



HAL
open science

Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle

Latifa Chebil

► **To cite this version:**

Latifa Chebil. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL097N . tel-01752787

HAL Id: tel-01752787

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752787>

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>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés

THÈSE

Présentée à l'INPL par

Latifa CHEBIL

Ingénieur en Industries Alimentaires

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de
Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle**

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2006 devant la commission d'examen

<u>Président</u>	M. J-M. Engasser	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
<u>Rapporteurs</u>	M. S. Kermasha	Professeur à l'Université Mc Gill, Canada
	M. E. Dubreucq	Professeur à l'ENSAM, Montpellier
<u>Examineurs</u>	Mme C. Gerardin	Professeur à l'UHP, Nancy
	Mme C. Humeau-Virot	Maître de conférence à l'ENSAIA-INPL, Nancy
	Mme F. Husson	Maître de conférence à l'ENSBANA, Dijon
	M. B. Maigret	Directeur de Recherche CNRS à l'UHP, Nancy
	M. M. Ghoul	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
<u>Invité</u>	M. F. Dehez	Chargé de recherche CNRS à l'UHP, Nancy

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés essentiellement au Laboratoire de Biocatalyse et Bioprocédés (LBB) à Nancy. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Jean-Marc ENGASSEUR, Professeur à l'INPL et Directeur du LBB, de m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses conseils et remarques pertinents. C'est un grand plaisir pour moi qu'il ait accepté de présider le jury de thèse.

Monsieur Mohamed GHOU, Professeur à l'INPL, a dirigé mes travaux de recherche avec la conviction, les qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils. Cette thèse doit beaucoup à son soutien et à ses encouragements, Merci.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Madame Christine GERARDIN, Professeur à l'Université Henri Poincaré, de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire « LESOC » pour réaliser les analyses RMN et LC-MS, pour sa disponibilité et son aide dans l'interprétation des spectres RMN.

Je remercie infiniment Monsieur Bernard MAIGRET, Directeur de recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré, de m'avoir fait découvrir le monde de la modélisation moléculaire et de m'accueillir au sein de son équipe, e-DAM.

Je remercie également, François DEHEZ, Chargé de recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré, pour le temps qu'il a pu consacrer pour m'aider à comprendre les principes et les techniques de la modélisation moléculaire.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Eric DUBREUCQ, Professeur à l'ENSAM, Montpellier et Monsieur Selim KERMASSHA, Professeur à l'université Mc Gill, Montréal de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Mme Florence HUSSON, maître de conférences à l'ENSBANA de Dijon, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier Catherine HUMEAU : tout d'abord pour son épaulement tout au long de cette thèse, ensuite pour toutes ses remarques pertinentes, pour nos longues discussions et pour tout le reste...

Je tiens à remercier, Mesdames Marie DE LA LAMBALLERIE et Anne VERNIERE pour leur contribution à la réalisation des analyses de Cp.

Merci au laboratoire LSGA, ensaia, de m'avoir permis de réaliser les analyses calorimétriques sur leur calorimètre à balayage différentiel.

Merci également aux personnes que j'ai eu de la chance de côtoyer durant ces années de Doctorat : Aude, Malika, Hicham, Nicolas, Iléf, Fayçal, Naima, et les nouveaux venus :Edwardo, Jennifer et nidhal

Je remercie tout le personnel des deux laboratoires LBB et LESOC pour leur aide et leur soutien.

Un remerciement particulier va à Céline et Julie, pour leur aide qu'elles n'hésitèrent jamais à me proposer dans les moments difficiles. Je n'oublierai pas les remarques de Julie concernant le nombre de vêtements que j'ai pu mettre pendant cette thèse ...

Merci à Isabelle CHEVALOT, Eric OLMOS, Frantz FOURNIER, et Emmanuel GEDON pour leur sympathie et leur aide.

Je dois un grand grand merci à ma chère Ahlam pour nos délires, nos fous rires, nos moments de bonheur et de déprime qu'on a partagé pendant ces années à Nancy.

Je remercie également mes chers amis, que même si on se voit périodiquement, pour leur grand cœur et sympathie : ma chère Mireille, Lobna, Naziha, Johnny, Hassan, Zied, Rodrigue, Charbel, Walid, ...

Merci à Muhannad pour sa sympathie, sa bonne humeur (quoique pas tout le temps) et le réconfort qu'il a pu me transmettre toutes ces années.

Enfin, je suis très reconnaissante pour mes parents, que j'admire, et surtout mon père qui voulait tout le temps que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable, Merci pour tout...

Je ne pourrais pas bien sur finir sans remercier mes sœurs, mon frère, mes beaux frères, minou, bessem et assouma pour tout l'amour qu'ils n'hésitèrent jamais à me le prouver, Merci à tous.

Je dédie ce travail au p'tit Youssef !

LISTE DES ABREVIATIONS

PCL	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS ⁺	Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzoThiazoline-6-sulfonique)
Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Occupied Molecular Orbital
E _{HOMO}	Energy of the Highest Occupied Molecular Orbital
E _{LUMO}	Energy of the Lowest Occupied Molecular Orbital
E _g	Différence entre E _{HOMO} et E _{LUMO}
AM1	Austin Model 1
BDE	Bond Dissociation Enthalpie
IP	Ionization Potential
MM	Molecular Mechanic
DFT	Density Functional Theory
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
χ	Electronégativité
μ	Moment dipolaire
POL	Polarisabilité moléculaire
A	Aire superficielle
VOL	Volume moléculaire
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
FTIR	Fourier Transformed InfraRed spectroscopy
ATR	Attenuated Total Reflection
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography- ElectroSpray Ionization-Mass Spectroscopy
RMN	Resonance Magnetic Nuclear
DSC	Differential Scanning Calorimetry
T _m	Température de fusion
ΔH_f	Enthalpie de fusion
C _p	Capacité calorifique
C _p ^S	Capacité calorifique à l'état solide
C _p ^L	Capacité calorifique à l'état liquide
a ^S	Activité du solide
γ	Coefficient d'activité
OPLS	Optimized Potential for Liquid Simulations
OPLS-AA	Optimized Potential for Liquid Simulations All Atoms
CVFF	Consistent Valence Force Field
SCF	Self Consistent Field
NPT	Ensemble isobare-isotherme
RMSD	Root Mean Square Distance
RMS	Root Mean Square
PCM	Polarizable Continuum Model
RESP	Restrained electrostatic potential fit
RDF	Radial Distribution Functions
DA/F	Donneur d'Acyle/Flavonoïde

SOMMAIRE GENERAL

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	5
<u>CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES</u>	64
<u>CHAPITRE III : ETUDE DE LA SOLUBILITE DES FLAVONOÏDES</u>	99
<u>CHAPITRE IV : ACYLATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOÏDES</u>	
<u>CHAPITRE IV.1</u> : Effet de la nature du substrat, de l'origine de la lipase et des conditions opératoires sur le rendement de conversion et la régiosélectivité.....	117
<u>CHAPITRE IV.2</u> : Effet de la nature du donneur d'acyle sur le rendement de conversion et la régiosélectivité.....	147
<u>CHAPITRE V : MODELISATION MOLECULAIRE APPLIQUEE AUX FLAVONOÏDES</u>	
<u>CHAPITRE V.1</u> : Modélisation moléculaire des flavonoïdes dans le vide.....	152
<u>CHAPITRE V.2</u> : Modélisation moléculaire de la quercétine dans des solvants organiques.....	175
<u>CONCLUSIONS & PERSPECTIVES</u>	195

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus dans tout le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons.

Les flavonoïdes interviennent dans le mécanisme d'oxydo-réduction. L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxy (ROO^\bullet), alcoxy (RO^\bullet), superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et hydroxyles (HO^\bullet). Ces radicaux centrés sur l'oxygène (appelés ainsi parce que l'électron célibataire est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS: Reactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne). Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN. Ces dommages oxydatifs sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes qui

agissent en synergie, à savoir la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). En effet, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde d'hydrogène, tandis que la catalase métabolise ce dernier en une molécule d'eau et une autre d'oxygène.

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes.

Ces molécules ont fait l'objet de plusieurs travaux. Il s'agit essentiellement des différentes techniques d'extraction végétale, leur identification, leur fonctionnalisation et des propriétés de ces molécules. L'intérêt pour ces composés est justifié par les nombreux effets biologiques qu'on leur attribue, tels que leur rôle protecteur contre les inflammations, les allergies, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les infections bactériennes et virales, la stimulation du système immunitaire. Ces effets sont reliés à leur pouvoir antioxydant et inhibiteur d'enzymes (hydrolases, les oxydoréductases, les kinases et les isoméras).

Des flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine, la naringine, l'hesperitine, etc., à l'état pur et sous forme d'extraits, sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Cependant, la formulation de ces molécules dans diverses préparations est difficile à réaliser. En effet, la mise en oeuvre des flavonoïdes est difficile même aux faibles concentrations des préparations cosmétiques (0,01-0,15 %) en raison d'une faible solubilité de ces composés dans la plupart des solvants utilisés dans ce domaine. De plus, après incorporation dans des préparations, ces composés sont très instables à la lumière et à la chaleur. En effet, les flavonoïdes peuvent s'oxyder rapidement, ce qui conduit à une modification de la couleur de la préparation et à une altération de leurs propriétés bénéfiques.

Plusieurs réactions ont été décrites dans la littérature pour améliorer leur utilisation. Ces techniques reposent essentiellement sur la fonctionnalisation des flavonoïdes. Ainsi, l'acylation des flavonoïdes est une des voies intéressantes et prometteuses pour remédier à leurs inconvénients. D'autres réactions comme la glycosylation, la polymérisation ou l'hydroxylation ont été aussi citées. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'acylation des flavonoïdes. Cette réaction consiste à greffer une chaîne grasse qui devrait

améliorer la solubilité dans des milieux lipidiques. L'acylation par des acides aromatiques peut aussi augmenter la stabilité de ces molécules.

Dans la littérature, trois modes d'acylation ont été décrits, à savoir les voies enzymatique, chimique et chimio-enzymatique. Néanmoins, les modifications par voie enzymatique ont été privilégiées pour la synthèse de ces nouvelles molécules. En effet, cette technique permet d'une part de préserver le caractère naturel des composés et d'autre part, elle est sélective et par conséquent bien adaptée à des molécules ayant plusieurs positions acylables comme les flavonoïdes.

Bien que plusieurs travaux aient porté sur la synthèse enzymatique des esters de flavonoïdes, ces études ont été focalisées essentiellement sur les molécules glycosylées, en utilisant la lipase de *Candida antarctica* comme biocatalyseur. L'acylation de flavonoïdes aglycones n'a pas été étudiée du point de vue cinétique et régiosélectivité. En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer les rendements de conversion, la structure des produits formés et par conséquent leurs propriétés.

Le manque de travaux concernant les molécules aglycones peut être expliqué par la crainte de toucher à des groupements essentiels pour certaines propriétés tel que le pouvoir antioxydant. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à l'étude approfondie des flavonoïdes aglycones.

Ainsi, les objectifs de ce travail se résument à :

- comprendre le rôle des différents facteurs pouvant affecter les rendements de conversion et la régiosélectivité de la réaction tels que l'origine de la lipase, la nature des substrats (donneur d'alcool et donneur d'acyle), le rapport molaire (DA/F) et la nature du solvant.
- quantifier les équilibres thermodynamiques de la solubilité des flavonoïdes et des réactions de synthèse d'esters de flavonoïdes.
- déterminer la conformation des molécules dans le vide et en présence de solvants organiques et établir des relations structure-activité.

Pour réaliser ces objectifs, plusieurs investigations ont été menées:

- dans une première étape, une étude de solubilité a été réalisée sur plusieurs flavonoïdes (rutine, isoquercitrine, quercétine, chrysin, naringénine, hespéridine) tout en étudiant l'influence de la nature du solvant (acétonitrile, acétone, *tert*-amyl alcool), de la température, de la structure et des propriétés thermodynamiques sur les équilibres thermodynamiques.
- dans une deuxième partie, une étude cinétique de l'acylation de flavonoïdes (quercétine, isoquercitrine, naringénine, hespéridine et chrysin) a été effectuée pour quantifier les effets de plusieurs facteurs importants pouvant influencer les performances des réactions de synthèse. Ces facteurs sont l'origine de la lipase (*Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*), la nature des substrats (flavonoïdes et donneurs d'acyles) et leur concentration et la nature du solvant (acétonitrile, acétone et *tert*-amyl alcool). Dans cette partie la régiosélectivité des deux lipases a été aussi étudiée.
- dans une troisième étape, l'approche modélisation moléculaire a été utilisée pour déterminer la configuration structurale des flavonoïdes dans le vide. A partir des propriétés électroniques obtenues après minimisation des structures, des relations structure-activité ont été également déterminées.
- enfin, l'approche modélisation moléculaire a été aussi utilisée pour étudier la structure de la quercétine dans trois solvants organiques (acétone, acétonitrile et *tert*-amyl alcool) et les interactions soluté-solvant.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. STRUCTURE ET ORIGINE DES FLAVONOÏDES.....	5
2. PROPRIETES ET APPLICATIONS DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS ESTERS	9
2.1. Propriétés physico-chimiques	9
2.1.1. Solubilité des flavonoïdes	9
2.1.2. Absorption des rayonnements UV.....	11
2.1.3. Stabilité des flavonoïdes.....	12
2.2. Propriétés et applications des flavonoïdes	14
2.2.1. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires	14
2.2.2. Propriétés complexantes.....	18
2.2.3. Inhibition d'enzymes.....	19
2.2.4. Activité photoprotectrice des flavonoïdes.....	20
2.2.5. Application reliées aux activités des flavonoïdes et à leurs esters.....	21
2.2.6. Interaction des flavonoïdes avec les membranes biologiques.....	22
2.3. Conclusion.....	24
3. ACYLATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOÏDES.....	25
4. MODELISATION MOLECULAIRE APPLIQUEE AUX FLAVONOÏDES	41
4.1. Etude conformationnelle	41
4.2. Relation structure-activité antioxydante.....	46
4.3. Corrélations quantitatives (QSAR) et qualitatives (SAR) structure-activité	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55

*****FIGURES*****

Figure I.1. squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée	5
Figure I.2. voies de biosynthèse des flavonoïdes.....	6
Figure I.3. différentes classes de flavonoïdes	7
Figure I.4. exemples d'autoxydation de flavonoïdes	13
Figure I.5. éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes	16

Figure I.6. chélation des métaux par les flavonols.....	18
Figure I.7. métabolisation cellulaire de la quercétine et de ses dérivés dans des cellules de fibroblaste	24
Figure I.8. structure de l'isoquercitrine et angles de torsion caractéristique de la molécule ..	45
Figure I.9. structure optimisée d'énergie minimale de l'isoquercitrine	45
Figure I.10. structure optimisée d'énergie minimale de la rutine	45
Figure I.11. structure optimisée d'énergie minimale de la 3'-O-(6''-O-triméthoxybenzoyl)-b-D-glucopyranosylquercétine	46
Figure I.12. structure optimisée d'énergie minimale du p-methoxycinnamate de chrysine ...	46

*****TABLEAUX*****

Tableau I.1. distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes	8
Tableau I.2. absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol.....	11
Tableau I.3. effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes	17
Tableau I.4. aperçu sur les propriétés biologiques de flavonoïdes et de leurs esters.....	21
Tableau I.5. étude structurale de la quercétine	42
Tableau I.6. angle de torsion entre le cycle B et le reste de la molécule pour différentes classes de flavonoïde	43
Tableau I.7. analyse conformationnelle des radicaux de la quercétine.....	48
Tableau I.8. éléments structuraux nécessaires à une bonne activité antioxydante dans le cas des deux mécanismes par transfert d'hydrogène et d'électron	49
Tableau I.9. principaux travaux reliant les activités biologiques aux structures des flavonoïdes.	51

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. STRUCTURE ET ORIGINE DES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (figure I.1).

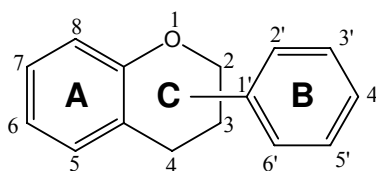


Figure I.1. squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée (1)

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine. La voie biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure I.2. Les enzymes intervenant dans la voie de différenciation des classes de flavonoïdes ont été plutôt bien caractérisées.

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 2',4,4',6'-tétrahydroxychalcone. Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétyl-coenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamate-coenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes.

Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoid glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation.

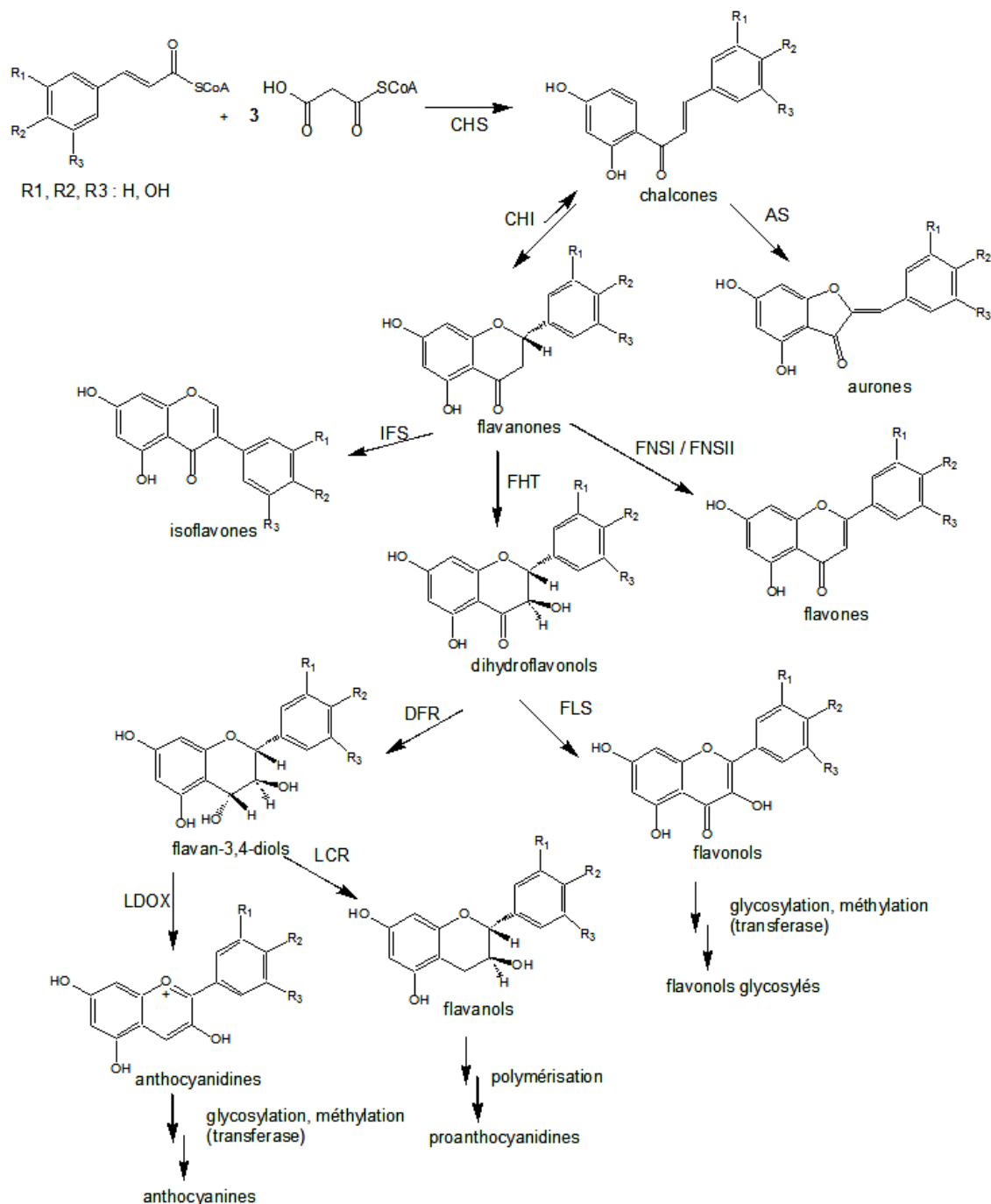


Figure I.2. voies de biosynthèse des flavonoïdes (adaptées de Winkel-Shirley, 2002 (2); Forkmann et Martens, 2001 (3)).
 AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-réductase, FHT : flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygénase, LCR : leucoanthocyanidin réductase

Ainsi, les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C (figure I.3).

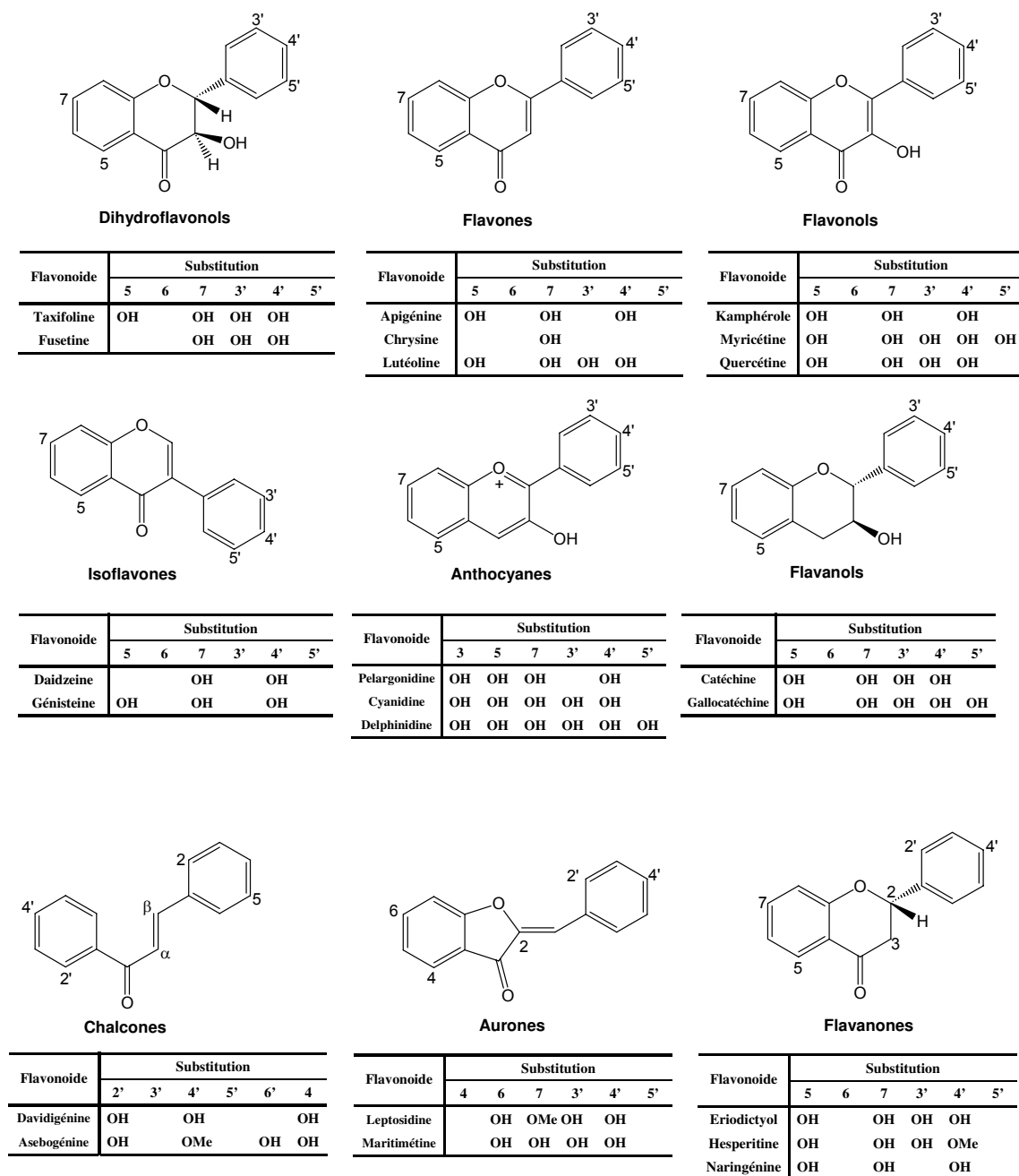


Figure I.3. différentes classes de flavonoïdes (4, 5)

Pour chaque classe de flavonoïde, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une

hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose.

Les flavonoïdes sont essentiellement hydroxylés en position 5, 7, 4' et éventuellement en position 3. Ces groupes hydroxyles peuvent être alkylés.

Les flavonoïdes sont fréquemment rencontrés sous forme glycosylée. La présence d'un sucre modifie les propriétés de la molécule par rapport à son analogue non glycosylé en particulier sa solubilité et son hydrophobicité. La liaison entre l'aglycone et l'ose se fait généralement par l'un des hydroxyles phénoliques, en particulier ceux en position 3 (pour les flavonols) ou en 7 (pour les flavones) et parfois en 6 ou 8 si ces positions sont hydroxylées.

Les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont : le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose, et occasionnellement le D-allose, l'apiose et le D-mannose. Les sucres les plus couramment rencontrés sont le D-glucose et le L-rhamnose.

Pour les flavonoïdes acylés, la partie acyle est soit un acide aliphatique (acétique, butyrique, isobutyrique, 2-méthylbutyrique, 3-méthylbutyrique, 2-méthylbut-2-énoïque, 2-hydroxypropionique, malonique, succinique, crotonique, 3-hydroxy-3-méthylglutarique, quinique), soit un acide aromatique (gallique, benzoïque, p-hydroxybenzoïque, cinnamique, p-coumarique, caféique, férulique, isoférulique, sinapique), soit les deux à la fois.

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les légumes feuilles (salade, chou, épinard, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. La distribution des différentes familles de flavonoïdes dans le règne végétal a été évaluée par plusieurs auteurs (tableau I.1).

Tableau I.1. distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes (Heller et Forkmann, 1993 (6); Di carlo et al., 1999 (4); Fargeix, 2000 (7); Rice-Evans et al., 1996 (8), Hollman et Katan, (1999) (5), Sampson et al., (2002)(9))

Famille	Molécules principales	Distribution
flavone	apigénine, lutéoline, chrysin	pomme, céleri, grains de céréale,...(teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), Petroselinum sativum, Apium graveolens...
flavanone	hespéritine, naringine, taxifoline	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) eucalyptus globulus
flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir,... (teneur = 56-250 mg/kg) Sophora japonica, Stellaria media, Vitis vinifera

isoflavones	genisteine et daidzeine	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg) Pueraria labata, stellaria media
flavan-3-ols	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) Vitis vinifera
anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

2. PROPRIETES ET APPLICATIONS DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS ESTERS

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les propriétés des flavonoïdes vu leur grand intérêt pour la santé. Dans cette partie quelques propriétés physico-chimiques et biologiques, en l'occurrence la solubilité, l'absorption UV-visible, l'activité antioxydante, l'inhibition d'enzymes, la photoprotection et les interactions avec des membranes biologiques des flavonoïdes ont été synthétisées. Quelques applications des flavonoïdes et de leurs esters dans les domaines cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques ont été récapitulées.

2.1. Propriétés physico-chimiques

2.1.1. Solubilité des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes (10) :

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ;
- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde ;
- des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH.

Selon Saidman *et al.* (2002) (11), le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, la solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du pH (12). En effet, à un pH 1.5, la solubilité de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée. D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10 mg/L (13, 14). Benavente-Garcia *et al.* (2001) (15) ont évalué la solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12 g/L et 123 g/L. L'étude de la solubilité dans les solvants organiques a été pas ou peu étudié.

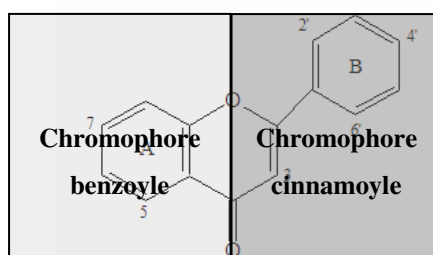
La faible solubilité des flavonoïdes dans les phases aqueuses et lipophiles laisse leurs incorporations dans les formulations pharmaceutiques et alimentaires difficiles. Toutefois, la métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation) de ces composés par les cellules de l'intestin permettent leur absorption par l'organisme (16).

Pour pallier à ces problèmes de solubilité, différentes techniques ont été utilisées ayant pour but de modifier la structure de ces molécules :

- la glycosylation de la naringine par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus*, a permis l'augmentation de sa solubilité dans l'eau de 250 fois (17).
- la complexation de la naringénine et de l'hespéretine avec de la β cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité dans des milieux hydrophiles à différents pH (18).
- l'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2-phosphono-myo-inositol) (13), l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine (19) ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine. Cependant, Perrier *et al.* (1998) (20) et Sakai *et al.* (21) ont observé, respectivement, une augmentation de la solubilité de l'hespéretine et de la catéchine dans les phases grâce après acylation par des acides gras.
- la polymérisation de la rutine a permis d'augmenter sa solubilité dans l'eau (22).

2.1.2. Absorption des rayonnements UV

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre (23, 24). Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle comme l'indique le schéma suivant :



Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs (tableau I.2).

Tableau I.2. absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol (25, 26)

classe des flavonoïdes	absorption UV-visible λ_{max} (nm)	
	Bande II	Bande I
flavonol	250-280	330-385
quercétine	255, 269s	301s, 370
quercétine 3-O-glucoside	257, 269s	299s, 362
hespétine	288	300s
taxifolin	290	327s
flavone	250-280	310-350
chrysin	247s, 268	313
apigénine	267, 296s	336
flavanone et dihydroflavanol	275-295	300-330
flavanol	270-280	-
chalcone	230-270	340-390
4'-hydroxychalcone		328
2', 4, 4'-trihydroxychalcone		367
aurone	230-270	380-430
4-hydroxyaurone		389
6, 3', 4'-trihydroxyaurone-6-glucoside		405
anthocyane	270-280	465-560
cyanidin-3-glucoside	274	523
pelargonidine 3,7-diglucoside	279	498
isoflavone	245-275	310-330
daidzein	238s, 249	260s, 303s
genistein	261	328s

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet (26). Pour l'acylation, peu de données existent sur l'effet de cette réaction sur les propriétés spectrales des flavonoïdes.

2.1.3. Stabilité des flavonoïdes

L'importante réactivité des flavonoïdes donne à ces molécules une instabilité à plusieurs conditions environnantes.

▪ Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes

Les paramètres qui peuvent agir sur la stabilité des flavonoïdes sont la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non et d'oxydant. Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. En effet, la stabilité est plus faible à des pH basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion superoxyde). La nature du solvant affecte le mécanisme de dégradation des flavonoïdes. En effet, lors de l'étude de la dégradation de la quercétine par le DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Fargeix (2000) (7) a observé la formation de produits différents en milieu protique et aprotique. De même, Tommasini *et al.* (2004) (18) ont rapporté, lors de l'étude de la photostabilité du 3-hydroxyflavone, des voies de dégradation différentes selon la nature du solvant avec une amélioration de la stabilité en présence de cyclodextrines.

▪ Autoxydation des flavonoïdes

Les cinétiques et les mécanismes d'oxygénation des flavonoïdes ont été étudiés par Fargeix (2000) (7), Barhaes *et al.* (2000) (27), Balogh-hergovich *et Speier* (2001) (28), Mochizuki *et al.* (2002) (29), Ramos-Tejada *et al.* (2002) (30). Cependant, le pH, la présence d'ion métallique et de borate affectent l'autoxydation de la catéchine en milieu aqueux (29). Les produits formés au cours de l'auto-oxydation sont très variables mettant en évidence des voies de dégradation différentes selon la nature du flavonoïde et des conditions de conservation (figure I.4).

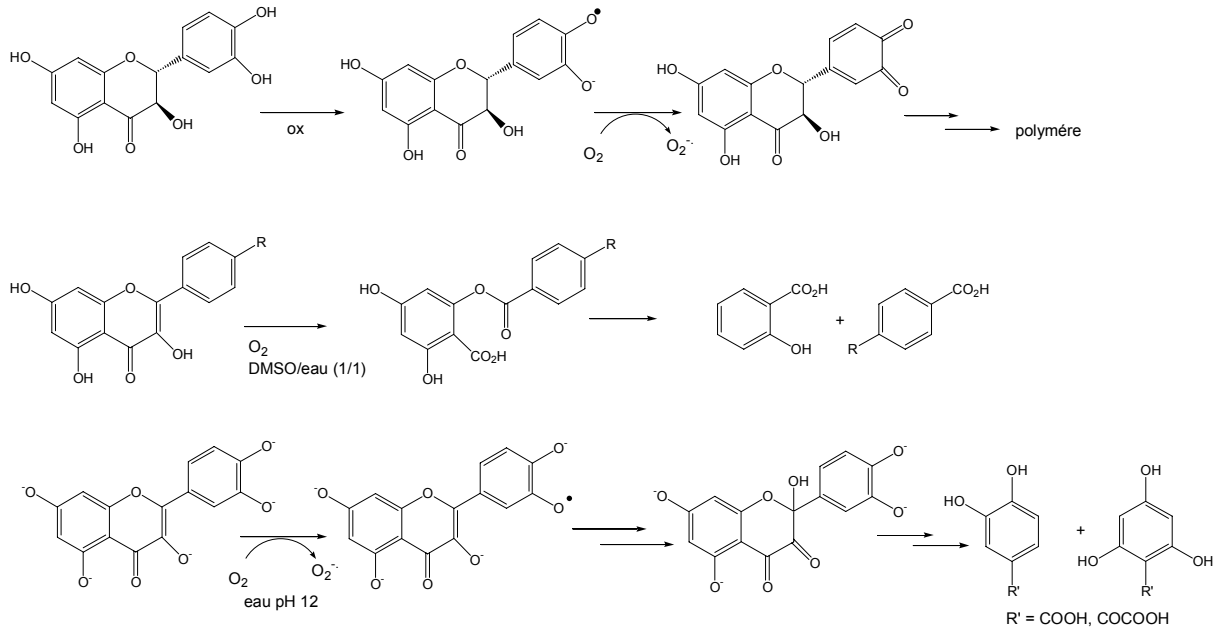


Figure 1.4. exemples d'autoxydation de flavonoïdes (7, 28, 29)

▪ *Effet de la structure du flavonoïde sur la stabilité*

La stabilité des flavonoïdes est affectée par la nature du flavonoïde et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). En effet, Friedman et Jurgens (2000) (31) ont observé que la stabilité des flavonoïdes et de certains acides aromatiques, vis-à-vis du pH, est plus élevée que dans le cas d'autres composés phénoliques en raison d'une stabilisation accrue par résonance des intermédiaires de type phénoxy et quinoïque. Il a été aussi reporté que la stabilité des flavones à la lumière est plus importante que celle des flavonols (32). Ainsi, l'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont donc moins réactifs.

En ce qui concerne l'hydroxylation, Markris et Rossiter (2002) (33) n'ont pas observé d'effet sur la stabilité en comparant les mécanismes de dégradation de la quercétine et de la morine. Par contre, le mécanisme de dégradation à la température de la génistéine et de la daidzéine est différent (34).

D'autre part, Smith *et al.* (2000) (32) et Makris et Rossiter (2000) (33) ont comparé des molécules aglycones à des glycosylées et ils ont reporté respectivement que la quercétine 3-galactoside et la rutine ont une photostabilité et une thermorésistance plus élevée que la quercétine.

L'effet de l'acylation sur la stabilité des flavonoïdes a été étudié par Perrier *et al.* (1998) (20), Ishihara et Nakajima (2003) (35) et Svehlikova *et al.* (2004) (36). Ils ont observé respectivement que la stabilité vis-à-vis de la température, de la lumière et du pH de l'hésperitine, l'isoquercitrine, l'apigénine-7-glucoside a été améliorée par l'introduction de groupements dodécanoate, aromatiques, acétate et malonate. L'effet de l'acylation par les acides aromatiques sur la stabilité a été attribué à des interactions de type hydrophobe intra et/ou intermoléculaire ou à un π - π stacking entre la partie génine du flavonoïde et la partie acyle.

L'effet de la polymérisation sur la stabilité de l'épicatéchine a été décrit par Zhu *et al.* (2002) (37). Ils ont reporté que les dimères d'épicatéchine sont plus sensibles au pH que les monomères.

2.2. Propriétés et applications des flavonoïdes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

D'autres activités, thérapeutiques, ont été décrites dans la littérature pour les flavonoïdes. Elles seraient la conséquence des propriétés antioxydantes, d'inhibition d'enzyme et de complexation des métaux.

2.2.1. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (8), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement

capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène.

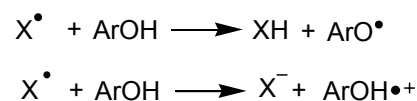
L'activité anti-radicalaire peut être évaluée par radiolyse pulsée, par l'étude spectrométrique du piégeage de radicaux colorés tel que le 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS⁺) (38). L'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Une méthode alternative consiste aussi à déterminer leur aptitude à diminuer la réaction de peroxydation des lipides.

▪ Mécanismes d'action

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont été décrits :

→ le piégeage direct des radicaux libres

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés (X) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène :



Le radical aryloxyde formé est stabilisé par résonance. L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique. Mais, il peut continuer à évoluer selon plusieurs processus (dimérisation, dismutation, recombinaison avec d'autres radicaux, réduction en molécule parent, oxydation en quinone) soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules.

L'activité antiradicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes (39).

→ chélation des ions métalliques (Fe^{3+} , Cu^+)

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives.

Par ailleurs, la complexation des flavonoïdes par des métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation (39, 40).

→ inhibition d'enzyme

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces

radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase...).

→ régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' α -tocopherol (8).

▪ *Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes*

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (39, 41, 42) (figure I.5). Il s'agit de :

→ la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

→ la présence d'un motif énone dans le cycle C.

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

→ la présence de groupement hydroxyle en position 3

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones (43).

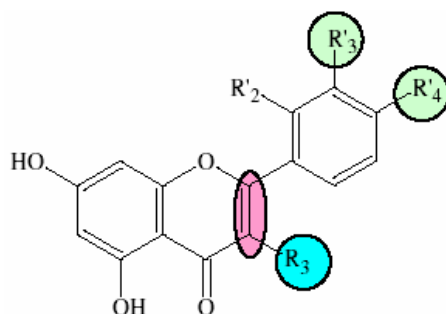


Figure I.5. éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

D'autre part, plus le degré d'hydroxylation du flavonoïde est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé (44). De même, la polymérisation de flavonoïde peut améliorer, comme dans le cas des polymères de rutine (22) ou des procyanidines (45), ou conserver les activités antiradicalaires.

En ce qui concerne l'effet de l'acylation sur les propriétés antioxydantes, il a été principalement rapporté pour les esters galliques de la famille des flavanes (46) ainsi que pour les esters de rutine et d'acide succinique (47). Dans ce dernier cas, l'auteur a montré que les modifications de la partie osidique de la rutine n'altéraient pas le pouvoir antioxydant sauf dans les cas d'une succinylation élevée. Perrier *et al.* (1998) (20) et Boumendjel *et al.* (2003) (48) ont revendiqué la conservation de l'activité antioxydante des esters d'hésperitine et d'acide dodécandioïque. De même, Saija *et al.* (2003) (19) ont observé que l'acylation de la quercétine sur le groupe hydroxyle en position 3 avec différentes chaînes aliphatiques (acétate, propionate, palmitate) ne masque pas l'activité de piégeage de radicaux libres de la molécule parent.

Récemment, Mellou *et al.* (2005) (49) ont observé que les dérivés acylés de la chrysoeriol-7-O- β -D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside et de la chrysoeriol-7-[6''-O-acetyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glycopyranoside] ont une activité antimicrobienne et antioxydante plus importante que les molécules parents. De même, Katsoura *et al.* (2006) (50) ont constaté une augmentation de l'activité antioxydante avec la rutine-4''-O-oléate.

En fonction du mécanisme de l'activité antiradicalaire étudiée, quelques différences dans les relations structure-activité ont été observées. Le tableau I.3 résume l'effet des éléments structuraux des flavonoïdes sur les activités antiradicalaires, de complexation des métaux et d'inhibition de la peroxydation des lipides.

Tableau I.3. effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes (1, 8, 38, 39, 41, 43, 44)

Activité	Facteurs améliorant le pouvoir antioxydant
anti-radicalaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ le nombre de groupements OH disponibles ▪ la méthylation a des effets variables et son effet est difficile à quantifier. ▪ les structures possédant une double liaison C2-C3 et un seul OH en position 4' ▪ une fonction catéchol sur le cycle B. ▪ la présence du C4'-OH.
complexation métallique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ la présence d'une fonction carbonyle en C₄ et de groupe hydroxyle en C₅ et/ou C₃ ▪ la présence d'une partie catéchol ▪ la présence d'un sucre a peu d'effet
inhibition de la peroxydation des lipides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ la présence d'une fonction catéchol ▪ le groupement carbonyle en position 4 du cycle C ▪ La présence de groupement hydroxyle en position C₅, C₇, C_{3'}, C_{4'}, C₃

2.2.2. Propriétés complexantes

Il existe deux sortes de complexations : réversible et irréversible.

- *Complexation réversible*

La complexation réversible des flavonoïdes se fait avec un grand nombre de molécules et biomolécules telles que les phénols (phénomène de copigmentation), les protéines (comme l'albumine de sérum (51)), les polysaccharides (en particulier les cyclodextrines (18, 52)) ou l'ADN (53). Cette complexation peut s'effectuer d'une part par les groupements phénoliques *via* des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et d'autre part, par les noyaux aromatiques *via* des interactions de Van der Waals et des effets hydrophobes (54, 55).

Les flavonoïdes forment aussi des complexes stables avec des métaux de transition (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) ; la stoechiométrie du complexe et le site de chélation dépendent de la nature du flavonoïde (présence de partie catéchol) (56) et du pH (57, 58). De plus, ce phénomène de chélation s'accompagne parfois de l'oxydation du flavonoïde (Cu^{2+} , Fe^{3+}). Les positions généralement complexées font intervenir les groupes hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B, l'hydroxyle en 3 et le groupe carbonyle en 4, l'hydroxyle en 5 et le groupe carbonyle en 4 (figure I.6).

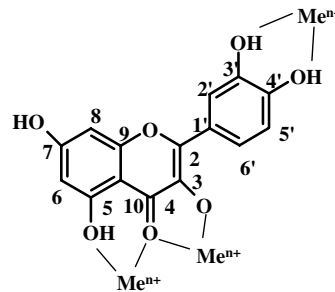


Figure I.6. chélation des métaux par les flavonols (59)

Lorsque les flavonoïdes possèdent plusieurs groupements chélateurs de métaux, il peut y avoir polymérisation. La co-polymérisation des flavonoïdes et du fer est responsable d'un type d'anémie chez les grands consommateurs de thé (60).

La capacité des flavonoïdes à complexer les protéines et les métaux est probablement à l'origine de leur inhibition de nombreuses enzymes.

Alluis *et al.* (1999) (47) ont étudié l'effet de l'acylation de la chrysin-7-glucoside par des acides aromatiques et succiniques sur leurs propriétés de complexation de l'albumine de

sérum et de l'aluminium. Les esters de malonate et succinanate améliorent la complexation des flavonoïdes et des métaux grâce à la participation de la fonction carboxylate libre dans la liaison avec l'ion métallique. L'acylation par un acide aromatique améliore l'affinité du flavonoïde pour les protéines.

▪ *Complexation irréversible*

La complexation irréversible des flavonoïdes avec des protéines a été décrite par Walle *et al.* (2003) (61). Des liaisons covalentes entre les acides aminés des protéines et les polyphénols ont été observées suite à l'oxydation des flavonoïdes. En effet, 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 pouvant réagir avec les groupements nucléophiles, amines et thiols des protéines.

2.2.3. Inhibition d'enzymes

L'inhibition des enzymes par les flavonoïdes concerne plusieurs classes. Il s'agit des hydrolases, les oxydoréductases, ADN synthétases, ARN polymérase, phosphatases, protéine kinases, oxygénases, amino acide oxydases (62). Dans le cas des oxygénases, plusieurs mécanismes d'inhibition ont été proposés :

- le piégeage des radicaux libres générés au cours du mécanisme réactionnel de l'enzyme (l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes)
- le flavonoïde peut remplacer le co-facteur et empêcher son recyclage en raison de leur analogie structurale
- la complexation de Fe^{2+} et Cu^{2+} par les flavonoïdes. Ces ions métalliques sont essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme.

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, Sadik *et al.* (2003) (63) ont étudié l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxigénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxigénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe^{2+} , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy).

L'effet de la nature du flavonoïde, en termes de degrés d'oxydation du cycle C, du nombre d'hydroxyle et de leur alkylation, de la présence d'une structure catéchole et de substituants a

aussi été étudié sur l'activité de ces molécules (63-65). Comme pour l'activité antioxydante, les éléments structuraux déjà cités (paragraphe 2.2.1) améliorent l'activité d'inhibition du flavonoïde. Les substituants ont par contre des effets variables. En effet, la glycosylation diminue drastiquement l'activité inhibitrice alors que la présence de groupes alkyles en position C₆ ou C₈ semble l'améliorer.

2.2.4. Activité photoprotectrice des flavonoïdes

Les rayonnements UV sont divisés en trois groupes. Les UVC de 200 à 290 nm sont des rayonnements à haute énergie et qui sont stoppés avant l'entrée dans l'atmosphère par la couche d'ozone. Les UVB (280-320 nm) sont nocifs pour la santé et n'atteignent que l'épiderme, alors que les UVA (320-400 nm) pénètrent plus profondément. La réponse biologique à ce stress peut être immédiate et passagère (inflammation, brûlure), retardée et chronique (vieillesse de la peau, cancer). L'accumulation de ce stress oxydant induit entre autre une augmentation des radicaux libres, qui dégradent les composants cellulaires : lipides, protéines, bases nucléiques...

Les flavonoïdes, suivant leur structure, présentent des maxima d'absorption dans la zone 270 à 350 nm, ce qui pourrait prévenir ou diminuer les dommages de la peau induits par le stress oxydant en particulier ceux des radiations UVB (66) en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées. En effet, plusieurs brevets et publications ont revendiqué l'utilisation des flavonoïdes dans des préparations anti-UV (19, 67-69).

Ainsi, Bonina *et al.* (1996) (69) ont étudié l'effet protecteur des flavonoïdes (quercétine, hespéritine, naringénine) contre la peroxydation des liposomes induite par des radiations UV. L'efficacité des produits testés a été classée de la manière suivante : quercétine > hespéritine > naringénine. Les auteurs ont attribué cet effet aux propriétés de piégeage des radicaux et de filtre dans le domaine UV des flavonoïdes. De même, Casagrande *et al.* (2006) (70) ont observé un effet protecteur de la quercétine contre les UVB induits par le stress oxydatif.

Dans la même optique, Saija *et al.* (2003) (19) ont étudié l'effet de l'acylation des flavonoïdes sur les propriétés de photoprotection la quercétine. Vu la relation évidente qui existe entre la présence de radicaux oxygène et la dégradation phospholipidique induite par l'UV, l'effet photoprotecteur de la quercétine et ses esters est peut être dû à leur capacité de

capter les radicaux libres et ainsi d'empêcher la propagation de la réaction de peroxydation lipidique. Pour mieux clarifier cet effet, la quercétine et leurs esters ont été mis sous rayons UVC durant différentes périodes et des mesures de spectre d'absorption ont été faites. Ce test a montré que, contrairement à la palmitate de quercétine, l'utilisation de l'acétate de quercétine et de la propionate de quercétine a provoqué une modification spectrale indiquant l'apparition d'un nouveau produit. Ces modifications ont permis de présumer que ces composés pourraient avoir un effet protecteur contre les dégradations induites par les rayons UVC en agissant comme écran absorbant d'UV.

