flavonoïdes glucosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire	156
III.3.2. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire	157
III.3.3. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés, dépourvus d'hydroxyle primaire	158
III.3.4. Conclusion	159

IV. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle »	161
<i>IV.1. Influence des conditions opératoires</i>	<i>161</i>
IV.1.1. Etude de la synthèse du cinnamate de phloridzine	161
IV.1.2. Effet de la température	163
IV.1.3. Effet de la quantité d'enzyme	166
IV.1.4. Etude de la stabilité du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle à 80°C	167
IV.1.5. Optimisation de la production du cinnamate de phloridzine	171
<i>IV.2. Influence du donneur d'acyle</i>	<i>177</i>
IV.2.1. Sélection des donneurs d'acyles	177
IV.2.2. Effet de la nature du groupement partant (éthanol ou méthanol) sur la synthèse du cinnamate de phloridzine	178
IV.2.3. Influence de la structure du donneur d'acyle	179
<i>IV.3. Influence de la structure du flavonoïde</i>	<i>181</i>
IV.3.1. Synthèse d'esters de flavonoïdes monoglucosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire	181
IV.3.2. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés porteurs d'un hydroxyle primaire	183
IV.3.3. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés dépourvus d'hydroxyle primaire	185
IV.3.4. Conclusion	188

I. Recherche de donneurs d'acyle acceptés par la lipase B de *Candida antarctica*

Il ressort de la partie bibliographique que la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est capable de catalyser une grande variété de réactions en acceptant de nombreux donneurs d'acyle différents.

En ce qui concerne les esters de flavonoïdes, les donneurs d'acyles étudiés étaient :

- soit des acides aliphatiques : acide acétique (Danieli *et al.*, 1997), acide gras à chaîne moyenne (Kontogianni *et al.*, 2001; Kontogianni *et al.*, 2003), acides gras à longue chaîne (Gayot *et al.*, 2003)
- soit des acides arylaliphatiques (Geers *et al.*, 2001)
- soit des acides cinnamiques (Nakajima *et al.*, 1997, Nakajima *et al.*, 1999b, Gao *et al.*, 2001)

Parmi ces donneurs d'acyles, les acides aromatiques et plus particulièrement les acides phénoliques, pourraient modifier la solubilité des flavonoïdes, augmenter leur absorption des rayonnements UV et également améliorer les propriétés propres de ces polyphénols, en particulier leurs propriétés antioxydantes.

Dans un premier temps, nous avons donc testé l'acceptabilité de différents donneurs d'acyles aromatiques par la lipase B de *Candida antarctica*. Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser le butan-1-ol à la fois comme accepteur d'acyle et comme solvant. En effet, il est préférable d'utiliser un composé à courte chaîne porteur d'une fonction alcool primaire qui est ainsi proche de l'accepteur d'acyle naturel de l'enzyme : le glycérol. De plus, cet alcool permet de solubiliser tous les donneurs d'acyles étudiés. Il est avantageux de l'utiliser comme solvant ce qui lui permet d'être en large excès pour favoriser la réaction de synthèse. On note que le butan-1-ol a déjà été employé pour des études similaires (Guyot *et al.*, 1997, Buisman *et al.*, 1998).

Les réactions ont été menées dans le Syncore Polyvap parce qu'il permet d'effectuer jusqu'à 24 réactions simultanément.

Pour chaque réaction, 1 mmol (0,2 M) de donneur d'acyle est introduite dans 5 ml de butan-1-ol préalablement séché sur tamis moléculaire 4Å. La réaction est initiée par l'addition de 100 mg de Novozym 435® préalablement déshydraté sur P₂O₅. Après 100 h de réaction à 65°C, le milieu réactionnel est analysé par CLHP (détecteur à barrette de diodes) avec le gradient A.

Etant donné le grand nombre d'esters butyliques synthétisés, il n'a pas été envisagé de les purifier pour confirmer leurs structures et pour effectuer un étalonnage du dosage CLHP. Le rendement de la réaction est donc estimé par la disparition du substrat. Certains composés phénoliques, particulièrement les composés aromatiques plurisubstitués sont sensibles à l'oxydation. Pour éviter toute confusion entre les éventuels produits d'estérification et d'oxydation, nous nous sommes assurés que la disparition du substrat est corrélé à l'apparition d'un pic en CLHP plus hydrophobe que le substrat aromatique et que ce pic « produit » possède un spectre UV semblable à celui du substrat. On sait, en effet, que les acides et leurs dérivés méthylés ou éthylés ont quasiment le même spectre UV-visible et le même coefficient d'absorption molaire à 280 nm notamment pour les dérivés cinnamiques, salicyliques et 4-hydroxyphénylacétiques (chapitre 2, § IV.1.2).

Les résultats de ce criblage sont présentés en trois parties :

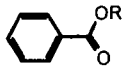
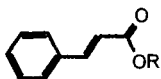
- estérification d'acides aromatiques non substitués
- estérification d'acides aromatiques monosubstitués (sur le cycle)
- estérification d'acides aromatiques plurisubstitués (sur le cycle)

Pour chacun de ces groupes de donneurs d'acyle, nous présenterons nos résultats d'estérification par le butan-1-ol puis nous les comparerons avec les données bibliographiques.

I.1. Estérification d'acides aromatiques non substitués : acide benzoïque et acide cinnamique

Les résultats obtenus pour l'estérification des deux acides aromatiques non substitués sont rassemblés dans le tableau 25 et comparés aux données bibliographiques du tableau 26.

tableau 25 : estérification par le butan-1-ol des acides aromatiques non substitués

Structures	Donneurs d'acyle	Produits et rendements après 48h
	série benzoïque	benzoate de butyle (1250s)
	acide benzoïque R=H (485s)	30%
	benzoate de méthyle R=CH ₃ (815s)	75%
	série cinnamique	cinnamate de butyle (1560 s)
	acide cinnamique R=H (680 s)	40%
	cinnamate d'éthyle R=C ₂ H ₅ (1120 s)	80%

Conditions expérimentales : Novozym 435® : 20 g.l⁻¹, donneur d'acyle : 0,2 M, butan-1-ol : 5 ml, réacteur syncore polyvap, 65°C, 500 mbar, agitation 260 rpm. Les temps de rétention des différents composés en analyse CLHP avec le gradient A sont présentés entre parenthèses.

Les rendements obtenus sont meilleurs en transestérification qu'en estérification directe à la fois pour le benzoate et pour le cinnamate. En effet, malgré les précautions prises pour le séchage du solvant (tamis moléculaire 4Å) et de la préparation enzymatique (P₂O₅), il apparaît que l'eau produite au cours de l'estérification directe est suffisante pour limiter la synthèse. De plus, les conditions réactionnelles (65°C, 500 mbar) permettent aisément l'évaporation du méthanol et de l'éthanol mais pas celle de l'eau comme le montrent les courbes de rosée (figure 56).

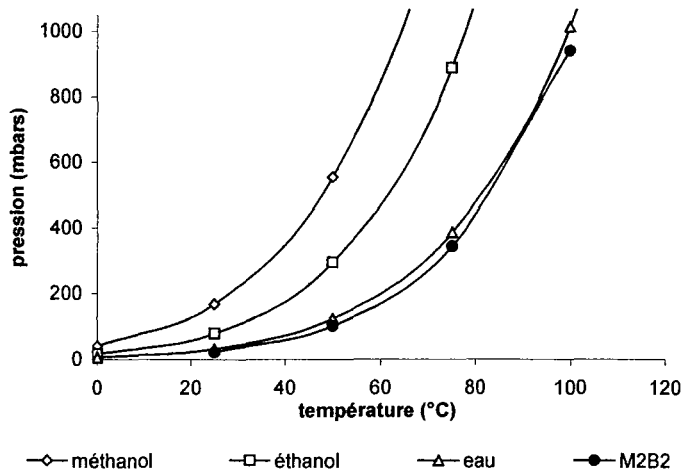


figure 56 : courbes de rosée du méthanol, de l'éthanol, du M₂B₂ et de l'eau (Lide, 2001-2002).

tableau 26 : synthèse bibliographique concernant l'estérification des acides aromatiques non substitués.

Groupement acyle	Réf	Accepteurs d'acyle (solvant)	Conditions réactionnelles	Rendements (temps réactionnels)	
série benzoïque					
acide benzoïque	(1)	méthanol (hexane/toluène)	37°C, léger excès de méthanol, lipase de <i>Candida rugosa</i> ⁽¹⁾	95% (72h)	
	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	0% (48h)	
	(3)	hexan-1-ol, benzyl alcool	55°C, excès d'accepteur (1/2) Novozym 435®, ⁽¹⁾	90% (75-100h)	
série cinnamique					
acide cinnamique	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	82% (12j)	
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	97% (15j)	
	(6)	glucose (ter-butanol)	45°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	14% (5j)	
	(6)	octyl-1-glucoside (ter-butanol)	45°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	45% (5j)	
	(7)	butan-1-ol (pentane)	50°C, équimolaire CAL-B, ⁽¹⁾	85% (5j)	
	(8)	glucose (acétone / cyclohexane ; 2/1 ; v/v)	55°C, Novozym 435®, excès acyle, ⁽¹⁾	70% (7j)	
	série arylaliphatique				
	acide phénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	22% (48h)
acide phénylpropionique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	23% (48h)	
acide phénylbutyrique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	42% (48h)	
acide phénylvalérique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	11% (48h)	
Références :		Notes :			
(1) Leszczak & Tran-Minh, 1998	(5) Guyot <i>et al.</i> , 1997	⁽¹⁾ estérification directe			
(2) Otto <i>et al.</i> , 2000	(6) Stamatis <i>et al.</i> , 2001				
(3) Gryglewicz <i>et al.</i> , 2000	(7) Buisman <i>et al.</i> , 1998				
(4) Stamatis <i>et al.</i> , 1999	(8) Yan, 2001				

Peu de travaux font état d'estérifications enzymatiques efficaces avec les acides de la série benzoïque. Parmi ceux-ci, les travaux de Leszczak & Tran-Minh, 1998 montrent que le benzoate de méthyle est synthétisé par estérification directe avec le méthanol en présence de la lipase de *Candida rugosa* avec un excellent rendement (95%) dans un mélange hexane/toluène. D'après l'étude menée par Pleiss *et al.*, 1998 cette lipase possède un site actif beaucoup plus large que celui de la lipase B de *Candida antarctica*. Elle serait éventuellement plus apte à catalyser l'estérification d'acides aromatiques rigides tels que l'acide benzoïque.

Par la suite, Gryglewicz *et al.*, 2000 ont utilisé le Novozym 435® pour synthétiser les benzoates d'hexyle et de benzyle en milieu sans solvant à partir du benzoate de méthyle et de l'accepteur d'acyle dans le rapport molaire 1/2. Ici encore, les rendements obtenus sont excellents et dépassent 90%.

Cependant, lorsque Otto *et al.*, 2000 utilisent le glucose comme accepteur d'acyle dans le *ter*-butanol avec le Novozym 435® comme catalyseur, l'acide benzoïque présent en concentration équimolaire n'est pas estérifié. Ces auteurs ont étudié l'accessibilité du site actif de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire. Leur étude montre que l'interaction entre le noyau aromatique volumineux et le groupe méthyle de la thréonine 138 empêche la liaison du substrat au site actif. La rigidité du benzoate empêche tout réarrangement. De plus, la nature très hydrophobe du noyau benzoate peut empêcher le positionnement correct de ce substrat au sein du site actif à cause de la présence du résidu hydrophile aspartate 134. Ces auteurs n'ont pas eu plus de succès avec l'acide cinnamique imputant également cet échec à une gêne stérique au niveau du site actif de l'enzyme. Cependant, des conditions expérimentales différentes ont permis à Yan, 2001 d'obtenir des résultats intéressants concernant l'estérification de l'acide cinnamique par le glucose. De plus, nos résultats montrent que cet acyle est bien accepté par la CALB puisque la conversion du cinnamate d'éthyle atteint 80% en 48 h.

Enfin, avec les travaux menés par Otto *et al.*, 2000, on constate que l'acide phénylbutyrique a permis d'obtenir l'acylation du glucose alors qu'un acide aromatique de structure plus rigide (acide benzoïque et cinnamique) ne le permet pas. On peut donc penser qu'une chaîne aliphatique à deux, trois ou quatre carbones porteuse du groupement carboxylique donne à la molécule la flexibilité facilitant la formation du complexe tétraédrique au sein du site actif. De plus, avec une chaîne aliphatique de 3 à 4 carbones, le noyau aromatique du donneur d'acyle interagit avec un domaine hydrophobe du site actif lorsqu'il est impliqué dans l'intermédiaire tétraédrique, ce qui stabilise le complexe acyle/enzyme.

I.2. Estérification des acides aromatiques monosubstitués sur le cycle

Pour examiner l'influence de la présence d'un hydroxyle ou d'une amine phénolique et de sa position sur le cycle, nous avons comparé les synthèses d'esters butyliques d'acides benzoïques et cinnamiques hydroxylés ou aminés en position 2, 3 ou 4 obtenus par estérification et par alcoololyse. Cette série d'expériences a été complétée par des essais d'estérification d'acides phénoliques possédant une chaîne latérale saturée à deux ou trois carbones. Il s'agissait ici de déterminer l'éventuelle influence de la longueur du « bras

espaceur » qui écarte la fonction carboxylique du cycle aromatique en diminuant ainsi la gêne stérique. Les différents acides aromatiques monosubstitués utilisés dans cette étude sont présentés dans les tableaux 27 et 29.

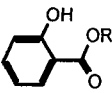
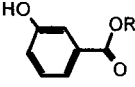
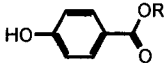
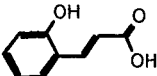
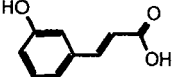
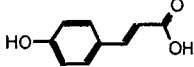
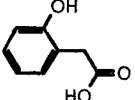
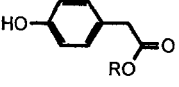
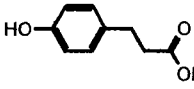
I.2.1. Substitution par un hydroxyle

Nous observons comme précédemment de meilleurs résultats en alcoololyse qu'en estérification directe. Par exemple, le 3-hydroxybenzoate de butyle est obtenu avec un rendement deux fois supérieur quand on passe de l'acide 3-hydroxybenzoïque au 3-hydroxybenzoate d'éthyle comme donneur d'acyle.

La présence d'un hydroxyle sur le cycle aromatique des acides de la série benzoïque et cinnamique réduit considérablement les rendements de synthèse : lorsqu'elle a lieu, l'estérification directe des acides benzoïques et cinnamiques hydroxylés donne lieu à un rendement de 10% au mieux, alors que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique sont estérifiés avec un rendement de 30 à 40%.

Il semble que la substitution du cycle en position méta (10% de conversion en estérification directe) soit moins défavorable à la synthèse qu'en position ortho (conversion < 5%) ou para (pas de réaction avec l'acide 4-hydroxybenzoïque, 2% de conversion de l'acide 4-hydroxycinnamique). Cependant, cet effet néfaste n'est pas observé lorsqu'un ou deux carbones saturés sont présents entre le noyau aromatique et la fonction carboxylique. Les acides hydroxyphénylacétiques et hydroxyphénylpropioniques sont estérifiés avec d'excellents rendements : 100% et 75% respectivement (tableau 27).

tableau 27 : estérification par le butan-1-ol des acides monophénoliques.

Structures	Donneurs d'acyle	Produits et rendements estimés après 48h
	série benzoïque	2-hydroxybenzoate de butyle (1320s)
	acide 2-hydroxybenzoïque R=H (550s) 2-hydroxybenzoate de méthyle R=CH ₃ (850s)	Traces <10%
	acide 3-hydroxybenzoïque R=H (310s) 3-hydroxybenzoate d'éthyle R=C ₂ H ₅ (570s)	3-hydroxybenzoate de butyle (810s) 10% 20%
		acide 4-hydroxybenzoïque R=H (300s) 4-hydroxybenzoate de méthyle R=CH ₃ (435s)
		série cinnamique
	acide 2-hydroxycinnamique (730 s)	5%
		acide 3-hydroxycinnamique (655 s)
		acide 4-hydroxycinnamique (730 s)
		série arylaliphatique
acide 2-hydroxyphénylacétique (295 s)		100%
		acide 4-hydroxyphénylacétique R=H (295 s) 4-hydroxyphénylacétate de méthyle R=CH ₃ (355 s)
		acide 4-hydroxyphénylpropionique R=H (300 s) 4-hydroxyphénylacétate de méthyle R=CH ₃ (370 s)

Conditions expérimentales : Novozym 435® : 20 g.l⁻¹, donneur d'acyle : 0,2 M, butan-1-ol : 5 ml, réacteur syncore polyvap, 65°C, 500 mbar, agitation 260 rpm. Les temps de rétention des différents composés en analyse CLHP avec le gradient A sont présentés entre parenthèses.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Guyot *et al.*, 1997 et Stamatis *et al.*, 1999 (tableau 28) et viennent consolider l'hypothèse émise par ces auteurs. Ils pensent qu'à la gène stérique évoquée précédemment pour les donneurs d'acyles benzoïques et cinnamiques, vient s'ajouter un effet mésomère donneur d'électron des hydroxyles situés en position ortho et para conduisant à une déstabilisation électronique au niveau de la fonction carboxylique (figure 57). Ces auteurs ont ainsi obtenu un rendement de conversion 3 fois plus grand avec l'acide 3-hydroxybenzoïque qu'avec les acides 2 et 4-hydroxybenzoïques (tableau 28).

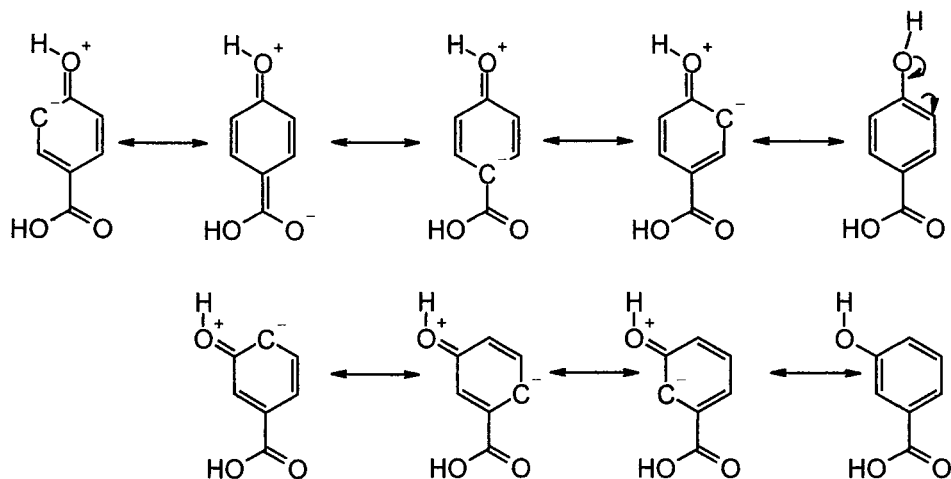


figure 57 : délocalisation électronique mésomère au sein des acides 3 et 4-hydroxybenzoïque.

Cependant, Maugard *et al.*, 2001 ont réussi à l'aide du Novozym 435® à synthétiser du salicylate (2-hydroxybenzoate) de sorbitol en milieu M_2B_2 avec un rendement de conversion du salicylate de 40% (le milieu réactionnel comprend 2 équivalents molaires de salicylate de méthyle par rapport au sorbitol). Ces auteurs montrent que les rendements sont largement améliorés en travaillant en transestérification et qu'une pression réduite permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement (en 6 h seulement).

Enfin nous avons observé une bonne acceptabilité des acides arylaliphatiques monophénoliques par la CALB, ce qui est confirmé par les études menées par une équipe grecque (Stamatis *et al.*, 1999; Stamatis *et al.*, 2001). En effet, la présence du « bras espaceur » saturé à un ou deux carbones entre le noyau aromatique et la fonction carboxylique empêche la délocalisation électronique jusqu'à la fonction carboxyle.

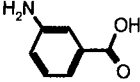
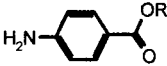
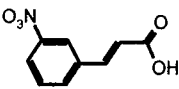
tableau 28 : synthèse bibliographique concernant l'estérification des acides aromatiques monohydroxylés.

Groupement acyle	Réf.	Accepteurs d'acyle (solvant)	Conditions réactionnelles	Rendements (temps réactionnels)
série benzoïque				
acide 2-hydroxybenzoïque (salicylate)	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	4% (30j)
	(9)	sorbitol (M ₂ B ₂)	65°C, Novozym 435® pression réduite, ⁽²⁾	40% (6h)
acide 3-hydroxybenzoïque	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435® ⁽¹⁾	14% (30j)
acide 4-hydroxybenzoïque	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	4% (30j)
	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	traces (12j)
	(7)	butan-1-ol (éther diéthylique)	34°C, CAL-B, ⁽¹⁾	<2% (5j)
série cinnamique				
acide 2-hydroxycinnamique	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	21% (12j)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	18% (40j)
acide 3-hydroxycinnamique	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	38% (12j)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	30% (34j)
acide 4-hydroxycinnamique	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	25% (12j)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	20% (40j)
série arylaliphatique				
acide 2-hydroxy-phénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	traces (48h)
acide 3-hydroxy-phénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	18% (48h)
acide 4-hydroxy-phénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	17% (48h)
	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	97% (12j)
	(6)	glucose (ter-butanol)	45°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	25% (5j)
	(6)	octyl-1-glucoside (ter-butanol)	45°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	55% (5j)
	(10)	thymidine (acétonitrile)	25°C, CAL-B, donneur d'acyle sous forme trifluoroéthyle, ⁽²⁾	95% (18h)
acide 4-hydroxy-phényl-propionique	(6)	octan-1-ol (octan-1-ol)	45°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	97% (12j)
Références :		Notes :		
(2) Otto <i>et al.</i> , 2000	(7) Buisman <i>et al.</i> , 1998	⁽¹⁾ estérification directe		
(4) Stamatis <i>et al.</i> , 1999	(9) Maugard <i>et al.</i> , 2001	⁽²⁾ alcoololyse		
(5) Guyot <i>et al.</i> , 1997	(10) Wang & Dordick, 1998			
(6) Stamatis <i>et al.</i> , 2001				

I.2.2. Substitution par un groupement azoté

Deux acides benzoïques aminés en position 3 et 4 ont été testés pour établir une comparaison avec les acides phénoliques ainsi qu'un acide cinnamique nitré.

tableau 29 : estérification par le butan-1-ol des acides aromatiques monoaminés ou mononitrés.

Structures	Donneurs d'acyle	Produit et rendements estimés après 48h
	série benzoïque acide 3-aminobenzoïque (230s)	3-aminobenzoate de butyle pas de réaction
	acide 4-aminobenzoïque R=H (240s) 4-aminobenzoate d'éthyle R=C ₂ H ₅ (450s)	4-aminobenzoate de butyle (715s) traces traces
	série cinnamique acide 3-nitrocinnamique (760 s)	3-nitrocinnamate de butyle (1355 s) 40%

Conditions expérimentales : Novozym 435® : 20 g.l⁻¹, donneur d'acyle : 0,2 M, butan-1-ol : 5 ml, réacteur syncore polyvap, 65°C, 500 mbar, agitation 260 rpm. Les temps de rétention des différents composés en analyse CLHP avec le gradient A sont présentés entre parenthèses.

La fonction amine exerce un effet mésomère donneur d'électron au même titre qu'un hydroxyle quoique moins marqué. Des résultats voisins de ceux observés avec les acides aromatiques monohydroxylés étaient donc attendus. Or, des traces de produits sont observées pour l'estérification de l'acide 4-aminobenzoïque alors qu'aucune réaction n'est observée avec l'acide 4-hydroxybenzoïque. Au contraire, l'acide 3-aminobenzoïque ne semble pas réagir alors que le 3-hydroxybenzoate de butyle est synthétisé avec un rendement de 10%. La présence de la fonction amine donne à la molécule un caractère amphotère qui pourrait être préjudiciable à la réaction d'estérification. On note que l'ester du 2-aminobenzoate a été obtenu avec un faible rendement (9%) par Kittelson & Pantaleone, 1995, dans des conditions (solvant et enzyme) très différentes des nôtres (tableau 30).

Enfin, une expérience est menée avec un dérivé aromatique nitré : l'acide 3-nitrocinnamique qui est converti à 40% en 3-nitrocinnamate de butyle.

Malgré l'effet mésomère très attracteur exercé par le groupement nitré, le rendement de conversion de l'acide 3-nitrocinnamique est identique à celui de l'acide cinnamique. La délocalisation électronique ne peut se propager jusqu'au carboxyle du fait de la position du groupement nitré en méta.

A notre connaissance, l'estérification enzymatique de dérivés benzoïques ou cinnamiques nitrés n'est pas rapportée dans la littérature. Cependant, Otto *et al.*, 2000 font état de la synthèse d'esters de 4-chloro et 4-nitrophénylacétates. L'effet mésomère de ces substituants n'est pas propagé jusqu'au carboxyle puisqu'il s'agit de dérivés du phénylacétate. Les auteurs obtiennent cependant des rendements faibles.

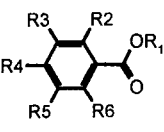
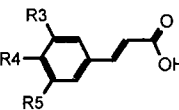
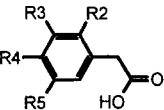
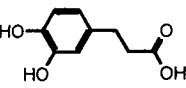
tableau 30 : synthèse bibliographique concernant l'estérification des acides aromatiques monosubstitués.

Groupement acyle	Réf.	Accepteurs d'acyle (solvant)	Conditions réactionnelles	Rendements (temps réactionnels)
acide 2-aminobenzoïque	(11)	alcool C1 à C4 (milieu biphasique, tampon acétate/solvant apolaire)	37°C, excès d'accepteur, lipase de <i>Candida cylindracea</i> ⁽¹⁾	9% (80h)
acide 4-chlorophénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	27% (48h)
acide 4-nitrophénylacétique	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®, ⁽¹⁾	12% (48h)
<u>Références :</u>			<u>Notes :</u>	
(2) Otto <i>et al.</i> , 2000			⁽¹⁾ estérification directe	
(11) Kittelson & Pantaleone, 1995				

I.3. Estérification des acides aromatiques plurisubstitués sur le cycle

Comme précédemment nous avons étudié l'estérification de différents acides aromatiques di ou trisubstitués des séries benzoïque et cinnamique et de quelques acides arylaliphatiques. Leurs structures sont présentées dans le tableau 31. Les substituants sont des groupements hydroxyles et/ou méthoxyles.

tableau 31 : estérification par le butan-1-ol des acides aromatiques plurisubstitués.

Structures	Donneurs d'acyle	Produits et rendements estimés après 48h
	série benzoïque	2,3-dihydroxybenzoate de butyle
	acide 2,3-dihydroxybenzoïque (290s) R2, R3 = OH ; R1, R4, R5, R6 = H	Pas de réaction
	acide 2,5-dihydroxybenzoïque (300s) R2, R5 = OH ; R1, R3, R4, R6 = H	2,5-dihydroxybenzoate de butyle
		Pas de réaction
	acide 2,6-dihydroxybenzoïque (250s) R2, R6 = OH ; R1, R3, R4, R6 = H	2,6-dihydroxybenzoate de butyle
		Pas de réaction
	acide 3,4-dihydroxybenzoïque (240s) R3, R4 = OH ; R1, R2, R5, R6 = H	3,4-dihydroxybenzoate de butyle
		Pas de réaction
	acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque (290s) R3 = OCH ₃ , R4 = OH ; R1, R2, R5, R6 = H	3-méthoxy-4-hydroxybenzoate de butyle
		Pas de réaction
	acide 3,4-diméthoxybenzoïque (355s) R3, R4 = OCH ₃ ; R1, R2, R5, R6 = H	3,4-diméthoxybenzoate de butyle (990s)
		5%
acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (210s) R3, R4, R5 = OH ; R1, R2, R6 = H	3,4,5-trihydroxybenzoate de butyle	
	Pas de réaction	
3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle (250s) R3, R4, R5 = OH ; R2, R6 = H ; R1 = CH ₃	Pas de réaction	
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque (275s) R3, R5 = OCH ₃ ; R4 = OH ; R1, R2, R6 = H	3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoate de butyle	
	Pas de réaction	
	série cinnamique	3,4-dihydroxycinnamate de butyle
	acide 3,4-dihydroxycinnamique (270s) R3, R4 = OH ; R5 = H	Pas de réaction
	acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (295s) R3 = OCH ₃ ; R4 = OH ; R5 = H	3-méthoxy-4-hydroxycinnamate de butyle (913 s)
		<1%
	acide 3,4-diméthoxycinnamique (315s) R3, R4 = OCH ₃ ; R5 = H	3,4-diméthoxycinnamate de butyle (1080 s)
		<5%
	acide 3,4,5-triméthoxycinnamique (360s) R3, R4, R5 = OCH ₃	3,4,5-triméthoxycinnamate de butyle (1100 s)
	<5%	
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (265s) R3, R5 = OCH ₃ ; R4 = OH	3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamate de butyle	
	Pas de réaction	
	série arylaliphatique	4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétate de butyle : (630 s)
	acide 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (250s) R3 = OCH ₃ ; R4 = OH ; R2, R5=H	100%
	acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (225s) R3, R4 = OH ; R2, R5=H	3,4-dihydroxyphénylacétate de butyle : (495 s)
		100%
	acide 2,5 dihydroxyphénylacétique (225s) R2, R5 = OH ; R3, R4=H	2,5 dihydroxyphénylacétate de butyle : (360 s)
	70%	
	acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique (245s)	3,4-dihydroxyphénylpropionate de butyle : (575 s)
		50%

Conditions expérimentales : Novozym 435® : 20 g.l⁻¹, donneur d'acyle : 0,2 M, butan-1-ol : 5 ml, réacteur syncore polyvap, 65°C, 500 mbar, agitation 260 rpm. Les temps de rétention des différents composés en analyse CLHP avec le gradient A sont présentés entre parenthèses.

En ce qui concerne les acides benzoïques et cinnamiques di ou trihydroxylés, l'estérification par le butan-1-ol ne s'est pas produite au bout de 48 h. Par contre, de faibles rendements de conversion (<5%) sont observés avec les substrats méthoxylés (acide 3,4-diméthoxybenzoïque et acide 3,4-diméthoxycinnamique). Cette meilleure réactivité peut s'expliquer par le fait que les méthoxyles sont plus hydrophobes que les hydroxyles. Ils sont donc mieux acceptés dans le site actif de la lipase.

tableau 32 : synthèse bibliographique concernant l'estérification des acides aromatiques plurisubstitués.

Groupements acyle	Réf.	Accepteurs d'acyle (solvant)	Conditions réactionnelles	Rendements (temps réactionnels)
acide 2,5-dihydroxybenzoïque	(7)	butan-1-ol (éther diéthylique)	34°C, CAL-B, ⁽¹⁾	<2% (5j)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	3% (50j)
acide 3,4-dihydroxybenzoïque	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	3% (50j)
acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque	(7)	butan-1-ol (éther diéthylique)	34°C, CAL-B, ⁽¹⁾	<2% (5j)
acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (gallique)	(7)	butan-1-ol (éther diéthylique)	34°C, CAL-B, ⁽¹⁾	<2% (5j)
acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque	(7)	butan-1-ol (éther diéthylique)	34°C, CAL-B, ⁽¹⁾	<2% (5j)
acide 3,4-dihydroxycinnamique (caféique)	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	traces (12j)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	0% (15j)
	(2)	glucose (ter-butanol)	60°C équimolaire, Novozym 435®	0% (48h)
	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	11% (12j)
acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (férule)	(4)	octan-1-ol (octan-1-ol)	50°C, Lipozyme IM®, ⁽¹⁾	30% (12j)
	(12)	octan-1-ol (toluène)	60°C, application de vide toutes les 24h, ⁽²⁾	80% (288h)
	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	traces (15j)
	(13)	trioléine (trioléine)	60°C, Novozym 435®, ⁽³⁾	77% (144h)
	(14)	trioléine (SC-CO ₂)	80°C, Novozym 435®, ⁽³⁾	74% (48h)
acide 3,4-diméthoxycinnamique	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	60% (15j)
acide 3,4-dihydroxy-phénylpropionique	(5)	butan-1-ol (butan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	78% (15j)
	(5)	octan-1-ol (octan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	80% (8h)
acide 3,4-dihydroxy-phénylacétique	(5)	octan-1-ol (octan-1-ol)	60°C, Novozym 435®, ⁽¹⁾	98% (5h)

Références :		Notes :
(2) Otto <i>et al.</i> , 2000	(12) Compton <i>et al.</i> , 2000	⁽¹⁾ estérification directe
(4) Stamatis <i>et al.</i> , 1999	(13) Compton & Laszlo, 2002	⁽³⁾ interestérification
(5) Guyot <i>et al.</i> , 1997	(14) Compton & King, 2001	SC-CO ₂ : CO ₂ supercritique
(7) Buisman <i>et al.</i> , 1998		

D'autre part comme précédemment, les acides arylaliphatiques plurisubstitués sont estérifiés efficacement : l'acide 3-méthoxy-4-hydroxyphénylacétique et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique sont totalement convertis en 48 h. l'estérification est plus lente dans le cas de l'acide 2,5-dihydroxyphénylacétique et de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique (70 et 50% de conversion respectivement en 48 h).

La synthèse bibliographique des travaux portant sur l'acylation des composés plurisubstitués est rapportée tableau 32. Ces différents travaux font état de rendements de conversion très faibles après plus de 5 jours de réaction, avec les dérivés benzoïques et cinnamiques plurisubstitués. On note une exception pour l'acide férulique (acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique) qui est estérifié avec de bons rendements dans des conditions très différentes des nôtres (Compton *et al.*, 2000; Compton & King, 2001; Compton & Laszlo, 2002). D'autre part, les auteurs ayant utilisé des conditions proches des nôtres (Stamatis *et al.*, 1999, Guyot *et al.*, 1997) ont obtenu de meilleurs résultats avec l'acide férulique qu'avec l'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique).

Presque tous les auteurs cités dans le tableau 32, utilisent le Novozym 435® comme catalyseur à l'exception de l'équipe Stamatis *et al.*, 1999 qui a également utilisé le Lipozyme IM ®. Cette préparation enzymatique s'est montrée moins efficace que le Novozym 435® pour estérifier les acides phénoliques à l'exception de l'acide férulique.

Les taux de conversion obtenus avec les acides 3,4-dihydroxyphénylpropionique et 3,4-dihydroxyphénylacétique sont beaucoup plus importants (de l'ordre de 80%) au bout de temps réactionnels relativement courts (5 et 8 h) (Guyot *et al.*, 1997).

I.4. Conclusion

Nos résultats confortent en grande partie ceux décrits dans la littérature. Ils permettent également d'étayer encore plus fortement les hypothèses émises précédemment quant à l'acceptabilité des donneurs d'acyles par le Novozym 435® :

→ Plusieurs substituants des composés benzoïques et cinnamiques provoquant un effet mésomère donneur d'électron propagé jusqu'à la fonction carboxylique sont défavorables à l'estérification.

→ Les composés comprenant au moins un carbone saturé entre le cycle aromatique et la fonction carboxylique ne subissent pas la délocalisation électronique sur l'ensemble de la molécule. L'estérification est alors possible avec de bons rendements.

Cependant, ces hypothèses ne sont pas toujours vérifiées puisque certaines conditions expérimentales permettent d'obtenir avec l'acide férulique (Compton & King, 2001) ou encore l'acide salicylique (Maugard *et al.*, 2001) des rendements de conversion intéressants dans des temps relativement courts. En effet, ces auteurs ont travaillé non pas en estérification directe mais respectivement en interestérification et en transestérification. De plus, les accepteurs d'acyle sont différents des nôtres : Compton & King, 2001 ont utilisé le glycérol et Maugard *et al.*, 2001 ont utilisé le sorbitol. Or, le premier est l'accepteur d'acyle naturel de la CALB et le second possède une structure proche du glycérol. La question reste posée de savoir quel paramètre (solvant, accepteur d'acyle) intervient. On note également que Compton & King, 2001 ont travaillé à une température plus élevée que la notre ; 80°C au lieu de 65°C.

Quoi qu'il en soit, la CALB ne montre pas de sélectivité stricte vis-à-vis du donneur d'acyle, mais les différents groupements « défavorables » diminuent la vitesse d'estérification à un point tel qu'il ne nous est pas possible d'observer l'apparition d'un produit.

Signalons que les acides arylaliphatiques donneurs d'acyles acceptés par la CALB ont des propriétés antioxydantes intéressantes s'il s'agit d'orthophénols. Rice-Evans *et al.*, 1996 accorde même à l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique un pouvoir antioxydant supérieur à celui de l'acide caféique.

II. Etude de la faisabilité de la synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes

La faisabilité de l'acylation enzymatique des flavonoïdes par un groupement aromatique est étudiée sur une réaction modèle : la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine. Ce composé a été choisi car il a déjà été synthétisé par voie chimio-enzymatique (Danieli *et al.*, 1993) et par voie enzymatique (Nakajima *et al.*, 1999b, Gao *et al.*, 2001). Ainsi, notre étude débute par la synthèse d'un ester précédemment caractérisé.

La réaction d'estérification enzymatique des flavonoïdes est représentée figure 58.

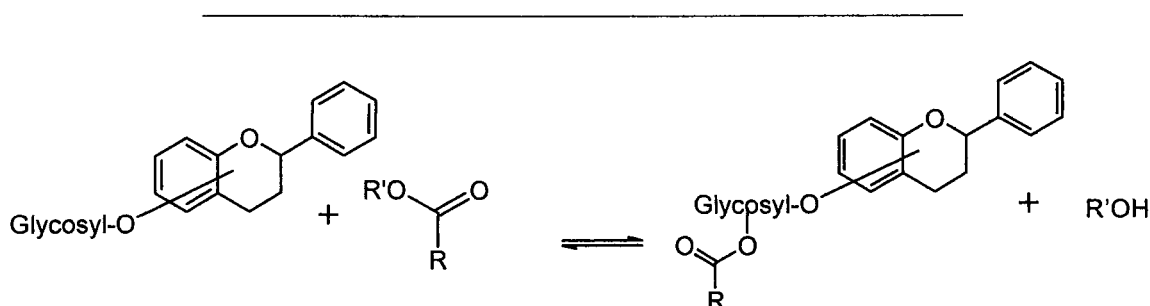


figure 58 : réaction d'estérification enzymatique des flavonoïdes.

Jusqu'à présent, les esters aromatiques de flavonoïde ont été synthétisés à l'aide de donneurs d'acyle sous forme vinylique (seul un brevet : Geers *et al.*, 2001, mentionne l'estérification directe entre la naringine et l'acide cinnamique avec un rendement inférieur à 15%). Comme nous l'avons fait remarqué précédemment, lors de ces réactions, la tautomérisation du groupement partant en acétaldéhyde favorise la synthèse en rendant la réaction irréversible. Cependant, l'acétaldéhyde est un composé hautement réactif qu'il est souhaitable d'éviter dans les procédés de production à visée alimentaire ou cosmétique. Nous nous sommes donc refusés dans ce travail à utiliser des donneurs d'acyle activés tels que les dérivés vinyliques ou fluoroéthyls.

La première partie de cette étude vise à démontrer la faisabilité de la réaction d'estérification directe d'un flavonoïde dans un milieu où le M_2B_2 est le solvant. Il s'agira ensuite d'optimiser les conditions réactionnelles afin d'obtenir différents esters de flavonoïdes avec de bons rendements dans un temps raisonnable. Les donneurs d'acyle seront des acides, des esters de méthyle ou d'éthyle. Les réactions seront ainsi de type estérification directe ($R' = H$) ou alcoolysé ($R' \neq H$, transestérification).

II.1. Essais préliminaires de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine

Le premier essai de synthèse d'ester de flavonoïde a été réalisé dans un réacteur Wheaton fermé par estérification directe à 80°C, dans le M₂B₂. Dans un premier temps, l'isoquercitrine (100 µmol), l'acide cinnamique (20 équivalents molaires) et le 2,6-diméthoxyphénol (étalon interne) ont été placés sous agitation (200 rpm) dans 5 ml de M₂B₂ non desséché pendant 16 h. L'analyse CLHP du milieu réactionnel indique qu'il n'y a ni formation spontanée d'ester d'isoquercitrine, ni dégradation des composés introduits (substrats / étalon interne). L'activité de l'eau mesurée après solubilisation des composés est de 0,084.

Puis, la réaction est initiée par l'introduction de 500 mg de Novozym 435® préalablement déshydraté sur P₂O₅ dans le milieu réactionnel. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps, toutes les 30 min au départ puis plus espacés, pendant 200 h.

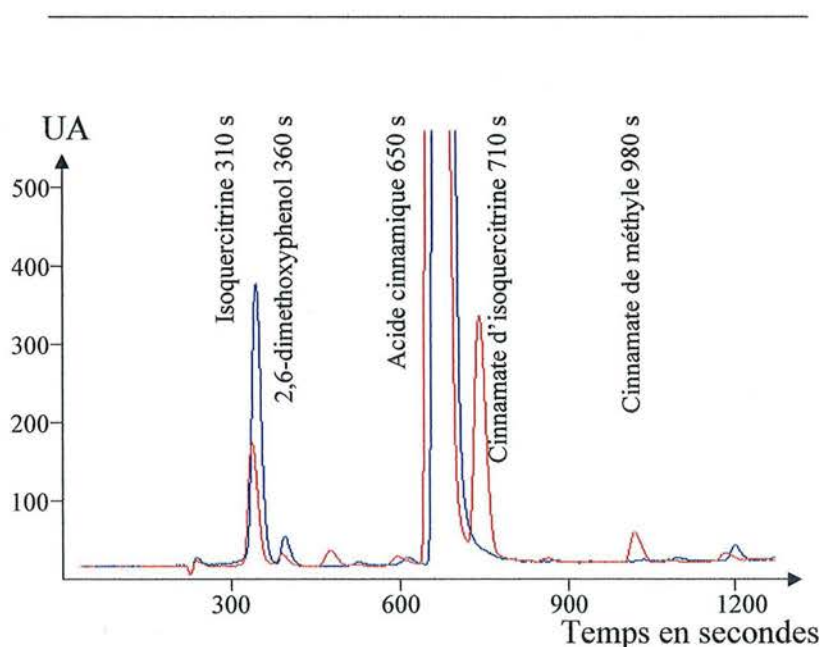


figure 59 : chromatogrammes CLHP d'un milieu de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine.

(bleu) : avant réaction. (rouge) : après 24 h d'incubation avec le Novozym 435®. Conditions expérimentales : isoquercitrine 100 µmol, étalon interne : 2,6-diméthoxyphénol 160 µmol, acide cinnamique 2000 µmol, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 500 mg, réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, 80°C, pression atmosphérique. UA : unités arbitraires

Les analyses CLHP (gradient A) montrent l'apparition de deux produits (figure 59), l'un au temps de rétention (tr) 710 s et l'autre 980 s. Le premier produit, tr 710 s, a été

identifié après purification (chapitre 2, § III.2) et analyse RMN (cf annexes) comme étant le 6''-O-cinnamate d'isoquercitrine (figure 60), en accord avec la structure identifiée par Nakajima *et al.*, 1999b et Danieli *et al.*, 1993.

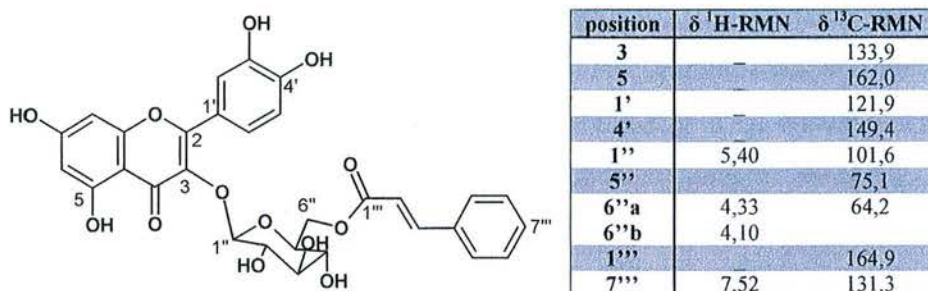


figure 60 : structure du cinnamate d'isoquercitrine.
 déterminée par RMN ^1H et ^{13}C dans le DMSO- d_6 . δ : déplacements chimiques en ppm.

Le second produit (tr 980 s) a été identifié comme étant le cinnamate de méthyle par comparaison au standard commercial. L'apparition de ce dérivé d'acide cinnamique suggère la présence de méthanol dans le M_2B_2 . Cette observation a déjà été rapportée précédemment par Chamouleau, 2002 qui préconise l'évaporation et l'usage de tamis moléculaire pour déshydrater le M_2B_2 et le débarrasser du méthanol.

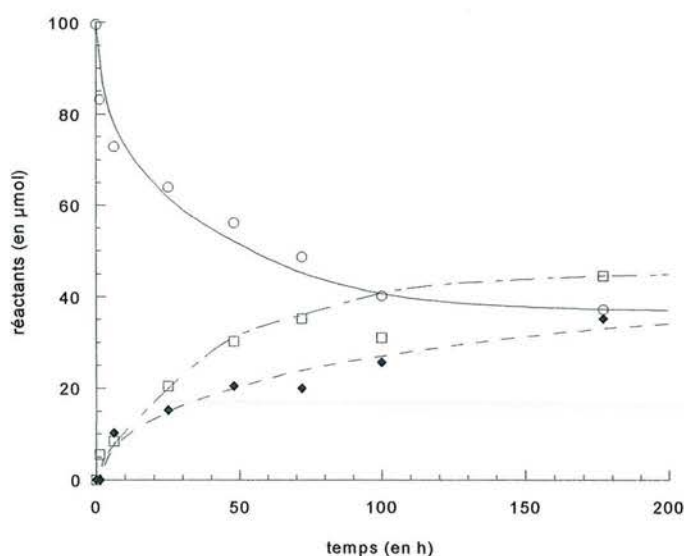


figure 61 : acylation de l'isoquercitrine par l'acide cinnamique.
 (o) isoquercitrone, (\square) cinnamate d'isoquercitrine, (\blacklozenge) cinnamate de méthyle. Conditions expérimentales : isoquercitrone 100 μmol , 2,6-diméthoxyphénol 160 μmol , acide cinnamique 2000 μmol , M_2B_2 5 ml, réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, Novozym 435® 500 mg, 80°C, pression atmosphérique.