2.2.5. Application reliées aux activités des flavonoïdes et à leurs esters

Les propriétés thérapeutiques, cosmétiques et alimentaires ont fait l'objet de nombreuses publications et brevets (4, 23, 62, 71, 72). Il s'agit essentiellement d'activités anti-virale, anti-tumorale, anti-inflammatoire, anti-allergique, anti-cancéreuse, etc. Ces propriétés sont souvent interprétées comme la conséquence de leurs propriétés antioxydantes et de leur affinité pour les protéines (dont une variété d'enzymes). En effet, en plus de la capacité antiradicalaire, chélatrice de métaux et inhibitrice de la peroxydation des lipides, les flavonoïdes sont aussi inhibiteurs de nombreuses enzymes telles que les hydrolases (hyaluronidase, protéase, phospholipase, phosphatase, etc.), des oxydoréductases, kinases, isoméras, ligases et lyases. Dans le domaine agroalimentaire, les flavonoïdes sont surtout utilisés comme colorant (rutine) et conservateurs contre le rancissement des matières grasses. Quant aux esters de flavonoïdes, ils ont généralement des propriétés renforcées par rapport aux molécules parentes. Le tableau I.4 résume les principales applications des flavonoïdes et de leurs esters dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

Tableau I.4. aperçu sur les propriétés biologiques de flavonoïdes et de leurs esters

Applications pharmaceutiques		
Références	Flavonoïdes	Propriétés
Leroi <i>et al.</i> (1973) (73)	hespéridine octonicotinoate	traitement de l'hypercholestérolémie
Albert <i>et al.</i> (1977) (74)	esters de cyanidan-3-ol	inhibition de la lipoperoxydation
Vercauteren <i>et al.</i> (1993) (75)	perester de catéchine et OPC et d'acide gras	veinotonique, vasculoprotecteur
Watanabe <i>et al.</i> (1993) (76)	esters d'esculétine et d'acide gras	protection des cartilages, inhibition de la dégradation du protéoglycane, traitement pour l'arthropathie
Watanabe <i>et al.</i> (1994 a, b) (77, 78)	dérivés des hydroxycoumarines	inhibition des métalloprotéinases agent chondroprotecteur, traitement de l'arthropathie
Bombardelli <i>et al.</i> (1994)	esters de chalcones et d'acide gras	activité anti-proliférative des tumeurs de l'utérus, des ovaires et des poumons
Formica et Regelson (1995) (72)	quercétine	anti-inflammatoire, anti-tumeur, anti-virale
Manach <i>et al.</i> (1996) (79)	flavones, flavonols, isoflavones, flavanones	prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires
Eugster <i>et al.</i> (1996) (80)	perester de flavonols et de	anti-virale, anti-parasitaire

	flavanones (non glycosylés) et d'acide gras	
Di carlo <i>et al.</i> (1999) (4)	flavonoïde	effet anti-tumeur, anti-inflammatoire, anti-ulcère
Bok <i>et al.</i> (1999) (81)	esters de flavanones et d'acides gras et aromatiques	traitement et prévention des maladies liées à l'hyperlipidémie
Alcaraz <i>et al.</i> (2000) (82)	flavones, flavanones, chalcones	activité anti-bactérienne
Mantas <i>et al.</i> (2000) (83)	flavonoïdes	activité anti-HIV
Matsubara <i>et al.</i> (2004) (84)	quercétine, isoquercitrine, rutine, quercitmeritrine, isoquercitrine cinnamate, isoquercitrine dihydrocinnamate, isoquercitrine p-coumarate, isoquercitrine 2-naphtalate	activité anti-angiogénique (empêcher l'alimentation des tumeurs en sang ce qui favorise leurs disparition)
Syuchi <i>et al.</i> (2006) (85)	eridictyol/ diosmetin	anti-bactérienne, traitement pour glucosidase
Cavazza (86)	propionyl L-carnitine, quercétine, rutine	antiradicalaire, traitement d'anomalies thrombotiques et artérioscléreuses

Applications cosmétiques

Références	Flavonoïdes	Propriétés
Gorou (1983) (87)	esters de quercétine et d'acide gras	inhibition de la tyrosinase, suppression de la formation de mélanine, anti-UV
Vercauteren <i>et al.</i> (1993) (75)	perester de catéchine, OPC et d'acide gras	anti-vieillessement, anti-acnéique, anti-solaire
Levy et Andry (1994) (88)	microcapsules de flavonoïdes et d'OPC	activité antiradicalaire, traitement du vieillissement cutané
Mariotte <i>et al.</i> (1998) (20)	esters de flavonoïdes et d'acide gras	effet anti-age (amélioration de l'élasticité de la peau, anti-ride), antiradicalaire, amincissement
Otto <i>et al.</i> (2000) (89)	esters de flavones et isoflavones et d'acides aromatiques et d'acides gras polyinsaturés	activité de photoprotection et d'activation de la synthèse de collagène
Pfluecker <i>et al.</i> (2000) (90)	flavones et flavonols non glycosylés alkylés ou acylés par des filtres UV	antioxydante, filtre UV
Wolber <i>et al.</i> (2004) (91)	alpha glucosyl rutine	antioxydante pour les préparations dermocosmétiques
Amalia (2004) (92)	flavonoïdes aglycones et glycosylés	modification de l'état des cellules endogènes de la peau
Suk <i>et al.</i> (2005) (93)	gallate d'épicatéchine	résistance à l'oxygène et à la lumière pour des préparations cosmétiques

Applications agro-alimentaires

Références	Flavonoïdes	Propriétés
Markakis (94)	quercétine, rutine	colorants naturels (jus de fruit, soupe, etc.)
Sakai <i>et al.</i> (1993) (21)	esters de catéchine et d'acides gras	antioxydant alimentaire
Vercauteren <i>et al.</i> (1993) (75)	peresters de catéchine, OPC et d'acide gras	compléments diététiques (boissons, produits laitiers et dérivés, confiserie), conservation des aliments
Bok <i>et al.</i> (1999) (81)	esters de flavanones et d'acides gras et aromatiques	incorporation dans des préparations alimentaires
Chen <i>et al.</i> (1999) (95)	polyphénols du thé acylés par des chaînes grasses	antioxydant pour les huiles

2.2.6. Interaction des flavonoïdes avec les membranes biologiques

Dans la plupart des travaux, les propriétés des flavonoïdes ont été mesurées *in vitro*. Cependant, il est difficile de corrélérer ces propriétés avec les effets bénéfiques observés au cours d'études épidémiologiques (Hertog *et al.*, 1993) (96).

Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle lors du passage de ces molécules à travers les membranes c'est-à-dire à une interface eau-lipide et lors de leur absorption. En effet, la forme

bioactive du flavonoïde *in vivo* n'est donc pas nécessairement la forme phytochimique naturelle. Lors de l'absorption des flavonoïdes par l'intestin, la première phase de métabolisation correspond à déglycosylation par hydrolyse, puis l'aglycone résultant (quercétine, hespéritine, naringénine, épicatechine) est ensuite glucuronylé, sulphaté ou *O*-méthylé (16, 97, 98). Pour la quercétine, la forme rencontrée, après ingestion, dans le plasma est la quercétine 3-*O*- β -D-glucuronide (98).

Des études sur la relation structure-activité entre les substrats et leur absorption percutanée ont permis de déterminer les propriétés physico-chimiques impliquées dans le processus de pénétration dans la peau. Les principaux paramètres sont l'hydrophobicité et la taille moléculaire du substrat et leur possibilité à former des liaisons hydrogènes avec les composés du *stratum corneum* (Patel *et al.*, 2002) (99). Bonina *et al.* (1996) (69) ont rapporté que l'hespéridine, la naringénine et à un plus faible degré la quercétine sont capables de traverser le *stratum corneum*. La faible perméabilité de la quercétine a été attribuée à son insolubilité dans l'eau. De même, Saija *et al.* (1998) (100) ont évalué l'effet de différents additifs (éthanol, D-limonène, lécithine) sur l'absorption de l'hespéridine, la naringénine et la quercétine. Ces auteurs ont observé que la quercétine a une faible capacité à pénétrer dans la peau en raison de sa faible solubilité dans l'eau et que la perméabilité de l'hespéridine et de la naringénine augmente après un traitement avec du D-limonène ou de la lécithine en raison d'une diminution de la résistance de la peau.

L'ajout de liposomes dans les préparations favorise l'absorption percutanée de la génistein et sa distribution dans les différentes couches de la peau (101).

L'effet de la structure du flavonoïde sur son assimilation par des fibroblastes a été étudié par Spencer *et al.* (2004) (97). Ils ont observé que l'épicatechine est faiblement assimilé par rapport aux flavanols et pour une même famille de flavonoïde la teneur intracellulaire augmente avec la lipophilie de la molécule. La présence d'un sucre sur le flavonoïde limite et même inhibe son assimilation. De plus, ils ont observé une métabolisation intracellulaire de certains flavonoïdes et de leurs dérivés méthylés. L'assimilation et la métabolisation cellulaire de la quercétine et de ces métabolites par des fibroblastes sont résumées dans la figure I.7.

Le système de transport transmembranaire est encore mal connu. Selon les conditions opératoires et la structure du flavonoïde, les auteurs ont suggéré des mécanismes variés : rapides et nécessitant un co-produit et induit par une molécule énergétique (ATP) (Schramm *et al.*, 1999) (102), par une diffusion passive ou par un processus actif nécessitant un transporteur (Lançon *et al.*, 2004) (103).

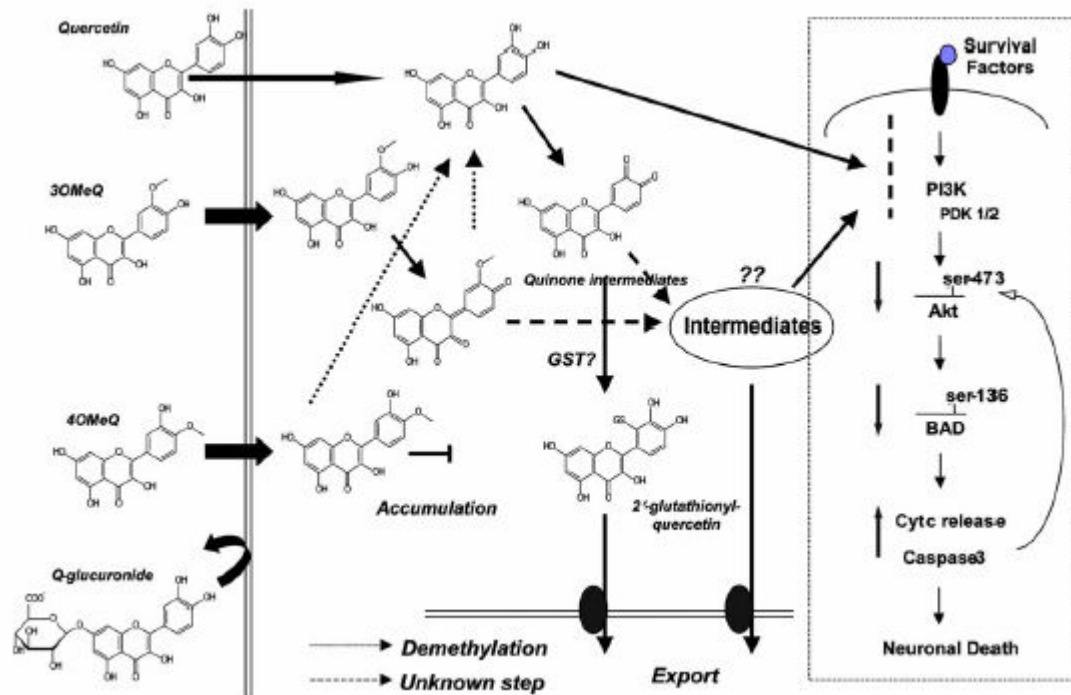


Figure 1.7. métabolisation cellulaire de la quercétine et de ses dérivés dans des cellules de fibroblaste (97)

2.3. Conclusion

A travers cette revue bibliographique nous avons pu balayer les différentes propriétés des flavonoïdes, les mécanismes mis en jeu par leur structure et les applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Il est essentiel de noter que plusieurs problèmes se posent lors de leur formulation. En effet, la solubilité des flavonoïdes est faible et dépend fortement de leur structure. De plus, ces molécules sont sensibles à l'oxygène, aux métaux et à la lumière et ce qui peut donner aux préparations cosmétiques ou alimentaires une couleur indésirable et une grande perte de la valeur recherchée (20, 75). Un autre problème se pose et il s'agit de la biodisponibilité limitée de ces molécules. En effet, les activités observées *in vitro* n'ont pas été nécessairement corrélées aux études épidémiologiques (96). L'absorption des flavonoïdes par la voie alimentaire passe par leur métabolisation. Quant à la voie cutanée, la perméabilité des flavonoïdes est faible et il est nécessaire d'utiliser des exhausteurs de pénétration.

Différentes méthodes ont été utilisées pour améliorer la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité (acylation, glycosylation, polymérisation...). Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'acylation enzymatique des flavonoïdes. Cependant, dans la littérature trois types d'acylations ont été réalisés. Il s'agit de l'acylation chimique (13, 20, 47, 48, 73, 74, 76-78, 81, 89, 95, 104, 105), chimio-enzymatique (19, 106-111) et enzymatique de flavonoïdes.

Dans la partie suivante, une revue bibliographique, traitant les différents paramètres affectant la synthèse enzymatique des flavonoïdes, sera présentée.

3. ACYLATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOÏDES

Ce paragraphe a fait l'objet d'une revue bibliographique publiée dans le journal « Process Biochemistry ». Dans cette revue, les principaux travaux qui ont traité l'acylation enzymatique des flavonoïdes et l'effet de plusieurs paramètres sur cette réaction ont été récapitulés.



Process Biochemistry 41 (2006) 2237–2251

 Process
 Biochemistry

www.elsevier.com/locate/proctio

Review

Enzymatic acylation of flavonoids

Latifa Chebil, Catherine Humeau, Aude Falcimaigne,
 Jean-Marc Engasser, Mohamed Ghoul*

Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, 2, Av de la Forêt de Haye 54500, Vandoeuvre, France

Received 26 November 2005; received in revised form 24 April 2006; accepted 10 May 2006

Abstract

Flavonoids (aglycon, glycosylated) are widely used in pharmaceutical, cosmetic and food preparation. They have several physico-chemical properties and biological activities but they are characterized by a low solubility and stability. In order to take advantage of these properties, the enzymatic acylation of these molecules with fatty and aromatic acids by protease and lipase under different operating conditions has been suggested as a promising route by several authors. However, it is very important to make a compromise between improving the stability and the solubility without affecting the biological activities. In fact, the position of acylation (regioselectivity) can drastically modify these properties. This article reviews the main work done on the influence of the type, origin and concentration of the enzyme, the nature of the reaction, the operating conditions, the composition of the reactional media and the nature of substrates on regioselectivity, initial rates and conversions yields of the acylation. The published data showed that with glycosylated flavonoids, acylation occurred with all lipases and subtilisin tested, whereas with aglycon flavonoids, acylation was possible only with *Pseudomonas cepacia* lipase and carboxyl-esterase. When acylation occurred, several products were obtained (mono-, diesters). The regioselectivity of acylation depends on the type of the enzyme. For a given enzyme, regioselectivity is affected by the structure of the flavonoid and the acyl donor. The position of acylation on the flavonoid and the nature of the acyl donor could improve the properties of these molecules. The nature of the flavonoid also plays a major role on the conversion yields and initial rates. When optimal conditions (temperature, enzyme, substrates and solvent) were applied, the conversion yield was often more than 95% and the properties are increased.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Acylation; Subtilisin; Lipase; Flavonoid; Acyl donor; Solvent

Contents

1. Introduction	2238
2. Effect of the type, origin and concentration of the enzyme	2238
2.1. Effect on yield conversion and initial rate	2238
2.2. Effect on regioselectivity	2243
3. Effect of the nature of the acylation	2244
4. Operating conditions	2244
4.1. Temperature	2244
4.2. The various processes of flavonoid ester synthesis	2245
4.3. The by-products of the flavonoid acylation: their effects and the techniques for their elimination	2245
4.3.1. Effects of the by-products on flavonoid acylation	2245
4.3.2. Different techniques of elimination of the by-products	2245
5. Effect of the nature of the solvent used	2246
6. Effect of the nature and concentration of the substrates	2247
6.1. Effect of the flavonoids	2247
6.1.1. Effect of the nature of flavonoids	2247
6.1.2. Effect of the concentration of the flavonoid	2248

* Corresponding author. Tel.: +33 383595892; fax: +33 383595778.

E-mail addresses: ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr, Mohamed.Ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr (M. Ghoul).

6.2. Effect of the acyl donors	2248
6.2.1. Effect of the nature of the acyl donor	2248
6.2.2. Effect of the concentration of the acyl donor	2249
7. Conclusion	2249
References	2249

1. Introduction

Flavonoids are an important group of natural compounds widely distributed throughout the plant kingdom. They are used in food, cosmetics, and various other commodity preparations [1–5]. The biological, pharmacological, and medicinal properties of flavonoids have been reviewed extensively [6,7]. It has been reported that, in addition to their free radical scavenging and antioxidant power [8], flavonoids have multiple biological activities [9], including vasodilatory, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antibacterial, immune-stimulating, anti-allergenic, antiviral, and estrogenic effects, as well as being inhibitors of several enzymes such as phospholipase A2, cyclooxygenase, lipoxigenase, glutathione reductase, and xanthine oxidase [10]. However, the use of flavonoids in several domains is limited by their low stability and solubility in the fatty and aqueous phases [11–14]. To improve their properties, several authors have studied the modification of their structure by chemical, enzymatic or chemo-enzymatic reactions. Two reactions (glycosylation and acylation) have received particular attention. The first allowed flavonoids to reinforce their hydrophilic character by adding sugars, whereas the second reaction make them more hydrophobic by fatty acid linkage. The chemical acylation of flavonoids by various fatty acids has been patented [15,16], but this process is not regioselective and leads to an unwanted functionalisation of phenolic hydroxyl groups which are responsible for the antioxidant activity of flavonoids [10]. However, the enzymatic acylation of flavonoids by lipases with phenolic acids is more regioselective than chemical acylation and may enhance not only their solubility in various media, but also their stability [17,18] and their antioxidant activity [19].

In this paper, we review the main factors affecting regioselectivity and the performance of the enzymatic acylation of flavonoids.

2. Effect of the type, origin and concentration of the enzyme

The enzymes used in the enzymatic acylation of flavonoids are often an immobilized form. In fact, immobilization facilitates product recovery and makes substrate access to the catalytic sites of enzymes easier. Moreover, some papers indicated that the immobilization of the enzyme enhanced their resistance against inactivation by different denaturants [20]. However, depending on the nature of the support used, the partition coefficient of substrate-solvent and the products could be affected. Yahya et al. [21] reported that immobilization in a hydrophilic support led to a loss of substrate solubility and

lipase activity, while the use of a hydrophobic carrier tended to increase this activity. The carrier not only serves as the scaffold on which the enzyme can be attached, but its physical and chemical properties (e.g. pore size, hydrophilic/hydrophobic balance, aquaphilicity and surface chemistry), also strongly dictate the catalytic properties of the enzyme (e.g. activity, selectivity and stability) [22].

2.1. Effect on yield conversion and initial rate

Various types of enzymes have been tested for acylation of flavonoids, such as proteases, acyl transferases and lipases (Table 1) and subtilisin was the first enzyme used for flavonoid ester synthesis. However, the increase in the number of biocatalysts to be used, among which are lipases and in particular lipase B of *Candida antarctica* (CAL-B). Some reactions were also catalyzed by acyl transferases, but they required the use of either an activated acyl donor (ester of coenzyme A) or the presence *in situ* of a system allowing the generation of these derivatives [23,24].

The acylation of quercitrin (rhamnoside flavonoid), isoquercitrin (glucoside flavonoid) and luteolin-7-glucoside was carried out by Danieli et al. [25] in anhydrous pyridine, with subtilisin of Carlsberg and an activated acyl donor: trifluoroethyl butanoate. After 48 h of incubation in these conditions, conversion yields of quercitrin, isoquercitrin and luteolin-7-glucoside, were 0%, 86% and 76%, respectively (Table 2). Danieli et al. [25] also used the trifluoroethyl cinnamate as an acyl donor, but no reaction was observed with isoquercitrin and luteolin-7-glucoside. According to these authors, the absence of reactivity was due to the fact that the formation of a cinnamoyl-enzyme intermediate which hindered the access of large molecules (isoquercitrin, luteolin-7-glucoside, etc.) to the enzyme site. These authors also studied the reactivity of rutin (6''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-D-glucose flavonoid), naringin (2''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-D-glucose flavonoid), hesperidin (6''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-D-glucose flavonoid) and peltoside (6''-O-(α -L-arabinopyranosyl)-D-glucose flavonoid) in the presence of trifluoroethyl butanoate as an acyl donor and subtilisin from *Bacillus licheniformis* as a biocatalyst [26]. They observed that the conversion yields, after 48 h of incubation, were in the range of 33–78% (Table 2). However, with the same substrates (rutin, trifluoroethyl butanoate), Kodelia et al. [27] indicated that with subtilisin from *Bacillus subtilis*, the conversion yield was higher (90%) and the reaction was faster (Table 2).

Since these works [25–27], many papers have discussed the use of lipases for flavonoid ester synthesis. For the

Table 1
A literature survey of enzyme-catalyzed flavonoid esters synthesis

Enzyme	Enzyme source	Flavonoid	Acyl donor	References
Subtilisin	<i>Bacillus licheniformis</i> , free (sigma)	Isoquercitrin, quercitrin, luteolin-7-glucoside	Trifluoroethyl butyrate and cinnamate	[25]
		Rutin, hesperidin, naringin, peltatoside	Trifluoroethyl butyrate	[26]
Lipase B (Novazym 453 [®])	<i>Bacillus subtilis</i> , free (Sigma)	Isoquercitrin	2-Chloroethyl methyl succinate	[35]
		Rutin	Trichloroethyl butyrate	[27]
Lipase B (Novazym 435 [®])	<i>Candida Antarctica</i> immobilized	Isoquercitrin, rutin, naringin	Dibenzyle malonate	[62]
Lipase B (Novazym 435 [®])	(Novo Nordisk A/S)	Isoquercitrin, quercitrin, rutin	Vinyl acetate	[36]
		Naringin	Stearic, palmitic, lauric, oleic, capric, 12-hydroxystearic, linoleic, <i>p</i> -coumaric, 4-chlorophenylacetic, cinnamic, 4-hydroxyphenylacetic, 5-phenylvaleric, 4-phenylbutyric, 3-phenylpropionic acids	[64]
		Naringin, isoquercitrin, luteolin-7-glucoside, catechin-7- <i>O</i> - α - <i>D</i> -glucoside	Vinyl cinnamate, caffeate, <i>p</i> -coumarate	[32]
		Rutin, naringin	Octanoic, decanoic, dodecanoic acids	[33,40]
		Naringin	Palmitic acid	[41]
		Phloridzin	Ethyl cinnamate, methyl benzoate, methyl <i>p</i> -hydroxyphenylacetate, methyl <i>p</i> -hydroxyphenyl-propionate, methyl salicylate	[34]
		Quercetin, hesperidin, rutin, esculin	Hexanoic, heptanoic, nonanoic, lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic acids	[29]
		Rutin, esculin	Lauric, myristic, palmitic, stearic, adipic, azelaic, dodecanoic, hexadecanoic, 11-aminoundecanoic, 11-mercaptoundecanoic acids	[39]
		Rutin, esculin	Palmitic, hexadecanoic, 16-hydroxyhexadecanoic, benzoic, gallic, cinnamic, 4-nitrocinnamic, hydrocinnamic, 3,4-dihydroxy hydrocinnamic, 4-hydroxyphenyl acetic, quinic, (<i>R</i> , <i>S</i>)-thioctic acids	[38]
		Naringin chrysoeriol-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -(3'- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside, chrysoeriol-7-[6''- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -allostyl-(1 \rightarrow 2)- β - <i>D</i> -glucopyranoside]	Vinyl decanoate, laurate and stearate; decanoic acid, lauric acid and stearic acid	[42]
*Lipase B	* <i>Candida antarctica</i> , free (Novo Nordisk A/S)	Isoquercitrin, callistephin, chrysanthemine, rutin, naringin	Vinyl cinnamate and <i>p</i> -coumarate	[31]
*Lipase PS	* <i>Pseudomonas cepacea</i> , free (Amano)			
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i> , free (Amano International)	Catechin	Vinyl acetate	[28]
*Chirazyme L-2 [®]	* <i>Candida antarctica</i> , free (Roche Diagnostics)	Isoquercitrin	3-Phenylpropionate, 3-methoxycinnamate,	[18]
*Lipase PS	* <i>Pseudomonas cepacea</i> , free (Amano Pharmaceutical Co.)		2-methoxycinnamate, benzoate, 4-phenylbutyrate, 2-naphthylacetate, cinnamate, <i>p</i> -coumarate, vinyl hexanoate	
*Lipoprotein lipase	*Free (Toyobo Co., Ltd.)			
Carboxyl-esterase	* <i>Streptomyces rochei</i> , free (Wako); * <i>Aspergillus niger</i> , free (Amano Seiyaku)	Catechin, epigallocatechin	Ethyl acetate, ethyl propionate, phenyl propionate, phenyl butyrate	[13]
Cell extract	<i>Perilla frutescens</i>	3-Glucoside anthocyanin (delphinidin, cyanidin, pelargonidin)	Esters CoA of caffeic and <i>p</i> -coumaric acids	[23]
Cell extract	<i>Ipomoea batatas</i>	Isoquercitrin, callistephin, chrysanthemine	Caffeic, ferulic, <i>p</i> -coumaric cinnamic acids	[24]

acylation of (+) catechin with vinyl acetate, Lambusta et al. [28] tested seven lipases but only the lipase from *Pseudomonas cepacea* (PCL) allowed a significant conversion yield at 48 h (70%, Table 2). However, this activity was

improved when the lipase was immobilized by adsorption on Celite. Aglycon flavonoid synthesis occurred only with the PCL or carboxyl-esterases [13] and no reaction was observed with CAL-B [29].

2240

L. Chebil et al. / Process Biochemistry 41 (2006) 2237–2251

Table 2
Reaction conditions and conversion yields of enzymatic acylation of flavonoids

Substrate	Operating conditions	Result	Reference
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin, quercitrin, luteolin-7-glucoside	Pyridine anhydrous, 45 °C, 48 h	Mixture of isoquercitrin 6''- <i>O</i> -butanoate, 3''- <i>O</i> -butanoate and 3'',6''- <i>O</i> -dibutanoate (20%, 13%, 24%)	[25]
<i>Acyl donor</i> : trifluoroethyl butyrate and cinnamate (1/10) ^a	<i>Enzyme</i> : subtilisin from Carlsberg (27 g/L)	Mixture of luteolin-7-glucoside 6' - <i>O</i> -butanoate, 3''- <i>O</i> -butanoate and 3'',6''- <i>O</i> -dibutanoate (14%, 12%, 12%) No reaction with quercitrin No reaction with trifluoroethyl cinnamate	
<i>Flavonoid</i> : rutin, hesperidin, naringin, peltatoside (33.3 g/L)	Pyridine anhydrous, 45 °C, 48 h	Rutin 3''- <i>O</i> -butanoate (67%)	[26]
<i>Acyl donor</i> : trifluoroethyl butyrate (1/5) ^a	<i>Enzyme</i> : subtilisin from <i>Bacillus licheniformis</i> (26.6 g/L)	Hesperidin 3''- <i>O</i> -butanoate (65%) Naringin 3''- <i>O</i> -butanoate (33%) Esters of peltatoside (78%): mixture of peltatoside 3''- <i>O</i> -mono, 4''- <i>O</i> -mono and 3'',4''- <i>O</i> -dibutanoate	
<i>Flavonoid</i> : catechin (15.3 g/L)	Acetonitrile, 45 °C, 48 h	Mixture of catechin 5- <i>O</i> -acetate (40%) and 7- <i>O</i> -acetate (32%)	[28]
<i>Acyl donor</i> : vinyl acetate (1/20.5) ^a	<i>Enzyme</i> : <i>Pseudomonas cepacia</i> lipase (50 g/L)		
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin (20 g/L)	Pyridine anhydrous 45 °C, 7 days	Isoquercitrin 6''- <i>O</i> -methyl malonate (45%)	[35]
<i>Acyl donor</i> : 2-chloroethyl methyl succinate (1/30) ^a	<i>Enzyme</i> : subtilisin from <i>Bacillus licheniformis</i> (16 g/L)	Isoquercitrin 3''- <i>O</i> -methyl malonate (5%) Isoquercitrin 3'', 6''- <i>O</i> -di (methyl malonate) (5%)	
<i>Flavonoid</i> : catechin, epigallocatechin (6.6 g/L)	Buffer MacIlvain (pH 5), 33 °C, 24 h	Catechin 3- <i>O</i> -acetate	[13]
<i>Acyl donor</i> : ethyl acetate, ethyl propionate, phenyl propionate, phenyl butyrate (1/2) ^a	<i>Enzyme</i> : carboxyl-esterase from <i>Streptomyces rochei</i> (27 u/ml) or <i>Aspergillus niger</i> (334 u/ml)	Catechin 3- <i>O</i> -propionate Epigallocatechin 3- <i>O</i> -propionate Epigallocatechin 3- <i>O</i> -butyrate	
<i>Flavonoid</i> : rutin (180 g/L)	Pyridine anhydrous 45 °C, 8 h	Rutin 3''- <i>O</i> -butanoate (90%)	[27]
<i>Acyl donor</i> : trichloroethyl butyrate (1/9) ^a	<i>Enzyme</i> : subtilisin from <i>Bacillus subtilis</i> (100 g/L)		
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin, rutin, naringin (15–20 g/L)	Acetone anhydrous with 10% pyridine, 45 °C, 12 days	Isoquercitrin 6''- <i>O</i> - (benzyle malonate) (74%)	[62]
<i>Acyl donor</i> : dibenzyle malonate (1/15) ^a	<i>Enzyme</i> : CAL-B (66.6 g/L)	Rutin 6''- <i>O</i> - (benzyle malonate) (79%) Naringin 6''- <i>O</i> - (benzyle malonate) (69%)	
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin, quercitrin, rutin (18–25 g/L)	Acetone/pyridine (9/1, v/v) 45 °C	Isoquercitrin 3'', 6''- <i>O</i> -diacetate (79%, 60 h)	[36]
<i>Acyl donor</i> : vinyl acetate (1/10) ^a	<i>Enzyme</i> : Novozym 435 [®] (30 g/L)	Quercitrin 4''- <i>O</i> -acetate (77%, 150 h) Rutin 3'',4''- <i>O</i> -diacetate (91%, 45 h)	
<i>Flavonoid</i> : anthocyanin (delphinidine, cyanidine, pelargonidine) 3-glucoside	<i>Buffer</i> : Tris-HCl pH 7.5; 10 min; 30 °C	Anthocyanidin 6''- <i>O</i> - (<i>p</i> -coumarique) 3-glucoside	[23]
<i>Acyl donor</i> : acid caffeic, <i>p</i> -coumaric esters CoA (1/0.5) ^a	<i>Enzyme</i> : cell extract from <i>Perilla frutescens</i> (0.4 g/L)	Anthocyanidin 6''- <i>O</i> -caffeate de 3-glucoside	

Table 2 (Continued)

Substrate	Operating conditions	Result	Reference
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin, callistephin, chrysanthemin, rutin, naringin (10 g/L) <i>Acyl donor</i> : vinyl cinnamate, <i>p</i> -coumarate (1/5) ^a	Acetonitrile, acetone or acetone/DMF (10/1, v/v) 37 °C, 3 days <i>Enzymes</i> : CAL-B (10–12.5 g/L), Amano PS (10 g/L)	Isoquercitrin cinnamate (68%) Isoquercitrin <i>p</i> -coumarate (>40%) Naringin cinnamate (>40%) Rutin cinnamate (>40%) Callistephin cinnamate (>40%) Chrysanthemin cinnamate (>40%)	[31]
<i>Flavonoid</i> : isoquercitrin, callistephin, chrysanthemin (2.2 mg/L) <i>Acyl donor</i> : caffeic, ferulic, <i>p</i> -coumaric and cinnamic acids (1/2) ^a	<i>Buffer</i> : Tris–HCl, pH 7.8, 30 °C, 3 h <i>Enzyme</i> : extract cell from <i>Ipomoea batatas</i> (6.4 g proteins/L)	Isoquercitrin 6'- <i>O</i> -caffeate (38%) Isoquercitrin <i>p</i> -coumarate (27%) Isoquercitrin ferulate (9%) Isoquercitrin cinnamate (0%) Callistephin caffeate (12%) Chrysanthemin caffeate (12%)	[24]
<i>Flavonoid</i> : naringin (133 g/L) <i>Acyl donor</i> : stearic, palmitic, lauric, oleic, capric, 12-hydroxystearic, linoleic, <i>p</i> -coumaric, 4-chlorophenylacetic, cinnamic, 4-hydroxyphenylacetic, 5-phenylvaleric, 4-phenylbutyric, 3-phenylpropionic acids (1/4) ^a	<i>tert</i> -Butanol, 60 °C, 24–40 h <i>Enzyme</i> : Novozym 435 [®] (333 g/L)	Naringin 6'- <i>O</i> -stearate (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -palmitate (>15%) Naringin 6'- <i>O</i> -laurate (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -oleate (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -caprate (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(12-hydroxystearate) (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -linoleate (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumarate) (<15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(4-chlorophenylacetate) (>15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(4-hydroxyphenylacetate) (>15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(5-phenylvalerate) (>15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(4-phenylbutyrate) (>15%) Naringin 6'- <i>O</i> -(3-phenylpropionate) (>15%)	[64]
<i>Flavonoid</i> : naringin, isoquercitrin, luteolin-7-glucoside, catechin-7- <i>O</i> - α - <i>D</i> -glucoside (10–30 g/L) <i>Acyl donor</i> : vinyl cinnamate, caffeate, <i>p</i> -coumarate (1/4) ^a	<i>tert</i> -Butanol/pyridine (9/1, v/v), 37 °C, 5 days <i>Enzyme</i> : Novozym 435 [®] (15–44 g/L)	Catechin 7- <i>O</i> - α - <i>D</i> -glucosyl 6'- <i>O</i> -cinnamate (70%) Naringin 6'- <i>O</i> -ferulate (25%) Naringin 6'- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumarate) (30%) Naringin 6'- <i>O</i> -cinnamate (30%) Isoquercitrin 6'- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumarate) (32%) Isoquercitrin 6'- <i>O</i> -cinnamate (45%) Isoquercitrin 6'- <i>O</i> -ferulate (15%) Luteolin-7- <i>O</i> -glucosyl 6'- <i>O</i> -cinnamate (30%)	[32]
<i>Flavonoid</i> : rutin, naringin (10–80 g/L) <i>Acyl donor</i> : octanoic, decanoic, dodecanoic acids (1/3–8) ^a	Acetone, <i>tert</i> -butanol, THF, solvent free, 45 °C, 240 h <i>Enzyme</i> : Novozym 435 [®] (5–20 g/L)	Rutin 3'- <i>O</i> -acyl Naringin 6'- <i>O</i> -acyl Conversion yield depends on the nature of the solvent: in <i>t</i> -BuOH (60% at 220 h), THF (<4%), acetone (<30%), solvent free (<13%)	[33,40]
<i>Flavonoid</i> : naringin (29 g/L) <i>Acyl donor</i> : palmitic acid (1/5) ^a	<i>tert</i> -Amyl alcohol, 60 °C, 45 h <i>Enzyme</i> : Novozym 435 [®] (10 g/L)	Naringin 6'- <i>O</i> -palmitate (24–43% with different water content)	[41]

Table 2 (Continued)

Substrate	Operating conditions	Result	Reference
Flavonoid: phloridzin (4.6–210 g/L)	Solvent free, 60–100 °C, 2–15 h	Phloridzin 6''-O-cinnamate (100% 5 h)	[34]
Acyl donor: ethyl cinnamate, methyl benzoate, methyl <i>p</i> -hydroxyphenylacetate, methyl <i>p</i> -hydroxyphenylpropionate, methyl salicylate (1/600) ^a	Enzyme: Novozym 435 [®] (5–60 g/L)	Phloridzin 6''-O-benzoate (100%, 6 h) Phloridzin 6''-O-salicylate (100%, 6 h) Phloridzin 6''-O-(<i>p</i> -hydroxyphenylacetate) (0%) Phloridzin 6''-O-(<i>p</i> -hydroxyphenylacetate) (0%)	
Flavonoid: isoquercitrin (23 g/L)	Acetone or acetonitrile, 37 °C, 10 days, molecular sieves 4A (12.5 g/L)	Isoquercitrin 6''-O-phenylpropionate (68%)	[18]
Acyl donor: vinyl 3-phenylpropionate, 3-methoxycinnamate, 2-methylcinnamate, benzoate, 4-phenylbutyrate, 2-naphthylacetate, cinnamate, <i>p</i> -coumarate, hexanoate (1/5) ^a	Enzyme: chirazyme L-2, Amano PS, lipoprotein lipase (25 g/L)	Isoquercitrin 6''-O-(<i>m</i> -methoxycinnamate) (30%) Isoquercitrin 6''-O-(<i>o</i> -methyl cinnamate) (22%) Isoquercitrin 6''-O-benzoate (42%) Isoquercitrin 6''-O-(4'''-phenylbutyrate) (49%) Isoquercitrin 6''-O-(2'''-naphthylacetate) (43%) Isoquercitrin 6''-O-cinnamate (59%) Isoquercitrin 6''-O-(<i>p</i> -hydroxycinnamate) (11%) Isoquercitrin 6''-O-hexanoate (49%)	
Flavonoid: quercetin, hesperidin, rutin, esculin (5 g/L)	<i>tert</i> -Amyl alcohol, 60 °C, 150 h	No reaction with quercetin	[29]
Acyl donor: hexanoic, heptanoic, nonanoic, lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic acids (1/1) ^a	Enzyme: Novozym 435 [®] (10 g/L)	Rutin palmitate (71%) Esculin palmitate (80%) Hesperidin palmitate (38%) Influence of the chain length of the acyl donor on conversion yield of rutin (40–80%)	
Flavonoid: rutin, esculin (5 g/L)	<i>tert</i> -Amyl alcohol, 60 °C, 150 h	Esters of rutin and fatty acids (70–76%)	[39]
Acyl donor: lauric, myristic, palmitic, stearic, adipic, azelaic, dodecandioic, hexadecandioic, 11-aminoundecanoic, 11-mercaptoundecanoic acids (1/1) ^a	Enzyme: Novozym 435 [®] (10 g/L)	Esters of esculin and fatty acids (80–82%) Esters of rutin and diacids (48–87%) Esters of esculin and diacids (70–89%) Esters of rutin and substituted acids (30–76%) Esters of esculin and substituted acids (60–82%)	
Flavonoid: rutin, esculin (5 g/L)	<i>tert</i> -Amyl alcohol, 60 °C, 150 h	Esters of rutin and aliphatic acids (69–90%)	[38]
Acyl donor: palmitic, hexadecandioic, 16-hydroxyhexadecanoic, benzoic, gallic, cinnamic, 4-nitrocinnamic, hydrocinnamic, 3,4-dihydroxy hydrocinnamic, 4-hydroxyphenyl acetic, quinic, (<i>R</i> , <i>S</i>)-thioctic acids (1/1) ^a	Enzyme: Novozym 435 [®] (10 g/L)	Esters of esculin and aliphatic acids (75–89%) Esters of rutin and aromatic and aryl aliphatic acids (0–62%) Esters of esculin and aromatic and aryl aliphatic acids (0–75%) Esters of rutin and other cyclic acids (20; 47%) Esters of esculin and other cyclic acids (23; 70%)	
Flavonoid: naringin (5.8–7.5 g/L), chrysoeriol-7- <i>O</i> -β-D-(3''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside, chrysoeriol-7-[6'''- <i>O</i> -acetyl-β-D-allosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranoside]	Acetone, <i>tert</i> -butanol, 50 °C, 96 h	Esters of naringin and aliphatic acids (19–27%)	[42]
Acyl donor: vinyl decanoate, laurate, stearate; decanoic, lauric and stearic acids (1/10) ^a	Enzyme: Novozym 435 [®] (10 g/L)	Esters of naringin and vinyl esters (48–70%) Chrysoeriol-7- <i>O</i> -β-D-(3''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside 6''-laurate (90%) Chrysoeriol-7-[6'''- <i>O</i> -acetyl-β-D-allosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranoside] 6''-laurate (75%)	

^a Molar ratio flavonoid/acyl donor.

Mozhaev et al. [30] tested 15 lipases and proteases for the acylation of bergenin. They observed that only eleven enzymes were active with this substrate. The best results were obtained with Chirazyme L-2 (lipase from *Candida Antarctica*), Chirazyme L-6 (lipase from *Pseudomonas* sp.), lipase PS30 (lipase from *Burkholderia cepacea*) and lipase FAP-15 (lipase from *Rhizopus oryzae*).

For the transesterification of glycosylated flavonoids, Nakajima et al. [31] showed that only CAL-B and PCL, among the nine lipases tested, were active during this reaction. Gao et al. [32] also tested several enzymes for the acylation of glycosylated catechin. They reported that this reaction occurred only with the lipase of *Mucor miehei* (Lipozyme®) and the CAL-B (Novozym 435®). The highest conversion yield (70% of catechin 7-*O*- α -D-glucosyl 6'-*O*-cinnamate) was obtained with the last enzyme (Table 2).

For a given enzyme, CAL-B, Kontogianni et al. [33] observed that the variation of the concentration of lipase, during the acylation of naringin in the presence of decanoic acid as an acyl donor and *tert*-butanol as a solvent, led to an increase of the conversion yield. However, a plateau was reached when lipase concentrations were higher than 15 g/L. The highest value of the conversion yield was about of 40% after 240 h of incubation. The effect of enzyme concentration on the initial rate was also investigated by Enaud et al. [34] during the synthesis of phloridzin ester in melting medium at 80 °C. They

Table 3

Effect of the amount of Novozym 435® on the initial rate of phloridzin (50 μ mol) acylation by ethyl cinnamate (30 mmol), at 80 °C, under 200 mbar

Novozym 435® (g/L)	Initial rate (mM h ⁻¹)
0	0
5	1.5
10	4
15	7
20	10
22	11
25	12.5
26	13
30	13
40	14
60	17

Adapted from Enaud et al. [34].

reported that the initial rate rose in proportion to the concentration of lipase up to 20 g/L (Table 3). In this work, the conversion yield was about 100%.

2.2. Effect on regioselectivity

Apart from its effect on the conversion yield and the initial rate of acylation, the form and nature of the enzyme also affect the regioselectivity of this reaction.

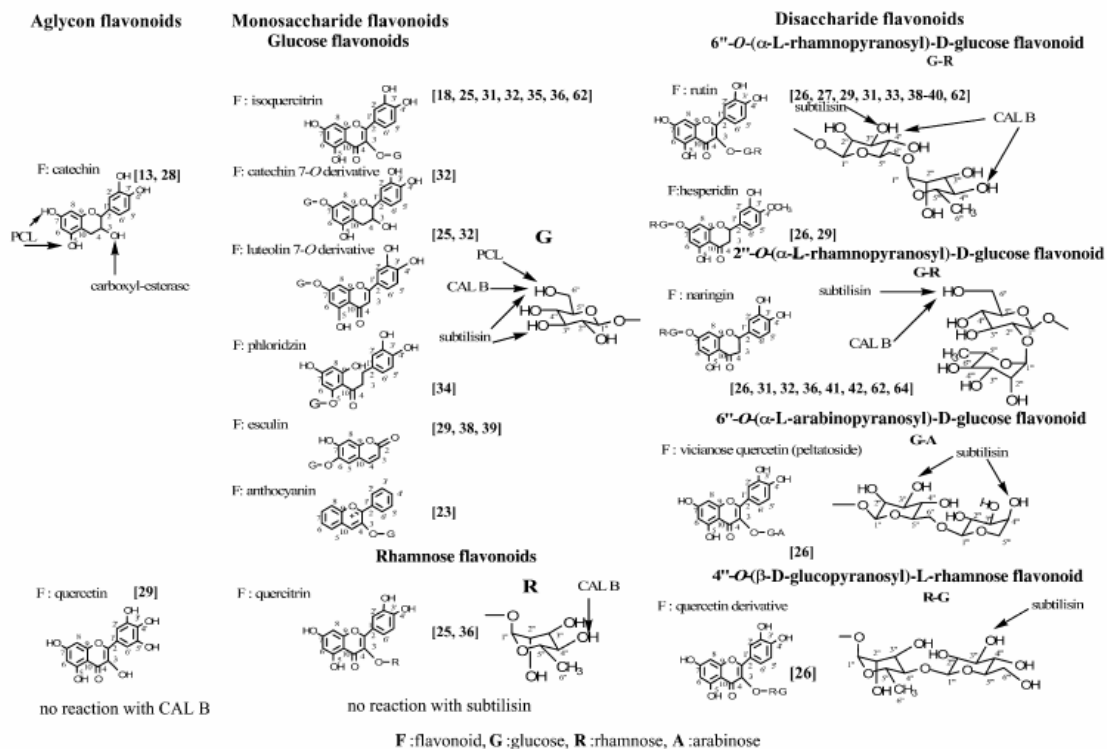


Fig. 1. Regioselectivity of flavonoid acylation with protease (subtilisin) and lipase (CAL-B: lipase of *Candida antarctica*; PCL: lipase of *Pseudomonas cepacea*).

Danieli and coworkers [25,26,35–37] were pioneers in the investigation of the regioselectivity of flavonoid ester synthesis. They showed that the acylation of isoquercitrin (quercetin-3-glucoside) and luteolin-7-glucoside with subtilisin as a biocatalyst and trifluoroethyl butanoate as an acyl donor led to mono- and di-ester on the position 6''-OH and 3''-OH of the glucose [25] (Table 2, Fig. 1). These results indicated that when the trifluoroethyl butanoate was used as an acyl donor, regioselectivity was not affected by the site of the position of the glucose attachment on the genin. However, this regioselectivity was affected by the nature of the sugar part. In fact, as has been previously mentioned, the reaction with quercitrin (rhamnose flavonoid) did not occur [26]. These authors also reported that the structure of the disaccharide part affected the regioselectivity. They showed that with rutin, naringin, and hesperidin only monoesters were produced and the linkage took place on the glucose, whereas with the peltoside, several products were synthesized (mono- and di-esters) (Table 2, Fig. 1).

In the presence of lipases (CAL-B), Danieli et al. [36] indicated that this enzyme preferred primary alcohol C_{6''}-OH but that it was able to acylate rutin, without primary alcohol, on the secondary alcohols C_{3''}-OH and C_{4''}-OH (Fig. 1). Taking into account the data reported by these authors, for flavonoids having free primary and secondary alcohol (isoquercitrin), acylation took place on both alcohols (C_{6''}-OH and C_{3''}-OH). Similar results have been described by several authors [31,33,34] (Fig. 1). However, other data indicated that the acylation took place only on the C_{4''}-OH [29,38,39].

For aglycon flavonoids, the position of esterification depends on several factors such as the nature and origin of the enzyme, the backbone of the flavonoid, etc. Thus, in the case of the catechin, the acylation in the presence of PCL as a biocatalyst and vinyl acetate as an acyl donor, took place on the C₅-OH and C₇-OH [28] (Fig. 1). However, in the presence of carboxyl-esterase as a biocatalyst, and ethyl acetate and ethyl propionate as an acyl donor, the linkage formed in the C₃-OH [13].

The effects of the type and origin of the enzyme on regioselectivity of the acylation were confirmed by Mozhaev et al. [30]. In fact, these authors indicated that the acylation of bergenin by vinyl butyrate in acetone, by lipases Chirazyme L-2 (CAL-B), Chirazyme L-6 (lipase from *Pseudomonas* sp.), lipase PS30 (lipase from *Burkholderia cepacea*) and lipase FAP-15 (lipase of *Rhizopus oryzae*) as biocatalysts, took place on the

primary OH of C₁₁. However, in the presence of protease (subtilisin Carlsberg) and in a mixture of toluene/DMSO (95/5, v/v), the acylation of bergenin occurred on C₁₁-OH and C₄-OH.

In conclusion, it appears that the choice of the biocatalyst depends on the objectives in question (conversion yield, initial rate or regioselectivity) and on the operating conditions of synthesis (nature of the flavonoid, acyl donor and solvent). However, Novozym 435[®] and PCL seem to be the best enzymes for the synthesis of glycosylated and aglycon flavonoid esters, respectively.

3. Effect of the nature of the acylation

For the enzymatic acylation of flavonoids, two reactions were investigated: direct esterification or transesterification (Fig. 2).

Few studies have compared the performance of these two reactions. In fact, Kontogianni et al. [33,40], Gayot et al. [41] and Ardhaoui et al. [29,38,39] synthesized flavonoid esters mainly by direct esterification, using both aromatic and substituted or non-substituted aliphatic acids as an acyl donors, and CAL-B as a biocatalyst. Danieli et al. [25], Lambusta et al. [28], Nakajima et al. [31], Gao et al. [32], Enaud et al. [34], Ishihara and Nakajima [18], and Mellou et al. [42] studied the transesterification of flavonoids in the presence of several lipases and vinyl esters. However, the transesterification reaction was better adapted when aromatic acids were used as acyl donors [43–47]. The performance of the transesterification depends on the nature of the biocatalyst. Nakajima et al. [31] observed that in the presence of the lipase and caffeate the conversion yield of isoquercitrin was relatively weak compared with that obtained by a cell culture of *Ipomoea batatas* as a biocatalyst [24]. The low conversion yield with lipase was due to the in-parallel reaction of an oxidative condensation of the phenolic hydroxyl groups in caffeic acid molecules.

4. Operating conditions

4.1. Temperature

Temperature is a significant factor in enzymatic synthesis. It affects the viscosity of the medium, the activation and the thermal denaturation of the enzyme and the solubility of substrates and

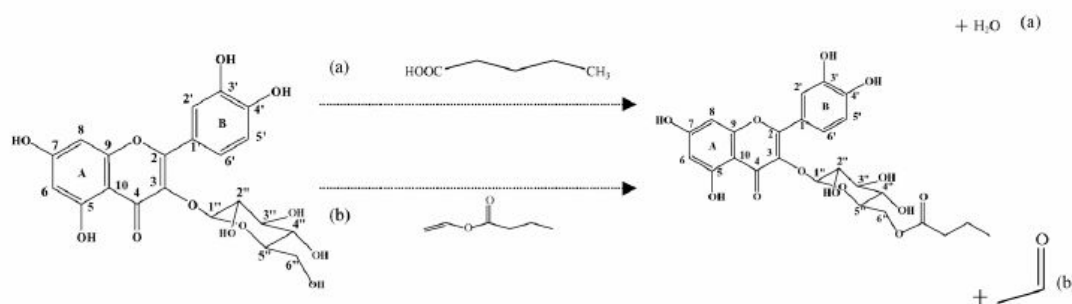


Fig. 2. Mechanism of flavonoid acylation: (a) esterification; (b) transesterification.

products. Enaud et al. [34] reported that the synthesis of phloridzin cinnamate by transesterification, catalyzed by Novozym 435[®], led to a total conversion of phloridzin. However, the time needed depended on the temperature applied. It was 15 h at 60 °C, 4 h at 80 °C and 2 h at 100 °C.

With the immobilized PCL, Ema et al. [48] observed an increase in conversion yield with temperature during the transesterification of 1,1-diphenyl-2-propanol with vinyl acetate. It was 3% at 60 °C and 39% at 90 °C.

Temperature also affects the stability of the biocatalyst. Thus, Enaud et al. [34] reported that less than 30% of activity was lost after 1 day of incubation at 80 °C during the synthesis of phloridzin esters in the presence of Novozym 435[®]. This deactivation was attributed to both the enzyme denaturation and a possible interaction with ethyl cinnamate.