Le suivi cinétique de la réaction est reporté figure 61. Sur ce graphique, la quantité totale des différents composés présents dans le milieu est rapportée en fonction du temps. Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est d'environ 150 h menant à un rendement de conversion de l'isoquercitrine de 45%.

Kontogianni *et al.*, 2001 ont synthétisé le dodécanoate de naringine avec un rendement de 60% au mieux en mettant en présence pendant 200 h la naringine avec 18 équivalents molaires d'acide décanoïque et 50 mg de Novozym 435® dans le tert-butanol à 45°C. La synthèse du cinnamate d'isoquercitrine menée dans nos conditions, est donc moins efficace puisqu'une quantité dix fois supérieure d'enzyme et une température plus importante conduisent à un rendement et un temps réactionnel équivalents. On note que, pour favoriser la réaction de synthèse, ces auteurs introduisent du tamis moléculaire dans le milieu réactionnel afin de capter l'eau produite en cours de synthèse.

Dans le but d'améliorer les temps et rendements de conversion de l'isoquercitrine, les effets de la pression et du solvant seront étudiés sur les réactions d'estérification directe de l'isoquercitrine par l'acide cinnamique et de transestérification par le cinnamate d'éthyle ou le cinnamate de méthyle.

II.2. Influence de la nature du donneur d'acyle

Comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique (chapitre 1, § II.2.3.2), l'estérification peut se produire en présence d'un acide libre (estérification directe) ou en présence d'un ester (transestérification).

La synthèse du cinnamate d'isoquercitrine par transestérification a été testée en utilisant le cinnamate d'éthyle comme donneur d'acyle, dans les mêmes conditions que l'estérification directe. La cinétique de la réaction est similaire à celle de l'estérification directe : en 150 h, 60% du flavonoïde est converti (figure 62). En effet, l'éthanol, coproduit de la réaction, ne peut être évacué bien que la température de travail soit suffisante pour permettre son évaporation car la réaction a lieu en réacteur Wheaton fermé.

Il est à noter qu'une quantité importante d'acide cinnamique apparaît au cours de la synthèse par transestérification, suggérant que de l'eau est disponible dans le milieu pour jouer le rôle d'accepteur d'acyle. Ainsi, la principale impureté du milieu n'est pas le méthanol mais l'eau.

L' a_w du M_2B_2 (Merck) étant inférieure à 0,1, nous avons dans un premier temps envisagé de l'utiliser sans traitement préalable. Cependant, au vu des problèmes rencontrés au cours de ces essais préliminaires, le stockage de ce solvant sur tamis moléculaire s'imposait. Un tamis moléculaire 4 Å a été choisi car cette taille de pore permet, théoriquement, l'adsorption du méthanol et de l'eau.

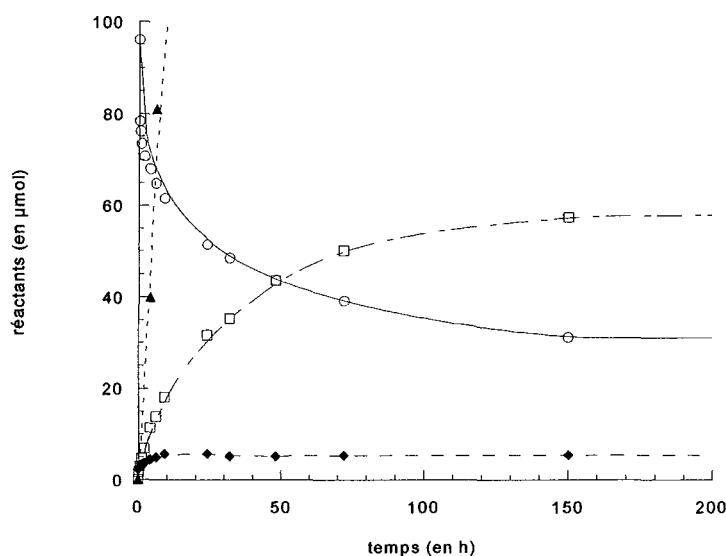


figure 62 : acylation de l'isoquercitrine par le cinnamate d'éthyle.
 (○) isoquercitrine, (□) cinnamate d'isoquercitrine, (◆) cinnamate de méthyle, (▲) acide cinnamique. Conditions expérimentales : isoquercitrine 100 µmol, 2,6-diméthoxyphénol 160 µmol, cinnamate d'éthyle 2000 µmol, M_2B_2 5 ml, Novozym 435® 500 mg, réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, 80°C, pression atmosphérique.

La figure 63, permet de comparer l'apparition du cinnamate d'isoquercitrine au cours des deux types de synthèses. Les vitesses de réaction sont lentes, $1,35 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ et $2,90 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement en mode estérification directe et en transestérification. L'équilibre n'est atteint qu'après 150 h et le rendement de conversion de l'isoquercitrine avoisine 60% en transestérification et seulement 45% en estérification directe. Le meilleur rendement obtenu en transestérification peut être expliqué par une élimination partielle de l'éthanol du milieu réactionnel lors de l'ouverture du réacteur pour effectuer les différents prélèvements, mais aussi par une diminution de la quantité d'eau disponible du fait de son utilisation pour l'hydrolyse du cinnamate d'éthyle.

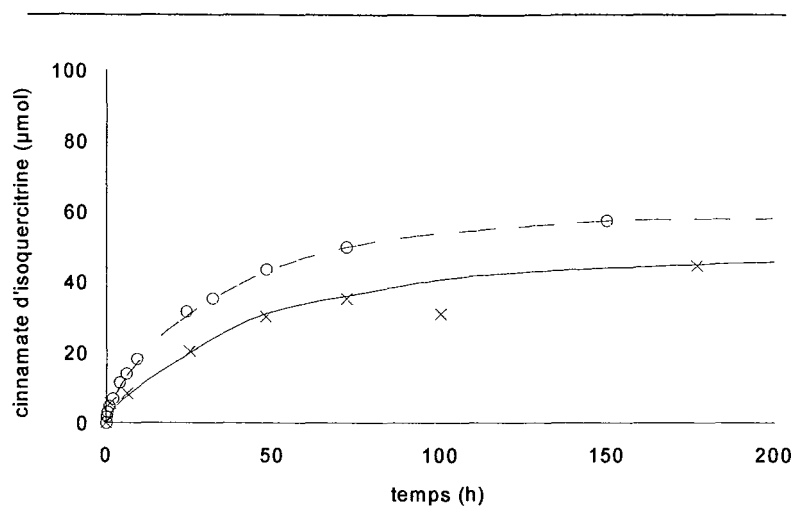


figure 63 : comparaison des synthèses du cinnamate d'isoquercitrine en modes estérification directe et transestérification sous pression atmosphérique.

(○) transestérification avec le cinnamate d'éthyle, (×) estérification directe avec l'acide cinnamique. Conditions expérimentales : isoquercitrine 10 g.l⁻¹ (21 mM), 2,6-diméthoxyphénol 10 g.l⁻¹, donneur d'acyle 20 équivalents molaires (420 mM), 5 ml de M₂B₂, 500 mg Novozym 435®, réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, 80°C, pression atmosphérique.

Des différences similaires entre estérification directe et alcoololyse ont précédemment été observées. En effet, Humeau, 1998 a observé un allongement des temps réactionnels nécessaires pour atteindre l'équilibre passant de 2 h en mode transestérification à 2 jours en mode estérification directe pour la synthèse du palmitate d'ascorbyle sans qu'il y ait de différences de rendement. D'autre part, Coulon *et al.*, 1995, qui ont étudié la synthèse de l'oléate de fructose dans le M₂B₂ à 60°C obtiennent des vitesses initiales de conversion équivalentes avec l'acide oléique et avec l'oléate de méthyle comme donneurs d'acyle. Ils expliquent le meilleur rendement obtenu en transestérification par l'évaporation du méthanol du milieu.

II.3. Effet de la pression

Afin d'améliorer le rendement de conversion du flavonoïde, il est nécessaire de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction dans le sens de la synthèse. L'introduction de 20 moles de donneurs d'acyle par mole de flavonoïde favorise en partie la synthèse. L'amélioration du rendement de conversion peut aussi être obtenue par le retrait d'un des produits. En effet, le méthanol ou l'éthanol produits en mode transestérification ou l'eau formée en mode estérification directe peuvent être éliminés par évaporation sous vide.

Le couple température/pression : 80°C/200 mbar a été choisi de façon à permettre, théoriquement, l'évaporation des coproduits des deux types de réaction. Cependant, ces conditions entraînent aussi l'évaporation non désirée du M₂B₂ à raison d'approximativement 0,5 ml par heure. Cette diminution de volume a été compensée par l'ajout de solvant frais de façon à ce que le volume réactionnel soit compris entre 2 et 8 ml. Le solvant utilisé au départ et celui ajouté en cours de synthèse, sont préalablement séchés sur tamis moléculaire 4Å.

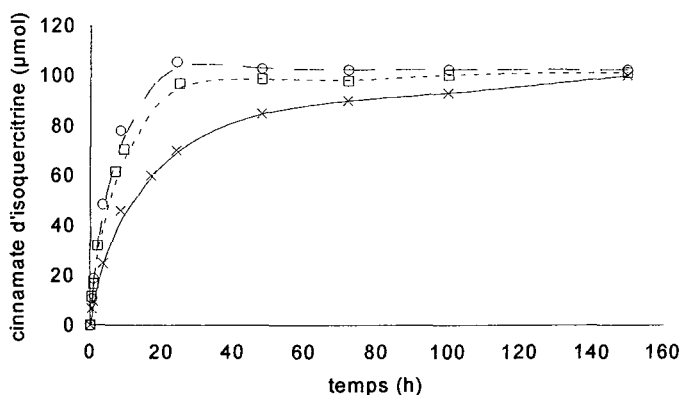


figure 64 : acylation de l'isoquercitrine sous pression réduite par l'acide cinnamique (x), le cinnamate d'éthyle (o) ou le cinnamate de méthyle (□).

Conditions expérimentales : isoquercitrine 100 µmol, 2,6-diméthoxyphénol 160 µmol, donneur d'acyle 20 équivalents molaires, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 500 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 150 rpm, 80°C, 200 mbar.

Sur la figure 64 sont reportées les quantités de cinnamate d'isoquercitrine formées au cours du temps à partir de différents donneurs d'acyles : l'acide cinnamique, le cinnamate d'éthyle et le cinnamate de méthyle.

Sous pression réduite, les rendements de conversion de l'isoquercitrine sont largement améliorés, atteignant 99% quel que soit le mode d'estérification choisi. De plus, les temps réactionnels nécessaires pour atteindre l'équilibre sont réduits, passant de 150 h à 50 h pour l'estérification directe et à 25h pour les transestérifications.

En ce qui concerne les vitesses initiales de transformation, elles augmentent considérablement par rapport aux synthèses effectuées sous pression atmosphérique. En mode direct, la vitesse initiale d'estérification de l'isoquercitrine est de 1,3 µmol.h⁻¹ et atteint 7,7 µmol.h⁻¹ sous pression réduite. De même, en mode transestérification, la vitesse initiale passe de 2,9 µmol.h⁻¹ sous pression atmosphérique à 15,0 µmol.h⁻¹ sous pression réduite.

Ces résultats suggèrent qu'il y a bien élimination des coproduits de la réaction et que l'élimination de l'éthanol et du méthanol est plus rapide que celle de l'eau.

L'hypothèse de l'élimination de l'eau par évaporation est confirmée par les mesures de quantité d'eau dans le milieu réactionnel. En effet, au début de la réaction d'estérification directe, 1 mg d'eau est détecté par gramme de milieu, alors qu'en fin de réaction, l'eau n'est plus détectable par l'appareil utilisé : la concentration en eau du milieu est donc inférieure à $0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ (chapitre 2, § IV.3.1).

L'amélioration des rendements par l'élimination du coproduit a déjà été largement décrite (Yan *et al.*, 1999, Bartling *et al.*, 2001, Giacometti *et al.*, 2001). Cependant, l'augmentation de la vitesse initiale sous pression réduite trouve peu d'explications. Elle pourrait être attribuée à la différence de configuration des réacteurs : réacteur Wheaton sous agitation magnétique (200 rpm) sous pression atmosphérique ou ballon d'évaporation en rotation (150 rpm) pour les synthèses sous pression réduite. Mais la principale hypothèse peut être la suivante : en éliminant rapidement le coproduit de l'environnement du catalyseur, on évite la compétition entre le coproduit et le flavonoïde dans le rôle du nucléophile / accepteur d'acyle.

II.4. Effet du solvant

II.4.1. Synthèse en milieu 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one : HMP

L'utilisation du couple température/pression : $80^{\circ}\text{C}/200 \text{ mbar}$ permettant une élimination efficace des coproduits mène à d'excellents rendements de synthèse. Cependant, ces conditions provoquent des variations du volume réactionnel à cause de l'évaporation importante du solvant M_2B_2 .

La diacétone alcool ou 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one (HMP) a donc été utilisée comme solvant, car sa température d'ébullition à pression atmosphérique est plus élevée (160°C) que celle du M_2B_2 (102°C). Ces propriétés physiques devraient théoriquement permettre l'élimination des coproduits de synthèse en assurant le maintien du volume réactionnel. De plus, le HMP n'inhibe pas l'activité enzymatique du Novozym 435® (Humeau, 1998) et permet la solubilisation des différents substrats.

Comme précédemment avec le M_2B_2 , le solvant a été séché sur tamis moléculaire 4 Å, mais la quantité d'eau résiduelle dans le milieu réactionnel n'a pu être déterminée car la méthode de Karl Fisher ne peut être utilisée en présence de cétones. (chapitre 2, § IV.3.1).

tableau 33 : comparaison des différents modes de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine.

donneur d'acyle	solvant / pression		
	M_2B_2 / atmosphérique	M_2B_2 / 200 mbar	HMP / 200 mbar
acide cinnamique	45% (>150h)	99% (50h)	50% (70h)
cinnamate d'éthyle	60% (>150h)	99% (25h)	80% (30h)
cinnamate de méthyle	nr	99% (25h)	nr

Les rendements sont exprimés en pourcentages de conversion de l'isoquercitrine, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est indiqué entre parenthèses. Conditions expérimentales : isoquercitrine 100 μmol , 2,6-diméthoxyphénol 160 μmol , donneur d'acyle 20 équivalents molaires, solvant 5 ml, Novozym 435@ 500 mg, sous pression atmosphérique en réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, sous 200 mbars en réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 150 rpm, 80°C. nr : non réalisé.

Dans le HMP, la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine a bien lieu mais elle est moins importante que dans le M_2B_2 . Comme le montre le tableau 33, les rendements de conversion obtenus sous pression réduite sont inférieurs à ceux obtenus dans le M_2B_2 , à la fois pour l'estérification directe (50%) et la transestérification (80%). De plus, les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre réactionnel sont plus longs. Ces résultats suggèrent une mauvaise élimination de l'éthanol coproduit de la transestérification et/ou la rétention de l'eau dans le milieu réactionnel. On peut aussi penser à une activité moins importante de la lipase dans ce type de milieu comme cela a été démontré par Humeau, 1998 et Rahal, 2000 pour l'acylation de l'acide ascorbique.

Il est à noter qu'aucune trace de cinnamate de méthyle n'est apparue au cours des synthèses effectuées avec le HMP comme solvant. Le HMP ne sera cependant pas retenu pour la poursuite de l'étude qui s'effectuera donc avec le M_2B_2 comme solvant.

II.4.2. Synthèse avec le donneur d'acyle comme solvant

Deux des donneurs d'acyles précédemment testés en milieu solvant sont liquides aux températures de réaction : il s'agit du cinnamate d'éthyle dont le point de fusion est de 7°C et du cinnamate de méthyle dont le point de fusion est compris entre 34 et 38°C. Ainsi il est envisageable de synthétiser le cinnamate d'isoquercitrine par alcoolyse dans un milieu où le rôle du solvant serait joué par le donneur d'acyle.

Les premières synthèses sont effectuées en réacteurs Wheaton fermés sous pression atmosphérique. Les milieux réactionnels sont composés comme suit : 100 μmol d'isoquercitrine sont introduites dans 5 ml de cinnamate d'éthyle et sont agitées à 80°C pendant 16 h afin de permettre une solubilisation maximale du flavonoïde. Cependant, l'isoquercitrine est en grande partie insoluble dans le cinnamate d'éthyle et le milieu est donc trouble. Les prélèvements ne permettent pas de déterminer la quantité réelle de substrat présent. Le suivi cinétique est donc effectué seulement par dosage du produit formé (figure 65).

Les analyses CLHP du milieu réactionnel indiquent l'apparition du cinnamate d'isoquercitrine. Au bout de 20 h de réaction sous pression atmosphérique, 95 % de la quantité d'ester attendue est apparue. De plus, après 10 h de réaction, le milieu est limpide, suggérant que le substrat et le produit sont à ce stade solubilisés. En effet, après 10 h, les dosages CLHP permettent de faire le bilan des quantités de substrat transformé ou non par rapport à la quantité de substrat initialement introduite.

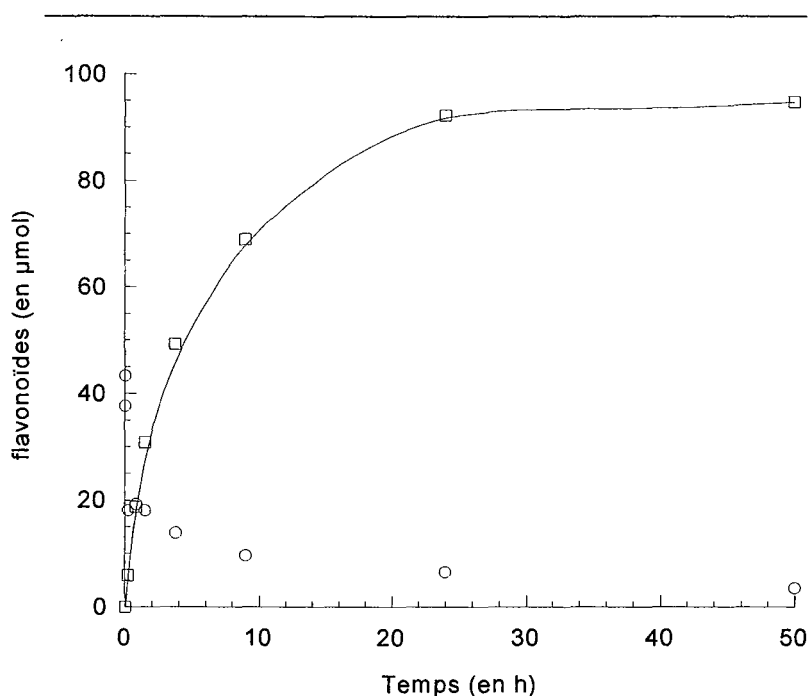


figure 65 : acylation de l'isoquercitrine par le cinnamate d'éthyle sous pression atmosphérique.

(○) isoquercitrine, (□) cinnamate d'isoquercitrine. Conditions expérimentales : isoquercitrine 100 μmol , cinnamate d'éthyle 5 ml (275 équivalents molaires), Novozym 435® 500 mg, réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, 80°C, pression atmosphérique.

La même synthèse a été réalisée sous pression réduite ; l'élimination de l'éthanol du milieu permet dans ce cas d'accélérer la réaction et d'obtenir un rendement encore meilleur : 99% après 10 h de réaction. La vitesse initiale de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine est d'environ $30 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ en milieu donneur d'acyle contre seulement $15 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ en présence de M_2B_2 (80°C , 200 mbar). Une synthèse réalisée avec le cinnamate de méthyle mène aux mêmes résultats (tableau 34).

Dans le cadre de ces synthèses, il n'est pas possible de déterminer si la vitesse de conversion du flavonoïde est limitée par la dissolution du flavonoïde ou par la catalyse enzymatique.

tableau 34 : rendements obtenus pour la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine en milieu « donneur d'acyle »

pression	donneur d'acyle	taux de conversion (temps)
atmosphérique	cinnamate d'éthyle	95% (20 h)
200 mbar	cinnamate d'éthyle	99% (10 h)
200 mbar	cinnamate de méthyle	99% (10 h)

Les rendements sont exprimés en pourcentages de conversion de l'isoquercitrine, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est indiqué entre parenthèses. Conditions expérimentales : isoquercitrine 50 mg (100 μmol), donneur d'acyle 5ml (275 à 370 équivalents molaires), 500 mg Novozym 435®, 80°C . sous pression atmosphérique en réacteur Wheaton®, agitation 200 rpm, sous 200 mbars en réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 150 rpm, 80°C .

Comme le montre le tableau 34, l'abaissement de la pression a permis de diminuer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de la réaction. On note, que des essais conduits sans avoir séché au préalable le Novozym 435® sur P_2O_5 ont montré un allongement des temps réactionnels (équilibre atteint en 24 h au lieu de 10 h sous pression réduite et en 48 h au lieu de 20 h sous pression atmosphérique). Les traces d'eau présentes dans la préparation enzymatique entrent en compétition avec le flavonoïde dans le rôle d'accepteur d'acyle ralentissant ainsi la réaction sans pour autant modifier le taux de conversion du flavonoïde ; en effet, le donneur d'acyle est en large excès par rapport aux accepteurs présents : l'eau et le flavonoïde.

L'acylation des flavonoïdes en milieu sans solvant a été tentée par Kontogianni *et al.*, 2001 par estérification directe avec des acides gras à 45°C et sous pression atmosphérique. Ces auteurs n'ont obtenu que 12,5% de conversion du flavonoïde et n'ont pas mentionné le temps nécessaire à l'obtention de ce rendement. Ils ont attribué ce faible résultat au manque de solubilité de la naringine et de la rutine dans les acides gras à chaîne moyenne (C8 à C12). Au vu de nos propres résultats obtenus pour la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine en milieu « donneur d'acyle », cette hypothèse paraît discutable puisque la faible solubilité de

l'isoquercitrine n'empêche pas sa conversion quasi totale. D'autre part, le travail sous pression réduite permet une meilleure élimination des coproduits et conduit donc à un meilleur rendement.

II.5. Conclusion

La synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes par estérification directe n'a été rapportée que dans un brevet (Geers *et al.*, 2001). Ces auteurs mentionnent la synthèse d'un produit avec un rendement inférieur à 15% en 40 h. Dans ce mode, nous avons pu obtenir 45% de conversion de l'isoquercitrine et un résultat encore meilleur en transestérification (60%). Cependant, le temps réactionnel, de l'ordre de 150 h, reste très long.

Une nette amélioration des rendements est obtenue en éliminant les coproduits de synthèse, à savoir l'eau dans le cas d'une estérification directe et le méthanol ou l'éthanol dans le cas d'une transestérification. Cette élimination par évaporation sous pression réduite a permis, non seulement d'augmenter les rendements de conversion (jusqu'à 99%), mais aussi de diminuer les temps réactionnels nécessaires pour atteindre l'équilibre (25 à 50 h au lieu de 150 h).

De plus, sous pression réduite, l'élimination du méthanol et de l'éthanol est plus rapide que celle de l'eau rendant la réaction de transestérification 2 fois plus rapide que l'estérification directe. Ainsi, il est préférable de travailler en mode transestérification.

Enfin, l'acylation en milieu « donneur d'acyle » s'est montrée la plus efficace puisque, sous pression réduite, 99% de l'isoquercitrine est acylée en seulement 10 h contre 25 h en présence de solvant et ceci bien que l'isoquercitrine ne soit que peu soluble dans le cinnamate d'éthyle et le cinnamate de méthyle.

Ces conclusions nous amènent à envisager pour la suite de l'étude les synthèses dans deux types de milieux :

- en présence de M_2B_2 (en utilisant des donneurs d'acyle méthylés ou éthylés chaque fois qu'ils sont disponibles)
- en milieu « donneur d'acyle » lorsque les propriétés physiques de ces derniers le permettent.

Dans ces deux cas, les réactions seront conduites sous pression réduite.

Ces études sont d'abord réalisées avec un flavonoïde modèle original : la phloridzine (dihydrochalcone caractéristique de la pomme). Elle est présente à hauteur de $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ dans le marc de pommes (chapitre 1, § I.1.2.4). Les méthodes d'extraction efficaces existantes (Ridgway *et al.*, 1997, Gaudout *et al.*, 2003) en font un excellent produit à valoriser.

La phloridzine possède, en outre, des propriétés biologiques et physico-chimiques intéressantes pour des applications cosmétiques (chapitre 2, § I.3.5). Il serait très intéressant soit de valoriser ces propriétés par une vectorisation de la molécule (augmentation de la solubilité dans les phases lipophiles par exemple) soit d'apporter des propriétés complémentaires par greffage d'acides de type cinnamique (propriétés anti-UV, antioxydantes)

On note aussi que l'excellente solubilité de la phloridzine dans le cinnamate d'éthyle facilite l'étude de la synthèse enzymatique en milieu « donneur d'acyle ».

III. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu solvant

La phloridzine et un donneur d'acyle bien accepté par l'enzyme ont été choisis pour l'étude de différents paramètres de la réaction en milieu solvant (M_2B_2). Ensuite, la phloridzine a été acylée avec un certain nombre de donneurs d'acyle puis la réaction a été étendue à d'autres flavonoïdes.

L'installation Syncore Polyvap est utilisée afin de pouvoir multiplier les essais sous pression réduite (chapitre 2, § I.3). Néanmoins, ce dispositif ne permet pas de fixer à volonté tous les paramètres : la température maximale applicable est de 65°C ; aussi la pression est fixée à 180 mbar pour faciliter l'élimination des coproduits (eau, méthanol, éthanol) de la réaction. Signalons une variabilité non négligeable des réactions en fonction de la position des tubes sur le plateau agitant. Cette variabilité concerne les concentrations en substrats dans les milieux réactionnels : elle est due à la recondensation préférentielle du solvant dans les tubes proches de l'extérieur du plateau agitant. Aussi, les rendements et vitesses réactionnelles observés n'indiquent qu'un ordre de grandeur : les écarts-types sont d'environ 10 à 15% pour les vitesses initiales et de moins de 5% pour les taux de conversion.

III.1. Influence des conditions opératoires

L'étude de la synthèse d'esters de phloridzine dans le M_2B_2 a donc été conduite à 65°C, sous une pression de 180 mbar et sous une agitation de 260 rpm. L'acide cinnamique et l'acide 4-hydroxyphénylacétique ont été choisis car ce sont de bons substrats pour l'enzyme (chapitre 3, § I). L'analyse des milieux réactionnels est conduite par CLHP et les produits sont quantifiés grâce au biphenyl-4,4'-diol utilisé comme étalon interne.

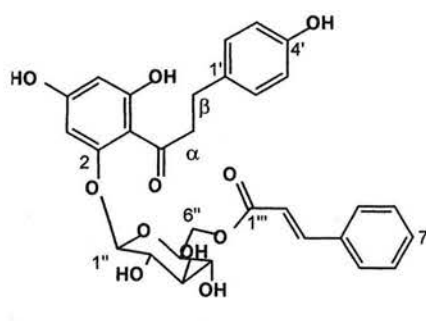
Quelques paramètres de la réaction sont plus particulièrement étudiés : l'influence de la quantité d'enzyme, le rapport donneur / accepteur d'acyle ainsi que la stabilité du Novozym 435® à 65°C dans le M_2B_2 .

III.1.1. Etude de la synthèse du 4-hydroxyphénylacétate et du cinnamate de phloridzine à 65°C, 180 mbar dans le M₂B₂

La phloridzine 50 μmol (4,7 g.l⁻¹), le donneur d'acyle (10 équivalents molaires) et le biphenyl-4,4'-diol (80 μmol) sont placés dans 5 ml de M₂B₂ préalablement déshydraté (a_w : 0,073) pendant 16 h sous une agitation de 260 rpm, à 65°C, 180 mbar. L'analyse CLHP indique qu'il n'y a ni formation de produits de dégradation, ni apparition spontanée d'ester de phloridzine en absence d'enzyme. La réaction est initiée par l'introduction de 100 mg de préparation enzymatique dans le milieu réactionnel. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h.

III.1.1.1. Synthèse du cinnamate de phloridzine

Les réactions sont conduites en estérification directe (acide cinnamique) et en transestérification (cinnamate d'éthyle). L'analyse HPLC avec le gradient A (chapitre 2, § IV.1) a permis d'identifier pour ces deux réactions, un produit à 980 s. Après purification et caractérisation RMN-¹H et ¹³C, nous avons identifié le 6''-O-cinnamate de phloridzine (figure 66) en accord avec la structure attendue au vu de la spécificité de cette enzyme (chapitre 3, § II.1).



position	δ ¹ H-RMN	δ ¹³ C-RMN
C=O		204,3
α	3,2-3,5	45,2
β	2,76	29,5
1'		104,8
4'		163,8
1''	5,09	101,1
5''	3,20-3,40	70,0
6''a	4,20	63,9
6''b	4,47	
1'''		166,5
7'''	7,65	128,7

figure 66 : structure du cinnamate de phloridzine déterminée par RMN-¹H et ¹³C dans le DMSO-d₆. Déplacements chimiques en ppm.

Les concentrations en cinnamate de phloridzine sont déterminées après étalonnage de la méthode analytique avec le produit purifié. Sur les graphiques présentés figure 67 sont reportées les quantités de phloridzine restante et d'ester de phloridzine formé au cours du temps, en estérification directe (A) et en transestérification (B).

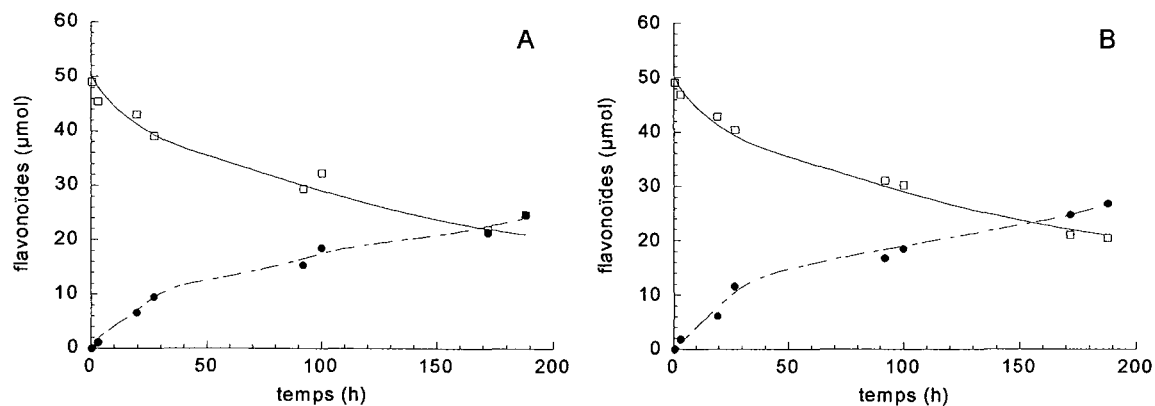


figure 67 : acylation de la phloridzine par l'acide cinnamique : A, par le cinnamate d'éthyle : B.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, donneurs d'acyle 500 µmol, biphenyl-4,4'-diol 80 µmol, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 20 g.l⁻¹, réacteur Syncore Polyvap, agitation : 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

□ : phloridzine, ● : cinnamate de phloridzine.

La réaction de synthèse du cinnamate de phloridzine par estérification directe (figure 67A) atteint un rendement d'environ 50% seulement en 175 h. Après 200 h de réaction, l'équilibre n'est pas atteint. La réaction de transestérification se déroule de la même façon (figure 67B) avec 50% de conversion du flavonoïde au bout de 160 h. Les vitesses initiales d'apparition du cinnamate de phloridzine sont identiques (0,4 µmol.h⁻¹) en estérification directe et en alcoololyse.

III.1.1.2. Synthèse du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine

Les réactions conduites avec l'acide 4-hydroxyphénylacétique et le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle comme donneurs d'acyle sont suivies par CLHP avec le gradient B (chapitre 2, § IV.1). Pour ces deux réactions, un seul produit apparaît à 1090 s. Ce produit n'a pas été isolé et caractérisé. Néanmoins, au vu des résultats précédents, le groupement acyle est sans aucun doute greffé sur l'hydroxyle en 6'' du résidu glucoside de la phloridzine. Le produit serait donc le 6''-O-(4-hydroxyphénylacétate) de phloridzine (figure 68).

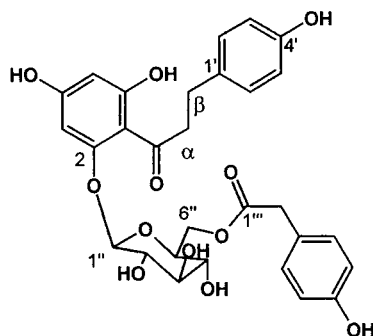


figure 68 : structure du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine.

Les concentrations en 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine sont déterminées grâce au calcul du coefficient d'étalonnage (chapitre 2, § IV.1.2). Le suivi cinétique des réactions est reporté figure 69.

La réaction de synthèse du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine par estérification directe (figure 69A) atteint 50% de rendement en environ 60 h. Après 200 h de réaction, l'équilibre semble atteint avec 80% de conversion de la phloridzine.

La réaction de transestérification (figure 69B) est plus rapide, sa vitesse initiale est de $0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ contre $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ en estérification directe. De plus l'équilibre est atteint plus rapidement (environ 100 h) avec 95% de conversion.

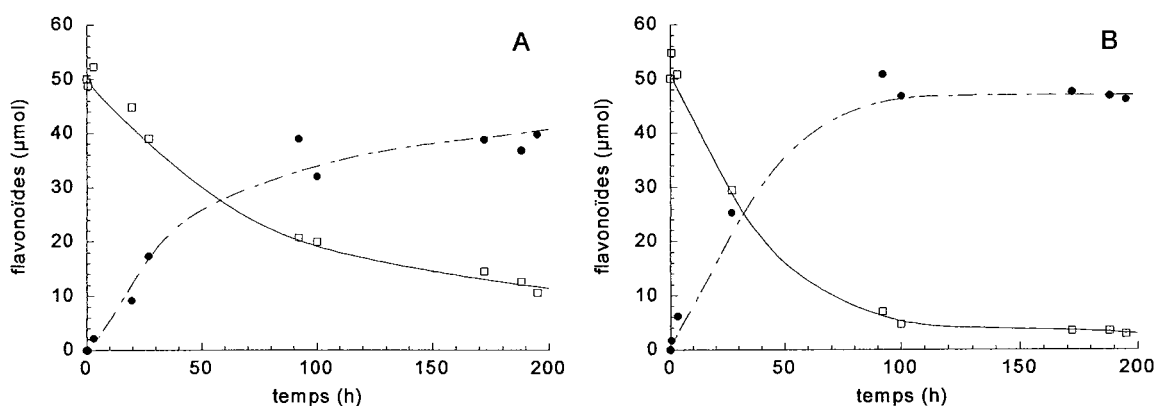


figure 69 : acylation de la phloridzine par l'acide 4-hydroxyphénylacétique : A et le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle : B.

Conditions expérimentales : phloridzine $50 \mu\text{mol}$, donneurs d'acyle $500 \mu\text{mol}$, biphenyl-4,4'-diol $80 \mu\text{mol}$, M_2B_2 5 ml , Novozym 435@ $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, réacteur Syncore Polyvap, agitation : 260 rpm , 65°C , 180 mbar .

□ : phloridzine, ● : cinnamate de phloridzine.

Les différences observées entre estérification directe et transestérification semblent indiquer que dans ces conditions, l'eau est moins efficacement éliminée que le méthanol (voir courbes de rosée figure 56, p 115).

Par ailleurs, les réactions d'estérification et de transestérification de la phloridzine par le cinnamate sont plus lentes et l'équilibre n'est pas encore atteint après 200 h de réaction. Dans les conditions de pression de la réaction, l'éthanol devrait être éliminé. L'absence d'accélération de la réaction pour la transestérification avec le cinnamate d'éthyle suggère que ce n'est pas le cas.

Les réactions présentées ici sont longues à cause des conditions opératoires liées à l'utilisation du Syncore Polyvap qui ne permet pas de travailler à plus de 65°C. Mais comme nous l'avons précisé, cet appareil permet néanmoins un gain de temps considérable pour comparer la réactivité des flavonoïdes et des donneurs d'acyles étudiés dans cette étude.

La réaction de synthèse du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine, étant la plus rapide, a été choisie pour étudier quelques paramètres réactionnels, en particulier la quantité d'enzyme et le rapport molaire donneur / accepteur d'acyle.

III.1.2. Influence de la quantité d'enzyme

Le milieu réactionnel contient 50 μmol de phloridzine et 5 équivalents molaires de 4-hydroxyphénylacétate de méthyle dans 5 ml de M_2B_2 . La réaction est initiée par l'addition de 25 à 300 mg de Novozym 435®, à 65°C et sous 180 mbar.

La vitesse initiale et le taux de conversion atteint après 200 h de réaction sont reportés figure 70 en fonction de la quantité de Novozym 435® (g.l^{-1}).

La vitesse initiale de formation du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine augmente proportionnellement à la quantité d'enzyme introduite jusqu'à environ 35 g.l^{-1} . Au delà de cette concentration, la vitesse augmente moins ce qui semble indiquer que la concentration en substrat (10 mM) devient le facteur limitant. Il est difficile de préciser dans les conditions opératoires de cette expérience si certains sites actifs enzymatiques restent inoccupés ou si les limitations diffusionnelles freinent l'accès du substrat au site actif. Il est cependant probable que l'importante quantité de support enzymatique empêche un mélange correct du milieu réactionnel.

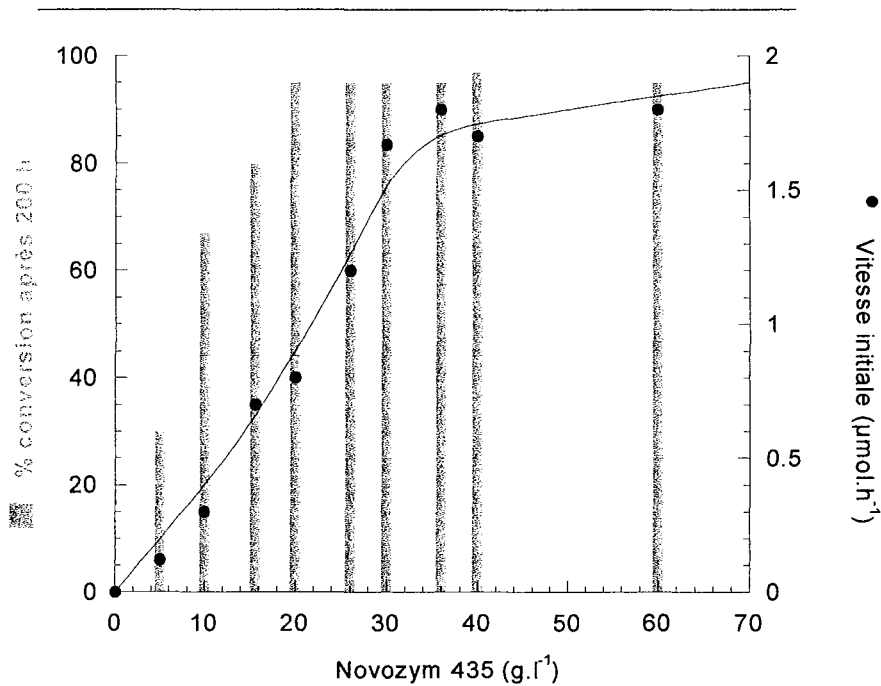


figure 70 : effet de la quantité de Novozym 435® sur la synthèse du 4-hydroxyphénylacétate de phloridzine.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, 4-hydroxyphénylacétate de méthyle 250 μmol, biphenyl-4,4'-diol 80 μmol, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 5 à 60 g.l⁻¹, réacteur Syncore Polyvap, agitation : 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

Quoi qu'il en soit, l'équilibre est atteint en 50 h avec une concentration en Novozym 435® supérieure ou égale à 30 g.l⁻¹ et en 100 h entre 20 et 26 g.l⁻¹. Cet équilibre n'est pas atteint après 200 h pour des concentrations en Novozym 435® inférieures à 20 g.l⁻¹.

La firme Novozymes A/S recommande, pour la synthèse du laurate de propyle, d'utiliser une concentration en enzyme de 20 à 40% (p/p) par rapport au propanol (Novo Nordisk Bioindustrials Inc., 1992). Or, la plus petite concentration testée au cours de notre étude (5 g.l⁻¹) correspond à 100% du poids de la phloridzine mise en jeu dans la réaction.

L'acylation des flavonoïdes dans les conditions expérimentales imposées par l'utilisation du Syncore Polyvap (65°C) est donc loin d'être efficace.

A la suite de ces essais nous avons fixé la concentration en enzyme à 20 g.l⁻¹.

III.1.3. Influence du ratio donneur / accepteur d'acyle

Cette étude est réalisée dans les conditions précédemment décrites arbitrairement avec l'acide 4-hydroxyphénylacétique comme donneur d'acyle.

L'équilibre thermodynamique des réactions a été déplacé dans le sens de la synthèse grâce à un excès important de donneur d'acyle. A ce stade de l'étude, nous cherchons à minimiser l'excès de substrat acyle à mettre en œuvre permettant de conserver une vitesse et un rendement de conversion optimaux.

L'effet du rapport molaire donneur d'acyle / flavonoïdes (R) est étudié dans le cadre d'un excès de donneur d'acyle. En effet, le flavonoïde étant un substrat plus coûteux que le donneur d'acyle, il convient de privilégier sa conversion d'autant plus que la séparation de l'ester du donneur d'acyle est plus aisée que la séparation de l'ester du flavonoïde (chapitre 2, § III.1). De plus, certains auteurs ont montré que les excès de donneurs d'acyle mènent généralement à de meilleurs résultats que les excès d'accepteurs (From *et al.*, 1997, Maugard *et al.*, 2000, Macedo *et al.*,).

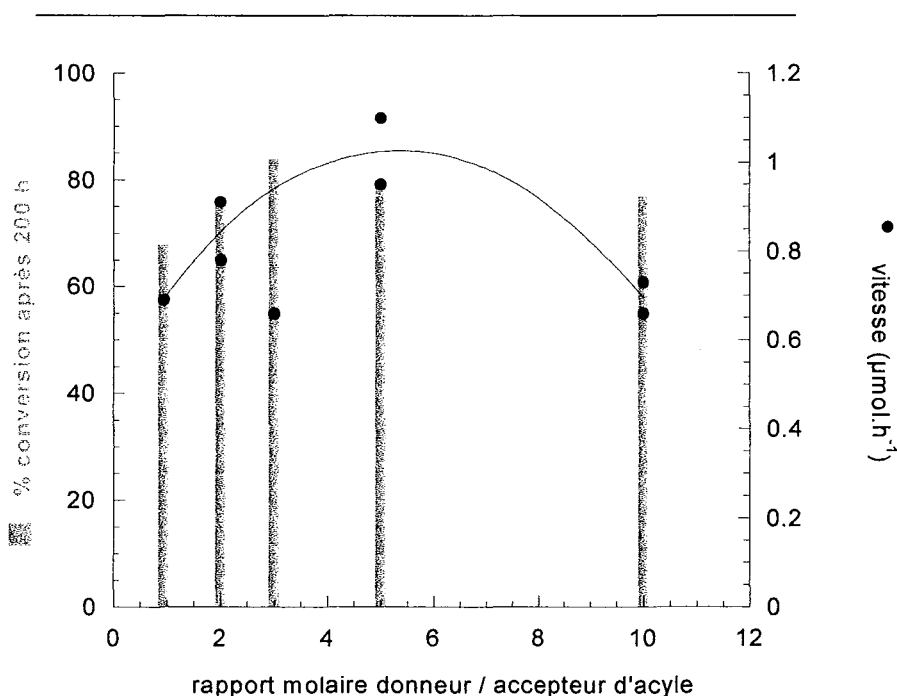


figure 71: influence du rapport molaire donneur / accepteur d'acyle

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, acide 4-hydroxyphénylacétique 50 à 500 μmol, biphenyl-4,4'-diol 80 μmol, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 20 g.l⁻¹, réacteur Syncore Polyvap, agitation : 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

Quelle que soit la concentration en acide 4-hydroxyphénylacétique, l'équilibre est atteint au bout de 100 h environ. Le taux de conversion à l'équilibre évolue peu : 70 à 85% pour des valeurs de R comprises entre 1 et 5 et ne semble plus évoluer lorsque R est supérieur à 5. Il semble même que la conversion soit plus faible quand la quantité d'acide est largement excédentaire (R=10).

Kontogianni *et al.*, 2003 ont étudié la synthèse du décanoate de naringine dans le *tert*-butanol catalysée par le Novozym 435®. Ces auteurs ont fait varier la concentration en acide décanoïque de 50 à 300 mM pour une concentration en naringine de 16,5 mM soit des valeurs de R comprises entre 3 et 18. Ces auteurs ont montré que les vitesses initiales d'acylation de la naringine augmentent avec R et que l'acide décanoïque n'exerce aucune inhibition sur la synthèse.

L'excédent de donneur d'acyle semble avoir un effet moins net dans notre étude : la vitesse initiale augmente de 0,7 à 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ entre R = 1 et R = 5 et diminue pour R = 10 jusqu'à 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Cette observation peut s'expliquer en partie par l'hydrolyse de l'ester formé en présence de l'eau produite au cours de l'estérification directe. En effet, Kontogianni *et al.*, 2003 introduisent du tamis moléculaire dans le milieu réactionnel pour le déshydrater.

D'autre part, Hari Krishna *et al.*, 2001 synthétisent l'acétate d'isoamyle dans l'heptane en présence de la lipase de *Rhizomucor miehei*. Ces auteurs trouvent qu'un excès d'acide acétique, correspondant à une concentration de 0,06 M, diminue le rendement d'estérification à cause d'une acidification de la microphase aqueuse causant éventuellement une hydrolyse de l'ester et une inhibition de l'enzyme. Or, le pKa de l'acide 4-hydroxyphénylacétique, proche du pKa de l'acide phénylacétique (pKa : 4,25) est légèrement plus bas que celui de l'acide acétique (pKa : 4,76). On peut donc penser que l'acidité de nos milieux apportée par une concentration en acide 4-hydroxyphénylacétique supérieure ou égale à 0,05 M est responsable de la diminution de vitesse initiale observée.

Pour éviter l'acidification du milieu réactionnel, il aurait fallu travailler en transestérification, avec le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle. Néanmoins, le rapport molaire accepteur / donneur d'acyle égal à 5 a été retenu pour la suite de l'étude.

III.1.4. Etude de la stabilité du Novozym 435® dans le M₂B₂ à 65°C

L'étude menée par Coulon *et al.*, 1997 montre que la réutilisation de cette enzyme est possible après lavage au M₂B₂. Ces auteurs ont observé une perte d'activité minimale après 10 cycles de 24 h à 60°C, la vitesse initiale passant de 34 à 24,5 g.l⁻¹.h⁻¹. Néanmoins, la même étude menée à 80°C montre une chute d'activité plus importante : de 84 à 6,7 g.l⁻¹.h⁻¹, toujours après 10 cycles. Les réactions considérées dans notre étude étant beaucoup plus longues (200 h), il fallait s'assurer en premier lieu que la perte d'activité au cours d'une réaction n'était pas trop importante. C'est pourquoi la stabilité du Novozym 435® a été étudiée par incubation dans le milieu réactionnel à 65°C.

Le Novozym 435® (100 mg) est incubé pendant 0, 2,5 ou 10 jours soit dans le M₂B₂ seul (4ml), soit dans le M₂B₂ en présence de phloridzine (50 µmol), soit dans le M₂B₂ en présence de donneur d'acyle (250 µmol). Deux donneurs d'acyles sont utilisés : l'acide 4-hydroxyphénylacétique et l'acide cinnamique. Après incubation, la réaction est déclenchée par l'addition du ou des substrats manquants. Chaque réaction est effectuée en double et arrêtée au bout de 200 h.

Sur la figure 72, sont présentés les rendements de conversion de la phloridzine obtenus après 200 h de réaction, ainsi que les activités résiduelles de la préparation enzymatique représentées par les vitesses initiales de chaque réaction. Les valeurs présentées sont les moyennes obtenues pour deux essais.

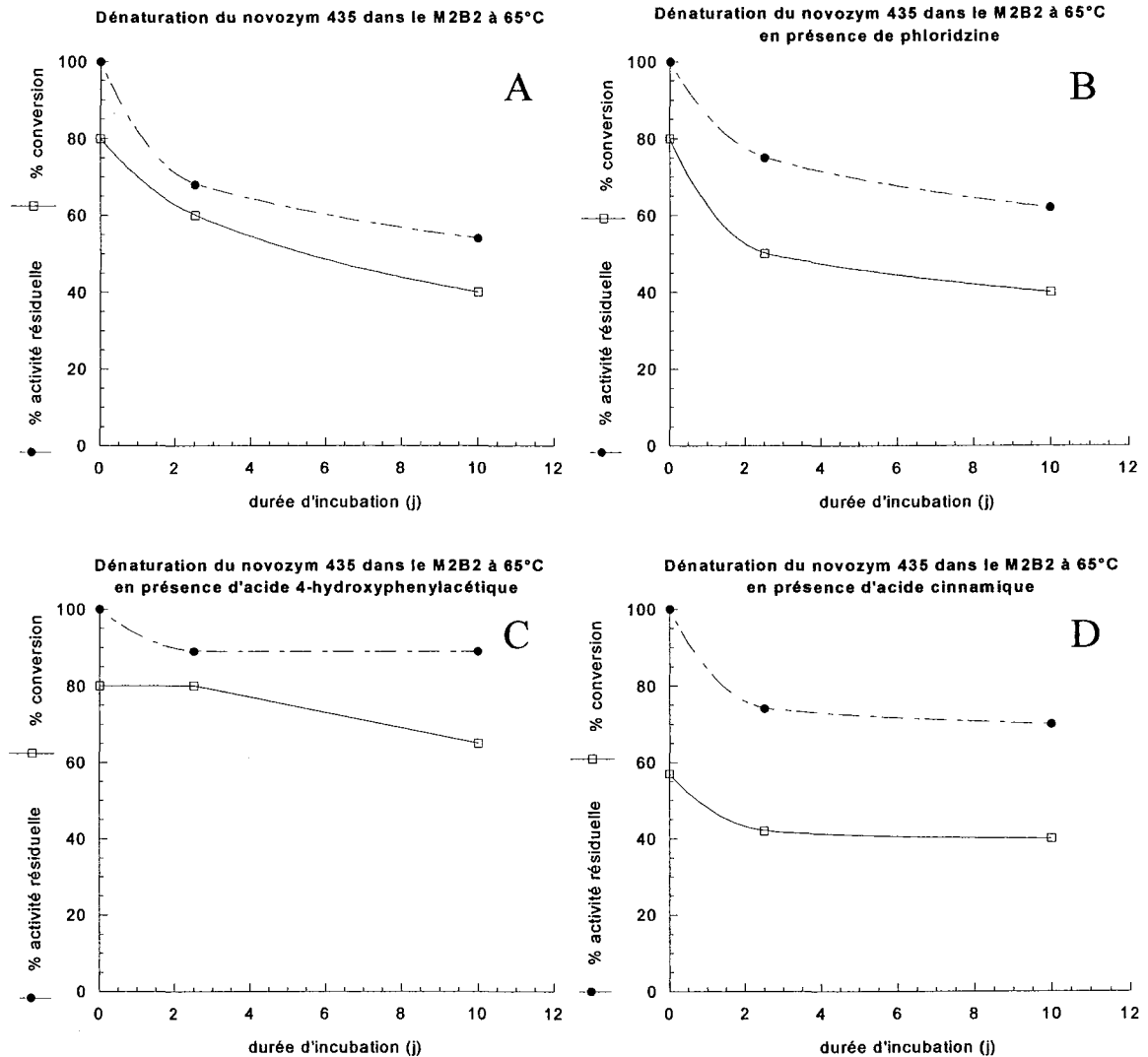


figure 72 : stabilité du Novozym 435® dans le M₂B₂ à 65°C, 180 mbar.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, donneur d'acyle 250 μmol, biphenyl-4,4'-diol 80 μmol, M₂B₂ 5 ml, Novozym 435® 20 g.l⁻¹, réacteur Syncore Polyvap, agitation : 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

A : incubation en absence de substrat, **B :** incubation en présence de phloridzine (50 μmol), **C :** incubation en présence d'acide 4-hydroxyphénylacétique (250 μmol), **D :** incubation en présence d'acide cinnamique (250 μmol).

Le Novozym 435® perd 40% de son activité en 10 jours d'incubation dans le M₂B₂ pur (figure 72A). La présence de l'accepteur d'acyle (la phloridzine) ne renforce pas la stabilité de l'enzyme (figure 72B). Par contre, cette perte d'activité est moindre lorsque le catalyseur est incubé en présence de donneur d'acyle. En effet, il ne perd que 15% de son activité en présence de l'acide 4-hydroxyphénylacétique (figure 72C) et 25% en présence d'acide cinnamique (figure 72D).

L'effet protecteur des donneurs d'acyle est peut-être dû à la formation du complexe tétraédrique entre l'enzyme et le donneur d'acyle.

C'est l'hypothèse qui a été émise par Lozano *et al.*, 1994 qui ont également constaté une forte stabilisation de l' α -chymotrypsine en présence d'un donneur d'acyle. Ils ont expliqué ce résultat par une forte rigidification de la structure protéique due aux interactions enzyme / substrat. La lipase B de *Candida antarctica* étant, comme l' α -chymotrypsine, une sérine-hydrolase, on peut penser que l'effet protecteur du donneur d'acyle est de même nature pour ces deux enzymes.

Cependant, cet effet est moins prononcé pour le Novozym 435®, la structure protéique de la lipase étant déjà stabilisée par son immobilisation (Arroyo *et al.*, 1999).

Donc, en présence du donneur d'acyle, le Novozym 435® ne perd que 15 à 25% de son activité après 10 jours d'incubation à 65°C dans le M₂B₂. Si la perte d'activité en stockage (observée ici) est proche de celle ayant lieu en fonctionnement, il n'y a que peu de conséquences pour des réactions courtes. Mais les synthèses de flavonoïdes acylés étant longues, le recyclage de l'enzyme semble compromis dans ces conditions réactionnelles.

III.2. Influence du donneur d'acyle

Tous les donneurs d'acyles dont l'estérification par le butan-1-ol a été menée avec succès n'ont pu être employés pour l'acylation des flavonoïdes. Nous avons choisi de porter notre attention uniquement sur les donneurs d'acyles présentés tableau 35 :

tableau 35 : donneurs d'acyles testés pour la réaction d'acylation de la phloridzine.

Donneurs d'acyle	Antioxydant	Ecran UV	Antibactérien
acide benzoïque			+
acide cinnamique		+	
acide 4-hydroxyphénylacétique	+		
acide 4-hydroxyphénylpropionique	+		
acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	+++		
acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique	+++		
acide 3,4-dihydroxycinnamique (caféique)	+++	+	
acide 2-hydroxybenzoïque (salicylique)	+	+	+
acide 3,4-diméthoxycinnamique		+	

Tous ces donneurs d'acyles sont susceptibles d'apporter au moins une propriété intéressante au flavonoïde. Leur intérêt réside aussi au niveau de la compréhension des mécanismes de l'acylation par la lipase B de *Candida antarctica*.

Les réactions d'estérification directe ont été mises en œuvre dans le Syncore Polyvap, à 65°C, 180 mbar. 50 µmol de phloridzine, 250 µmol de donneur d'acyle sous forme acide et 80 µmol de biphenyl-4,4'-diol sont introduits dans 5 ml de M₂B₂ préalablement séché sur tamis moléculaire 4 Å. La réaction est initiée par l'addition de 100 mg de Novozym 435®. Le suivi cinétique des réactions est réalisé par l'analyse CLHP des prélèvements effectués au cours du temps pendant 200 h.

Une partie des produits synthétisés ici n'ayant pu être purifiés, les rendements de conversion seront donc estimés par rapport à la disparition du substrat.

Les résultats analytiques obtenus par CLHP sont présentés tableau 36 et les résultats cinétiques sont rassemblés tableau 37.

tableau 36 : esters aromatiques de phloridzine synthétisés par le Novozym 435®

Produits	Gradient CLHP (chapitre 2, § IV.1)	tr (s)
benzoate de phloridzine	A	795
cinnamate de phloridzine	A	980
4-hydroxyphénylacétate de phloridzine	B	1090
4-hydroxyphénylpropionate de phloridzine	B	1220
3,4-dihydroxyphénylacétate de phloridzine	B	1040
3,4-dihydroxyphénylpropionate de phloridzine	B	1120

tableau 37 : données cinétiques des réactions d'acylation de la phloridzine par différents donneurs d'acyles en milieu solvant.

Donneurs d'acyle	Vitesse initiale	Temps nécessaire à atteindre l'équilibre	Rendement après 200 h de réaction
acide benzoïque	0,3 µmol.h ⁻¹	>200 h	50%
acide 2-hydroxybenzoïque (salicylique)		Pas de réaction	
acide cinnamique	0,4 µmol.h ⁻¹	>200 h	65%
acide 4-hydroxyphénylacétique	0,8 µmol.h ⁻¹	100 h	80%
acide 4-hydroxyphénylpropionique	0,7 µmol.h ⁻¹	100 h	80%
acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	0,1 µmol.h ⁻¹	>200 h	30%
acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique	0,1 µmol.h ⁻¹	>200 h	20%
acide 3,4-dihydroxycinnamique (caféique)		Pas de réaction	
acide 3,4-diméthoxycinnamique		Pas de réaction	

Conditions expérimentales : Novozym 435® 20 g.l⁻¹, phloridzine 50 µmol, donneur d'acyle 250 µmol, biphenyl-4,4'-diol 80 µmol, M₂B₂ 5 ml, réacteur Syncore Polyvap, agitation 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

La réaction de synthèse du benzoate de phloridzine n'atteint pas l'équilibre en 200 h. Seulement 50% de la phloridzine mise en jeu sont convertis en benzoate (tableau 37). Cette synthèse est légèrement plus lente que celle du cinnamate de phloridzine qui atteint 65% en 200 h. Ces résultats confirment l'observation faite sur les synthèses du benzoate et du

cinnamate de butyle (chapitre 3, § I.1) à savoir que le Novozym 435® catalyse l'estérification de l'acide benzoïque plus lentement que celle de l'acide cinnamique.

☞ Avec l'acide 4-hydroxyphénylacétique et l'acide 4-hydroxyphénylpropionique, l'équilibre de la réaction est atteint après environ 100 h. La phloridzine est convertie à 80% en 4-hydroxyphénylacétate et 4-hydroxyphénylpropionate de phloridzine (tableau 37). Une fois encore les vitesses initiales d'acylation de la phloridzine confirment les résultats obtenus pour la synthèse du 4-hydroxyphénylacétate et du 4-hydroxyphénylpropionate de butyle (chapitre 3, § I.2.1) à savoir que la catalyse par le Novozym 435® est légèrement plus rapide pour l'acide 4-hydroxyphénylacétique.

☞ Les réactions avec l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique sont lentes, l'équilibre n'étant pas encore atteint après 200 h. La phloridzine est convertie à 30% en 3,4-dihydroxyphénylacétate et à 20% en 3,4-dihydroxyphénylpropionate de phloridzine (tableau 37). Là encore, comme pour l'acylation du butanol, l'acylation de la phloridzine est légèrement plus rapide avec l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique.

A côté des 2 produits principaux (3,4-dihydroxyphénylacétate de phloridzine et 3,4-dihydroxyphénylpropionate de phloridzine), le chromatogramme CLHP révèle aussi l'apparition de 2 produits supplémentaires. Un test de stabilité de ces deux donneurs d'acyle est réalisé dans le M_2B_2 à 80°C, dans un tube fermé pendant 10 jours. L'analyse du milieu montre alors la présence des mêmes molécules indésirables provenant de la dégradation thermique des donneurs d'acyle (probablement par des mécanismes oxydatifs). Par contre, il semblerait que les esters soient plus stables mais cette hypothèse devra être vérifiée par un test de stabilité des produits purifiés.

☞ L'acide caféique (3,4-dihydroxycinnamique), l'acide salicylique et l'acide 3,4-diméthoxycinnamique ont été testés pour vérifier les résultats du criblage en milieu butan-1-ol. Nous avons eu confirmation que ces donneurs d'acyles ne sont pas de bons substrats pour la CALB puisqu'aucun produit d'estérification n'a été observé après 200 h de réaction.

On note que l'acide salicylique et l'acide 3,4-diméthoxycinnamique donnent lieu à de très faibles rendements d'acylation du butan-1-ol mais qu'aucun produit n'est formé avec la phloridzine. Il est possible que l'encombrement stérique de la phloridzine, conjugué à la faible réactivité de ces deux donneurs d'acyles soient responsables de ces échecs.

En conclusion, le Novozym 435® ne permet pas, dans les conditions expérimentales imposées par le Syncore Polyvap, d'acyler la phloridzine avec les acides de la série cinnamique ou benzoïque porteur d'un groupement hydroxyle. On peut néanmoins obtenir des esters de phloridzine avec un pouvoir antioxydant renforcé grâce à la fonction catéchol du 3,4-dihydroxyphénylacétate et du 3,4 dihydroxyphénylpropionate. Il est cependant nécessaire d'optimiser les conditions réactionnelles afin d'obtenir ces produits dans un temps raisonnable. Une augmentation de température (à 80°C) devrait raccourcir les temps réactionnels mais aussi améliorer les rendements en permettant une meilleure élimination des coproduits (chapitre 3, § II.3). Malheureusement, l'augmentation de température favorisera aussi la dégradation oxydative des donneurs d'acyles.

III.3. Influence de la structure du flavonoïde

La synthèse d'esters en milieu M_2B_2 est étendue à d'autres flavonoïdes glycosylés qui diffèrent par leurs noyaux, leur partie glycosidique et/ ou par la position de la partie glycosidique sur le noyau. Le donneur d'acyle choisi pour cette étude comparative est le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour les études précédentes (Chapitre 3, § II.2 et II.3).

Les structures des flavonoïdes étudiés sont reportées figure 73. Les réactivités des trois flavonoïdes monoglucosylés suivants seront tout d'abord comparées : la phloridzine (dihydrochalcone glucosylée en position 2), l'isoquercitrine (flavonol glucosylé en position 3) et la lutéoline-7-glucoside (L7G, flavone glucosylée en position 7). Ces trois flavonoïdes possèdent un hydroxyle primaire libre sur le carbone 6 du résidu glucose. Puis l'acylation sera tentée sur des flavonoïdes diglycosylés (néohespéridinose) : la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) et la naringine. Ces flavonoïdes possèdent aussi un hydroxyle primaire sur le carbone 6 du glucose mais il est possible qu'il soit moins accessible du fait de la présence d'un résidu rhamnose lié sur le carbone 2 du glucose. Enfin, la réaction sera effectuée avec l'hespéridine (flavanone), la diosmine (flavone), le peltatoside (flavonol) et la rutine (flavonol) tous dépourvus d'hydroxyle primaire libre.

Les rendements de conversion seront estimés par la mesure de la disparition du substrat.

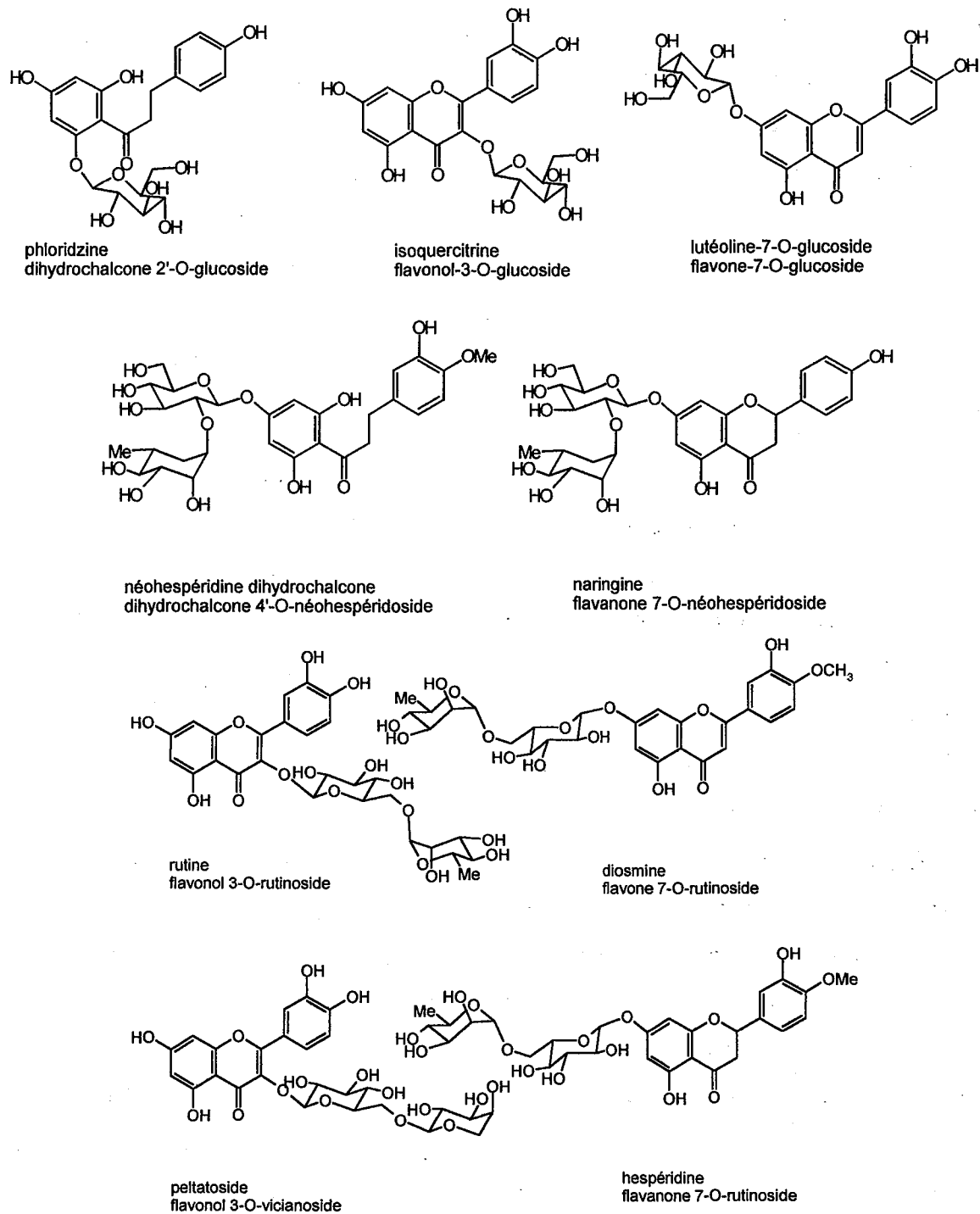


figure 73 : structures chimiques des différents flavonoïdes utilisés au cours de cette étude.

III.3.1. Synthèse d'esters de flavonoïdes glucosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire

La phloridzine et l'isoquercitrine sont solubles dans le M₂B₂ à la concentration de 10 mM, alors que la lutéoline-7-glucoside (L7G) n'est pas entièrement solubilisée.

La réaction avec l'isoquercitrine donne lieu à l'apparition d'un produit unique caractérisé par un tr de 700 s (gradient B). La cinétique de la réaction d'acylation de l'isoquercitrine est similaire à celle de la phloridzine. L'équilibre est atteint après 100 h, temps au bout duquel 95% du flavonoïde est acylé (figure 74).

En ce qui concerne la lutéoline-7-glucoside, les premiers prélèvements ne permettent pas de déterminer la quantité de substrat réellement présente dans le milieu puisque la L7G n'est pas entièrement soluble et que le milieu n'est pas homogène (figure 74). Cependant, les analyses CLHP (gradient B) montrent l'apparition d'un produit, (tr : 950 s). Au bout de 100 h de réaction le milieu est devenu limpide suggérant que la L7G non consommée s'est totalement solubilisée et que le produit apparu est lui aussi soluble dans le milieu. Il semble qu'après 200 h de réaction, l'équilibre soit atteint avec une conversion de 95% de la L7G initialement introduite.

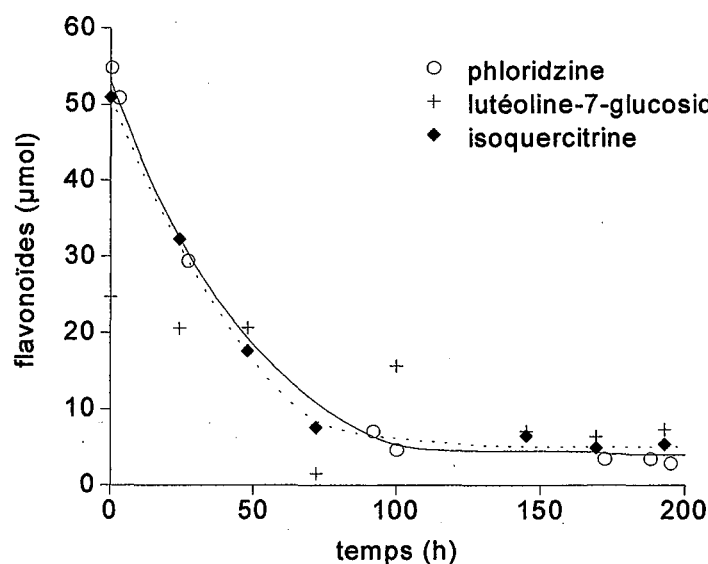


figure 74 : cinétique d'acylation des flavonoïdes monoglycosylés par le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle.

Conditions expérimentales : Novozym 435® 20 g.l⁻¹, flavonoïde 50 μmol, 4-hydroxyphénylacétate de méthyle 500 μmol, biphenyl-4,4'-diol 80 μmol, M₂B₂ 5 ml, réacteur Syncore Polyvap, agitation 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

Les produits d'acylation de la L7G et de l'isoquercitrine par le 4-hydroxyphénylacétate n'ont pas été isolés. Mais, comme nous l'avons vu précédemment pour la phloridzine, la CALB acyle préférentiellement les hydroxyles primaires. Les produits formés sont donc certainement le 6''-O-(4-hydroxyphénylacétate) d'isoquercitrine et le 6''-O-(4-hydroxyphénylacétate) de lutéoline-7-glucoside.

III.3.2. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire

La naringine et la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) sont solubles à la concentration de 10 mM dans le M_2B_2 .

L'acylation de la naringine et de la NHDC par le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle donne lieu pour chacun d'eux à l'apparition d'un produit unique dont les t_r sont respectivement 1045 s et 1245 s (gradient B). Les cinétiques de ces deux réactions sont pratiquement identiques et l'équilibre est atteint après 200 h, avec 95% de flavonoïde acylé. L'enzyme ne fait pas de différence entre une flavanone et une dihydrochalcone.

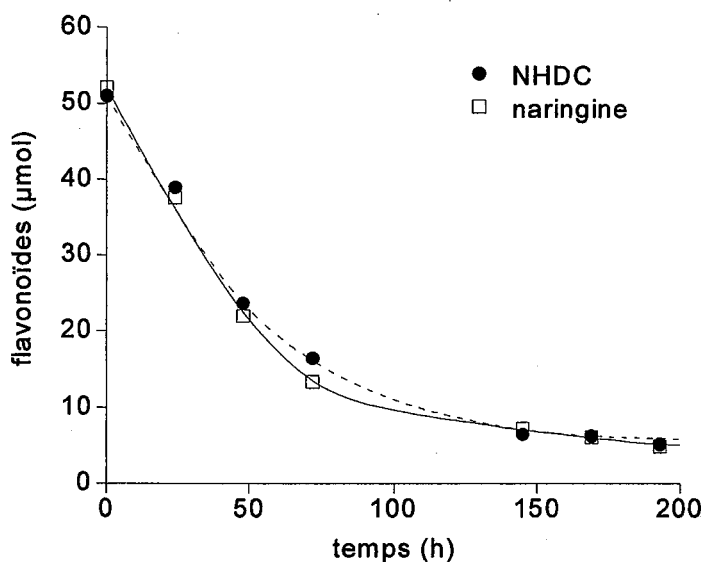


figure 75 : cinétique d'acylation de la naringine et de la NHDC par le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle.

Conditions expérimentales : Novozym 435® 20 g.l⁻¹, flavonoïde 50 µmol, 4-hydroxyphénylacétate de méthyle 500 µmol, biphenyl-4,4'-diol 80 µmol, M_2B_2 5 ml, réacteur Syncore Polyvap, agitation 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

Kontogianni *et al.*, 2001 ainsi que Gao *et al.*, 2001 ont déterminé la structure des produits formés respectivement entre la naringine et l'acide décanoïque et la naringine et le cinnamate de vinyle lors des réactions catalysées par la CALB. Dans ces deux cas, l'acylation a lieu sur l'hydroxyle primaire. Il est donc très probable que les esters que nous obtenons soient le 6''-O-(4-hydroxyphénylacétate) de naringine et le 6''-O-(4-hydroxyphénylacétate) de néohespéridine dihydrochalcone.

L'acylation des flavonoïdes néohespéridinosylés a lieu à une vitesse de $0,65 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$, inférieure à celle des flavonoïdes glucosylés ($V_i = 0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$). Il est donc possible que la présence du rhamnose en position 2'' du glucose, groupement de taille importante, gêne le positionnement optimal du flavonoïde au sein du site actif pour l'attaque nucléophile du complexe acyle / enzyme.

III.3.3. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés, dépourvus d'hydroxyle primaire

Parmi les flavonoïdes testés (hespéridine, diosmine, rutine, peltatoside), seuls la rutine et le peltatoside sont entièrement solubles dans le M_2B_2 à la concentration de 10 mM.

En ce qui concerne l'hespéridine et la diosmine, aucune réaction n'est observée. Deux hypothèses peuvent expliquer le manque de réactivité de ces flavonoïdes : l'absence d'hydroxyle primaire sur ces flavonoïdes et leurs très faibles solubilités dans le milieu réactionnel. Par exemple la solubilité de l'hespéridine n'excède pas $0,22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (0,8 mM) soit moins d'un dixième du substrat introduit. Ces flavonoïdes sont également peu solubles dans le méthanol et l'analyse des milieux réactionnels a nécessité l'ajout de DMSO (chapitre 2, § IV.1.3) pour permettre leur solubilisation.

Les deux autres flavonoïdes (rutine et peltatoside) sont solubles, néanmoins, seule la rutine donne lieu à l'apparition d'un produit avec un rendement faible (20% en 200h), l'équilibre n'étant apparemment pas atteint.

Ce résultat n'est pas surprenant étant donné la sélectivité de l'enzyme pour les alcools primaires. Cependant, d'autres auteurs ont eu plus de succès pour l'acylation de la rutine par la CALB : Kontogianni *et al.*, 2001 ont synthétisé des dérivés 3''-O-acyle de rutine (24% de conversion) en utilisant comme donneur d'acyle l'acide octanoïque, l'acide décanoïque et l'acide dodécanoïque. Nakajima *et al.*, 1999b ont acylé la rutine avec le cinnamate de vinyle et Danieli *et al.*, 1997 ont produit le 3''-4''-O-diacétate de rutine avec l'acétate de vinyle

comme donneur d'acyle (91% de conversion en 45 h). Ces études nous mènent à penser que la position acylée sur la rutine est l'hydroxyle en 3'' sur le résidu glucosyle.

III.3.4. Conclusion

Dans les conditions expérimentales imposées par l'utilisation du Syncore Polyvap, tous les flavonoïdes porteurs d'une fonction hydroxyle primaire ont pu être acylés par le 4-hydroxyphénylacétate de méthyle avec de bons rendements de conversion (environ 95%).

La réaction avec la L7G, peu soluble dans le milieu réactionnel (tableau 38) prend plus de temps pour atteindre l'équilibre suggérant que la cinétique réactionnelle est gouvernée par la dissolution du flavonoïde dans le milieu.

tableau 38 : synthèse de 4-hydroxyphénylacétates de flavonoïdes à 65°C, 180 mbar.

Flavonoïdes	Solubilité dans le M ₂ B ₂ (65°C)	Vitesse initiale (μmol.h ⁻¹)	Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre
Phloridzine	> 10 mM*	0,9	100 h (95%)
Isoquercitrine	> 10 mM*	0,9	100 h (95%)
Lutéoline-7-glucoside	5,6 mM	non déterminée	200 h (95%)
Naringine	> 10 mM*	0,65	200 h (95%)
Néohespéridine dihydrochalcone	> 10 mM*	0,65	200 h (95%)
Rutine	100 mM	non déterminée	> 200 h (20%)
Hespéridine	< 1mM	pas de réaction	
Diosmine	<10 mM*	pas de réaction	
Peltatoside	<10 mM*	pas de réaction	

Conditions expérimentales des synthèses : flavonoïde 50 μmol, 4-hydroxyphénylacétate de méthyle 500 μmol, Novozym 435® 100 mg, biphenyl-4,4'-diol 80 μmol, M₂B₂ 5 ml, réacteur Syncore Polyvap, agitation 260 rpm, 65°C, 180 mbar.

Conditions expérimentales des déterminations de solubilité : chapitre 2, § IV.2. * : solubilité appréciée de façon visuelle.

Par ailleurs, les mêmes vitesses initiales de conversion sont observées pour deux flavonoïdes glucosylés de structures très différentes (la phloridzine de la famille des dihydrochalcones et l'isoquercitrine de la famille des flavonols) ainsi que pour deux flavonoïdes porteurs d'un néohespéridose (la naringine et la NHDC). Il semble donc que la vitesse de réaction dépende uniquement de la nature du résidu glycosidique et non pas de la structure du noyau en C₁₅ ou de la position sur laquelle est fixé le résidu glycosidique.

Enfin, parmi les flavonoïdes dépourvus d'hydroxyle primaire, seule l'acylation de la rutine a été possible avec un rendement faible (20% en 200 h). L'étude de l'acylation de ces flavonoïdes pourrait être poursuivie dans des conditions expérimentales plus favorables (température plus élevée, solvant différent) augmentant leur faible solubilité (tableau 38).

Les rendements obtenus dans ces conditions réactionnelles sont satisfaisants. Cependant, les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre sont extrêmement longs (au mieux 95% de conversion sont obtenus en 100 h) et n'offrent donc qu'une faible amélioration par rapport aux synthèses évoquées dans la littérature (Nakajima *et al.*, 1999b obtiennent plus de 70% de rendement de purification après 7 jours de réaction). Comme il avait été précisé, l'utilisation du réacteur Syncore Polyvap impose des conditions opératoires non optimales mais a permis de multiplier les essais.

IV. Synthèse d'esters de flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle »

Les milieux fondus ou milieux sans solvant sont des milieux initialement composés des réactifs et du catalyseur uniquement. Les milieux « donneur d'acyle » utilisés au début de notre étude pour la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine sont de ce type : bien que l'isoquercitrine ne soit que faiblement soluble dans le cinnamate d'éthyle, l'alcoololyse a lieu, le rôle du solvant étant joué par le donneur d'acyle.

La synthèse du produit modèle : cinnamate de phloridzine est d'abord étudiée pour déterminer les conditions optimales des synthèses en milieu « donneur d'acyle ». Puis nous étudierons, dans les mêmes conditions, l'acylation de la phloridzine par d'autres donneurs d'acyle. Enfin, nous comparerons la réactivité d'autres flavonoïdes dans le cinnamate d'éthyle.

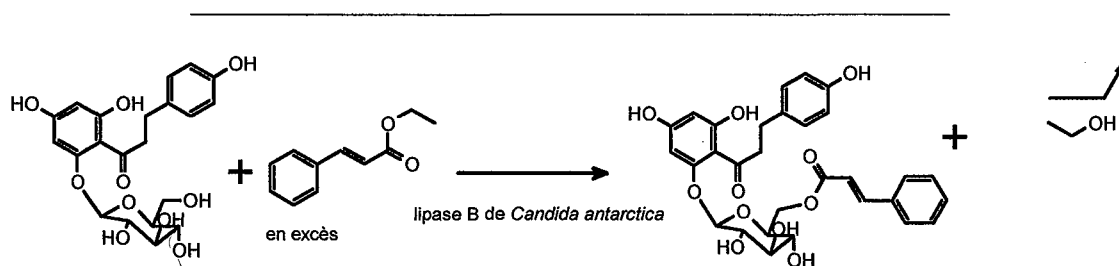


figure 76 : schéma réactionnel de la synthèse du cinnamate de phloridzine.

IV.1. Influence des conditions opératoires

IV.1.1. Etude de la synthèse du cinnamate de phloridzine

Ces réactions ont été effectuées dans 4 ballons d'évaporation (25 ml) fixés sur un évaporateur rotatif grâce au dispositif « 4 pis » de façon à pouvoir mener quatre réactions en parallèle.

La synthèse du cinnamate de phloridzine est effectuée à 80°C, sous 200 mbar et avec une rotation de 40 rpm. Le milieu réactionnel est composé de 50 µmol de phloridzine (10 mM) et de 5 ml de cinnamate d'éthyle (rapport molaire donneur/accepteur d'acyle : 595/1). Après incubation pendant 16 h, l'analyse CLHP (gradient A) ne révèle alors aucune évolution

du milieu réactionnel : ni dégradation des substrats, ni estérification spontanée. Dans ces conditions, la phloridzine est totalement solubilisée après 1 h d'agitation.

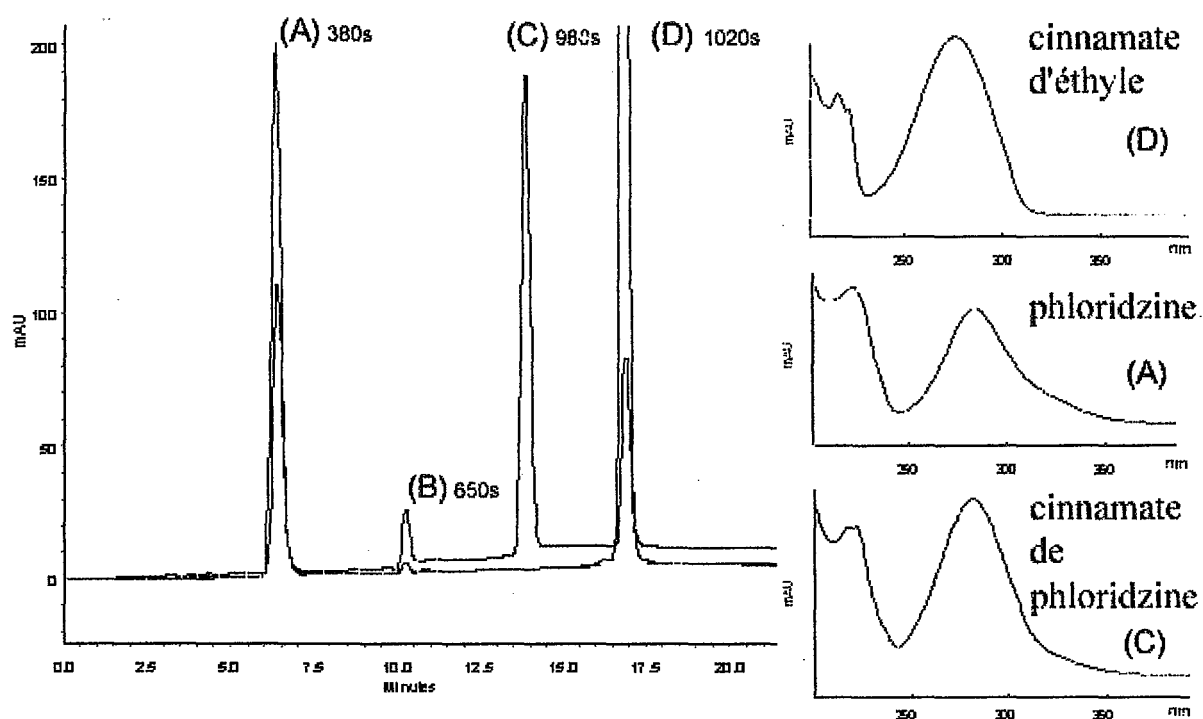


figure 77 : chromatogrammes d'un milieu de synthèse du cinnamate de phloridzine.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μ mol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 75 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

A droite sont présentés les spectres UV des substrats et du produit. Gradient analytique : gradient A. mAU : unité arbitraire.

Avant l'ajout d'enzyme (rouge), après 1 h de réaction (bleu).

La réaction d'estérification (figure 76) est alors initiée par l'addition de 75 mg (15 g l^{-1}) de Novozym 435® préalablement séché sur P_2O_5 . Les analyses CLHP au cours du temps (figure 77) montrent, en plus des pics correspondants à la phloridzine (A) et au cinnamate d'éthyle (D), la production d'acide cinnamique (B), identifié grâce à son spectre UV et au témoin commercial. Le dernier pic (C) (tr : 980 s) d'une polarité intermédiaire entre le cinnamate d'éthyle et la phloridzine, correspond à la phloridzine-6''-O-cinnamate (figure 76 et chapitre 3, § III.1.1.1). Les concentrations en substrats et en produits sont déterminées à l'aide de gammes d'étalonnage.

La cinétique réactionnelle représentée sur la figure 78, montre que la phloridzine disparaît entièrement du milieu réactionnel après 12 h. La formation concomitante du

cinnamate de phloridzine permet d'affirmer que la totalité de la phloridzine est acylée en moins de 12 h.

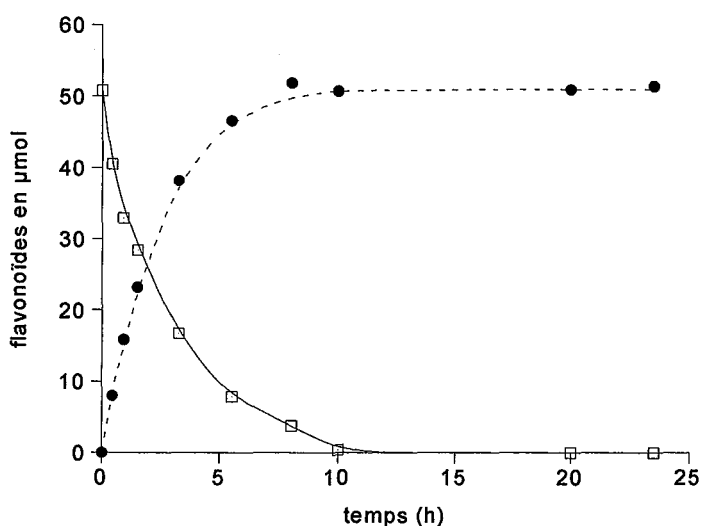


figure 78 : réaction de synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle ».

Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 75 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

□ : phloridzine, ● : cinnamate de phloridzine.

IV.1.2. Effet de la température

L'augmentation de la température doit permettre d'augmenter à la fois la solubilité des substrats et la vitesse de la réaction. Cependant, des températures élevées peuvent dégrader à la fois l'enzyme, les substrats et les produits. C'est pourquoi, l'effet de la température sur le déroulement de la synthèse a été étudié entre 60 et 100°C, dans les conditions précédentes à l'exception de la quantité d'enzyme fixée à 20 g.l⁻¹ de Novozym 435®.

La phloridzine étant soluble dans ces conditions, la température n'influence ici que l'activité enzymatique et la viscosité du milieu. Comme attendu, la vitesse de conversion du flavonoïde augmente avec la température (figure 79).

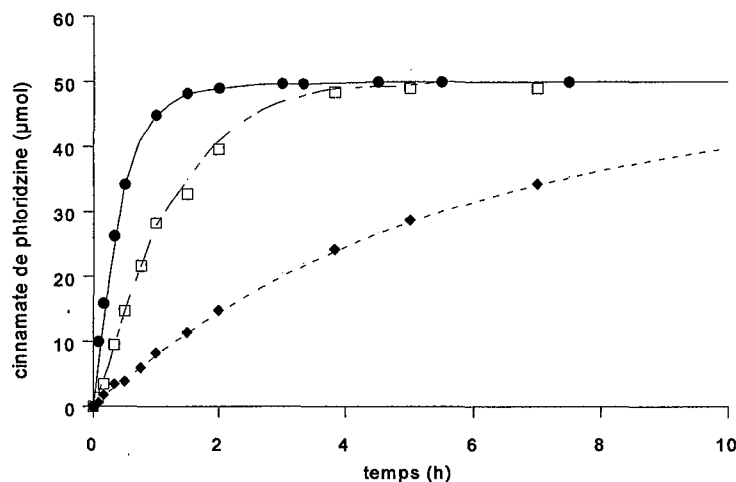


figure 79 : influence de la température sur la synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle ».

Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 75 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 200 mbar.

(◆) 60°C, (□) 80°C, (●) 100°C

Coulon, 1997 et Humeau, 1998 ont étudié respectivement, les synthèses de l'oléate de fructose et du palmitate d'ascorbyle catalysées par le Novozym 435® dans le M_2B_2 comme solvant. Ces auteurs ont observé qu'au delà de 65°C, la vitesse n'augmente plus exponentiellement (cas de l'oléate de fructose), ou diminue (cas du palmitate d'ascorbyle), suggérant une dénaturation thermique. En ce qui concerne l'acylation de la phloridzine dans le cinnamate d'éthyle, la vitesse initiale augmente entre 60 et 100°C (tableau 39).

tableau 39 : influence de la température sur la synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle » sous 200 mbar.

Température (°C)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$)	Temps nécessaire à atteindre l'équilibre (h)
60	11	15
80	39	5
100	82	2

Conditions expérimentales : 50 µmol phloridzine, 5 ml cinnamate d'éthyle et 20 g.l⁻¹ Novozym 435®, 60 à 100°C, sous 200 mbar.

L'équation d'Arrhénius (équation 6) donne l'expression de la vitesse initiale de l'acylation de la phloridzine dans le cinnamate d'éthyle en fonction de la température.

$$\text{équation 6 : } Vi = k \times e^{-\frac{Ea}{RT}}$$

$$\text{équation 7 : } \ln Vi = \ln k - \frac{1}{RT} \times Ea$$

La représentation d'Arrhénius (équation 7, figure 80) permet de déterminer l'énergie d'activation de la réaction. Cette énergie (50 kJ.mol^{-1}) est inférieure à celle requise pour la synthèse du butyrate de géranol (62 kJ.mol^{-1}) en milieu sans solvant, catalysée par le Novozym 435® (Oguntimein *et al.*, 1995) ; elle est supérieure à celle requise pour la synthèse de l'oléate de butyle (10 kJ.mol^{-1}) en milieu sans solvant catalysée par la lipase de *Mucor miehei* (Habulin & Knez, 1993).

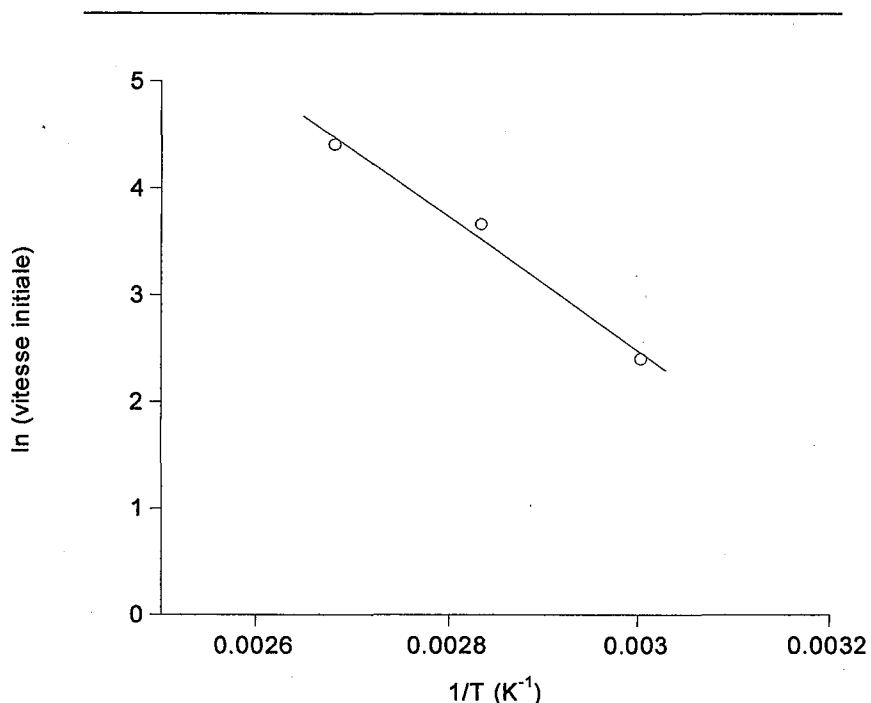


figure 80 : représentation d'Arrhénius associée à la synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle ».
 Conditions expérimentales : phloridzine $50 \mu\text{mol}$, cinnamate d'éthyle 5 ml , Novozym 435® 75 mg , réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm , 200 mbar .