However, Turner and Vulfson [49] showed that this enzyme remained active without any loss up to 130 °C. Other data were reported by Coulon et al. [52], Cao et al. [50], and Chamouleau et al. [51] in the case of the sugar ester synthesis. They revealed that the effect of temperature was not yet clear and depended on the enzyme environment.

4.2. The various processes of flavonoid ester synthesis

The enzymatic synthesis of flavonoid esters has been carried out mainly in a batch reactor with or without online by-product removal (water, alcohol).

Two types of apparatus were used:

- (I) Wheaton[®] or similar reactors with or without online solvent evaporation.
- (II) Robotic workstations.

The best performances were obtained in the case of the single batch reactor and mainly when the reaction was coupled with a system for the online removal of the water or alcohol produced. The best system was that using evaporation under reduced pressure rather than introducing molecular sieves into the medium [34].

Two types of workstation were described. The first one consisted of a 96-well punt format and was used to obtain a library of 167 bergenin derivatives [30]. A more sophisticated workstation was used by Ardhaoui et al. [29,38,39]. This station was equipped with 27 ml micro-reactors allowing eight reactions to be carried out in parallel and the online HPLC analysis of substrate consumption and the flavonoid esters produced. This station was also able to work under reduced pressure for online removal of by-products.

4.3. The by-products of the flavonoid acylation: their effects and the techniques for their elimination

4.3.1. Effects of the by-products on flavonoid acylation

Depending on the reaction used (esterification, transesterification), water, methanol or acetaldehyde are produced as by-products. They affect both the thermodynamic equilibrium of the reaction and the enzyme activity.

4.3.1.1. Effect of water on the synthesis of flavonoid esters. The water produced during direct esterification affects the thermodynamic equilibrium and the initial rate of the reaction. However, this effect varies from one enzyme to another [21,53]. For a given enzyme, it depends on the nature of the solvent, the state of the lipase (immobilized or not), and the nature of the support [54].

In the case of Novozym 435[®], the studies of the sorption curve by Chamouleau et al. [51] showed that a small variation of the water contents of the medium lead to a wide variation of the water activity of this enzyme. This behavior explains the high sensitivity of this enzyme to the water level of the medium. In fact, the investigation led by Kontogianni et al. [33] and Ardhaoui et al. [39], during rutin and naringin ester synthesis by Novozym 435[®], showed that the highest conversion yield was reached when the water activity and the water content were lower than 0, 11 and 200 ppm, respectively.

Moreover, Gayot et al. [41] reported that the combination of the dehydration of the substrates and the online removal of water resulted in an improvement of the conversion yield of naringin palmitate. It shifted from 24% to 43%. Similar results were indicated by Mellou et al. [42]. These authors added 4 Å molecular sieves (100 g/L) to the reaction medium. Under these conditions they observed a significant increase of the conversion yield from 15–20% up to 30–40% after 72 h of incubation.

4.3.1.2. Effect of other by-products on enzyme activities. - Methanol and acetaldehyde formed during the transesterification reaction affect the activity of the lipase. Thus, Coulon et al. [52] reported, during sugar ester synthesis by CAL-B, that the initial rate decreased with the increase of methanol concentration in the medium. These authors attributed this behavior to substrate competition between fructose and methanol and to inhibition of the enzyme.

It was also mentioned that the acetaldehyde produced during the transesterification reaction, in the presence of vinyl acetate, led to an irreversible deactivation of the lipase. The mechanism of the deactivation was attributed to the fact that acetaldehyde reacted with the aminogroups of the enzyme [55,56]. To avoid this effect induced by the various by-products of flavonoid esters synthesis, Villeneuve et al. [57] proposed the online elimination of these molecules.

4.3.2. Different techniques of elimination of the by-products

The online removal of the water and alcohol formed in the medium during the esterification reaction has been the subject of several works.

The oldest and the most commonly used technique is the online evaporation of by-products which is carried out mainly under vacuum [34]. Azeotropic distillation is also applied when acetone or ethyl methyl ketone are used as a solvent. In fact, both these solvents are able to form an azeotrope with water or methanol.

The use of the desiccant agents has often been shown in the literature. Salt hydrates or saturated salt solutions have been

used to control water activity at a fixed point, even at the beginning or throughout the reaction [53,58,59], while activated alumina, silica gel or a molecular sieve have been used for the online elimination of water during the esterification reaction or as a post-treatment technique for the medium [51,60].

Pervaporation and gas stripping were also tested to control water activity. However, the most commonly used desiccant, in the case of sugar and flavonoid ester syntheses, is the molecular sieve. The presence of this desiccant in the reaction medium shifts the equilibrium of the reaction towards the synthesis of esters.

5. Effect of the nature of the solvent used

During the synthesis of flavonoids several studies have quantified the effect of solvents on the conversion yield and initial rate of this reaction. The aim of these works was to determine the solvent allowing the highest enzymatic activity, dissolving substrates and facilitating the down-stream processing. Depending on the final use of the synthesized molecules (pharmaceutical, cosmetic or food application) the toxicity of the solvent was also considered to be a discriminating criterion [33]. Table 4 summarizes the main works done in this field.

It appears that for a given substrates (flavonoid, acyl donor), the effect of the solvent depends mainly on the origin of the

enzyme (subtilisin, CAL-B, PCL). For PCL, Lambusta et al. [28] and Nakajima et al. [31] tested several solvents. They reported that the best solvents for this enzyme, under the operating conditions tested, were acetonitrile and acetone. Conversely, for the same enzyme (PCL), Cernia et al. [61] mentioned that the highest activity was reached in the presence of apolar and hydrophobic solvents such as hexane and methylcyclohexane.

For subtilisin, Danieli et al. [25,26,35] and Kodelia et al. [27] used anhydrous pyridine for flavonoid ester synthesis.

The effect of the solvent on CAL-B activity has been the subject of several papers. Riva et al. [62], Danieli et al. [36], Nakajima et al. [31], Gao et al. [32], Kontogianni et al. [33,40] and Mellou et al. [42] compared different solvents and reported that the highest activity of this enzyme was reached in the presence of acetone or an acetonitrile/pyridine mixture. A THF/pyridine mixture was also described by Danieli et al. [36] as a good solvent. However, Kontogianni et al. [33] observed that the use of this mixture inhibited CAL-B activity. As these works were carried out with different substrates, this contradiction could be attributed to this factor. In recent papers, Ardhaoui et al. [29,38,39] and Gayot et al. [41] mentioned that the use of the *tert*-amyl alcohol as a solvent was the most suitable in order to obtain the highest initial rate and conversion yield for flavonoid ester synthesis.

Table 4
Comparison between the different solvents used in the literature during the acylation of flavonoids

Flavonoid/acyl donor	Enzyme	Tested solvents	Best solvents	Reference
Catechin/vinyl acetate	Lipase PS	Acetonitrile, acetone, tetrahydrofurane, <i>tert</i> -amyl alcohol	Acetonitrile	[28]
Isoquercitrin, quercitrin and rutin/vinyl acetate	Novozym 435 [®]	Hexane, acetone, acetonitrile, <i>tert</i> -amyl alcohol, <i>tert</i> -butanol, dioxane, DMF, <i>N</i> -methylpyrrolidone, 3-pentanone, pyridine, THF, mixture of solvents	Hexane, acetone, acetonitrile, <i>tert</i> -amyl alcohol, <i>tert</i> -butanol, dioxane, 3-pentanone, THF, THF/pyridine (7/3, v/v), THF/pyridine (5/5, v/v), THF/pyridine (3/7, v/v), dioxane/pyridine (5/5, v/v) and acetonitrile/pyridine (5/5, v/v)	[36]
Isoquercitrin, callistephin and chrysanthemin and rutin/vinyl cinnamate and <i>p</i> -coumarate	Novozym 435 [®] and Amano PS	Acetonitrile, acetone, chloromethane, dichloromethane, 1,4-dioxane, DMSO, THF and DMF	Acetonitrile and acetone	[31]
Naringenin, isoquercitrin, luteolin-7-glucoside, catechin-7- α -D-glucoside/vinyl cinnamate, caffeate and <i>p</i> -coumarate	Novozym 435 [®]	<i>tert</i> -Butanol/pyridine (9/1, v/v) acetonitrile/pyridine (9/1, v/v)	<i>tert</i> -Butanol/pyridine (9/1) acetonitrile/pyridine (9/1)	[32]
Rutin, naringenin/octanoic, decanoic, dodecanoic acids	Novozym 435 [®]	Acetone, THF and <i>tert</i> -butanol	Acetone and <i>tert</i> -butanol	[33]
Naringin (5.8–17.5 g/L), chrysoeriol-7- <i>O</i> - β -D-(3'- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside, chrysoeriol-7-[6''- <i>O</i> -acetyl- β -D-allosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside]/vinyl decanoate, laurate, stearate; decanoic, lauric and stearic acids	Novozym 435 [®]	<i>tert</i> -Butanol and acetone	Acetone	[42]

DMF: dimethylformamide; THF: tetrahydrofurane; DMSO: dimethyl sulfoxide.

Table 5
Effect of the nature of solvent on conversion yield of flavonoid

Solvent	Flavonoid	Acyl donor	Conversion yield (%)	Reference
Acetone	Rutin	Octanoic acid	17.7	[33,40]
		Decanoic acid	22	
		Dodecanoic acid	23	
	Naringin	Octanoic acid	30.1	[33,40]
		Decanoic acid	18.3	
		Dodecanoic acid	15.8	[42]
		Decanoic acid	25	
		Lauric acid	27	
		Stearic acid	22	
		Vinyl decanoate	65	
Vinyl laurate	70			
Vinyl stearate	58			
<i>tert</i> -Butanol	Rutin	Octanoic acid	14.8	[33,40]
		Decanoic acid	24	
		Dodecanoic acid	13.5	
	Naringin	Octanoic acid	19.6	[33,40]
		Decanoic acid	21.9	
		Dodecanoic acid	18.2	[42]
		Decanoic acid	20	
		Lauric acid	23	
		Stearic acid	19	
		Vinyl decanoate	54	
Vinyl laurate	59			
Vinyl stearate	48			

Adapted from Kontogianni et al. [33,40] and Mellou et al. [42].

The effect of solvent on conversion yield depends on both the nature of the acyl donor and the flavonoid. Kontogianni et al. [33,40] tested different acyl donors in the presence of naringin and rutin as alcohol donors, and CAL-B as a biocatalyst (Table 5). They reported that the conversion yield was variable and strongly affected by the composition of the reaction media. These authors mentioned that for a given flavonoid, octanoic acid gave rise to a higher conversion yield in acetone. In the case of decanoic acid the conversion yield was higher in *tert*-butanol. These observations were confirmed by similar investigations led by Mellou et al. [42]. However, these data are in the same range of magnitude and there is no indication of their standard deviation, so it is difficult to draw an available conclusion about the significance of the differences observed between data.

As the elimination of the co-solvent of the reaction is often a limiting factor to reaching higher purity of the synthesized molecules, some papers have described the use of melting media instead of conventional solvents. So, Guyot et al. [44] and Enaud et al. [34] used cinnamic acid, ethyl and methyl cinnamate, methyl benzoate or methyl salicylate as solvents and Novozym 435® as a biocatalyst. They indicated that the conversion yield of the alcohol substrates was about 100% and the reaction was rapid compared with the use of conventional solvents. However, Kontogianni et al. [33] reported that when fatty acids were used both as an acyl donor and a solvent, the conversion yields of naringin and rutin decreased. In spite of its attractiveness, the use of melting media is characterized by a serious drawback due to the necessity of the elimination of the excess of the acyl donor for the recovery of the synthesized products.

6. Effect of the nature and concentration of the substrates

6.1. Effect of the flavonoids

The main works done on the enzymatic acylation was carried out with glycosylated flavonoids. Few data are available with aglycon forms.

6.1.1. Effect of the nature of flavonoids

For the glycosylated flavonoids, with both subtilisin and lipases, acylation took place on the hydroxyl groups of the sugar part. The genin was not affected.

However, in the presence of subtilisin, no reaction occurred on rhamnose (Fig. 1). The length of the sugar part (monosaccharide, disaccharide) and the position of the attachment of sugar on the genin did not affect the activity of this enzyme [25,26].

For CAL-B, the reaction occurred even with rhamnose. However, both the composition of the sugar part and the position of glycosylation affected the reactivity of this enzyme.

Thus, Gao et al. [32], during catechin 7-*O*- α -D-glucosyl ester synthesis, observed that the highest initial rate was reached with monoglycosylated flavonoids. However, these observations could not be generalized because the absence of the primary hydroxyl, the steric obstructions and the low solubility of certain substrates can modulate these results.

The study conducted by Ardhaoui et al. [29] confirmed these results. In fact, these authors compared the obtained conversion

yields and the initial rates during the esterification of different flavonoids (esculin, rutin, hesperidin, quercetin) by palmitic acid with CAL-B and indicated that the best results were obtained with esculin, because of the presence of a primary OH and a weaker steric obstruction (monosaccharide), followed by rutin and hesperidin (Table 2). No reactivity was observed with quercetin. The weak reactivity of hesperidin was attributed to its lower solubility in the solvent used (*tert*-amyl alcohol), while, the absence of reactivity with quercetin seemed to be due to the incompatibility of the active site of CAL-B to the aglycon form of flavonoids.

6.1.2. Effect of the concentration of the flavonoid

The concentration of the flavonoid also affects the performance of the acylation reaction.

The conversion yield and the initial rate rise with the increase of flavonoid concentration.

However, as the solubility of the flavonoid is often low, the solubilization rate is the limiting step [29]. This phenomenon was reported by Enaud et al. [34]. In fact these authors observed that an increase of the flavonoid concentration from 10 to 210 mM did not affect the final conversion yield (100%) but the productivity was strongly affected due to the low solubilization rate of the substrate.

When the solubilization was not a limiting factor, Kontogianni et al. [40] reported that during naringin ester synthesis the initial rate reached a plateau for a naringin concentrations of higher than 120 mM (Fig. 3).

For the aglycon flavonoids, the performance and the selectivity of this reaction depend mainly on the nature of the flavonoid and the enzyme. Thus, Lambusta et al. [28] obtained a mixture of catechin 5-*O*-acetate and 7-*O*-acetate by transesterification of catechin with vinyl acetate as an acyl donor and PCL as a biocatalyst. However, the acylation of the same flavonoid by ethyl acetate and propionate as acyl donors and carboxyl-esterase from *Streptomyces rochei* or *Aspergillus niger* as biocatalysts gave catechin 3-*O*-acyls [13] (Fig. 1).

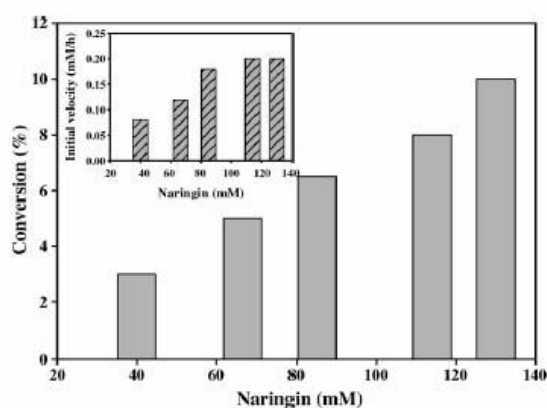


Fig. 3. Initial velocities of naringin esterification with decanoic acid (250 mM), *tert*-butanol and Novozym[®] at different naringin concentrations. Adapted from Kontogianni et al. [40].

6.2. Effect of the acyl donors

As for the flavonoids, the nature and concentration of the acyl donor affect the performance of the acylation reaction and the physico-chemical and biological properties of the esters formed. Many acyl donors have been tested, such as aromatic or fatty acid esters substituted or not. The derivatization of the aromatic acids is particularly interesting, due to their intrinsic biological activities [10,63]. The esters of flavonoids and aliphatic acids have been synthesized with a view to improving solubility both in lipophilic and in aqueous media. The modulation between these two possibilities depends on the length of the chain and the presence of substituents [29,34,38–40,62].

6.2.1. Effect of the nature of the acyl donor

The highest conversion yield and initial rates have often been obtained with fatty acids or activated vinyl esters. For the aromatic acids, the performance depends on the nature of the substitution, the length of the spacer and the position of the hydroxyl groups (ortho, para, etc.). Thus, Nakajima et al. [24] reported that the conversion yields of isoquercitrin were higher with caffeic acid than with *p*-coumaric, ferulic, cinnamic acids with relative percentages of 100, 70, 25 and 0 when a cell culture of *Ipomoea batatas* was used as a biocatalyst.

In the presence of Novozym 435[®] as a biocatalyst, Gao et al. [32] mentioned the following order of reactivity: vinyl cinnamate (45%) > ferulate (32%) > *p*-coumarate (15%).

The effect of the aromatic acyl donors was also described by Enaud et al. [34] during the esterification of phloridzin, and the order of reactivity reported was: methyl cinnamate > benzoate \approx salicylate > *p*-hydroxyphenylacetate \approx *p*-hydroxyphenylpropionate (Table 2).

The effect of the acyl radical structure in the presence of Novozym 435[®] was described by Ardhaoui et al. [38]. The results obtained indicated that the acylation performance was greatly dependent on the acyl radical structure. These authors indicated that the best conversion yields and initial rates were reached in the presence of aliphatic and then aryl-aliphatic acids. No reaction was observed with benzoic acids. For all the aliphatic acids tested in this work, the conversion yields and initial conversion rates were respectively higher than 68% and $9.5 \times 10^{-2} \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ after 150 h of incubation. However, for aromatic acids having at least one alkyl or alkenyl bridge between the carboxylic group and the aromatic ring, the acylation performance was affected by unsaturation of the spacer and/or substitution (hydroxy and nitro-groups) on the aromatic ring. The variation of conversion yields and initial rates observed with this subgroup was due to several mechanisms such as electronic, electrostatic, steric and polarity effects.

Concerning the effect of chain length of the fatty acids, the results obtained showed some contradictions. So, for Kontogianni et al. [33], during the flavonoid (naringin, rutin) ester synthesis by Novozym 435[®], the chain length of the fatty acids (C_8 , C_{10} , C_{12}) did not affect the conversion yield of this reaction. However, Ardhaoui et al. [39] reported that the conversion yield and the initial rate of flavonoid ester synthesis

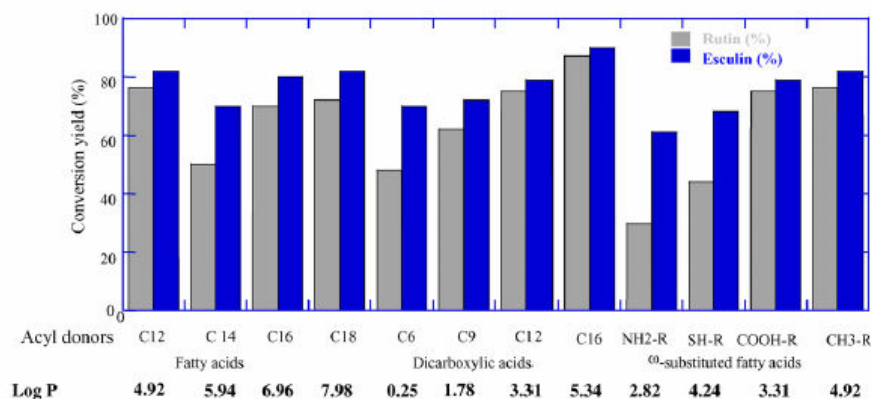


Fig. 4. Flavonoid conversion yields during the acylation of rutin and esculin with different acyl donors catalyzed by Novozym 435[®] in *tert*-amyl alcohol under water contents lower than 200 ppm (R = HOOC(CH)₁₀) [39].

Table 6

Influence of the initial molar ratio of acyl donor to flavonoid on the conversion of naringin (%) (20 mM) with various vinyl fatty acid esters

	[Vinyl ester]/[naringin] (mol/mol)			
	2	5	10	15
C10	25	48	62	60
C12	30	50	70	71
C18	28	51	55	55

Reaction conditions as described in Mellou et al. [42].

was affected by the chain length (Fig. 4). The lowest values of both conversion yield and initial rate were reached with short chain length (<C₁₀).

Vinyl esters and dicarboxylic fatty acids were also used in the reaction of flavonoid ester synthesis. The reactivity of these acyls was higher compared with aromatic and fatty acids [42].

6.2.2. Effect of the concentration of the acyl donor

The main works mentioned the use of an excess of acyl donor for flavonoid ester synthesis [33,62]. This excess could rise to 600 equivalents when the reaction was carried out in melting media [34].

The concentration of the acyl donor affected both the initial rate and the conversion yield. Kontogianni et al. [40] and Mellou et al. [42] respectively tested the effect of the concentration of the fatty acid and the vinyl ester in the presence of Novozym 435[®]. They observed that the initial rate became constant for a higher acyl donor concentration. However, this behavior could be due to enzyme deactivation. Mellou et al. [42] also mentioned that conversion yield increased with vinyl ester concentration (Table 6).

7. Conclusion

Enzymatic acylation of flavonoids with several acyl donors (aliphatic acids, aromatic acids and vinyl esters) was achieved by various enzymes (subtilisin, *Candida antarctica* lipase, *Pseudomonas cepacea* lipase, lipoprotein lipase, carboxyl-

esterases and cell extract). Reactions were carried out in free- or added-solvent systems and it took between a few hours and several days at temperatures ranging from 30 to 60 °C. The analysis of the data obtained established that the *Candida antarctica* lipase was the most versatile and regioselective enzyme for this reaction. However, this lipase needed glycosylated flavonoid as a substrate, while PCL acylates both aglycon and glycosylated flavonoids.

The performance of this reaction was affected by several factors (type and concentration of the enzyme, nature of the reaction of acylation, operating conditions, composition of the reactional media, nature of substrates, etc.). However, for the esterification reaction, the accumulation of water was the main limiting factor and had to be removed to shift the equilibrium of this reaction. When the best operating conditions were established, the conversion yield of the substrate could reach more than 95% and biological and physico-chemical properties were often improved. To our knowledge several pilot plants are at an advanced stage and it seems that these products (acylated flavonoids) will be available on the market soon.

References

- [1] Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1355–63.
- [2] Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure–activity relationship. *J Agric Food Chem* 1996;42:497–501.
- [3] Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481–504.
- [4] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* 2002;96:67–202.
- [5] Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 2002;56:200–7.
- [6] Das, N.P., editors. Flavonoids in biology and medicine III—current issues in flavonoids research; 1990.
- [7] Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999;65:337–53.
- [8] Kandaswami C, Middleton EJ. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:351–76.

- [9] Ho C, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, Rosen RT. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev Med* 1992;21:520–5.
- [10] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933–56.
- [11] Kitao S, Ariga T, Matsudo T, Sekine H. The synthesis of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. *Biosci Biotech Biochem* 1993;57:2010–5.
- [12] Miyake T, Suzuki K, Yoneyama, M. 4G- α -D-glucopyranosyl rutin, and its preparation and uses. EP 0420376; 1991.
- [13] Sakai M, Suzuki M, Nanjo F, Hara, Y. 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP 0618203; 1994.
- [14] Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2004;35:379–87.
- [15] Bok S-H, Jeong T-S, Lee S-K, Kim J-R, Moon S-S, Choi M-S, et al. Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1 (2001).
- [16] Perrier E, Mariotte AM, Boumendjel A, Bresson-Rival D. Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmétique, dermatopharmacie, en pharmacie et en agro-alimentaire. FR 2778663-A1; 1998.
- [17] Fossen T, Cabrita L, Andersen OM. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chem* 1998;63:435–40.
- [18] Ishihara K, Nakajima N. Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *J Mol Catal B: Enzym* 2003;23:411–7.
- [19] Tamura H, Yamagami A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J Agric Food Chem* 1994;42:1612–5.
- [20] Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pastor E, Bernabe M, et al. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J Biotechnol* 2002;96:55.
- [21] Yahya ARM, Anderson WA, Moo-Young M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb Technol* 1998;23:438–50.
- [22] Cao L, Langen LV, Sheldon RA. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:387.
- [23] Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Ashikari T, Yamaguchi M, Kusumi T. Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Sci* 1998;137:87–94.
- [24] Nakajima N, Ishihara K, Hamada H, Kawabe S-I, Furuya T. Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *J Biosci Bioeng* 2000;90:347–9.
- [25] Danieli B, De Bellis P, Carrea G, Riva S. Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides. *Heterocycles* 1989;29:2061–4.
- [26] Danieli B, De Bellis P, Carrea G, Riva S. Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv Chim Acta* 1990;73:1837–44.
- [27] Kodelia G, Athansiou K, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of butyl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture. *Appl Biochem Biotechnol* 1994;44:205–12.
- [28] Lambusta D, Nicolosi G, Patti A, Piattelli M. Enzyme-mediated regio-protection–deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin. *Synthesis* 1993;11:1155–8.
- [29] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser J-M, Moussou P, Pauly G, Ghoul M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *J Mol Catal B: Enzym* 2004;29:63–7.
- [30] Mozhaev VV, Budde CL, Rich JO, Usyatinsky AY, Michels PC, Khmel-nitsky YL, et al. Regioselective enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinatorial libraries. *Tetrahedron* 1998;54:3971–82.
- [31] Nakajima N, Ishihara K, Itoh T, Furuya T, Hamada H. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J Biosci Bioeng* 1999;87:105–7.
- [32] Gao C, Mayon O, MacManus DA, Vulfson EN. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnol Bioeng* 2001;71:235–43.
- [33] Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur J Lip Sci Technol* 2001;103:655–60.
- [34] Enaud E, Humeau C, Piffaut B, Girardin M. Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J Mol Catal B: Enzym* 2004;27:1–6.
- [35] Danieli B, Bertario A, Carrea G, Redigolo B, Secundo F, Riva S. Chemo-enzymatic synthesis of 6''-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helv Chim Acta* 1993;76:2981–91.
- [36] Danieli B, Luisetti M, Sampognaro G, Carrea G, Riva S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 1997;3:193–201.
- [37] Danieli B, Riva S. Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. *Pure Appl Chem* 1994;66:2215–8.
- [38] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M. Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatal Biotransformation* 2004;22:253–9.
- [39] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J Biotechnol* 2004;110:265–72.
- [40] Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN. Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J Mol Catal B: Enzym* 2003;21:59–62.
- [41] Gayot S, Santarelli X, Coulon D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J Biotechnol* 2003;101:29–36.
- [42] Mellou F, Lazari D, Skaltsa H, Tselepis AD, Kolisis FN, Stamatis H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol* 2005;116:295–304.
- [43] Buisman GJH, Van Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP, Cuperus FP. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol Lett* 1998;20:131–6.
- [44] Guyot B, Bosquette B, Pina M, Graille J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnol Lett* 1997;19:529–32.
- [45] Otto RT, Bornscheuer UT, Syltatk C, Schmid RD. Lipase-catalyzed synthesis of arylaliphatic esters of [beta]-(+)-glucose, n-alkyl- and aryl-glucosides and characterization of their surfactant properties. *J Biotechnol* 1998;64:231–7.
- [46] Otto RT, Scheib H, Bornscheuer UT, Pleiss J, Syltatk C, Schmid RD. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *J Mol Catal B: Enzym* 2000;8:201.
- [47] Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B: Enzym* 2001;11:323–8.
- [48] Ema T, Kageyama M, Korenaga T, Sakai T. Highly enantioselective lipase-catalyzed reactions at high temperatures up to 120 °C in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* 2003;14:3943–7.
- [49] Turner NA, Vulfson EN. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb Technol* 2000;27:108–13.
- [50] Cao L, Bornscheuer UT, Schmid RD. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J Mol Catal B: Enzym* 1999;6:279–85.
- [51] Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J Mol Catal B: Enzym* 2001;11:949–54.
- [52] Coulon D, Girardin M, Engasser JM, Ghoul M. Investigation of key parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Indust Crops Prod* 1997;6:375–81.
- [53] Wehtje E, Adlercreutz P. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol Bioeng* 1997;55:798–806.
- [54] Arroyo M, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports:

- effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:3–12.
- [55] Bovara R, Carrea G, Ferrara L, Riva S. Resolution of (+/-)-trans-sobrerol by lipase PS-catalyzed transesterification and effects of organic solvents on enantioselectivity. *Tetrahedron: Asymmetry* 1991;2:931–8.
- [56] Schudok M, Kretschmar G. Enzyme catalyzed resolution of alcohols using ethoxyvinyl acetate. *Tetrahedron Lett* 1997;38:387–8.
- [57] Villeneuve P, Hills G, Bachain P, Pina M, Caro Y, Baréa B, et al. Lipase-catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters. *Eur J Lip Sci Technol* 2002;104:394–401.
- [58] Ducret A, Giroux A, Trani M, Lortie R. Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol Bioeng* 1995;48:214–21.
- [59] Humeau C, Girardin M, Rovet B, Miclo A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *J Biotechnol* 1998;63:1–8.
- [60] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Continuous production of acyl mannoses by immobilized lipase using a packed-bed reactor and their surfactant properties. *Biochem Eng J* 2001;8:213–6.
- [61] Cernia E, Palocci C, Soro S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chem Phys Lipids* 1998;93:157–68.
- [62] Riva S, Danieli B, Luisetti M. A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *J Nat Prod* 1996;59:618–21.
- [63] Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Luisa Pellegrino M, Tita B, Messina C, et al. 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut* 2003;56:167–74.
- [64] Otto RT, Geers B, Weiss A, Petersohn D, Schlotmann K, Schroeder K-L. Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition. WO 0179245; 2001.

4. MODELISATION MOLECULAIRE APPLIQUEE AUX FLAVONOÏDES

La stabilité, la réactivité et les effets physiologiques des flavonoïdes sont couramment reliés à leur famille, la nature de leurs substituants et à leur structure moléculaire (géométrie) (8, 39, 112). Afin de corrélérer avec plus de précision les données expérimentales sur les activités avec la structure des molécules et de quantifier ces relations, des études théoriques ont été entreprises par modélisation moléculaire. En effet, la modélisation moléculaire de flavonoïdes par mécanique moléculaire ou par mécanique quantique permet d'accéder à de nombreuses propriétés moléculaires.

A travers ces méthodes de modélisation moléculaire plusieurs paramètres peuvent être obtenus :

- paramètres structuraux de la molécule : longueurs de liaison, angles de valence, angles de torsion, liaisons hydrogènes,
- paramètres énergétiques : énergie de liaison, enthalpie de formation,
- paramètres électroniques : charges, densité de spin, énergies et délocalisation des orbitales (HOMO, LUMO), Eg, électronégativité (χ), électroaffinité (EA),
- paramètres stériques : volume et surface moléculaires,
- paramètres hydrophobiques : log P.

De nombreuses études ont eu pour objectif de corrélérer et d'expliquer les relations entre propriétés électronique, stérique, hydrophobique et les activités ou les effets biologiques ou physico-chimiques observés lors des expériences. Dans ces travaux, la modélisation moléculaire des flavonoides a été réalisée dans le vide alors que les tests biologiques se font dans des solvants bien déterminés.

4.1. Etude conformationnelle

Pour relier la structure des flavonoides à leur activité, une analyse conformationnelle de ces molécules a été souvent réalisée. Cette étape permet de déterminer la structure la plus stable.

▪ Cas des flavonoïdes non glycosylés

L'analyse conformationnelle des flavonoïdes aglycones a été effectuée par rotation de la liaison entre la partie chromane et le cycle B (angle θ) (39, 83, 113). Ceci a été réalisé grâce à des méthodes de mécanique quantique (semi-empirique, *ab initio*) ou de mécanique moléculaire en fonction des résultats recherchés.

Il s'agit essentiellement de la méthode semi-empirique Austin Model 1 (AM1) en raison de la bonne corrélation des paramètres géométriques avec les données cristallographiques pour les flavonoïdes, de la description correcte des liaisons hydrogènes (114) et de la sous-estimation des effets de conjugaison électronique de PM3 (113). Dans d'autres cas, des champs de forces basés sur celui de Allinger (MM2) ont été utilisés pour des études portant principalement sur la quercétine et les anthocyanes. Toutefois, les résultats issus de ces différentes méthodes sont variables, comme cela a été indiqué dans le tableau I.5 pour la quercétine.

Tableau I.5. étude structurale de la quercétine

Référence	Méthode de calcul	Propriétés structurales-expérimentales
van Acker <i>et al.</i> 1996 (39)	i) analyse conformationnelle par MM (AMBER) ii) optimisation par méthode <i>ab initio</i> (STO-3G)	Structure : molécule plane (θ : 0°), système complètement délocalisé, présence de 3 liaisons H (O ₅ -H et C ₄ =O, O ₃ -H et C ₄ =O, catéchol)
Russo <i>et al.</i> 2000 (113)	optimisation par AM1 et PM3	Structure : molécule non plane (θ : 153°), présence de trois liaisons H (O ₅ -H et C ₄ =O, O ₃ -H et C ₄ =O, catéchol) et d'une interaction entre C ₃ -O et C ₂ -H stabilisant la structure Propriétés électroniques : délocalisation électronique sur les cycles A et B, double liaison localisé sur C ₂ -C ₃ et C ₄ =O μ : 3.409 D
Erkoç <i>et al.</i> 2003 (115)	i) analyse conformationnelle par MM (MM+) ii) optimisation par méthode semi-empirique (AM1)	Structure : molécule plane avec des charges sur les OH phénoliques (O ₃ -H le plus chargé et absence sur O ₅ H) Propriétés électroniques : E_{liaison} : -3718 kcal/mol ΔH : -217 kcal/mol Eg : α 7.6 eV et β 8.1 eV μ : 3 D
Rodriguez <i>et al.</i> 2004 (116)	optimisation par AM1	Structure : θ : -27°
Mendoza-Wilson et Glossman-Mitnik 2004 (117)	optimisation par la fonctionnelle de la densité (3-21G*, 6-31G(d,p), CBSB2**, CBSB7, CBSB4, CBSB1)	Structure : molécule plane (θ : 0°) présence de trois liaisons H (O ₅ -H et C ₄ =O (1.716 Å), O ₃ -H et C ₄ =O (1.948 Å), catéchol (2.113 Å)) μ : 2.852D Vol : 187.21 cm ³ mol ⁻¹ Relation avec : spectre UV et IR
Mendoza-Wilson et Glossman-Mitnik 2005 (118)	optimisation par la fonctionnelle de la densité (6-31G (df,p), 6-31G (d,p), CBSB2**, CBSB4)	Affinité électronique [-E _{LUMO}] (eV) E=0.76, O=2.31 Potentiel d'ionisation [-E _{HOMO}] (eV) E=7.22, O=5.69 Electronégativité (eV) E=3.99, O=4.00 Electrophilicité (eV) E=2.47, O=4.72 E : considération énergétique O : considération orbitale
Kim <i>et al.</i> 2006 (112)	i) exploration conformationnelle par dynamique moléculaire (GAFF) dans le vide et dans l'eau ii) minimisation de la géométrie (gradients conjugués)	Structure : θ : 1.2° Relation avec TEAC

D'après ces travaux, la quercétine possède une structure plane, excepté chez Russo *et al.* (2000) (113). Toutefois, la barrière énergétique pour passer d'une conformation avec un angle θ de 153° à une conformation plane n'est que de 0,5 kcal/mol. Ceci laisse à penser que la conformation plane peut être facilement obtenue. La quercétine est stabilisée par la présence de trois liaisons hydrogènes intramoléculaires et possède une certaine polarité puisque son moment dipolaire est compris entre 2.8 et 3.5 suivant la méthode de calcul. Le tableau I.6 montre les valeurs de cet angle pour différents flavonoïdes.

Tableau I.6. angle de torsion entre le cycle B et le reste de la molécule pour différentes classes de flavonoïde

Classe	Flavonoïde	θ ($^\circ$)
flavonols	quercétine	-0.3 ^(a) -1.2 ^(f)
	galangine	-0.3 ^(a)
	kaempferol	-0.1 ^(a)
	3-OMe-quercétine	-23.6 ^(a)
	rutine	27.2 ^(a) - 27.5 ^(f)
	quercétine -3-glucoside	22.1 ^(f)
	quercétine -3-galactoside	25.6 ^(f)
flavanones	morine	34.1 ^(f)
	taxifoline	-27.6 ^(a) - -79 ^(e)
	hespéretine	-42.3 ^(a)
flavones	naringénine	-42.7 ^(a)
	lutéoline	16.3 ^(a) - 0 ^(e)
	apigénine	16.5 ^(a) - 0 ^(e)
	diosmine	15.5 ^(a)
flavanols	flavone	30 ^(b) dans l'éthanol
	(+)-catéchine	35.6 ^(a) - -31.37 ^(g)
anthocyanes	(-)-épicatéchine	-45.77 ^(g)
	ion flavylum	0 ^(d)
	ion 2'-hydroxyflavylium	7.4 ^(d)
	ion 3'-hydroxyflavylium	13.9 ^(d)
	ion 4'-hydroxyflavylium	0 ^(d)
	ion 6'-hydroxyflavylium	18.2 ^(d)
	ion 2',6'-dihydroxyflavylium	28.6 ^(d)
	ion 3',6'-dihydroxyflavylium	20.1 ^(d)
ion 3',4',5'-trihydroxyflavylium	4.1 ^(d)	
isoflavone	genistéine	non plan ^(c)

^(a) van Acker *et al.*, 1996 (39) ^(b) Saidman *et al.*, 2002 (11) ^(c) Erkoç et Erkoç, 2002 (119) ^(d) Pereira *et al.*, 1997 (120) ^(e) Leopoldini *et al.*, 2004 (121) ^(f) Kim *et al.* 2006 (112) ^(g) Mendoza-Wilson et Glossman-Mitnik 2006 (122)

En utilisant une méthode de calcul par dynamique moléculaire, Kim *et al.* (2006) (112) ont reporté un angle θ de 1.2° et que cet angle de torsion entre le cycle B et le reste de la molécule est aussi influencé par la nature du flavonoïde et la présence de substituants. De plus, la dynamique réalisée dans l'eau a montré une variation de cet angle due aux interactions avec les molécules d'eau.

D'une manière générale, les flavonols sont plans en raison de la délocalisation électronique sur l'ensemble de la molécule. Les liaisons hydrogènes entre la fonction carbonyle du cycle C et les hydroxyles en position 5 et 3 et l'interaction entre C₂-H et O₃-H stabilisent la molécule.

La substitution de l'hydroxyle en position 3 ou son absence comme dans le cas des flavones conduit à une déformation de la molécule avec un angle θ compris entre 15° et 30°. Les isoflavones ne sont pas planes en raison d'une gêne stérique entre le carbonyle du cycle C et le cycle B. Pour les dérivés de l'ion flavylum, la position des substitutions sur le cycle B a une influence sur la planéité de la molécule en raison d'une gêne stérique entre les liaisons C₃-H et C₆-H et de la possibilité de former des liaisons hydrogènes avec O₁.

▪ *Cas des flavonoïdes glycosylés*

L'analyse conformationnelle des flavonoïdes glycosylés semble être délicate. En effet, peu de travaux ont étudié par modélisation moléculaire la structure de ces molécules. Ceci peut être dû aux nombreuses liaisons hydrogènes, angles de torsion et aux phénomènes de répulsion stérique.

Cependant, l'analyse conformationnelle de l'isoquercitrine (3-O-glucopyranosylquercétine) a été effectuée par Cornard *et al.* (1999) (114) en combinant une étude préliminaire par mécanique moléculaire (champs de force MMX) pour les calculs des surfaces d'énergie potentielle et les optimisations d'énergie des conformères les plus stables par mécanique quantique (semi-empirique, AM1). Pour les flavonoïdes glycosylés, les principaux changements dans les conformations sont dus à des rotations autour des liaisons. La flexibilité de la molécule a donc été caractérisée par 3 angles de torsion principaux (θ , α , ω) pour définir les positions d'une part du cycle B par rapport à la partie chromone et d'autre part du glucose par rapport à la génine (figure I.8). De plus, la possibilité de former des liaisons hydrogènes entre le glucose, particulièrement avec OH en position 6, et le cycle B a été aussi étudiée grâce aux angles de torsion γ et ε . La modélisation a permis de mettre en évidence sur la structure de l'isoquercitrine les éléments suivants (figure I.9):

- la génine n'est pas plane avec un angle d'environ -30° entre la partie chromone et le cycle B en raison d'une gêne stérique du glucose. Cependant, la barrière énergétique

entre plusieurs conformères de basse énergie est relativement faible mettant en évidence leur coexistence à température ambiante.

- la structure de plus basse énergie présente un réseau de liaisons hydrogène, en particulier entre C₅-OH et C₄=O, entre C_{2''}-OH et C₄=O (autre possibilité avec C_{6''}-OH mais conduit à une structure moins stable), entre C_{6''}-OH et O₃-H, et entre les deux OH de la partie catéchol.

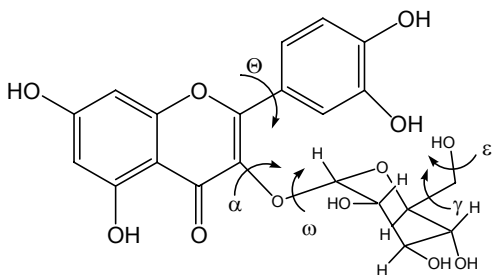


Figure I.8. structure de l'isoquercitrine et angles de torsion caractéristique de la molécule

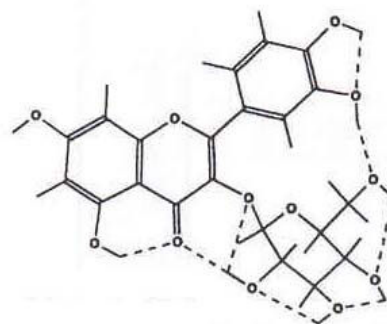


Figure I.9. structure optimisée d'énergie minimale de l'isoquercitrine (calculs semi-empiriques, AM1) (114) θ : -31,8, α : 124, ω : -94, γ : -67,8, ε : -68,2

De même, une étude moins poussée a été réalisée par Alluis (2000) (47) pour rechercher la conformation la plus stable de la rutine (figure I.10) en optimisant par mécanique moléculaire (champs de force MM+ sans minimisation d'énergie) les distances intramoléculaires entre le chromophore et l'ose déterminées par l'étude des corrélations NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) à « longue distance ». La structure obtenue présente entre autre une liaison hydrogène entre le glucose (C_{2''}-H) et la fonction carbonyle du cycle C (C₄=O) et une poche hydrophobe entre le rhamnose et le cycle B.

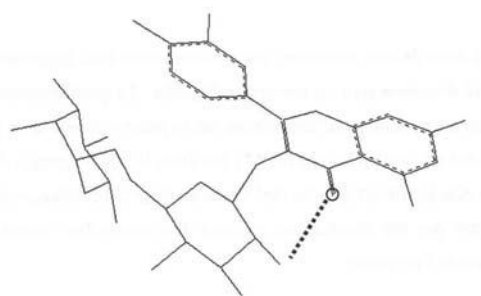


Figure I.10. structure optimisée d'énergie minimale de la rutine (calculs mécaniques moléculaires, champs de force MM+) (47)

▪ *Cas des flavonoïdes acylés*

L'introduction d'un résidu acyle à un flavonoïde pourrait modifier la conformation de ce dernier. En effet, Figueiredo *et al.* (1996) (123) ont observé des interactions intramoléculaires entre le noyau pyrylium central d'une anthocyane acylée et les deux dérivés cafféyles.

De même, la modélisation moléculaire de dérivés glycosylés et acylés (triméthoxybenzoyl) de la quercétine a conduit à des interactions de type Van der Waals et hydrophobiques entre les cycles A et triméthoxybenzoyl pour le dérivé glycosylé de la quercétine (47) (figure I.11). Des interactions similaires entre les cycles aromatiques de la génine et ceux de la partie acyle ont aussi été décrites pour l'ester de la chryisine et de l'acide *p*-methoxycinnamique (figure I.12).

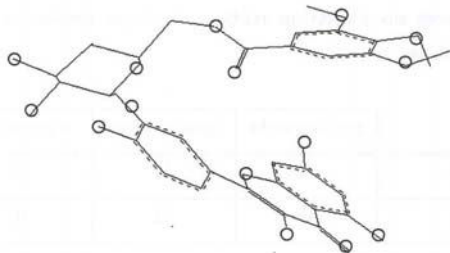


Figure I.11. structure optimisée d'énergie minimale de la 3'-O-(6''-O-triméthoxybenzoyl)-b-D-glucopyranosylquercétine (calculs semi-empiriques, méthode AM1) (47)

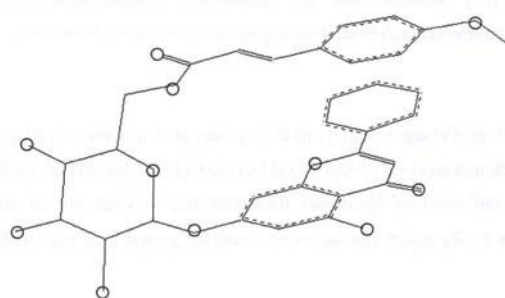


Figure I.12. structure optimisée d'énergie minimale du *p*-methoxycinnamate de chryisine (calculs mécaniques moléculaires, champs de force MM+) (47)

Ces résultats montrent que les phénomènes d'empilement entre l'aglycone et les parties acyles aromatiques, particulièrement décrits pour les anthocyanes (copigmentation intra- et intermoléculaire) semblent se généraliser à d'autres classes de flavonoïde et en particulier aux flavonols. La présence d'une partie flexible comme un ose entre la génine et le résidu aromatique est nécessaire à l'obtention de telles conformations.

4.2. Relation structure-activité antioxydante

Plusieurs auteurs ont remarqué que l'activité antioxydante était améliorée lorsque la molécule possédait une fonction catéchol, une double liaison entre C₂-C₃ dans le cycle C et une planéité de la molécule. Ces éléments structuraux conduiraient probablement en la

formation d'un radical stable en raison de nombreux groupes phénoliques et d'une délocalisation électronique étendue.

▪ *Définition des paramètres impliqués dans les processus de piégeage de radicaux*

Un antioxydant peut jouer son rôle soit par un mécanisme de transfert de proton, soit par un mécanisme de transfert mono-électronique (124).

Le mécanisme par transfert de proton (abstraction d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant par un radical libre) est particulièrement important dans le cas de l'inhibition de la peroxydation des lipides. Pour que ce mécanisme soit vraiment efficace, le radical phénoxy formé doit être relativement stable. L'efficacité de l'antioxydant dépend donc de la stabilité du radical phénoxy, c'est-à-dire de son nombre de liaisons hydrogènes et des effets de conjugaison et de résonance. L'enthalpie de dissociation de liaison (BDE) de la liaison O-H est un paramètre important pour évaluer l'activité antioxydante (121, 124). En effet, plus cette liaison est faible, plus la réaction avec le radical libre sera facilitée.

Le deuxième mécanisme est un transfert mono-électronique de l'antioxydant vers le radical libre conduisant à la formation d'un radical cation. Cette réaction n'est en réalité que la première étape d'une succession d'équilibres acido-basiques et de transferts électroniques. Dans ce cas le paramètre énergétique important pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire est le potentiel d'ionisation (IP).

Deux paramètres sont donc particulièrement étudiés :

- la stabilité du radical
- les enthalpies de formation des radicaux par rapport à la molécule parent c'est-à-dire la DBE et l'IP

▪ *Structure des radicaux et relation avec leur propriété anti-radicalaire*

La stabilité des radicaux aryloxy générés par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un hydroxyle phénolique et du radical cation formé par abstraction d'un électron de la HOMO et les enthalpies de dissociation de liaison O-H et du potentiel d'ionisation ont été évalués par modélisation moléculaire en utilisant la mécanique quantique (semi-empirique, *ab initio*). Ces

études ont porté uniquement sur les flavonoïdes non glycosylés et majoritairement sur la quercétine dont les caractéristiques structurales de ces radicaux sont indiquées dans le tableau I.7.

Tableau I.7. analyse conformationnelle des radicaux de la quercétine

Référence	Méthode de calcul	Structure des radicaux de la quercétine
Erkoç <i>et al.</i> 2003 (115)	i) Analyse conformationnelle par MM (MM+) ii) Optimisation par méthode semi-empirique (AM1)	Etude des 5 radicaux aryloxy Structure : structure plane pour les radicaux, présence d'excès de charge sur OH (pouvant intervenir dans leur activité biologique) Propriétés électroniques : E_{liaison} : -3630 à -3644 kcal/mol ΔH : -181 à -195 kcal/mol E_g : α 7.7–8.5 eV et β 6.5-8.0 eV μ : 1-5 D Radical 4'-OH (5D) : le plus interactif avec l'environnement
Russo <i>et al.</i> 2000 (113)	Optimisation par AM1 et PM3	Etude des 5 radicaux aryloxy Structure : radicaux O ₃ H et O ₄ -H sont isoénergétiques et les plus stables, pour radical O ₃ H distortion du cycle C, pour les autres radicaux structure presque plane avec angle entre 10° et 20°, présence de liaisons H en nombre variable suivant le radical, délocalisation électronique et densité de spin différentes suivant le radical Radical O ₃ H densité de spin sur le C2 Radical O ₄ -H densité de spin identique sur C ₁ , C ₃ , C ₅ , C ₃
Van acker <i>et al.</i> 1996 (39)	i) Analyse conformationnelle par MM (AMBER) ii) optimisation méthode <i>ab initio</i> (STO-3G)	Etude du radical en O ₄ Structure : structure plane, liaison hydrogène de la partie catéchol stabilise le radical, 84 % de la densité de spin reste sur la position d'abstraction du H Corrélation entre la différence d'enthalpie de formation du radical et du flavonoïde parent avec le potentiel d'oxydation de demi-oxydation pour les flavones
Trouillas <i>et al.</i> 2006 (125)	Optimisation par DFT (Density Functional Theory)	Etude des 5 radicaux aryloxy BDE 4'-OH < 3'-OH < 3-OH

La comparaison des études par modélisation des radicaux phénoliques de la quercétine et des observations expérimentales indiquent que le radical en O₄-H est probablement l'espèce radicalaire formée. Cependant, les radicaux en O₃H (ΔE : 0.22 kcal/mol) et O₃·H (ΔE : 1.96 kcal/mol) ont des énergies proches (113).