D'après les travaux de Turner & Vulfson, 2000, c'est la faible hydratation du milieu réactionnel qui permet à la préparation enzymatique d'être encore très active à des températures supérieures à 100°C . Ces auteurs ont montré que le Novozym 435® est actif jusqu'à 130°C pendant la réaction de transestérification entre le stéarate de palmityle et l'octadécanol (après séchage des solvants, substrats et enzyme pendant un mois sur CuSO_4) et qu'il y a une perte drastique de l'activité à 140°C .

On note que la phloridzine et le cinnamate de phloridzine sont stables à 100°C dans le cinnamate d'éthyle sous 200 mbar . Aucun produit de dégradation n'a pu être observé par l'analyse CLHP après 5 jours d'incubation dans ces conditions.

IV.1.3. Effet de la quantité d'enzyme

La vitesse de réaction est un facteur important pour l'optimisation d'un système réactionnel. En effet, un temps de réaction court est toujours préférable pour éviter la formation de produits secondaires et l'inactivation de la préparation enzymatique.

Nous avons déterminé la quantité optimale d'enzyme nécessaire à la synthèse du cinnamate de phloridzine dans les conditions décrites précédemment. La synthèse est initiée par l'addition de 25 à 300 mg de Novozym 435® soit 5 à 60 g.l⁻¹.

Sur la figure 81 sont reportés les vitesses initiales des réactions et les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre, soit 100% de conversion, en fonction de la concentration en Novozym 435®.

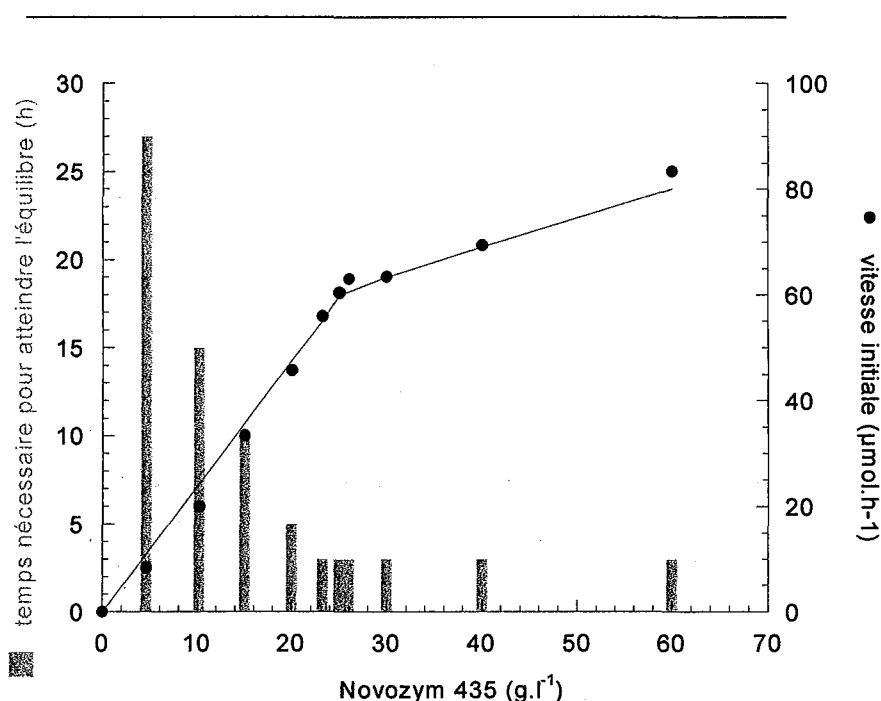


figure 81 : effet de la quantité de Novozym 435® sur la synthèse du cinnamate de phloridzine.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 25 à 300 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Comme attendu, la quantité de catalyseur mise en jeu n'influence pas l'état d'équilibre de la réaction mais joue sur le temps nécessaire pour atteindre cet équilibre. Quelle que soit la concentration du catalyseur dans le milieu, la conversion du flavonoïde est totale en moins de 25 h (figure 81). Lorsque la concentration en Novozym 435® est supérieure à 25 g.l⁻¹, le

temps nécessaire pour atteindre l'équilibre ne diminue plus et la conversion du flavonoïde est totale en 3 h.

Il semble que la vitesse de production du cinnamate de phloridzine soit proportionnelle à la concentration en enzyme entre 0 et 25 g.l⁻¹ de Novozym 435®, puis après le point d'inflexion à 30 g.l⁻¹, la vitesse de la réaction augmente moins.

Comme pour l'étude en milieu solvant, nous avons choisi une concentration en Novozym 435® de 20 g.l⁻¹ pour la suite de notre étude.

IV.1.4. Etude de la stabilité du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle à 80°C

A ce stade de l'étude, nous avons jugé nécessaire de vérifier la stabilité de l'enzyme dans le cinnamate d'éthyle. En effet, la stabilité du catalyseur est un paramètre important à considérer pour envisager un procédé industriel continu ou à forte concentration en substrat.

Bien que le Novozym 435® soit très performant à 100°C, nous avons choisi de travailler à 80°C pour limiter les dégradations de l'enzyme mais aussi des substrats. En effet, notre but est d'étendre la réaction à d'autres flavonoïdes qui peuvent se révéler moins thermostables que la phloridzine.

Les essais de stabilité ont donc été réalisés à 80°C, sous une pression de 200 mbar en incubant le Novozym 435® dans 4 ml de cinnamate d'éthyle pendant des temps variables allant de 0 à 20 jours. Puis la réaction est initiée par l'ajout d'1 ml d'une solution de phloridzine à 50 mM, portant le volume réactionnel à 5 ml et la concentration en phloridzine à 10 mM : conditions identiques aux essais réalisés précédemment.

La figure 82 montre le déroulement des synthèses de cinnamate de phloridzine après incubation du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle à 80°C. On observe que rapidement le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre s'allonge. Cependant, la conversion du flavonoïde est totale en 15 h quelle que soit la durée d'incubation inférieure ou égale à 6 jours.

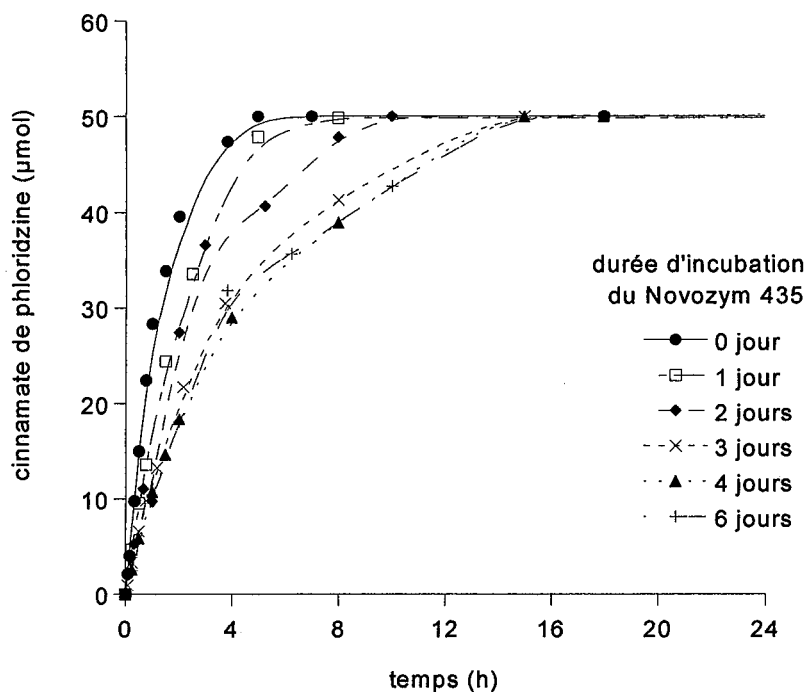


figure 82 : réactions de synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle » après incubation du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar. Le Novozym 435® est incubé entre 0 et 6 jours à 80°C, 200 mbar dans le cinnamate d'éthyle.

La diminution de la vitesse initiale de la réaction d'acylation en fonction de la durée d'incubation de l'enzyme montre la perte d'activité du Novozym 435® (figure 83). On note que 50% de l'activité sont perdus après 2 jours d'incubation et seulement 5 % sont maintenus après 20 jours.

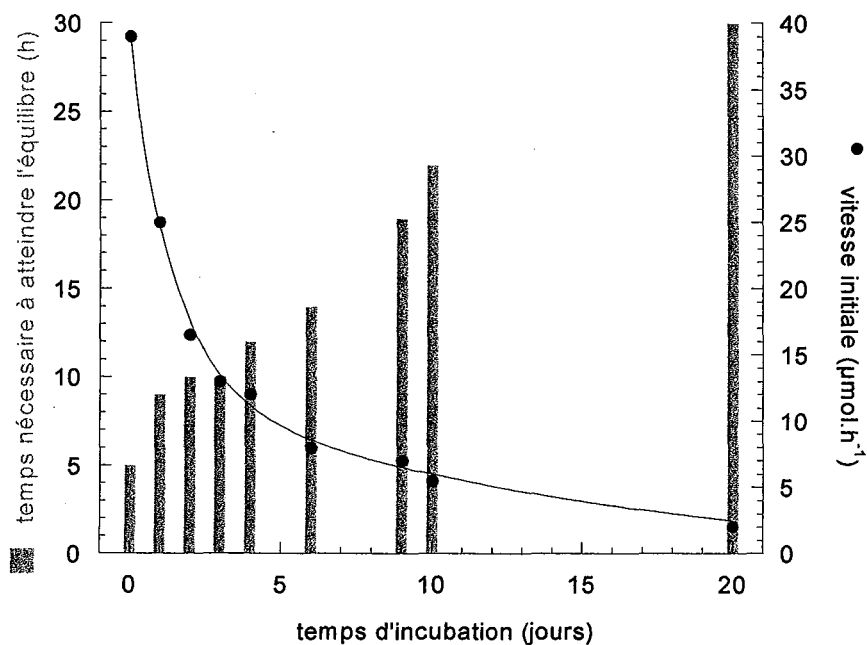


figure 83 : stabilité du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle.
 Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar. Le Novozym 435® est incubé entre 0 et 20 jours à 80°C, 200 mbar dans le cinnamate d'éthyle.

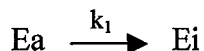
Pour la synthèse du cinnamate de phloridzine à partir de faibles concentrations en substrat (10 mM), cette perte rapide d'activité n'a pas de conséquences importantes puisque la synthèse est complète en 5 h. Cependant, pour synthétiser le cinnamate de phloridzine en quantité importante, la perte d'activité enzymatique devra être prise en compte, surtout si on a affaire à une réaction lente. Ainsi, la mise en œuvre d'une synthèse de flavonoïdes acylés en réacteur continu, nécessiterait d'augmenter progressivement le temps de séjour pour compenser la perte d'activité enzymatique.

Arroyo *et al.*, 1999 ont étudié la stabilité du Novozym 435® à 50°C en milieu aqueux par mesure de l'activité hydrolytique sur la triacétine. La cinétique de déstabilisation est beaucoup plus rapide que dans le cas présent : 50% de perte d'activité en 14 h. La meilleure stabilité que nous observons en milieu « donneur d'acyle » s'explique principalement par la présence du minimum d'eau nécessaire à l'activité enzymatique.

Dans les conditions utilisées par Arroyo *et al.*, 1999, le Novozym 435® et la forme libre de la lipase B de *Candida antarctica*, subissent une cinétique de désactivation d'ordre 1. Cette observation est expliquée par le mode d'immobilisation. En effet, le Novozym 435® est

constitué d'enzyme adsorbée en surface du support. Il est donc assez proche des enzymes libres, c'est-à-dire, exposé au milieu réactionnel.

Le schéma de désactivation d'ordre 1 est le suivant



Où Ea est l'activité spécifique de l'enzyme native, k_1 est la vitesse de désactivation de Ea et l'activité spécifique Ei est nulle. La vitesse de disparition de l'enzyme active est donnée par :

$$\text{équation 8 : } -\frac{d[Ea]}{dt} = k_1 \times [Ea]$$

où $[Ea]$ est la concentration en enzyme active. Cette équation s'intègre comme suit :

$$\text{équation 9 : } [Ea] = [Ea]_0 \times e^{-k_1 t}$$

et équivaut à

$$\text{équation 10 : } \ln[Ea] = \ln[Ea]_0 - k_1 t$$

Pour une concentration en enzyme inférieure à 25 g.l^{-1} , la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme active présente dans le milieu (figure 81). Ainsi, s'il existe une relation linéaire (équation 10) entre le logarithme de l'activité enzymatique résiduelle et la durée d'incubation de l'enzyme, alors la désactivation du Novozym 435® suit le modèle d'ordre 1.

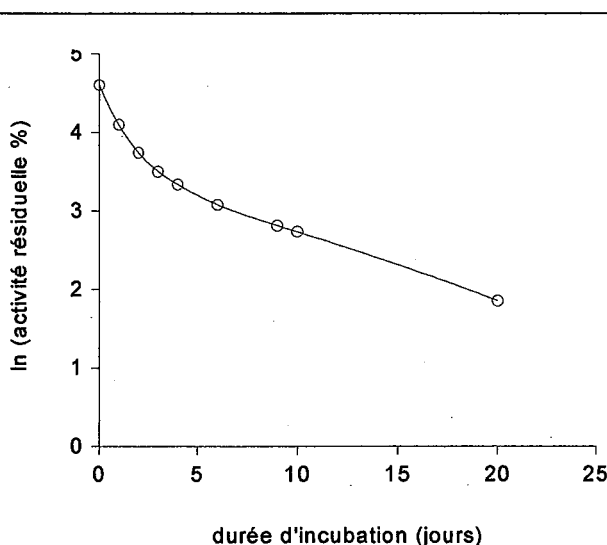
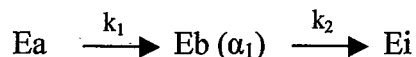


figure 84 : stabilité du Novozym 435® dans le cinnamate d'éthyle.
Conditions expérimentales : phloridzine $50 \mu\text{mol}$, cinnamate d'éthyle 5 ml , Novozym 435® 100 mg , réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm , 80°C , 200 mbar . Le Novozym 435® est incubé entre 0 et 20 jours à 80°C , 200 mbar dans le cinnamate d'éthyle.

D'autres modèles de désactivation plus complexes ont été proposés (Henley & Sadana, 1985, Malcata *et al.*, 1992). La désactivation peut se dérouler en plusieurs étapes. Par exemple, le schéma de désactivation en deux étapes en série est le suivant :



Ce type de modèle est souvent employé pour des enzymes immobilisées (Henley & Sadana, 1985).

La perte d'activité du Novozym 435® a lieu en deux phases (figure 84). La première (de 0 à 4 jours d'incubation) est plus rapide que la seconde (au delà de 4 jours). Cette cinétique est similaire à celle observée pour la désactivation d'une glucose oxydase immobilisée sur sépharose (Henley & Sadana, 1985) et ne peut être attribué à un modèle de désactivation d'ordre 1.

Il est possible que le processus de désactivation dans nos conditions soit très différent de celui qui a lieu dans les conditions opératoires utilisées par Arroyo *et al.*, 1999. Bien que plus lente qu'en milieu aqueux, la désactivation est relativement rapide à l'échelle de nos temps réactionnels. Ces résultats nous ont donc conduits à limiter le suivi cinétique des réactions à environ 6 jours (150 h), car le Novozym 435® ne conserve alors que 20% de son activité initiale.

IV.1.5. Optimisation de la production du cinnamate de phloridzine

L'influence de la concentration en phloridzine, substrat limitant, a été étudiée dans le but de produire des quantités importantes d'esters de flavonoïdes. De plus, cette étude permet de déterminer la vitesse maximale de la réaction ainsi que l'affinité du Novozym 435® pour la phloridzine.

La détermination de la solubilité par la méthode décrite chapitre 2 § IV.2 n'a pas été possible car l'introduction d'une quantité de phloridzine de 1480 µmol dans le cinnamate d'éthyle donne lieu à la gélification du milieu après 48 h d'agitation à 80°C. Une observation visuelle du milieu réactionnel permet d'affirmer que 1060 µmol de phloridzine sont solubles dans 5 ml de cinnamate d'éthyle mais pas 1480 µmol indiquant que le seuil de solubilité est compris entre 210 et 295 mM soit 90 à 130 g.l⁻¹.

Ainsi, les quantités de phloridzine solubilisées que nous avons utilisées varient de 50 à 1060 μmol et une expérience a été réalisée en milieu non totalement soluble (avec 1480 μmol). Une incubation dans le cinnamate d'éthyle pendant 16 h est nécessaire pour solubiliser au mieux la phloridzine. Puis la réaction est initiée par addition de 100 mg (20 g.l^{-1}) de Novozym 435®.

En ce qui concerne l'essai réalisé avec 1480 μmol de phloridzine, la cinétique n'a pas pu être déterminée jusqu'à l'équilibre. En effet, le milieu reste trouble durant 100 h, ce qui montre que la phloridzine n'est pas totalement solubilisée. De plus, après 60 h, le milieu devenant très visqueux, il n'a plus été possible d'effectuer des prélèvements de volumes précis. La synthèse enzymatique semble alors très ralentie, voire stoppée : en effet, des analyses qualitatives effectuées entre 60 et 150 h montrent qu'il reste de la phloridzine en quantité importante.

Les cinétiques d'acylation de la phloridzine à différentes concentrations dans le milieu réactionnel sont reportées figure 85.

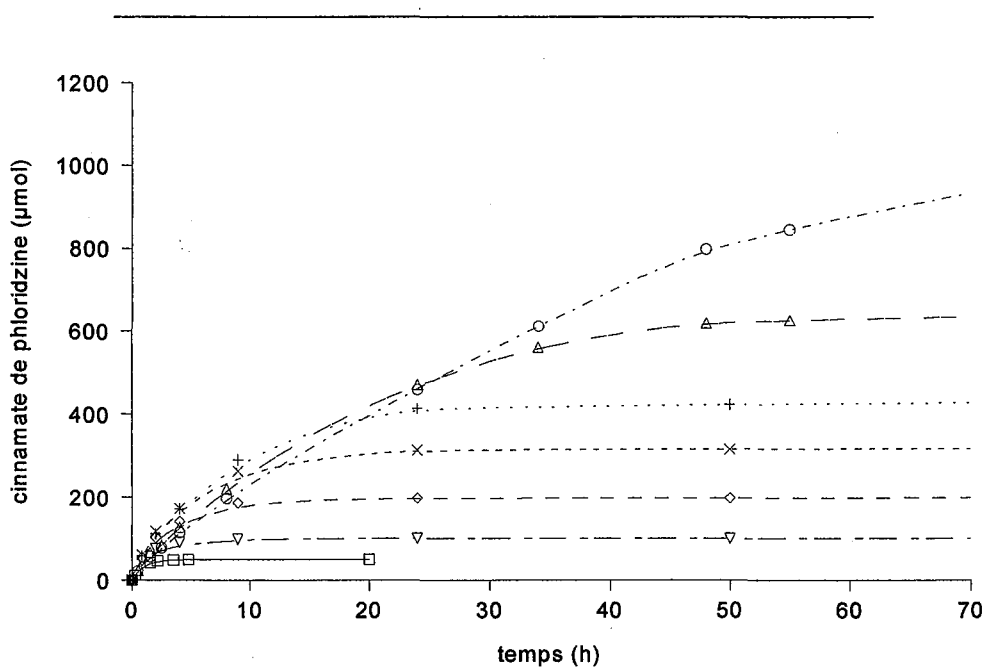


figure 85 : effet de la quantité de phloridzine sur la réaction de synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle » à 80°C, 200 mbar.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol (□), 100 μmol (∇), 200 μmol (◇), 325 μmol (×), 430 μmol (+), 640 μmol (△) ou 1060 μmol (○), cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Les quantités de cinnamate de phloridzine formées après 60 h de réaction augmentent quand la concentration initiale en phloridzine dans le milieu augmente. La figure 85 ne permet cependant pas d'apprécier nettement la variation des vitesses initiales en fonction de la quantité de substrat. C'est pourquoi nous avons rapporté figure 86A, les vitesses initiales en fonction de la quantité de phloridzine. Rappelons que la quantité de donneur d'acyle reste la même pour tous les essais (29,75 mmol) alors que celle de l'accepteur varie ; d'où une évolution du rapport molaire donneur d'acyle / accepteur rapportée figure 86B.

On observe une accélération de la conversion de la phloridzine passant de 5,6 mM.h⁻¹ à 11,4 mM.h⁻¹ pour des quantités de phloridzine comprises entre 50 et 325 µmol (figure 86A). Au delà, de 325 µmol correspondant à un rapport molaire voisin de 90, la vitesse initiale diminue.

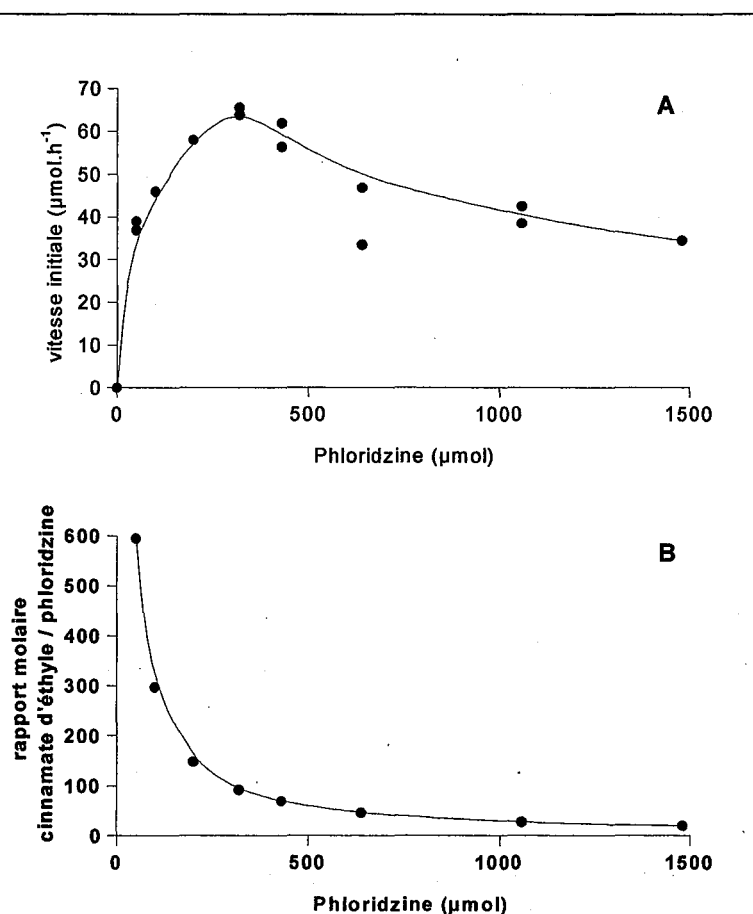


figure 86 : effet de la quantité de phloridzine sur la réaction de synthèse du cinnamate de phloridzine.

A) effet sur la vitesse initiale de synthèse du cinnamate de phloridzine.
B) évolution du rapport molaire donneur/accepteur d'acyle

Conditions expérimentales : phloridzine 50 à 1480 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Cette observation conduit à formuler plusieurs hypothèses :

- ✓ Une **inhibition par le substrat** peut être envisagée. L'inhibition des lipases par les alcools à chaînes courtes tels que l'éthanol (Shimada *et al.*, 2002), l'alcool isoamylique (Rizzi *et al.*, 1992), a souvent été observée ; mais il est peu probable que la CALB soit inactivée de la sorte par des flavonoïdes glycosylés. Il existe plusieurs mécanismes d'inhibition par le substrat : soit une entrée de plusieurs molécules de substrats dans le site actif, soit l'entrée des substrats dans le mauvais ordre, soit encore une interaction du flavonoïde avec l'enzyme. Les deux premières hypothèses semblent peu plausibles du fait de l'encombrement stérique important généré par la phloridzine dans la poche enzymatique étroite recevant le substrat alcool d'une part et d'autre part, la présence d'un excédent de donneur d'acyle quelle que soit la quantité de phloridzine utilisée. Par contre, les composés polyphénoliques sont connus pour réagir avec les protéines (chapitre 1, § I.2.5) et bien que l'immobilisation sur support polyacrylique apporte à l'enzyme une certaine stabilité, la protéine reste accessible aux dénaturants chimiques (Arroyo *et al.*, 1999).
- ✓ Une **augmentation de la viscosité du milieu** a été observée visuellement au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de phloridzine introduite. Il semblerait donc que la diffusion des substrats et des produits soit d'autant plus affectée que la viscosité augmente et en particulier à partir de 325 μmol (65 mM) de phloridzine. On peut alors comprendre que la réaction soit freinée par les contraintes diffusionnelles.
- ✓ Par ailleurs, la forte **diminution du rapport molaire donneur/accepteur d'acyle** peut jouer un rôle sur la diminution de la vitesse initiale (figure 86). Celle-ci atteint un maximum pour une quantité de phloridzine introduite de 325 μmol soit un rapport molaire donneur/accepteur voisin de 90. Lorsque ce rapport diminue, il est possible que le donneur d'acyle, étant à la fois solvant et substrat de la réaction, ne soit plus en quantité suffisante pour agir totalement en tant que substrat.

Nous estimons cependant que la diminution de la vitesse est principalement due à une augmentation de la viscosité à partir d'un rapport molaire donneur/accepteur d'acyle de 90. Quoi qu'il en soit ce phénomène ne nous permet pas de déterminer la constante d'affinité du Novozym 435® pour la phloridzine ni la vitesse maximale de synthèse du cinnamate de phloridzine.

L'augmentation de la quantité de substrat introduite mène naturellement à une augmentation du temps réactionnel nécessaire pour atteindre l'équilibre. Pour toutes les quantités de phloridzine testées, à l'exception de 1480 μmol , la conversion du flavonoïde est totale. La conversion complète de 50 μmol de phloridzine est atteinte en 5 h, alors que celle de 1060 μmol est atteinte en 80 h (figure 87).

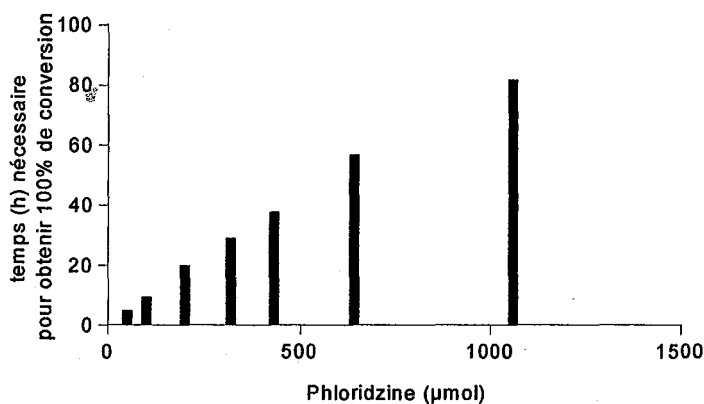


figure 87 : influence de la quantité de phloridzine sur le temps nécessaire à obtenir la conversion totale de la phloridzine
 Conditions expérimentales : phloridzine 50 à 1060 μmol , cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

En dessous de son seuil de solubilité dans le cinnamate d'éthyle, la phloridzine est complètement acylée avec une production maximale de cinnamate de phloridzine de 119 g.l^{-1} en 80 h. A notre connaissance, ce sont les niveaux de production d'esters cinnamiques de flavonoïdes les plus élevés obtenus avec le Novozym 435®.

La productivité en cinnamate de phloridzine, c'est-à-dire la quantité d'ester produit par gramme de catalyseur pendant le temps nécessaire pour atteindre la conversion totale, en fonction de la concentration en substrat est un paramètre important pour un développement industriel.

Cette productivité, représentée figure 88, n'augmente que faiblement avec l'augmentation de la quantité de flavonoïde (de 0,10 à 0,12 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Il sera préférable d'utiliser les quantités de phloridzine les plus élevées possibles car la perte importante d'activité de la préparation enzymatique dans ces conditions opératoires (chapitre 3, § IV.1.4) ne permet pas d'envisager une réutilisation du Novozym 435®.

A titre de comparaison, Cao *et al.*, 1999 ont synthétisé le palmitate de glucose avec une productivité de $0,30 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en utilisant le Novozym 435® comme catalyseur.

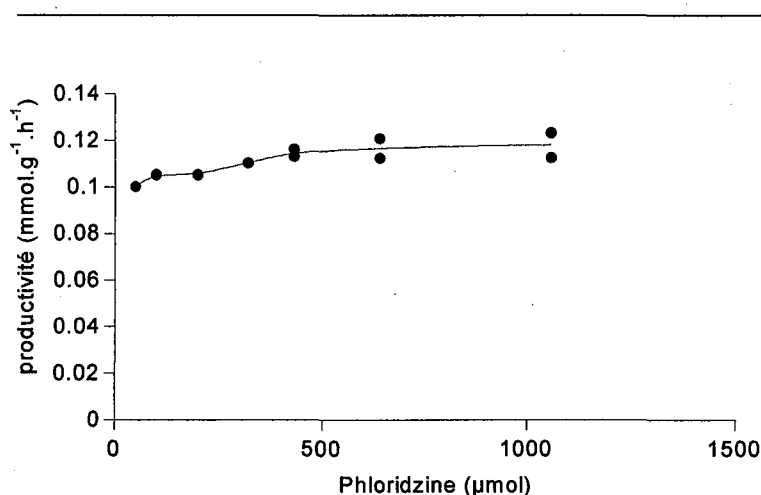


figure 88 : productivité de la réaction de synthèse du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle »
 Conditions expérimentales : 50 à 1060 µmol phloridzine, 5 ml cinnamate d'éthyle, 20 g.l^{-1} Novozym 435®, 80°C , 200 mbar.

En conclusion, cette étude nous a permis d'optimiser les conditions expérimentales conduisant à d'excellents rendements en ester. En effet, l'utilisation du milieu « donneur d'acyle » conduit à la conversion totale de la phloridzine introduite à condition que sa concentration initiale ne soit pas saturante. Nous avons ainsi synthétisé jusqu'à 119 g.l^{-1} de cinnamate de phloridzine en 80 h. Un autre avantage de ce procédé de synthèse est qu'il permet de purifier le produit par une méthode simple (chapitre 2, § III.3) grâce à la conversion totale du flavonoïde.

La seule étude faisant état de l'acylation des flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle » a été conduite par Kontogianni *et al.*, 2001 en mode estérification directe et rapporte de faibles résultats. Trois paramètres peuvent expliquer la contradiction entre leur étude et la nôtre. D'abord, l'utilisation d'une température élevée (80°C dans notre étude contre 45°C dans celle de Kontogianni *et al.*, 2001) permet à la réaction d'avoir lieu plus rapidement mais aussi de favoriser la solubilisation du flavonoïde dans le donneur d'acyle. Ensuite, il est possible que les flavonoïdes dissaccharides, rutine et naringine, que ces auteurs utilisent soient peu solubles dans les milieux apolaires constitués par des acides gras. Enfin, l'utilisation d'un donneur d'acyle éthylé permet d'éviter une acidification du milieu par le donneur d'acyle sous forme acide libre.

Il n'est pas possible de comparer directement les synthèses du cinnamate de phloridzine en milieu « donneur d'acyle » et en milieu solvant puisque nos deux études ont été menées à des températures différentes. Cependant, la conversion de la phloridzine est totale en 15 h dans le milieu « donneur d'acyle » à 60°C alors que la réaction en présence de M₂B₂ à 65°C n'atteint pas l'équilibre après 200 h. Ceci confirme les résultats obtenus pour la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine (chapitre 3, § II.4.2), à savoir que le milieu « donneur d'acyle » permet à la réaction d'avoir lieu plus rapidement.

Un inconvénient économique de cette méthode est l'utilisation d'un large excès de donneur d'acyle, cependant celui-ci peut-être facilement recyclé. En effet, même à l'issue des réactions enzymatiques les plus longues (où la concentration en phloridzine est supérieure à 65 mM), le taux d'hydrolyse du cinnamate d'éthyle n'excède pas 1% : on peut donc le récupérer après évaporation de l'hexane qui a servi à la purification de l'ester (chapitre 2, § III.3).

IV.2. Influence du donneur d'acyle

IV.2.1. Sélection des donneurs d'acyles

La faisabilité des réactions dans les milieux « donneur d'acyle » repose, d'une part, sur la réactivité des donneurs d'acyle (chapitre 3, § I), et d'autre part, sur un certain nombre de paramètres tels que la solubilité du flavonoïde, la viscosité du milieu...

Les donneurs d'acyles aromatiques sélectionnés sont des esters méthyliques ou éthyliques d'acides aromatiques dont la température de fusion est inférieure à 60°C (tableau 40).

tableau 40: donneurs d'acyle testés en milieu « donneur d'acyle ».

Donneurs d'acyle	Masse molaire	Température de fusion (°C)	λ_{UV} (max)
cinnamate d'éthyle	176,2	7	276
cinnamate de méthyle	162,2	34-38	275
benzoate de méthyle	136,2	-12,4	280
salicylate de méthyle	152,1	19,4	305
4-hydroxyphénylacétate de méthyle	166,2	57-60	276
4-hydroxyphénylpropionate de méthyle	180,2	39-41	276

IV.2.2. Effet de la nature du groupement partant (éthanol ou méthanol) sur la synthèse du cinnamate de phloridzine

Quel que soit le donneur d'acyle utilisé (éthylé ou méthylé), aucune différence ne devrait apparaître au niveau de l'équilibre thermodynamique de la réaction. En effet, dans les deux cas, les groupements partants (éthanol et méthanol) ont des températures d'ébullition inférieures à la température de réaction. De plus, une pression de 200 mbar facilite l'élimination par évaporation de ces coproduits de la réaction.

Pourtant, la transformation complète de la phloridzine en dérivé cinnamoylé (figure 89) est plus rapide en milieu cinnamate d'éthyle ($39 \mu\text{mol.h}^{-1}$) qu'en milieu cinnamate de méthyle ($24 \mu\text{mol.h}^{-1}$). Ce résultat pourrait être attribué à une affinité plus importante de l'enzyme pour l'ester éthylique que pour l'ester méthylique. Cependant, des résultats inverses sont observés lors d'alcoolyses des esters palmitiques et lauriques par l'acide ascorbique (Tang *et al.*, 2000). Il est plus probable que la diminution de vitesse observée dans notre étude soit due à une viscosité plus importante du milieu cinnamate de méthyle dont le point de fusion est beaucoup plus élevé que celui du cinnamate d'éthyle.

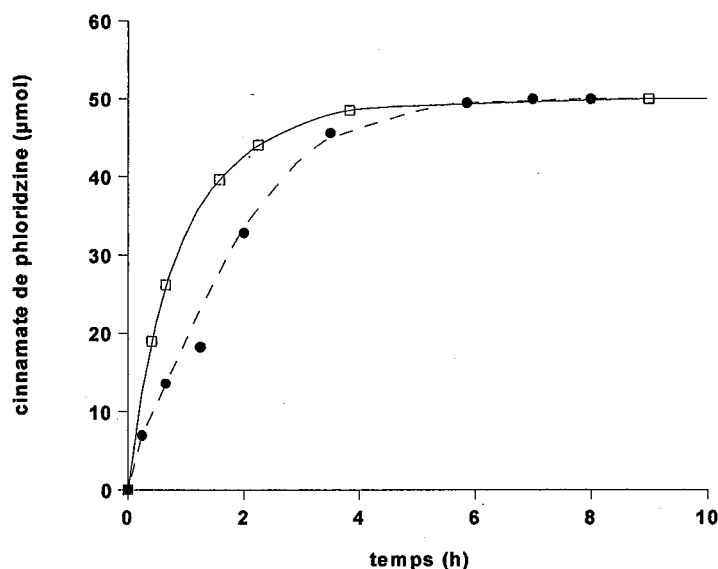


figure 89 : cinétiques de synthèse du cinnamate de phloridzine au cours des réactions de transestérification avec le cinnamate d'éthyle (□) ou avec le cinnamate de méthyle (●).

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol , donneur d'acyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

IV.2.3. Influence de la structure du donneur d'acyle

La phloridzine s'est montrée soluble à raison de 10 mM dans le cinnamate, le salicylate et le benzoate de méthyle. Cette solubilité n'a été vérifiée que par l'observation de la limpidité du milieu après 16 h de solubilisation à 80°C.

Les réactions enzymatiques ont été suivies par CLHP (gradient A). Pour chaque réaction, on observe la synthèse d'un produit unique aux temps de rétention 860 s lors de la transestérification avec le salicylate de méthyle, 795 s avec le benzoate de méthyle et 980 s avec le cinnamate de méthyle. La purification et l'analyse par RMN-¹H et ¹³C (voir annexes), permettent d'identifier les deux nouveaux produits au 6''-O-salicylate de phloridzine et au 6''-O-benzoate de phloridzine. Ainsi, pour les deux nouveaux esters synthétisés, la position impliquée dans la liaison ester est encore l'hydroxyle primaire de la phloridzine.

Les cinétiques de formation de ces trois esters de phloridzine ne sont pas significativement différentes (figure 90). Dans les trois cas, la conversion totale de la phloridzine est obtenue en moins de 8 h et la vitesse initiale avoisine 30 μmol.h⁻¹.

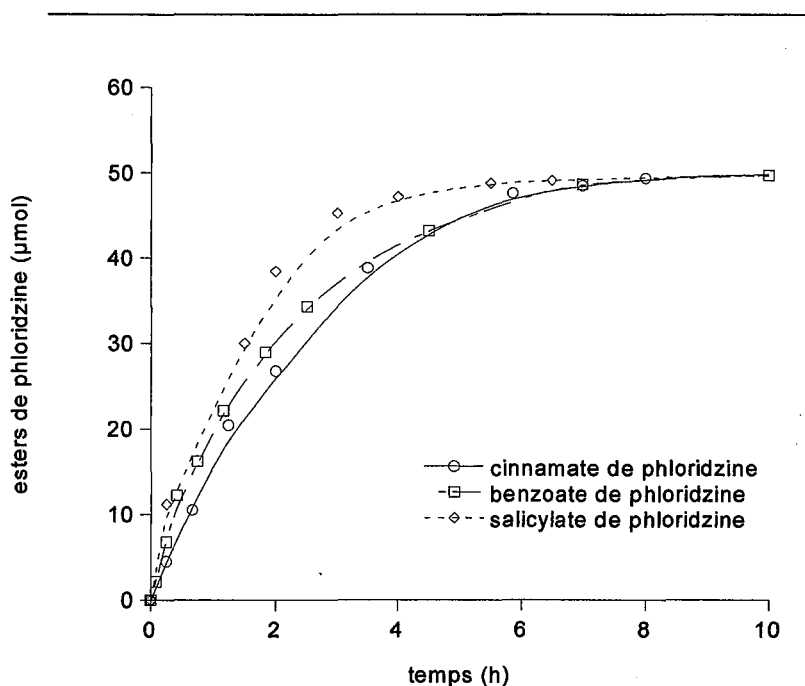


figure 90 : cinétiques d'acylation de la phloridzine par le cinnamate, le benzoate et le salicylate de méthyle
 Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, donneur d'acyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

L'acylation de la phloridzine par le salicylate en milieu « donneur d'acyle » est surprenante. En effet, d'après les observations faites chapitre 3 § I et III.2, la présence d'un hydroxyle sur le cycle aromatique en conjugaison avec la fonction carboxylique est défavorable à la catalyse par la CALB. Les résultats obtenus en milieu butanol (chapitre 3, § I.2.1) ont révélé que la réactivité du salicylate est très inférieure à celle du benzoate ; par ailleurs, nous n'avons pas observé de réaction entre la phloridzine et l'acide salicylique en présence de solvant (chapitre 3, § III.2). Il semble donc qu'un excès important de donneur d'acyle (salicylate de méthyle) permette une excellente conversion de la phloridzine (figure 90, figure 91).

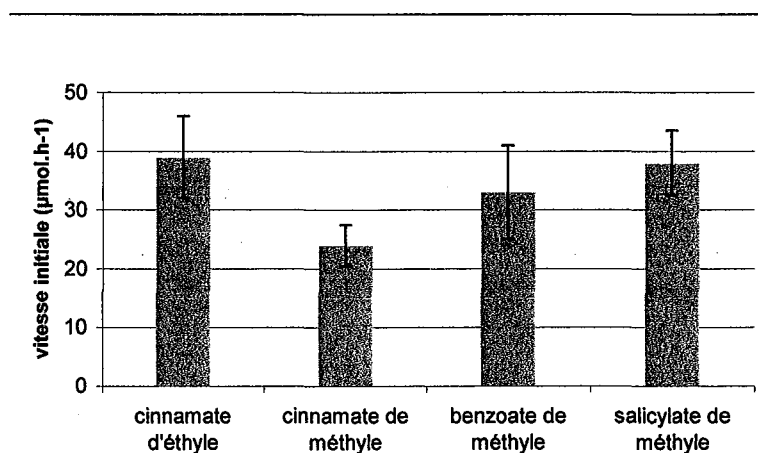


figure 91 : Effet du donneur d'acyle / solvant sur la vitesse d'acylation de la phloridzine

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol, donneur d'acyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Les vitesses initiales de synthèse pour les trois donneurs d'acyles méthyliques et le cinnamate d'éthyle représentées figure 91 sont les moyennes de trois déterminations. La variabilité observée est certainement due aux incertitudes générées par les traitements des échantillons plutôt qu'à une variation dans les cinétiques réactionnelles. Dans ces conditions réactionnelles, il semble que la réactivité du cinnamate d'éthyle soit équivalente à celle du salicylate de méthyle, toutes deux supérieures à celle du benzoate de méthyle, le cinnamate de méthyle réagissant le plus lentement.

Le 4-hydroxyphénylacétate et le 4-hydroxyphénylpropionate de méthyle n'ont pas permis de solubiliser ni même de disperser la phloridzine après 16 h d'agitation à 80°C. Le Novozym 435® n'est pas non plus correctement agité dans ces milieux beaucoup trop visqueux. Ainsi, la réaction en milieu « donneur d'acyle » n'est pas possible, les trois acteurs

de la synthèse n'étant que peu ou pas en contact. Après plus de 150 h de mise en présence des substrats et du Novozym 435®, les milieux réactionnels ont été solubilisés dans le méthanol et leur analyse CLHP ne révèle la présence que de traces de 4-hydroxyphénylacétate et de 4-hydroxyphénylpropionate de phloridzine. De plus, un brunissement du donneur d'acyle est observé, suggérant un phénomène d'oxydation.

Ce sont donc les viscosités à 80°C des donneurs d'acyle qui ne permettent pas à la réaction d'avoir lieu et non pas la sélectivité du catalyseur car il a été démontré chapitre 3, § I.2.1 et III.2 que la réaction est possible dans un milieu où l'enzyme est au contact des deux substrats.

IV.3. Influence de la structure du flavonoïde

La synthèse d'esters en milieu « donneur d'acyle » a été étendue à d'autres flavonoïdes présentés chapitre 3, § III.3, page 154. Les réactions ont lieu avec le cinnamate d'éthyle.

IV.3.1. Synthèse d'esters de flavonoïdes monoglucosylés, porteurs d'un hydroxyle primaire

IV.3.1.1. Isoquercitrine

Dans les conditions opératoires choisies (80°C ; 200 mbar), l'isoquercitrine (50 µmol) n'est pas entièrement soluble dans 5 ml de cinnamate d'éthyle contrairement à la phloridzine. Cependant, comme il a été montré précédemment (chapitre 3, § II.4.2), le produit de la réaction 6''-O-cinnamate d'isoquercitrine est soluble dans ces conditions.

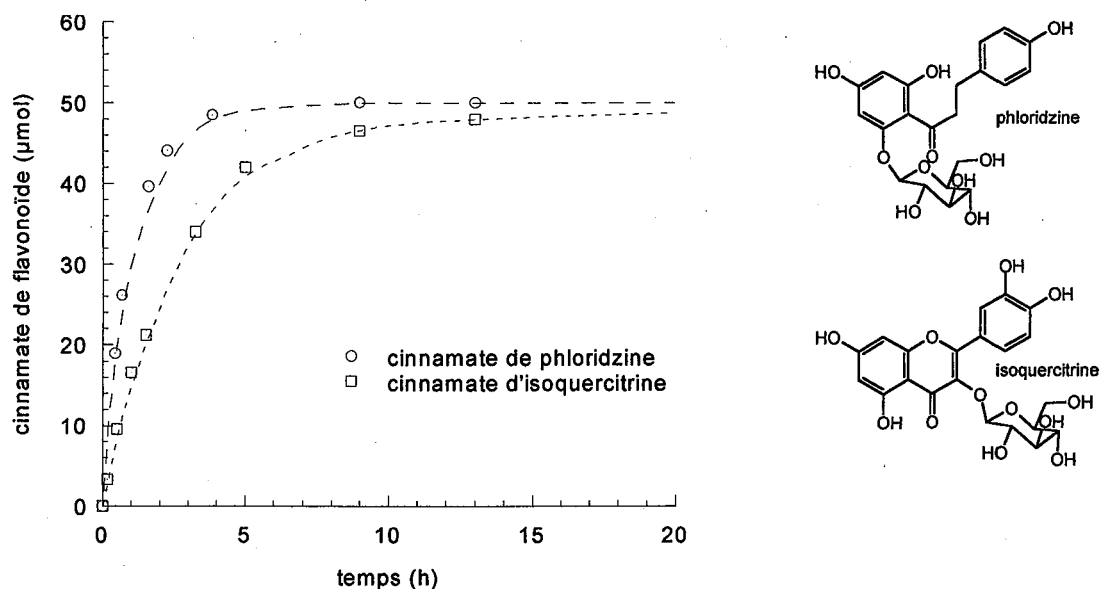


figure 92 : comparaison de la synthèse des esters cinnamiques de phloridzine et d'isoquercitrine.