Les radicaux de la quercétine ont été décrits généralement comme plan ou avec un faible angle entre le noyau B et le reste de la molécule. Cette structure plane autorise une délocalisation électronique entre les différents noyaux. Les liaisons hydrogènes sont conservées par rapport à la molécule parent. Par contre, les valeurs obtenues pour la distribution de densité de spin sont variables en fonction de la méthode de calcul. Néanmoins, une délocalisation importante de la densité de spin a été corrélée avec une bonne activité anti-

oxydante (121). Les facteurs structuraux des radicaux des flavonoïdes non glycosylés nécessaires à l'obtention d'un bon antioxydant sont présentés dans le tableau I.8.

Tableau I.8. éléments structuraux nécessaires à une bonne activité antioxydante dans le cas des deux mécanismes par transfert d'hydrogène et d'électron

Mécanisme par abstraction d'hydrogène	Mécanisme par transfert mono-électronique
<p><u>Formation du radical</u> : les OH du cycle B sont les plus adaptés pour le transfert d'hydrogène (O_4^+)</p> <p><u>Structure</u> : radical plan, présence de fonction catéchol sur cycle C (stabilisation par liaison hydrogène), d'une double liaison C_2-C_3 et $C_4=O$ (délocalisation électronique)</p> <p>La présence d'une liaison H sur la partie catéchol confine la densité de spin sur l'oxygène ($\approx 84\%$)</p> <p><u>Critère</u> : BDE < 80 kcal/mol pour avoir une activité antiradicalaire par rapport au DPPH ou à l'ABTS^{•+}</p> <p><u>Flavonoïde</u> : quercétine, taxifoline, lutéoline, épicatechine, cyanidine</p>	<p><u>Formation du radical</u> : localisation de la densité de spin variable en fonction du flavonoïde</p> <p><u>Structure</u> : radical plan (sauf pour taxifolin $\Theta : 101^\circ$), éléments structuraux permettant une délocalisation électronique sur toute la molécule (double liaison C_2-C_3 et $C_4=O$), conservation des liaisons H par rapport à la molécule parent</p> <p><u>Critère</u> : IP le plus faible possible (relié à l'énergie de la HOMO)</p> <p><u>Flavonoïde</u> : quercétine, apigénine, lutéoline, épicatechine, kaempférol</p>

Plusieurs études sur les flavonoïdes et des molécules analogues (124-127) ont relié l'activité antiradicalaire aux enthalpies de dissociation des OH phénoliques. Le potentiel d'ionisation a été aussi corrélé avec les données expérimentales d'activité antiradicalaire mais d'une manière moins précise (125, 128). Il semblerait donc que le mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène soit la voie prépondérante dans l'activité antioxydante des flavonoïdes même en milieu aqueux.

4.3. Corrélations quantitatives (QSAR) et qualitatives (SAR) structure-activité

Les corrélations quantitatives (QSAR) ou qualitatives (SAR) entre structure et activité se font nombreuses ces dernières années. Différentes méthodes ont été utilisées pour corréler les paramètres moléculaires aux activités :

- la comparaison entre les données de la modélisation moléculaire et celles des activités étudiées afin d'obtenir des tendances. Cette méthode permet d'estimer pour chaque variable moléculaire si elle a une influence.
- l'analyse statistique par régression multivariante permet une étude plus précise des effets de chaque paramètre moléculaire et de leurs interactions. Cette méthode aboutit à une équation reliant la variable expliquée en fonction des variables explicites.
- les méthodes statistiques telles que l'analyse de la composante principale et l'hierarchisation des groupes discriminants sont utilisées pour diminuer la dimension du nombre de variables et pour déterminer qu'elles sont les variables qui pourraient être les plus efficaces pour classer les molécules testées selon leur degré d'activité.

Le tableau I.9 récapitule quelques travaux décrivant des modèles reliant des propriétés biologiques à la structure des flavonoïdes optimisée dans le vide. Aucune étude n'a été faite en phase condensée. Cependant, il est plus judicieux de se placer dans les mêmes conditions que le test biologique (antioxydant, inhibition d'enzymes, ...). Ainsi, l'étude structurale du flavonoïde devrait être réalisée dans le même solvant utilisé dans le test biologique.

Tableau 1.9. principaux travaux reliant les activités biologiques aux structures des flavonoïdes

Référence	Molécules	Activité	Modélisation moléculaire	Descripteurs/paramètres	Méthode de corrélation
Novic et al. 1997 (129)	105 dérivés flavonoïdes	Inhibition de la pK56 ^{lck} protéine tyrosine kinase	Optimisation de la géométrie par AM1	Descripteurs classiques, Descripteurs quantiques	Qsar multiregressionnel standard
Lien et al. 1998 (130)	i) 31 Phénols ii) 23 Vitamines E iii) 42 flavonoïdes	Antioxydante	Optimisation de la géométrie par AM1 Hyperchem Qsar (CQSAR software)	E_{HOMO} , E_{LUMO} , Hf, ΔH_f (Hf radical phenoxy-Hf parent) nombre de groupement hydroxyle	CQSAR ; Régressions linéaires : i) Relation entre le potentiel rédox du radical à pH7 et : ΔH_f ; E_{LUMO-r} ; (ΔH_f et OH) ; (Hfr, Hfp et OH) ; (E_{LUMO-r} , ΔH_f et OH) ; (Hfr, Hfp, E_{LUMO-r} et OH) ii) Relation entre activité antioxydante (K_s) et : ΔH_f ; E_{HOMO} ; (ΔH_f et E_{HOMO}) iii) Relation entre TEAC et : n OH, I (variable indicatrice : I=1 présence de double liaison entre C2 et C3 ou de groupement OH en 3,5,7 ou en 3', 4', 5' et I=0 absence de ces situations)
Amic et al. 2003 (131)	29 flavonoïdes	Antioxydante RSA : % de piégeage de radicaux DPPH	Optimisation de la géométrie par AM1 Hyperchem Qsar (CQSAR software)	Amélioration du model de Lien et al 1998	Relation entre RSA et : I _{3'} , 4'-diOH ou 3-OH et I _{5-OH}
Lemanska et al. 2001 (132)	Hydroxyflavones	Antioxydante pKa	Optimisation géométrie par DFT Gaussian 98 Single point	Energie de déprotonation (DE)	Relation linéaire entre pKa et DE
Olivero-Verbel et Pacheco-Londono, 2002 (133)	3 groupes de flavonoïdes: i) composés isolés de <i>C. morifolium</i> ii) composés naturels connus iii) composés de	Anti-HIV EC₅₀ : Concentration en flavonoïde permettant d'inhiber à 50% la réplication du virus. IC₅₀ : Concentration en	Optimisation de la géométrie par AM1 Hyperchem Optimisation de la géométrie par AM1 Gaussian 94	Energie totale, E_{HOMO} , E_{LUMO} , $E_{HOMO} - E_{LUMO}$ (GAP), moment dipolaire (dipole), charges atomiques négatives (MNC) et positives (MPC), charge atomique de chaque atome (QA1, QA2, ..., Qan), ΔH . Descripteurs géométriques : Moment d'inertie, LogP, aire de la	Forward Stepwise Multiple Regression : régression multivariées Hierarchical cluster analysis : classement en deux groupes (1 ^{er} cluster : effet bioactif des flavonoïdes contre la réplication HIV-1 dépend de quelques charges atomiques, moment dipolaire, moment d'inertie I ; 2 ^{ème} cluster : effet des charges atomiques, E des orbitales et le LogP. Groupe 1 : Relation linéaire entre Log (EC ₅₀),

	synthèse	flavonoïde nécessaire pour diminuer de 50% la croissance des cellules lymphocytes des cultures non traitées		surface accessible au solvant (SASA)	Log(IC ₅₀) et MPC (les charges positives des carbones évoque le mécanisme d'interaction électrophile avec le centre nucléophile du site actif. Groupe 2 : Relation entre Log(EC ₅₀) et des descripteurs électroniques (dipole et ΣQ1-4) ; relation entre Log(IC ₅₀) des descripteurs géométriques (SASA et MI-1)= la présence d'un dipôle et quelques charges sur les atomes 1-4 résume l'importance de l'architecture moléculaire stéréoelectronique et la nature électronique localisée sur le cycle A, ce sont les descripteurs déterminants de l'activité anti-HIV des flavonoïdes de ce groupe. Groupe 3 : relation entre Log(EC ₅₀), Log(IC ₅₀) et les descripteurs électroniques (dipole et QA3)= QA3 explique les différences électroniques entre les substituants en C2 et par conséquent l'extension de la délocalisation des électrons autour du cycle A. Dipôle renseigne sur les préférences conformationnelles pour le site récepteur.
Amic et al. 1997 (134)	14 dérivés coumarines 3 dérivés flavonoïdes	Inhibition de l'aldose réductase		Descripteurs topologiques : indexes de connectivité de valence Descripteurs électroniques	Qsar multivariate regression method (MLR): i) Nonorthogonalized MLR method ii) Ordred orthogonalized MLR method
Trouillas et al. 2004 (128)	Taxifolin	Antioxydante	SAR Optimisation de la géométrie par AM1 (parent RHF, radical UHF et ROHF)	Potentiel d'ionisation (IP)=-E _{HOMO} , Bond Dissociation Enthalpie (BDE)=ΔHf (Hf radical phenoxy -Hf parent)	Wright et al. 2001 ont conclu que les valeurs de ΔHf et IP des flavonoïdes dans le vide sont d'excellents indicateurs de l'activité antioxydante. Planéité de la molécule Quercétine IP 8.91, Taxifoline 9.11 eV= habilité de la quercetine à transférer des électrons Confirmation des études SAR : flavonols sont plus actifs que les hydroflavonols (HOMO localisée sur le cycle B, C3, cycle C et double liaison C2-C3).
Lin et al., 2002 (135)	Flavone : Apigénine Flavonol : quercétine, myricetine flavones glycosides :	Inhibition xanthine oxydase	SAR Mécanique moléculaire (tripos)	L'inhibition de la xanthine oxydase est augmentée par la présence de : double liaison C2-C3 pour une structure plane Présence de OH en position 5 et 7 et C4=O pour des interactions électrostatique et liaison H	

	isovitexine Isoflavone : genisteine Flavanone : naringénine			Absence de OH en position 3 (destabilisation zone hydrophobe) et de glycosyl en position 6	
Babu et al. 2002 (136)	51 Chalcones	Inhibition de la 5-lipoxygénase	Semi-empirique MNDO (MOPAC) 3D-Qsar (Molecular simulation incorporation (MSI) : Insight-II, Builder, Search-compare, Discover and APEX-3D)	Charges atomiques, π -population, indice donneur et accepteur d'électron, coefficient HOMO et LUMO, hydrophobicité, réfractivité molaire.	3D-Qsar <u>Modèle 1</u> : relation linéaire entre Log (1/IC ₅₀) et présence de groupement en C3' pouvant donner une liaison H, réfractivité molaire du C6 et du C3 et le centre cycle B <u>Modèle 2</u> : relation linéaire entre Log (1/IC ₅₀) et groupement en C3' pouvant donner une liaison H, la réfractivité molaire de double liaison et des carbones attachés aux carbones en position 2' et 5'
Yang et al. 2001 (137)	8 flavonols 5 Flavones 2 Flavanones 3 Isoflavones 10 Flavanes 1 flavanonol	Activité antioxydante IC ₅₀ : Concentration nécessaire à l'inhibition de la peroxydation lipidique de 50%	Qsar Détermination du LogP des structures (Pallas) Régressions multiparamètres (NLRAna software)	Potentiel demie onde (E _{1/2}) : calculé expérimentalement LogP	Relation linéaire entre IC ₅₀ et (E _{1/2} , Log P) : équation valable pour des E _{1/2} ≤ 0.45 23 de 29 flavonoïdes obéissent à cette équation Les flavonols montrent des valeurs élevées en activité antioxydante
Estrada et al. 2004 (138)	22 composés de la propolis	Activité antioxydante IC ₅₀ : Concentration nécessaire à l'inhibition de la peroxydation lipidique de 50%	Structures transformées en SMILES codes et rentrées dans le logiciel MODESLAB QSAR : Topological Sub-Structure Molecular Design (TOPS-MODE)	LogP, Surface polaire, polarisabilité, Charges de Gasteiger-Marsilli, rayon atomique de van der Waals, réfraction molaire	Relation entre Log IC ₅₀ et (hydrophobicité, polarisabilité et charges atomiques) TSAR : Création virtuelle de nouvelles molécules
Da Silva et al., 2004 (139)	Flavone : Apigénine Flavonol : quercétine, myristine flavones glycosides : isovitexine Isoflavone :	Inhibition xanthine oxydase	SAR Modélisation moléculaire : i) Analyse conformationnelle par MM (MM+) ii) Optimisation par méthode semi-empirique (AM1)	Paramètre influençant l'activité inhibitrice : polarisabilité, réfractivité molaire, surface moléculaire, hydrophobicité, surface du potentiel électrostatique Angle de torsion entre cycle B et reste de la molécule inférieur à 27° Effet négatif de la taille du flavonoïde Bon inhibiteur si angle vers 27°,	

	genisteine Flavanone : naringenine			petite taille et hydrophobe	
Ghiotto et al. 2004 (140)	4 flavonols	Activité antioxydante TEAC	Optimisation de la géométrie par AM1 MOPAC QSAR : analyse régressions multiples	E_{HOMO} , E_{HOMO-1} , $\Delta E_{H,H-1}$	Relation linéaire entre TEAC et $\Delta E_{H,H-1}$
Rodriguez <i>et al.</i> , 2004 (116)	Quercetine Taxifolin Catéchine Lutéolin	Inhibition de la lipoxygénase	SAR Optimisation de la géométrie par AM1	E_{LUMO} et sa délocalisation Planéité de la molécule Pas de relation avec le moment dipolaire	
Sadeghipour et al. 2005 (141)	1 flavane 3 Flavanones 2 flavones 6 Flavonols	Inhibition de la nitration de la tyrosine	Optimisation de la géométrie par PM3 Gaussian 98 Optimisation de la géométrie par DFT accès énergie	ΔH_f	Classement pouvoir inhibiteur : Flavonol (myristine, quercétine), flavone lutéoline, flavanone taxifoline et flavane catéchine Relation linéaire entre %inhibition nitrotyrosine et $\Delta \Delta H_f$ ($\Delta H_{f(\text{flavonoïdes})} - \Delta H_{f(\text{tyrosine})}$) $\Delta \Delta H_f < 0$ (exothermique) : flavonoïde ayant la capacité de piéger le radical tyrosyl Répartition en groupes : Groupe 1 : flavonoïdes ayant sur le cycle B des <i>ortho</i> - dihydroxyle a un pouvoir inhibiteur > Groupe 2 ayant sur le cycle B des <i>mono</i> -hydroxyle = capacité à piéger un nombre plus important de radicaux
Lameira et al. (2006) (142)	26 flavonoïdes	Anti-HIV (EC ₅₀) Cytotoxicité (IC ₅₀)	Optimisation par DFT	Log P, électonegativité (χ), charge sur le carbone 8 (C8)	Relation linéaire entre Log (1/ EC ₅₀) et (Log P, χ) Relation linéaire entre Log (1/ IC ₅₀) et (Log P, χ , C8)

REFERENCES

1. Cook, N.; Samman, S., Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* **1996**, 7, 66-76.
2. Winkel-Shirley, B., Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, 5, 218-223.
3. Forkmann, G.; Martens, S., Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, 12, 155-160.
4. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F., Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* **1999**, 65, (4), 337-353.
5. Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, 37, (9-10), 937-942.
6. Heller, W.; Forkmann, G., *The flavonoids*. Harborne J.B. ed.; London, 1993; p 499.
7. Fargeix, D. Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoides en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoides. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon, 2000.
8. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20, (7), 933-956.
9. Sampson, L.; Rimm, E.; Hollman, P. C. H.; De Vries, J. H. M.; Katan, M. B., Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals. *Journal of the American Dietetic Association* **2002**, 102, (10), 1414-1420.
10. Mompon, B.; Lemaire, B.; Mengal, P.; Surlbled, M. In *Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle*, Polyphenols, Bordeaux, 15-18 juillet 1996, Bordeaux.
11. Saidman, E.; Yurquina, A.; Rudyk, R.; Molina, M. A. A.; Ferretti, F. H., A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2002**, 585, (1-3), 1-13.
12. Abou El Hassan, M. A. I.; Touw, D. J.; Wilhelm, A. J.; Bast, A.; van der Vijgh, W. J. F., Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 211, (1-2), 51-56.
13. Calias, P.; Galanopoulos, T.; Maxwell, M.; Khayat, A.; Graves, D.; Antoniadis, H.; d'Alarcao, M., Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Research* **1996**, 292, 83-90.
14. Pulley, G., Solubility of naringin in water. *Industrial and Engineering Chemistry* **1936**, 8, (5), 360.
15. Benavente-García, O.; Castillo, J.; Del Baño, M., J.; Lorente, J., Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (1), 189 - 191.
16. Walle, T., Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, 36, (7), 829-837.
17. Lee, S. J.; Kim, J.-C.; Kim, M. J.; Kitaoka, M.; Park, C. S.; Lee, S. Y.; Ra, M.-J.; Moon, T. W.; Robyt, J. F.; Park, K. H., Transglycosylation of Naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase To Give Glycosylated Naringin. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, (9), 3669-3674.

18. Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P., Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 35, (2), 379-387.
19. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Luisa Pellegrino, M.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F. P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F., 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, 56, (2), 167-174.
20. Perrier, E.; Mariotte, A. M.; Boumendjel, A.; Bresson-Rival, D. Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmetique, dermopharmacie, en pharmacie et en agro-alimentaire. FR2778663-A1, 1998.
21. Sakai, M.; Suzuki, M.; Nanjo, F.; Hara, Y. 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP0618203, 1994.
22. Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S., Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules* **2003**, 4, (5), 1394-1399.
23. Harborne, J. B.; Williams, C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, 55, (6), 481-504.
24. Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R., Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, 64, (5), 923-933.
25. Harborne, J., *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press: 1989; Vol. 1 Plant Phenolics.
26. Markham, K., *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press: 1982; p 36-93.
27. Barhacs, L.; Kaizer, J.; Speier, G., Kinetics and Mechanism of the Oxygenation of Potassium Flavonolate. Evidence for an Electron Transfer Mechanism. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (11), 3449-3452.
28. Balogh-Hergovich, E.; Speier, G., Kinetics and Mechanism of the Base-Catalyzed Oxygenation of Flavonol in DMSO-H₂O Solution. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, (24), 7974-7978.
29. Mochizuki, M.; Yamazaki, S.-i.; Kano, K.; Ikeda, T., Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, 1569, (1-3), 35-44.
30. Ramos-Tejada, M. M.; Duran, J. D. G.; Ontiveros-Ortega, A.; Espinosa-Jimenez, M.; Perea-Carpio, R.; Chibowski, E., Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, 24, (3-4), 297-308.
31. Friedman, M.; Jurgens, H. S., Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (6), 2101-2110.
32. Smith, G.; Thomsen, S.; Markham, K.; Andary, C.; Cardon, D., The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry* **2000**, 136, 87-91.
33. Makris, D. P.; Rossiter, J. T., An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry* **2002**, 77, (2), 177-185.
34. Ungar, Y.; Osundahunsi, O. F.; Shimoni, E., Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (15), 4394-4399.
35. Ishihara, K.; Nakajima, N., Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 23, (2-6), 411-417.

36. Švehlíková, V.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A.; Bao, Y., Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry* **2004**, 65, (16), 2323-2332.
37. Zhu, Q. Y.; Holt, R. R.; Lazarus, S. A.; Ensunsa, J. L.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L., Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, (6), 1700-1705.
38. Burda, S.; Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, (6), 2774-2779.
39. Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D.-j.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20, (3), 331-342.
40. Afanas; rsquo; eva, I. B.; Ostrakhovitch, E. A.; Mikhal; rsquo; chik, E. V.; Ibragimova, G. A.; Korkina, L. G., Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology* **2001**, 61, (6), 677-684.
41. Sroka, Z., Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C* **2005**, 60, (11-12), 833-843.
42. Aliaga, C.; Lissi, A. E., Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.* **2004**, 82, 1668-1673.
43. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2002**, 13, (10), 572-584.
44. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L., Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **1997**, 22, (5), 749-760.
45. Lotito, S. B.; Actis-Goretta, L.; Renart, M. L.; Caligiuri, M.; Rein, D.; Schmitz, H. H.; Steinberg, F. M.; Keen, C. L.; Fraga, C. G., Influence of Oligomer Chain Length on the Antioxidant Activity of Procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, 276, (3), 945-951.
46. Miller, N. J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C., The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters -- radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters* **1996**, 392, (1), 40-44.
47. Alluis, B. Modifications chimiques de flavonoides, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydants. Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, 2000.
48. Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Bresson-Rival, D.; Perrier, E., Hesperitin Esters: Highly Stable Flavanones With Both Free Radical Scavenging and Anti-Elastase Activities. *Pharmaceutical Biology* **2003**, 41, (7), 546-549.
49. Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H., Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* **2005**, 116, (3), 295-304.
50. Katsoura, M. H.; Polydera, A. C.; Tsironis, L.; Tselepis, A. D.; Stamatis, H., Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof.

51. Zsila, F.; Bikadi, Z.; Simonyi, M., Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochemical Pharmacology* **2003**, 65, (3), 447-456.
52. Ficarra, R.; Tommasini, S.; Raneri, D.; Calabro, M. L.; Di Bella, M. R.; Rustichelli, C.; Gamberini, M. C.; Ficarra, P., Study of flavonoids/[beta]-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, 29, (6), 1005-1014.
53. Zhu, Z.; Li, C.; Li, N.-Q., Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA. *Microchemical Journal* **2002**, 71, (1), 57-63.
54. Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Khan, M. L.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P., Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, (6), 1593-1601.
55. Haslam, E., Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, (2), 205-215.
56. Le Nest, G.; Caille, O.; Woudstra, M.; Roche, S.; Guerlesquin, F.; Lexa, D., Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorganica Chimica Acta* **2004**, 357, (3), 775-784.
57. Cornard, J. P.; Merlin, J. C., Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 92, (1), 19.
58. Cornard, J. P.; Merlin, J. C., Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron* **2002**, 21, (27-28), 2801.
59. Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **2000**, 63, (7), 1035-42.
60. Wang, H.; Provan, G. J.; Helliwell, K., Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, 11, (4-5), 152.
61. Walle, T.; Vincent, T. S.; Walle, U. K., Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochemical Pharmacology* **2003**, 65, (10), 1603-1610.
62. Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, 96, (2-3), 67-202.
63. Sadik, C. D.; Sies, H.; Schewe, T., Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology* **2003**, 65, (5), 773-781.
64. Arockia Babu, M.; Shakya, N.; Prathipati, P.; Kaskhedikar, S. G.; Saxena, A. K., Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase antagonists: chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (12), 4035-4041.
65. Chi, Y. S.; Jong, H. G.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim, H. P., Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* **2001**, 62, (9), 1185-1191.
66. Zhai, H.; Maibach, H., Skin antioxidants. *Cosmetics & Toiletries* **2002**, 117, 28-32.
67. Saliou, C.; Kitazawa, M.; McLaughlin, L.; Yang, J.-P.; Lodge, J. K.; Tetsuka, T.; Iwasaki, K.; Cillard, J.; Okamoto, T.; Packer, L., Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, (1-2), 174-183.
68. Zhang, K.; Yang, E.-B.; Tang, W.-Y.; Wong, K. P.; Mack, P., Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochemical Pharmacology* **1997**, 54, (9), 1047-1053.

69. Bonina, F.; Lanza, M.; Montenegro, L.; Puglisi, C.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Castelli, F.; Saija, A., Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, 145, (1-2), 87-94.
70. Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri, J. W. A.; Dorta, D. J.; dos Santos, A. C.; Fonseca, M. J. V., Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**, 84, (1), 21.
71. Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2001**, 90, (2-3), 157-177.
72. Formica, J. V.; Regelson, W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **1995**, 33, (12), 1061-1080.
73. Leroi, E. Polynicotinic esters of hesperidin. US 3751570, 1973.
74. Albert, A.; Courbat, P.; Weith, A. Process of the preparation of *O*-substituted derivatives of cyanidan-3-ol. US4255336, 1977.
75. Vercauteren, J.; Weber, J.-F.; Bisson, J.-L.; Bignon, J. Polyphenol derivative compositions and preparation thereof. US 5844061, 1993.
76. Watanabe, K.; Niimura, K.; Miyagawa, J. Esculetin derivatives and method for manufacture thereof, use thereof, and pharmaceutical composition. EP 0654479A2, 1993.
77. Watanabe, K.; Niimura, K.; K., U. Esculetin derivatives and pharmaceutical composition. EP 0 614 896 A1, 1994.
78. Watanabe, K.; Niimura, K.; Yamazaki, T. Maruoka. Esculetin derivatives, method for manufacture thereof, and pharmaceutical composition. EP 0 719 770 A1, 1994.
79. Manach, C.; Regeat, F.; Texier, O.; Agullo, G.; Demigne, C.; Remesy, C., Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* **1996**, 16, (3), 517-544.
80. Eugster, C. Bioflavonol glycoside peroxy esters and their preparation for pharmacologically effective concentrations and ultramicroemulsions. WO9811876, 1996.
81. Bok, S.-H.; Jeong, T.-S.; Lee, S.-K.; Kim, J.-R.; Moon, S.-S.; Choi, M.-S.; Hyun, B.-H.; Lee, C.-H.; Choi, Y.-K. Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1, 2001.
82. Alcaraz, L.; Blanco, S.; Puig, O.; Tomas, F.; Ferretti, F., Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology* **2000**, 205, 231-240.
83. Mantas, A.; Deretey, E.; Ferretti, F. H.; Estrada, M. R.; Csizmadia, I. G., Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2000**, 504, (1-3), 171.
84. Matsubara, K.; Ishihara, K.; Mizushina, Y.; Mori, M.; Nakajima, N., Anti-angiogenic activity of quercetin and its derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery* **2004**, 1, 329-333.
85. Syuichi, F.; Kazutaka, T.; Shigeharu, M. Antioxidant material, anti-deterioration agent and food or beverage. WO2006070810, 2006.
86. Cavazza, C. Antioxidant composition comprising propionyl L-carnitine and a flavonoid against throm-bosis and atherosclerosis. US2003206895, 2003.
87. Gorou, H. Cosmetic for fair-complexioned face containing fatty acid ester of quercetin. JP 58131911, 1983.

88. Levy, M.-C.; Andry, M.-C. Microcapsule à paroi de flavonoïde réticulé et composition en contenant. FR 2715582, 1994.
89. Otto, R. T.; Geers, B.; Weiss, A.; Petersohn, D.; Schlotmann, K.; Schroeder, K.-L. Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition. WO0179245, 2001.
90. Pfluecker, F.; Buenger, J.; Driller, H.-J.; Buchholz, H.; Roskopf, R. Flavonoid Verbindungen zur Verwendung gegen oxidativen Stress und UV-Strahlung. EP 1205475 A1, 2000.
91. Wolber, R.; Staab, F.; Max, H.; Wehmeyer, A.; Hadshiew, I.; Wenck, H.; Rippke, F.; Wittern, K. P., Alpha-glucosylrutin, a highly effective flavonoid for protection against oxidative stress. *Alpha-glucosylrutin: Ein hochwirksames Flavonoid zum Schutz vor oxidativem Stress?* **2004**, 2, (7), 580.
92. Amalia, P. Flavonoid compounds and their pharmaceutical uses. US2004266699, 2004.
93. Suk, L. J.; Woong, K. J.; Junoh, K.; Hoon, S. H.; Seop, C. I. Flavonoid-deposited polymer composite particles and process for preparation of the same, and cosmetic compositions containing the same. WO2005049704, 2005.
94. Markakis, P., stability of anthocyanins in foods. In *anthocyanins as food colors*, Academic Press: New York, 1982; pp 163-180.
95. Chen, P.; Zhong, J.; Zhang, G. Fat-soluble tea polyphenol and esterification method productive process thereof. CN1231277, 1999.
96. Hertog, M.; Hollman, P.; van de Putte, B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, 1241-1246.
97. Spencer, J. P. E.; Abd El Mohsen, M. M.; Rice-Evans, C., Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, 423, (1), 148.
98. Moon, J.-H.; Tsushida, T.; Nakahara, K.; Terao, J., Identification of quercetin 3-O-[beta]-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 30, (11), 1274.
99. Patel, H.; Berge, W.; Cronin, M., Quantitative structure-activity relationships for the prediction of skin permeation of exogenous chemicals. *Chemosphere* **2002**, 48, 603-613.
100. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Giacchi, M.; De Pasquale, A.; Bonina, F., Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 175, 85-94.
101. Schimid, D.; Züllig, F.; Nissen, H.-P.; Prieur, H., Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. *Cosmetics & Toiletries* **2003**, 118, 71-76.
102. Schramm, D.; Collins, H.; German, J., Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1999**, 10, 193-197.
103. Lançon, A.; Delmas, D.; Osman, H.; Thénot, J.; Jannin, B.; Latruffe, N., Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive and carrier-mediated. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 316, 1132-1137.
104. Bombardelli, E.; Spelta, M., Phospholipid-polyphenol complexes: a new concept in skin care ingredients. *Cosmetics & Toiletries*, **1991**, 106, 69-76.

105. Verstraeten, S.; Keen, C.; Schmitz, H.; Fraga, C.; Oteiza, P., Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology & Medicine* **2003**, 34, (1), 84-92.
106. Chen, P.; Wang, H.; Du, Q.; Ito, Y., Purification of long-chain fatty acid ester of epigallocatechin-3-O-gallate by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, 982, (1), 163-165.
107. Giorno, L.; Molinari, R.; Natoli, M.; Drioli, E., Hydrolysis and regioselective transesterification catalyzed by immobilized lipases in membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science* **1997**, 125, (1), 177-187.
108. Nicolosi, G.; Piatelli, M.; Lambusta, D.; Patti, A., Biocatalytic process for the preparation of 3-O-acyl flavonoids. *WO 9966062* **1999**.
109. Patti, A.; Piattelli, M.; Nicolosi, G., Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, 10, (6), 577-582.
110. Riva, S.; Danieli, B.; Luisetti, M., A Two-Step Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Flavonoid Glycoside Malonates. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, (6), 618-621.
111. Sardone, L.; Pignataro, B.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Nicolosi, G.; Marletta, G., Temperature and pressure dependence of quercetin-3-O-palmitate interaction with a model phospholipid membrane: film balance and scanning probe microscopy study. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 271, (2), 329-335.
112. Kim, H.; Jeong, K.; Jung, S., Molecular dynamics simulations on the coplanarity of quercetin backbone for the antioxidant activity of quercetin-3-monoglycoside. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2006**, 27, (2), 325-328.
113. Russo, N. T., M.; Uccella, N., Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (8), 3232-3237.
114. Cornard, J. P.; Boudet, A. C.; Merlin, J. C., Theoretical investigation of the molecular structure of the isoquercitrin molecule. *Journal of Molecular Structure* **1999**, 508, (1-3), 37-49.
115. Erkoc, S.; Erkoc, F.; Keskin, N., Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2003**, 631, (1-3), 141-146.
116. Rodriguez, M. R.; Cano, A. T.; Pinto, M. D. C.; Macias, P., Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 674, (1-3), 121-124.
117. Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D., CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, 68, 171-176.
118. Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D., CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2005**, 716, (1-3), 67.
119. Erkoc, F.; Erkoc, S., Theoretical investigation of flavonoids naringenin and genistein. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2002**, 583, (1-3), 163.
120. Pereira, G.; Donate, P.; Galembek, S., Effects of substitution for hydroxyl in the B-ring of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **1997**, 392, 169-179.
121. Leopoldini, M. P., I. P.; Russo, N.; Toscano, M., Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A.* **2004**, 108, (1), 92-96.

122. Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D., Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2006**, 761, (1-3), 97.
123. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, L.; Dangles, O.; Brouillard, R., New aspects of anthocyanin complexation intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* **1996**, 41, (1), 301-308.
124. Wright, J. S. J., E. R.; DiLabio, G. A., Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (6), 1173-1183.
125. Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. L., A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* **2006**, 97, (4), 679.
126. Wang, L.-F.; Zhang, Y.-H., Unexpected role of 5-OH in DPPH radical-scavenging activity of 4-thiaflavans. Revealed by theoretical calculations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14, 2609-2611.
127. Zhang, H.-Y.; Wang, L.-F., Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, 673, 199-202.
128. Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L., A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry* **2004**, 88, (4), 571-582.
129. Novic, M.; Nikolovska-Coleska, Z.; Solmajer, T., Quantitative Structure-Activity Relationship of Flavonoid p56^{lck} Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. A Neural Network Approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, 990-998.
130. Lien, E. J.; Ren, S.; Bui, H.-H.; Wang, R., Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, (3-4), 285.
131. Amic, D.; Amic, D.-D.; Beslo, D.; Trinajst, N., Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA* **2003**, 76, (1), 55-61.
132. Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A. E. M. F.; Rietjens, I. M. C. M., The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 31, (7), 869.
133. Olivero-Verbel, J.; Pacheco-Londono, L., Structure-Activity Relationships for The Anti-HIV Activity of Flavonoids. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42, (5), 1241-1246.
134. Amic, D.; Davidovic-Amic, D.; Beslo, D. L., B.; Trinajstic, N., The Use of the Ordered Orthogonalized Multivariate Linear Regression in a Structure-Activity Study of Coumarin and Flavonoid Derivatives as Inhibitors of Aldose Reductase. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, (3), 581-586.
135. Lin, C.-M.; Chen, C.-S.; Chen, C.-T.; Liang, Y.-C.; Lin, J.-K., Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 294, (1), 167.
136. Babu, A. M.; Shakya, N.; Prathipati, P.; Kaskhedikar, S. G.; Saxena, A. K., Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase antagonists: chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (12), 4035-4041.
137. Yang, B.; Kotani, A.; Arai, K.; Kusu, F., Estimation of the antioxydant activities of flavonoids from their oxidations potentials. *analytical sciences* **2001**, 17, 599-604.

138. Estrada, E.; Quincoces, J. A.; Patlewic, G., Creating molecular diversity from antioxidants in Brazilian propolis. Combination of TOPS-MODE QSAR and virtual structure generation. *Molecular Diversity*, **2004**, 8, 21-33.
139. da Silva, S. L.; da Silva, A.; Honorio, K. M.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.; da Silva, A. B. F., The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 684, (1-3), 1.
140. Ghiotto, R. C. T.; Lavarda, F. C.; Ferreira, F. J. B., Antioxidant Activity of Flavonols. *International Journal of Quantum Chemistry* **2004**, 97, (5), 949-952.
141. Sadeghipour, M.; Terreux, R.; Phipps, J., Flavonoids and tyrosine nitration: structure-activity relationship correlation with enthalpy of formation. *Toxicology in Vitro* **2005**, 19, (2), 155.
142. Lameira, J.; Alves, C. N.; Moliner, V.; Silla, E., A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* In Press, Corrected Proof.

CHAPITRE II

MATÉRIEL & MÉTHODES

CHAPITRE II. MATERIEL & METHODES

1. MATERIEL.....	64
1.1. Biocatalyseurs	64
1.2. Réactifs.....	64
1.2.1. Flavonoïdes	64
1.2.2. Donneurs d'acyles	65
1.2.3. Tamis moléculaire.....	65
1.2.4. Solvants organiques.....	65
2. CONDUITES DES ACYLATIONS ENZYMATIQUES.....	66
3. ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES	67
3.1. Etude de la solubilité dans différents solvants organiques.....	67
3.2. Calcul de l'hydrophobicité des molécules et des solvants	68
3.3. Activité anti-radicalaire : piégeage de radicaux ABTS ^{•+}	69
4. METHODES ANALYTIQUES	69
4.1. Analyses des flavonoïdes et de leurs esters par CLHP	69
4.1.1. Principe.....	69
4.1.2. Matériels et protocole.....	70
4.2. Détermination de la teneur en eau.....	72
4.3. Purification par CLHP préparative des esters de flavonoïdes produits.....	73
4.3.1. Etat de l'art	73
4.3.2. Protocole.....	74
4.4. Analyse par spectroscopie InfraRouge (IR).....	74
4.5. Analyse par CLHP couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS).....	76
4.5.1. Principe.....	76
4.5.2. Protocole.....	77
4.6. Caractérisation des structures par Résonance Magnétique Nucléaire.....	79

4.7. Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour Differential Scanning Calorimetry)	80
5. ESTIMATION DE LA CAPACITE CALORIFIQUE (Cp)	81
6. MODELISATION MOLECULAIRE	82
6.1. Mécanique quantique	82
6.1.1. Bases.....	82
6.1.2. Les méthodes <i>ab-initio</i>	85
6.1.3. La théorie de la fonctionnelle de densité DFT	86
6.1.4. Les méthodes semi-empiriques	86
6.1.5. Prise en compte de l'effet de solvant	87
6.2. Mécanique moléculaire	87
6.3. Méthodes d'analyse des surfaces d'énergie potentielle	91
6.3.1. Optimisation de géométries.....	92
6.3.2. La dynamique moléculaire	92
6.3.3. Analyse conformationnelle par recherche systématique	95
6.4. Descripteurs moléculaires	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97

*** FIGURES ***

Figure II.1. Chemspeed-CLHP (a) et réacteurs chemspeed (b) pour synthèse en parallèle. .	67
Figure II.2. courbes d'étalonnage de la quercétine (a), isoquercitrine (b), naringénine (c), hespéritine (d), chrysin (e) et rutine (f) dans l'acétonitrile.....	71
Figure II.3. spectres IR de la quercétine et de ses esters (PSL-C) (a), de l'isoquercitrine et de ses esters (PSL-C) (b) et de l'isoquercitrine et ses esters obtenus par CAL-B (c).....	76
Figure II.4. schéma de principe d'un spectromètre de masse	76
Figure II.5. schéma de principe d'une ionisation électrospray (a) et d'un analyseur quadripolaire (b) (14).	77
Figure II.6. spectre de masse du mélange réactionnel naringénine [M-H ⁻ , m/z 271], naringénine 4'-acétate [M-H ⁻ , m/z 313] et naringénine 4',7-diacétate [M-H ⁻ , m/z 355] (a), masse du produit majoritaire purifié (b).	78

Figure II.7. représentation schématique d'un appareil de RMN.....	79
Figure II.8. spectre RMN ^{13}C (a) et ^1H (b) de la naringénine 4'-acétate.	80
Figure II.9. représentation schématique de la méthode PCM.....	87
Figure II.10. modèle (ϵ , R^*) des paramètres de van der Waals pour une molécule diatomique de type X-X. Energie d'interaction en fonction de la distance de séparation entre les deux atomes.....	90
Figure II.11. conditions périodiques aux limites pour un système à deux dimensions.	94

*****TABLEAUX*****

Tableau II.1. liste des flavonoïdes utilisés.....	64
Tableau II.2. donneurs d'acyles utilisés	65
Tableau II.3. solvants utilisés	66
Tableau II.4. Log P des flavonoïdes, de leurs esters et des solvants utilisés.....	68
Tableau II.5. gradient d'élution pour la séparation du flavonoïde de ses esters.	70
Tableau II.6. techniques de purification des esters de flavonoïdes	73
Tableau II.7. décomposition en sous groupes des flavonoïdes.....	82

CHAPITRE II. MATERIEL & METHODES

1. MATERIEL

1.1. Biocatalyseurs

La lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) utilisée est la Novozyme 435 avec une activité de 7000 PLU/g, où 1 unité de propyl laurate (1 PLU) est définie comme 1 μmol d'acide laurique transformée en propyl laurate par minute sous les conditions standards (1-propanol/ acide laurique=1/1). Il s'agit d'une lipase immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse avec une teneur en eau de 1 à 2 % (p/p) et une teneur protéique enzymatique comprise entre 1 et 10 % (p/p).

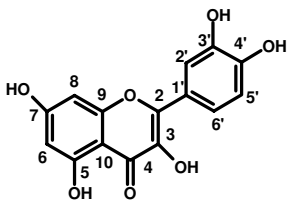
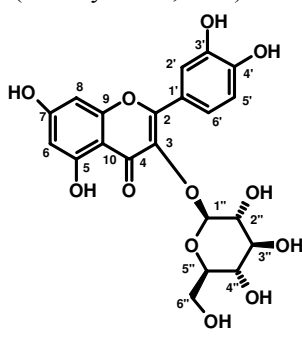
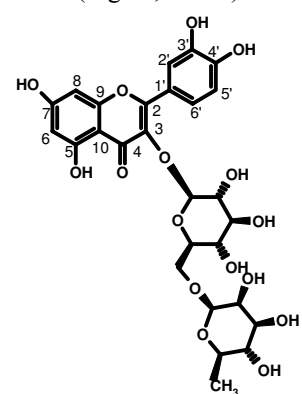
La lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) utilisée est la Amano PS-C II, immobilisée sur céramique, avec une activité de 752 U/g: 1 unité est définie comme 1 μmol de 1-phénéthyle alcool transformée en 1-phénéthyle acétate par minute à 25°C en présence de vinyle acetate.

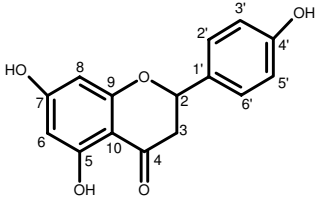
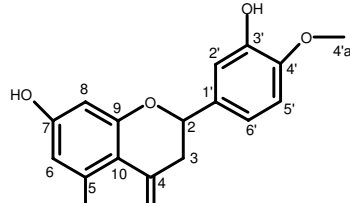
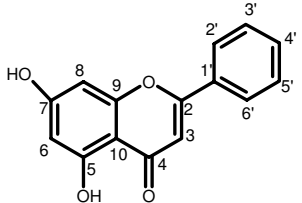
1.2. Réactifs

1.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes étudiés proviennent de trois familles différentes : flavonol, flavone et flavanone (tableau II.1).

Tableau II.1, liste des flavonoïdes utilisés

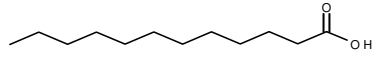
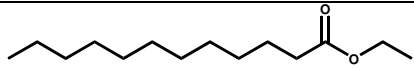
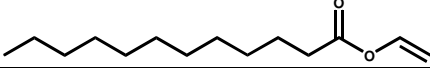
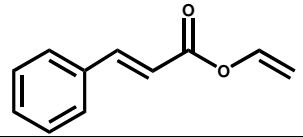
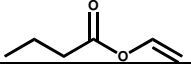
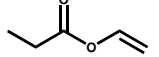
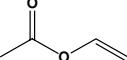
Flavonol		
Flavonoïde, Masse Molaire, Fournisseur, Pureté		
Quercétine (M 302 g/mol) (Sigma, 98%) 	Isoquercitrine (M 464 g/mol) (Extrasynthèse, 95%) 	Rutine (M 610 g/mol) (Sigma, >95%) 

Flavone		Flavanone
Flavonoïde, Masse Molaire, Fournisseur, Pureté		
Naringénine (M 272 g/mol) (Sigma, >95%) 	Hespéritine (M 302 g/mol) (Sigma, >98%) 	Chrysin (M 254 g/mol) (Acros, >95%) 

1.2.2. Donneurs d'acyles

Les donneurs d'acyles étudiés sont l'acide laurique, le méthyle laurate, et des vinyles esters (tableau II.2).

Tableau II.2. donneurs d'acyles utilisés

Donneur d'acyle, Masse Molaire (g/mol), Fournisseur	Structure
Acide laurique, M 200, Flucka	
Méthyle laurate, M 214.34, Flucka	
Vinyle laurate, M 226.36, Flucka	
Vinyle cinnamate, M 174.2, Aldrich	
Vinyle butyrate, M 114.14, Flucka	
Vinyle propionate, M 100.12, Flucka	
Vinyle acetate, M 86.09, Flucka	

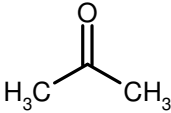
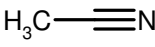
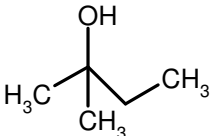
1.2.3. Tamis moléculaire

Le tamis moléculaire utilisé pour sécher les solvants est du 4Å fourni par Accros. Ce tamis est régénéré après chaque utilisation par lavage aux solvants et séchage dans un four sous vide à 220°C.

1.2.4. Solvants organiques

Trois solvants organiques ont été testés lors de ce travail (tableau II.3).

Tableau II.3. solvants utilisés

Solvant, Masse Molaire (g/mol), densité, Fournisseur	Structure
Acétone, M 58.08, d 0.79, Carlo erba	
Acétonitrile, M 41.05, d 0.786, Aldrich	
Tert-amyl alcool, M 88.14, d 0.8, Merck	

2. CONDUITES DES ACYLATIONS ENZYMATIQUES

Après des études préliminaires réalisées dans un réacteur type Wheaton[®] de 50 ml, l'effet de la structure du flavonoïde, du donneur d'acyle, de la nature solvant et de l'enzyme, et du rapport molaire (flavonoïde/donneur d'acyle) sur la performance de synthèse a été mené dans une installation de microréacteurs (Figure II.1.a). Cette installation est équipée d'un bloc de huit réacteurs (27 ml) (Figure. II.1.b). Le volume utile de chaque micro-réacteur est de 20 ml. Au-dessus de chaque réacteur un dispositif réfrigérant est présent pour limiter toute évaporation possible du solvant lors des prélèvements. L'installation est totalement automatisée et permet de mener plusieurs synthèses en parallèle. Le protocole général suivi, dans les conditions standard, est le suivant :

- séchage des micro-réacteurs à une température de 90°C sous vide (200 mbars) pendant 24h,
- ajout automatique de solvant et de donneur d'acyle (volume total 15 ml) séchés au préalable avec du tamis moléculaire (< 50 ppm),
- ajout du flavonoïde et solubilisation pendant 12 h à 50°C sous agitation (500 rpm),
- prélèvement de 1ml du milieu réactionnel avant le début de synthèse (0 h) et analyse de la teneur en eau,
- déclenchement de la réaction par ajout de lipase (CAL-B ou PSL-C, 50 g/L),
- prélèvement régulier de 3 fois 100 µl du milieu réactionnel et forte dilution automatique par le solvant utilisé durant les 6 jours d'incubation,
- filtration en ligne de l'échantillon (0.2 µm),

- Analyses en ligne des substrats et produits en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Une description plus détaillée des conditions opératoires pour chaque réaction sera donnée dans les chapitres portant sur les résultats obtenus durant ce travail.

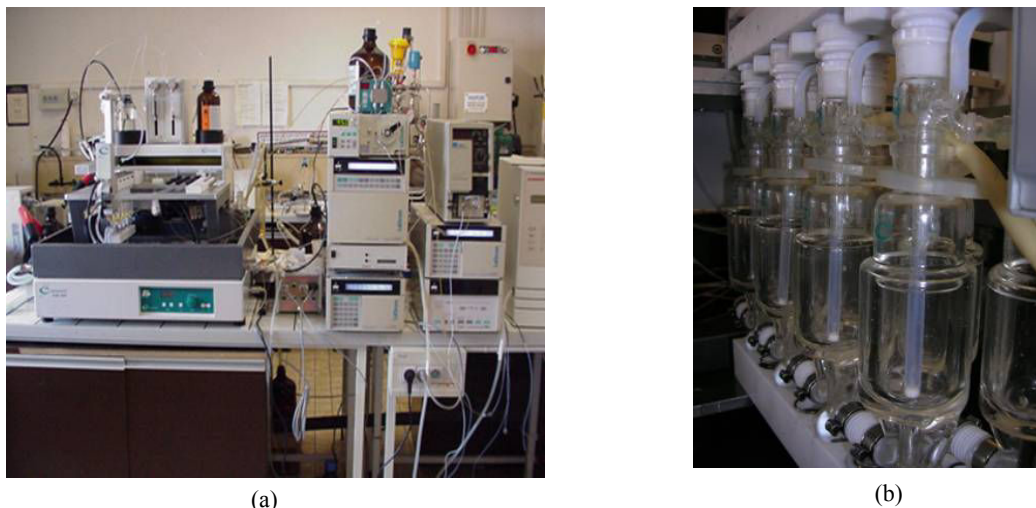


Figure II.1. Chemspeed-CLHP (a) et réacteurs chemspeed (b) pour synthèse en parallèle

3. ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES

3.1. Etude de la solubilité dans différents solvants organiques

La solubilité de la rutine, de l'isoquercitrine, de la quercétine, de la chrysin, de la naringénine et de l'hespéritine a été mesurée dans différents solvants organiques (*tert*-amyl alcool, acétone, acétonitrile) à 50°C.

Le solvant (15 ml) est séché au préalable par du tamis moléculaire et maintenu dans une série de réacteurs en parallèles à 50°C. La solubilité commence en transférant automatiquement (Chemspeed) le solvant au flavonoïde qui a été placé aussi dans une autre série de réacteurs maintenus à 50°C. En présence d'acétonitrile, 0.15g de flavonoïde ont été utilisés. La masse de flavonoïde est de 0.75g dans le cas de l'acétone et du *tert* amyl alcool. Des prélèvements réguliers sont effectués pendant 6 jours. Les échantillons prélevés sont filtrés sur 0.2 µm et injectés, après dilution, sur CLHP. Les filtres, les solvants et les vials sont séchés et maintenu à 50°C pour éviter une précipitation possible du flavonoïde.

L'étude de l'influence du vinyle acétate sur la solubilité de la quercétine et de l'isoquercitrine dans l'acétonitrile a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Un rapport molaire donneur d'acyle/ flavonoïde de 40 a été testé.