Conditions expérimentales : flavonoïde 50 μmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

La figure 92 montre que la synthèse du cinnamate d'isoquercitrine est un peu moins rapide que celle du cinnamate de phloridzine. On peut penser que la cinétique de synthèse du cinnamate d'isoquercitrine est contrôlée par la cinétique de dissolution de l'isoquercitrine car la réactivité de l'isoquercitrine en milieu M_2B_2 (chapitre 3, § III.3.1) est identique à celle de la phloridzine. Contrairement aux réactions mettant en jeu la phloridzine, il reste encore des traces d'isoquercitrine après 72 h de réaction (traces inférieures à 1%).

IV.3.1.2. Lutéoline-7-glucoside

Bien que la lutéoline-7-glucoside ne soit pas totalement solubilisée dans les conditions de synthèse, on observe aussi l'apparition d'un produit unique. Ce produit n'a pas été purifié. Aussi, la synthèse du cinnamate de L7G est représentée (figure 93) par l'aire du pic CLHP en unités arbitraires. Le milieu réactionnel est très hétérogène ; les prélèvements permettant le suivi cinétique contiennent le produit de synthèse qui semble soluble (au moins au début de la réaction) et la L7G présente en partie sous forme soluble et en partie sous forme de suspension. Ainsi, les dosages CLHP ne montrent pas la quantité de L7G réellement présente dans le milieu réactionnel.

La réaction n'est pas totale au bout de 150 heures (figure 93) et il reste des réactants non-solubilisés. Le rendement de la réaction a été estimé à 65% en dosant la lutéoline-7-glucoside n'ayant pas réagi sur la totalité d'un milieu réactionnel.

Au vu des résultats obtenus pour les deux autres flavonoïdes glucosides et des résultats obtenus par Gao *et al.*, 2001, la position acylée est probablement l'hydroxyle primaire de la partie glucosidique du flavonoïde.

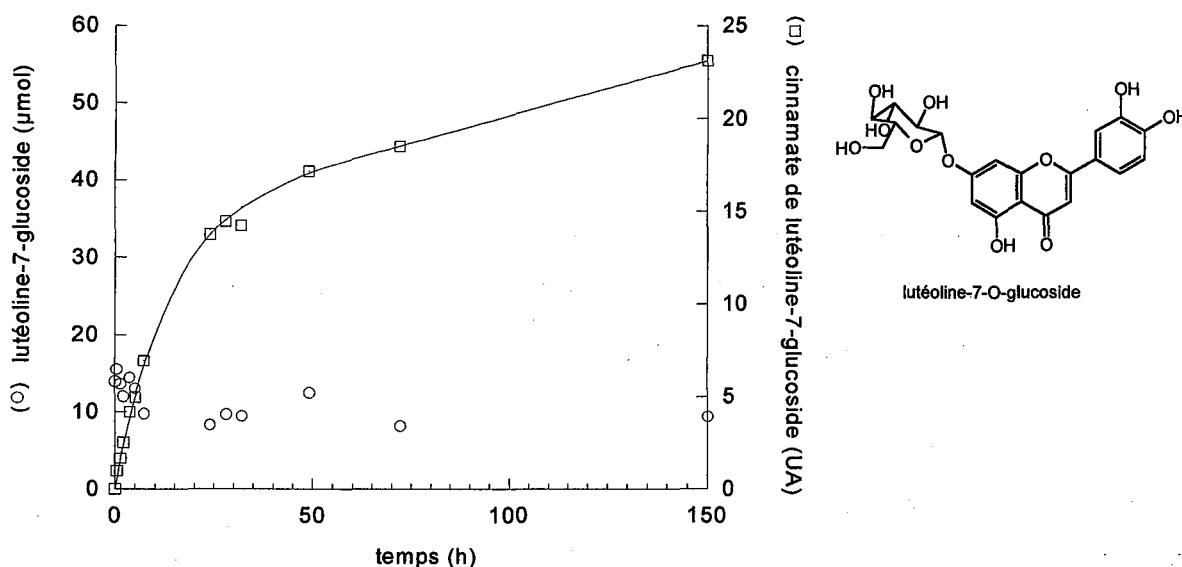


figure 93 : cinétique de synthèse du cinnamate de lutéoline-7-glucoside.

Conditions expérimentales : lutéoline-7-glucoside 50 μmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

IV.3.2. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés porteurs d'un hydroxyle primaire

La naringine et la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) sont solubles dans les conditions opératoires. Chacune des deux réactions donne lieu à la synthèse d'un produit unique. Le temps de rétention est de 875 s pour le cinnamate de naringine et de 980 s pour le cinnamate de NHDC (gradient A).

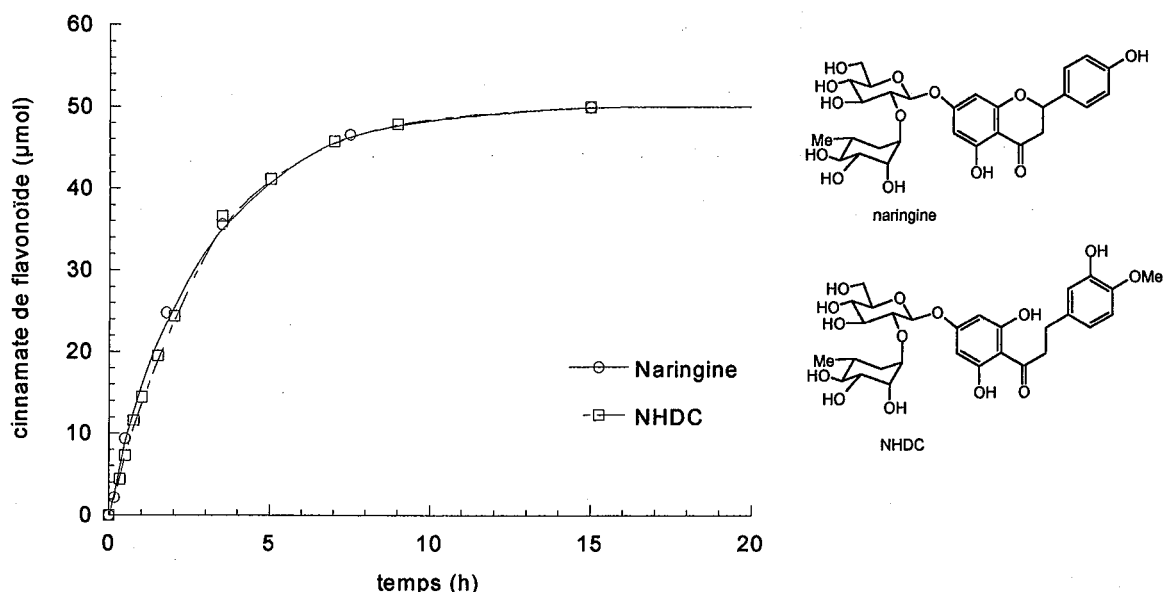


figure 94 : cinétiques de synthèse du cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone et de naringine.

Conditions expérimentales : flavonoïde 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

D'après les cinétiques représentées figure 94, les réactions sont totales en environ 12 heures. Il ne semble pas y avoir de différence de réactivité entre ces deux substrats. La synthèse du cinnamate de naringine catalysée par le Novozym 435® a déjà été rapportée dans la littérature : Gao *et al.*, 2001 ont purifié cet ester avec un rendement de 30% après 5 jours de synthèse et Geers *et al.*, 2001 ont obtenu un rendement de conversion inférieur à 15% en 40 h (chapitre 1, § III.3.2.3.2). Le milieu « donneur d'acyle » utilisé dans notre étude conduit à un excellent résultat comparé à ceux obtenus par ces auteurs en milieu solvant.

Gao *et al.*, 2001 ont déterminé que l'hydroxyle en position 6'' du glucose est impliqué dans la liaison ester du cinnamate de naringine. La néohespéridine dihydrochalcone possédant la même partie glucidique, il était attendu que l'acylation ait lieu sur la même position, ce qui a été confirmé par les analyses RMN (cf annexes).

Comme cela a été observé en milieu solvant, la vitesse initiale d'acylation des composés porteurs d'un néohespéridose est inférieure à celle de composés glycosylés. Ici encore, on peut avancer l'hypothèse d'une gêne stérique due à la présence du résidu rhamnose.

IV.3.3. Synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés dépourvus d'hydroxyle primaire

La synthèse d'esters de flavonoïdes diglycosylés dépourvus d'hydroxyles primaires a été tentée dans les mêmes conditions opératoires. La rutine, l'hésperidine, la diosmine et le peltatoside ne sont que peu solubles dans le cinnamate d'éthyle dans ces conditions (structures figure 95, figure 96).

Il a été cependant possible de synthétiser le cinnamate de rutine. Les analyses CLHP montrent la synthèse d'un unique produit (rt : 770 s). Ce produit n'a pas été purifié. L'acylation de la rutine par des acides gras (C8 à C12) réalisée par Kontogianni *et al.*, 2001 ou par le dibenzyl malonate menée par Riva *et al.*, 1996 conduit à la formation d'un composé acylé sur la position 3'' du résidu glucose. Il est probable que la transestérification de la rutine par le cinnamate d'éthyle implique cette même position.

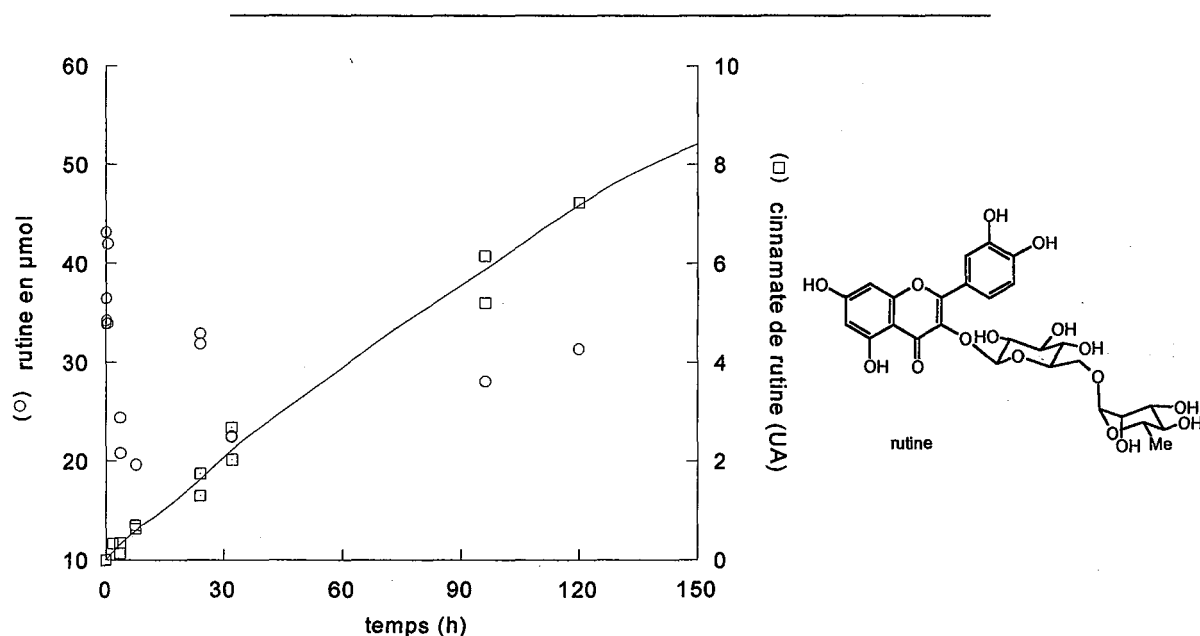


figure 95 : cinétiques de synthèse du cinnamate de rutine.
Conditions expérimentales : rutine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Le rendement de la réaction a été estimé à 45% après 150 h de réaction, en dosant la rutine résiduelle sur la totalité d'un milieu réactionnel. Il est clair d'après la figure 95, que l'équilibre n'est pas atteint à 150 h.

Les synthèses du cinnamate d'hésperidine, du cinnamate de diosmine et du cinnamate de peltatoside n'ont pas été possibles dans ces conditions réactionnelles.

L'absence d'hydroxyle primaire pourrait expliquer ce résultat. Pourtant la rutine a pu être lentement acylée bien que ce flavonoïde possède la même partie glycosidique que l'hésperidine et la diosmine (figure 95, figure 96).

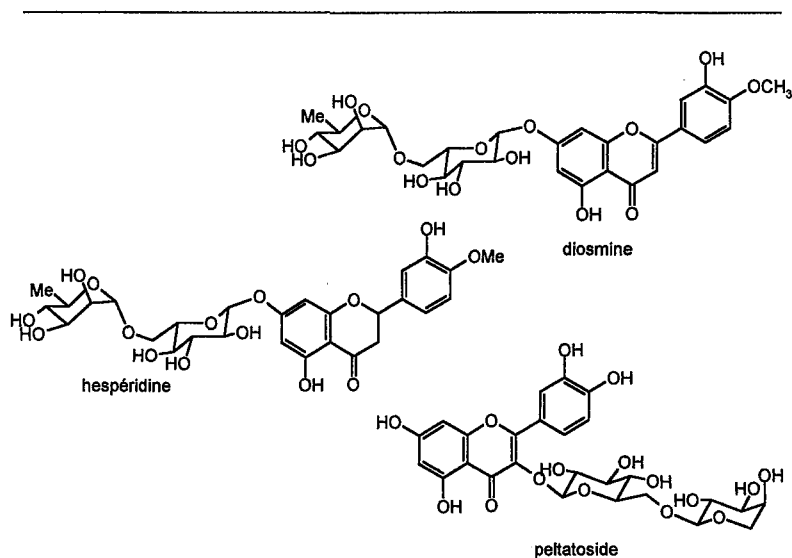


figure 96 : structures chimiques de l'hésperidine, de la diosmine, du peltatoside.

De même, la naringine, flavanone 7-O-néohésperidoside, (chapitre 3, § IV.3.2) est rapidement acylée mais pas l'hésperidine, flavanone 7-O-rutinoside. Il semble donc que la partie glycosidique soit davantage responsable de la réactivité plus ou moins élevée des flavonoïdes étudiés que la structure du noyau en C15.

Par ailleurs, Kawaguchi *et al.*, 1997 ont mis en évidence une activité inhibitrice de l'hésperidine sur la lipase pancréatique de porc et une lipase de *Pseudomonas*. Cette hypothèse a été vérifiée en ajoutant de l'hésperidine dans un milieu réactionnel mettant en jeu la phloridzine et le cinnamate d'éthyle sans solvant.

Les cinétiques de formation du cinnamate de phloridzine en présence ou en absence d'hésperidine sont reportées figure 97. Aucune différence n'est observée entre ces deux synthèses : l'hésperidine n'inhibe pas la réaction dans ces conditions.

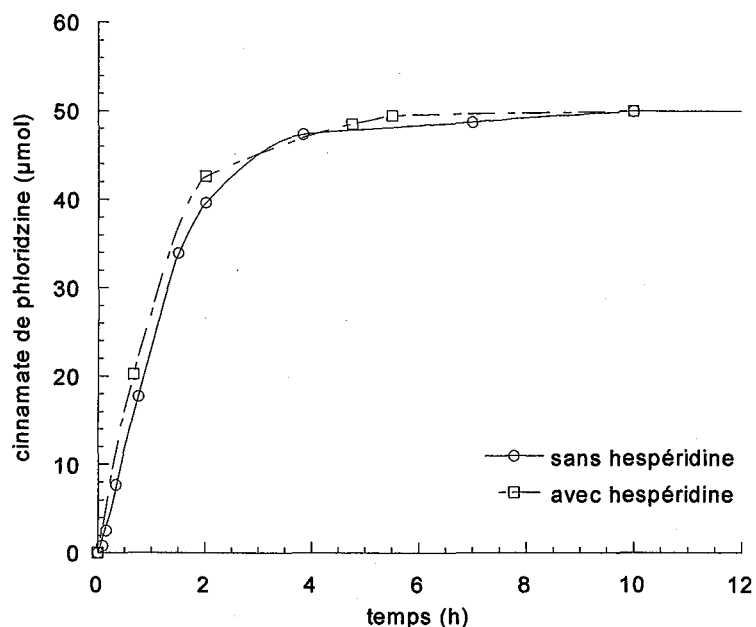


figure 97 : effet de la présence de l'hésperidine sur la synthèse du cinnamate de phloridzine.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 µmol, hésperidine 50 µmol, cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Le manque de réactivité de l'hésperidine, de la diosmine et du peltatoside pourrait donc plutôt s'expliquer par le manque de solubilité dans le cinnamate d'éthyle.

En effet, les solubilités de la rutine et de l'hésperidine sont respectivement de 2 mM et 0,2 mM. Ainsi, l'effet combiné de la faible solubilité et de la moindre réactivité des alcools secondaires peut expliquer la lenteur de la synthèse du cinnamate de rutine et la non réactivité de l'hésperidine.

Nous avons donc voulu augmenter la solubilité de quelques flavonoïdes (hésperidine, rutine, isoquercitrine et lutéoline-7-glucoside) en ajoutant du diméthyl sulfoxyde (DMSO) au milieu réactionnel à raison de 10% en volume. Cette proportion de DMSO entraîne la solubilisation totale de ces flavonoïdes dans le milieu. Cependant, il n'y a aucune réaction de synthèse. Ce résultat suggère une inhibition de la préparation enzymatique par le DMSO en accord avec les observations de Degn & Zimmermann, 2001 : ces auteurs ont en effet observé qu'une proportion de DMSO supérieure à 2% dans le milieu réactionnel provoque une réduction de l'activité de la CALB.

IV.3.4. Conclusion

Les résultats des différentes synthèses de cinnamates de flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle » sont rassemblés tableau 41.

tableau 41 : synthèse de cinnamates de flavonoïdes à 80°C, 200 mbar.

Flavonoïdes	Solubilité dans le cinnamate d'éthyle (80°C)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$)	Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre
Phloridzine	> 210 mM*	39 ± 9 (4 déterminations)	6 h (100%)
Isoquercitrine	5 mM	16,5 (1 détermination)	13 h (99%)
Lutéoline-7-glucoside	0,8 mM	lente	> 150 h (65%)
Naringine	> 10 mM*	17,5 ± 0,5 (2 déterminations)	12 h (100%)
Néohespéridine dihydrochalcone	> 10 mM*	15,0 ± 0,5 (2 déterminations)	12 h (100%)
Rutine	2 mM	lente	> 150 h (45%)
Hespéridine	0,1 mM	pas de réaction	
Diosmine	< 10 mM*	pas de réaction	
Peltatoside	< 10 mM*	pas de réaction	

Conditions expérimentales des synthèses : flavonoïde 50 μmol , cinnamate d'éthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Conditions expérimentales des déterminations de solubilité : chapitre 2, § IV.2. * : solubilité appréciée de façon visuelle.

La synthèse enzymatique d'esters cinnamiques de flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle » catalysée par le Novozym 435® s'est montrée très efficace pour certains flavonoïdes tels que la phloridzine, l'isoquercitrine, la naringine et la néohespéridine dihydrochalcone avec des conversions totales des flavonoïdes en moins de 12 h.

Le Novozym 435® catalyse l'acylation régiosélective des flavonoïdes. En effet, lorsqu'elle est présente, seule la position alcool primaire est acylée. Lorsque seuls des hydroxyles secondaires sont présents (cas de la rutine) un seul produit est formé dans nos conditions expérimentales.

Il n'est cependant pas possible de comparer la réactivité des fonctions alcool primaire et secondaire en milieu « donneur d'acyle » du fait des différences de solubilité dans ce milieu.

La catalyse enzymatique en milieu « donneur d'acyle » est donc un bon moyen d'obtenir des esters de flavonoïdes à condition que la solubilité des substrats soit suffisante. En effet, la solubilité de certains flavonoïdes dans le cinnamate d'éthyle s'est montrée très faible (lutéoline-7-glucoside, rutine, hespéridine, diosmine, peltatoside...). De plus, d'importantes différences de solubilité ont été remarquées pour des molécules de structure proche, la partie glucidique n'étant pas seule responsable de cette solubilité.

Le principal avantage des acylations en milieu « donneur d'acyle » est la conversion quasi totale du flavonoïde en flavonoïde acylé. Ainsi, la purification du produit est simplifiée et ne requiert qu'une précipitation à l'hexane, suivie d'une extraction liquide/liquide. Ce procédé de purification très simple permet d'obtenir les esters de flavonoïdes avec un degré de pureté compris entre 95 et 99,5%.

discussion

Influence du milieu réactionnel	191
Sélectivité de l'enzyme	193
Les moyens de contourner la sélectivité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	197
les enzymes spécifiques de l'estérification des acides phénoliques	202
Propriétés des esters synthétisés	205



INFLUENCE DU MILIEU REACTIONNEL

L'acylation des flavonoïdes, catalysée par une hydrolase telle que la lipase B de *Candida antarctica*, nécessite de travailler en milieu pauvre en eau. Au cours de notre étude nous avons utilisé des milieux organiques : le rôle du solvant de la réaction est joué soit par le 2-méthylbutan-2-ol soit par le donneur d'acyle lui-même.

En ce qui concerne les synthèses en présence d'un tierce solvant, nos résultats les plus intéressants ainsi que ceux de la littérature sont reportés tableau 42.

tableau 42 : acylations des flavonoïdes en milieu solvant catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*.

Flavonoïdes	Donneurs d'acyle	Enzyme, conditions opératoires	Produits (rendements)	ref
isoquercitrine (10 g.l ⁻¹) ^a	acide cinnamique (1/20) ^b	Novozym 435® (100 g.l ⁻¹) ^c , M ₂ B ₂ , 80°C, 200 mbar, 50 h	6''-cinnamate d'isoquercitrine (99%) ^d	1
isoquercitrine (10 g.l ⁻¹) ^a	cinnamate d'éthyle (1/20) ^b	Novozym 435® (100 g.l ⁻¹) ^c , M ₂ B ₂ , 80°C, 200 mbar, 25 h	6''-cinnamate d'isoquercitrine (99%) ^d	1
isoquercitrine (46 g.l ⁻¹) ^a	cinnamate de vinyle (1/5) ^b	CAL-B (12,5 g.l ⁻¹) ^c , acétone, 37°C, 7 jours	6''-cinnamate d'isoquercitrine (68%) ^e	2
isoquercitrine (11,6 g.l ⁻¹) ^a	cinnamate de vinyle (1/4) ^b	Novozym 435® (17,4 g.l ⁻¹) ^c , ter-butanol/pyridine (9/1 ; v/v), 37°C, 5 jours	6''-cinnamate d'isoquercitrine (45%) ^e	3
naringine (29 g.l ⁻¹) ^a	cinnamate de vinyle (1/4) ^b	Novozym 435® (43,5 g.l ⁻¹) ^c , ter-butanol/pyridine (9/1 ; v/v), 37°C, 5 jours	6''-cinnamate de naringine (30%) ^e	3
lutéoline-7-O-glucosyle (10 g.l ⁻¹) ^a	cinnamate de vinyle (1/4) ^b	Novozym 435® (15 g.l ⁻¹) ^c , ter-butanol/pyridine (9/1 ; v/v), 37°C, 5 jours	6''-cinnamate de lutéoline-7-O-glucosyl (30%) ^e	3
phloridzine (4,6 g.l ⁻¹) ^a	4-hydroxyphényl-acétate de méthyle (1/10) ^b	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^c , M ₂ B ₂ , 65°C, 100 h (4 jours)	6''-(4-hydroxyphénylacétate) de phloridzine (95%) ^d	4
naringine (5,8 g.l ⁻¹) ^a	4-hydroxyphényl-acétate de méthyle (1/10) ^b	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^c , M ₂ B ₂ , 65°C, 200 h (8 jours)	6''-(4-hydroxyphénylacétate) de naringine (95%) ^d	5
naringine (133 g.l ⁻¹) ^a	acide 4-hydroxyphényl-acétique (environ 1/4) ^b	Novozym 435® (333 g.l ⁻¹) ^c , ter-butanol, 60 à 65°C, 40 h (2 jours)	6''-(4-hydroxyphénylacétate) de naringine (> 15%) ^d	6
rutine (6,1 g.l ⁻¹) ^a	4-hydroxyphényl-acétate de méthyle (1/10) ^b	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^c , M ₂ B ₂ , 65°C, 200 h (8 jours)	4-hydroxyphénylacétate de rutine (20%) ^d	7

Références :

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| (1) chapitre 3, § II.3 | (5) chapitre 3, § III.3.2 |
| (2) Nakajima <i>et al.</i> , 1999b | (6) Geers <i>et al.</i> , 2001 |
| (3) Gao <i>et al.</i> , 2001 | (7) chapitre 3, § III.3.3 |
| (4) chapitre 3, § III.1.1.2 | |

Notes :

- a) quantité de flavonoïde
 b) rapport molaire flavonoïde / donneur d'acyle
 c) concentration en enzyme
 d) pourcentage de conversion du flavonoïde
 e) rendement de purification

Les taux de conversion que nous obtenons (99% en 25 h au mieux) sont excellents. Il est cependant difficile de comparer nos résultats à ceux de Nakajima *et al.*, 1999b et de Gao *et al.*, 2001 car ces auteurs n'expriment le rendement en ester qu'après purification. Il est possible que les techniques de purification (chromatographie sur colonne de silice) donnent lieu à une perte non négligeable de produit.

Cependant, nos résultats sont très intéressants puisque nous avons obtenu d'excellents rendements de conversion sans avoir recours à un donneur d'acyle activé de type vinylique, grâce à l'élimination du coproduit de la réaction. De plus, les temps réactionnels sont largement diminués, certainement grâce à une température plus élevée.

* * * * *

Par ailleurs, de très bons résultats ont été obtenus en faisant réagir les flavonoïdes dans un milieu où le rôle du solvant est joué par le **donneur d'acyle** (tableau 43). Nous sommes les premiers à rapporter la conversion totale de certains flavonoïdes tels que la phloridzine, la naringine, la néohespéridine dihydrochalcone (conversion de 10 μ M en 5 à 12 h).

tableau 43 : acylations des flavonoïdes en milieu « donneur d'acyle » catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*.

Flavonoïdes	Donneurs d'acyle	Enzyme, conditions opératoires	Produits (rendements)	ref
isoquercitrine (10 g.l ⁻¹) ^{a)}	cinnamate d'éthyle	Novozym 435® (100 g.l ⁻¹) ^{c)} , 80°C, 200 mbar, 10 h	6''-cinnamate d'isoquercitrine (99%) ^{d)}	1
phloridzine (4,6 g.l ⁻¹) ^{a)}	cinnamate d'éthyle	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^{c)} , 80°C, 5 h	6''-cinnamate de phloridzine (100%) ^{d)}	2
naringine (5,8 g.l ⁻¹) ^{a)}	cinnamate d'éthyle	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^{c)} , 80°C, 12 h	6''-cinnamate de naringine (100%) ^{d)}	3
naringine (10 g.l ⁻¹) ^{a)}	acide décanoïque	Novozym 435® (10 g.l ⁻¹) ^{c)} , 45°C	6''-cinnamate de naringine (10%) ^{d)}	4
rutine (10 g.l ⁻¹) ^{a)}	acide décanoïque	Novozym 435® (10 g.l ⁻¹) ^{c)} , 45°C	cinnamate de rutine (12%) ^{d)}	4
rutine (6,1 g.l ⁻¹) ^{a)}	cinnamate d'éthyle	Novozym 435® (20 g.l ⁻¹) ^{c)} , 80°C, 150 h	6''-cinnamate de rutine (45%) ^{d)}	5
Références :		Notes :		
(1) chapitre 3, § II.4.2	(4) Kontogianni <i>et al.</i> , 2001	a) quantité de flavonoïde		
(2) chapitre 3, § IV.1.2	(5) chapitre 3, § IV.3.3	c) concentration en enzyme		
(3) chapitre 3, § IV.3.2		d) pourcentage de conversion du flavonoïde		

De tels milieux n'avaient été employés jusqu'ici qu'avec des donneurs d'acyle aliphatiques sous forme acide et n'avaient conduit qu'à de faibles rendements (Kontogianni *et al.*, 2001). Deux hypothèses ont été proposées pour les expliquer : le manque de solubilité des flavonoïdes (rutine et naringine) dans ces donneurs d'acyle et l'acidité du milieu.

Les milieux donneurs d'acyle ne conduisent pas seulement à de meilleurs rendements que les milieux M₂B₂, mais ils permettent aussi à la réaction d'avoir lieu plus rapidement.

Un frein à l'utilisation d'un tel procédé est la nécessité d'employer un large excès de donneur d'acyle, mais la méthode de purification du flavonoïde permet aisément de le recycler. Par ailleurs, avant d'envisager un changement d'échelle, il est nécessaire d'avoir plus d'informations sur les phénomènes d'augmentation de la viscosité du milieu quand on augmente la concentration en flavonoïdes (substrat et ester).

SELECTIVITE DE L'ENZYME

Le paramètre utilisé pour comparer l'affinité d'une enzyme pour différents substrats est le K_m. La détermination de ce paramètre passe par la mesure de la vitesse initiale de la réaction lorsqu'on fait varier la concentration en substrat. Malheureusement, la lenteur des réactions en milieu solvant ne nous a pas permis de mettre en œuvre ce type de mesure. D'autre part, en milieu « donneur d'acyle », certains flavonoïdes sont trop peu solubles et, dans le cas de la phloridzine, l'augmentation de sa concentration dans le cinnamate d'éthyle provoque une augmentation de la viscosité du milieu rendant impossible la détermination du K_m. Nous avons donc dû nous limiter à la comparaison des cinétiques réactionnelles à une concentration donnée en substrat.

* * * * *

Les flavonoïdes glycosylés possèdent de nombreux hydroxyles. Les hydroxyles phénoliques sont les plus difficilement acylables et, à notre connaissance, la seule hydrolase commercialement disponible capable de le faire est la lipase de *Pseudomonas cepacea* (Lambusta *et al.*, 2003).

La comparaison des spectres RMN-¹H et ¹³C de la phloridzine ou de la NHDC (flavonoïdes porteurs d'hydroxyles primaires) avec ceux de leurs esters, révèle d'une part un

déplacement caractéristique des protons du groupement méthylène en 6'' vers les faibles champs et d'autre part vers les hauts champs pour le carbone en 5''. Ces déplacements indiquent que les groupements acyles sont greffés en position 6'' sur le résidu glucose, seule position porteuse d'un hydroxyle primaire, en accord avec la spécificité de l'enzyme.

Les études rapportées dans la littérature montrent que dans certains cas (acylation de l'isoquercitrine par l'acétate de vinyle en position 3'' et 6'', Danieli *et al.*, 1997) un alcool secondaire peut être impliqué. Ce phénomène n'est pas observé lorsque le cinnamate d'éthyle est employé comme donneur d'acyle, même après une mise en contact prolongée avec la phloridzine et le Novozym 435® (en milieu donneur d'acyle à 80°C, 200 mbar, pendant 10 jours). Il est probable que l'encombrement stérique important du cinnamate ne permet pas le greffage d'un deuxième groupement. Par contre, l'acylation de la rutine (ne possédant pas d'hydroxyle primaire) a lieu montrant que l'acylation d'un alcool secondaire est possible dans nos conditions opératoires.

Nous avons montré que l'acylation des flavonoïdes glucosylés est la plus rapide grâce à l'accessibilité de la fonction alcool primaire en 6'' du glucose. Les flavonoïdes porteurs d'un néohespéridose (naringine et néohespéridine dihydrochalcone) sont aussi convertis totalement mais plus lentement à cause de l'encombrement stérique dû à la présence d'un rhamnose lié au glucose. Enfin, la lipase B de *Candida antarctica* acyle plus difficilement les hydroxyles secondaires et seule la rutine a pu être acylée avec un faible rendement à la fois par le 4-hydrophénylacétate de méthyle en milieu M₂B₂ et par le cinnamate d'éthyle en milieu « donneur d'acyle ». De la même façon, l'absence de réactivité des autres flavonoïdes utilisés dans notre étude (diomine, peltatoside et hespéridine) est expliquée par l'absence d'hydroxyles primaires mais aussi par leur solubilité très médiocre dans le cinnamate d'éthyle et dans le M₂B₂.

* * * * *

Les acides aromatiques ne sont pas des substrats naturels de la lipase B de *Candida antarctica*. Nous avons donc effectué une étude préliminaire de la sélectivité du Novozym 435® vis-à-vis de ces donneurs d'acyle avec le butan-1-ol comme accepteur d'acyle et comme solvant. Nos résultats ont confirmé les études réalisées dans les mêmes conditions réactionnelles (Guyot *et al.*, 1997, Stamatis *et al.*, 1999, Stamatis *et al.*, 2001, Buisman *et al.*, 1998).

Nos résultats montrent que :

- La présence d'un carbone insaturé en α du carboxyle (acides cinnamiques et benzoïques) provoque une gêne stérique importante au sein du site actif qui a pour effet de ralentir la cinétique d'estérification.
- La présence d'un groupement donneur d'électron sur le cycle (par effet mésomère) est défavorable à la synthèse lorsqu'il est conjugué à la fonction acide.
- Les hydroxyles phénoliques semblent mal acceptés au sein de la poche hydrophobe recevant le groupement acyle du fait de leur hydrophilie. Alors que, certains acides aromatiques porteurs de fonctions méthoxyles relativement plus hydrophobes mais toujours donneurs d'électrons sont un peu mieux acceptés que leurs homologues hydroxylés.

NB : les esters phénoliques « conjugués » tels que le 4-hydroxybenzoate de méthyle sont très peu hydrolysés par la CALB dans le M_2B_2 . En effet, une expérience menée avec 1 mmol de 4-hydroxybenzoate de méthyle, 5 ml de mélange M_2B_2 : H_2O , 9 : 1 ; v : v, à 50°C, sous pression atmosphérique pendant 48 h et en présence de 100 mg de Novozym 435® n'a permis d'observer que des traces d'acide 4-hydroxybenzoïque. Ainsi, les faibles résultats obtenus en synthèse sont aussi retrouvés en hydrolyse.

Cependant, d'autres auteurs ont pu mener à bien des transformations de dérivés salicyliques (Maugard *et al.*, 2001) et féruliques (Compton *et al.*, 2000) catalysées par la CALB dans des conditions différentes. Ainsi, la sélectivité de la lipase est hautement dépendante des conditions opératoires.

C'est ce que nous avons nous-même observé pour l'acylation des flavonoïdes : alors qu'en présence d'un alcool (butan-1-ol, M_2B_2) comme solvant, la réactivité du salicylate est faible voire nulle, l'acylation de la phloridzine en milieu « donneur d'acyle » avec le salicylate de méthyle a lieu aussi rapidement qu'avec le cinnamate ou le benzoate de méthyle (tableau 44).

tableau 44 : estérification des principaux donneurs d'acyle aromatiques de cette étude catalysée par le Novozym 435®

Groupements acyles	Conditions opératoires	Rendements, produits (temps nécessaire pour atteindre l'équilibre en heures)
benzoate de méthyle	accepteur d'acyle : butan-1-ol	75% benzoate de butyle (48 h*)
cinnamate d'éthyle	solvant : butan-1-ol	80% cinnamate de butyle (48 h*)
salicylate de méthyle	65°C, 500 mbar	<10% salicylate de butyle (48 h*)
acide benzoïque	accepteur d'acyle : phloridzine	50% benzoate de phloridzine (200 h*)
acide cinnamique	solvant : M ₂ B ₂	65% cinnamate de phloridzine (200 h*)
acide salicylique	65°C, 180 mbar	0% salicylate de phloridzine (200 h*)
benzoate de méthyle	accepteur d'acyle : phloridzine	100% benzoate de phloridzine (8 h)
cinnamate d'éthyle	solvant : donneur d'acyle	100% cinnamate de phloridzine (8 h)
salicylate de méthyle	80°C, 200 mbar	100% salicylate de phloridzine (8 h)

* : équilibre non atteint

Nous avons aussi pu observer que les synthèses du 4-hydroxyphénylacétate et du 4-hydroxyphénylpropionate de phloridzine (effective en milieu M₂B₂) n'ont pas lieu en milieu donneur d'acyle. Ceci est dû à une trop grande viscosité des donneurs d'acyle qui ne permet pas le mélange des différents acteurs de la synthèse.

La faisabilité de l'acylation des flavonoïdes glycosylés par les acides aromatiques dépend donc de trois paramètres :

- la réactivité propre du donneur d'acyle
- son acceptabilité par la CALB
- les propriétés physiques et chimiques du solvant comprenant (i) sa capacité à solubiliser le flavonoïde, (ii) son influence sur l'activité du catalyseur (chapitre 1, § II.2.4.1.2), (iii) son influence sur la réactivité du donneur d'acyle : l'organisation des molécules de salicylate de méthyle entre elles (dans les milieux sans solvant) leur offrirait-elle une réactivité plus importante que lorsqu'elles interagissent avec un solvant de nature alcoolique (butan-1-ol et M₂B₂) ?

LES MOYENS DE CONTOURNER LA SELECTIVITE DE LA LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA*

L'échec de l'estérification des acides phénoliques « conjugués » (mis à part l'acide salicylique) nous a conduits à essayer de contourner la sélectivité de CALB.

Nous avons envisagé pour cela plusieurs stratégies :

- la modification du pH du milieu réactionnel
- l'utilisation de deux types de pontage entre le flavonoïde et le groupement phénolique.

* * * * *

Un des moyens envisagé pour améliorer la réactivité des donneurs d'acyle phénoliques est l'ajout dans le milieu réactionnel d'un composant de nature basique susceptible d'orienter différemment l'induction électronique au sein des donneurs d'acyles aromatiques porteurs d'un phénol conjugué à la fonction carboxylique.

Gao *et al.*, 2001 ont ainsi utilisé pour milieu réactionnel un mélange de solvants organiques contenant de la pyridine. La pyridine permet la solubilisation des flavonoïdes dans le solvant organique où ils ne sont à l'origine que faiblement solubles. Cependant, la pyridine est aussi un solvant basique. Elle peut donc modifier la protonation des groupements ionisables du site catalytique, favorisant éventuellement le positionnement du donneur d'acyle pour une formation et une stabilisation plus efficace du complexe tétraédrique.

Cette hypothèse est testée avec différents additifs plus ou moins basiques : la pyridine, la N,N-diméthyl-octylamine et le DMSO pour la synthèse du caféate de phloridzine. La pyridine et la N,N-diméthyl-octylamine sont introduits dans le milieu réactionnel à la concentration de 0,5 et 2,5% (v/v). Le DMSO est utilisé à la concentration de 1% (v/v).

Les milieux réactionnels sont composés de 50 μmol de phloridzine, 250 μmol d'acide caféique, 5 ml de M_2B_2 préalablement déshydraté. La réaction est initiée par l'addition de 100 mg de Novozym 435®. Des prélèvements effectués pendant 100 h permettent de suivre la réaction par analyse CLHP (gradient B). les résultats montrent que la présence de composé basique ne permet pas l'estérification de l'acide caféique. Non seulement, il n'y a aucune trace de produit d'estérification mais on observe en plus la formation de produits de

dégradation de la phloridzine et de l'acide caféique en quantité importante en présence de N,N-diméthyl-octylamine et en plus faibles proportions avec la pyridine.

On peut donc en déduire que les bons résultats obtenus par Gao *et al.*, 2001 sont plutôt dus à l'utilisation de donneurs d'acyles sous forme vinylique qu'à la basicité du solvant.

* * * * *

Puisque l'hydrolyse des « esters phénoliques conjugués » est très difficile (p 196), on peut envisager l'estérification directe d'un acide chlorogénique sur un flavonoïde.

Les acides chlorogéniques sont des esters formés entre certains acides trans cinnamiques et l'acide quinique. Ils sont notamment abondants dans tous les fruits. Le plus commun est l'acide 5-caféoylquinique (figure 98).

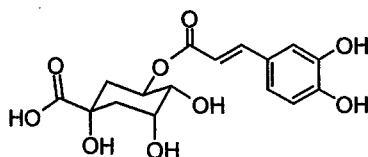


figure 98 : structure d'un acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique)

L'estérification de l'acide 5-caféoylquinique a précédemment été réalisée par Guyot *et al.*, 2000 dans des milieux où l'accepteur d'acyle (octan-1-ol, dodécane-1-ol ou hexadécane-1-ol) joue le rôle du solvant. Ces auteurs ont montré que la CALB ne catalyse pas la synthèse de caféate d'alkyle par transestérification mais la synthèse de caféoylquininate d'alkyle par estérification directe.

Nous avons mis en œuvre l'estérification de l'acide 5-caféoylquinique en milieu butan-1-ol dans les conditions utilisées précédemment (chapitre 3, § I). L'analyse CLHP révèle la conversion de 43 % de l'acide chlorogénique introduit après 48 h de réaction et ne montre pas l'apparition d'acide caféique suggérant que l'acide 5-caféoylquinique n'est pas hydrolysé. Selon les résultats obtenus par Guyot *et al.*, 2000, le produit formé est le caféoylquininate de butyle. Nous obtenons un taux de conversion de l'acide 5-caféoylquinique équivalent à celui de l'acide cinnamique dans les mêmes conditions (tableau 45) et à une vitesse très supérieure à celle obtenue par Guyot *et al.*, 2000 (60% en 20 jours) dans des conditions légèrement différentes. Ceci peut être dû à une solubilité accrue dans le butan-1-ol

par rapport aux alcools à chaîne carbonée plus longue ainsi qu'à la température légèrement plus élevée (65 contre 60°C pour l'étude de Guyot *et al.*, 2000) mais aussi à une disponibilité en eau réduite dans nos milieux grâce au stockage du solvant sur tamis moléculaire avant emploi.

tableau 45 : estérifications de l'acide 5-caféoylquinique catalysée par le Novozym 435®

Conditions opératoires	Rendement, produits (temps nécessaire pour atteindre l'équilibre en heures)
accepteur d'acyle : butan-1-ol solvant : butan-1-ol 65°C, 500 mbar	43% (48 h*) 5-caféoylquininate de butyle
accepteur d'acyle : phloridzine solvant : M ₂ B ₂ 65°C, 180 mbar	Aucune réaction

* : équilibre non atteint

Néanmoins, l'acylation de la phloridzine par l'acide 5-caféoylquinique en milieu M₂B₂ n'a pas lieu. Il est probable que ces deux substrats de taille importante provoquent une gêne stérique dans le site actif de la lipase.

* * * * *

Nous avons montré que l'estérification d'« acides phénoliques conjugués » catalysée par la CALB est peu efficace. En revanche, cette lipase catalyse l'acylation d'alcools phénoliques (Buisman *et al.*, 1998, Rahal, 2000). Nous avons donc envisagé d'utiliser un diacide aliphatique pour effectuer le pontage entre un flavonoïde et un alcool phénolique.

Nous avons choisi d'utiliser le malonate de diéthyle à la fois comme donneur d'acyle et comme solvant pour acyler la phloridzine et l'isoquercitrine dans les conditions utilisées précédemment (chapitre 3, § IV.2). Comme dans le cinnamate d'éthyle, la phloridzine est soluble à 10 mM dans le malonate de diéthyle, alors que l'isoquercitrine ne l'est pas. La réaction a cependant lieu et les analyses CLHP montrent la formation de plusieurs produits.

Quatre produits sont formés lors de l'acylation de la phloridzine. Leurs temps de rétention en CLHP (gradient A) sont de 600 s (P600), 690 s (P690), 770 s (P770) et 900 s (P900), tous supérieurs à celui de la phloridzine. Ils sont donc plus hydrophobes que la phloridzine. Les composés P600 et P770 apparaissent rapidement et sont présents en grande quantité alors que P690 et P900 ne sont détectés qu'après 1 heure de réaction (figure 99).

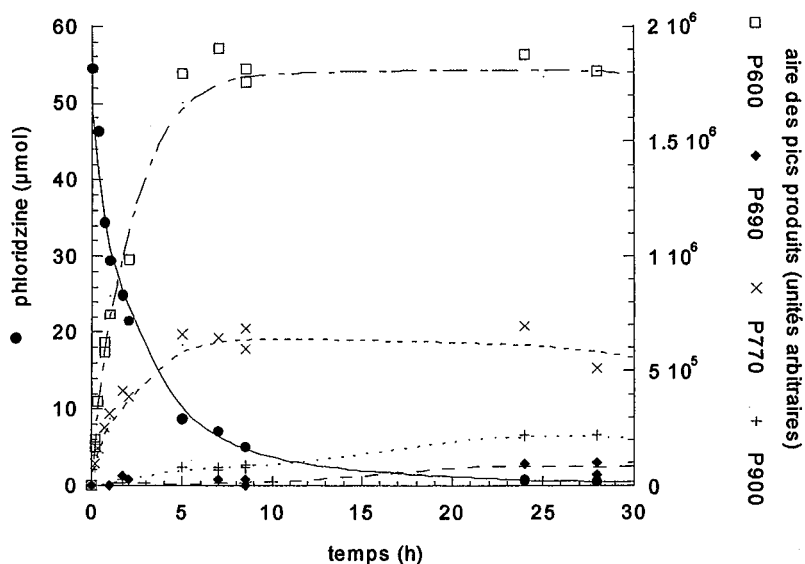


figure 99 : acylation de la phloridzine en milieu malonate de diéthyle.

Conditions expérimentales : phloridzine 50 μmol , malonate de diéthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

Ces produits n'ont pu être purifiés, mais on peut supposer que le produit majoritaire (P600) est le 6''-O-(éthyl-malonate) de phloridzine (figure 100). Quant aux autres produits, il peut s'agir de phloridzine acylée en position 3'', de diesters de phloridzine ou encore de produits de couplage entre deux molécules de phloridzine par un pont malonate. La totalité de la phloridzine introduite est transformée en 30 h.

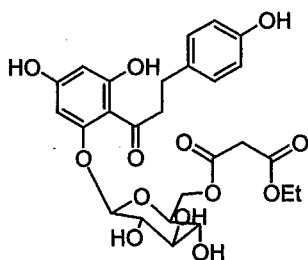


figure 100 : structure du 6''-O-(éthyl-malonate) de phloridzine

L'acylation de l'isoquercitrine ne donne lieu qu'à la formation de deux produits dont les temps de rétention en CLHP (gradient A) sont de 400 s (P400) et 480 s (P480). Le produit majoritaire est P400, il s'agit certainement du 6''-éthyl-malonate d'isoquercitrine. Comme la phloridzine, l'isoquercitrine est totalement transformée en 30 h.

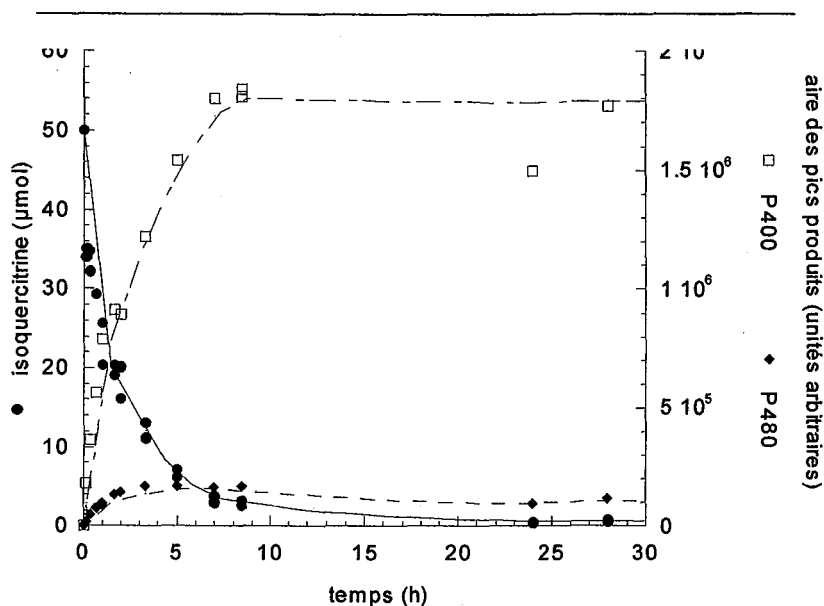


figure 101 : acylation de l'isoquercitrine en milieu malonate de diéthyle.

Conditions expérimentales : isoquercitrine 50 µmol, malonate de diéthyle 5 ml, Novozym 435® 100 mg, réacteur ballon d'évaporation muni de chicanes, agitation 40 rpm, 80°C, 200 mbar.

L'utilisation des milieux « donneurs d'acyles » nous a permis d'obtenir l'acylation du flavonoïde beaucoup plus rapidement (100% de conversion du flavonoïde en plusieurs produits) que Riva *et al.*, 1996 qui utilisent le Novozym 435® pour synthétiser le 6''-benzyl malonate d'isoquercitrine (74% de conversion en 12 jours) dans un mélange acétone/pyridine (90/10 ;v/v).

La méthode d'extraction liquide/liquide mise au point pour la purification des dérivés aromatiques permet également de séparer les esters maloniques de flavonoïde du malonate de diéthyle.

Il est donc possible à partir de cet intermédiaire d'envisager le greffage d'un alcool phénolique. Les conditions expérimentales devront être optimisées pour favoriser l'alcoolyse du groupement éthyle et non celle du flavonoïde. Cette étude pourrait débiter par la mise en présence du mélange d'esters maloniques de flavonoïdes avec une quantité équimolaire d'alcool phénolique et le Novozym 435® dans le M₂B₂ séché sur tamis moléculaire. Ce travail n'a pas été réalisé dans le cadre de cette thèse.

Le couplage de deux molécules identiques ou de natures différentes au moyen d'un diacide a déjà été évoqué dans plusieurs brevets déposés par une équipe américaine (Dordick *et al.*, 2000, Kmelnitsky *et al.*, 2001). Maugard *et al.*, 2002 ont également réalisé un pontage entre le rétinol et le sorbitol au moyen de l'acide adipique. Les résultats obtenus sont

encourageants ; néanmoins, il semble utopique de mettre en œuvre un tel procédé au niveau industriel, d'une part, parce que deux étapes sont nécessaires à la synthèse du composé et d'autre part, parce que les alcools phénoliques du type conyférylique sont très onéreux.

Etant donné les inconvénients des méthodes envisagées pour contourner la sélectivité de la CALB vis-à-vis du groupement acyle, la meilleure solution pour synthétiser des « esters phénoliques conjugués » serait certainement de faire appel à des enzymes spécifiques de ces acides.

LES ENZYMES SPECIFIQUES DE L'ESTERIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES

Andersen *et al.*, 2002 ont montré que de nombreuses préparations enzymatiques disponibles commercialement (cutinases de *Fusarium solani pissi*, *Humicola insolens*, *Aspergillus oryzae*, lipases de *Thermomyces lanuginosa*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* et de *Candida antarctica* A et B) n'agissent pas significativement sur les esters d'acide férulique. Mais, il existe des enzymes spécifiques de l'hydrolyse de ces composés : les phénolates estérases.

Parmi celles ci, les tannases et les férulate estérases sont actuellement très étudiées et se sont révélées aptes à catalyser l'estérification d'acides phénoliques en milieu organique.

* * * * *

Les tannases (tannin acyle hydrolases EC, 3.1.1.20) catalysent naturellement l'hydrolyse des tannins dits hydrolysables : esters d'acide gallique (acides digalliques, gallates de catéchine, esters galliques de glucose). Elles sont employées dans le traitement des jus de fruits et des boissons aromatisées au café en tant qu'agent clarifiant, mais les principales applications des tannases concernent la confection des thés instantanés et la production d'acide gallique (Lekha & Lonsane, 1997).

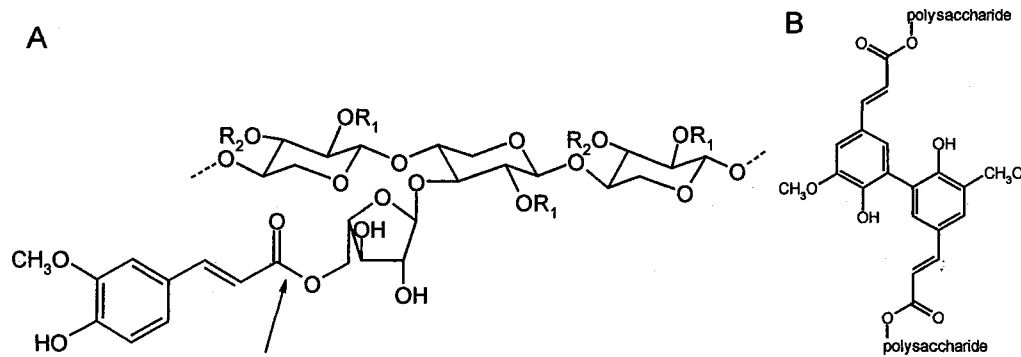
Les premières descriptions de l'activité synthétique des tannases datent du milieu du 20^{ième} siècle (Weetall, 1985a). Dès 1985, une tannase produite par *Aspergillus niger* (Weetall, 1985b) a été utilisée sous forme soluble et sous forme immobilisée pour estérifier l'acide gallique soit en milieu tamponné avec une forte concentration en substrat alcoolique, soit dans un solvant apolaire : l'hexane.

Les différentes études (Weetall, 1985a, Weetall, 1985b, Beverini, 1987) montrent que les tannases sont très spécifiques de l'acide gallique mais peu spécifiques de l'alcool. L'acide gallique a pu être estérifié par le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'alcool amylique, l'acide gallique, le glucose, le 1,3-propanediol, le 1,2-butanediol... L'estérification a lieu sur les alcool primaires ou secondaires.

Ainsi, il est probable que les tannases soient capables d'acyler des flavonoïdes glycosylés avec des groupements acides galliques en milieu organique.

* * * * *

Les férulate estérases (FAE) sont impliquées dans la dégradation des parois végétales polysaccharidiques. En effet, au sein de la paroi, les polysaccharides sont liés entre eux ou avec d'autres polymères (lignines) par des ponts constitués de dérivés phénoliques (diférulates ou dityrosines). Par exemple, la liaison ester formée entre un arabinofuranoside et un acide férulique (figure 102) est hydrolysable par les FAE (Michelsen *et al.*, 2000).



**figure 102 : structure d'un ester d'arabinofuranoside et d'acide férulique (A), pont diférulate interpolysaccharide (B).
→ site de clivage par la FAE**

Les FAE sont actuellement largement étudiées car ces enzymes possèdent de nombreuses applications potentielles agroalimentaires et médicales. On peut citer l'amélioration de l'étape de filtration des sirops issus du blé, la production de vanilline, la production d'acide férulique pour son utilisation en tant que composé anti-cancéreux ou antioxydant (Michelsen *et al.*, 2000, Kikuzaki *et al.*, 2002).

Les nombreuses études ont permis d'établir que certaines FAE sont spécifiques de l'acide férulique (Ferreira *et al.*, 1999), mais que d'autres peuvent hydrolyser divers esters cinnamiques tels que les esters d'acide 4-hydroxycinnamique ou d'acide sinapique (acide 4-hydroxy-3,5-méthoxycinnamique) : on parle alors de cinnamate estérases (Bartholomé & Gomez-Cordoves, 1999, Sancho *et al.*, 1999).

Généralement, ces estérases nécessitent la présence d'un méthoxy en position 3 sur le cycle phénolique du groupement acyle pour être actives et n'ont pas d'activité lipasique (Andersen *et al.*, 2002, Aliwan *et al.*, 1999, Topakas *et al.*, 2003b). Ceci est illustré par les travaux de Prates *et al.*, 2001 portant sur le module FAE du complexe enzymatique xylanase 10B de *Clostridium thermocellum*. Ces auteurs ont montré que ce module FAE possède une poche superficielle liant spécifiquement les substituants hydroxy et méthoxy du résidu férulate. Le mécanisme catalytique de ce module enzymatique est montré figure 103.

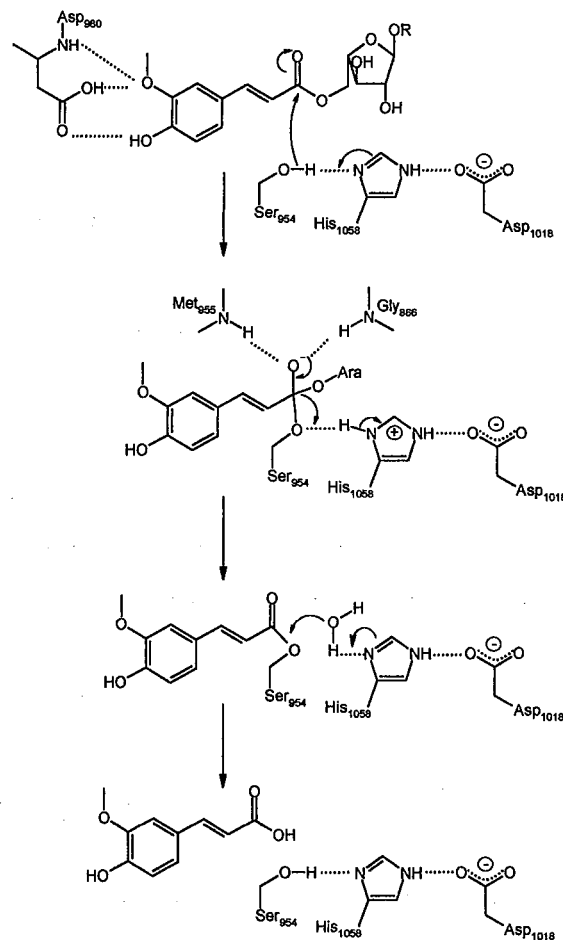


figure 103 : Mécanisme catalytique du module FAE de la xylanase 10B de *Clostridium thermocellum* (Prates *et al.*, 2001)

Les férulate estérases ont été très récemment utilisées pour la synthèse d'esters. Giuliani *et al.*, 2001 ont réalisé la synthèse de férulate de pentyle catalysée par une FAE d'*Aspergillus niger* dans une microémulsion eau dans huile en présence de cétyltriméthylammoniumbromide comme surfactant. Hatzakis *et al.*, 2003 ont utilisé la préparation enzymatique Pentopan 500 BG (Novo Nordisk) issue de *Humicola insolens* pour

acyler énantiosélectivement des alcools secondaires par l'acétate de vinyle. Pour finir Topakas *et al.*, 2003a; Topakas *et al.*, 2003b ont purifié deux FAE (I et II) du micro-organisme *Fusarium oxysporum* et ont testé leurs capacités à acyler le propanol ou le butanol par différents acides en microémulsion sans ajout de surfactant. Ils ont trouvé qu'avec la FAE-I comme catalyseur, la réactivité du 4-hydroxycinnamate de méthyle (75% de conversion en 140 h) est supérieure à celle du caféate de méthyle (22%), du férulate de méthyle (13%) et du sinapate de méthyle (1%). Par contre avec la FAE-II, l'estérification directe de l'acide 4-hydroxycinnamique et de l'acide férulique ne mène qu'à des rendements faibles (13 et 16% respectivement en 224 h) alors que l'acide 4-hydroxyphénylpropionique et l'acide 4-hydroxyphénylacétique sont plus efficacement transformés (70 et 75% respectivement).

Ainsi, les réactions restent lentes et les rendements variables suivant la nature du donneur d'acyle. Ces résultats sont cependant encourageants quant à l'utilisation de ce type d'enzyme pour l'estérification des acides de la série cinnamique. On note en outre que les premiers essais de synthèse ont été réalisés avec des alcools aliphatiques comme accepteur d'acyle, alors que les acyles naturellement hydrolysés par les FAE sont portés par un résidu glycosidique. Topakas *et al.*, 2003b ont d'ailleurs montré que les esters cinnamiques d'arabinofuranose étaient plus efficacement hydrolysés que les esters de méthyle. Ceci permet d'espérer que l'estérification de composés glycosylés (tels que les flavonoïdes) pourrait être plus rapide.

PROPRIETES DES ESTERS SYNTHETISES

De nombreux esters aromatiques de flavonoïdes ont été synthétisés dans cette étude. Cependant, tous n'ont pu être purifiés. Pour ceux qui l'ont été, seule l'influence du groupement aromatique sur le spectre d'absorption UV a été étudiée (tableau 46).

Le tableau 46 présente les résultats d'analyse en spectrométrie UV-visible des différents produits synthétisés et des substrats correspondants. Pour les esters purifiés (exception faite du cinnamate d'isoquercitrine), la longueur d'onde d'absorption maximum avoisine 280 nm, elle n'est que peu ou pas modifiée. Son intensité augmente et est en générale proche de la somme des absorptions des deux substrats. Il semble donc que les groupes

aromatiques des acyles ne soient pas en interaction avec le noyau des flavonoïdes puisqu'on n'observe pas d'effet bathochrome.

tableau 46 : longueurs d'onde maximales d'absorption et densités optiques des esters aromatiques de flavonoïde purifiés.

	acide benzoïque $\lambda_{273} = 0,010$	acide cinnamique $\lambda_{273} = 0,198$	acide salicylique $\lambda_{304} = 0,034$
isoquercitrine $\lambda_{360} = 0,170$ $\lambda_{255} = 0,197$		cinnamate d'isoquercitrine* $\lambda_{358} = 0,168$ $\lambda_{266} = 0,340$	
néohespéridine dihydrochalcone $\lambda_{282} = 0,227$		cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone $\lambda_{277} = 0,342$	Salicylate de néohespéridine dihydrochalcone $\lambda_{283} = 0,204$
phloridzine $\lambda_{285} = 0,207$	benzoate de phloridzine $\lambda_{283} = 0,209$	cinnamate de phloridzine $\lambda_{285} = 0,348$	salicylate de phloridzine $\lambda_{285} = 0,210$
phloridzine $\lambda_{285} = 0,207$	acide benzoïque + phloridzine $\lambda_{285} = 0,219$	acide cinnamique + phloridzine $\lambda_{285} = 0,404$	acide salicylique + phloridzine $\lambda_{285} = 0,215$

Spectres UV-visible déterminés à partir de solutions de composé (10 μ M) dans le méthanol (0,1% TFA).

* : spectre UV-visible du cinnamate d'isoquercitrine déterminé dans le méthanol/DMSO (90/10 ; v/v)

Les groupements aromatiques, en absorbant les rayonnements UV, préviennent l'initiation des réactions d'oxydation par la lumière (chapitre 1, § I.2.4.2). L'utilisation de ces esters comme écran solaire ne dépend pas uniquement de l'absorption des rayonnements UV mais aussi de leur solubilité dans le produit formulé et de leur capacité à interagir avec la peau.

La poursuite de ce travail devrait dans un premier temps porter sur la caractérisation des propriétés des esters synthétisés.

La modification du pouvoir antioxydant sera plus facilement mise en évidence sur un ester de flavonol tel que l'isoquercitrine. En effet, les flavonols font partie des meilleurs antioxydants de type flavonoïde (Rice-Evans *et al.*, 1996) alors que les dihydrochalcones ont un pouvoir antioxydant plus modeste particulièrement lorsque le groupe hydroxyle en 2' n'est pas libre (phloridzine, Rezk *et al.*, 2002, Nakamura *et al.*, 2003). Les tests d'activité antioxydante devront être judicieusement choisis car l'efficacité des antioxydants dépend des contraintes de solubilité, des éléments à protéger et des facteurs provoquant l'oxydation.

Parmi les groupements acyles qui ont pu être greffés sur les flavonoïdes, les plus susceptibles d'améliorer l'activité antioxydante sont l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique car ils possèdent une fonction catéchol (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Cependant, les autres groupements aromatiques sont susceptibles d'avoir une influence :

(i) Ils modifient la solubilité du flavonoïde. Par exemple, le groupement cinnamique augmente la solubilité des flavonoïdes dans les milieux apolaires (le cinnamate d'isoquercitrine est soluble dans le cinnamate d'éthyle à 80°C, à 20 mM alors que l'isoquercitrine ne l'est pas).

(ii) Dans les milieux biologiques, la disponibilité peut augmenter par le phénomène de complexation réversible avec les protéines (Dangles *et al.*, 2001).

(iii) Il est aussi important de savoir quelle est l'influence de l'acylation sur les propriétés biologiques des flavonoïdes : les esters de phloridzine conservent-ils des propriétés amincissantes ? Les esters de NHDC conservent-ils une saveur sucrée ? Les esters benzoïques sont réputés pour leurs propriétés antibactériennes, qu'en est-il des benzoates de flavonoïdes ?

conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la synthèse par voie enzymatique d'esters phénoliques de flavonoïdes glycosylés. De tels composés sont susceptibles d'être plus stables (à la température, à la lumière et aux milieux basiques) que les flavonoïdes non acylés. On pourrait aussi espérer un renforcement des propriétés antioxydantes et une capacité plus puissante à absorber les UVB. De plus, la biodisponibilité des esters de flavonoïdes devrait être améliorée par la modification de leur solubilité ainsi que par leur capacité accrue à se lier aux protéines (Dangles *et al.*, 2001). Par ailleurs, certains esters aromatiques de flavonoïdes ont des propriétés que leurs homologues non acylés ne possèdent pas, telles que les activités anti-inflammatoire (Havsteen, 2002) et antimicrobienne (Liu *et al.*, 1999).

Au cours de notre étude expérimentale, la lipase B de *Candida antarctica* a permis la synthèse régiosélective de nombreux esters aromatiques de flavonoïdes. Les synthèses ont été menées soit en milieu M₂B₂, soit en milieux « donneur d'acyle ». Ces derniers se sont révélés les plus efficaces : nous avons pu obtenir la conversion totale de certains flavonoïdes en moins de 12 h.

Cependant, l'acylation en milieu solvant par des acides phénoliques s'est montrée impossible lorsque le donneur d'acyle possède une fonction donneuse d'électron conjuguée à la fonction carboxylique. Parmi ces donneurs d'acyle, le salicylate de méthyle est le seul liquide dans nos conditions opératoires et il a permis l'acylation de la phloridzine en milieu « donneur d'acyle ».

Ainsi, les esters de flavonoïdes les plus intéressants tels que les esters caféiques n'ont pas pu être obtenus à l'aide de la lipase B de *Candida antarctica*. Néanmoins, l'utilisation des phénolates estérases, enzymes spécifiques des acides phénoliques, semble prometteuse et une étude est actuellement mise en œuvre au laboratoire.

Il serait maintenant intéressant de caractériser les propriétés des flavonoïdes isolés (cinnamate d'isoquercitrine, cinnamate, benzoate et salicylate de phloridzine et enfin cinnamate et salicylate de néohespéridine dihydrochalcone). La littérature fait état de quelques résultats dans ce domaine. Ainsi, Ishihara & Nakajima, 2003 ont pu montrer que certains esters aromatiques d'isoquercitrine et particulièrement les esters coumariques et cinnamiques étaient plus stables à la chaleur et à la lumière.

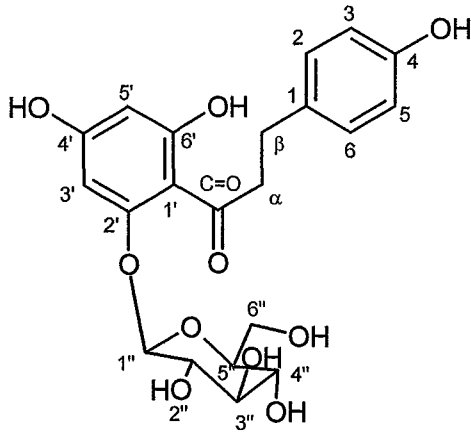
L'isoquercitrine elle-même possède des propriétés antioxydantes intéressantes : on peut penser que son ester cinnamique est plus efficace pour la protection des phases lipidiques. La phloridzine et la néohespéridine dihydrochalcone sont des agents séquestrants de radicaux moins efficaces que l'isoquercitrine (Lu & Foo, 2000) mais on peut penser que leurs esters ont un plus grand pouvoir photoprotecteur principalement contre les UVB.

Il sera aussi important de déterminer si ces esters conservent les propriétés biologiques et organoleptiques des flavonoïdes substrats.

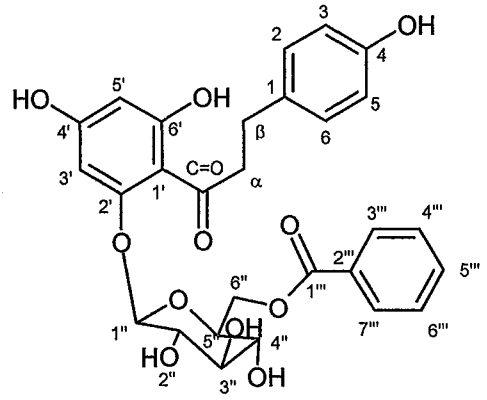
annexes

Structure des dérivés de phloridzine	211
Structure des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone	216
Structure des dérivés de l'isoquercitrine	221
Publication	226

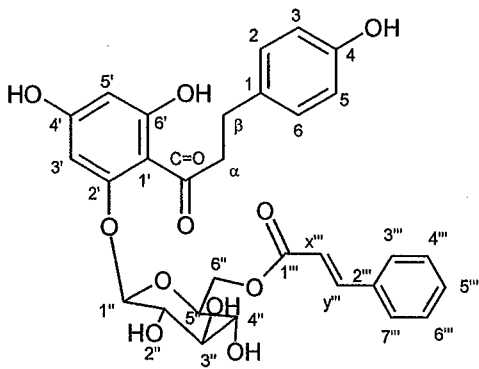
STRUCTURE DES DERIVES DE PHLORIDZINE



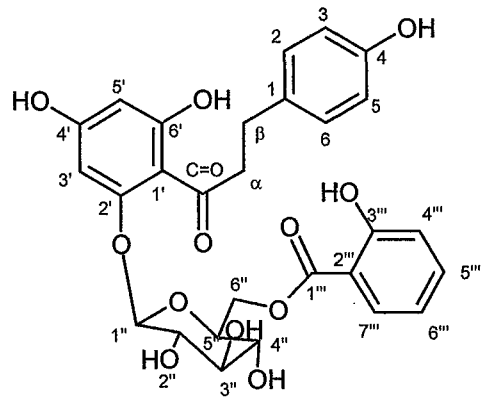
phloridzine



benzoate de phloridzine



cinnamate de phloridzine



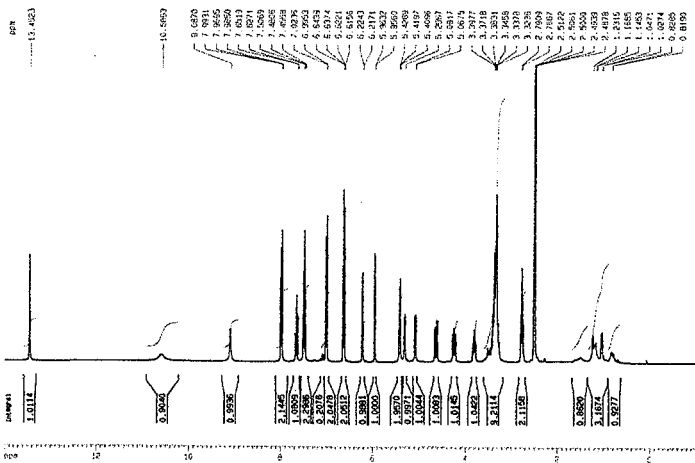
salicylate de phloridzine

Déplacements chimiques en RMN-¹H et RMN-¹³C des dérivés de phloridzine (dans le DMSO-d₆)

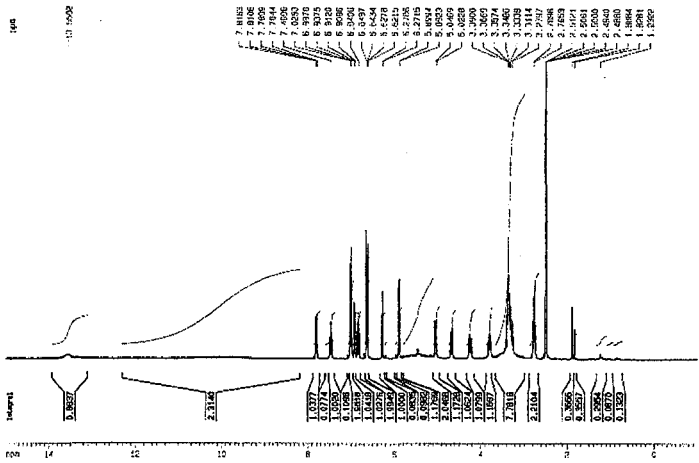
	phloridzine	benzoate de phloridzine		cinnamate de phloridzine		salicylate de phloridzine	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
phlorétine							
C=O	—	205,0	—	204,3	—	204,4	—
α	3,2 à 3,5	45,3	3,2 à 3,5	45,2	3,2 à 3,4	45,2	3,2 à 3,6
β	2,71	29,4	2,76	29,5	2,76	29,5	2,76
1	—	131,9	—	131,9	—	131,9	—
2	6,96	129,7	7,00	129,5	7,03	129,5	7,03
3	6,56	115,5	6,30	115,3	6,64	115,3	6,63
4	—	155,6	—	155,7	—	155,6	—
5	6,56	115,5	6,30	115,3	6,64	115,3	6,63
6	6,96	129,7	7,00	129,5	7,03	129,5	7,03
1'	—	105,5	—	104,8	—	104,9	—
2'	—	160,9	—	161,0	—	161,0	—
3'	6,06	97,2	6,22	97,6	6,18	97,5	6,27
4'	—	166,0	—	165,8	—	166,7	—
5'	5,85	94,8	5,86	95,5	5,91	95,4	5,89
6'	—	164,8	—	—	—	169,1	—
glucose							
1''	4,98	100,7	5,08	101,1	5,09	100,9	—
2''	3,2 à 3,5	74,3	3,2 à 3,5	74,3	3,2 à 3,4	74,2	3,2 à 3,6
3''	3,2 à 3,5	76,8	3,2 à 3,5	76,9	3,2 à 3,4	76,9	3,2 à 3,6
4''	3,2 à 3,5	73,5	3,2 à 3,5	73,6	3,2 à 3,4	73,5	3,2 à 3,6
5''	3,2 à 3,5	70,3	3,2 à 3,5	70,0	3,2 à 3,4	70,3	3,2 à 3,6
6''	a : 3,60 b : 3,43	64,6	a : 4,23 b : 4,62	63,9	a : 4,20 b : 4,47	64,8	a : 4,24 b : 4,68
acyle							
1'''	—	165,7	—	166,5	—	165,9	—
x'''	—	—	—	118,2	7,63	—	—
y'''	—	—	—	145,0	6,59	—	—
2'''	—	129,9	—	134,3	—	113,7	—
3'''	—	129,5	7,96	128,7	7,65	161,1	—
4'''	—	129,0	7,47	129,3	7,41	118,0	6,92
5'''	—	133,7	7,67	130,8	7,41	135,8	7,46
6'''	—	129,0	7,47	129,3	7,41	119,1	6,83
7'''	—	129,5	7,96	128,7	7,65	130,8	7,80

Spectres RMN-1H des dérivés de phloridzine

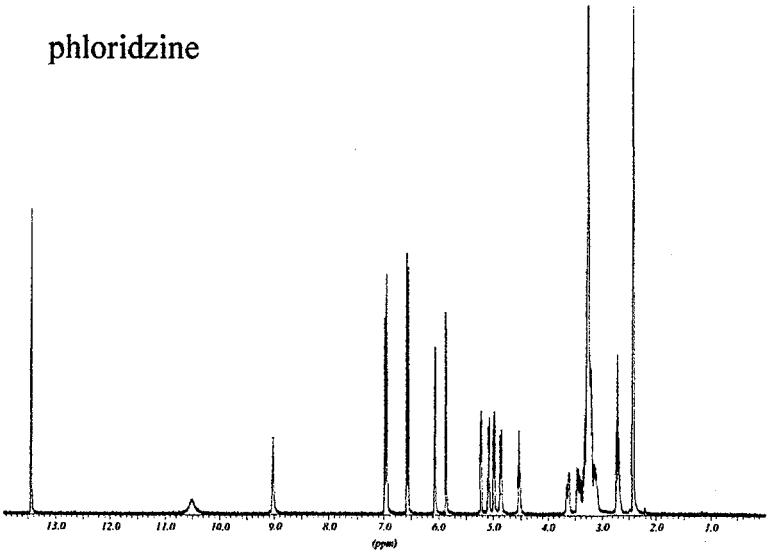
benzoate de phloridzine



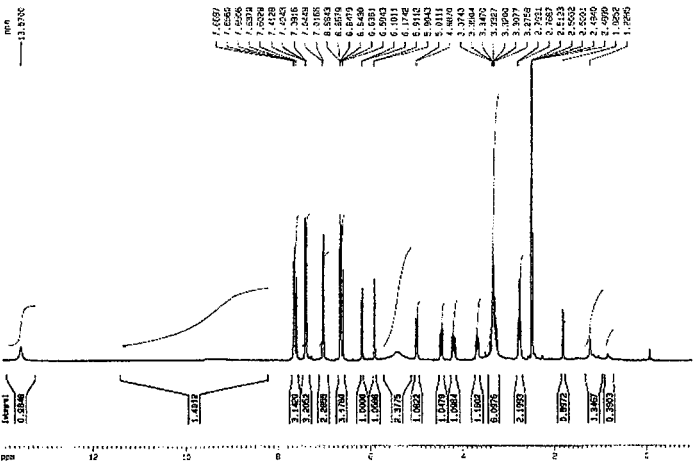
salicylate de phloridzine



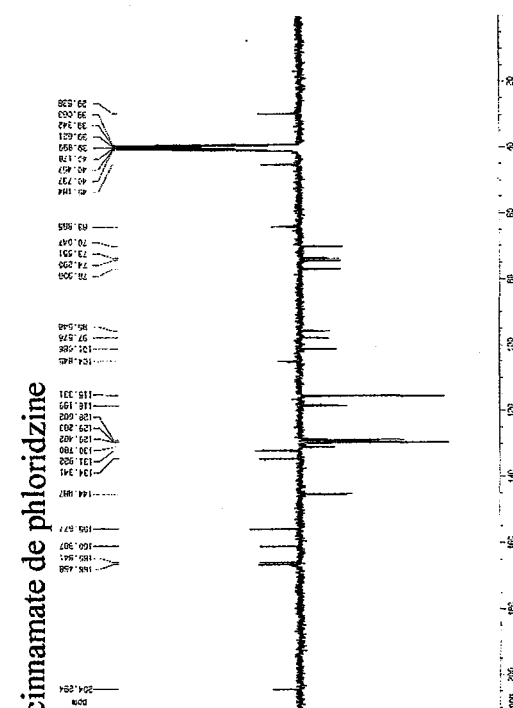
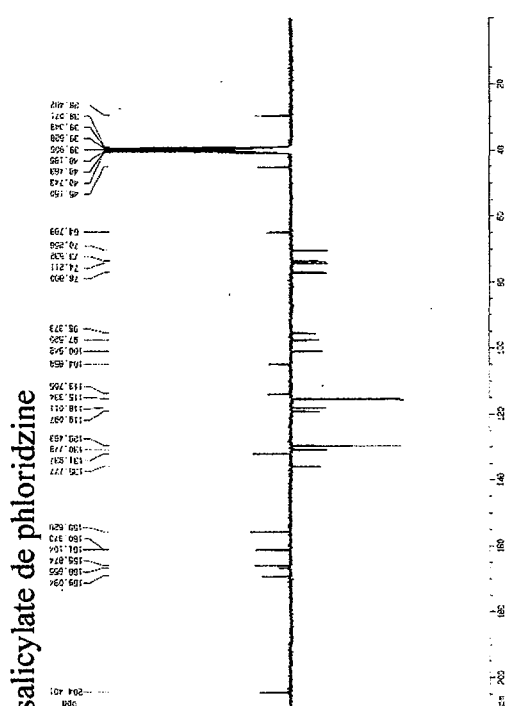
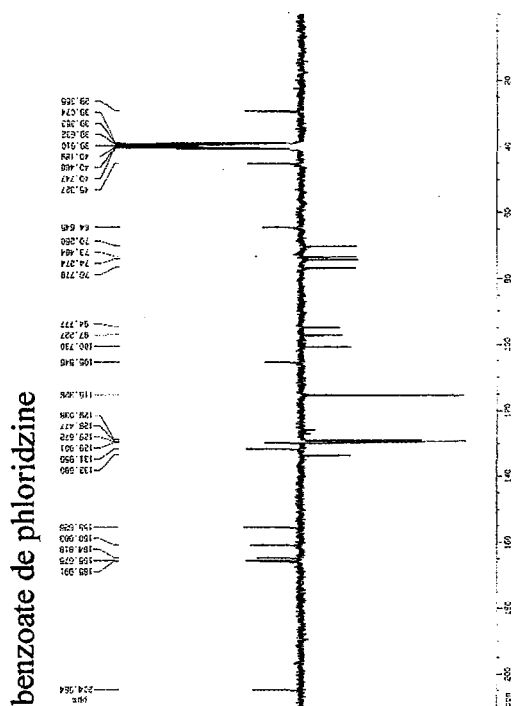
phloridzine



cinnamate de phloridzine

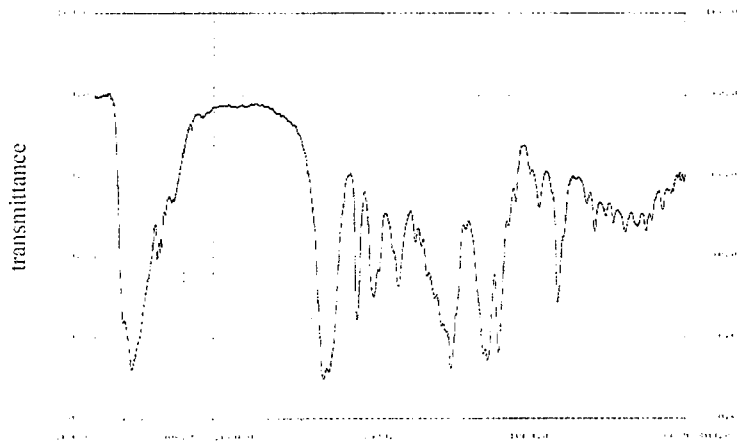


Spectres RMN-¹³C des dérivés de phloridzine

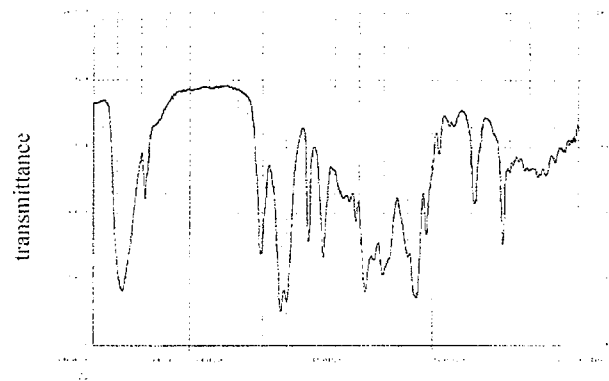


Spectres infrarouge des dérivés de phloridzine

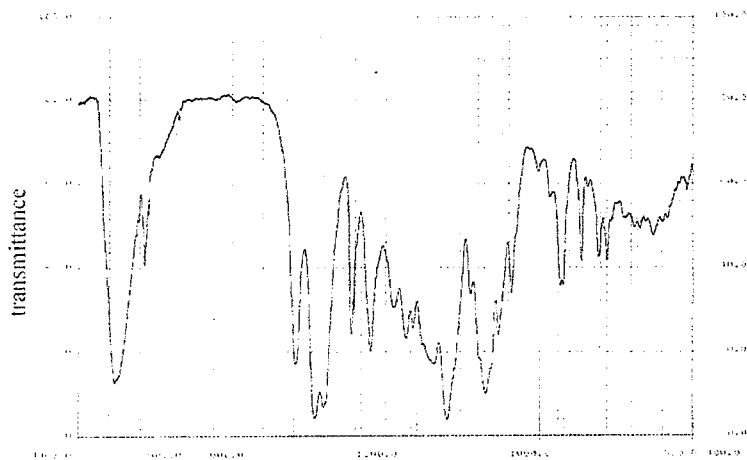
phloridzine



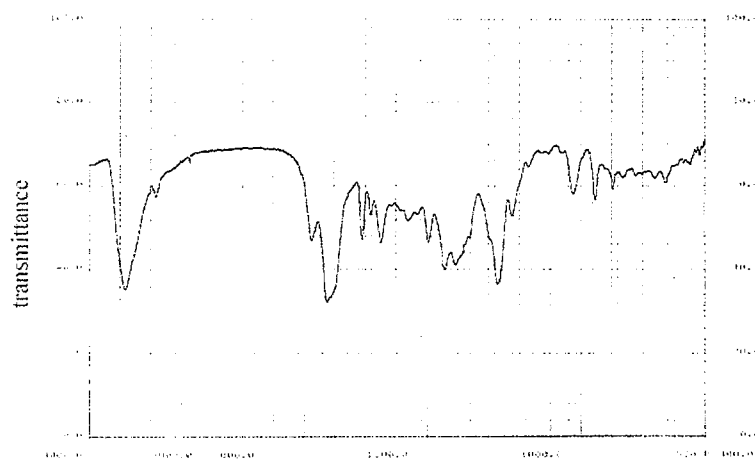
benzoate de phloridzine



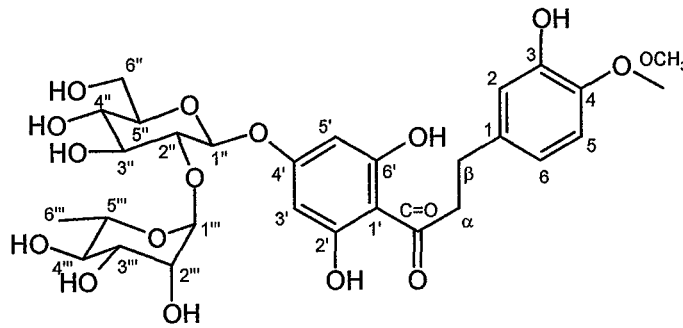
cinnamate de phloridzine



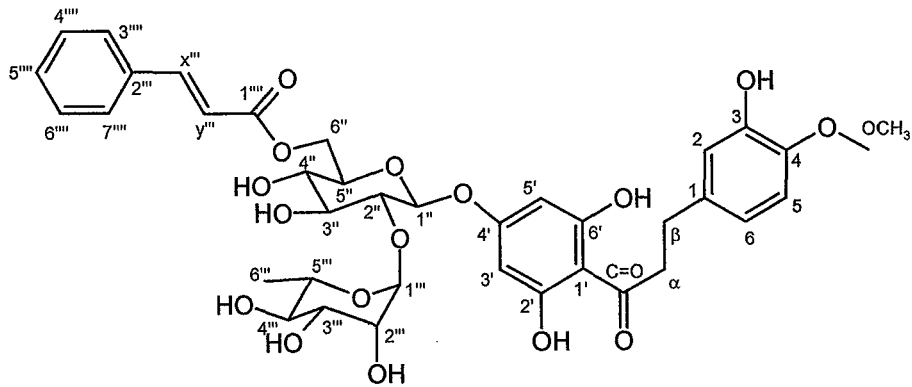
salicylate de phloridzine



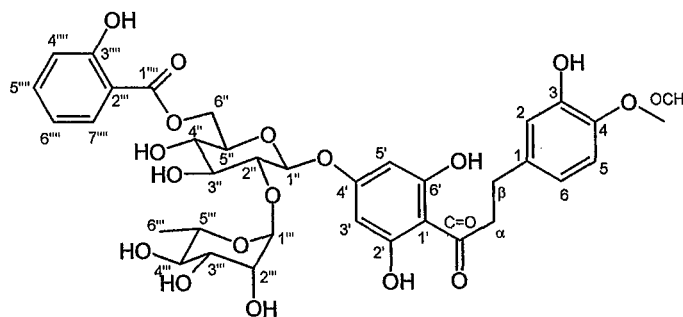
STRUCTURE DES DERIVES DE NEOHESPERIDINE DIHYDROCHALCONE



néohespéridine dihydrochalcone



cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone

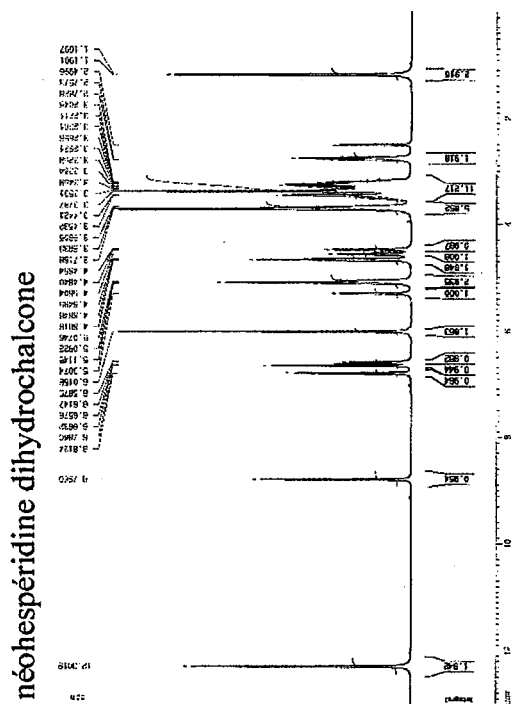


salicylate de néohespéridine dihydrochalcone

Déplacements chimiques en RMN-¹H et RMN-¹³C des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone (dans le DMSO-d₆)

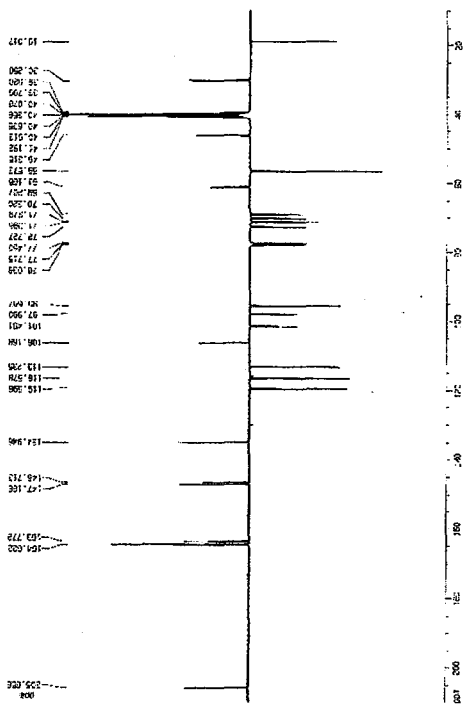
	néohespéridine dihydrochalcone		cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone		salicylate de néohespéridine dihydrochalcone	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
hespéridine dihydrochalcone						
C=O	205,85	—	205,82	—	205,9	—
α	46,31	3,2-3,7	46,32	3,2-4	46,31	—
β	30,25	2,8	30,24	2,72	30,24	2,76
1	134,94	—	134,87	—	134,95	—
2	116,58	6,66	116,61	6,66	116,59	6,66
3	146,71	—	146,71	—	146,71	—
4	147,19	OCH ₃	147,21	—	147,2	—
5	113,23	6,80	113,24	6,79	113,23	6,79
6	119,59	6,60	119,57	6,58	119,57	6,58
1'	106,17	—	106,25	—	106,22	—
2'	164,62	—	164,78	—	164,69	—
3'	95,69	6,01	95,68	6,03	95,63	6,07
4'	163,77	—	163,53	—	163,48	—
5'	95,69	6,01	95,68	6,03	95,63	6,07
6'	164,62	—	164,78	—	164,69	—
glucose						
1 ^o	56,57	5,00	56,58	5,09	56,57	5,09
2 ^o	97,98	3,2-3,7	97,77	3,2-4	97,57	—
3 ^o	77,71	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
4 ^o	77,45	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
5 ^o	70,32	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
6 ^o	78,04	3,2-3,7	—	4,16	—	4,26
6 ^o	61,16	3,2-3,7	64,31	4,41	64,31	4,59
rhamnose						
1 ^o	101,48	5,05	101,6	5,14	101,67	5,17
2 ^o	71,39	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
3 ^o	71,28	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
4 ^o	72,72	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
5 ^o	69,21	3,2-3,7	—	3,2-4	—	—
6 ^o	19,02	1,18	19,03	1,19	19,05	1,19
acyle						
1 ^o	—	—	166,89	—	169,61	—
x ^o	—	—	118,76	6,59	—	—
y ^o	—	—	145,47	7,58	—	—
2 ^o	—	—	134,97	—	113,45	—
3 ^o	—	—	129,11	7,55	161,16	—
4 ^o	—	—	129,73	7,37	118,12	6,92
5 ^o	—	—	131,34	7,37	136,73	7,45
6 ^o	—	—	129,73	7,37	120,27	6,84
7 ^o	—	—	129,11	7,55	131,16	7,8