3.2. Calcul de l'hydrophobicité des molécules et des solvants

L'hydrophobicité des molécules et des solvants a été déterminée par leur log P, où P est le coefficient de partition de ladite molécule ou solvant entre l'eau et l'octanol (tableau II.4). Le logiciel HyperChem[®] a été utilisé pour la prédiction des valeurs de log P. Les calculs des Log P sont basés sur la méthode des constantes fragmentales développées par Nys et Rekker (1973) et revues par Ghose et ses collaborateurs (1989) (1). Le principe est d'attribuer à des groupements d'atome une constante d'hydrophobicité appelée valeur fragmentale f. L'hydrophobicité est ainsi calculée par la somme des constantes d'hydrophobicité de chaque groupement constituant la molécule et de facteurs de correction tenant compte des différentes interactions et répulsions moléculaires entre fragments.

Tableau II.4. Log P des flavonoïdes, de leurs esters et des solvants utilisés

Substance	LogP
Quercétine	0.28
Isoquercitrine	-1.18
Rutine	-1.97
Chrysine	1.75
Naringénine	1.99
Hespéritine	1.73
Quercétine 4'-acétate	0.06
Quercétine 4',3'-diacétate	-0.15
Quercétine 4',3',7'-triacétate	-0.37
Isoquercitrine 6''-acétate	-1.05
Isoquercitrine 6'',3''-diacétate	-0.93
Isoquercitrine 6'',3'',2''-triacétate	-0.83
Isoquercitrine 6'',4'-diacétate	-1.27
Chrysine 7-acétate	6.47
Naringénine 4'-acétate	1.77
Naringénine 4',7'-diacétate	1.55
Hespéritine 3'-acétate	1.52
Hespéritine 7-acétate	1.52
Acétone	-0.23
Acétonitrile	-0.33
Acétonitrile+vinyl acétate	-0.32
Tert-amyl alcool	1.3

3.3. Activité anti-radicalaire : piégeage de radicaux ABTS^{•+}

L'activité anti-radicalaire de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la naringénine, de l'hespéritine et de la chrysin a été évaluée par le piégeage de radicaux ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique acide). Une solution ABTS^{•+} à 7 mM et une solution de trolox dans de l'éthanol à différentes concentrations sont préparées. La solution ABTS^{•+} à 7 mM est diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une DO à 734 nm de l'ordre de 0,7. A 1 ml de solution d'ABTS^{•+}, 50µL de solution à doser sont ajoutés et la DO à 734 nm après 15 min d'incubation est mesurée. L'échantillon est solubilisé, puis dilué dans de l'éthanol à différentes concentrations et analysé de la même manière que le trolox. Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{DO_{initial} - DO_{final}}{DO_{initial}} \times 100$$

La valeur du TEAC correspondant à la concentration molaire de trolox équivalent permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'1 µM ou 1 g/L de produit est déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration.

4. METHODES ANALYTIQUES

4.1. Analyses des flavonoïdes et de leurs esters par CLHP

4.1.1. Principe

La séparation par chromatographie en phase liquide, comme toute méthode chromatographique, est fondée sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une solide poreuse, appelée phase stationnaire (la colonne), l'autre constituée par un solvant et dite phase mobile. Des différences d'affinité des divers constituants du mélange, pour chacune des deux phases, il en résulte des différences entre les vitesses de migration de ces composés, d'où une possibilité de séparation. La colonne utilisée dans cette étude est apolaire (support de silice sur lequel sont greffées des chaînes aliphatiques en C₁₈), tandis que l'éluant est polaire: c'est le principe de la chromatographie inversée. Les composés hydrophobes sont retenus sur la colonne alors que ceux hydrophiles sont entraînés les premiers par l'éluant.

4.1.2. Matériels et protocole

Les différentes analyses ont été effectuées en utilisant un système Merck (LaChrom, Merck) équipé de:

- une colonne Apollo C18 (250x4.60 mm, Alltech);
- un four de colonne (L-7350, Merck);
- un injecteur d'échantillons automatique (L-7200, Merck);
- une pompe (L-7100, Merck);
- un détecteur à ultraviolet UV (Merck);
- un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogramme EZ-Chrom[®].

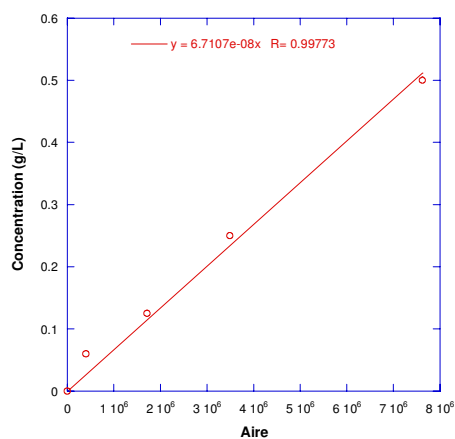
Les échantillons prélevés du milieu réactionnel renferment des molécules de polarités différentes, il est nécessaire donc de réaliser un gradient d'élution afin de séparer tous les composants du milieu. Le Tableau II.5 donne la composition de ce gradient en fonction du temps d'analyse. Le passage du mélange H₂O/MeOH (60/40; v/v) permet d'éluer dans un premier temps le composé le plus polaire (flavonoïde). L'enrichissement progressif de l'éluant en méthanol permet d'entraîner les esters. L'analyse est effectuée avec un débit d'élution de 1 ml.min⁻¹. La température de la colonne étant réglée à 55 °C. Les échantillons ont été filtrés à 0.2 µm et dilués 10 à 100 fois avant injection.

Tableau II.5. gradient d'élution pour la séparation du flavonoïde de ses esters

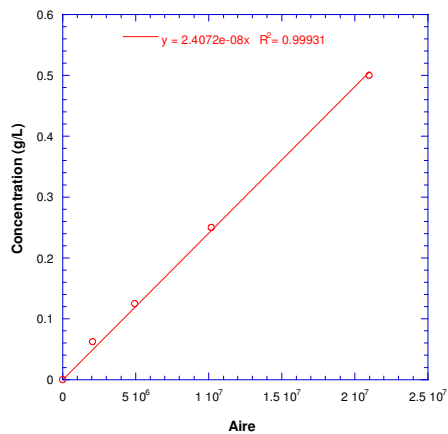
Temps (min)	MeOH	H ₂ O
0	40	60
5	100	0
10	100	0
15	40	60

L'utilisation d'un détecteur UV pour la détection des flavonoïdes a nécessité de se placer à la longueur d'onde maximale (λ_{\max}) de chaque molécule. Un λ_{\max} de 254 nm a été utilisé avec la rutine, la quercétine, l'isoquercitrine et la chrysin, alors qu'avec la naringénine et l'hésperitine, il est de 280 nm.

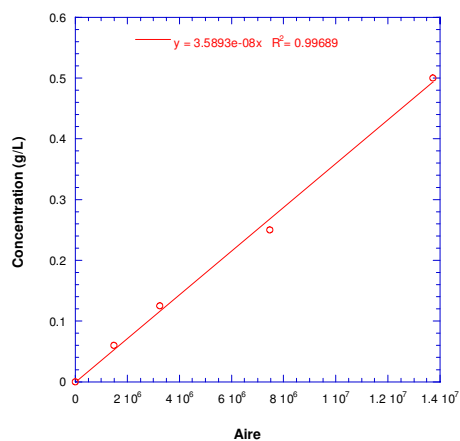
Des courbes d'étalonnages ont été réalisées pour chaque flavonoïde solubilisé dans le même solvant que le milieu réactionnel (figure II.2).



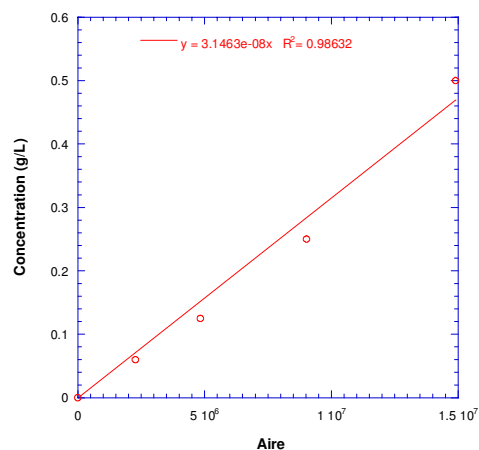
(a)



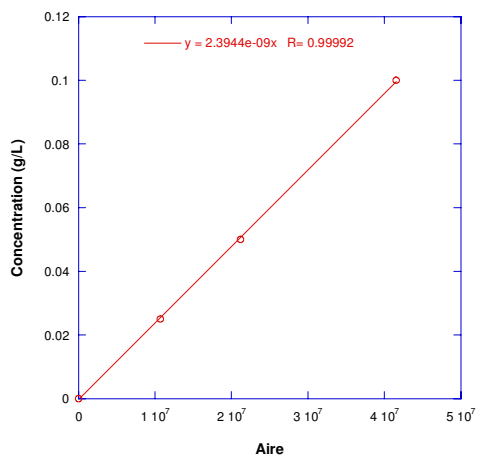
(b)



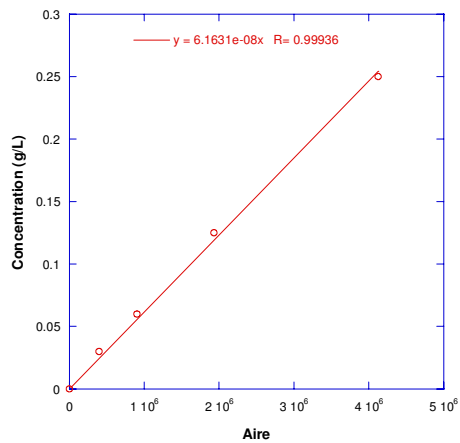
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure II.2. courbes d'étalonnage de la quercétine (a), isoquercitrine (b), naringénine (c), hespétine (d), chryisine (e) et rutine (f) dans l'acétonitrile

- Calcul des taux de conversion

Le taux de conversion du flavonoïde est calculé à partir des concentrations déterminées par CLHP :

$$\% \text{ conversion} = ([S]_i - [S]_f) * 100 / [S]_i \quad (\text{II.1})$$

où $[S]_i$: concentration en substrat initiale (g/L)

$[S]_f$: concentration en substrat finale (g/L)

- Calcul de la vitesse initiale de consommation du flavonoïde

La vitesse initiale a été estimée à partir de la pente de la partie linéaire de la cinétique (24 premières heures).

- Calcul de la sélectivité de la réaction

Pour étudier l'influence des différents paramètres de la réaction sur la sélectivité de synthèse les pourcentages des esters présents dans le milieu réactionnel ont été déterminés.

Le pourcentage d'un produit est calculé comme suit:

$$\% \text{ d'un ester} = [A_i (\text{ua})] * 100 / [A_t (\text{ua})] \quad (\text{II.2})$$

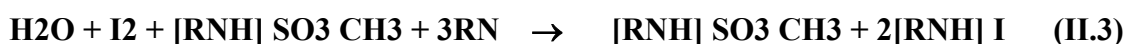
où A_i : aire de l'ester (i) présents dans le milieu

A_t : la somme des aires de tous les esters présents dans le milieu

4.2. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau du milieu réactionnel est déterminée par titrage coulométrique selon la méthode de Karl Fisher.

Le titrage d'une solution contenant de l'eau comprend plusieurs réactions qui s'expriment par l'équation globale suivante:



Selon cette équation, l'iode réagit quantitativement avec H_2O . La quantité de courant, en relation avec l'iode formé est donc proportionnelle à la quantité d'eau introduite dans le milieu. Le titrage final s'effectue par voltamétrie, ce qui permet de détecter d'infime quantité d'iode dans le milieu.

Les analyses sont réalisées grâce à un coulomètre KF 737II (Metrohm) à l'aide du réactif Hydranal-Coulomat AG-H (Riedel-de-Haën).

Une quantité connue d'échantillon à analyser (200-800 mg) est injectée au sein de la cellule de mesure du coulomètre KF. Les résultats sont donnés soit en % soit en ppm (p/p).

4.3. Purification par CLHP préparative des esters de flavonoïdes produits

4.3.1. Etat de l'art

Dans la littérature, peu de travaux traitent spécifiquement de la purification des esters de flavonoïdes synthétisés. Les données présentées sont donc issues de l'analyse des protocoles opératoires. Les techniques utilisées sont celles classiques de la purification de composés synthétisés à savoir la chromatographie, la recristallisation, la précipitation et l'extraction liquide-liquide ou une combinaison de ces techniques. Le tableau II.6 donne quelques techniques de purification des esters de flavonoïdes synthétisés par voie enzymatique.

La première étape de purification consiste à éliminer le solvant et le catalyseur. Dans le cas des catalyseurs enzymatiques, les synthèses utilisant principalement des enzymes immobilisées, une filtration permet d'éliminer et de récupérer, puis après lavage de recycler le biocatalyseur (2). L'élimination du solvant de la réaction est réalisée le plus souvent par évaporation sous pression réduite.

La technique la plus utilisée pour la séparation des esters de flavonoïdes et des produits de départ est la chromatographie sur gel de silice. Selon la nature du flavonoïde et du donneur d'acyle et le niveau d'élution, le système de solvant est variable. Toutefois, des lavages, des précipitations ou des recristallisations avec un solvant tel que l'hexane, l'heptane, les solvants halogénés ont été décrits afin d'éliminer l'acide résiduel. Ces techniques sont employées généralement dans les cas où le taux de conversion en flavonoïde de la réaction est quasi-total et/ou que l'acide a été introduit en excès.

Tableau II.6. techniques de purification des esters de flavonoïdes

Références	Molécules	Conditions
Danieli <i>et al.</i> (1990) (3)	butanoate de rutine, d'héspéridine, de naringine	chromatographie sur gel de silice solvant : AcOEt/AcOH/eau (15/1/1)
Riva <i>et al.</i> (1996) (4)	benzyl malonate d'isoquercitrine, de rutine et de naringine	chromatographie sur gel de silice solvant : mélange AcOEt/MeOH
Patti <i>et al.</i> (2000) (5)	propionate, valérate, palmitate	chromatographie sur gel de silice

	de catéchine	<u>solvant</u> : éther de pétrole/acétone (7/3)
Gao <i>et al.</i> (2001) (6)	cinnamate de catéchine-7-glucoside, de naringine, d'isoquercitrine, de lutéoline-7-glucoside	chromatographie sur gel de silice <u>solvant</u> : chloroforme/méthanol (7/3)
Kontogianni <i>et al.</i> (2001) (7) Kontogianni <i>et al.</i> (2003) (8)	décanoate de naringine et de rutine	chromatographie sur gel de silice <u>solvant</u> : acétonitrile/méthanol/eau (8/2/0,3) chromatographie sur couche mince <u>solvant</u> : chloroforme/méthanol/eau (8/2/0,3, v/v/v)
Enaud <i>et al.</i> (2003) (2)	cinnamate de phloridzine	précipitation par ajout d'hexane
Ardhaoui <i>et al.</i> (2004) a, b, c (9-11)	esters de rutine et d'esculine	extraction liquide/liquide - élimination du flavonoïde résiduel par eau/heptane (2/3, v/v) - élimination du donneur d'acyle par acétonitrile/heptane (3/5, v/v)
Mellou <i>et al.</i> (2005) (12)	esters de naringine, chrysoeriol-7-O-β-D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside 6''-laurate, chrysoeriol-7-[6''-O-acetyl-β-D-allosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranoside] 6''-laurate	chromatographie sur gel de silice 60A <u>solvant</u> : cyclohexane-ethylacetate ou mélange de chloroforme-méthanol
Katsoura <i>et al.</i> (2006) (13)	esters de naringine et de rutine	chromatographie sur C18 <u>solvant</u> : gradient de 10 à 100% acétonitrile dans l'eau.

4.3.2. Protocole

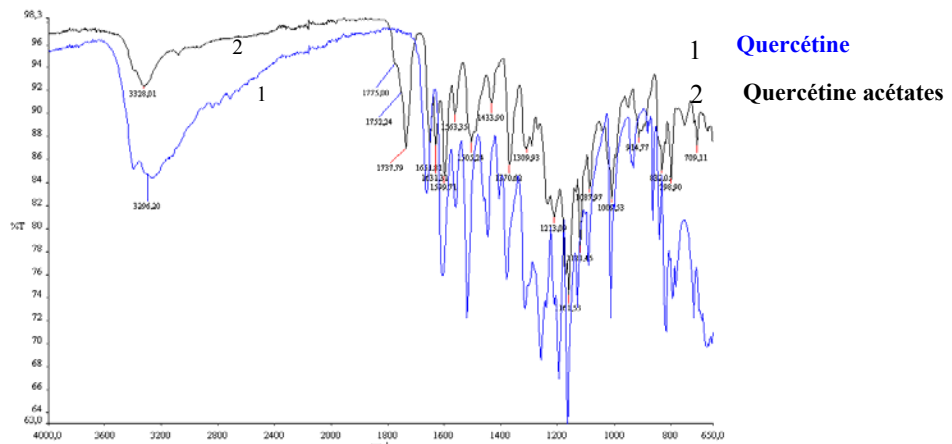
Après filtration du milieu réactionnel pour éliminer l'enzyme, les esters de flavonoïdes et les substrats flavonoïdes ont été séparés et purifiés par chromatographie liquide haute pression préparative Novasep. Les analyses ont été effectuées sur une colonne Alltech C18 (25x5 cm, 12 μm) avec une phase mobile composée de 80% méthanol et 20% eau à un débit de 20 mL/min. L'éluion a été réalisée à température ambiante avec une détection par UV. Le milieu a été dilué 2,5 fois dans la phase de départ et 10 ml de cette solution ont été injectés à chaque batch. Plusieurs batchs ont été réalisés. Après rassemblement des fractions pour chaque ester, le solvant a été évaporé à sec.

4.4. Analyse par spectroscopie InfraRouge (IR)

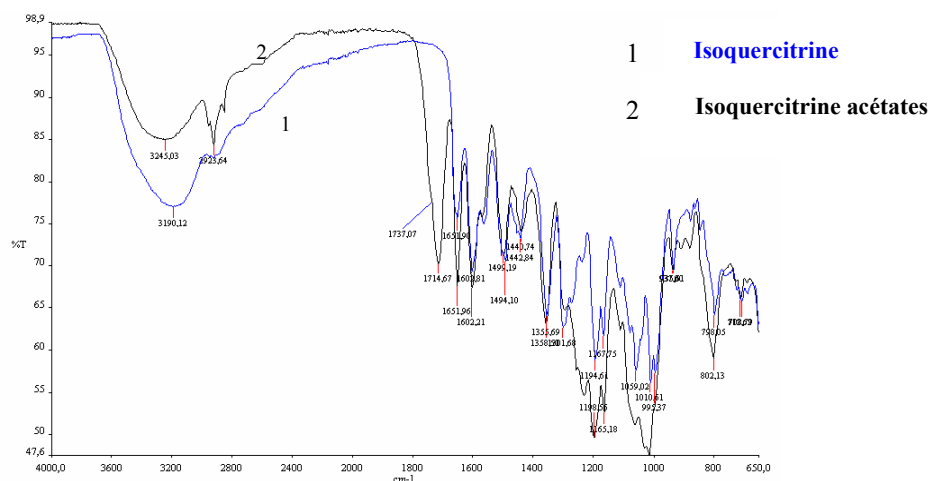
La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une

diminution de l'intensité réfléchiée ou transmise est enregistrée. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5\text{--}25\ \mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée, les modes de vibration actifs en infrarouge peuvent être déterminés grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

Les spectres IR de la quercétine, de l'isoquercitrine et de leurs esters (figure II. 3) ont été déterminés à l'aide d'un spectromètre IR Perkin-Elmer FT-IR, montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).



(a)



(b)

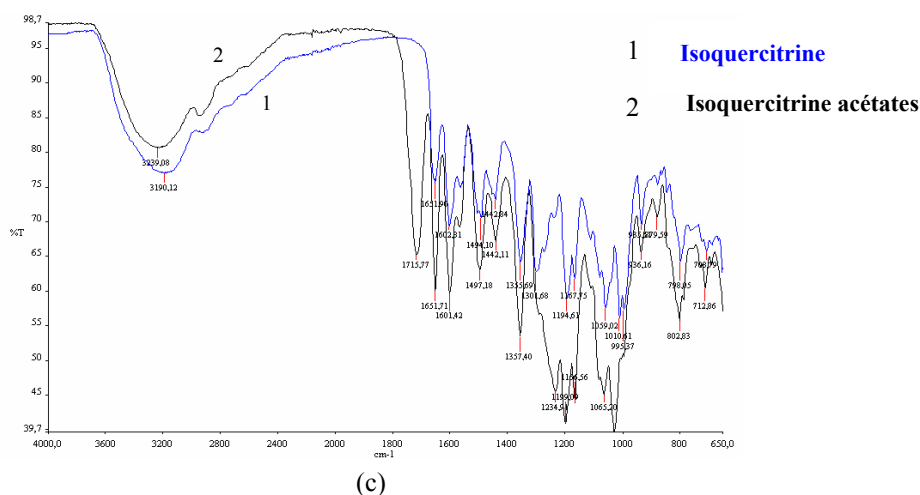


Figure II.3. spectres IR de la quercétine et de ses esters (PSL-C) (a), de l'isoquercitrine et de ses esters (PSL-C) (b) et de l'isoquercitrine et ses esters obtenus par CAL-B (c)

4.5. Analyse par CLHP couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS)

4.5.1. Principe

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant leur rapport de masse/charge, noté m/z . La figure II.4 récapitule toutes les parties constituant un spectromètre de masse.

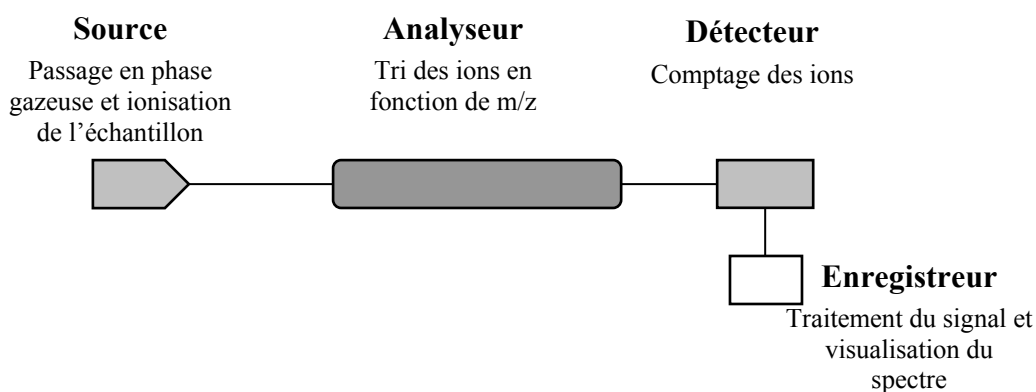


Figure II.4. schéma de principe d'un spectromètre de masse

Bien que le mécanisme de l'électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionization) ne soit pas encore bien élucidé, le processus peut être simplement décrit. Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire qui est portée à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de

gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse.

Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée) (Figure II.5.a). L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. De plus, un flux de gaz (de l'azote en général) est appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé. Les ions formés en mode positif sont des espèces multiprotonées. Le mécanisme exact de la formation des ions à partir des gouttelettes chargées est encore mal compris. L'électrospray est généralement couplé à un analyseur quadripolaire (Figure II.5.b).

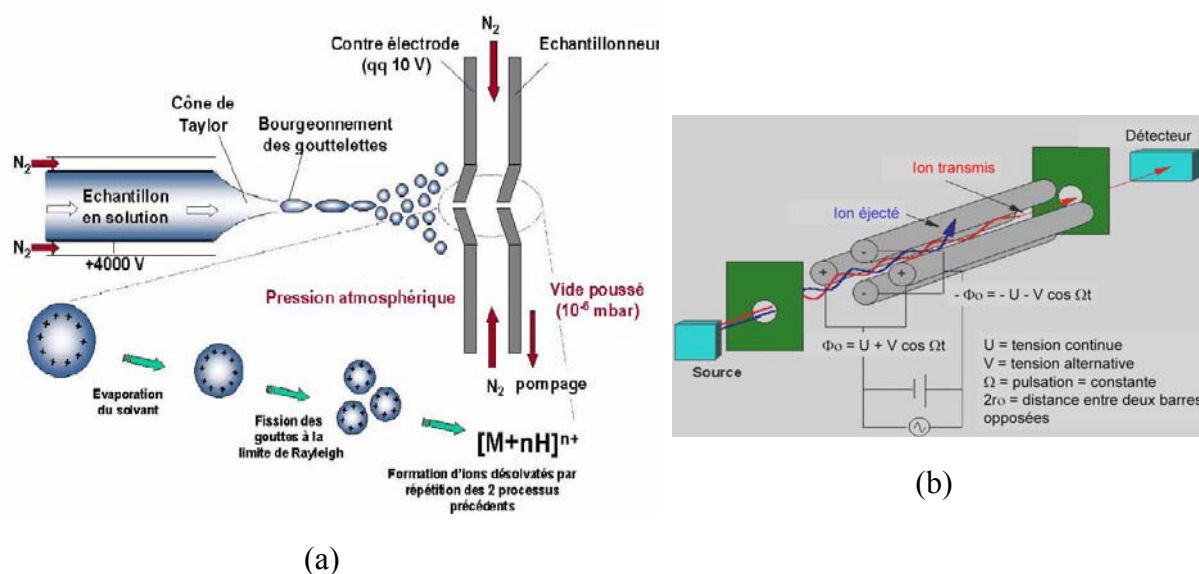


Figure II.5. schéma de principe d'une ionisation électrospray (a) et d'un analyseur quadripolaire (b) (14)

4.5.2. Protocole

Pour l'analyse des flavonoïdes et de leurs esters par CLHP-ESI-MS, la chromatographie a été exécutée sur un système Jasco 9xx, équipé d'un détecteur UV (Jasco UV-975), couplé à une plateforme II VG de spectromètre de masse équipée d'une source électrospray, couplée à un analyseur quadripolaire, fonctionnant dans des modes positif et négatif d'ionisation. La température de la source a été fixée à 80°C avec une tension de cône de 40 V . $10\ \mu\text{L}$

d'échantillon ont été injectés. La colonne (Apollo C18 (250×4.6 millimètre)) a été éluée avec du méthanol/eau (a)/(b): 0 minutes (40/60), 5min (100/0), 10 min (100/0) et 15 min (40/60). À l'extrémité de la colonne, l'écoulement a été dédoublé à 1/20, 95% a été envoyé vers le détecteur UV et 5% a été orienté sur le spectromètre de masse. Les données spectrométriques de masse ont été rassemblées en plein mode de balayage de 100 à 600 m/z , de 0 à 17 min. La figure II.6 montre un exemple de spectre de masse obtenu sur un mélange de produits d'acylation de la naringénine par du vinyle acétate et de PSL-C et la masse du produit majoritaire de la réaction obtenu après purification (naringénine 4'-acétate [$M-H^-$, m/z 313]).

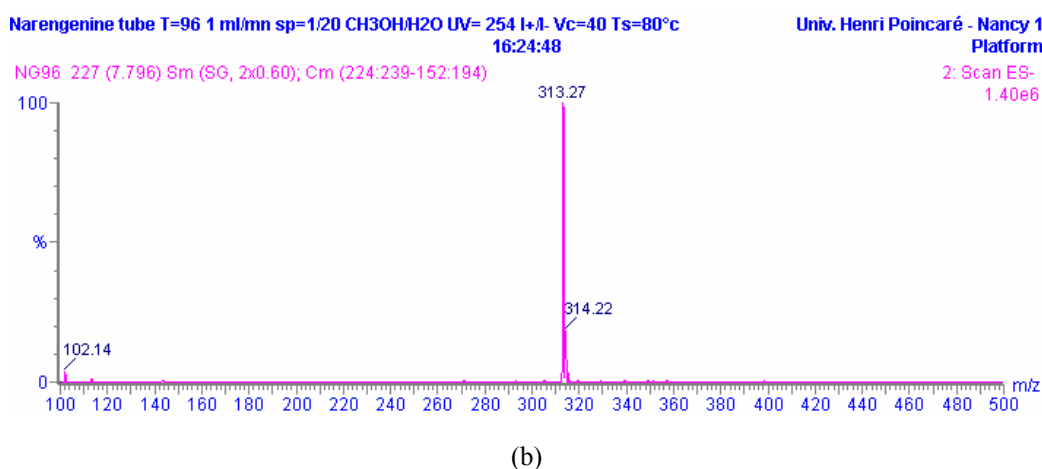
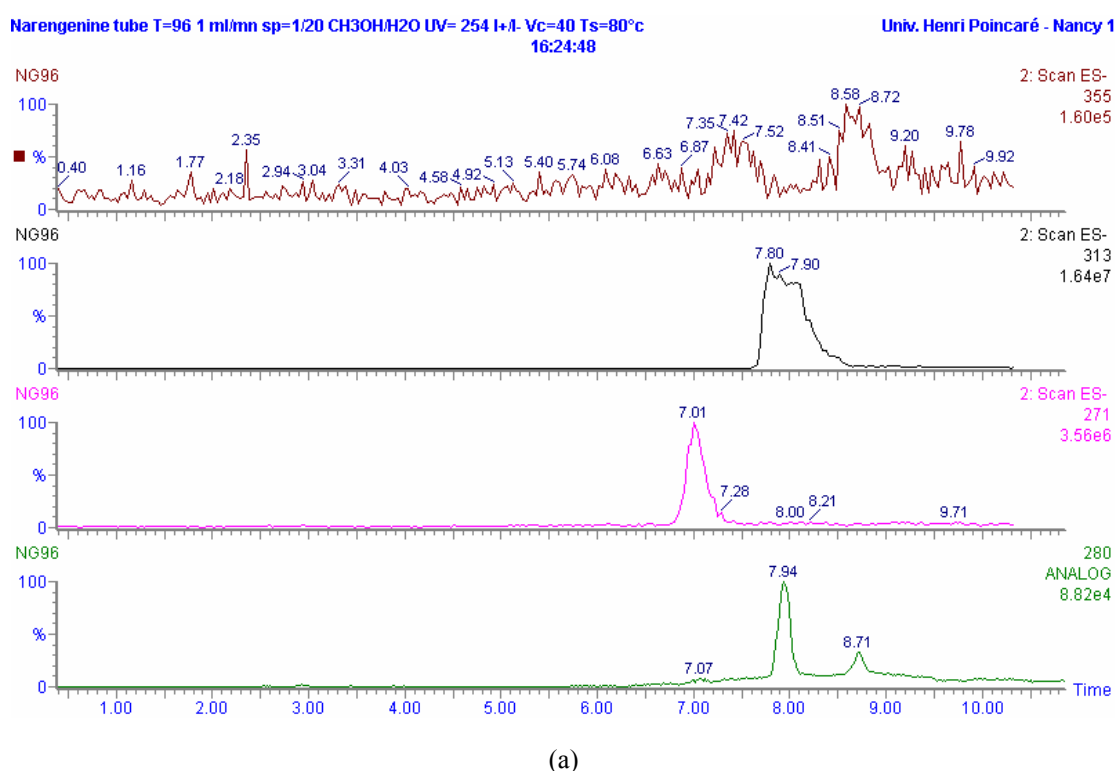


Figure II.6. spectre de masse du mélange réactionnel naringénine [$M-H^-$, m/z 271], naringénine 4'-acétate [$M-H^-$, m/z 313] et naringénine 4',7-diacétate [$M-H^-$, m/z 355] (a), masse du produit majoritaire purifié (b)

4.6. Caractérisation des structures par Résonance Magnétique Nucléaire

La spectroscopie RMN consiste en l'observation de transitions entre des niveaux d'énergie. La RMN doit permettre de suivre les transitions entre les deux niveaux magnétiques $m=+1/2$ et $m=-1/2$. La figure II.7 montre une représentation schématique d'un appareil de RMN.

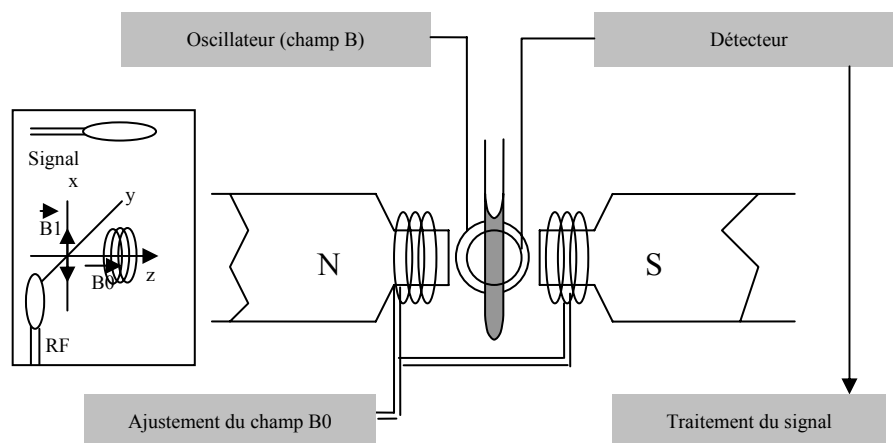
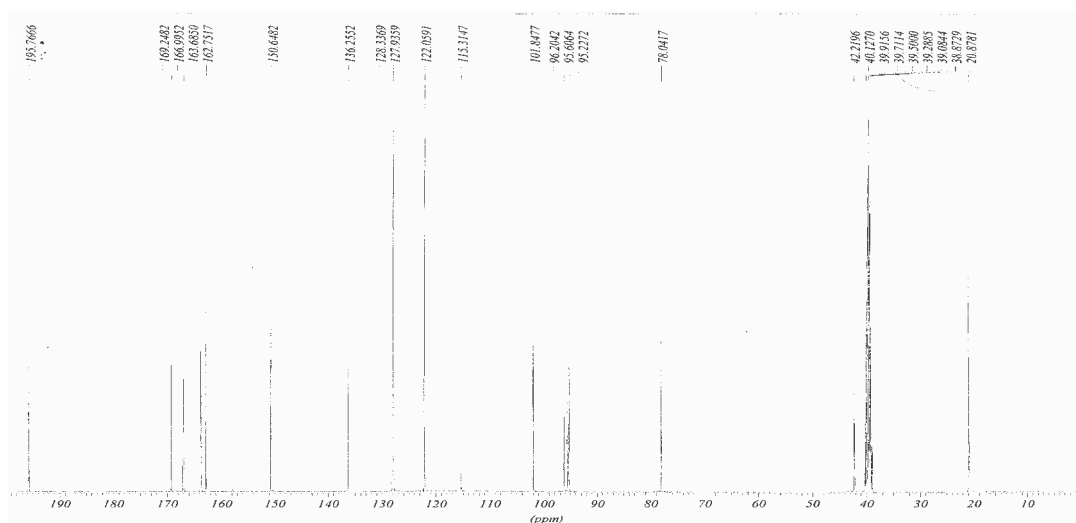


Figure II.7. représentation schématique d'un appareil de RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été effectués pour les substrats flavonoïdes et leurs esters dans du d_6 -DMSO sur un spectromètre Brücker AM 400 à 400 MHz et à 100 MHz respectivement.

La figure II.8 regroupe les spectres ^{13}C et ^1H de la naringénine 4'-acétate. La caractérisation détaillée des différents flavonoïdes et de leurs esters sera présentée dans la partie résultat (chapitre IV).



(a)

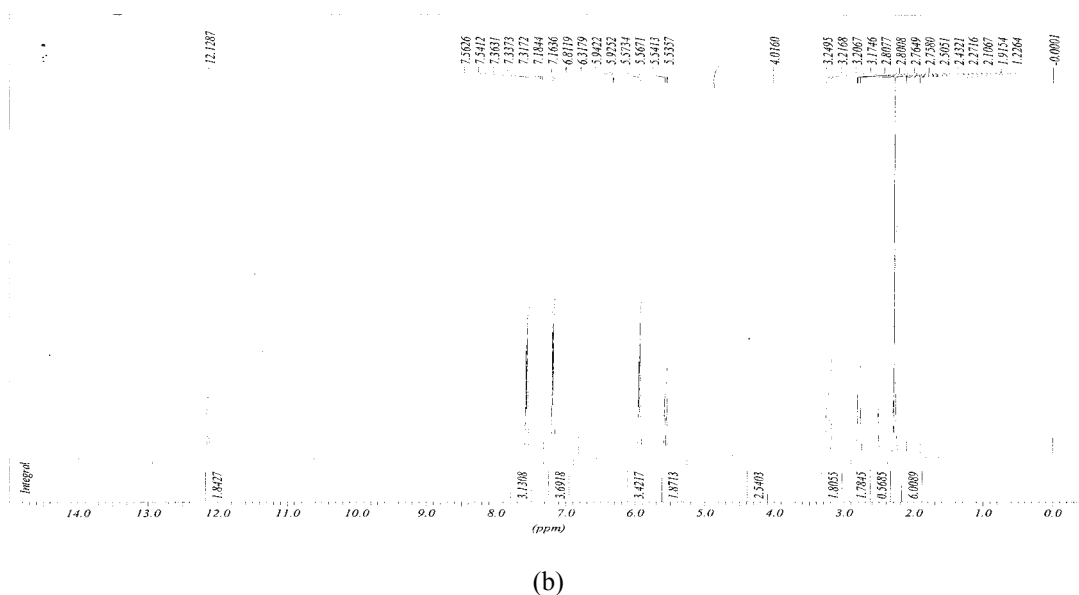


Figure II.8. spectre RMN ^{13}C (a) et ^1H (b) de la naringénine 4'-acétate

4.7. Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour Differential Scanning Calorimetry)

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une technique qui permet de détecter les effets thermiques liés à des transformations ou évolutions microstructurales. Le principe de la mesure consiste à déterminer la variation de l'enthalpie lorsque le matériau est soumis à une rampe de montée en température (isochrone) ou lors d'un recuit à une température donnée (isotherme). Lors d'une expérience de calorimétrie, le thermogramme obtenu correspond à la dérivée de l'enthalpie par rapport à la température c'est-à-dire à la chaleur spécifique en fonction de la température.

Un appareil DSC Perkin Elmer Pyris 1 a été utilisé pour déterminer la température de fusion (T_m), l'enthalpie de fusion (ΔH_f) et la capacité calorifique (C_p) de la quercétine, l'isoquercitrine, la rutine, la chryisine, la naringénine et l'hespéritine.

Les paramètres thermotropiques des échantillons des flavonoïdes (2-8 mg) ont été obtenus en augmentant la température de 25 à 400°C par pas de 10°C/min en présence d'azote. Pour chaque essai, deux capsules en aluminium sont placées dans l'appareil, l'une contenant l'échantillon à analyser et l'autre vide servant de référence. Pour chaque échantillon, l'essai a été répété au moins 3 fois.

5. ESTIMATION DE LA CAPACITE CALORIFIQUE (Cp)

En plus de la détermination expérimentale de la capacité calorifique des flavonoïdes à l'état solide (Cp^S), une estimation du Cp^L a été réalisée en se basant sur les modèles établis par Ruzicka et Domalski (1993) (15). En effet, selon Pappa *et al.* (2005) (16), pour les composés aromatiques, il est nécessaire de tenir compte de la valeur du ΔCp ($Cp^L - Cp^S$) afin de calculer l'activité du solide (a^s) :

$$a^s(T) = \exp \left[\frac{\Delta H_m^f}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left(\ln \frac{T_m}{T} - T_m / T + 1 \right) \right] \quad (\text{II.4})$$

L'expression II.8 a été utilisée par Ruzicka et Domalski (1993) (15) pour estimer le Cp^L . Nous avons défini, à partir de la base de données reportée par ces auteurs, les groupements qui forment la rutine, l'isoquercitrine, la quercétine, la chrysin, la naringénine et l'hésperitine (tableau II.7).

$$Cp^L = \left(\sum_i^k n_i \Delta c_i \right) R \quad (\text{II.8})$$

$$\Delta c_i = a_i + b_i \frac{T}{100} + d_i \left(\frac{T}{100} \right)^2 \quad (\text{II.9})$$

Où n_i est le nombre de répétition du groupement dans la molécule.

Δc_i est une valeur adimensionnelle des unités de type i.

k est le nombre total des groupements.

R est la constante des gaz parfaits.

a_i , b_i et d_i sont des paramètres ajustables dont les valeurs sont citées par Ruzicka et Domalski (1993) (15).

Tableau II.7. décomposition en sous groupes des flavonoïdes

Groupes	rutine	isoquercitrine	quercétine	chrysrine	naringénine	hespéritine
C _B -(H)	5	5	5	7	6	5
O-(H)(C _B)	4	4	4	2	3	3
C _B -(O)	5	5	5	3	3	4
C _{BF} -(C _{BF})(C _B) ₂	2	2	2	2	0	0
O-(C _B) ₂	1	1	1	1	1	1
CO-(C _B)(C)	1	1	1	1	1	1
C _B -(C _B)	2	2	1	2		
O-(C)(C _B)	1	1	0			
O-(H)(C)	6	4	1			
C-(C)(H) ₃	1	0				
C-(H)(C) ₂ (O) alcool	6	3				
C-(H)(C) ₂ (O) éther	2	1				
O-(C) ₂	3	1				
C-(H) ₂ (C)(O)	1	1				
C-(O) ₂ (H)(C)=C-(O) ₂ (C) ₂	2	1				
tertrahydropyrane	2	1				
C _B -(C)					1	1
C-(H) ₂ (C)(CO)					1	1
C-(O)(H)(C _B)(C)=C-(O)(H) ₂ (C _B)					1	1
C-(H) ₃ (O)						1
CB-(CB) ₂ (O)					1	1
CB-(CB) ₂ (CO)					1	1

6. MODELISATION MOLECULAIRE

Dans ce travail, la modélisation moléculaire a été utilisée pour étudier la conformation et les propriétés électroniques de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la naringénine, de la chrysrine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés.

Nous présentons dans ce paragraphe l'ensemble des méthodologies qui ont été utilisées au cours de cette étude (17).

6.1. Mécanique quantique

Nous décrivons ici les principes qui sont à la base des méthodes de la chimie quantique (computational chemistry). Un rappel des approximations couramment utilisées permet de comparer les méthodes entre elles et de mieux comprendre leurs limitations.

6.1.1. Bases

Les méthodes de la chimie quantique, basées sur les principes de la mécanique quantique, sont utilisées pour étudier les propriétés moléculaires dépendantes de la structure

électronique du système. Dans le cas d'un système non-relativiste et qui n'évolue pas dans le temps, chaque état de ce système est entièrement décrit par une fonction d'onde multi-particulaire Ψ , solution de l'équation de Schrödinger (18) :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (\text{II.10})$$

où \hat{H} est l'opérateur *hamiltonien* et E l'énergie du système.

Dans le cas général des systèmes d'intérêt chimique, qui sont le plus souvent polyatomiques et multi-électroniques, cette équation ne peut être résolue analytiquement. Des approximations ont donc été proposées.

L'approximation de Born et Oppenheimer (19) établit que la grande différence de masse et donc de vitesse qui existe entre noyaux et électrons implique que leurs mouvements peuvent être étudiés séparément. On peut alors considérer le comportement des électrons dans une molécule en supposant que les noyaux occupent les positions fixes dans l'espace. On aboutit alors à l'équation de l'équation de Schrödinger électronique :

$$\hat{H}_{\text{el}} \Psi_{\text{el}} = E_{\text{el}} \Psi_{\text{el}} \quad (\text{II.11})$$

Cet hamiltonien électronique comprend trois contributions ; la première est relative à l'énergie cinétique des électrons, la seconde à l'attraction entre noyaux et électrons et la dernière correspond à la répulsion coulombienne entre électrons. On écrit :

$$\hat{H}_{\text{el}} = - \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (\text{II.12})$$

où ∇_i est l'opérateur énergie cinétique correspondant à l'électron i , n désigne le nombre d'électrons du système, M est le nombre de noyaux, Z_A est le numéro atomique de l'atome A et r_{ij} est la distance entre les électrons i et j .

L'hamiltonien du système s'obtient en ajoutant à l'hamiltonien électronique le terme de répulsion entre noyaux \hat{U}_{NN} :

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{el}} + \hat{U}_{\text{NN}} \quad (\text{II.13})$$

où

$$\hat{U}_{\text{NN}} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{II.14})$$

Et R_{AB} désigne la distance entre les noyaux A et B.

Ce dernier terme peut être considéré comme constant. En conséquence, on peut écrire :

$$E = E_{\text{el}} + \hat{U}_{\text{NN}} \quad (\text{II.15})$$

On peut exprimer l'hamiltonien électronique sous la forme de deux contributions ; un opérateur de cœur \hat{H}^c et un opérateur de répulsion inter-électronique :

$$\hat{H}_{\text{el}} = \hat{H}^c + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (\text{II.16})$$

avec:

$$\hat{H}^c = - \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_{N_i} \quad (\text{II.17})$$

où i et j se rapportent à 2 électrons du système et où V_{N_i} est l'opérateur associé à l'interaction attractive noyaux-électrons.

Dans l'approximation orbitale, la fonction d'onde électronique Ψ_{el} définie ci-dessus est représentée par un *déterminant de Slater* (20, 21), construit à partir de fonctions monoélectroniques produits d'une orbitale spatiale et d'une fonction de spin : les spinorbitales χ . Une telle fonction a l'avantage de vérifier le principe d'exclusion de Pauli (22).

L'opérateur \hat{H}^c est une somme de termes monoélectroniques. L'énergie a pour expression :

$$E = \langle \Psi_{\text{el}} | \hat{H}_{\text{el}} | \Psi_{\text{el}} \rangle = \sum_{k=1}^n H_k^c + \sum_{k=1}^n \sum_{l<k}^n (J_{kl} - K_{kl}) \quad (\text{II.18})$$

où Ψ est la fonction d'onde multiélectronique (n électrons) dont le déterminant de Slater est construit à partir de n spinorbitales.

Les méthodes dites du champ auto-cohérent ou SCF (Self Consistent Field) utilisent le principe variationnel pour résoudre l'équation II.18. Le meilleur ensemble de spinorbitales est celui qui minimise l'énergie, tout en vérifiant le principe d'orthonormalité des autres spinorbitales. Cette approche mène à la définition de *l'opérateur, ou hamiltonien, de Hartree-Fock* qui vérifie la relation :

$$F(1) = \hat{H}^c(1) + \sum_{i=1}^N [J_i(1) - K_i(1)] \quad (\text{II.19})$$

où $H^c(1)$ est l'hamiltonien de cœur relatif à un électron, $J_i(1)$ et $K_i(1)$ sont respectivement les opérateurs coulombien et d'échange.

Les équations de Hartree-Fock (23, 24)

$$F\chi_k = \epsilon_k \chi_k \quad (\text{II.20})$$

définissent un ensemble de fonctions permettant de construire un déterminant de Slater qui approche le mieux la fonction d'onde multiélectronique du système étudié. En pratique, pour résoudre ces équations, il faut connaître les spinorbitales solution de l'équation II.20 et qui définissent les opérateurs J et K. C'est donc un processus itératif avec une estimation initiale de la matrice de densité, jusqu'à ce que le système ait atteint sa cohérence interne, d'où le nom de *méthode du champ auto-cohérent*.

L'application de l'approximation LCAO (Linear Combination of Atomic Orbital) aux fonctions propres de l'opérateur de Hartree-Fock mène aux équations de Roothan (25)

$$FC = SCE \quad (\text{II.21})$$

où F est la matrice de Fock, C est la matrice des coefficients des orbitales atomiques dans les orbitales moléculaires, S est la matrice de recouvrement des orbitales atomiques et E est la matrice diagonale des énergies.

6.1.2. Les méthodes *ab-initio*

Les méthodes *ab-initio* résolvent exactement l'équation II.21 dans une base d'orbitales atomiques donnée. Alors que les éléments de la matrice de cœur H^c se calculent aisément, le nombre des intégrales multicentriques (qui croît comme la puissance 4 du nombre d'orbitales atomiques) et leur forme mathématique posent des problèmes délicats, notamment en termes de temps de calcul.

Les orbitales atomiques sont développées sur des fonctions Gaussienne ($e^{-\alpha r^2}$) plutôt que sur des Slater ($e^{-\zeta r}$), ce qui rend leur calcul plus aisé. Plus le choix des fonctions de base est judicieux et plus leur nombre est grand, plus le calcul est exact.

Avec une station de travail moyenne, on traite, en un temps raisonnable, des systèmes contenant au maximum une vingtaine d'atomes lourds. Ce nombre varie évidemment avec le type de base utilisé et les caractéristiques de l'ordinateur.

6.1.3. La théorie de la fonctionnelle de densité DFT

La théorie de la fonctionnelle de la densité est basée sur le théorème Hohenberg-Kohn (26) qui établit que l'énergie d'un système dans son état fondamental est une fonctionnelle de la densité électronique de ce système, $\rho(r)$, et que toute densité, $\rho'(r)$, autre que la densité réelle conduit nécessairement à une énergie supérieure. Ainsi contrairement aux méthodes précédentes, la théorie de la fonctionnelle de la densité ne consiste pas à chercher une fonction d'onde complexe, ψ , à $3N$ -dimensions décrivant le système à étudier, mais plutôt une simple fonction à trois dimensions : la densité électronique totale ρ (27).

Il existe trois types de fonctionnelles énergies d'échange-corrélation : les fonctionnelles locales, les fonctionnelles à correction du gradient et les fonctionnelles hybrides. Parmi ces dernières la fonctionnelle hybride B3LYP que nous avons utilisée dans ce travail.

6.1.4. Les méthodes semi-empiriques

Les méthodes semi-empiriques négligent un grand nombre des intégrales multicentriques du terme de répulsion électroniques. Cette réduction du nombre d'intégrale à calculer permet d'utiliser des fonctions de base de Slater pour développer les orbitales atomiques. En outre, seules les orbitales atomiques de la couche de valence sont utilisées.

Les intégrales de recouvrement sont négligées dans la procédure SCF, ainsi que toutes les intégrales biélectroniques à trois ou quatre centres. Suivant la méthode de calcul utilisée, certaines intégrales biélectroniques sont également négligées.

Parmi les méthodes semi-empiriques existantes, nous pouvons citer les méthodes de type NDDO (28) (Neglect of Diatomic Differential Overlap) comme AM1 (29) ou PM3 (30, 31), dans lesquelles toutes les intégrales faisant intervenir le recouvrement différentiel de deux orbitales centrées sur deux atomes différents sont négligées, ou encore la méthode CNDO (32) (Complete Neglect of Differential Overlap) dans laquelle les recouvrements différentiels sont complètement négligés.

Au coût d'une précision moindre, les méthodes semi-empiriques permettent le traitement quantique des systèmes dont la taille est importante. Dans cette approximation on peut également envisager de mener des études nécessitant la répétition d'un grand nombre de calculs quantiques.

6.1.5. Prise en compte de l'effet de solvant

Dans ce travail le modèle type « continuum » a été utilisé pour modéliser dans les calculs quantiques l'effet de solvant sur la quercétine.

Les modèles type « continuum » impliquent toute sorte de cavité contenant le soluté, et le solvant se trouvant en-dehors est traité comme milieu continu, caractérisé par quelques une seulement des ses propriétés comme sa constante diélectrique (ϵ). Le champ électrique produit par les particules chargées comprenant le soluté interagit alors avec ce milieu, produisant une polarisation, ce qui se reflète sur les fonctions d'onde du soluté.

La méthode que nous avons utilisée, dénommée « Polarizable Continuum Model » (PCM) et implémentée dans le programme *Gaussian*, place le soluté dans une cavité formée par l'union de sphères centrées sur chaque atome et le potentiel électrostatique du soluté est décrit par la production d'une charge apparente (de surface) sur la surface de la cavité, ce qui implique un plus grand réalisme pour l'interaction électrostatique (figure II.9). Le traitement par ordinateur divise la surface en petits morceaux sur lesquels la charge (et sa contribution au gradient) est évaluée. La taille des sphères a un volume équivalent à environ 1.2 fois le rayon de van der Waals.

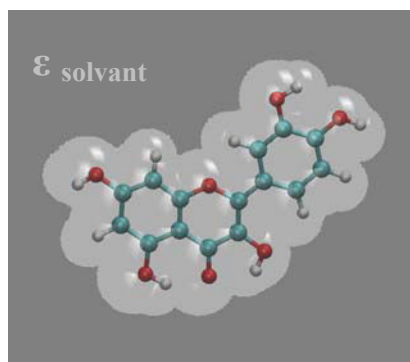


Figure II.9. représentation schématique de la méthode PCM

6.2. Mécanique moléculaire

Les méthodes de la mécanique moléculaire permettent le calcul de propriétés structurales et thermodynamiques de systèmes moléculaires comportant jusqu'à plusieurs milliers d'atomes. Les électrons n'y sont pas traités explicitement comme dans un calcul de mécanique quantique, mais les atomes y sont représentés par des masses ponctuelles chargées reliées les unes aux autres par des ressorts.

Contrairement à la mécanique quantique, l'énergie des systèmes moléculaires ne provient pas de la résolution de l'équation de Schrödinger, mais est décrite par les fonctions empiriques auxquelles sont associés des paramètres dérivant de l'expérience ou de calculs précis quanto-chimiques. Le « champ de force » établi par cette méthode représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire.

L'énergie de la molécule est exprimée sous la forme d'une somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence :

$$E = \overbrace{E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dièdre}}}^{E_{\text{intramoléculaire}}} + \overbrace{E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{électrostatique}}}^{E_{\text{intermoléculaire}}} \quad (\text{II. 22})$$

Les variables du calcul sont les coordonnées internes du système : longueurs de liaisons, angles de valence, angles dièdres, ainsi que les distances entre atomes non liés dont les interactions sont représentées par un potentiel de van der Waals et un potentiel électrostatique le plus souvent de type Coulombien.

Habituellement, on distingue dans l'équation de l'énergie du champ de force les termes intramoléculaires concernant les atomes *liés* chimiquement (liaisons, angle, dièdres, *etc.*) des termes intermoléculaires concernant les interactions entre les atomes *non-liés* chimiquement (électrostatiques, van der Waals, *etc.*)

De nombreux champs de force existent, certains sont calibrés pour reproduire les propriétés de systèmes biologiques (CHARMM, AMBER, CVFF, ...), d'autres sont adaptés à de petites molécules organiques en phase condensée (OPLS, MM2, MM3, ...).

Les champs de force diffèrent notamment par la fonction mathématique et les paramètres.

Dans ce travail, nous avons utilisé le champ de force OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations) (33, 34) dont nous allons maintenant présenter les contributions individuelles.

La forme du potentiel OPLS (33) que nous avons utilisé est:

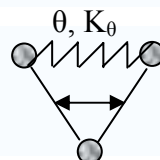
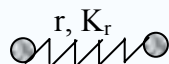
(a) Longueurs de liaison et angles de valence

En général, aux températures ordinaires et en l'absence de réaction chimique, les déformations des liaisons et des angles de valence sont faibles et peuvent donc être exprimés sous la forme d'un potentiel harmonique (loi de Hooke). C'est ainsi que sont décrits les termes E_r et E_θ dans le champ de force OPLS.

Les paramètres r_{eq} et θ_{eq} représentent respectivement les valeurs de référence de longueurs de liaison et d'angles de valence ; K_r et K_θ sont les constantes de force et varient respectivement avec la nature de la liaison ou de l'angle.

$$E_{liaisons} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_{eq})^2$$

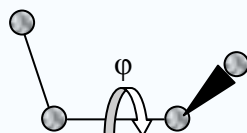
$$E_{angles} = \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2$$



(b) Torsion et dièdres impropres

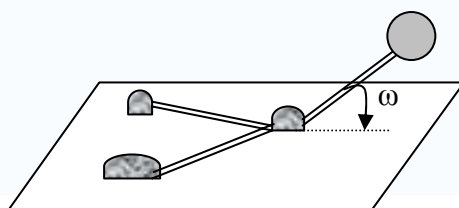
L'introduction d'un terme de torsion garantit la bonne représentation de la rotation de groupements autour d'une liaison donnée. Le potentiel harmonique ne peut pas être utilisé dans ce cas puisque les déformations sont souvent importantes et périodiques. Un développement en série de Fourier est utilisé. Selon la périodicité, une combinaison de plusieurs termes sera utilisée. V_1^i , V_2^i et V_3^i sont les coefficients de la série de Fourier.

$$E_{dièdre} = \sum_i \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\varphi_i)] + \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\varphi_i)] + \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\varphi_i)]$$



La contribution des dièdres impropres (ω), qui représentent les déformations (généralement faibles) hors du plan d'atomes de carbone hybridés sp^2 par exemple, est représentée par un potentiel harmonique. Si B, C et D sont trois atomes liés à un même quatrième A, l'écart à la planéité de A est caractérisé par l'angle ω formé par les plans ABC et BCD.

$$E_{impropres} = \sum_{impropres} K (\omega - \omega_0)^2$$



(c) Interactions de van der Waals et électrostatiques

$$E_{\text{van der Waals+électrostatiques}} = \sum_i^{\text{sur } a} \sum_j^{\text{sur } b} \left[q_i q_j e^2 / r_{ij} + 4\varepsilon_{ij} \left(\sigma_{ij}^{12} / r_{ij}^{12} - \sigma_{ij}^6 / r_{ij}^6 \right) \right] f_{ij}$$

Le champ de force OPLS utilise un potentiel de Lennard-Jones (35), couramment appelé potentiel 6-12, pour décrire les interactions de van der Waals. Ce potentiel contient deux paramètres ajustables : le diamètre de collision σ (séparation pour laquelle l'énergie est égale à 0) et la profondeur ε (figure II.10).

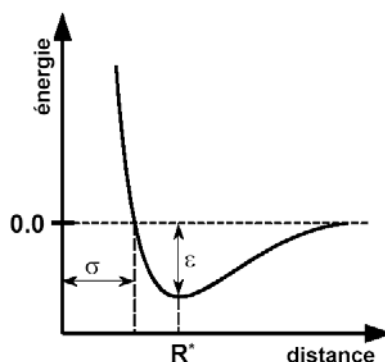


Figure II.10. modèle (ε , R^*) des paramètres de van der Waals pour une molécule diatomique de type X-X. Energie d'interaction en fonction de la distance de séparation entre les deux atomes.

L'énergie de van der Waals entre 2 atomes i, j distants de r_{ij} est représentée par :

- une contribution attractive variant en $-(1/r_{ij})^6$. Cette fonction représente l'énergie de dispersion de LONDON.
- une contribution répulsive variant en $(1/r_{ij})^{12}$, traduisant le recouvrement des nuages électroniques à courtes distances, due à l'exclusion de PAULI.

Les paramètres σ_{ij} et ε_{ij} sont déterminés à partir de ceux des atomes « purs » via des règles de combinaisons appropriées. Pour OPLS, on utilise les règles de Lorentz-Berthelot :

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_{ii} + \sigma_{jj})$$

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj}}$$

OPLS utilise un potentiel Coulombien simple. L'énergie électrostatique entre 2 atomes ij de charges q_i et q_j est représentée par la loi de Coulomb. La constante diélectrique prend en général des valeurs de 2 à 4.

Plusieurs approches de dérivation de charges partielles existent, par exemple celle de MULLIKEN ou celle des charges à partir du potentiel électrostatique (ESP, RESP).

L'estimation des charges atomiques provient de leur dérivation à partir d'une fonction d'onde pour mieux reproduire le potentiel électrostatique (ESP) calculé sur un nombre important de points autour de la molécule.

Dans le cas de OPLS, une version modifiée de la méthode ESP a été utilisée, il s'agit de la méthode RESP (restrained electrostatic potential fit). Cette méthode utilise des contraintes hyperboliques sur les atomes autres que l'hydrogène. Ces contraintes ont un effet réducteur de la charge sur les atomes, particulièrement les carbones sp^3 . Les charges RESP varient peu avec la conformation de la molécule (17).

Les interactions d'atomes *non liées* chimiquement sont considérées uniquement pour les paires d'atomes intramoléculaires séparés par 3 ou plusieurs liaisons. Il est nécessaire d'équilibrer les interactions 1,4 *non liées* pour pouvoir utiliser les mêmes paramètres pour les interactions inter- et intramoléculaires. Un facteur de correction $f_{ij}=1/2$ pour les interactions coulombiennes et de Lennard-Jones est utilisé dans le cas du champ de force OPLS.

6.3. Méthodes d'analyse des surfaces d'énergie potentielle

Jusque-là, il a été question de différentes méthodologies permettant d'évaluer l'énergie potentielle d'un système moléculaire pour une géométrie donnée (*i. e.* pour une certaine position de noyaux). Si l'un ou plusieurs noyaux changent de position, alors l'énergie du système varie. Ces changements dans l'énergie d'un système peuvent être considérés comme des mouvements sur une surface multidimensionnelle appelée *surface d'énergie potentielle*. C'est par l'étude de cette hypersurface qu'il est possible d'accéder aux différentes propriétés physico-chimiques d'un système moléculaire.

6.3.1. Optimisation de géométries

Une des étapes importantes dans l'analyse d'une surface d'énergie potentielle est la caractérisation des minima de cette surface. Le minimum le plus bas en énergie correspond au *minimum global* de la fonction potentielle. Les géométries associées aux minima sont les structures stables du système. Le plus haut point reliant deux minima d'une surface d'énergie potentielle est appelé *état de transition*. Les minima sont des points où toutes les dérivées secondes de l'énergie par rapport aux coordonnées atomiques sont positives. Pour déterminer les géométries correspondantes, il faut utiliser un algorithme de minimisation. De nombreux types de méthodes d'optimisation concernant ce problème existent dans la littérature (la plus grande pente, gradients conjugués,...). Les algorithmes de minimisation d'une fonction continue à plusieurs variables se répartissent en deux catégories selon qu'ils utilisent ou non les dérivées de l'énergie par rapport aux coordonnées atomiques. La plupart de ces algorithmes, appliqués à la fonction énergie potentielle, permettent seulement d'atteindre le minimum le plus proche de la structure initiale.

6.3.2. La dynamique moléculaire

(a) Principes

L'étude des minima de la fonction potentielle permet d'accéder à des propriétés statiques du système moléculaire. Pour accéder aux propriétés dynamiques, il faut faire appel aux équations de la dynamique moléculaire. Cette dernière est dite *déterministe*, ce qui signifie que tout état du système à un temps t peut être prédit à partir d'un état initial connu à temps t_0 . Pour étudier les propriétés dynamiques d'un système moléculaire évoluant dans le temps, il faut explorer l'espace des configurations.

Les configurations successives du système moléculaire sont obtenues en intégrant les équations classiques du mouvement de Newton :

$$f_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (\text{II.23})$$

Cette équation décrit le mouvement d'une particule de masse m_i de coordonnées $r_i(t)$ qui subit une force f_i . Les ensembles thermodynamiques générés sont le plus souvent de type NVE (ensemble microcanonique), NVT (ensemble canonique) ou NPT (ensemble isobare-isotherme). Chacune de ces trois lettres caractérise une grandeur conservée au cours de la

simulation ; N désigne le nombre de particules, E l'énergie du système, T sa température et P sa pression.

La première simulation de dynamique moléculaire d'une phase condensée a été faite par Alder et Wainwright en 1957 (36) pour un modèle de sphère dure. Les modèles les plus réalistes décrivant les interactions intermoléculaires sont basés sur des fonctions potentielles continues.

Lors d'un pas d'intégration (δt) de dynamique moléculaire, la force agissant sur chaque atome i au temps t est évaluée par dérivation de l'énergie potentielle par rapport aux coordonnées atomiques r_i , puis les coordonnées et les vitesses des atomes au temps $t + \delta t$ sont calculées par intégration numérique sur l'intervalle δt de l'équation II.23. Ces étapes sont répétées à chaque pas d'intégration.

Outre la taille du système, un des facteurs limitants de la dynamique moléculaire est le pas de temps que l'on peut utiliser pour intégrer les équations de mouvement. Il doit être environ 10 fois moins grand que le mouvement le plus rapide du système (par exemple pour un système contenant des liaisons C-H dont la fréquence de vibration est de l'ordre de 10 fs, il faudra utiliser 1 fs). De ce fait les simulations de dynamique moléculaires sont limitées à des échelles de temps allant au maximum à quelques centaines de nanosecondes.

(b) Mise en oeuvre

Considérons un ensemble de N particules dont on souhaite étudier la dynamique dans l'ensemble microcanonique. Ce système est placé dans une boîte cubique (ce choix n'est pas unique et d'autres types de boîtes peuvent être utilisés) et la position des particules associées à un jeu de vitesse définit l'état initial de ce système. Cette boîte initiale est répliquée dans toutes les directions de l'espace de manière à simuler un milieu infini. Cette technique, appelée *conditions périodiques aux limites*, conduit à un système composé d'une infinité de cubes images les uns des autres. Si une particule quitte la boîte initiale durant la simulation, elle est immédiatement remplacée par une particule image qui rentre par le côté opposé, comme le montre la figure II.11 pour un système à deux dimensions.

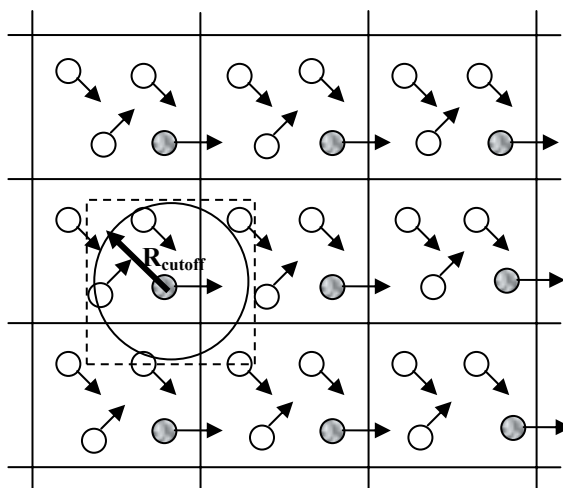


Figure II.11. conditions périodiques aux limites pour un système à deux dimensions

La partie la plus coûteuse en terme de calcul dans une simulation de dynamique moléculaire est l'évaluation des forces agissant sur chacune des particules du système. Le problème résulte principalement du nombre d'interactions entre atomes non liés qui, dans le cas d'un potentiel additif de paires, croît comme le carré du nombre de particules. Une des méthodes les plus populaires pour réduire le nombre de ces interactions est l'utilisation d'un rayon de troncature sphérique (R_{cutoff}). Les interactions entre deux particules séparées par une distance supérieure à R_{cutoff} sont considérées comme nulles. La convention de l'image minimum est appliquée et chaque particule i va interagir avec les images les plus proches de toutes les autres particules contenues dans la sphère de R_{cutoff} centrée sur la particule i .

Dans un certain nombre de cas, cette approximation n'est pas suffisante (discontinuité de l'énergie potentielle, portée importante des interactions électrostatiques,...). Des méthodes plus sophistiquées sont mises en œuvre pour traiter des interactions électrostatiques à longues distances. On peut citer les méthodes « *Fast Multipoles* » (37) ou bien encore les méthodes de somme de réseaux comme l'approche d'Ewald (38) largement utilisée. Dans cette approche, l'énergie électrostatique contient l'énergie d'interaction d'une particule avec toutes les autres particules de la boîte de simulation et avec toutes les images, et ce sans considération d'un rayon de coupure.

(c) Quelques propriétés accessibles à partir des simulations

Parmi les propriétés statiques qu'il est possible d'extraire des trajectoires générées au cours de simulations de dynamique moléculaire, les grandeurs structurales sont

particulièrement intéressantes, dans la mesure où elles rendent compte de l'ordre local du système moléculaire. Les fonctions de distribution radiale (RDF), $g(r)$, indiquent la probabilité de trouver une paire d'atomes séparés par une distance r , par rapport à la probabilité attendue pour une distribution totalement aléatoire à la même densité (39).

Pour une paire d'atomes, la fonction de distribution radiale peut être facilement évaluée par la relation II.24.

$$g_{ij}(r) = \frac{\langle n_j(r + \delta r) \rangle}{4\pi\rho_j \int r^2 dr} \quad \text{II.24}$$

$\langle n_j(r + \delta r) \rangle$ correspond au nombre moyen de sites j , dont la distance à i est comprise entre r et $r + \delta r$; ρ_j est la densité moyenne de sites j dans l'échantillon considéré.

6.3.3. Analyse conformationnelle par recherche systématique

Si le système moléculaire contient seulement un petit nombre de degré de liberté tel que la quercétine, et si la fonction de l'énergie potentielle n'a pas trop de minima, on peut explorer d'une manière extensive l'espace conformationnel.

La démarche la plus simple consiste à réaliser une *rotation rigide* autour de la liaison ciblée c'est-à-dire de tracer la courbe $E = f(\Phi)$, Φ étant l'angle dièdre permettant de décrire les conformations autour de la liaison. Une rotation rigide ne fait intervenir que l'angle dièdre; on garde fixe toutes les autres coordonnées internes de la molécule. Cette technique permet de déterminer grossièrement la position des minima et maxima.

On peut aussi réaliser une *rotation non rigide*: on fixe l'angle dièdre et on optimise toutes les autres variables. On réalise ceci en imposant une contrainte sur l'angle de torsion en rajoutant dans le calcul de l'énergie un terme dit de contrainte de la forme $E_c = k_c (\Phi - \Phi_0)^2$ dans laquelle Φ_0 prend la valeur de l'angle que l'on désire atteindre et la constante de force de contrainte k_c est choisie arbitrairement très grande pour imposer la contrainte.

6.4. Descripteurs moléculaires

Dans la littérature, plusieurs descripteurs ont été rapportés pour essayer de retrouver des corrélations descripteurs-propriétés biologiques (II.25). Dans ces approches, la structure tridimensionnelle optimisée des molécules étudiées doit être déterminée au préalable.

$$P = P_0 + \alpha_1 D_1 + \alpha_2 D_2 + \alpha_3 D_3 + \dots \quad \text{(II.25)}$$

où P est la propriété étudiée, variable dépendante

D_i est le descripteur, variable indépendante

α_i mesure le poids de chaque descripteur qui rentre dans la relation.

Il existe différentes classes de descripteurs moléculaires théoriques tels que les descripteurs structuraux, énergétiques, électroniques, stériques et hydrophobiques.

Les descripteurs moléculaires les plus étudiés, qui peuvent être corrélés aux propriétés des flavonoïdes et qui sont calculés par le module QSAR du logiciel HyperChem, sont les suivants :

- E_{HOMO} : énergie de l'orbitale moléculaire la plus haute occupée
- E_{LUMO} : énergie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante
- E_g : différence entre E_{HOMO} et E_{LUMO}
- χ : électronégativité (eV) = $0,5 (-E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}})$
- μ : moment dipolaire (D) (calculé à partir des charges partielles)
- POL : polarisabilité moléculaire (a.u.) (estimée à partir d'un schéma d'additivité (40)
- A : aire superficielle (\AA^2) (approximée par la méthode de grille développée par Still *et coll.* (41, 42))
- VOL : volume moléculaire (\AA^3) (approximé de la même manière que A)
- Log P : coefficient de partition octanol/eau (estimé par la méthode de contribution de groupe développée par Ghose *et coll.* (1)
- QOn : charge partielle sur l'oxygène n (calculée par un modèle empirique basé sur l'approche de l'égalisation partielle de l'électronégativité de l'orbitale (Partial Equalization of orbital Electronegativity, PEOE) de Gasteiger et Marsili (43)
- $\Delta\Delta H$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical phenoxy et la molécule parent (kcal/mol)
- IP : potentiel d'ionisation, variation d'enthalpie entre le radical cation ($\text{ArOH}^{\bullet+}$) et la molécule parent (ArOH) (kcal/mol).

REFERENCES

1. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. N.; Robins, R. K., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, 29, 163.
2. Enaud, E.; Humeau, C.; Piffaut, B.; Girardin, M., Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, 27, (1), 1-6.
3. Danieli, B.; De Bellis, P.; Carrea, G.; Riva, S., Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1837-1844.
4. Riva, S.; Danieli, B.; Luisetti, M., A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, (6), 618-621.
5. Patti, A.; Piatelli, M.; Nicolosi, G., Use of Muor miehei lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, 10, 577-582.
6. Gao, C.; Mayon, O.; MacManus, D. A.; Vulfson, E. N., Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnology and bioengineering* **2001**, 71, (3), 235-243.
7. Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N., Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Europ. J. Lip. Sci. Technol* **2001**, 103, 655-660.
8. Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N., Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 21, (1-2), 59-62.
9. Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Engasser, J. M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M., Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatalysis and biotransformation* **2004**, 22, (4), 253-259.
10. Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Engasser, J.-M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M., Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, 29, (1-6), 63-67.
11. Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; Engasser, J. M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M., Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology* **2004**, 110, (3), 265-272.
12. Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H., Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* **2005**, 116, (3), 295-304.
13. Katsoura, M. H.; Polydera, A. C.; Tsironis, L.; Tselepis, A. D.; Stamatis, H., Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof.
14. Gaskell, S. J., Electrospray: Principles and Practices. *J. Mass Spectrom* **1997**, 32, 677-688.
15. Ruzicka, J., V.; Domalski, E. S., *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, 22, (3), 619-657.
16. Pappa, G. D.; Voutsas, E. C.; Magoulas, K.; Tassios, D. P., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 44, (10), 3799-3806.
17. Leach, A. R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Addison Wesley LongMan Limited: Essex, 1996; p 585.
18. Schrödinger, E., *E. Ann. Phys* **1926**, (79), 361.

19. Born, M.; Oppenheimer, J. R., *Ann. Physik* **1927**, 84, 457.
20. Slater, J. C., The theory of complex spectra. *Phys. Rev.* **1929**, 34, 1293.
21. Slater, J. C., *Quantum Theory of Molecules and Solids*. McGraw Hill: New York, 1974; Vol. 4.
22. Pauli, W., Relation between the closing in on electron-group and the structure of complexes in the spectrum. *Z. Physik* **1925**, 31, 765.
23. Fock, V., *Z. Physik* **1928**, 61, 161.
24. Hartree, D. R., *Proc. Camb. Phil. Soc.* **1928**, 24, 89.
25. Roothan, C. C., New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 6989.
26. Hohenberg, P.; Kohn, W., *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864-b871.
27. Kohn, W., *Phys. Chem.* **1996**, 100, 12974.
28. Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A., Approximate Self-consistent Molecular orbital Theory I. Invariant Procedures. *J. Chem. Phys* **1965**, 43, 5129-5135.
29. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P., AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909.
30. Stewart, J. J. P., Optimisation of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J. Comput. Chem* **1989**, 10, 221-264.
31. Stewart, J. J. P., Optimisation of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comput. Chem* **1989**, 10, 209-220.
32. Pople, J. A.; Segal, G. A., Approximate Self-consistent Molecular Orbital Theory III. CNDO Results for AB2 and AB3. *J. Chem. Phys* **1966**, 44, 3289-3296.
33. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J., Development and Testing of OPLS ALL-Atom Force Field On Conformational Energetics and Properties Of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11225-11236.
34. Price, M. L. P.; Ostrovsky, D.; Jorgensen, W. L., Gas-Phase and Liquid-State Properties of Esters, Nitriles, and Nitro Compounds with the OPLS-AA Force Field. *J. Comput. Chem* **2001**, 22, (13), 1340-1352.
35. Lennard-Jones, J. E., Cohesion. *Proceedings of the Physical Society* **1931**, 43, 461-482.
36. Alder, T. E.; Wainwright, E., Phase transition for a hard sphere system. *J. Chem. Phys* **1957**, 27, 1208-1209.
37. Greengard L.; Roklin, V. I., A Fast Algorithm for Particule Simulations. *J. Computational Physics* **1987**, 73, 325-348.
38. Ewald, P., Due Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Physik* **1921**, 64, 253-287.
39. Allen, M. P.; Tildesley, D. J., *Computer Simulation of liquids*. Clarendon Press: Oxford, 1987.
40. Miller, K. J., *J. Am. Chem. Soc* **1990**, 112, 8533.
41. Hasel, W.; Hendrickson, T. F.; Still, W. C., *Tet. Comput. Meth* **1988**, 1, 103-116.
42. Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T., *J. Am. Chem. Soc* **1990**, 112, 6127-6129.
43. Gasteiger J.; Marsili, M., *Tetrahedron* **1980**, 36, 3219-3288.

CHAPITRE III

*ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ DES
FLAVONOÏDES*

CHAPITRE III. ETUDE DE LA SOLUBILITE DES

FLAVONOÏDES

INTRODUCTION

La solubilité des substrats peut affecter les performances de la réaction d'acylation en limitant la quantité de substrat disponible dans le milieu. Ce facteur est d'autant plus important que les flavonoïdes sont connus pour leur faible solubilité dans les milieux aqueux et certains solvants organiques.

Plusieurs paramètres peuvent affecter la solubilité : la température, la structure et la taille de la molécule, la polarité du solvant et du soluté, les propriétés thermophysiques, les interactions soluté-solvant (liaisons hydrogènes, forces dispersives, forces dipolaires), la solvation, *etc.*

Ainsi, il nous a donc paru nécessaire de :

- déterminer, expérimentalement, de la solubilité de six flavonoïdes dans trois solvants (acétone, acétonitrile et *tert*-amyl alcool).
- mesurer et estimer quelques grandeurs thermophysiques des flavonoïdes (température de fusion, enthalpie de fusion, capacité calorifique, coefficient d'activité).
- analyser la structure conformationnelle des flavonoïdes par modélisation moléculaire.
- déterminer d'éventuelles relations entre la solubilité des flavonoïdes, leurs propriétés thermophysiques et leurs structures moléculaires.

Les flavonoïdes choisis sont ceux qui ont été sélectionnés pour les réactions d'acylation, à savoir, la quercétine, l'isoquercitrine, la rutine, la naringénine, la chrysin et l'hésperitine.

En présence d'acétonitrile, trois températures ont été testées (50, 60 et 70°C) afin d'étudier l'effet de la température sur la solubilité.

De plus, l'effet de l'ajout d'un donneur d'acyle tel que le vinyle acétate, utilisé ultérieurement dans les réactions d'acylations, a été étudié dans les mêmes concentrations que dans les conditions de synthèse.

Cet article intitulé : « **Solubility of flavonoids in organic solvents** » sera soumis au *J. Chem. Eng. Data.* (Chebil *et al.*)

Solubility of flavonoids in organic solvents

Latifa CHEBIL¹, Catherine HUMEAU¹, François Dehez², Bernard Maigret², Jean-Marc
ENGASSER¹ and Mohamed GHOUL^{1*}

¹ Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, 2, Av de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² Equipe de Dynamique des Assemblages Membranaires, UMR CNRS/UHP 7565, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* Corresponding author: Tel. 0033383595892; Fax. 0033383595778

E-mail address: ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr

Abstract

The solubility of quercetin, isoquercitrin, rutin, chrysin, naringenin and hesperitin was quantified in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol. The solubility was strongly affected both by the nature of the solvent and the flavonoid structure. The highest solubility was obtained in acetonitrile for hesperitin (85 mM) and naringenin (77 mM) and in acetone (80 mM) for quercetin. The lowest solubility value was obtained with rutin in acetonitrile. The thermophysical properties of flavonoids were also quantified (melting point, enthalpy of fusion, heat capacity and activity coefficient). Glycosylated flavonoids are characterized by a low melting point and a high enthalpy of fusion compared to the aglycon ones. Contrary to the data reported for other molecules, there is no clear correlation between the solubility of flavonoids and their thermophysical properties. This behaviour seemed to be due to the conformational structure. Flavonoids having an torsion angle OC2C1'C6' of 40° are characterized by a high solubility.

Keywords: solubility, organic solvent, flavonoid, structure, thermophysical.

Introduction

Flavonoids are frequently present in nature and easily extracted from many different plants. Their protective effect against lipid peroxidation of membranes, involved in several physiological and pathological disorders, such as inflammation, atherosclerosis, ischemia, toxicity of oxygen and chemical substances has been largely studied¹⁻⁷. Many of these compounds are already used in pharmaceutical, cosmetic and food preparations.^{4, 8-13} However, their solubility is very low in water.^{8, 10, 14-16} It is about 125 mg/L, 0.5 g/L, < 10 mg/L and 0.4 g/L at 20°C, respectively for rutin, naringin, quercetin and neohesperidine dihydrochalcone¹⁷⁻¹⁹. This solubility also depends on the pH¹⁶. At pH 1.5, the solubility of hesperitin and naringenin are 0.06 and 0.025 mg/L, respectively, while at pH 8, this increases four fold. The nature of the solvent also has a strong effect on the solubility. Benavente-Garcia *et al.* (2001)¹⁹ measured the solubility of the neohesperidine dihydrochalcone in various water/ethanol mixtures and at different temperatures. They showed that the solubility of this compound at 20°C in ethanol and in the mixture eau/ethanol (1/1) is respectively 12 g/L and 123 g/L. Moreover, these authors reported that for temperatures higher than 70°C, solubility increases strongly. With a view to establishing a rational approach and to explaining the solubility of some molecules, several works have been devoted to revealing a possible correlation between the thermophysical, structural properties and the solubility of these molecules. In some of these studies, it has been shown that the solubility of molecules can truly be correlated to their thermophysical properties.²⁰ Moreover, the structural studies revealed that solubility is affected by the ability of molecules to form hydrogen bonds with the surrounding solvent.²¹

For flavonoids, despite the great interest in these molecules over recent years, few data dealing with their solubility are available.

The main aim of this work is to furnish experimental data both on the solubility and the thermophysical properties (melting point, enthalpy of fusion, activity coefficient) of six flavonoids (quercetin, isoquercitrin, rutin, chrysin, naringenin and hesperitin). Moreover, the structural properties of these molecules were also investigated. All these data were analyzed in order to understand the observed differences in flavonoid solubility.

Experimental Section

Materials. Quercetin ($\geq 98\%$ purity), rutin ($\geq 95\%$ purity), naringenin ($\geq 95\%$ purity) and hesperitin ($\geq 98\%$ purity) were purchased from Sigma. Chrysin ($\geq 95\%$ purity) and isoquercitrin ($\geq 95\%$ purity), were purchased from Acros and Extrasynthese respectively.

Vinyl acetate was purchased from Aldrich. Acetonitrile, *tert*-amyl alcohol and acetone were purchased from Merck.

Solubility Measurement. The experimental setup used for the solubility measurements of different solvents was an automated synthesis workstation (ASW 1000) equipped with 27 ml micro-reactors (Fig. 1). Before each experiment, solvent (15 ml) was dried with 4 Å molecular sieves, the temperature was set at the desired level and then transferred to the flavonoid (excess). The solution was stirred at a constant temperature, at 500 rpm using a Chemspeed vibration system, until equilibrium was reached.

Samples of the solution were automatically withdrawn, at several intervals and placed in vials at the same temperature as the solution temperature in order to avoid any precipitation. The samples were then filtered (0.22 µm) and analyzed by HPLC. When the difference in the flavonoid solubility value between measurements was less than 2%, equilibrium was considered to have been reached. In all cases, it was found that after 10 h of stirring, dissolution had been completed. Standard deviation was calculated after three repetitions. Measurement of water content in all mixtures, except those of acetone, was performed using the Karl Fischer titration method. In all these measurements, the water content was about 0.15% (m/m).

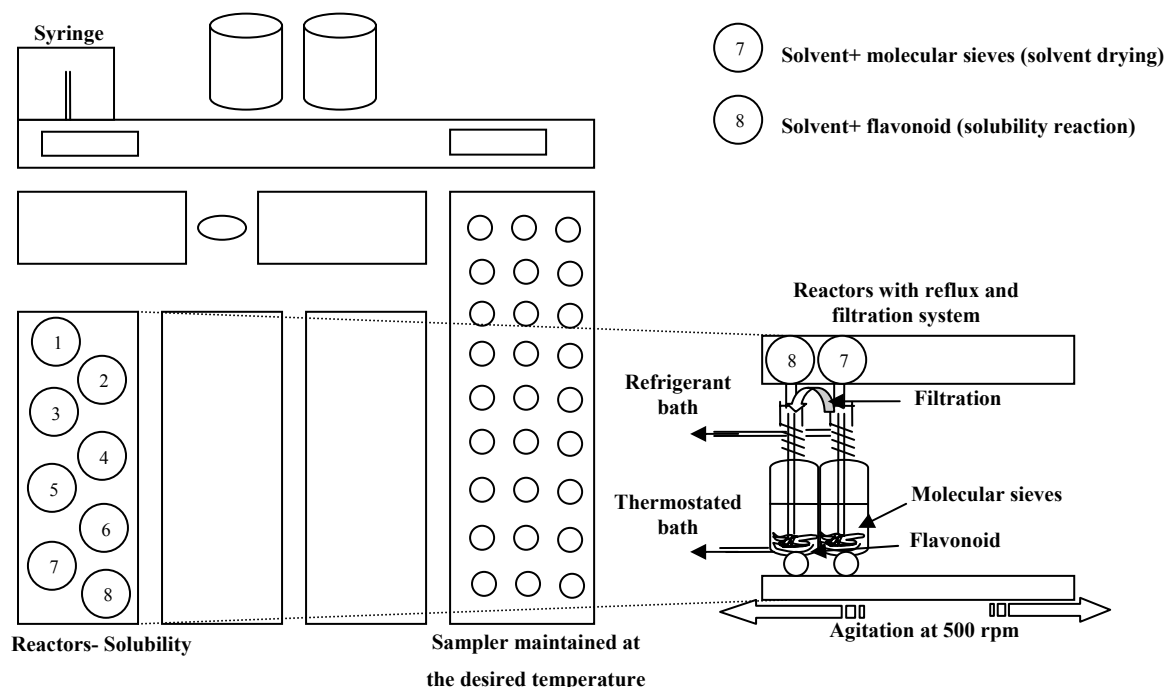


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental setup for all flavonoid solubility measurements.

Analytical Methods. (a) HPLC Analysis. The solubility of flavonoids was monitored by HPLC. Analyses were carried out in a system (Lachrom, Merck) equipped with a column (Apollo C18, 250×4.6 mm, Alltech), a column oven (L-7350, Merck), an auto-injector (L-7200, Merck) and a UV detector (Merck) at 254-280 nm. The different compounds were separated using a methanol (A)/ water (B) elution system. A three step gradient was applied: 0 min (40/60), 5min (100/0), 10 min (100/0) and 15 min (40/60). The elution flow rate was 1ml.mn⁻¹. Elution was performed at 55°C.

(b) Water content analysis. The water content of the reaction medium was determined by a coulometric Karl Fisher apparatus (KF737II coulometer). Hydranal-coulomat AG-H (sigma) was used as a reagent.

(c) DSC measurements. Melting points, enthalpies of fusion and heat capacities were determined by differential calorimetric scanning using a Perkin Elmer Pyris 1. Samples (2-8 mg) were placed in hermetically sealed aluminum pans (Perkin-Elmer); an empty pan was used as a reference in all cases. Measurements were performed over a temperature range including the flavonoid melting temperature (25–400°C). A temperature increment of 10°C/min was used throughout the study. Nitrogen was used as the purge gas. The calculation of the area under the transition peak allowed the phase transition energy, ΔH_f to be evaluated. The heat capacity of the sample was determined by the ratio of the differential power to the sample mass and the rate of temperature increase.

Thermophysical properties estimation.

(a) Equilibrium relationship. The activity of the dissolved solute in the saturated solution equals that of pure solid:

$$a_i^s = a_i^{sat} = \gamma_i^{sat} X_i^{sat} \quad (1)$$

Equation 1 shows that the solubility mole fraction of a compound can be predicted if the activity of the pure solid and the activity coefficient of the solute in the saturated solution can be predicted. Obviously, the standard state of the definition of the solution activity coefficient must be the same as that of the activity of the solid state.

After several approximations, the solid state activity $a^s(T)$ at temperature T can be estimated by equation 2:

$$a^s(T) = \exp \left[\frac{\Delta H_m^f}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left(\ln \frac{T_m}{T} - \frac{T_m}{T} + 1 \right) \right] \quad (2)$$

where ΔH_m^f is the enthalpy of fusion at the melting point, T_m . The heat capacity difference between the melt and the solid state ($C_p^m - C_p^s$) = ΔC_p is independent of temperature.²² This assumption is not always justified. However, the reference state is a super-cooled melt, the properties of which cannot, in general, be determined by experiment but only from extrapolation of data from above melting point.²² Hence, the assumption is usually accepted. In chemical engineering literature, there are two alternative assumptions commonly employed: the first one is that ΔC_p at T_m is equal to zero and the second that it is equal to fusion entropy at the melting point. For the determination of ΔC_p , predictions of liquid heat capacity (C_p^L) and solid heat capacity (C_p^S) with group contribution (GC) methods have been proposed.^{23, 24} In fact, Pappa et al.²⁵ showed that three schemas can predict the ΔC_p . For aromatic compounds $\Delta C_p = C_p^L - C_p^S$.

(b) Group Contribution Method for C_p^L . Ruzicka and Domalski (1993)²⁶ developed a group contribution method to predict the liquid heat capacities of organic compounds from the melting to the boiling point. According to these authors, the method has an average absolute percent deviation (AAD) of 1.9% from the melting point to the normal boiling point for 4000 exp. points that correspond to hydrocarbons (C_2 - C_{48}).

Molecular modeling. In order to explain the differences in solubility, a molecular modeling study was carried out on flavonoids by using two methods: semi-empirical calculations (AM1) and DFT simulations (B3LYP/6-31G*), in vacuum and in solvents (HyperChem 7 Molecular Visualization and simulation program²⁷). The effect of the nature of solvent was studied by solvating quercetin in rectangular boxes of acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol using an OPLS-AA force field. Molecular dynamics simulations were carried out by Namd.²⁸

Results and Discussion

The solubility and the thermophysical properties of quercetin, chrysin, isoquercitrin, naringenin, hesperitin and rutin (Fig. 2) were determined. The effect of the nature of the solvent (acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol), the temperature and the co-solvent on the solubility of these molecules were also quantified. Moreover, the structural conformation of the six flavonoids was investigated under vacuum and in the presence of solvents.

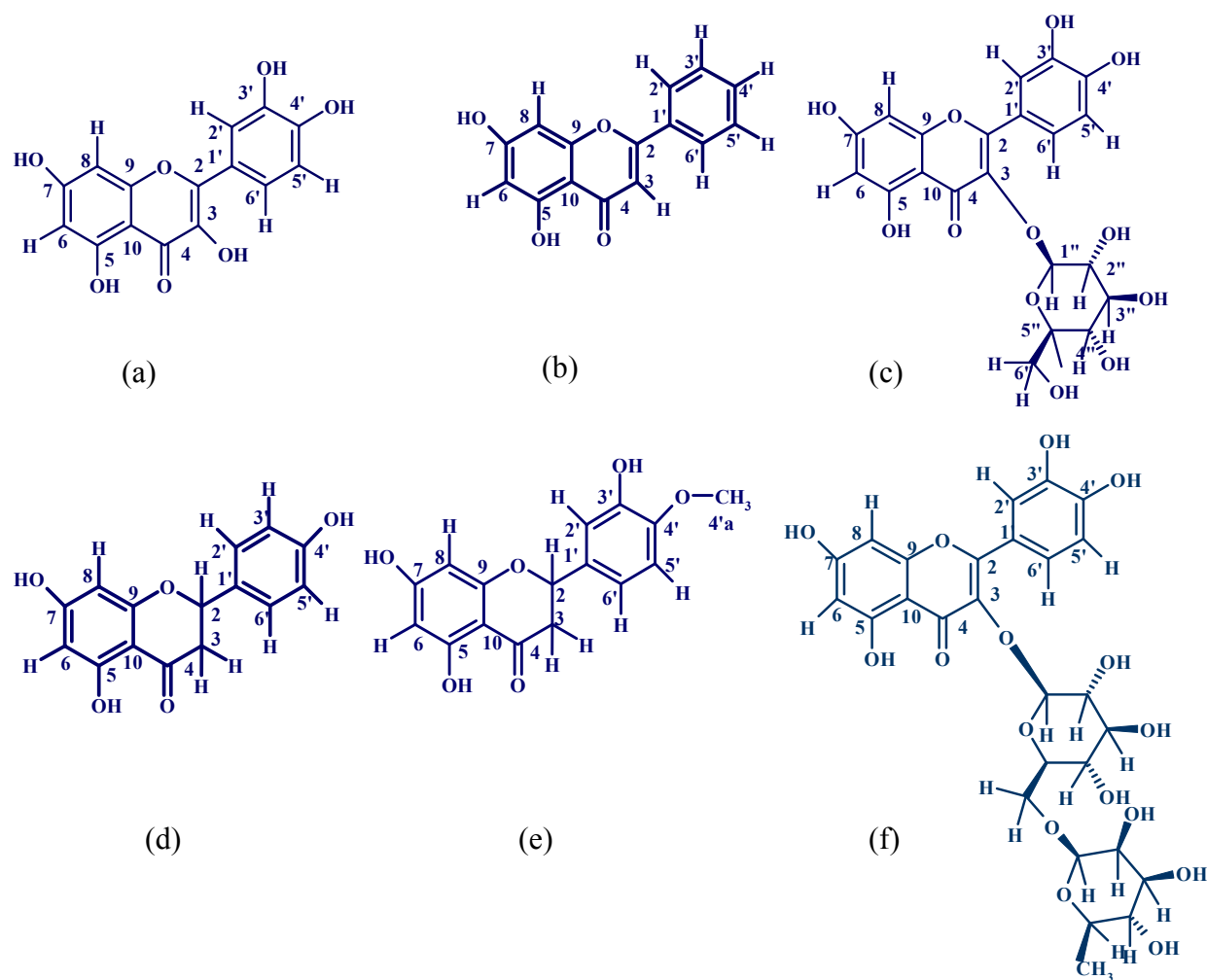


Fig. 2. Chemical structure of quercetin (a), chrysin (b), isoquercitrin (c), naringenin (d), hesperitin (e) and rutin (f).

Kinetic study of flavonoids solubility in acetonitrile

The evolution of the solubility of quercetin and isoquercitrin versus time, at 50°C, is reported in Fig.3. This shows that a plateau was reached after 10h. At this plateau, the concentrations are about 5.4 and 3.9 mM respectively for quercetin and isoquercitrin. Similar

operating conditions were used for studying the solubility of chrysin, naringenin, hesperitin and rutin. The solubility values obtained at the equilibrium are reported in Table 1. The highest solubility was reached with hesperitin (85 mM), while the lowest one was obtained with rutin (0.5 mM). As rutin is a glycosylated flavonoid, it seemed that the presence of sugar part is at the origin of this molecule's weak solubility of in acetonitrile. No correlation was observed between the hydrophobicity (Log P) and the solubility.

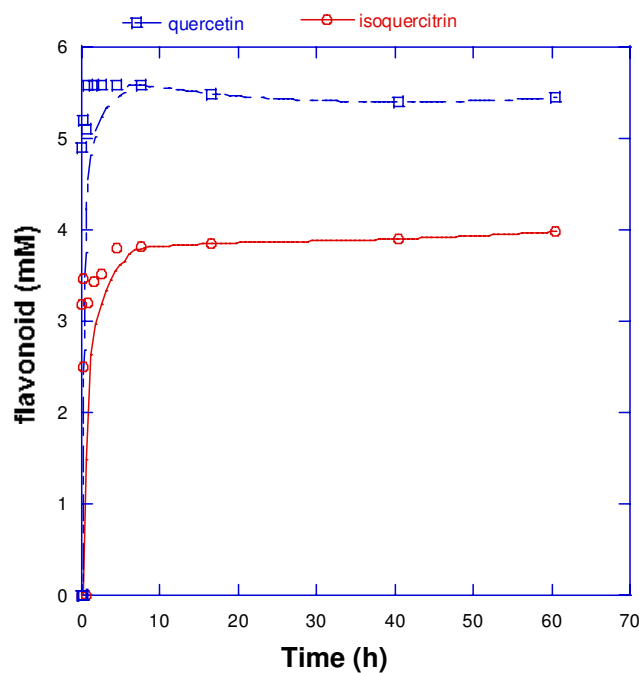


Fig.3. Kinetic dissolution profiles of quercetin and isoquercitrin in acetonitrile at 50°C.

Table 1. Solubility values (S) of rutin, isoquercitrin, quercetin, chrysin, naringenin and hesperitin in acetonitrile at 50°C at 48h.

	S (mM)	±SD ^a	Log P
rutin	0.5	0.01	-1.97
isoquercitrin	3.9	0.06	-1.18
quercetin	5.4	0.79	0.28
chrysin	6	0.13	1.75
naringenin	77	0.03	1.99
hesperitin	85	0.07	1.73

^a SD is the standard deviation of the experimentally measured solubility.

As has previously been mentioned, solubility can be affected by temperature. To evaluate the effect of this factor, three set points were investigated (50, 60 and 70°C). The results obtained are summarized in Table 2. It appears that for quercetin and isoquercitrin, temperature does not affect the solubility in acetonitrile, while the solubility for naringenin and hesperitin increased by 8 and 13%, respectively when the temperature rose from 50 to 70°C. Similar profiles was observed by Benaventa-Garcia et al. (2001)¹⁹ when they studied the solubility of neohesperidin dihydrochalcone in water and ethanol.

Table 2. Solubility (S) of quercetin, isoquercitrin, naringenin and hesperitin in acetonitrile at 50, 60 and 70°C.

	At 50°C		At 60°C		At 70°C	
	S (mM)	±SD	S (mM)	±SD	S (mM)	±SD
quercetin	5.6	0.79	6.8	0.09	7.05	0.05
isoquercitrin	3.9	0.06	3.7	0.07	4.12	0.07
naringenin	77	0.03	80	0.07	88	0.03
hesperetin	85	0.07	90	0.04	93	0.02

Effect of the nature of the solvent on flavonoid solubility

To determine the effect of the nature of the solvent, the solubilities of rutin, isoquercitrin (glycosylated forms) and quercetin (aglycon form) were measured and compared at 50°C in *tert*-amyl alcohol, acetone and acetonitrile. The results obtained at 48h, are summarized in Table 3. This indicates that for the aglycon form (quercetin), solubility was high in acetone (80 mM) and lowers in *tert*-amyl alcohol (67 mM) and in acetonitrile (5.4 mM). For glycosylated forms (isoquercitrin and rutin) high solubility was observed in *tert*-amyl alcohol (66 and 60 mM, respectively). The presence of sugar part (rutin and isoquercitrin) decreases the solubility in polar solvents (acetone and acetonitrile).

The use of vinyl acetate (1324 mM and 862 mM with quercetin and isoquercitrin, respectively) as co-solvent, or as an acyl donor in enzymatic acetylation, showed an increase in the solubility of quercetin and isoquercitrin by 14% and 5%, respectively. The observed variation, due to the addition of the co-solvent, remained low compared to that obtained by Tsavas et al. (2002)²⁹ for glucose solubility in a mixture of *tert*-amyl alcohol and octanoic acid.

Table 3. Solubility of quercetin, isoquercitrin and rutin in *tert*-amyl alcohol, acetone and acetonitrile at 50°C.