Spectres RMN-¹H des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone



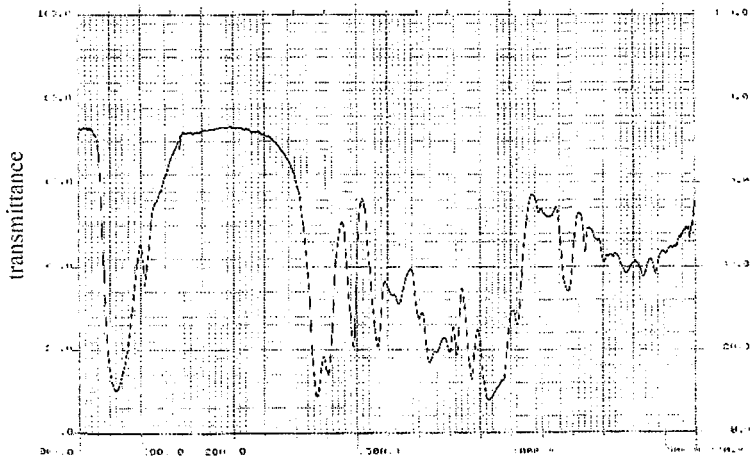
Spectres RMN-¹³C des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone

néohespéridine dihydrochalcone

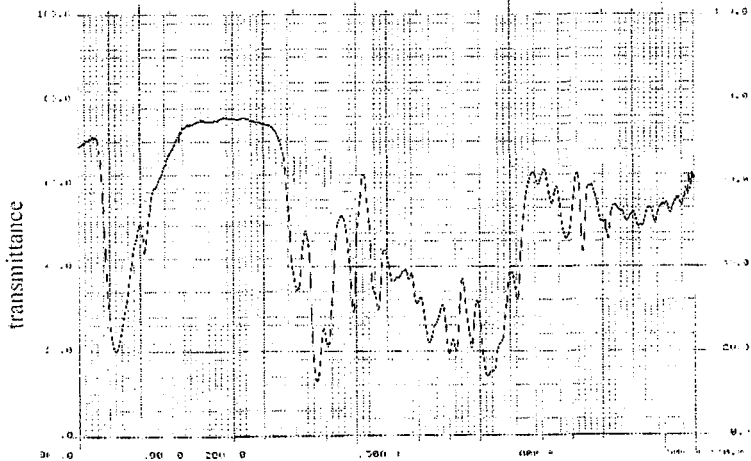


Spectres infrarouge des dérivés de néohespéridine dihydrochalcone

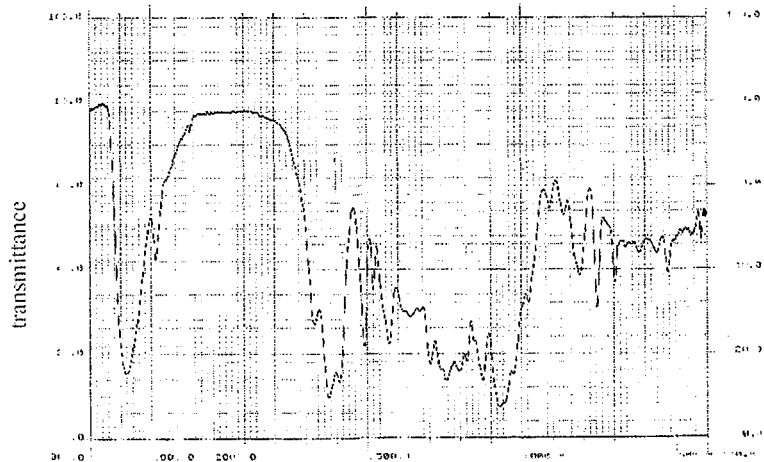
néohespéridine dihydrochalcone



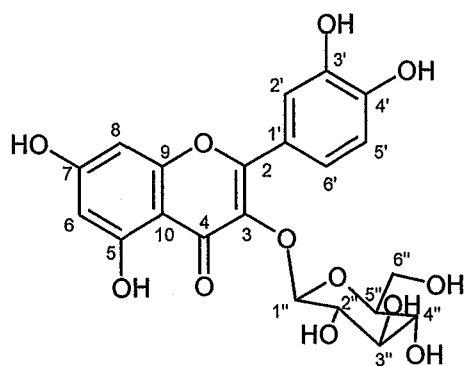
cinnamate de néohespéridine dihydrochalcone



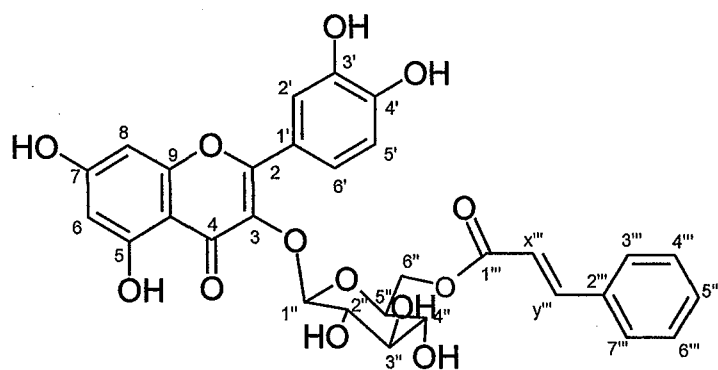
salicylate de néohespéridine dihydrochalcone



STRUCTURE DES DERIVES DE L'ISOQUERCITRINE



Isoquercitrine

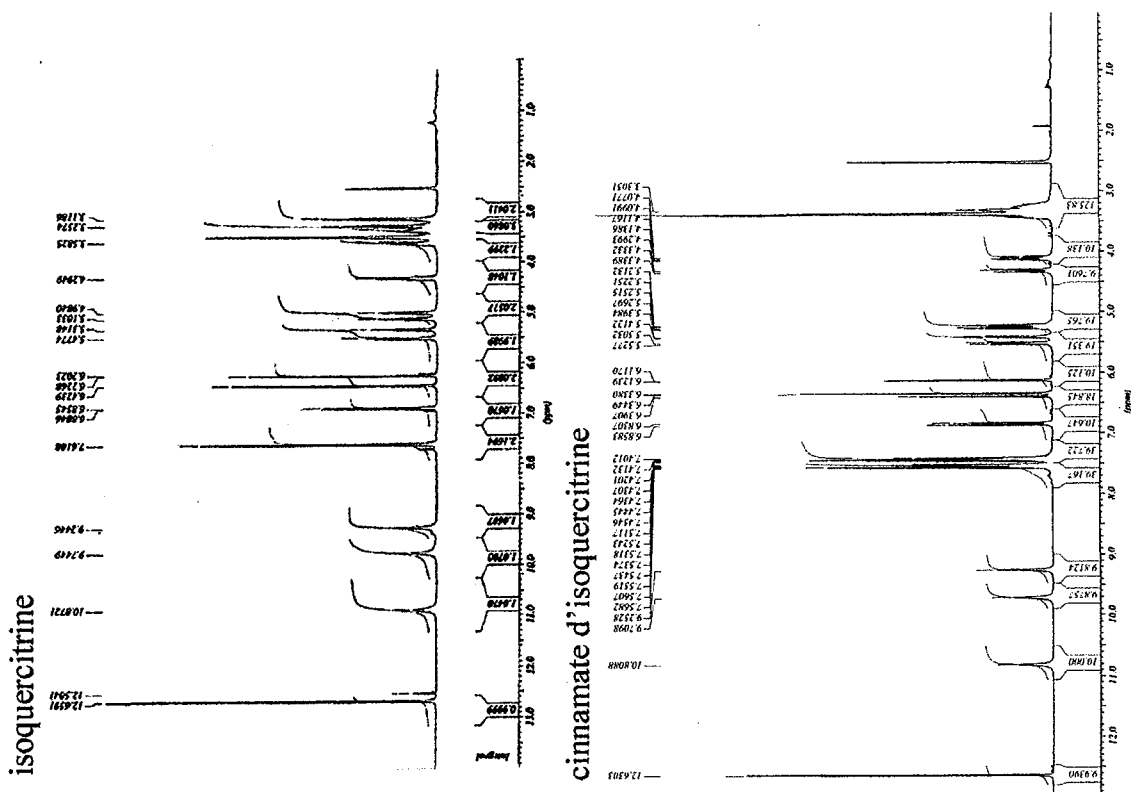


6''-O-cinnamate d'isoquercitrine

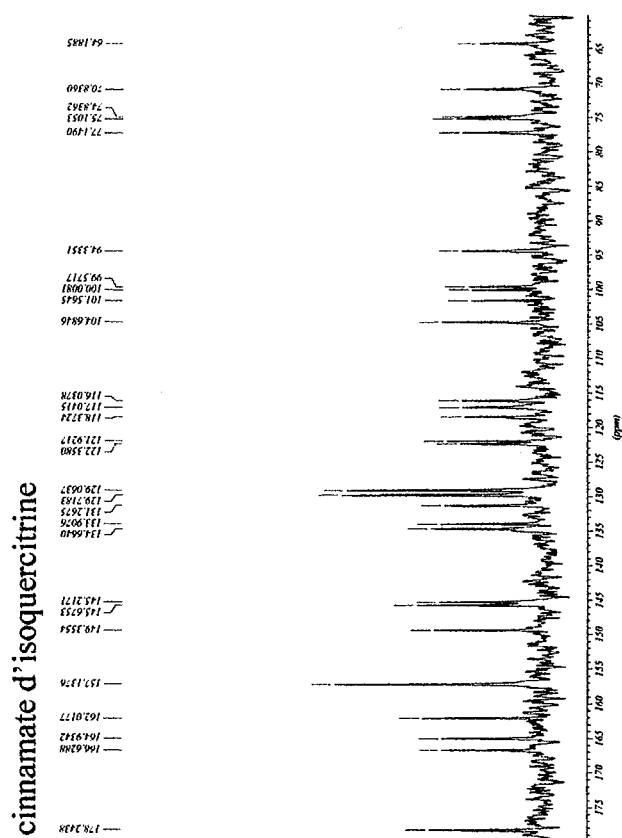
Déplacements chimiques en RMN-¹H et RMN-¹³C des dérivés de l'isoquercitrine
(dans le DMSO-d₆)

	isoquercitrine	cinnamate de phloridzine	
	δ_H	δ_C	δ_H
quercétine			
2		157,1	
3		133,9	
4		178,2	
5		162,0	
6	6,20	122,4	6,12
7		166,6	
8	6,42	94,3	6,33
9		157,1	
10		104,7	
1'		121,9	
2'	7,61	116,0	7,56
3'		145,7	
4'		149,4	
5'	6,86	117,0	6,84
6'	7,61	100,0	7,56
glucose			
1"	5,47	101,	5,40
2"	3,2 à 3,5	75,1	
3"	3,2 à 3,5	77,1	
4"	3,2 à 3,5	70,8	
5"	3,2 à 3,5	74,8	
6"	3,2 à 3,5	64,2	a : 4,10 b : 4,33
acyle			
1'''		164,9	
x'''		118,4	7,42
y'''		145,2	6,37
2'''		134,7	
3'''		129,7	7,52
4'''		129,1	7,45
5'''		131,3	7,45
6'''		129,1	7,45
7'''		129,7	7,52

Spectres RMN-¹H des dérivés de l'isoquercitrine

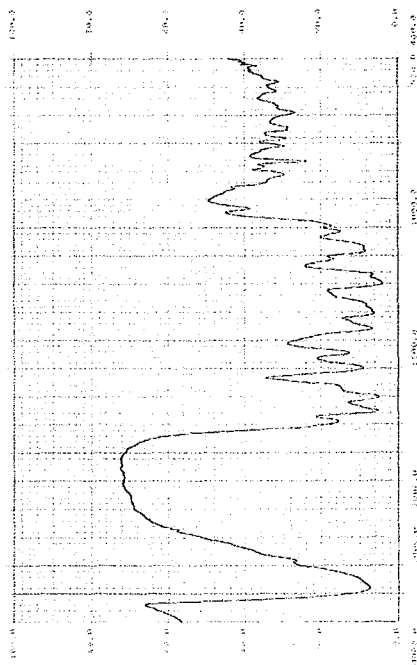


Spectres RMN-¹³C des dérivés de l'isoquercitrine



Spectres infrarouge des dérivés de l'isoquercitrine

cinnamate d'isoquercitrine



PUBLICATION



Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin

E. Enaud, C. Humeau, B. Piffaut*, M. Girardin

Laboratoire Bioprocédés Agroalimentaires, E.N.S.A.I.A.—I.N.P.L., 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172,
F 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received 16 June 2003; received in revised form 12 August 2003; accepted 12 August 2003

Abstract

Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on a macroporous acrylic resin (Novozym 435®) was used to catalyze the enzymatic synthesis of acylated derivatives of phloridzin a flavonoid from the dihydrochalcone family. Reactions were achieved under reduced pressure, in the presence of a large excess of acyl donor which also acted as a solvent for the acyl acceptor, phloridzin. The acylation of phloridzin by ethyl cinnamate was shown to be total and perfectly regioselective in favor of phloridzin-6''-O-cinnamate. The kinetic of the reaction was significantly improved by the temperature of the reaction medium best results being obtained at 80 °C. An amount of immobilized enzyme of 20 g l⁻¹ corresponding to 1.2 g l⁻¹ of proteins was chosen in order to obtain the total conversion of phloridzin after only few hours. Increasing phloridzin concentration allowed a maximal production of 119 g l⁻¹ phloridzin cinnamate after 80 h. Other esters like phloridzin-6''-O-benzoate and phloridzin-6''-O-salicylate were also prepared in similar conditions. However, only traces of ester were obtained when phenolic acyl donors like methyl *p*-hydroxyphenylacetate and methyl *p*-hydroxyphenylpropionate were used. All esters were purified and characterized.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Candida antarctica* lipase B; Enzymatic acylation; Flavonoid glycoside; Phloridzin

1. Introduction

Phenolic compounds are efficient antioxidants acting as free radical terminators or metal chelators [1]. Among them, flavonoids which are derivatives of benzo- γ -pyrone, are particularly interesting as natural antioxidants for foods and cosmetics. Flavonoids generally occur as glycosylated derivatives in plants where they contribute to the brilliant shades of leaves, flowers and fruits. Besides their antioxidant activity, some of them have a wide variety of physiological effects in both animals and plants as enzyme activators or inhibitors, transcription regulators and phytohormones [2]. However, their use is strongly limited by their weak solubility either in hydrophilic or hydrophobic formulations. An interesting way to enhance the solubility of flavonoid glycosides, and then to exploit their properties as well as possible, is their functionalisation with appropriate hydrophilic or hydrophobic radicals. Moreover functionalisation of flavonoids could be a way to enforce

their antioxidant activity with phenolic radicals or to bring additional properties with other active radicals.

A few studies are reported describing flavonoids functionalisation and especially acylation reactions which can be made either by a chemical way or an enzymatic way. Chemical acylation of flavonoids by various fatty acids was patented [3], but this process is not regioselective and leads to unwanted functionalisation of phenolic hydroxyl groups which are responsible for antioxidant activity of flavonoids [4].

Enzymatic acylation of flavonoids by fatty acids is also described in a few studies. Flavonoid disaccharides like rutin, hesperidin or naringin were acylated by butanoic acid in the presence of subtilisin [5]. Conversion yields were comprised between 33 and 65% and acylation was not regioselective, leading to mixtures of products. Danieli et al. [6] described the effective acylation (conversion yields around 80%) of flavonoid glycosides by vinyl acetate using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. More recently, Kontogianni et al. [7] presented the acylation of naringin and rutin by C8–C12 acids. Maximal conversion yield was about 65% after 10 days of reaction.

* Corresponding author. Fax: +33-3-83-59-57-71.

E-mail address: bernadette.piffaut@ensaia.inpl-nancy.fr (B. Piffaut).

The regioselective acylation of flavonoids with phenolic acids which may enhance not only their solubility in various media but also their stability [8] and their antioxidant activity [9] is an interesting way too. A two steps process could be applied where the subtilisin is firstly used to catalyze the acylation of flavonoid substrate with malonate [10]. This transformation was not total (65% conversion yield) and not regioselective which means intermediate purification steps. Secondly, a chemical Knoevenagel type condensation is applied leading to the desired arylaliphatic ester. A single step enzymatic process was also described in which Novozym 435[®] catalyzes alcoholysis reaction between flavonoid substrate and aromatic vinyl esters but yields and reaction rates remained low (maximal conversion yield was 70% after 5 days) [11,12].

One way to move esterification equilibrium towards synthesis is to work with a large excess of one substrate which also acts as a solvent for the second substrate (melting media). Such conditions were applied for the esterification of cinnamic acid esters with aliphatic alcohol [13]. High conversion yields up to 98% were obtained when using the acyl acceptor (primary alcohol C4–C12) as excess substrate. Acylation of flavonoids like naringin and rutin by carboxylic acids in excess was attempted too but was much less effective in melting medium comparing with solvent medium (conversion yields around 13% after 10 days) [7].

This work describes firstly the enzymatic acylation of phloridzin by cinnamic acid ethyl ester as excess substrate catalyzed by the Novozym 435[®] as a feasibility study. Phloridzin is a flavonoid glucoside of dihydrochalcone family which is found in *Malus* species (up to 10% of dry weight in young apple leaves and twigs) [14]. This flavonoid presents interesting biological activities such as inhibitor of glucose adsorption by cell [15]. Cinnamate radical is expected to bring additional anti-UV properties while increasing phloridzin solubility in lipidic phases. Secondly a few parameters such as temperature, enzyme and substrates concentrations were studied in the aim of improving phloridzin cinnamate production while reducing reaction time. Then the process was applied to other aromatic acyl donors like methyl benzoate and methyl salicylate which show anti-UV and/or antibacterial activities. Finally acylation of phloridzin by phenolic substrates like *p*-hydroxyphenylacetate and *p*-hydroxyphenylpropionate was attempted. All these acyl donors are liquid above 60 °C and are susceptible to make phloridzin soluble.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Enzyme

Lipase B from *C. antarctica* immobilized on a macroporous acrylic resin (Novozym 435[®], Novo Industry A/S, protein content between 2 and 10%) was used to catalyze

acylation reactions. Maximum activity of the lipase is 7 propyl laurate Units/mg (the enzyme activity refers to the synthesis of propyl laurate at 60 °C). Enzyme was dried for 16 h over P₂O₅ before use.

2.1.2. Chemicals

Phloridzin was supplied by Extrasynthese (France). Ethyl cinnamate (mp 7 °C), methyl benzoate (mp –12.4 °C), methyl *p*-hydroxyphenylacetate (mp 58 °C) of purity over 99% and methyl *p*-hydroxyphenylpropionate (mp 40 °C) of purity over 97% were purchased from Aldrich. Methyl salicylate (mp 19.4 °C) and methyl cinnamate (mp 36 °C) of purity over 99% were supplied by Fluka and Merck, respectively.

Methanol (BDH), hexane (Carlo Erba) and trifluoroacetic acid: TFA (Sigma) were of analytical grade.

2.2. Synthesis

Acylation reaction was carried out in the 25 ml evaporation flasks of a rotary evaporator (R-144, Büchi) under reduced pressure (200 mbar). Stirring was provided by a 40 rpm rotation. Temperature of the reaction medium is specified as needed.

Reaction mixture was prepared with 23 mg (50 μmol) phloridzin dissolved in 5 ml acyl donor (30 mmol). Reaction was started by adding 100 mg Novozym 435[®] which corresponds to about 6 mg of proteins.

Fifty microliters samples were taken from the reaction mixture at relevant time intervals for analytical monitoring of the reaction. Acyl donor excess was extracted twice with 0.5 ml hexane. Then precipitated phloridzin and derivatives were diluted in 0.5 ml methanol (0.1%TFA). Seventy-five microliters of this solution were diluted with 1.425 ml of a mixture MeOH/H₂O/TFA (50/50/0.1) for HPLC analysis.

2.3. HPLC analysis

Quantitative analysis of samples was made by high performance liquid chromatography (HPLC) on a 100 RP 18 Lichrosphere column (250 mm × 4 mm, 5 μm). Elution system was: A = methanol/water/TFA (50/50/0.01 (v/v/v)) and B = methanol/TFA (100/0.01 (v/v)). A two steps gradient starting from 20% B up to 70% within 20 min followed by an isocratic step at 70% B for 10 min was applied. Elution flow rate was 0.6 ml min⁻¹. Detection was achieved at 280 nm on a Merck Hitachi L-3000 UV detector. Calibration curves for phloridzin and acyl donors were obtained using standards in methanol. Calibration curves for phloridzin cinnamate, phloridzin salicylate and phloridzin benzoate were obtained using purified samples.

2.4. Conversion yields determination

Conversion yields were expressed by the molar ratio of ester formed to flavonoid introduced at the beginning of the reaction.

2.5. Water activity measurement

Flavonoid and enzyme were dried for 16 h over P₂O₅ before use, whereas acyl donors were used straight from the bottle.

Water activity (a_w) of the reaction medium was determined using a Thermoconstanter TH200 Novasina (20 °C). Initial a_w of all reaction media was under 0.1.

2.6. Purification of phloridzin esters

Purification of reaction mixtures was achieved in a quite simple procedure which led to pure phloridzin esters: at the end of the reaction, hexane was added to the reaction medium (5/1 (v/v)). A filtration on a Duran sintered disc filter funnel (no. 3) removed hexane phase containing ethyl cinnamate while retaining precipitated flavonoid and enzyme particles. Phloridzin esters were dissolved with 20 ml methanol. Methanol phase was extracted with 3 ml × 20 ml hexane in order to remove residual acyl donor traces. Esters were recovered after evaporation of methanol.

2.7. Chemical structure determination

Chemical structure of phloridzin cinnamate, phloridzin benzoate and phloridzin salicylate were determined by ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) in dimethylsulfoxide-*d*₆ by using tetramethylsilane as the internal reference on an Avance Bruker 300 MHz spectrometer.

¹H chemical shifts for phloridzin-6''-*O*-cinnamate were: $\delta(\text{H-}\beta) = 2.76$, $\delta(\text{H-2, H-6}) = 7.03$, $\delta(\text{H-3, H-5}) = 6.64$, $\delta(\text{H-3}') = 6.18$, $\delta(\text{H-5}') = 5.91$, $\delta(\text{H-1}'') = 5.09$, $\delta(\text{H-6}''\text{a}) = 4.20$, $\delta(\text{H-6}''\text{b}) = 4.47$, $\delta(\text{H-x}''') = 7.63$, $\delta(\text{H-y}''') = 6.59$, $\delta(\text{H-3}''') = 7.65$, $\delta(\text{H-4}''') = 7.5''$, $\delta(\text{H-6}''') = 7.41$.

¹³C chemical shifts were: $\delta(\text{C=O}) = 204.3$, $\delta(\text{C-}\alpha) = 45.2$, $\delta(\text{C-}\beta) = 29.5$, $\delta(\text{C-1}) = 131.9$, $\delta(\text{C-2, C-6}) = 129.5$, $\delta(\text{C-3, C-5}) = 115.3$, $\delta(\text{C-4}) = 155.7$, $\delta(\text{C-1}') = 104.8$, $\delta(\text{C-2}') = 161.0$, $\delta(\text{C-3}') = 97.6$, $\delta(\text{C-4}') = 165.8$, $\delta(\text{C-5}') = 95.5$, $\delta(\text{C-1}'') = 101.1$, $\delta(\text{C-2}'') = 74.3$, $\delta(\text{C-3}'') = 76.9$, $\delta(\text{C-4}'') = 73.6$, $\delta(\text{C-5}'') = 70.0$, $\delta(\text{C-6}'') = 63.9$, $\delta(\text{C-1}''') = 166.5$, $\delta(\text{C-x}''') = 118.2$, $\delta(\text{C-y}''') = 145.0$, $\delta(\text{C-2}''') = 134.3$, $\delta(\text{C-3}''') = 128.7$, $\delta(\text{C-4}''') = 129.3$, $\delta(\text{C-5}''') = 130.8$.

¹H chemical shifts for phloridzin-6''-*O*-benzoate were: $\delta(\text{H-}\beta) = 2.76$, $\delta(\text{H-2, H-6}) = 7.00$, $\delta(\text{H-3, H-5}) = 6.30$, $\delta(\text{H-3}') = 6.22$, $\delta(\text{H-5}') = 5.86$, $\delta(\text{H-1}'') = 5.08$, $\delta(\text{H-6}''\text{a}) = 4.23$, $\delta(\text{H-6}''\text{b}) = 4.62$, $\delta(\text{H-3}''') = 7.96$, $\delta(\text{H-4}''') = 7.47$, $\delta(\text{H-5}''') = 7.67$.

¹³C chemical shifts were: $\delta(\text{C=O}) = 205.0$, $\delta(\text{C-}\alpha) = 45.3$, $\delta(\text{C-}\beta) = 29.4$, $\delta(\text{C-1}) = 131.9$, $\delta(\text{C-2, C-6}) = 129.7$, $\delta(\text{C-3, C-5}) = 115.5$, $\delta(\text{C-4}) = 155.6$, $\delta(\text{C-1}') = 105.5$, $\delta(\text{C-2}') = 160.9$, $\delta(\text{C-3}') = 97.2$, $\delta(\text{C-4}') = 166.0$, $\delta(\text{C-5}') = 94.8$, $\delta(\text{C-6}') = 164.8$, $\delta(\text{C-1}'') = 100.7$, $\delta(\text{C-2}'') = 74.3$, $\delta(\text{C-3}'') = 76.8$, $\delta(\text{C-4}'') = 73.5$, $\delta(\text{C-5}'') = 70.3$, $\delta(\text{C-6}'') = 64.6$, $\delta(\text{C-1}''') =$

165.7 , $\delta(\text{C-2}''') = 129.9$, $\delta(\text{C-3}''') = 129.5$, $\delta(\text{C-4}''') = 129.0$, $\delta(\text{C-5}''') = 133.7$.

¹H chemical shifts for phloridzin-6''-*O*-salicylate were: $\delta(\text{H-}\beta) = 2.76$, $\delta(\text{H-2, H-6}) = 7.03$, $\delta(\text{H-3, H-5}) = 6.63$, $\delta(\text{H-3}') = 6.27$, $\delta(\text{H-5}') = 5.89$, $\delta(\text{H-1}'') = 5.03$, $\delta(\text{H-6}''\text{a}) = 4.24$, $\delta(\text{H-6}''\text{b}) = 4.68$, $\delta(\text{H-4}''') = 6.92$, $\delta(\text{H-5}''') = 7.46$, $\delta(\text{H-6}''') = 6.83$, $\delta(\text{H-7}''') = 7.80$.

¹³C chemical shifts were: $\delta(\text{C=O}) = 204.4$, $\delta(\text{C-}\alpha) = 45.2$, $\delta(\text{C-}\beta) = 29.5$, $\delta(\text{C-1}) = 131.9$, $\delta(\text{C-2, C-6}) = 129.5$, $\delta(\text{C-3, C-5}) = 115.3$, $\delta(\text{C-4}) = 155.6$, $\delta(\text{C-1}') = 104.9$, $\delta(\text{C-2}') = 161.0$, $\delta(\text{C-3}') = 97.5$, $\delta(\text{C-4}') = 166.7$, $\delta(\text{C-5}') = 95.4$, $\delta(\text{C-6}') = 169.1$, $\delta(\text{C-1}'') = 100.9$, $\delta(\text{C-2}'') = 74.2$, $\delta(\text{C-3}'') = 76.9$, $\delta(\text{C-4}'') = 73.5$, $\delta(\text{C-5}'') = 70.3$, $\delta(\text{C-6}'') = 64.8$, $\delta(\text{C-1}''') = 165.9$, $\delta(\text{C-2}''') = 113.7$, $\delta(\text{C-3}''') = 161.1$, $\delta(\text{C-4}''') = 118.0$, $\delta(\text{C-5}''') = 135.8$, $\delta(\text{C-6}''') = 119.1$, $\delta(\text{C-7}''') = 130.8$.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of phloridzin-6''-*O*-cinnamate

3.1.1. Feasibility study

Enzymatic acylation of phloridzin was achieved by an alcoholysis reaction in a large excess of ethyl cinnamate, at 60 °C, under reduced pressure (200 mbar). Such conditions should allow the elimination of the by-product of the reaction, ethanol, in order to move thermodynamic equilibrium of the reaction towards synthesis. Initial water activity of the reaction medium was less than 0.1 which is also in favor of ester synthesis [16].

HPLC analysis of the reaction medium (Fig. 1) showed the formation of a single new product while phloridzin disappeared. This product had a middle polarity between phloridzin and ethyl cinnamate and was expected to be the phloridzin-6''-*O*-cinnamate.

NMR analysis of the purified product showed that acylation did actually take place on the 6''-OH of phloridzin glycoside moiety (Fig. 2) which agrees with the selectivity of the enzyme towards primary alcohols [11].

Time course of the enzymatic acylation of phloridzin by ethyl cinnamate is reported in Fig. 3.

Phloridzin was totally converted after 15 h of reaction leading to a production of phloridzin cinnamate of 5.6 g l⁻¹ (10 mM). This result shows that enzymatic acylation of phloridzin by an aromatic substrate like ethyl cinnamate is possible. High efficiency of the process is explained by the large excess of acyl donor and the good elimination of ethanol which moves the equilibrium of the reaction in favor of ester synthesis, and also by the low a_w level (<0.1) of the reaction medium which limits possible hydrolysis phenomena.

3.1.2. Effect of the temperature

In order to diminish time necessary for the total conversion of phloridzin the effect of temperature on the kinetic of the reaction was studied (Fig. 4).

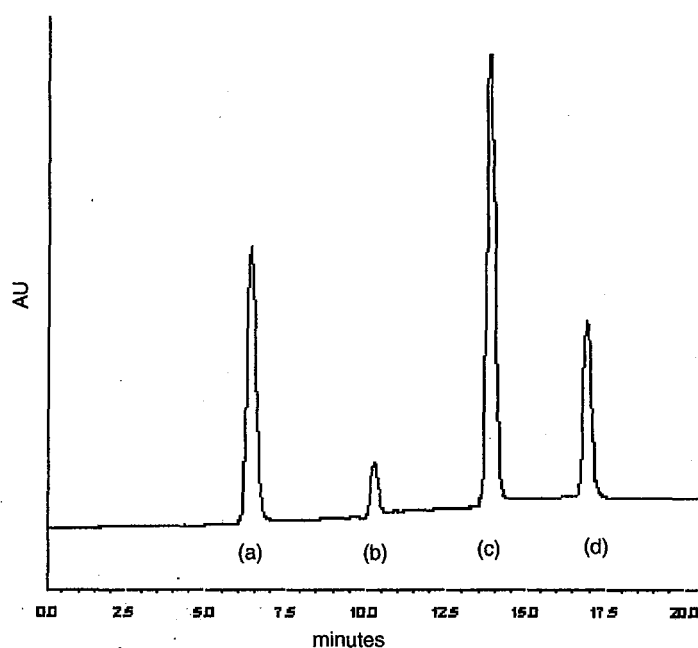


Fig. 1. Chromatogram from HPLC analysis of reaction medium, after 5 h reaction at 80 °C, under 200 mbar pressure. Reaction medium was composed of phloridzin (50 μ mol) and ethyl cinnamate (30 mmol): (a) phloridzin; (b) cinnamic acid; (c) phloridzin cinnamate; (d) ethyl cinnamate.

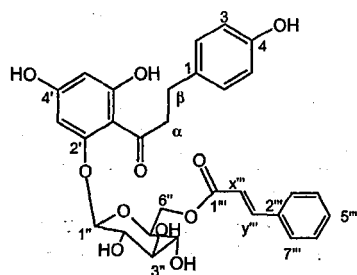


Fig. 2. Chemical structure of phloridzin-6''-O-cinnamate.

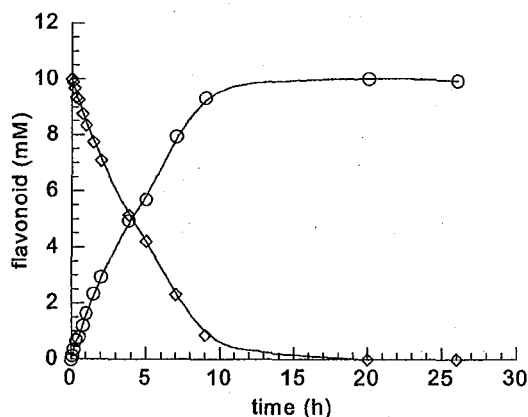


Fig. 3. Time course of the enzymatic acylation of phloridzin (50 μ mol) by ethyl cinnamate (30 mmol) catalyzed by the Novozym 435[®], at 60 °C, under 200 mbar: (\diamond) phloridzin; (\circ) phloridzin cinnamate.

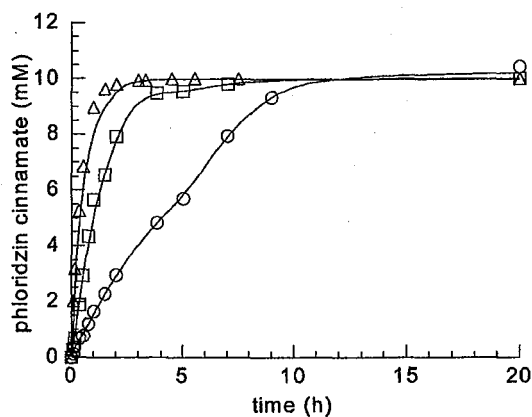


Fig. 4. Effect of temperature on time course of the enzymatic acylation of phloridzin (50 μ mol) by ethyl cinnamate (30 mmol) catalyzed by the Novozym 435[®], under 200 mbar, at 60 °C (\circ), 80 °C (\square) and 100 °C (\triangle).

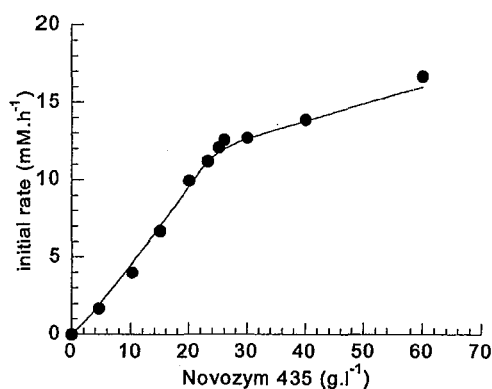


Fig. 5. Effect of the amount of Novozym 435[®] on the initial rate of phloridzin (50 μmol) acylation by ethyl cinnamate (30 mmol), at 80 $^{\circ}\text{C}$, under 200 mbar.

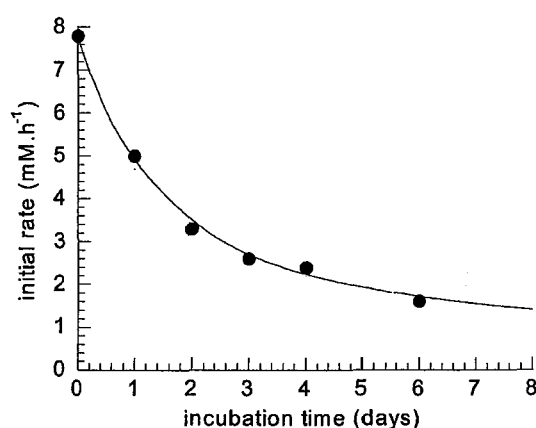


Fig. 6. Initial rate of the enzymatic acylation of phloridzin by ethyl cinnamate after variable incubation times of the Novozym 435[®], at 80 $^{\circ}\text{C}$.

3.1.3. Effect of enzyme amount

In order to minimize the amount of enzyme while maintaining the effective acylation of phloridzin, reactions were achieved in the presence of various amounts of Novozym 435[®] (Fig. 5).

As expected, phloridzin conversion yield was not affected by the amount of enzyme and was maintained to 100%.

The initial reaction rate was proportional to the concentration of Novozym 435[®] until 20 g l^{-1} which corresponds to about 1.2 g l^{-1} of proteins. As previously shown before, this concentration of enzyme led to the total conversion of phloridzin after 4 h at 80 $^{\circ}\text{C}$. A weaker effect was observed for higher concentrations which could be explained by diffusion limitations. Similar result was obtained when methyl benzoate was used as acyl donor (results not shown). Next experiments were all conducted with 100 mg of Novozym 435[®] per 5 ml ethyl cinnamate.

3.1.4. Stability of the Novozym 435[®] in ethyl cinnamate at 80 $^{\circ}\text{C}$

In order to consider the further development of this process the stability of the enzyme in such reactional conditions has to be evaluated. Hundred milligrams of Novozym 435[®] were incubated in 4 ml ethyl cinnamate, at 80 $^{\circ}\text{C}$, under atmospheric pressure, for 1–4 and 6 days. Then 1 ml of a 50 mM solution of phloridzin in ethyl cinnamate was added while reducing pressure up to 200 mbar. Residual enzymatic activity was evaluated through initial reaction rate measurements (Fig. 6).

As shown in Fig. 6, a rapid loss of the catalytic activity of the Novozym 435[®] was observed in ethyl cinnamate, at 80 $^{\circ}\text{C}$. For instance, 30% of the activity was lost after 1 day of incubation. This unstability was explained by the thermal denaturation of the lipase and also by possible interactions between enzymatic protein and ethyl cinnamate. Such a result should not limit the eventual development of the process as phloridzin was totally converted into phloridzin cinnamate after only 4 h at 80 $^{\circ}\text{C}$.

3.1.5. Effect of phloridzin concentration

In order to enhance the production of phloridzin cinnamate, initial concentration of phloridzin was increased from 10 to 210 mM (Table 1).

Phloridzin was totally converted whatever the initial concentration was, leading to a maximum of 118.9 g l^{-1} of phloridzin cinnamate after 80 h. This result represents a significant amelioration comparing with the literature, showing the high efficiency and the originality of the process. Actually, Nakajima et al. [12] and Gao et al. [11] both used 20 g l^{-1} *C. antarctica* lipase B and vinyl cinnamate as acyl donor to synthesize flavonoid glycoside esters. At best, a 70% conversion yield of flavonoid was obtained when starting from 44 mM (+) catechin 7-*O*- α -*D*-glucopyranoside [11] or 100 mM isoquercitrin [12]. In the present process, up to 210 mM phloridzin was involved. Conversion of the flavonoid was complete and a quite simple purification procedure (described Section 2.6) allowed recovering of all the ester formed which corresponds to 100% isolation yield.

Table 1

Phloridzin conversion yields and final reaction times for various initial concentrations of phloridzin in ethyl cinnamate

	Initial concentration of phloridzin (mM)						
	10	20	40	65	85	125	210
Phloridzin conversion yield (%)	100	100	100	100	100	100	100
Final phloridzin cinnamate concentration (g l^{-1})	5.7	11.3	22.6	36.8	48.1	70.8	118.9
Final reaction time (h)	5	10	25	28	40	60	80

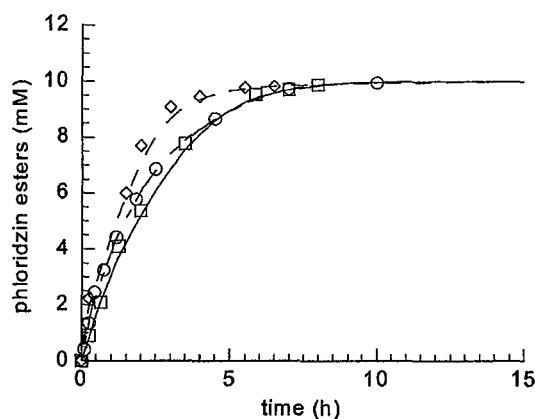


Fig. 7. Time course of the enzymatic acylation of phloridzin by methyl cinnamate (O), methyl benzoate (□) and methyl salicylate (◇) catalyzed by the Novozym 435®, at 80 °C, under 200 mbar.

The more the concentration of phloridzin was the higher the final reaction time. This result could be naturally explained by the growing amount of substrate to be transformed. Another explanation consists in mass transfer limitations due to the increasing viscosity of the reaction mixture.

3.2. Effect of the acyl donor

In order to study the influence of the acyl donor and to extent the process to the production of other original derivatives of phloridzin several available aromatic acid methyl esters were tested as acylating agents (Fig. 7).

Phloridzin was totally converted into a single product after 6 h when methyl cinnamate, methyl benzoate or methyl salicylate were used as acyl donors. NMR analysis of purified products confirmed the obtention of phloridzin-6''-O-cinnamate, phloridzin-6''-O-benzoate and phloridzin-6''-O-salicylate. All these transformations were slightly slower than acylation by ethyl cinnamate, which could result from the lower affinity of the enzyme for these substrates. Another explanation could be the higher viscosity of reaction mixtures.

The acylation of phloridzin by acyl donors like methyl *p*-hydroxyphenylacetate and methyl *p*-hydroxyphenylpropionate was also attempted. In that case, only traces of acylation products were observed even after 10 days of reaction. This poor result was probably due to the very low solubility of phloridzin in such media. Furthermore reaction media were observed to turn to brown suggesting oxidation phenomena.

4. Conclusion

The enzymatic acylation of phloridzin by various aromatic substrates like ethyl and methyl cinnamate, methyl

benzoate or methyl salicylate, catalyzed by the Novozym 435®, was demonstrated to be very efficient when the acyl donor was used in a large excess and acted as a solvent for the acyl acceptor. The total and rapid conversion of 10 mM phloridzin was obtained at 80 °C, under a pressure of 200 mbar after 4 h. The reaction was perfectly regioselective on the 6''-OH of phloridzin glycoside moiety. With the same concentration of Novozym 435®, about 119 g l⁻¹ phloridzin cinnamate (210 mM) were obtained after 80 h. This excellent result represents a significant amelioration comparing with other similar works. In the case of acyl donors like methyl *p*-hydroxyphenylacetate and methyl *p*-hydroxyphenylpropionate only traces of product were obtained due to the poor solubility of phloridzin.

Described process appears to be very efficient to produce original esters of phloridzin. Main drawbacks are the high viscosity of reaction mixtures which is responsible for mass transfer limitations and also the poor solubility of phloridzin in some acyl donors. Nevertheless, phloridzin esters synthesis with such acyl donors is expected to be more effective in media where both substrates are soluble. Reactions in solvent systems are currently under investigation and will be reported in a following paper.

The process is expected to be efficient for the preparation of many other derivatives of flavonoids of interest for cosmetics, pharmaceuticals or food industries.

References

- [1] F. Shahidi, P.K.J. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1992) 67.
- [2] B.H. Havsteen, *Pharmacol. Ther.* 96 (2002) 67.
- [3] E. Perrier, A.-M. Mariotte, A. Boumendjel, D. Bresson-Rival, US Patent US6235294 (2001).
- [4] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933.
- [5] B. Danieli, P. De Bellis, G. Carrea, S. Riva, *Helv. Chim. Acta* 73 (1990) 1837.
- [6] B. Danieli, M. Luisetti, G. Sampognano, G. Carrea, S. Riva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 3 (1997) 193.
- [7] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, F.N. Kolisis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 655.
- [8] T. Fossen, L. Cabrita, Ø.M. Andersen, *Food Chem.* 63 (1998) 435.
- [9] H. Tamura, A. Yamagami, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1612.
- [10] B. Danieli, A. Bertario, G. Carrea, B. Redigolo, F. Secundo, S. Riva, *Helv. Chim. Acta* 76 (1993) 2981.
- [11] C. Gao, P. Mayon, D.A. MacManus, E.N. Vulfson, *Biotechnol. Bioeng.* 71 (2001) 235.
- [12] N. Nakajima, K. Ishihara, T. Itoh, T. Furuya, H. Hamada, *J. Biosci. Bioeng.* 87 (1999) 105.
- [13] B. Guyot, B. Bosquette, M. Pina, J. Graille, *Biotechnol. Lett.* 19 (1997) 529.
- [14] T. Ridgway, G. Tucker, H. Wiseman, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 14 (1997) 165.
- [15] M.T. Trebosc, M.F. Aries, C. Dunauou, B. Fabre, French Patent FR 2 799 121 (1999).
- [16] C. Humeau, M. Girardin, B. Rovel, A. Miclo, *J. Biotechnol.* 63 (1998) 1.

bibliographie

- Abou El Hassan, M. A. I., Touw, D. J., Wilhelm, A. J., Bast, A. & van der Vijgh, W. J. F. (2000). Stability of monoHER in an aqueous formulation for *i.v.* administration. *International Journal of Pharmaceutics* **211**, 51-56.
- Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S.-I. (1999). Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavone skeleton in Licorice. *Plant Physiology* **121**, 821-828.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukami, Y. (1987). Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 5592-5595.
- Akiyama, T., Yamada, M., Yamada, T. & Maitani, T. (2000). Naringin glycosides α -glucosylated on ring B found in the natural food additive, enzymatically modified naringin. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **64**, 2246.
- Akoh, C. C. & Mutua, L. N. (1994). Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 115-119.
- Aliwan, F. O., Kroon, P. A., Faulds, C. B., Pickersgill, R. & Williamson, G. (1999). Ferulic acid esterase-III from *Aspergillus niger* does not exhibit lipase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 457-459.
- Alluis, B. & Dangles, O. (1999). Acylated flavone glucosides: synthesis, conformational investigation and complexation properties. *Helvetica Chimica Acta* **82**, 2201-2212.
- Alluis, B., Pérol, N., El hajji, H. & Dangles, O. (2000). Water-soluble flavonol (=3-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyrane-4-one) derivatives: Chemical synthesis, colouring, and antioxidant properties. *Helvetica Chimica Acta* **83**, 428-443.
- Al-Zuhair, S., Hasan, M. & Ramachandran, K. B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry* **38**, 1155-1163.
- Andersch, P., Berger, M., Hermann, J., Laumen, K., Lobell, M., Seemayer, R., Waldinger, C. & Schneider, M. P. (1997). Ester synthesis via acyl transfer. In *Lipases. Part B; Enzyme characterization and utilization.*, **286**, Methods in enzymology, pp. 406-443. Edited by B. Rubin & E. A. Dennis: Academic press.
- Andersen, A., Svendsen, A., Vind, J., Lassen, S. F., Hjort, C., Borsh, K. & Patkar, S. A. (2002). Studies on ferulic acid esterase activity in fungal lipases and cutinases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**, 47-55.
- Arora, A., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine* **24**, 1355-1363.
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of biochemistry and biophysics* **373**, 102-109.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, J. M. & Sinisterra, J. V. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity in organic media. *Enzyme and Microbial technology* **24**, 3-12.
- Athawale, V. & Manjrekar, N. (2000). Enzymatic synthesis of the acrylic esters: a comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 551-554.
- Austin, C. A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. & Fisher, L. M. (1992). Site specific DNA cleavage by mammalian topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochemical journal* **282**, 883-889.
- Bandoniene, D. & Murkovic, M. (2002). On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2482-2487.
- Barrett, K. E., Green, M. R., Hu, H.-L., Parmar, P., Powell, J. R. & Rawlings, A. V. (2002). Skin care composition, US 6,455,057.
- Bartholomé, B. & Gomez-Cordoves, C. (1999). Barley spent grain : release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzymes preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 435-439.
- Bartling, K., Thompson, J. U. S., Pfromm, P. H., Czermak, P. & Rezac, M. E. (2001). Lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. *Biotechnology and Bioengineering* **75**, 505-509.
- Beck, G., Bergmann, A., Keßeler, K. & Wess, G. (1990). Synthesis of a new flavonoid-antioxydant. *Tetrahedron Letters* **31**, 7293-7296.

- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Del Bano, M. J. & Lorente, J. (2001).** Improved water solubility of neohesperidin dihydrochalcone in sweetener blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 189-191.
- Bernard, F.-X., Sablé, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.-F., Crouzet, J. & Blanche, F. (1997).** Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomérase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 992-998.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. E. J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977).** The protein data bank a computer-based archival file for macromolecular structures. *Journal of Molecular Biology* **112**, 235-542.
- Beverini, M. (1987).** Contribution à l'étude de la composition et de l'activité catalytique de deux tannases d'origine fongique. Th: Nancy, 206 p.
- Biermann, U., Friedt, W., Lang, S., Lühs, W., Machmüller, G., Metzger, J. O., Klaas, M. R., Schäfer, H. J. & Schneider, M. P. (2000).** New syntheses with oils and fats as renewable raw materials for the chemical industry. *Angewandte Chemie. Int. Ed.* **39**, 2206-2224.
- Bloor, S. J. & Falshaw, R. (2000).** Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Phytochemistry* **53**, 575-579.
- Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F. & Köhrle, J. (1996).** Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eucaryotic topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2262-2270.
- Bohm, B. A. (1989).** Chalcones and aurones. In *Plant phenolics*, **1**, Methods in plant biochemistry, pp. 237-282. Edited by J. B. Harborne: Academic Press.
- Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Castelli, F. & Saija, A. (1996).** Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics* **145**, 87-94.
- Borg, P., Binet, C., Girardin, M., Rovel, B. & Barth, D. (2001).** Enzymatic synthesis of tricicosapentaenoylglycerol in a solvent-free medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 835-840.
- Bors, W., Michel, C. & Schikora, S. (1995).** Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine* **19**, 45-52.
- Bourquelot, E. & Bridel, M. (1913).** Synthèse des glycosides d'alcools à l'aide de l'émulsine et réversibilité des actions fermentaires. *Ann. Chim. Phys.* **29**, 145-218.
- Buettner G. R. (1993).** The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, [alpha]-Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 535-543.
- Buisman, G. J. H., Helteren, C. T. W. V., Kramer, G. F. H., Veldsink, J. W., Derksen, J. T. P. & Cuperus, F. P. (1998).** Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters* **20**, 131-136.
- Calias, P., Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H. N. & d'Alarcao, M. (1996).** Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Research* **292**, 83-90.
- Cao, L., Bornscheuer, U. T. & Schmid, R. D. (1999).** Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**, 279-285.
- Cao, Y., Cao, R. & Brakenhielm, E. (2002).** Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 380-390.
- Cernia, E. & Palocci, C. (1997).** Lipases in supercritical fluids. In *Methods in enzymology; Lipases, part B. Enzyme characterization and utilization*, **286**. Edited by B. Rubin & E. A. Dennis: Academic Press.
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. & Ghou, M. (2001).** Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 949-954.
- Chamouleau, F. (2002).** Etude et modélisation de la cinétique de synthèse enzymatique de palmitates de glucose et de fructose. Th: Nancy, 205 p.
- Chao, P.-D. L., Hsiu, S.-L. & Hou, Y.-C. (2002).** Flavonoids in herbs: biological fates and potential interactions with xenobiotics. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**, 219-228.

- Cheng, I. F. & Breen, K. (2000).** On the ability of four flavonoids, baiclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* **13**, 77-83.
- Cho, J. S., Yoo, S. S., Cheong, T. K., Kim, M. J., Kim, Y. & Park, K. H. (2000).** Transglycosylation of neohesperidin dihydrochalcone by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 152-154.
- Christensen, R. L., Shadel, D. L. & Graves, C. B. (1987).** Evidence that protein kinase C is involved in regulating glucose transport in the adipocyte. *International Journal of Biochemistry* **18**, 259-265.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S., Delorme, P. & Willemot, R. M. (1990).** kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS* **276**, 184-182.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S. & Combes, D. (1991).** Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. *Enzyme and Microbial technology* **14**, 293-298.
- Compton, D. L., Laszlo, J. A. & Berhow, M. A. (2000).** Lipase-Catalysed Synthesis of Ferulate Esters. *JAOCS* **77**, 513-519.
- Compton, D. L. & King, J. W. (2001).** Lipase-catalysed synthesis of triolein-based sunscreens in supercritical CO₂. *JAOCS* **78**, 43-47.
- Compton, D. L. & Laszlo, J. A. (2002).** Sunscreens from vegetable oil plant phenols, US 6,346,236.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A. & Moon, R. (1995).** Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure activity relationships. *Journal of Natural Product* **58**, 217-225.
- Cook, N. C. & Samman, S. (1996).** Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **7**, 66-76.
- Cos, P., Ying, L. & Calomme, M. (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Product* **61**, 71-76.
- Coulon, D., Girardin, M., Rovel, B. & Ghoul, M. (1995).** Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology Letters* **16**, 183-186.
- Coulon, D., Ismail, A., Girardin, M., Rovel, B. & Ghoul, M. (1996).** Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *Journal of Biotechnology* **51**, 115-121.
- Coulon, D. (1997).** Etude d'un procédé de synthèse enzymatique d'esters de sucre et d'acide gras. Th. Nancy, 222 p.
- Coulon, D., Girardin, M., Engasser, J.-M. & Ghoul, M. (1997).** Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Industrial Crops and Products* **6**, 375-381.
- Dangles, O., Dufour, C., Manach, C., Morand, C. & Remesy, C. (2001).** Binding of flavonoids to plasma proteins. In *flavonoids and other polyphenols*, 335, 319-333. Edited by L. Packer: Academic Press.
- Danieli, B., Bellis, P. D., Carrea, G. & Riva, S. (1990).** Enzyme-mediated regioselective acylation of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helvetica Chimica Acta* **73**, 1837-1844.
- Danieli, B., Bertario, A., Carrea, G., Redigolo, B., Secundo, F. & Riva, S. (1993).** Chemo-enzymatic synthesis of 6"-O-(3-aryprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helvetica Chimica Acta* **76**, 2981.
- Danieli, B., Luisetti, M., Sampognaro, G., Carrea, G. & Riva, S. (1997).** Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **3**, 193-201.
- Dass, H. C. & Weaver, G. M. (1971).** Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. *Journal of Chromatography* **67**, 105-111.
- De Oliveira, P. C., Alves, G. M. & De Castro, H. F. (2000).** Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal* **5**, 63-71.
- De Tommasi, N., Piacente, S. & Pizza, C. (1998).** Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens andicola*. *Journal of Natural Product* **61**, 973-977.
- Degn, P. & Zimmermann, W. (2001).** Optimisation of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and Bioengineering* **74**, 483-491.

- Derewenda, Z. S., Derewenda, U. & Dodson, G. G. (1992).** The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **227**, 818-839.
- Dixon, R. A. & Steele, C. L. (1999).** Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4**, 394-400.
- Dordick, J. S., Clark, D. S., Michels, P. C. & Kmelnitsky, Y. I. (2000).** biocatalytic methods for synthesizing and identifying biologically active compounds, US 6,136,961.
- Dougall, D. K., Baker, D. C., Gakh, E. & Redus, M. (1997).** Biosynthesis and stability of monoacylated anthocyanins. *Food Technology* **51**, 69-71.
- Downham, A. & Collins, P. (2000).** Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology* **35**, 5-22.
- Ducret, A., Giroux, A., Trani, M. & Lortie, R. (1995).** Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnology and Bioengineering* **48**, 214-221.
- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fischer, G. W. & Winston, G. W. (2000).** Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Product* **63**, 327-331.
- Ferreira, P., Diez, N., Gutiérrez, C., Soliveri, J. & Copa-Patino, J. L. (1999).** *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 produces a ferulic acid esterase able to release ferulic acid from sugar beet pulp soluble feruloylated oligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 440-442.
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Plou, P. J., Bernabé, M. & Ballesteros, A. (2000).** A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides. *Tetrahedron* **56**, 4053-4061.
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Dangles, O. & Brouillard, R. (1996).** New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for color loss? *Phytochemistry* **41**, 301-308.
- Filipe, P., Lança, V., Silva, J. N., Morlière, P., Santos, R. & Fernandes, A. (2001).** Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* **221**, 79-87.
- Forestier, S., Moire, C. & Lang, G. (1989).** Cosmetic composition containing hydroxylated chalcone derivatives and its use for protecting the skin and the hair against luminous radiations, new hydroxylated chalcone derivatives employed and process for their preparation, US 4,867,964.
- Forkmann, G. (1993).** Biosynthesis of flavonoids. In *Polyphenolic phenomena*, 65-71. Edited by A. Scalbert: INRA editions.
- Formica, J. V. & Regelson, W. (1995).** Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **33**, 1061-1080.
- Fougerousse, A., Elhabiri, M., George, F. & Brouillard, R. (1996).** Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes. Éléments structuraux en relation avec leur capacité à piéger des radicaux. In *Polyphenols communications*. Bordeaux.
- Fregapane, G., Sarney, D. B. & Vulfson, E. N. (1991).** Enzymatique solvent free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme and Microbial technology* **13**, 796-800.
- Friesenecker, B., Tsai, A. G. & Intaglietta, M. (1995).** Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **15**, 17-21.
- From, M., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B. (1997).** Lipase catalysed esterification of lactic acid. *Biotechnology Letters* **19**, 315-317.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Ashikari, T., Yamaguchi, M. & Kusumi, T. (1998).** Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla Frutescens*. *Plant Science* **137**, 87-94.
- Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S. & Nomura, T. (2002).** Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* **73**, 536-539.
- Furuno, K., Akasako, T. & Sugihara, N. (2002).** The contribution of the pyrogallol moiety to superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19-23.
- Gao, C., Mayon, P., MacManus, D. A. & Vulfson, E. N. (2001).** Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnology and Bioengineering* **71**, 235-243.
- Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M. & Aracil, J. (2000).** Kinetic model for the esterification of oleic

- acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. *Chemical Engineering science* **55**, 1411-1423.
- Gaudout, D., D., M., Inisan, C., Esteve, C. & Lejard, F. (2003). Phloridzin-rich phenolic fraction and use thereof as a cosmetic, dietary, or nutraceutical agent, US 2003/0003120A1.
- Gayot, S., Santarelli, X. & Coulon, D. (2003). Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *Journal of Biotechnology* **101**, 29-36.
- Geers, B., Otto, R. & Weiss, A. (2001). Neue flavonglykosid derivate für den einsatz in kosmetika, pharmazeutika und ernahrung, DE 10019235.
- Gers-Barlag, H. & Scheel, O. (1999). Use of flavones and flavonoids against the UV-induced decomposition of dibenzoylmethane and its derivatives, US 5,952,391.
- Giacometti, J., Giacometti, F., Milin, C. & Vasic-Racki, D. (2001). Kinetic characterisation of enzymatic esterification in a solvent system: adsorptive control of water with molecular sieves. *Journal of Molecular Catalysis B : enzymatic* **11**, 921-928.
- Giorno, L., Molinari, R., M., N. & drioli, E. (1997). Hydrolysis and regioselective transesterification catalysed by immobilized lipases in membrane bioreactors. *Journal of membrane science* **125**, 177-187.
- Giuliani, S., Piana, C., Setti, L., Hochkoeppler, A., Pifferi, P. G., Williamson, G. & Faulds, C. B. (2001). synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus Niger* using water-in-oil microemulsion. *Biotechnology Letters* **23**, 325-330.
- Giusti, M. M. & Wrolstrad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* **14**, 217-225.
- Gonzalez, E. A., Nazareno, M. A. & Borsarelli, C. D. (2002). Enthalpy-entropy compensation effect in the chalcone formation from naringin in water-ethanol mixtures. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2*, 2052-2056.
- Gotor, V. (1999). Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 2189-2197.
- Graber, M., Bousquet-Dubouch, M.-P., Sousa, N., Lamare, S. & Legoy, M.-D. (2003). Water plays a different role on activation thermodynamic parameters of alcoholysis reaction catalyzed by lipase in gaseous and organic media. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1645**, 56-62.
- Grayer, R. J. (1989). Flavanoids. In *Plant phenolics*, **1**, Methods in plant biochemistry, pp. 283-324. Edited by J. B. Harborne: Academic Press.
- Gryglewicz, S., Jadownicka, E. & Czerniak, A. (2000). Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. *Biotechnology Letters* **22**, 1379-1382.
- Güvenç, A., Kapucu, N. & Mehmetoglu, Ü. (2002). The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry* **38**, 379-386.
- Guyot, B., Bosquette, B., Pina, M. & Graille, J. (1997). Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent free medium. *Biotechnology Letters* **19**, 529-532.
- Guyot, B., Gueule, D., Pina, M., Graille, J., Farines, V. & Farines, M. (2000). Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeoylquinic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 93-96.
- Habulin, M. & Knez, Z. (1993). Influence of reaction parameters on synthesis of n-butyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Fat Sci. Technol.* **95**, 249-252.
- Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. In *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise. Secondary plant products*, **7**, The biochemistry of plants, a comprehensive treatise, pp. 425. Edited by P. K. Stumpf & E. E. Conn: Academic Press, inc.
- Halling, P. J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial technology* **16**, 178-205.
- Hari Krishna, S., Divakar, S., Prapulla, S. G. & Karanth, N. G. (2001). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Biotechnology* **87**, 193-201.
- Hari Krishna, S. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *biotechnology Advances* **20**, 239-267.

- Hart, H. & Conia, J. M. (1987). *Introduction à la chimie organique*: Intereditions.
- Haslam, E., Lilley, T. H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N. & Luck, G. (1992). polyphenols complexation, a study in molecular recognition. In *phenolic compounds in food and their effects on health. Analysis, occurrence and chemistry.*, 1, 8-50. Edited by C.-T. Ho, C. Y. Lee & M.-T. Huang. Washington, DC: American chemical society.
- Hatzakis, N. S., Daphnomili, D. & Smonou, I. (2003). Ferulic acid esterase from *Humicola insolens* catalyzes enantioselective transesterification of secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21, 309-311.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67-202.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heinonen, I. M. & Meyer, A. S. (2002). Antioxidants in fruits, berries and vegetables. In *Fruit and vegetable processing*. Edited by W. Jongen: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press, LLC.
- Henley, J. P. & Sadana, A. (1985). Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme and Microbial technology* 7, 50-60.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. (1993a). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. (1993b). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-29.
- Hider, R. C., Liu, Z. D. & Khodr, H. H. (2001). Metal chelation of polyphenols. In *Flavonoids and other polyphenols*, 335. Methods in enzymology, pp. 190-203. Edited by L. Packer: Academic press.
- Hill, A. C. (1898). Reversible zymohydrolysis. *Journal of the Chemical Society* 73, 634-658.
- Hollman, P. C. H. & Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones, flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1081-1093.
- Horvath, E., Gajari, J., Kristof, J., Redey, A. & Kocsis, L. (1998). Monitoring of enzyme catalysed reactions by Fourier transform Raman spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 370, 191-197.
- Houbiers, C., Lima, J. C., Maçanita, A. L. & Santos, H. (1998). Color stabilisation of malvidin 3-glucoside: self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry. B* 102, 3578-3585.
- Hubbard, C. D. & Shoupe, T. S. (1977). mechanisms of acylation of chymotrypsin by phenyl esters of benzoic acid and acetic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 252, 1633-1638.
- Humeau, C. (1998). Synthèse enzymatique du palmitate d'ascorbyle. Application à la synthèse d'esters d'acide L-ascorbique et de lipide polyinsaturés hautement oxydables. Th: Nancy, 198 p.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovet, B. & Mielo, A. (1998). Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *Journal of Biotechnology* 63, 1-8.
- Ishihara, K. & Nakajima, N. (2003). Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23, 411-417.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B. & G., S. M. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116, 4846-4851.
- Kafatos, A. G. (1999). Diet, antioxidants, and health - Case study: the cretan experience. In *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*, 119-129. Edited by A. M. Papas. London, New York: CRC Press.
- Kastle, J. H. & Loevenhart, A. S. (1900). Concerning lipase, the fat-splitting enzyme, and the reversibility of its action. *Am. Chem. J.* 24, 491-525.
- Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K. & Uchino, K. (1997). Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 61, 102-104.
- Kawasaki, M., Goto, M., Kawabata, S. & Kometani, T. (2001). The effect of vinyl esters on the enantioselectivity of the lipase-catalysed

transesterification of alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 585-596.

Kazlauskas, R. J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipase: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in Biotechnology* **12**, 464-472.

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. & Taniguchi, H. (2002). Antioxydant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2161-2168.

Kim, K.-W., Song, B., Choi, M.-Y. & Kim, M.-J. (2001). Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Organic Letters* **3**, 1507-1509.

Kittelson, J. R. & Pantaleone, D. P. (1995). Process for the synthesis natural aromatics, US 5,437,991.

Kmelnitsky, Y. L., Budde, C. L., Arnold, J. M., Rich, J. O., Chen, S. S., Usyatinsky, A. Y., Clark, D. S. & Dordick, J. S. (2001). two step enzymatic acylation, US 6,261,813.

Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S. & Watanabe, T. (1999). Lipase-catalysed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oil or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology Letters* **21**, 547-550.

Kodelia, G., Athanasiou, K. & Kolisis, F. N. (1994). Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **44**, 205-212.

Kondo, T., Tamura, H., Yoshida, K. & Goto, T. (1989). Structure of malonylshisonin, a genuine pigment in purple leaves of *Perilla ocymoides* L. var *crispa* Benth. *Agric. biol. Chem.* **53**, 797.

Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. & Kolisis, F. N. (2001). Regioselective acylation of flavonoids catalysed by lipase in low toxicity media. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**, 655-660.

Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. & Kolisis, F. N. (2003). Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **21**, 59-62.

Lamare, S. & Legoy, M. D. (1993). Biocatalysis in gaz phase. *Trends in Biotechnology* **11**, 413-418.

Lamare, S., Lortie, R. & Legoy, M.-D. (1996). Kinetic studies of *Fusarium solani pisi* cutinase used in a gaz/solid system: transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and Bioengineering* **56**, 1-8.

Lambusta, D., Nicolosi, G., Patti, A. & Piattelli, M. (1993). Enzyme-mediated regioprotection-deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin. *Synthesis (Stuttgart)* **11**, 1155-1158.

Lambusta, D., Nicolosi, G., Patti, A. & Sanfilippo, C. (2003). Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **22**, 271-277.

Lanzenhofer, G., Stab, F. & Untiedt, S. (2001). Agents acting against hyperactive and hypoactive, deficient skin conditions and manifest dermatitides, US 6,180,662.

Lanzenhofer, G., Stab, F. & Untiedt, S. (2002). Cosmetic and dermatological preparation with flavonoids, US 6,423,747.

Lekha, P. K. & Lonsane, B. K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase : state of the art. *Advances in Applied Microbiology* **44**, 215-260.

Leszczak, J.-P. & Tran-Minh, C. (1998). Synthesis of benzoates by enzymatic catalysis in heterogeneous medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5**, 277-281.

Li, B., Robinson, D. H. & Birt, D. F. (1997). Evaluation of properties of apigenin and [G - 3H] apigenin and analytic method development. *Journal of Pharmaceutical sciences* **86**, 721-725.

Lide, D. R. (2001-2002). *Handbook of chemistry and physics*, 82 edn. CRC Press.

Liggins, J., Bluck, L. J. C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A. & Bingham, S. A. (2000). Daidzein and genistein of fruits and nuts. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **11**, 326-331.

Linden, G. & Lorient, D. (2001). extraction and modification of biomolecules, chapitre 10 : Sugar chemistry. In *New ingredients in food processing : Biochemistry and agriculture*. Woodhead Publishing Ltd.

Liu, H., Orjala, J., Sticher, O. & Rali, T. (1999). Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlana palustris*. *Journal of Natural Product* **62**, 70-75.

- Lozano, P., Combes, D. & Iborra, J. L. (1994). Effect of polyols on α -chymotrypsin thermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilization. *Journal of Biotechnology* **35**, 9-18.
- Lu, Y. & Foo, L. Y. (1998). Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry* **61**, 29-33.
- Lu, Y. & Foo, L. Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry* **68**, 81-85.
- Luckner (1990). *Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals*: Springer-Verlag.
- Ma, L., Persson, M. & Adlercreutz, P. (2002). Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reaction. *Enzyme and Microbial technology* **31**, 1024-1029.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. & Thomas, M. B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Macedo, G. A., Pastore, G. M. & Rodrigues, M. I. (Available online 2 July 2003). Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus sp.* lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry* In Press, Corrected Proof.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. & Billot, J. (1990). *Fruits phenolics*: CRC Press, Boca Raton.
- Madeira-Lau, R., Rantwijk, F. v., Seddon, K. R. & Seldon, R. A. (2000). Lipase-catalysed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* **2**, 4189-4191.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G. & Amundson, C. H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial technology* **14**, 426-446.
- Malterud, K. E. & Rydland, K. M. (2000). Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5576-5580.
- Mariotte, A.-M., Perrier, E., Boumendjel, A. & Bresson-Rival, D. (2001). Flavonoid esters and their use notably in cosmetics, US 6235294.
- Markham, K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glucosides. In *Plant phenolics*, **1**, Methods in plant biochemistry, pp. 197-236. Edited by J. B. Harborne: Academic Press.
- Marvan, A. G. & Nagel, C. W. (1986). Microbial inhibitors of cranberries. *Journal of Food Science* **51**, 1009.
- Maugard, T., Tudella, J. & Legoy, M. D. (2000). Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalysed transesterification in organic media. *Biotechnology Progress* **16**, 358-362.
- Maugard, T., Boulonne, M., Rejasse, B. & Legoy, M. D. (2001). Enzymatic synthesis of water-soluble derivatives of salicylic acid in organic media. *Biotechnology Letters* **23**, 989-993.
- Maugard, T., Rejasse, B. & Legoy, M. D. (2002). Synthesis of water-soluble retinol derivatives by enzymatic method. *Biotechnology Progress* **18**, 424-428.
- Mazza, G. & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. *CRC Press*.
- McIntosh, C. A. & Mansell, R. L. (1997). Three dimensional distribution of limonin, limonate A-ring monolactone, and naringin in the fruit tissues of three varieties of *Citrus paradisi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2876-2883.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 439S-450S.
- Meulenbeld, G. H., Zuilhof, H., Veldhuizen, A. v., Heuvel, R. H. H. v. d. & Hartmans, S. (1999). Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4141-4147.
- Michelsen, B., De Vries, R. P., Visser, J., Soe, J. B., Poulsen, C. H. & Zargahi, M. R. (2000). Enzyme system comprising ferulic acid esterase from *Aspergillus*, US 6,143,543.
- Morel, I., Abalea, V., Cillard, P. & Cillard, V. (2001). Repair of oxidized DNA by the flavonoid Myricetin. In *Methods in Enzymology. Flavonoids and other polyphenols*, **335**, 308-316. Edited by L. Packer: Academic press.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Matsumura, S., Hamada, H., Nakamura, K. & Furuya, T. (1997). Lipase-catalyzed synthesis of arbutin cinnamate in an organic solvent and application of transesterification to stabilize plant pigments.

- Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **61**, 1926-1928.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Hamada, H., Yamane, S., Nakamura, K. & Furuya, T. (1999a). Multi-enzymatic glucosylation using Eucalyptus UDP-glucosyltransferase coupled UDPglucose-fermentation by bakers' yeast. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **63**, 934-936.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T. & Hamada, H. (1999b). Lipase-Catalyzed Direct and Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant Pigments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 105-107.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Hamada, H., Kawabe, S.-I. & Furuya, T. (2000). Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside with Aromatic Acid by an Enzymatic Reaction System from Cultured Cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**, 347-349.
- Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Khono, H. & Osawa, T. (2003). Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3309-3312.
- Natoli, M., Nicolosi, G. & Piattelli, M. (1990). Enzyme-catalysed alcoholysis of flavones acetates in organic solvents. *Tetrahedron Letters* **31**, 7371-7374.
- Natoli, M., Nicolosi, G. & Piattelli, M. (1992). Regioselective alcoholysis of flavonoid acetates with lipase in an organic solvent. *Journal of Organic Chemistry* **57**, 5776-5778.
- Ng, T. B., Ling, J. M. L., Wang, Z.-T., Cai, J. N. & Xu, G. J. (1996). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptides for antibacterial activity. *Gen. Pharmac.* **27**, 1237-1240.
- Nicolosi, G., Patti, A., Piattello, M. & Lambusta, D. (1999). Biocatalytic process for the preparation of 3-O-acylflavonoids, WO9966062.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., van Norren, K. & van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418-425.
- Nishimura, M., Horikawa, H. & Moriwaki, M. (1992). Composition and process for dissolving a sparingly water-soluble flavonoid, US 5.122.381.
- Novo Nordisk Bioindustrials Inc. (1992). Product information B 341c - GB.
- Oguntimein, G. B., Anderson, W. A. & Moo-Young, M. (1995). Synthesis of geraniol esters in a solvent free system catalysed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology Letters* **17**, 77-82.
- Ohrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T. & Hult, K. (1996). Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 328-331.
- Ollis, D., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S., Silman, L., Shrag, J., Sussman, J., Verschueren, K. & Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* **5**, 197-211.
- Otto, R. T., Scheib, H., Bornscheuer, U. T., Pleiss, J., Sydlatk, C. & Schmid, R. D. (2000). Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **8**, 201-211.
- Patti, A., Piattelli, M. & Nicolosi, G. (2000). Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 577-582.
- Pedersen, N. R., Halling, P. J., Pedersen, L. H., Wimmer, R., Matthiesen, R. & Veltman, O. R. (2002). Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. *FEBS Letters* **519**, 181-184.
- Peng, L., Xu, X., Mu, H., Hoy, C.-E. & Adler-Nissen, J. (2002). Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 523-532.
- Peterson, M. T. N., Fojan, P. & Petersen, S. B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology* **85**, 115-147.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product* **63**, 1035-1042.
- Plaschke, K. (2002). Composition comprising one or more flavonoids, method of obtaining such composition and use thereof as UV-absorbing agent, US 6,409,996.
- Pleiss, J., Fischer, M. & Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* **93**, 67-80.

- Prates, J. A. M., Tarbouriech, N., Charnock, S. J., Fontes, C. M. G. A., Ferreira, L. M. A. & Davies, G. J. (2001). The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* **9**, 1183-1190.
- Quieros, M., Parker, M.-C. & Turner, N. J. (2001). Tuning lipase enantioselectivity in organic media using solid-state buffers. *Journal of Organic Chemistry* **66**, 5074-5079.
- Rahal, N. (2000). Estérification enzymatique d'acides gras polyinsaturés par l'acide ascorbique : Préparation de dérivés plus résistants à l'auto-oxydation. Th: Nancy, 218 p.
- Rezk, B. M., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, W. J. F. & Bast, A. (2002). The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**, 9-13.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, G. P., Bramley, P. M. & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **22**, 375-383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 933-956.
- Ridgway, T., Tucker, G. & Wiseman, H. (1997). Novel Bioconversion for the Production of Designer Antioxidant and Colourant Flavonoids using Polyphenol Oxidases. *Biotechnology and engineering reviews* **14**, 165-190.
- Riva, S., Danieli, B. & Luisetti, M. (1996). A two step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *Journal of Natural Product* **59**, 618-621.
- Riva, S. (2001). Biocatalytic modification of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 106-111.
- Rizzi, M., Stylos, P., Riek, A. & Reuss, M. (1992). A kinetic study of immobilised lipase catalysing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in n-hexane. *Enzyme and Microbial technology* **14**, 709-714.
- Robinson, L. R., Bissett, D. L., Deckner, G. E. & Ha, R. B. K. (2002). Skin care composition containing combination of skin care actives, US 6,492,326.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L. & A., V. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA clivage protectors. *Cell Biology and Toxicology* **16**, 91-98.
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P. & Antolovich, M. (1999). Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in analytical chemistry* **18**, 362-372.
- Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M. A. A. & Ferretti, F. H. (2002). A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **585**, 1-13.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. & Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine* **19**, 481-488.
- Sakai, M., Suzuki, M., Nanjo, F. & Hara, Y. (1994). 3-O-acylated catechins and method of producing same, EP 0618203.
- Sala, A., Recio, M. C., Schinella, G. R., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. & Rios, J.-L. (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* **461**, 53-61.
- Sancho, A. I., Faulds, C. B., Bartolomé, B. & Williamson, G. (1999). Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 447-449.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D. & Drilleau, J.-F. (1999). Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4847-4853.
- Schoene, N. W. & Guidry, C. A. (1999). Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **10**, 421-426.
- Schrag, J. & Cygler, M. (1997). Lipases and α/β hydrolase fold. In *Lipases. Part A, Biotechnology*, **284**, Methods in enzymology, pp. 85-107. Edited by B. Rubin & E. A. Dennis: Academic Press.
- Schramm, D. D. & German, J. B. (1998). Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **9**, 560-566.

- Selmi, B., Gontier, E., Ergan, F. & Thomas, D. (1998). Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial technology* **23**, 182-186.
- Shaath, N. A. (1997a). The chemistry of sunscreens. In *Sunscreens - Development, evaluation and regulatory Aspects*, 263-283. Edited by N. J. Lowe, N. A. Shaath & M. A. Pathak. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Shaath, N. A. (1997b). Evolution of modern sunscreens chemicals. In *Sunscreens - Development, evaluation and regulatory Aspects*, 3-33. Edited by N. J. Lowe, N. A. Shaath & M. A. Pathak. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Shahidi, F. & Wanasundara, P. K. J. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**, 67-103.
- Shahidi, F. & Nacz, M. (1995). *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*: Technomic Publishing Company, Inc.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *biotechnology Advances* **19**, 627-662.
- Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (2001). Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**, 529-538.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **17**, 133-142.
- Sovova, H. & Zarevucka, M. (2003). Lipase-catalysed hydrolysis of blackcurrant oil in supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Science* **58**, 2339-2350.
- Stamatis, H., Sereti, V. & Kolisis, F. N. (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *JAOCs* **76**, 1505-1510.
- Stamatis, H., Sereti, V. & Kolisis, F. N. (2001). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* **11**, 323-328.
- Strack, D. & Wray, V. (1989). Anthocyanins. In *Plant Phenolics*, 1, Methods in plant biochemistry, pp. 325-356. Edited by J. B. Harborne: Academic Press.
- Suzuki, Y., Suzuki, K., Yoneyama, M., Hijiya, H. & Miyake, T. (1992). Preparation and uses of alpha-glucosyl rutin, US 5.145.781.
- Tamura, H. & Yamagashi, A. (1994). Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1612-1615.
- Tang, L., Zhang, H., M., S. M. & Sun, Y. (2000). A kinetic study of the synthesis of ascorbate fatty esters catalysed by immobilized lipase in organic media. *Biotechnology and Applied biochemistry* **32**, 35-39.
- Tomas-Barberan, F. A. & Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1073-1080.
- Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Kekos, D., Macris, B. J. & Christakopoulos, P. (2003a). Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *Journal of Biotechnology* **102**, 33-44.
- Topakas, E., Stamatis, H., Mastihubova, M., Biely, P., Kekos, D., Macris, B. J. & Christakopoulos, P. (2003b). Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. *Enzyme and Microbial technology* **33**, 729-737.
- Trebosc, M. T., Aries, M. F., Dunauou, C. & Fabre, B. (1999). Extraits de branches de pommiers utiles en dermocosmétologie et leur procédé de préparation, FR 2 799 121.
- Turner, N. A., Duchateau, D. B. & Vulfson, E. N. (1995). Effect of hydration on thermostability of serine esterases. *Biotechnology Letters* **17**, 371-376.
- Turner, N. A. & Vulfson, E. N. (2000). At what temperature can enzyme maintain their catalytic activity? *Enzyme and Microbial technology* **27**, 108-113.
- Undurraga, D., Markovits, A. & Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry* **36**, 933-939.
- Uppenberg, j., Hansen, M. T., Patkar, S. & Jones, T. A. (1994). The sequence, crystal structure

- determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **11**, 293-308.
- Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. & Jones, T. A. (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **34**, 16838-16851.
- Valente, M., Bufalino, L. & Castiglione, G. N. (1994). Effect of 1-year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass. *Calcified Tissue International*, 377-380.
- Valivety, R., Johnston, G., Suckling, C. & Halling, P. J. (1991). Solvent effect on biocatalysis in organic systems, equilibrium position and rate of lipase catalysed esterification. *Biotechnology and Bioengineering* **38**, 1137-1143.
- Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G. & Oteiza, P. I. (2003). Flavan-3-ols and Procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 84-92.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J. & Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**, 113-148.
- Virto, C. & Adlercreutz, P. (2000). Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 630-635.
- Von Rymon Lipinsk, G. (2001). Sweeteners. In *Food chemical safety : Vol.2 Additives*. Edited by D. Watson: Woodhead Publishing Ltd.
- Vulfson, E. N. (1994). Industrial applications of lipases. In *Lipases their structure, biochemistry and applications.*, 271-288. Edited by P. Woolley & S. B. Peterson. Cambridge: Cambridge Univers. Press.
- Wahler, D. & Raymond, J.-L. (2001). Novel methods for biocatalyst screening. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 152-158.
- Walle, T., Vincent, T. S. & Walle, U. K. (2003). Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharmacol* **65**, 1603-1610.
- Wang, H., Provan, G. J. & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science and Technology* **11**, 152-160.
- Wang, P. & Dordick, J. S. (1998). Enzymatic synthesis of unique thymidine containing polyphenols. *Macromolecules* **31**, 941-943.
- Watanabe, Y., Miyawaki, Y., Adachi, S., Nakanishi, K. & Matsuno, R. (2000). Synthesis of lauroyl saccharides through lipase-catalysed condensation in microaqueous water-miscible solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 241-247.
- Weber, H. K., Zuegg, J., Faber, K. & Jurgen, P. (1997). Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B : enzymatic* **3**, 131-138.
- Weber, N., Weitkamp, P. & Mukherjee, K. D. (2001). Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in Vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5210-5216.
- Weetall, H. H. (1985a). Enzymatic synthesis of gallic esters. *EP0137601*.
- Weetall, H. H. (1985b). Enzymatic gallic acid esterification. *Biotechnology and Bioengineering* **27**, 124-127.
- Williamson, G., Plumb, G. W. & Garcia-Conesa, M. T. (1999). Glycosylation, esterification, and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. In *Plant polyphenols 2: chemistry, pharmacology, ecology*. Edited by Gross. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774.
- Wong, C.-H. & Whitesides, G. M. (1994). *Enzymes in synthetic organic chemistry*: Elsevier Science Ltd.
- Xie, L.-P., Chen, Q.-X., Huang, H., Wang, H.-Z. & Zhang, R.-Q. (2003). Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 487-491.
- Yan, Y., Bornscheuer, U. T., Cao, L. & Schmid, R. D. (1999). Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: Removal of byproducts by

azeotropic distillation. *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 725-728.

Yan, Y. (2001). Enzymatic production of sugar fatty acid esters. Th: Stuttgart, 104 p.

Yang, T., Xu, X., He, C. & Li, L. (2003). Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chemistry* **80**, 473-481.

Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K., Kawakishi, S., Lubag, A. J. M., Mendoza, E. M. T. & Goto, T. (1991). Structures of Alatanin A, B and C isolated from edible purple yam *Dioscorea alata*. *Tetrahedron Letters* **32**, 5575-5578.

Yoshida, K., Toyama, Y., Kameda, K. & Kondo, T. (2000). Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecule of gentiodelphin to blue color development. *Phytochemistry* **54**, 85-92.

Zaks, A. & Klivanov, A. M. (1985). Enzyme-catalysed processes in organic solvents. *Biochemistry* **82**, 3192-3196.

Zaks, A. (2001). Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 130-136.

Zhu, B. T. & Liehr, J. G. (1996). Inhibition of catechol O-methyltransferase-catalysed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 1357-1363.

Zorn, H., Breithaupt, D. E., Takenberg, M., Schwack, W. & Berger, R. G. (2003). Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 623-628.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Marie-Dominique LEGOY, Professeur, LBCB, Pôle Sciences et technologie, La Rochelle

Monsieur Didier COMBES, Professeur, LBB, INSA, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame ENAUD Estelle

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**« Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques : synthèses d'esters
aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* »**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORÊT-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Procédés biotechnologiques et alimentaires »**

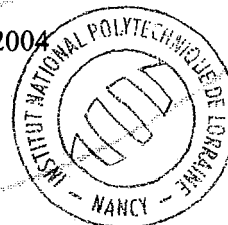
Fait à Vandoeuvre, le 22 avril 2004

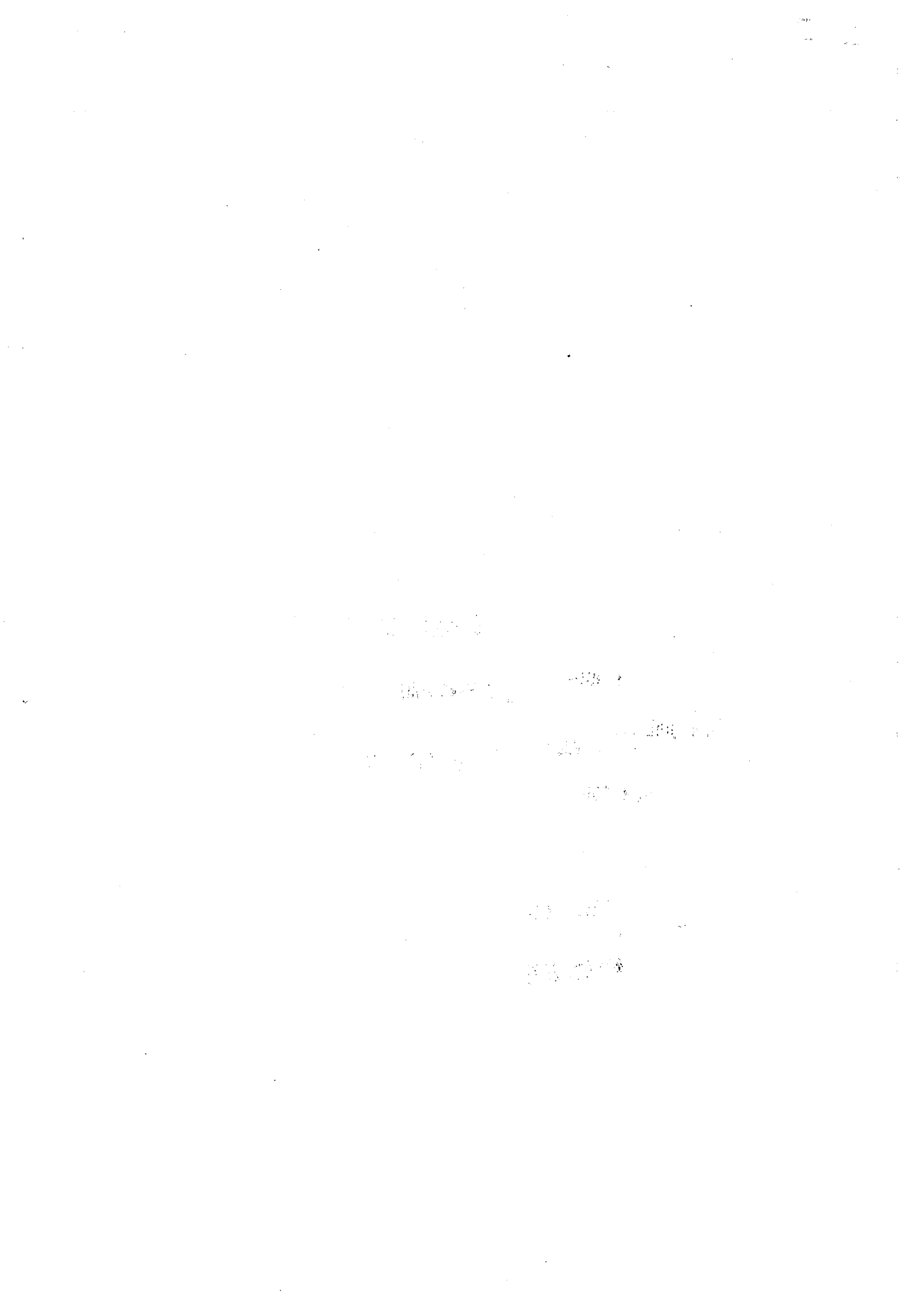
Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

Pour le Président
Le Vice-Président,

J.-L. COUJARD





Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques : synthèses d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques caractéristiques des végétaux supérieurs. Ils sont largement présents dans notre alimentation et leurs propriétés intéressent les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. L'objectif de ce travail était de synthétiser des esters phénoliques de flavonoïdes par voie enzymatique afin de modifier leurs caractéristiques physico-chimiques et augmenter éventuellement leurs propriétés biologiques. La lipase B de *Candida antarctica* a été utilisée sous forme immobilisée (Novozym 435®) pour étudier la faisabilité de la synthèse de différents esters aromatiques de flavonoïdes avec des donneurs d'acyles non activés. Des esters d'acides aromatiques non substitués (acides benzoïque et cinnamique) ont été synthétisés avec de bons rendements. Les meilleurs résultats ont été obtenus par transestérification sous pression réduite. En présence de solvant (2-méthylbutan-2-ol), on obtient jusqu'à 99% de conversion du flavonoïde en 25 h à 80°C, 200 mbar de pression. Dans les milieux où le rôle du solvant est joué par le donneur d'acyle lui-même, la conversion des flavonoïdes glycosylés et néohesperidosylés est totale en moins de 12 h à 80°C, 200 mbar. Le principal handicap de ces synthèses est la faible solubilité des flavonoïdes glycosylés dans les solvants organiques. Un certain nombre de produits ont été caractérisés (cinnamate, benzoate, salicylate de phloridzine, cinnamate d'isoquercitrine, cinnamate et salicylate de néohesperidine dihydrochalcone). Ce sont des monoesters régiosélectivement acylés sur la position 6'' (hydroxyle primaire) du glucose. Cependant, le Novozym 435® n'a pas permis de synthétiser efficacement des esters phénoliques de flavonoïdes lorsque le donneur d'acyle possède une fonction phénolique conjuguée au carboxyle (acide caféique). Une exception a toutefois été observée dans le cas des synthèses de salicylates de flavonoïdes en milieu salicylate de méthyle, liquide à la température de travail.

Mots clefs: acide aromatique, acide phénolique, acylation enzymatique, flavonoïde glycosylé, lipase B de *Candida antarctica*, milieu non conventionnel

Enzymatic functionalization of polyphenolic compounds: synthesis of flavonoid glycosides aromatic esters catalyzed by *Candida antarctica* lipase B

Flavonoids are polyphenolic compounds characteristic of higher plants. They are largely present in human diet and their properties are likely to interest food, cosmetic and pharmaceutical industries. The aim of this work was to synthesize phenolic esters of flavonoids by an enzymatic process. This acylation should modify their physico-chemical properties and eventually enhance their biological properties. Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®) was used to catalyze acylation of flavonoids with various aromatic non activated acyl donors. Aromatic esters of non-substituted acids (benzoic and cinnamic acids) were synthesized with good yields. Best results were obtained by transesterification under reduced pressure. At best, a 99% conversion yield of flavonoid was obtained in 25 h, in the presence of solvent (2-methylbutan-2-ol) at 80°C, 200 mbar. In media where the acyl donor acts as the solvent, total conversion of flavonoid glucosides and neohesperidosides was reached in less than 12 h, at 80°C, 200 mbar. Principal handicap of these syntheses was the low solubility of flavonoid glycosides in organic solvents. All characterized products (phloridzin cinnamate, benzoate, salicylate, isoquercitrin cinnamate, neohesperidine dihydrochalcone cinnamate and salicylate) are monoesters regioselectively acylated on position 6'' OH of the glycoside moiety (primary hydroxyl). However, Novozym 435® did not synthesize phenolic esters of flavonoids when acyl donor has a phenolic function conjugated with the carboxylic function (caffeic acid). An exception resides in the synthesis of flavonoid salicylates which only occurred in methyl salicylate, liquid in our experimental conditions.

Keywords: aromatic acid, phenolic acid, enzymatic acylation, flavonoid glycoside, *Candida antarctica* lipase B, nonconventional media