	<i>tert</i> -amyl alcohol		acetone		acetonitrile		acetonitrile+vinyl acetate
	S (mM)	±SD	S (mM)	±SD	S (mM)	±SD	S (mM)
quercetin	67	0.57	80	1	5.4	0.79	6.29
isoquercitrin	66	2	30	0.45	3.9	0.06	4.1
rutin	60	0.4	13.5	0.34	0.50	0.01	-

Thermophysical properties of flavonoids

For all the flavonoids studied, experimental data of T_m , ΔH_f and C_p^s were determined from the DSC scan (thermogram). However, due to the decomposition of flavonoids close to the melting point, it was difficult to determine the C_p^L values. Thus, C_p^L was predicted by using the method developed by Ruzicka and Domalski (1993).²⁶

The results obtained for the different thermophysical properties (experimental and predicted data) of quercetin, isoquercitrin, rutin, naringenin, chrysin and hesperitin are summarized in Tables 4 and 5. The analysis of these data revealed that the glycosylated flavonoids are characterized by a low melting point and a high fusion enthalpy compared to those of aglycon. Moreover, contrary to Gracin and Rasmuson²⁰, in our case, no relationship was observed between solubility and the different thermophysical properties (T_m , ΔH_f , a^s and γ). The absence of a clear correlation between the solubility and the thermophysical properties could be attributed to the fact that the flavonoid, in contrast to the phenolic acids studied by Gracin and Rasmuson²⁰, are formed by several rings and OH groups which can react strongly with surrounding media.

Table 4. Experimental values of melting points (T_m), fusion enthalpies (ΔH_f), solid heat capacities (C_p^s) of flavonoids at 50°C.

Flavonoid	T_m (°K)	SD	ΔH_f (KJ/mol)	SD	C_p^s (J/mol °K)	SD
quercetin	595	0.7	41.5	0.6	585.9	166
isoquercitrin	471	1.5	49.8	0.9	941.9	27
naringenin	523	0.6	39.8	0.3	259.7	32
hesperitin	499	1	35.9	0.08	906	531
rutin	450	1.5	82.3	0.07	915	158
chrysin	558	1.1	39.2	0.1	200.6	114

Table 5. Estimation of liquid heat capacity (C_p^L , J/mol °K), solid state activity (a^s) and activity coefficient (γ) of flavonoids at 50°C.

Flavonoid	C_p^L	ΔC_p	a^s	γ	γ	γ
				acetonitrile	tert-amyl alcohol	acetone
quercetin	591.6	5.75	0.0010	3.4	0.14	0.17
isoquercitrin	1024	82.3	0.0065	31.6	0.89	2.9
naringenin	600	340.3	0.9499	232.4		
hesperitin	574.2	-	-	-		
rutin	1390	475	0.0058	221.8	0.9	5.9
chrysin	428.7	228.1	0.3054	959.2		

Structural properties of flavonoids

As mentioned above, some papers have shown that differences in solubility can be explained by the structural properties of the molecules compared. To verify this hypothesis in the case of flavonoids, we studied their conformational structure in vacuum and in the three solvents used in this work.

The conformations obtained under vacuum with the AM1 method, showed that the structure of rutin, isoquercitrin, quercetin and chrysin are characterized by a torsion angle θ (OC2C1'C6') about of -25°, while for naringenin and hesperitin, this was of about 40°

(Fig.4). A similar torsion angle θ was observed by Russo et al.³⁰ and Rodriguez et al.³¹ for quercetin when using this method (AM1).

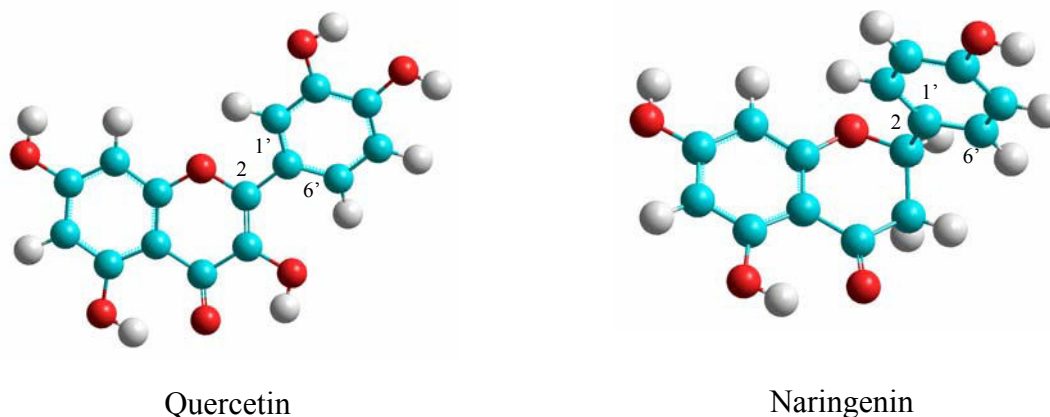


Fig.4. Quercetin and naringenin structure optimized by the AM1 method

The magnitude of this torsion angle θ seemed to be related to the presence or the absence of the double bond between C2-C3. In fact our data showed that the absence of a double bond led to a torsion angle θ of flavonoids of about 40° and to a high solubility in acetonitrile (naringenin and hesperitin).

To complete this investigation, the structure of quercetin was also studied by a Density Functional Theory (DFT) method (B3LYP/6-31G*). This method led to a torsion angle θ of about 0° compared to -25° obtained by the AM1 method. A similar result was reported by van Acker et al.³², Erkoç *et* Erkoç³³ and Mendoza-Wilson et al.³⁴ when they used AMBER force field, MM+ force field and DFT (6-31G*) method, respectively. This difference in the torsion angle θ indicates that it is difficult to compare the structural data obtained by these two methods. However, we can compare the structure of the different molecules by applying the same method to all of them, the AM1 method in our case.

As the environment surrounding the molecules can affect the conformational structure, quercetin was studied by molecular dynamics in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol (Fig.5). The results obtained showed that the structure of quercetin remains planar in the three solvents. This result suggests that the structure of quercetin was not affected by the nature of solvent.

The organization of the three solvents around quercetin is similar in the case of acetone and acetonitrile but different in the case of *tert*-amyl alcohol. In *tert*-amyl alcohol, several inter and intra- molecular H-bonds are established. However, even if the structural study showed

that the H-bond organization is similar in acetone and acetonitrile, the solubility of quercetin in the two solvents is different. These observations suggest that the high solubility cannot be explained by only the organization of H-bonds between flavonoids and surrounding media alone. These observations are in contradiction to those reported by Saidman et al.²¹ who explain the high solubility of flavone in ethanol by the important hydrogen-bond-donor capacity of this solvent.

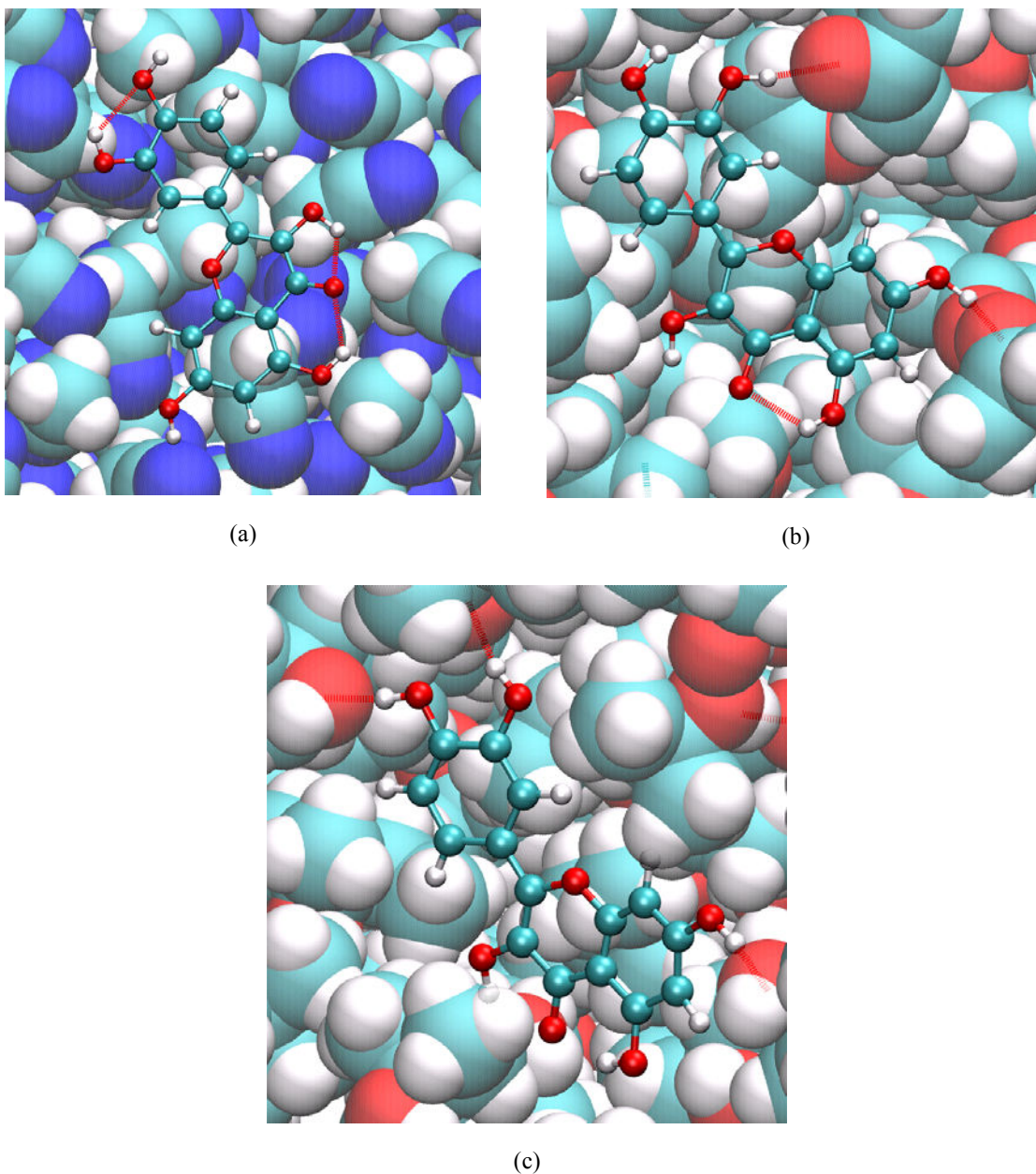


Fig.5. representation of quercetin immersed in acetonitrile (a), acetone (2) and *tert*-amyl alcohol (c).

Conclusion

In this paper, the solubility of quercetin, isoquercitrin, rutin, chrysin, naringenin and hesperitin have been quantified in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol. On the basis of our results, solubility can be seen to be strongly affected by the nature of both the solvent and the flavonoid structure. The highest solubility was reached within hesperitin (85 mM), while the lowest one was obtained with rutin (0.5 mM). It would consequently appear that the presence of the sugar is at the origin of the weak solubility of this molecule in acetonitrile. The thermophysical properties of flavonoids were also quantified (melting point, enthalpy of fusion, heat capacity and activity coefficient). The presence of sugar in the glycosylated flavonoids led to a low melting point and a high fusion enthalpy. Contrary to the data reported for other molecules, there is no clear correlation between the solubility of flavonoids and their thermo-physical properties. This behaviour seems to be due to the conformational structure. Flavonoids with an torsion angle OC2C1'C6' of 40° are characterized by a high solubility. The analysis of the organizational structure of solvents around quercetin, by molecular modeling study, showed that there is similarity between acetonitrile and acetone. However, the solubility of quercetin in the two solvents is different. These data suggest that high solubility cannot be explained by the organization of H-bonds between flavonoids and the surrounding media alone. The determination of solvation energy will be the next step of our investigation in an attempt to explain the differences in solubility observed between the six molecules studied.

Literature Cited

1. Burda, S.; Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, (6), 2774-2779.
2. Erlund, I., Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* **2004**, 24, (10), 851-874.
3. Harborne, J. B.; Williams, C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, 55, (6), 481-504.
4. Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, 96, (2-3), 67-202.
5. Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tomic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G., Flavonoids as Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, (11), 4846-4851.
6. Kandaswami, C.; Middleton, E. J., Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol.* **1994**, 366, 351-376.
7. Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **2000**, 63, (7), 1035-1042.
8. Boumendjel, A.; Mariotte, A. M.; Bresson-Rival, D.; Perrier, E., Hesperitin esters: Highly stable flavanones with both free radical scavenging and anti-elastase activities. *Pharmaceutical Biology* **2003**, 41, (7), 546-549.
9. Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M. T.; Ruberto, G., Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 42, (2), 497-501.
10. Miyake, T.; Suzuki, K.; Yoneyama, M. 4G-alfa-D-glucopyranosyl rutin, and its preparation and uses. EP0420376, 1991.
11. Perrier, E.; Mariotte, A. M.; Boumendjel, A.; Bresson-Rival, D. Nouveaux esters de flavonoides, leur utilisation en cosmetique, dermopharmacie, en pharmacie et en agro-alimentaire. FR2778663-A1, 1998.
12. Peschel, W.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Sánchez-Rabaneda, F.; Codina, C.; Lamuela-Raventós, R.; Buxaderas, S.; Gartzía, I.; Jiménez, D., An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* **2006**, 97, (1), 137-150.
13. Watanabe, K.; Niimura, K.; Miyagawa, J. Esculetin derivatives and method for manufacture thereof, use thereof, and pharmaceutical composition. EP 0654479A2, 1993.
14. Abou El Hassan, M. A. I.; Touw, D. J.; Wilhelm, A. J.; Bast, A.; van der Vijgh, W. J. F., Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 211, (1-2), 51-56.
15. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Luisa Pellegrino, M.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F. P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F., 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, 56, (2), 167-174.
16. Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P., Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 35, (2), 379-387.
17. Calias, P.; Galanopoulos, T.; Maxwell, M.; Khayat, A.; Graves, D.; Antoniadis, H.; d'Alarcao, M., Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Research* **1996**, 292, 83-90.

18. Pulley, G., Solubility of naringin in water. *Industrial and Engineering Chemistry* **1936**, 8, (5), 360.
19. Benavente-García, O.; Castillo, J.; Del Baño, M., J.; Lorente, J., Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (1), 189 - 191.
20. Gracin, S.; Rasmuson, Å. C., Solubility of Phenylacetic Acid, *p*-Hydroxyphenylacetic Acid, *p*-Aminophenylacetic Acid, *p*-Hydroxybenzoic Acid, and Ibuprofen in Pure Solvents. *J. Chem. Eng. Data* **2002**, 47, (6), 1379 - 1383.
21. Saidman, E.; Yurquina, A.; Rudyk, R.; Molina, M. A. A.; Ferretti, F. H., A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2002**, 585, (1-3), 1-13.
22. Gracin, S.; Brinck, T.; Rasmuson, Å. C., Prediction of Solubility of Solid Organic Compounds in Solvents by UNIFAC. *Ind. Eng. Chem. Res* **2002**, 41, (20), 5114 - 5124.
23. Goodman, B. T.; Wilding, W. V.; Oscarson, J. L.; Rowley, R. L., Use of the DIPPR Database for Development of Quantitative Structure-Property Relationship Correlations: Heat Capacity of Solid Organic Compounds. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, 49, (1), 24-31.
24. Za'bransky', M.; Ruzicka, J., V., Estimation of the Heat Capacities of Organic Liquids as a Function of Temperature Using Group Additivity: An Amendment. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2004**, 33, (4), 1071-1081.
25. Pappa, G. D.; Voutsas, E. C.; Magoulas, K.; Tassios, D. P., Estimation of the Differential Molar Heat Capacities of Organic Compounds at Their Melting Point. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 44, (10), 3799-3806.
26. Ruzicka, J., V.; Domalski, E. S., Estimation of the heat capacities of organic liquids as function of temperature using group additivity. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, 22, (3), 619-657.
27. HyperCube *HyperChem*, Release 7.5 for Windows; 2003.
28. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1781-1802.
29. Tsavas, P.; Polydorou, S.; Fafli, I.; Voutsas, E. C.; Tassios, D.; Flores, M. V.; Naraghi, K.; Halling, P. J.; Chamouleau, F.; Ghoul, M.; Engasser, J. M.; Ferrer, M.; Plou, F. J., Solubility of glucose in mixtures containing 2-methyl-2-butanol, dimethyl sulfoxide, acids, esters, and water. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2002**, 47, (4), 807-810.
30. Russo, N. T., M.; Uccella, N., Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (8), 3232-3237.
31. Rodriguez, M. R.; Cano, A. T.; Pinto, M. D. C.; Macias, P., Lipoxigenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 674, (1-3), 121-124.
32. van Acker, S. A. B. E. d. G., M. J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, (8), 1305-1312.
33. Erkoc, S.; Erkoc, F.; Keskin, N., Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2003**, 631, (1-3), 141-146.
34. Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D., CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, 68, 171-176.

CONTRIBUTION DE L'ARTICLE

Dans cet article, la solubilité de quelques flavonoïdes dans différents solvants a été étudiée. Cette investigation a permis d'en déduire que :

- la solubilité dans l'acétonitrile est caractérisée par une cinétique très rapide. Les valeurs à l'équilibre varient en fonction de la nature du flavonoïde. Ainsi, pour la naringénine et l'hespéritine cette solubilité, dans l'acétonitrile, avoisine les 80 mM alors qu'elle n'est que de 0.5 mM pour la rutine. De même, les propriétés thermophysiques dépendent de la nature du flavonoïde. Les flavonoïdes glycosylés possèdent un point de fusion moins élevé et une enthalpie de fusion plus élevée que ceux aglycones. La différence de solubilité observée à l'équilibre n'est corrélée ni à l'hydrophobicité des molécules (Log P), ni aux propriétés thermophysiques (T_m , ΔH_f , ΔC_p , a^s , γ). Ces dernières ont été déterminées pour la première fois dans ce travail. Néanmoins, ces différences semblent être liées à la structure des flavonoïdes. Ainsi, il a été observé que l'absence de double liaison entre C2-C3 (un angle dièdre OC2C1'C6' de 40°) est corrélée à la forte solubilité de la naringénine et de l'hespéritine dans l'acétonitrile.

Contrairement à ce qui a été observé dans de précédents travaux, la solubilité n'est pas reliée aux interactions soluté-solvant.

- dans l'acétone, la solubilité de la quercétine (aglycone) est élevée (80 mM) comparée à l'isoquercitrine (30 mM) et à la rutine (13.5 mM). La solubilité de ces trois molécules dans le *tert*-amyl alcool est comparable (60-67 mM).

- l'utilisation du vinyle acétate comme co-solvant avec l'acétonitrile augmente respectivement la valeur de la solubilité de la quercétine et de l'isoquercitrine de 14 et de 5%.

- pour la quercétine, l'isoquercitrine et la rutine, une augmentation de la température de 50 à 70° ne se traduit pas par une augmentation significative de la solubilité. En revanche, une légère augmentation de 8 à 13% a été notée pour la naringénine et l'hespéritine.

CHAPITRE IV

*ACYLATION ENZYMATIQUE DES
FLAVONOÏDES*

CHAPITRE IV.1

Effet de la nature du substrat, de l'origine de la lipase et des conditions opératoires sur le rendement de conversion et la régiosélectivité d'acylation

**CHAPITRE IV. 1. EFFET DE LA NATURE DU SUBSTRAT, DE
L'ORIGINE DE LA LIPASE ET DES CONDITIONS OPERATOIRES
SUR LA PERFORMANCE ET LA REGIOSELECTIVITE
D'ACETYLATION**

INTRODUCTION

Les performances (vitesse initiale et rendement de conversion) et la régiosélectivité de la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes dépendent de plusieurs facteurs tels que l'origine de la lipase, la nature du solvant, le rapport molaire donneur d'acyle/flavonoïde (DA/F) et la nature des substrats acide et alcool.

Dans cette étude notre choix a porté sur les flavonoïdes aglycones vu le manque de travaux traitant l'acylation de ce type de molécules. De même, dans la plupart des travaux CAL-B, était l'enzyme la plus utilisée. Cependant, cette enzyme se limite à l'acylation de flavonoïdes glycosylés. C'est ainsi que la PSL-C a été testée pour ce type de flavonoïdes.

Ainsi, les objectifs de ce chapitre sont :

- l'étude de l'effet de l'origine de la lipase sur la performance et la sélectivité de l'acétylation réalisée dans l'acétone, en comparant deux enzymes (CAL-B et PSL-C) et deux flavonoïdes (quercétine et isoquercitrine).
- l'étude de l'effet du solvant sur la performance et la sélectivité de PSL-C en présence de deux flavonoïdes.
- l'étude de l'effet du rapport molaire (DA/F) sur la performance et la sélectivité de l'acétylation de la quercétine par PSL-C.
- l'étude de l'effet de structure du donneur d'alcool (encombrement et glycosylation) sur la performance et la sélectivité d'acétylation, en comparant cinq flavonoïdes de structures différentes.

Les solvants utilisés sont l'acétone, l'acétonitrile et le *tert*-amyl alcool et le rapport molaire vinyle acétate/flavonoïde a été varié de 5 à 40.

Les cinq flavonoïdes testés sont des flavonoïdes aglycones (quercétine, naringénine, hespéritine et chrysine) et un flavonoïde glycosylé (isoquercitrine).

La performance des réactions de synthèse a été quantifiée par la détermination de la vitesse initiale de la réaction et du rendement de conversion du flavonoïde à l'équilibre. Pour mener ces synthèses dans les mêmes conditions opératoires (température, pression,...), ces réactions ont été réalisées en parallèle en utilisant une installation de microréacteurs.

Pour étudier l'effet des différents facteurs sur la sélectivité de synthèse, après purification par chromatographie préparative, les esters synthétisés ont été caractérisés par spectrométrie de masse (LC-ESI-MS), par infrarouge et par RMN ^1H et ^{13}C .

Cette partie a fait l'objet d'une publication intitulée « **Enzymatic acetylation of flavonoids: effect of the nature of substrate, origin of lipase and operating conditions on conversion yield and regioselectivity** » qui a été soumise au journal « Journal of Biotechnology » (Chebil *et al.*)

Enzymatic acetylation of flavonoids: effect of the nature of substrate, origin of lipase and operating conditions on conversion yield and regioselectivity

Latifa CHEBIL^a, Catherine HUMEAU^a, Christine GERARDIN^b, Jean-Marc ENGASSER^a
and Mohamed GHOUL^{a*}

(a) Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, 2, Av de la Forêt de Haye 54500
Vandoeuvre, France

(b) Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloïdale, Faculté des Sciences et Techniques.
UHP-Nancy I B.P. 239 54506 Vandoeuvre les Nancy cedex, France.

* Corresponding author: Tel. 0033383595892; Fax. 0033383595778

E-mail address: goul@ensaia.inpl-nancy.fr

Abstract

The kinetic behavior and the regioselectivity of the enzymatic acetylation of aglycon flavonoids (quercetin, naringenin, hesperitin and chrysin) were investigated and compared to those obtained with a glycosylated one (isoquercitrin). The effects of a wide range of operating conditions (solvent, substrates molar ratio, enzyme origin and flavonoid structure) were quantified. The results obtained indicated that the acetylation of aglycon forms occurred only with *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL). The conversion yield depended on the nature of the solvent, the substrates molar ratio and the flavonoid structure. The highest conversion yield (99%) was attained with quercetin and naringenin in acetonitrile, with a molar ratio of 40. Whatever the lipase (*Candida antarctica* (CAL-B), PSL) and the solvent used, isoquercitrin led to a conversion yield of 100%. The initial rate was affected only by the origin of the enzyme. It was two fold higher with CAL-B than with PSL. For both aglycon and glycosylated flavonoids, the number and the relative proportions of products were variable depending on the nature of the enzyme, the molar ratio and the flavonoid structure. In the case of chrysin only one product was synthesized, whereas, for isoquercitrin three products were formed with PSL and only two with CAL-B. An excess of acyl donor was shown to favor triester production. The regioselectivity depended on the enzyme origin and the flavonoid structure. CAL-B catalyzed acetylation only on the sugar part, while PSL led to the acetylation of both sugar and phenolic moieties. With this last enzyme the reaction took place firstly on the primary OH and then on the phenolic 4'-OH group. In the presence of aglycon flavonoids, the 4'-OH group is the most reactive followed by the 3' and 7-OH's.

Keywords: flavonoid, acetylation, CAL-B, PSL-C, regioselectivity.

1. Introduction

Flavonoids are a large group of phenolic plant constituents. To date, more than 6000 flavonoids have been identified. In recent years there has been growing academic and industrial interest in the health benefits of flavonoids. In fact, it has been observed that an increased consumption of fruits and vegetables may be an important factor in the prevention of certain cancers, coronary heart and neurodegenerative diseases (Harborne et al., 2000). Essentially, two forms of flavonoids are present in plants: aglycon and glycosylated. Compared to the glycosylated forms, the aglycons show a more biological activity *in vitro* (Burda et al., 2001, Di Carlo et al., 1999, Formica et al., 1995, Ross et al., 2002).

However, the processability of these molecules is still limited by their low solubility and weak stability (Kitao et al., 1993, Miyake et al., 1991, Sakai et al., 1994, Tommasini et al., 2004). With a view to improving these properties, derivatization of flavonoids like glycosylation and acetylation have been reported in several works (Danieli et al., 1997, Lambusta et al., 1993, Miyake et al., 1991, Sakai et al., 1994). These reactions can be carried out in chemical, enzymatic or chemo-enzymatic ways. Due to the high number of hydroxyl groups able to react on flavonoid structure, the use of chemical way needs many protection/deprotection steps to obtain a selective functionalization. For this reason, the enzymatic route, which is more regio-selective, has been described as a promising. Main works dealing with flavonoid acylation have been carried out with glycosylated forms using mainly *Candida antarctica* lipase (CAL-B) as biocatalyst (Ardhaoui et al., 2004a, b, c, Chebil et al., Danieli et al., 1997, Ishihara et al., 2003, Katsoura et al., Kontogianni et al., 2003, Kontogianni et al., 2001, Mellou et al., 2005, Nakajima et al., 1999). Few data are available with aglycon forms (Lambusta et al., 1993, Sakai et al., 1994). The aim of this work is to investigate the enzymatic acetylation of aglycon flavonoids (quercetin, naringenin, hesperitin and chrysin) and to compare the performance of this reaction to that obtained with a glycosylated form (isoquercitrin). Effects of several factors (solvent, substrates molar ratio, enzyme origin and flavonoid structure) have been evaluated both on kinetic parameters and the regioselectivity. These investigations were achieved using transesterification reaction, with an activated acyl donor (vinyl acetate).

2. Material and methods

2.1. Enzymes and chemicals

Immobilized CAL-B (Novozym 435[®], acrylic resin, EC 3.1.1.3, 7000 PLU/g: propyl laurate units synthesized per gram of catalyst) and immobilized PSL (PSL-C II[®], ceramic particles, 752 U/g: one unit will produce 1 μ mol of 1-phenethyl alcohol to 1-phenethyl acetate per min at 25°C in the presence of vinyl acetate) were purchased from Novo Industries and Amano Enzyme Inc., respectively.

The flavonoids tested were quercetin (purity 98%, Sigma), isoquercitrin (purity 95%, Extrasynthese), naringenin (\geq 95% purity, Sigma), hesperitin (\geq 98% purity, Sigma) and Chrysin (\geq 95% purity, Acros). Vinyl acetate (purity 99%, Aldrich) was used as acyl donor. The reactions of acetylation were performed in acetonitrile (purity 98%, Merck), acetone (purity 98%, Carlo Herba) or *tert*-amyl alcohol (purity 99%, Carlo Herba).

2.2. Flavonoid ester synthesis procedure

The enzymatic synthesis of flavonoid esters was performed in an automated synthesis workstation (AWS 1000) equipped with micro-reactors of 27 ml capacity. Before each experiment, solvent and vinyl acetate were dried on 4 Å molecular sieves and added to the flavonoid (10 g/l). The acyl donor concentration was adjusted to obtain a molar ratio of the substrates vinyl acetate/ flavonoid of 40. Acyl donor excess varied from 5 to 40 when studying the effect of this molar ratio. The mixture was stirred for 12h at 50°C. The transesterification reaction was started by adding 50 g/l of lipases (CAL-B or PSL-C) for up to 7 days. Samples were taken from the reaction medium at different times, then diluted and analyzed by HPLC. Control experiments without enzymes were also carried out.

The water content of the medium was measured at the beginning and the end of the reaction (0.15%).

2.3. Water content analysis

The water content of the reaction medium was determined with coulometric Karl Fisher apparatus (KF737II coulometer). Hydranal-coulomat AG-H (sigma) was used as a reagent.

2.4. HPLC analytical procedure

The transesterification reaction of flavonoids was monitored by HPLC. Analyses were carried out in a system (Lachrom, Merck) equipped with a column (Apollo C18, 250×4.6 mm,

Alltech), a column oven (L-7350, Merck), an auto-injector (L-7200, Merck) and an UV detector (Merck) at 245nm. The different compounds were separated using a methanol (A)/water (B) elution system. A three step gradient was applied: 0 min (40/60), 5min (100/0), 10 min (100/0) and 15 min (40/60). Elution flow rate was 1 ml.min⁻¹. The elution was performed at 55°C.

Calibration curves for the flavonoids were obtained using standards in acetonitrile, acetone or *tert*-amyl alcohol, depending on the reactional solvent.

The conversion yields were expressed by the molar ratio of consumed to initial flavonoid. The relative proportions of flavonoid esters were determined by the ratio of the peak area of each ester to the total area of products. Reaction rates were calculated from the slope of the linear portion of plots of decrease of flavonoid concentration versus time, and expressed as mM.h⁻¹ of biocatalyst.

2.5. FT-IR analysis

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR in Attenuated Total Reflection (ATR).

The FT-IR analyses of the synthesized esters were compared to those of substrates. The first observation is the apparition of a C=O stretching band (1720 cm⁻¹), corresponding to ester functions. The second one is a diminution of the intensity of the O-H stretching band (3300 cm⁻¹), due to hydroxyl acetylation. The magnitude of this variation is accentuated when the reaction takes place on phenolic hydroxyl groups.

2.6. NMR and HPLC-ESI-MS analytical procedure

The residual flavonoids and flavonoid esters were purified by semi-preparative HPLC. A 12 µm particle Alltech C18 (25*5 cm I.D.) was used. The chromatographic separation was carried out using a linear gradient from 20 to 100% methanol in water over 30 min. The flow-rate was maintained at 20 ml/min throughout the run. Elution was performed at ambient temperature with UV detection.

The chemical structure of flavonoids and their acetylated products, obtained with a high purity, was determined by ¹H NMR and ¹³C NMR in DMSO-d₆ using a Bruker AM 400 spectrometer at 400.13 and 100.58 MHz respectively. Coupling constant *J* was expressed in Hz. Tetramethylsilane was used as an internal reference. The ¹³C NMR analysis was carried out over night for better resolution.

For HPLC-ESI-MS analysis, chromatography was performed on a Jasco 9xx system, equipped with a UV detector (Jasco UV-975), coupled to a mass spectrometer VG Platform II equipped with an electrospray source operating in both positive and negative ionization modes. The source temperature was set at 80°C with a cone voltage of 40V. A 10µL aliquot sample was injected into an Apollo C18 column (250×4.6 mm). The column was eluted with methanol (A)/ water (B): 0 min (40/60), 5min (100/0), 10 min (100/0) and 15 min (40/60). At the end of the column flow was split to 1/20: 95% was used for UV detection and 5% was directed towards the mass spectrometer. The mass spectrometric data were collected in full scan mode from 100 to 600 m/z , from 0 to 17 min.

Quercetin (1)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 175.87 (C4), 135.75 (C3), 145.82 (C2), 93.38 (C8), 98.21 (C6), 103.05 (C10), 115.10 (C2'), 115.63 (C5'), 120.01 (C6'), 122.00 (C1'), 145.07 (C3'), 147.71 (C4'), 163.95 (C7), 160.75 (C5), 156.17 (C9), [M-H⁻, m/z 301].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.32 (s, OH_{phenolic}), 7.66 (dd, 1H, H_{6'}, J= 9, J= 2), 7.51 (d, 1H, H_{2'}, J= 2), 6.83 (d, 1H, H_{5'}, J= 9), 6.35 (s, 1H, H₈), 6.13 (s, 1H, H₆).

Quercetin 4'-acetate (1a)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 20.30 (OC_{4'}OCH₃), 175.78 (C4), 135.93 (C3), 145.41 (C2), 93.51 (C8), 98.31 (C6), 102.97 (C10), 116.76 (C2'), 122.00 (C5'), 126.27 (C6'), 129.05 (C1'), 150.74 (C3'), 138.52 (C4'), 163.95 (C7), 160.05 (C5), 155.53 (C9), 167.82 (COO_{4'}), [M-H⁻, m/z 343].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.32 (s, OH_{phenolic}), 8.00 (dd, 1H, H_{6'}, J= 9, J= 2), 7.79 (d, 1H, H_{2'}, J= 2), 7.47 (d, 1H, H_{5'}, J= 9), 6.43 (d, 1H, H₈, J= 2), 6.24 (d, 1H, H₆, J= 2), 2.54 (s, 3H, OC_{4'}OCH₃).

Quercetin 4',3'-diacetate (1b)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 20.26 (OC_{3'}OCH₃), 20.30 (OC_{4'}OCH₃), 176.14 (C4), 137.39 (C3), 142.83 (C2), 93.24 (C8), 97.82 (C6), 103.14 (C10), 123.78 (C2'), 122.58 (C5'), 125.76 (C6'), 129.43 (C1'), 143.04 (C3'), 142.05 (C4'), 164.28 (C7), 160.71 (C5), 156.24 (C9), 168.03 (COO_{3'}), 167.82 (COO_{4'}), [M-H⁻, m/z 385].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.32 (s, OH_{phenolic}), 8.13 (d, 1H, H_{6'}, J= 9), 8.07 (s, 1H, H_{2'}), 7.65 (d, 1H, H_{5'}, J= 9), 6.43 (s, 1H, H₈), 6.24 (s, 1H, H₆), 2.33 (s, 6H, OC_{4'}OCH₃ and OC_{3'}OCH₃).

Quercetin 4',3',7-triacetate (1c)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 19.40 (OC_7OCH_3), 20.16 (OC_3OCH_3), 20.69 (OC_4OCH_3), 176.33 (C4), 138.02 (C3), 145.01 (C2), 104.41 (C8), 107.28 (C6), 101.29 (C10), 123.79 (C2'), 122.41 (C5'), 125.97 (C6'), 129.01 (C1'), 143.06 (C3'), 141.97 (C4'), 154.79 (C7), 159.90 (C5), 155.44 (C9), 168.16 (COO_3), 167.98 (COO_4), 167.78 (COO_7), [M-H $^-$, m/z 427].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.28 (s, $\text{OH}_{\text{phenolic}}$), 8.09 (d, 1H, H_6 , $J=9$), 8.04 (s, 1H, H_2), 7.61 (d, 1H, H_5 , $J=9$), 7.20 (d, 1H, H_8 , $J=2$), 6.52 (d, 1H, H_6 , $J=2$), 2.24 (s, 9H, OC_4OCH_3 , OC_3OCH_3 and OC_7OCH_3).

Isoquercitrin (2)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 177.58 (C4), 133.46 (C3), 156.47 (C2), 93.56 (C8), 98.82 (C6), 104.14 (C10), 115.34 (C2'), 116.36 (C5'), 121.30 (C6'), 121.71 (C1'), 144.91 (C3'), 148.58 (C4'), 164.24 (C7), 156.74 (C9), 161.40 (C5), 101.08 (C1''), 74.21 (C2''), 76.61 (C3''), 69.77 (C4''), 77.59 (C5''), 60.08 (C6''), [M-H $^-$, m/z 463].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.50 (s, OH_5), 7.53 (dd, 1H, H_6 , $J=9$, $J=1.8$), 7.43 (d, 1H, H_2 , $J=2.1$), 6.84 (d, 1H, H_5 , $J=9$), 6.41 (d, 1H, H_8 , $J=1.8$), 6.19 (d, 1H, H_6 , $J=1.8$), 5.40 (d, 1H, H_1'' , $J=12.5$), 3.6 (dd, 1H, $\text{H}_6''\text{a}$, $J=11$, $J=1.5$), 3.4 (dd, 1H, $\text{H}_6''\text{b}$, $J=11$, $J=5.5$), 3.27 (m, 4H, H_5'' , H_4'' , H_3'' and H_2'').

Isoquercitrin 6''-acetate (2a)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 21.10 ($\text{OC}_6''\text{OCH}_3$), 177.34 (C4), 133.14 (C3), 156.38 (C2), 93.52 (C8), 98.86 (C6), 103.85 (C10), 115.09 (C2'), 116.16 (C5'), 121.03 (C6'), 121.47 (C1'), 144.83 (C3'), 148.54 (C4'), 164.47 (C7), 156.38 (C9), 161.27 (C5), 101.16 (C1''), 73.98 (C2''), 76.25 (C3''), 69.80 (C4''), 73.72 (C5''), 62.80 (C6''), 172.02 (COO_6''), [M-H $^-$, m/z 505].

^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12.50 (s, OH_5), 7.53 (dd, 1H, H_6 , $J=9$, $J=1.8$), 7.43 (d, 1H, H_2 , $J=2$), 6.84 (d, 1H, H_5 , $J=9$), 6.41 (d, 1H, H_8 , $J=1.8$), 6.19 (d, 1H, H_6 , $J=1.8$), 5.40 (d, 1H, H_1'' , $J=12.5$), 4.18 (dd, 1H, $\text{H}_6''\text{a}$, $J=11$, $J=1.5$), 4.02 (dd, 1H, $\text{H}_6''\text{b}$, $J=11$, $J=5.5$), 3.27 (m, 4H, H_5'' , H_4'' , H_3'' and H_2''), 1.91 (s, 3H, $\text{OC}_6''\text{OCH}_3$).

Isoquercitrin 6'',4'-diacetate (2b)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 20.56 ($\text{OC}_6''\text{OCH}_3$), 20.11 ($\text{OC}_4'\text{OCH}_3$), 177.34 (C4), 133.17 (C3), 156.38 (C2), 93.76 (C8), 98.86 (C6), 103.85 (C10), 116.48 (C2'), 120.87 (C5'), 124.05 (C6'), 127.88 (C1'), 151.97 (C3'), 137.94 (C4'), 164.47 (C7), 156.38 (C9), 161.30

(C5), 101.16 (C1''), 73.98 (C2''), 76.25 (C3''), 69.80 (C4''), 73.72 (C5''), 62.80 (C6''), 172.02 ($\underline{\text{COO}}_{6''}$), 168.51 ($\underline{\text{COO}}_{4'}$), [M-H⁻, *m/z* 547].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.50 (s, OH₅), 7.90 (dd, 1H, H_{6'}, J= 9, J= 2), 7.83 (d, 1H, H_{2'}, J= 2), 7.03 (d, 1H, H_{5'}, J= 9), 6.41 (d, 1H, H₈, J= 1.8), 6.19 (d, 1H, H₆, J= 1.8), 5.40 (d, 1H, H1'', J= 12.5), 4.18 (dd, 1H, H6''a, J= 11, J=1.5), 4.02 (dd, 1H, H6''b, J= 11, J=5.5), 3.27 (m, 4H, H5'', H4'', H3'' and H2''), 1.91 (s, 3H, OC_{6''}OCH₃), 2.3 (s, 3H, OC_{4'}OCH₃).

Isoquercitrin 6'',3''-diacetate (2d)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 20.62 (OC_{6''}OCH₃), 20.14 (OC_{3''}OCH₃), 177.28 (C4), 132.98 (C3), 156.39 (C2), 93.58 (C8), 98.74 (C6), 103.91 (C10), 115.18 (C2'), 116.24 (C5'), 120.98 (C6'), 121.46 (C1'), 144.82 (C3'), 148.61 (C4'), 164.27 (C7), 156.39 (C9), 161.30 (C5), 100.76 (C1''), 71.81 (C2''), 77.15 (C3''), 67.64 (C4''), 73.67 (C5''), 61.06 (C6''), 172.02 ($\underline{\text{COO}}_{6''}$), 169.69 ($\underline{\text{COO}}_{3''}$), [M-H⁻, *m/z* 547].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.50 (s, OH₅), 7.55 (dd, 1H, H_{6'}, J= 9, J= 1.8), 7.62 (d, 1H, H_{2'}, J= 2), 6.87 (d, 1H, H_{5'}, J= 9), 6.41 (d, 1H, H₈, J= 1.8), 6.21 (d, 1H, H₆, J= 1.8), 5.51 (d, 1H, H1'', J= 12.5), 4.84 (t, 1H, H3'', J= 9), 4.18 (dd, 1H, H6''a, J= 11, J= 1.5), 4.02 (dd, 1H, H6''b, J= 11, J= 5.5), 3.55 (1H, t, H4'', J= 9), 3.57 (m, 2H, H2'' and H5''), 1.91 (s, 3H, OC_{6''}OCH₃), 2 (s, 3H, OC_{3''}OCH₃).

Isoquercitrin 6'',3'',2''-triacetate (2e)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 21.06 (OC_{2''}OCH₃), 20.80 (OC_{6''}OCH₃), 20.60 (OC_{3''}OCH₃), 177.34 (C4), 133.27 (C3), 155.79 (C2), 94.00 (C8), 98.93 (C6), 104.03 (C10), 116.05 (C2'), 116.24 (C5'), 121.45 (C6'), 123.46 (C1'), 144.54 (C3'), 148.76 (C4'), 164.51 (C7), 156.50 (C9), 161.35 (C5), 100.93 (C1''), 74.67 (C2''), 77.67 (C3''), 67.73 (C4''), 74.58 (C5''), 62.50 (C6''), 172.12 ($\underline{\text{COO}}_{6''}$), 169.95 ($\underline{\text{COO}}_{3''}$), 169.91 ($\underline{\text{COO}}_{2''}$) [M-H⁻, *m/z* 589].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ ppm 12.50 (s, OH₅), 7.50 (dd, 1H, H_{6'}, J= 8.54, J= 1.73), 7.59 (1d, 1H, H_{2'}, J= 2.1), 6.87 (d, 1H, H_{5'}, J= 8.86), 6.41 (d, 1H, H₈, J=1.8), 6.21 (d, 1H, H₆, J= 1.8), 5.51 (d, 1H, H1'', J= 12.5), 4.84 (t, 1H, H3'', J= 8.8), 4.18 (dd, 1H, H6''a, J= 11.33, J= 1.5), 4.02 (dd, 1H, H-6''b, ²J= 11, ³J= 5.4), 3.57 (m, 3H, H2'', H5'' and H4''), 1.91 (s, 3H, OC_{6''}OCH₃), 2.03 (s, 3H, OC_{2''}OCH₃), 2.06 (s, 3H, OC_{3''}OCH₃).

Hesperitin (3)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 55.59 (OC4'OCH₃), 195.90 (C4), 42.19 (C3), 78.26 (C2), 94.98 (C8), 95.54 (C6), 101.79 (C10), 113.98 (C2'), 111.84 (C5'), 117.54 (C6'), 131.13 (C1'), 146.52 (C3'), 147.84 (C4'), 166.67 (C7), 162.75 (C9), 163.56 (C5), [M-H⁻, *m/z* 301].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.11 (s, OH₅), 10.68 (s, OH₇), 9.00 (s, OH_{3'}) 7.00 (d, 1H, H_{2'}, J=1.7), 6.91 (m, 1H, H_{5'}), 6.85 (m, 1H, H_{6'}), 5.86 (d, 2H, H₆ and H₈, J= 2.2), 5.51 (dd, 1H, H₂,

J= 12.09, J= 3.00), 4.00 (s, 3H, C₄OCH₃), 3.57 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.12, J= 12.34), 2.82 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J= 3).

Hesperitin 7-acetate (3a)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 55.59 (OC₄'OCH₃), 21.71 (OC₃'OCH₃), 196.01 (C₄), 42.23 (C₃), 78.71 (C₂), 105.86 (C₈), 102.67 (C₆), 101.80 (C₁₀), 114.03 (C₂'), 111.90 (C₅'), 117.60 (C₆'), 130.67 (C₁'), 146.57 (C₃'), 148.07 (C₄'), 158.01 (C₇), 162.17 (C₉), 162.30 (C₅), 172.04 (COO₇), [M-H⁻, *m/z* 343].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.11 (s, OH₅), 7.00 (d, 1H, H₂', J=1.7), 6.91 (m, 1H, H₅'), 6.85 (m, 1H, H₆'), 6.12 (d, 2H, H₆ and H₈, J= 2.2), 5.51 (dd, 1H, H₂, J=12.09, J=3.00), 4.00 (s, 3H, C₄OCH₃), 3.57 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.12, J= 12.34), 2.82 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J=3), 2.24 (s, 3H, OC₇OCH₃).

Hesperitin 3'-acetate (3b)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 55.59 (OC₄'OCH₃), 21.06 (OC₃'OCH₃), 197.91 (C₄), 42.88 (C₃), 78.17 (C₂), 95.05 (C₈), 95.89 (C₆), 101.87 (C₁₀), 120.52 (C₂'), 112.64 (C₅'), 121.70 (C₆'), 130.50 (C₁'), 130.01 (C₃'), 150.07 (C₄'), 166.07 (C₇), 162.75 (C₉), 162.55 (C₅), 166.94 (COO₃'), [M-H⁻, *m/z* 343].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.11 (s, OH₅), 7.14 (d, 1H, H₂', J=1.7), 6.99 (m, 1H, H₅'), 6.85 (m, 1H, H₆'), 5.88 (d, 1H, H₆, J=2.2), 5.86 (d, 1H, H₈, J=2.2), 5.51 (dd, 1H, H₂, J=12.09, J=3.00), 4.00 (s, 3H, C₄OCH₃), 3.57 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.12, J= 12.34), 2.82 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J=3), 2.3 (s, 3H, OC₃OCH₃).

Naringenin (4)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 196.16 (C₄), 42.08 (C₃), 78.45 (C₂), 94.96 (C₈), 95.93 (C₆), 101.76 (C₁₀), 128.20 (C₂'), 115.16 (C₅'), 128.20 (C₆'), 128.81 (C₁'), 115.16 (C₃'), 157.74 (C₄'), 166.65 (C₇), 162.90 (C₉), 163.55 (C₅), [M-H⁻, *m/z* 271].

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.12 (s, OH₅), 10.69 (s, OH₇), 9.53 (s, OH₄'), 6.77 (d, 2H, H₅' and H₃', J= 8.7), 7.30 (d, 1H, H₆', J= 8.4), 7.28 (d, 1H, H₂', J= 8.4), 5.87 (s, 2H, H₆ and H₈), 5.45 (dd, 1H, H₂, J= 12.84, J= 2.77), 3.14 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.37, J= 12.84), 2.85 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J= 2.77).

Naringenin 4'-acetate (4a)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 20.74 (OC₄'OCH₃), 195.39 (C₄), 42.27 (C₃), 77.91 (C₂), 96.12 (C₈), 95.58 (C₆), 101.67 (C₁₀), 127.67 (C₂'), 121.84 (C₅'), 127.77 (C₆'), 136.15 (C₁'), 121.84 (C₃'), 150.66 (C₄'), 167.07 (C₇), 162.39 (C₉), 163.64 (C₅), 171.97 (COO₄') [M-H⁻, *m/z* 313].

^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.10 (s, OH₅), 7.54 (d, 2H, H_{5'} and H_{3'}, J= 8.7), 7.30 (d, 1H, H_{6'}, J= 8.4), 7.18 (d, 1H, H_{2'}, J= 8.4), 5.90 (s, 2H, H₆ and H₈), 5.48 (dd, 1H, H₂, J= 12.84, J= 2.77), 3.14 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.37, J= 12.84), 2.85 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J= 2.77), 2.24 (s, 3H, OC₄OCH₃).

Naringenin 4',7-diacetate (4b)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 20.82 (OC₄OCH₃), 21.06 (OC₇OCH₃), 196.16 (C₄), 42.27 (C₃), 78.30 (C₂), 105.67 (C₈), 102.82 (C₆), 101.67 (C₁₀), 127.77 (C_{2'}), 121.92 (C_{5'}), 127.77 (C_{6'}), 136.64 (C_{1'}), 121.92 (C_{3'}), 150.50 (C_{4'}), 157.99 (C₇), 161.97 (C₉), 163.64 (C₅), 168.87 (COO₄), 167.87 (COO₇) [M-H⁻, *m/z* 355].

^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.10 (s, OH₅), 7.54 (d, 2H, H_{5'} and H_{3'}, J= 8.7), 7.30 (d, 1H, H_{6'}, J= 8.4), 7.15 (d, 1H, H_{2'}, J= 8.4), 6.31 (s, 2H, H₆ and H₈), 5.50 (dd, 1H, H₂, J= 12.84, J= 2.77), 3.38 (dd, 1H, H_{3a}, J= 17.37, J= 12.84), 2.90 (dd, 1H, H_{3b}, J= 17.12, J= 2.77), 2.24 (s, 6H, OC₄OCH₃ and OC₇OCH₃).

Chrysin (5)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 181.76 (C₄), 105.11 (C₃), 163.02 (C₂), 94.02 (C₈), 98.97 (C₆), 103.95 (C₁₀), 126.27 (C_{2'}), 128.98 (C_{5'}), 126.27 (C_{6'}), 130.69 (C_{1'}), 128.98 (C_{3'}), 131.81 (C_{4'}), 164.39 (C₇), 157.38 (C₉), 161.47 (C₅), [M-H⁻, *m/z* 253].

^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.12 (s, OH₅), 10.16 (s, OH₇), 7.53 (d, 2H, H_{2'} and H_{6'}, J= 16.4), 6.97 (m, 2H, H_{3'} and H_{5'}), 5.80 (s, 1H, H₈), 6.20 (s, 1H, H₃), 5.51 (s, 1H, H₆).

Chrysin 7-acetate (5a)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 20.86 (OC₇OCH₃), 181.76 (C₄), 105.66 (C₃), 163.03 (C₂), 101.46 (C₈), 105.27 (C₆), 108.10 (C₁₀), 126.27 (C_{2'}), 129.00 (C_{5'}), 126.27 (C_{6'}), 130.73 (C_{1'}), 129.00 (C_{3'}), 131.80 (C_{4'}), 156.23 (C₇), 157.42 (C₉), 161.41 (C₅), 182.49 (COO₇), [M-H⁻, *m/z* 295].

^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.10 (s, OH₅), 7.33 (d, 2H, H_{2'} and H_{6'}, J= 16.4), 6.87 (m, 2H, H_{3'} and H_{5'}), 6.37 (s, 1H, H₈), 6.20 (s, 1H, H₃), 5.92 (s, 1H, H₆), 2.32 (s, 3H, OC₇OCH₃).

3. Results and discussion

3.1 Effect of the origin of the lipase

According to the literature, several lipases can be used to catalyze esterification or transesterification of flavonoids. However, CAL-B and PSL seem to be the best enzymes for these reactions and have been selected for this study.

- Effect on conversion yield and initial rate

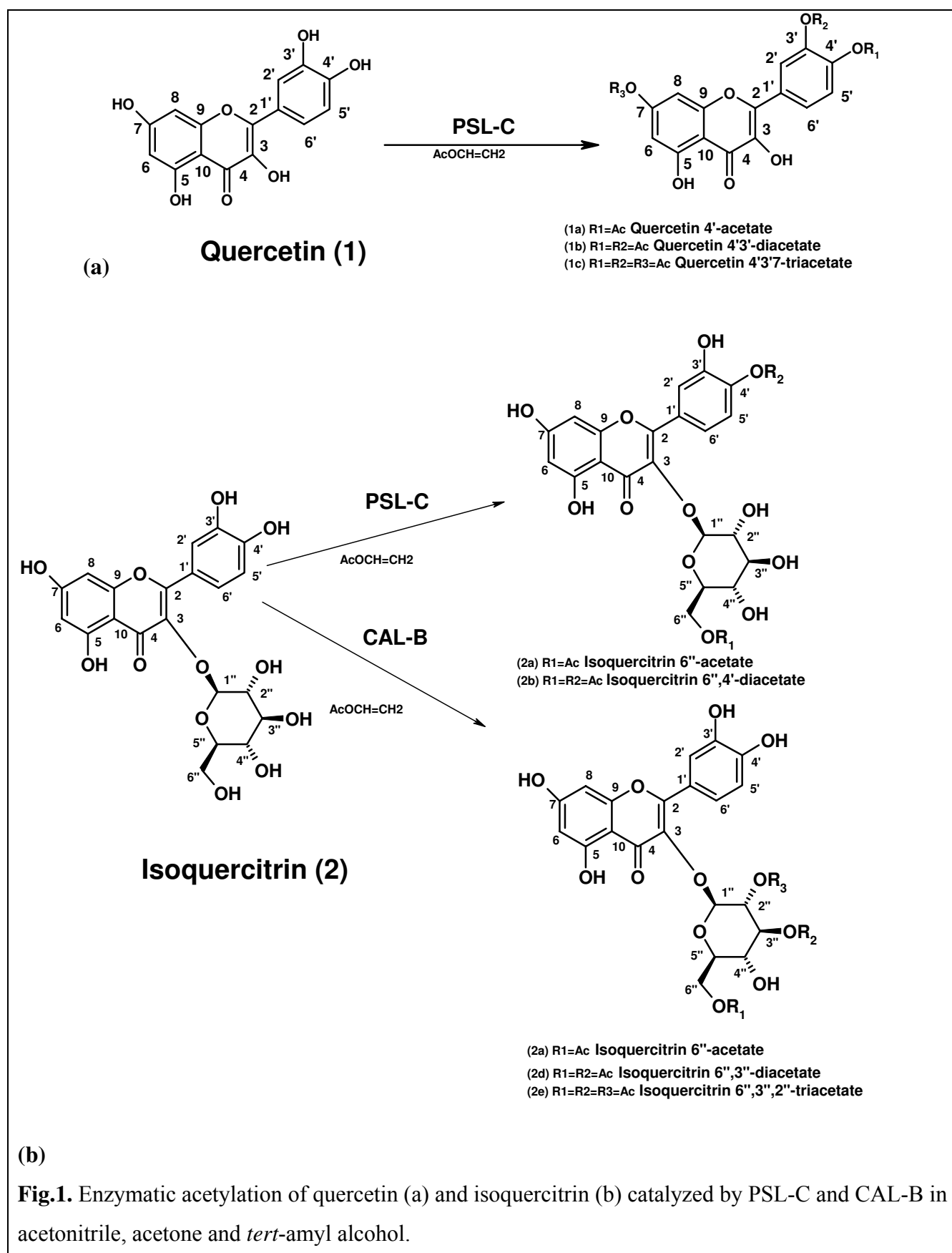
The enzymatic acetylation of quercetin (1) (Fig.1, a) and isoquercitrin (2) (Fig.1, b) was achieved using two enzymes, either CAL-B or PSL-C, in acetone, at 50°C. The molar ratio vinyl acetate to flavonoid was 40.

These two substrates have the same aglycon part. Isoquercitrin (2) is a glycosylated form of quercetin (1), where the sugar part is a glucose linked at position 3 (quercetin 3-β-D-glucoside).

The results obtained are reported in Figs. 2, 3 and 4. Both CAL-B and PSL-C catalyzed the acetylation of isoquercitrin (2), while only PSL-C was active with quercetin (1). As reported by Ardhaoui et al., (2004a) and Stevenson et al., the acetylation of quercetin (1) (aglycon flavonoid) with CAL-B did not occur even for the activated acyl donor. So, it would seem that for the CAL-B the presence of a sugar part is a sine qua none condition for its catalytic activity, while for PSL-C, this condition is not necessary. The non-reactivity of the aglycon phenols with CAL-B can be explained by the difference in the structure of the active site of the enzyme. In fact, the active site of CAL-B is an elliptical funnel characterized by a constant width equal to 4.5 Å, while, for PSL the width of the active site is variable from the base (4.5 Å) to the entrance (10.5 Å) (Pleiss et al., 1998). This wide entrance of the active site of this enzyme seemed to be at the origin of its ability to accept rigid structures like aglycon flavonoid substrates.

The enzymatic acetylation of isoquercitrin (2) by PSL-C in acetone (Fig.2) showed that the consumption of this molecule decreases rapidly to reach a plateau after 20h of incubation. The final conversion yield of isoquercitrin (2) and the initial rate were 100% and 4.9 mM.h⁻¹, respectively. Three products P1, P2 and P3 were synthesized. P1 was produced at the early stage of the reaction. After 2h of incubation, P1 concentration decreases leading to the formation of P2 and P3. Similar profiles have been mentioned by Min Sin et al., (1998) during the synthesis of fructose esters with *Pseudomonas sp.*.

For the acetylation of isoquercitrin (2) with CAL-B in acetone (Fig.3), the HPLC analysis of substrate consumption and products formed indicated, on the one hand, a conversion yield of 100% after 96h of incubation, and on the other hand, the formation of only two products. The initial rate of this reaction (8 mM.h⁻¹), was twice that obtained with PSL-C.



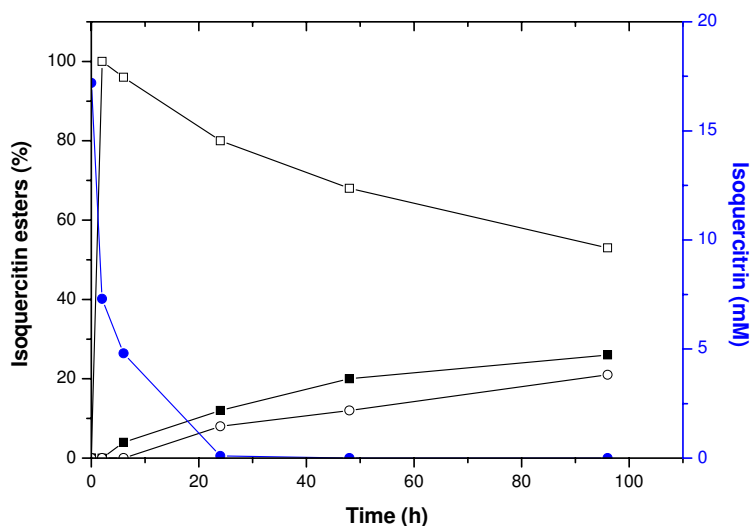


Fig. 2. Reaction progress of isoquercitrin (20mM) acetylation with vinyl acetate (800 mM) catalyzed by PSL-C in acetone at 50°C; (●) isoquercitrin, (□) P1 product, (■) P2 product and (○) P3 product.

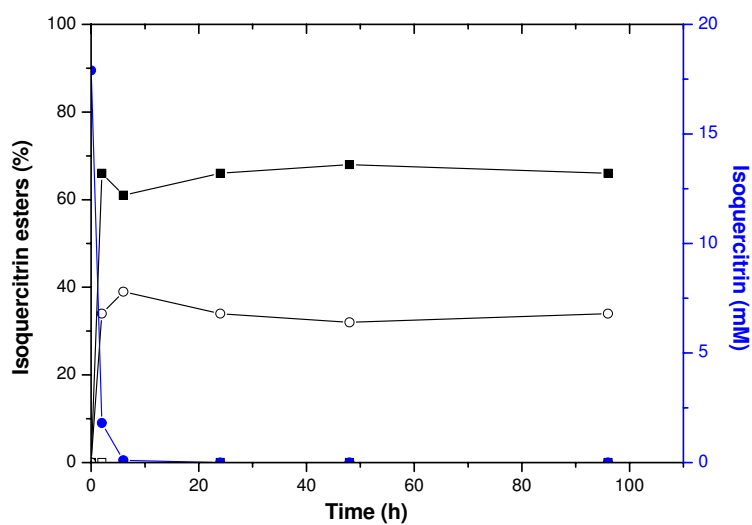


Fig. 3. Reaction progress of isoquercitrin (20mM) acetylation with vinyl acetate (800 mM) catalyzed by CAL-B in acetone at 50°C; (●) isoquercitrin, (■) P1 product and (○) P2 product.

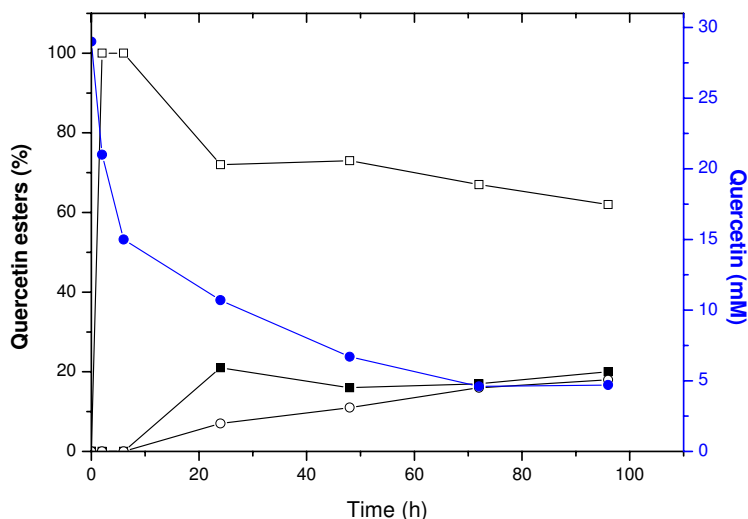


Fig. 4. Reaction progress of quercetin (30mM) acetylation with vinyl acetate (1200 mM) catalyzed by PSL-C in acetone at 50°C; (●) quercetin, (□) P1 product, (■) P2 product and (○) P3 product.

For the aglycon form (quercetin (1)), as previously mentioned, only PSL-C allowed the acetylation of these molecules (Fig 4). This reaction led to the formation of three products. P1 was synthesized in the first step of the reaction then the formation of P2 and P3 was observed. The initial rate and the conversion yield after 96h of incubation were 4 mM.h⁻¹ and 84%, respectively. The comparison of these results to those obtained with isoquercitrin (2) showed that the reaction occurred at a similar initial rate and number of molecules produced. However, the conversion yield of the glycosylated substrate is higher than the aglycon form.

-Effect on regioselectivity

The comparison of FT-IR spectra of quercetin (1) and molecules produced show a significant diminution in the signal width at 3300 cm⁻¹. This behavior could be due to the multiple acetylation on the phenolic ring of the quercetin (1). HPLC-ESI-MS analysis allowed the identification of P1 (1a) as a monoacetate [M-H⁻, *m/z* 343], P2 (1b) as a diacetate [M-H⁻, *m/z* 385] and P3 (1c) as a triacetate [M-H⁻, *m/z* 427] of quercetin (1).

¹H and ¹³C NMR spectra characterization of these esters showed that the three products obtained are successively quercetin 4'-acetate (1a), quercetin 4',3'-diacetate (1b) and quercetin 4',3',7'-triacetate (1c). The location of the acetylated sites was determined by comparing upfield and downfield shifts between products and quercetin (1). ¹³C NMR spectra

shows that the acetylation on the 4'-OH position led to an upfield shift of the C4' signal of -9 ppm and a downfield shift of the C3' and C5' signals (ortho position) of +6 ppm. These shifts are due to the mesomeric effect (Agrawal). Moreover, ¹H NMR analysis indicated a downfield shift of the adjacent proton signal (5'-H) confirming the acetylation on the 4'-OH. Similar shifts were obtained by Natoli et al., (1992) for the chemo-enzymatic acetylation of quercetin.

For isoquercitrin (2), FT-IR analysis indicated a less pronounced diminution of the signal located at 3300 cm⁻¹ suggesting a lower degree of acetylation on the phenolic ring. The HPLC-ESI-MS analysis of the products obtained, after 96h of incubation, showed that three masses were synthesized (P1 (2a), P2 (2b), P3) [M-H⁻, *m/z* 505, 547 and 589]. The ¹H and ¹³C NMR analyses revealed that P1 and P2 are isoquercitrin 6''-acetate (2a) and isoquercitrin 6'',4'-diacetate (2b) successively. P3's structure has not yet been elucidated. As previously described, acetylated sites were located by comparing the signal shifts between isoquercitrin (2) and products ¹H, ¹³C NMR spectra. The acetylation on the glycosidic part provokes a downfield shift of the saturated carbons signal of +2.72 ppm and an upfield shift of the adjacent carbons signal of -3.87 ppm. The downfield shift is due to the inductive attraction of members of the acetate group (Nakajima et al., 1999, Danieli et al., 1997, Agrawal). Moreover, ¹H NMR analysis showed that both the signals of H-6''a and H-6''b were shifted downfield by 0.8 ppm and the signals of H-2' and H-5' were shifted downfield by 0.4 and 0.2 ppm, respectively.

The C6'' signal shifts of isoquercitrin 6'',4'-diacetate (2b) was similar to those described previously. The C4' signal was shifted upfield (-10.7 ppm) whereas C3' and C5' signals were shifted downfield (+7.06 and +4.5 ppm, respectively).

The isoquercitrin 6'',4'-diacetate (2b), observed for first time in this work, indicates that the activity of PSL seemed to be modulated by the nature of the acyl donor used. In fact, Ishihara and Nakajima, (2003) using the same enzyme and substrate but vinyl benzoate as acyl donor, obtained only isoquercitrin 6''-benzoate.

The elucidation of the structures of the two products obtained during the acetylation of isoquercitrin (2) by CAL-B was also investigated by FTIR, HPLC-ESI-MS and NMR analyses. In FT-IR spectra no variation of intensity of the signal at 3300 cm⁻¹ was observed, indicating that the acetylation took place only on the sugar part. The masses obtained by

HPLC-ESI-MS analysis indicated that P1 (2d) and P2 (2c) are isoquercitrin diacetate [$M-H^-$, m/z 547] and isoquercitrin triacetate [$M-H^-$, m/z 589], respectively. 1H and ^{13}C NMR spectra allowed the identification of these products as isoquercitrin 6'',3''-diacetate (2d) and isoquercitrin 6'',3'',2''-triacetate (2c). In the ^{13}C NMR spectrum of isoquercitrin 6'',3''-diacetate, the signals of C-3'' were shifted downfield by 0.6 ppm, whereas C-2'' and C-4'' signals were shifted upfield by -2.4 and -2.13 ppm, respectively. These data are confirmed by the 1H NMR spectrum. The α H-3'' signal was shifted downfield by 1.57 ppm, while the β H-2'' and H4'' signals were shifted downfield by 0.3 ppm.

As in the case of PSL, CAL-B also led, in our operating conditions to a triacetate. For this enzyme Danieli et al., (1997) using the same substrates (molar ratio 10) and solvent as in this work, reported that only a diester in the 6'' and 3''-OH's of the glucose was synthesized. Obtaining of the triester could be attributed to the higher molar acyl donor/flavonoid (40) ratio used in this study. Moreover, the selectivity of the enzyme can be affected also by the nature of the acyl donor. However, Nakajima et al., (1999), using the same enzyme and solvent, have obtained only isoquercitrin 6''-cinnamate.

Moreover, Stevenson et al., have acylated isoquercitrin with 2-hydroxy-phenylpropionic acid (2-OH PPA) in *t*-butanol by CAL-B and observed that the major product was isoquercitrin 6''-2-OH PPA accompanied by several non-identified minor products.

3.2. Effect of the nature of the solvent

The nature of the solvent affects the solubility, the conformation of the substrates (flavonoid, acyl donor), the conformation of the enzyme, the coefficient partition of substrate and products between the active site and used solvent, etc. However, these effects on both the kinetic and the regioselectivity differ from one solvent to another.

-Effect on conversion yield and initial rate

The enzymatic acetylation of glycosylated flavonoid and their aglycon form, such as isoquercitrin (2) and quercetin (1), was investigated in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol using PSL-C as biocatalyst. The results obtained (conversion yield, initial rate) are summarized in Table 1.

Table 1. Conversion yield (a) and initial rate (b) for the acetylation of quercetin and isoquercitrin with vinyl acetate catalyzed by PSL-C in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol after 96h of incubation. Reaction conditions as described in Section 2.

Solvent	Initial rate (mM.h ⁻¹)		Conversion yield (%)	
	Quercetin	Isoquercitrin	Quercetin	Isoquercitrin
Acetonitrile	4	-	96	100
Acetone	4	4.9	84	99
<i>Tert</i> -amyl alcohol	4.9	4	68	98

The comparison of these data indicated that the influence of the nature of the solvent depends on the nature of the flavonoid. For isoquercitrin (2), the nature of the solvent affects neither the conversion yield (100%) nor the initial rate (4-4.9 mM.h⁻¹), while for quercetin (1) the nature of the solvent affects only the conversion yield. Acetonitrile led to the highest amount of esters (conversion yield, 96%). This result is in accordance with that obtained by Lambusta et al., (1993), who studied the effect of several solvents (acetonitrile, tetrahydrofuran, *tert*-amyl alcohol, acetone) on catechin acetylation using PSL and observed that acetonitrile was the most effective. The differing effects of the solvent can be explained by several factors (Log P, dielectric constant (ϵ), solubility, hydrophobicity). Taking to account of the data of Hazarika et al., (2003), Log P and dielectric constant have been shown to be determinant. The Log P and the dielectric constant of acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol are (Log P, ϵ): (-0.33, 35.9), (-0.23, 21), (1.3, 5.8), respectively (Stevenson 2000). It appears that the highest conversion yield was obtained in the solvent having the low Log P and the high dielectric constant (acetonitrile). Similar observations have been reported by Hazarika et al., (2003) and Klibanov (1990).

The results obtained can be also explained by the difference in the molar ratio due to the variation of the solubility in the solvents used. In fact, in acetonitrile, the solubility of quercetin (1) is only 6 mM, while this molecule is totally soluble in the other two solvents. This fact leads to the higher conversion yield obtained in acetonitrile. Moreover, in the case of acetonitrile, the precipitation of products was observed which also favor the shift in the equilibrium of the reaction toward the synthesis route.

-Effect on regioselectivity

For the enzymatic acetylation of quercetin (1) and isoquercitrin (2) in acetonitrile, *tert*-amyl alcohol and acetone three products were obtained: mono, di and triacetate. Figs.2, 4 and 5 summarize the different kinetic profiles of the formation of the products. In all cases, the formation of P2 and P3 is associated with the depletion of quercetin (1) or isoquercitrin (2) and P1.

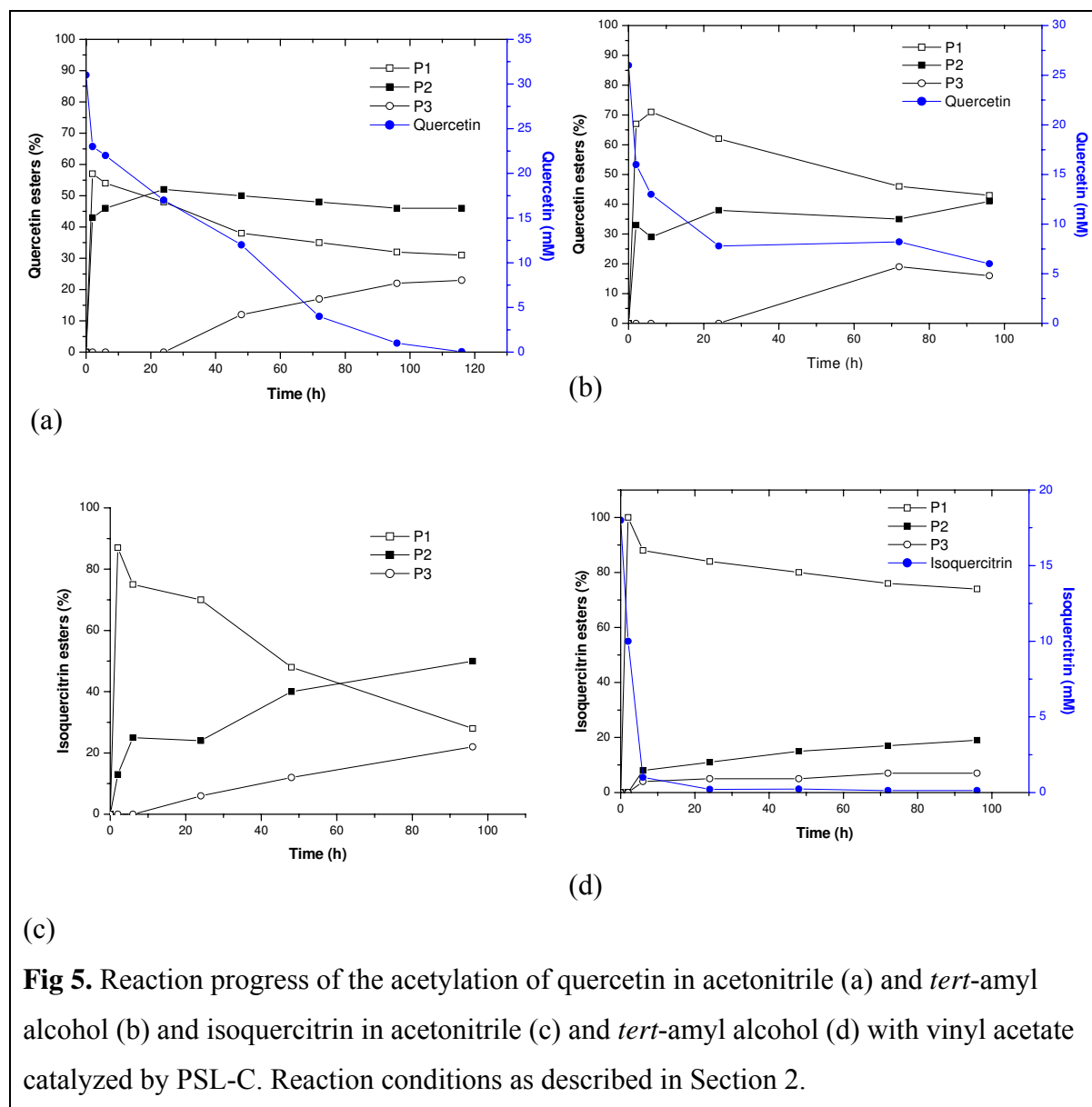


Fig 5. Reaction progress of the acetylation of quercetin in acetonitrile (a) and *tert*-amyl alcohol (b) and isoquercitrin in acetonitrile (c) and *tert*-amyl alcohol (d) with vinyl acetate catalyzed by PSL-C. Reaction conditions as described in Section 2.

The masses and the structures of the products were determined by HPLC-ESI-MS and ^1H , ^{13}C NMR analyses, respectively. No effect on the regioselectivity of the acetylation was observed whatever the solvent used. However, the percentages of mono, di and triacetate, after 96h of incubation, differ with the nature of the flavonoid and the solvent. With isoquercitrin (2), in acetone and *tert*-amyl alcohol, P1 was the most product (60 and 80%, respectively), while in

acetonitrile P2 was the major product (50%). Similar behavior was observed with quercetin (1).

These results are in accordance with those obtained by MacManus et al., (1997) and Lopez et al., (1994), for the acetylation, with PSL, of 6-O-trityl- β -D-glucopyranose and alkyl β -D-Xylopyranosides, respectively. They reported that the relative ratio between the products was dependent on the polarity of the organic solvent.

3.3. Effect of the molar ratio of substrates

The molar ratio affects the equilibrium of the reaction. For this reason the main works carried out in this field mention the use of an excess of acyl donor for flavonoid ester synthesis (Kontogianni et al., 2003, Mellou et al., 2005). However, the molar ratio effect can be modulated by the nature of the substrates and operating conditions.

- Effect on conversion yield and initial rate

The effect of the molar ratio of substrates was investigated in reaction media containing 30 mM of quercetin (1) and 50 g/l of lipase PSL-C. The molar ratio was raised from 5 to 40. The quantification of this effect was evaluated by determining the final conversion yield and the initial rate of the reaction. The results are summarized in Table 2.

Table 2. Effect of the acyl donor/quercetin molar ratio on the reaction rate, the conversion yield and the fractions of products present after 96h of incubation for the acetylation of quercetin (30mM) with vinyl acetate catalyzed by PSL-C in acetonitrile

Molar ratio	Initial reaction rate (mM.h ⁻¹)	Conversion yield (%)	Flavonoid esters produced (%)		
			Monoester	Diester	Triester
5	0.16	55	63	37	*
10	0.5	88	43	50	7
20	1	96	43	51	6
40	4	96	31	46	23

* Not present in the reaction media

These show that both the initial rate and the conversion yield were affected by the molar ratio of substrates. The conversion yield and the initial rate increased when the molar ratio vinyl acetate/ quercetin (1) varied from 5 to 40. Similar behavior has been reported for the

enzymatic acylation of various flavonoids in conventional organic media (Kontogianni et al., 2001, Mellou et al., 2005, Passicos et al., 2004) and ionic liquids (Katsoura et al.) . The influence of the molar ratio of substrates on the conversion yield and initial rate could be attributed to the thermodynamic shift in the equilibrium in favor of the synthesis of quercetin esters due to the vinyl acetate excess.

- Effect on regioselectivity

The effect of the molar ratio of substrates on the regioselectivity of the reaction is summarized in Table 2. For a molar ratio of 5, only mono (63%) and diester (37%) were synthesized. For a higher molar ratio (10, 20, 40), mono, di and triester were formed. Moreover, higher molar ratios favor the synthesis of triester, whilst reducing the synthesis of mono and diester. No further data are available in the literature relating to the effect of the acyl donor/ flavonoid molar ratio on the selectivity of PSL. For CAL-B several works (Arcos et al., 1998a, b) have reported that the formation of triester did not lead to a decrease in monoester.

3.4. Effect of the nature of the flavonoid

The structure of the flavonoid plays a major role in the feasibility of the acylation reaction. Two factors must be considered: the intrinsic chemical reactivity of flavonoid hydroxyls and the selectivity of the enzyme.

- Effect on conversion yield and initial rate

The effect of flavonoid structure on the performance of the acetylation reaction was studied by using quercetin (1), isoquercitrin (2), hesperitin (3), naringenin (4) and chrysin (5), with PSL-C, in acetonitrile, at 50°C. The results obtained are summarized in Table 3.

The best results were obtained with quercetin (1), naringenin (4) and isoquercitrin (2). In fact, conversion yields and initial rates were about 100% and 4 mM.h⁻¹, in the case of quercetin (1) and naringenin (4), while they were limited to 30 and 15% for hesperitin (3) and chrysin (5), respectively.

Table 3. Effect of the nature of the flavonoid on the conversion yield of the acetylation of hesperitin, chrysin, quercetin, naringenin and isoquercitrin with vinyl acetate catalyzed by PSL-C in acetonitrile after 140h of incubation. Reaction conditions as described in Section 2.

Flavonoid	Initial reaction rate (mM.h ⁻¹)	Conversion yield (%)	Flavonoid esters produced (%)		
			Monoesters	Diester	Triester
Hesperitin	-	15	100 (2 isomers, 3a, 3b)	*	*
Chrysin	-	30	100 (5a)	*	*
Quercetin	4	99	31 (1a)	46 (1b)	23 (1c)
Naringenin	4	99	86 (4a)	14 (4b)	*
Isoquercitrin	-	100	28 (2a)	50 (2b)	22 (2c)

* Not present in the reaction media

As the solubilities, at 50°C in acetonitrile, of chrysin (5) (6 mM) and hesperitin (3) (85 mM) were comparable to those of quercetin (1) and naringenin (4) respectively, the difference in reactivity observed could not be attributed to this factor. Nevertheless, these results could be explained by the difference in structure of the five flavonoids tested. Quercetin (1), naringenin (4) and isoquercitrin (2) possess a common 4'-OH group on the B ring. The presence of such a group seems to be at the origin of the high reactivity of these molecules. This reactivity can be also explained by the torsion angles and the number of intra- and intermolecular H-bonds which can differ from one flavonoid to another and can hinder or favor their access to the active site of the enzyme (Cornard et al., 1997).

- Effect on regioselectivity

Fig.6 localizes the different positions of acetylation of the aglycon flavonoids. The masses and the structures of flavonoid esters were determined by HPLC-ESI-MS, and ¹H, ¹³C NMR analyses, respectively. In the case of naringenin (4) two products were obtained: naringenin 4'-acetate (4a) [M-H⁻, *m/z* 313] and then naringenin 4',7-diacetate (4b) [M-H⁻, *m/z* 355]. With hesperitin (3), two isomeric monoesters were detected: hesperitin 7-acetate (3a) and hesperitin 3'-acetate (3b) [M-H⁻, *m/z* 343], while with chrysin (5) only one monoester was formed (chrysin 7-acetate, [M-H⁻, *m/z* 295]). For quercetin (1) and isoquercitrin (2), as previously shown, the acetylation took place on the 4',3' and 7-OH's and 6'', 4'-OH's positions, respectively.

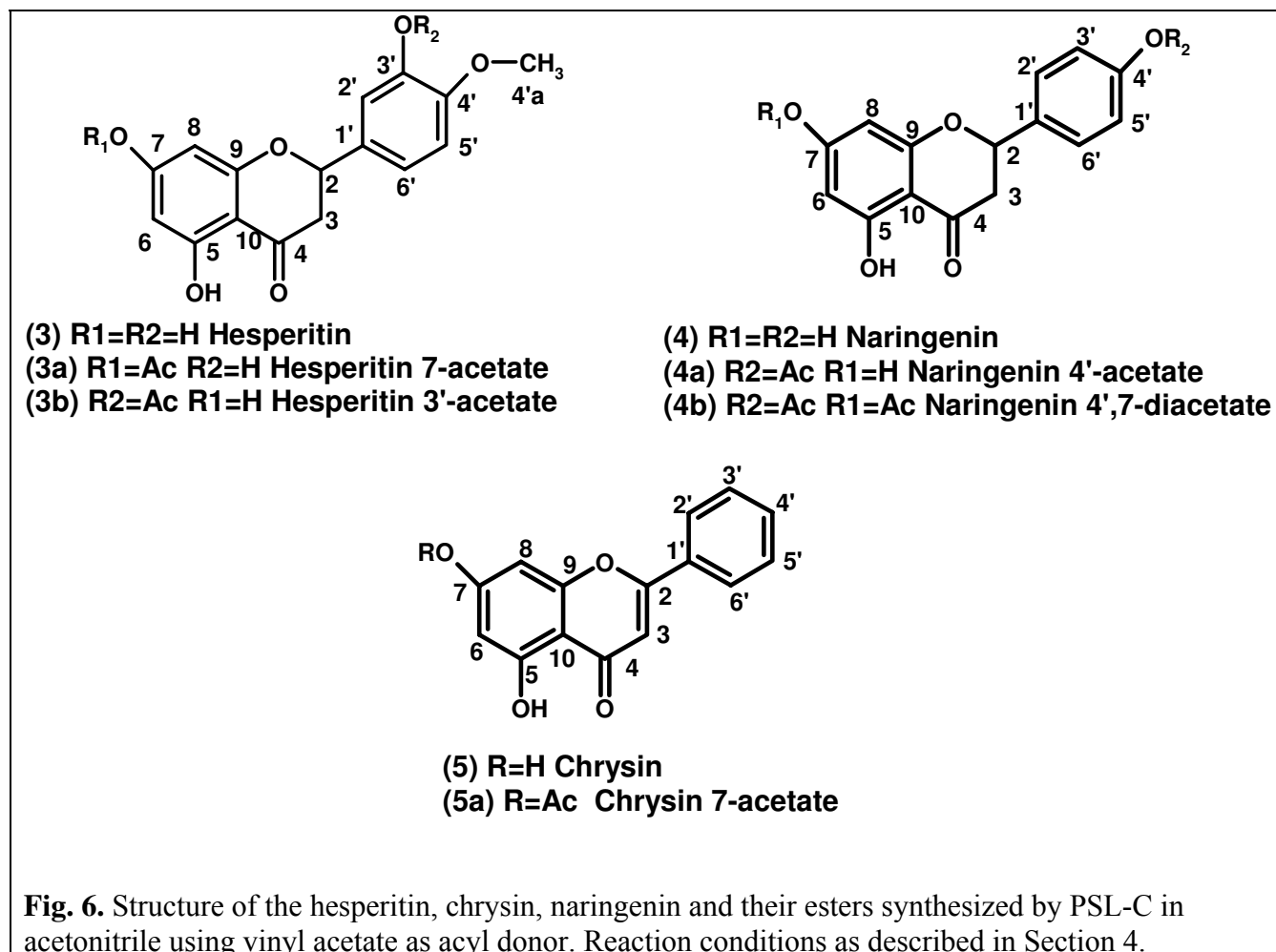


Table 3 summarizes all the results obtained during the acetylation of the five flavonoids by PSL-C. These results show that the regioselectivity of the reaction depends mainly on the class of available hydroxyl group (primary, secondary, phenolic) and their position. When a primer hydroxyl group is present (isoquercitrin (2)), acetylation first took place at this position. This result has already been yet reported in many studies and has been explained by the reactivity and the accessibility of such a group. When only phenolic hydroxyl groups are available, as in the case of quercetin, the acetylation took place successively on the 4'-OH, 3'-OH and 7-OH positions. This order of reactivity for quercetin (1) can be explained, as has been suggested by Cornard et al., (1997) and Russo *and* Uccella, (2000), by the twisting conformation of quercetin (1) which favors the acetylation on the B ring. The high reactivity of 4'-OH group is confirmed by Erkoc et al., (2003) and Van Acker et al., (1996). Moreover, these authors indicated that the acetylation of the 7-OH group instead of the 3-OH and 5-OH groups is probably due to the engagement of these two positions in an intramolecular H-bond. The conclusion of these authors is established from the energy minimization in vacuum.

However, in our operating conditions the presence of the solvent was able to affect the geometry of the quercetin (1) (Colombo et al., 2004).

Concerning naringenin (4), the most preferred hydroxyl group by PSL-C is the 4'-OH (naringenin 4'-acetate (4a), 84% at 140h). For hesperitin (3), with a methoxy group at the C-4' position, PSL-C prefers the 7-OH group at first, followed by the 3'-OH. The low reactivity of the 3'-OH group in the case of hesperitin (3) compared to quercetin (1) seemed to be due to the presence of a methoxy group at the C-4' which can form a steric hindrance.

Finally, with chrysin (5), having only two hydroxyl groups (7, 5-OHs), the acylation took place on the 7-OH. This result confirms that the 5-OH group is not reactive when a 4-oxo group is present in the structure of the flavonoid. The reactivity of the 7-OH group was observed by Shin et al., (1999) during chemical acylation of chrysin. Moreover, in the absence of the 4-oxo group (catechin), Lambusta et al., (1993) have reported that the acetylation of catechin by PSL can take place both on the 5 and 7-OH groups.

4. Conclusion

This study indicates that various factors can strongly affect the performances (reaction initial rate and conversion yield) and the regioselectivity of the enzymatic acetylation of aglycon (quercetin, naringenin, hesperitin and chrysin) and glycosylated (isoquercitrin) flavonoids. The results obtained confirm the non-reactivity of CAL-B with aglycon flavonoids, while PSL-C is able to acylate both aglycon and glycosylated forms. The higher conversion, of about 100%, of the quercetin and naringenin acetylation was obtained in acetonitrile and with a molar ratio of the substrates of 40, in the presence of PSL. In the same operating conditions, the conversion yield of chrysin and hesperitin, was relatively low and equal to 15 and 30%, respectively. The difference in the conversion yields observed with these flavonoids seemed to be due to their structure. Flavonoids with a 4'-OH group are characterized by a high reactivity. Under comparable operating conditions the glycosylated flavonoids allowed a high conversion yield (100%) to be obtained with both enzymes used (CAL-B, PSL-C). For aglycon flavonoids, the regioselectivity of PSL was affected by the structure of the substrates and their molar ratio. With molecules with a 4'-OH, the acetylation takes place at this group followed by 3' and 7-OH's. The presence of vinyl acetate excess favors triester synthesis. For glycosylated forms, in the presence of PSL-C, the acetylation was located firstly on the primary OH of the sugar part to form a monoester and secondly on the 4'-OH's of the phenolic B ring to form a diester. With CAL-B, acting only on the sugar part, the linkage takes place on 6'', 3'' and 2''-OH's groups.

References

- Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier. Berlin, pp. 78-79
- Arcos, J. A., Bernabé, M. and Otero, C. (1998a) Quantitative Enzymatic Production of 1,6-Diacyl Sorbitol Esters. *Biotechnology and Bioengineering*. 60, 53-60.
- Arcos, J. A., Bernabé, M. and Otero, C. (1998b) Quantitative Enzymatic Production of 6-acylglucose Esters. *Biocatal. Biotransform.* 57, 505-509.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G. and Ghoul, M. (2004a) Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29, 63.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J. M., Moussou, P., Pauly, G. and Ghoul, M. (2004b) Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatalysis and biotransformation*. 22, 253-259.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Ognier, S., Engasser, J. M., Moussou, P., Pauly, G. and Ghoul, M. (2004c) Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology*. 110, 265.
- Burda, S. and Oleszek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*. 49, 2774-2779.
- Chebil, L., Falcimaigne, A., Humeau, C., Engasser, J.-M. and Ghoul, M. Enzymatic acylation of flavonoids: A review. *Process Biochemistry*. In Press, Accepted Manuscript.
- Colombo, G., Riva, S. and Danieli, B. (2004) Remote control of enzyme selectivity: the case of stevioside and steviolbioside. *Tetrahedron*. 60, 741-746.
- Cornard, J. P., Merlin, J. C., Boudet, A. C. and Vrielynck, L. (1997) Structural Study of Quercetin by Vibrational and Electronic Spectroscopies Combined with Semiempirical Calculations. *Biospectroscopy*. 3, 183-193.
- Danieli, B., Luisetti, M., Sampognaro, G., Carrea, G. and 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.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capasso, F. (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65, 337.
- Erkoc, S., Erkoc, F. and Keskin, N. (2003) Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 631, 141-146.

- Formica, J. V. and Regelson, W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 33, 1061-1080.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55, 481-504.
- Hazarika, S., Goswami, P. and Dutta, N. N. (2003) Lipase catalysed transesterification of 2-o-benzylglycerol with vinyl acetate: solvent effect. *Chemical Engineering Journal*. 94, 1-10.
- Ishihara, K. and 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.
- Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Tsironis, L., Tselepis, A. D. and Stamatis, H. Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology*. In Press, Corrected Proof.
- Kitao, S., Ariga, T., Matsudo, T. and Sekine, H. (1993) The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 2010-2015.
- Klibanov, A. M. (1990) Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.* 23, 114 - 120.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. and 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.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti V., Stamatis, H. and Kolisis, F. N. (2001) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Europ. J. Lip. Sci. Technol.* 103, 655-660.
- Lambusta, D., Nicolosi, G., Patti, A. and Piattelli, M. (1993) Enzyme-mediated regioprotection-deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin. *Synthesis*. 11, 1155-1158.
- Lopez, R., Montero, E., Sanchez, F., Canada, J. and Fernandez-Mayoralas, A. (1994) Regioselective Acetylations of Alkyl.beta.-D-Xylopyranosides by Use of Lipase PS in Organic Solvents and Application to the Chemoenzymic Synthesis of Oligosaccharides. *J. Org. Chem.* 59, 7027-7032.
- MacManus, D. A. and Vulfson, E. N. (1997) Reversal of regioselectivity in the enzymatic acylation of secondary hydroxyl groups mediated by organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 20, 225-228.

- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A. D., Kolisis, F. N. and Stamatis, H. (2005) Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116, 295-304.
- Min Sin, Y., Woong Choo, K. and Ho Lee, T. (1998) Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas sp.* lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnology letters*. 20, 91-94.
- Miyake, T., Suzuki, K. and Yoneyama, M. (1991) 4G- α -D-glucopyranosyl rutin, and its preparation and uses. EP0420376.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T. and Hamada, H. (1999) Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87, 105-107.
- Natoli, M., Nicolosi, G. and Piattelli, M. (1992) Regioselective alcoholysis of flavonoid acetates with lipase in an organic solvent. *J. Org. Chem.* 57, 5776-5778.
- Passicos, E., Santarelli, X. and Coulon, D. (2004) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnology Letters*. 26, 1073.
- Pleiss, J., Fischer, M. and Schmid, R. D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93, 67-80.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002) Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22, 19-34.
- Russo, N. T., M.; Uccella, N. (2000) Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3232-3237.
- Sakai, M., Suzuki, M., Nanjo, F. and Hara, Y. (1994) 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP0618203.
- Shin, J.-S., Kim, K.-S., Kim, M.-B., Jeong, J.-H. and Kim, B.-K. (1999) Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 9, 869-874.
- Stevenson, C. L. (2000) Characterization of Protein and Peptide Stability and Solubility in Non-Aqueous Solvents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 1, 165-182.
- Stevenson, D. E., Wibisono, R., Jensen, D. J., Stanley, R. A. and Cooney, J. M. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435(R)). *Enzyme and Microbial Technology*. In Press, Corrected Proof.

- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabro, M. L., Stancanelli, R. and Ficarra, P. (2004) Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35, 379-387.
- Van Acker, S. A. B. E. d. G., M. J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. (1996) A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1305-1312.

CONTRIBUTION DE L'ARTICLE

Dans cet article, les effets de l'origine de l'enzyme, de la nature du solvant, du rapport molaire (vinyle acétate/flavonoïde) et de la structure du flavonoïde sur la performance et la régiosélectivité d'acétylation ont été étudiés en comparant deux enzymes (CAL-B, PSL-C), trois solvants (acétone, acétonitrile, *tert*-amyl alcool) et cinq flavonoïdes (isoquercitrine, quercétine, naringénine, hespéritine et chrysine). Les principales contributions sont les suivantes :

- les performances d'acétylation (vitesse initiale et rendement de conversion) dépendent fortement de l'origine de la lipase, de la nature du solvant, du rapport molaire et de la structure du flavonoïde.
- avec CAL-B, seule l'isoquercitrine (glycosylée) a pu être acétylée. Cette enzyme n'accepte pas la forme aglycone. Alors que PSL-C est capable d'acétyler les deux formes de flavonoïdes.
- avec la forme aglycone, des rendements de conversions élevés ont été obtenus avec la quercétine et la naringénine (99%) dans l'acétonitrile avec un rapport molaire vinyle acétate/flavonoïde de 40. Dans les mêmes conditions opératoires d'acétylation, les rendements de conversions de la chrysine et de l'hespéritine, relativement faibles, sont de 15 et 30%, respectivement. La faible réactivité de ces deux molécule a été expliquée par l'absence d'un groupement OH en position 4'. Avec l'isoquercitrine, quel que soit la lipase (CAL-B ou PSL-C) et le solvant, le rendement de conversion est de 100%. La vitesse initiale a été affectée uniquement par l'origine de la lipase. Elle est deux fois plus élevée avec CAL-B (8 mM.h⁻¹).
- le nombre et les proportions relatives des produits, obtenus avec les deux formes de flavonoïdes, varient en fonction de l'origine de l'enzyme, du rapport molaire et la structure du flavonoïde. Pour la chrysine, un seul produit a été obtenu, alors qu'avec

l'isoquercitrine, trois et deux produits ont été obtenus en présence de PSL-C et de CAL-B, respectivement.

- l'utilisation d'un excès de vinyle acétate a favorisé la formation de triesters.

- la régiosélectivité d'acétylation dépend essentiellement de l'origine de l'enzyme et de la structure du flavonoïde. En effet, l'acétylation avec CAL-B a lieu uniquement sur la partie sucre, alors que PSL-C réagit à la fois sur la partie sucre et sur la génine. Avec CAL-B, l'acétylation a lieu dans l'ordre suivant : 6''-OH, 3''-OH et 2''-OH. Pour PSL-C, en présence de l'isoquercitrine, l'ordre de réactivité est le suivant : 6''-OH et 4'-OH. Lors de l'acétylation des formes aglycone, l'ordre de réactivité est le suivant : 4'-OH, 3'-OH et 7'-OH.

CHAPITRE IV.2

*Effet de la nature du donneur d'acyle sur le rendement de conversion et la régiosélectivité de la lipase de *Pseudomonas cepacia**

CHAPITRE IV.2: EFFET DE LA NATURE DU DONNEUR D'ACYLE **SUR LE RENDEMENT DE CONVERSION ET LA** **REGIOSELECTIVITE DE LA LIPASE DE *PSEUDOMONAS CEPACIA***

Les effets de la nature du solvant et du rapport molaire (DA/F) sur les performances et la régiosélectivité d'acétylation de la quercétine par PSL-C ont été étudiés dans le chapitre IV.1. Nous avons observé que le meilleur solvant et rapport molaire sont respectivement l'acétonitrile et 40. En utilisant ces mêmes conditions de synthèse, l'effet de la nature du donneur d'acyle a été réalisé en présence de vinyle propionate, vinyle butyrate, vinyle laurate, vinyle cinnamate, méthyle laurate et acide laurique.

1. FAISABILITE DES REACTIONS D'ACYLATION

Les rendements de conversion obtenus, après 140h d'incubation, suite à l'acylation de la quercétine par les différents donneurs d'acyle en présence de PSL-C sont récapitulés dans la figure 1.

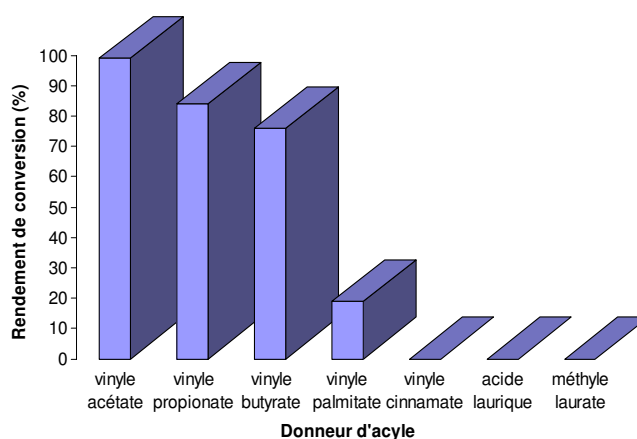


Figure 1. effet de la nature et de la longueur de la chaîne aliphatique du donneur d'acyle sur le rendement de conversion de la quercétine.

La comparaison des performances de conversion de la quercétine par différents vinyles esters montre que le rendement de conversion dépend de la longueur de la chaîne carbonée du

donneur d'acyle. Le rendement le plus élevé, 99%, a été obtenu avec le vinyle acétate suivi du vinyle propionate, 84%, du vinyle butyrate, 76% et du vinyle palmitate, 19%. Aucune réaction n'a été observée en présence de vinyle cinnamate, de méthyle laurate et d'acide laurique. Cette tendance, en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, a été observée par Mellou *et al.* (2005) (1) et Kasoutra *et al.* (2006) (2) lors de l'acylation de la rutine et de la naringine par plusieurs vinyles esters dans des solvants organiques et des liquides ioniques en présence de CAL-B. L'effet de la longueur de la chaîne carbonée a été étudié aussi par Ardhaoui *et al.* (2004) (3) en présence de CAL-B comme biocatalyseur, la rutine et l'esculine comme donneurs d'alcool et des acides gras de différentes longueur de chaîne carbonée comme donneurs d'acyle. Ces auteurs ont reporté une augmentation du taux de conversion pour des acides allant jusqu'à C₁₂, puis de C₁₂ à C₁₈ une faible diminution des performances. Par contre, Kontogianni *et al.* (2001) (4), en utilisant la même enzyme et les mêmes substrats, n'ont pas observé d'effet de la nature du donneur d'acyle (C₈-C₁₂) sur le rendement de conversion de la rutine. En utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia*, d'autres auteurs ont indiqué que les rendements de conversion du fructose sont meilleurs en présence d'acide gras de longueur de chaîne carbonée de C₁₂ à C₁₄ (5).

La non-réactivité du vinyle cinnamate n'est pas attendue. En effet, Gao *et al.* (2001) (6), en présence de ce donneur d'acyle, ont réussi d'acyler des flavonoïdes glycosylés.

En ce qui concerne la non-réactivité des méthyles esters (caprate, butyrate, myristate et laurate) et de l'acide laurique comme donneurs d'acyle, il s'avère que la présence d'une fonction vinylique est essentielle pour l'activité de PSL-C. L'acylation des flavonoïdes par la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été toujours conduite en présence de vinyles esters (4, 7-9). Ceci a été motivé par la formation de produits irréversibles (10, 11).

2. REGIOSELECTIVITE DE LA LIPASE DE PSEUDOMONAS CEPACIA

L'évolution de la consommation de la quercétine et l'apparition des produits d'acylation par les vinyles propionate et butyrate a été suivie pendant 140h (Figure 2, a et b).

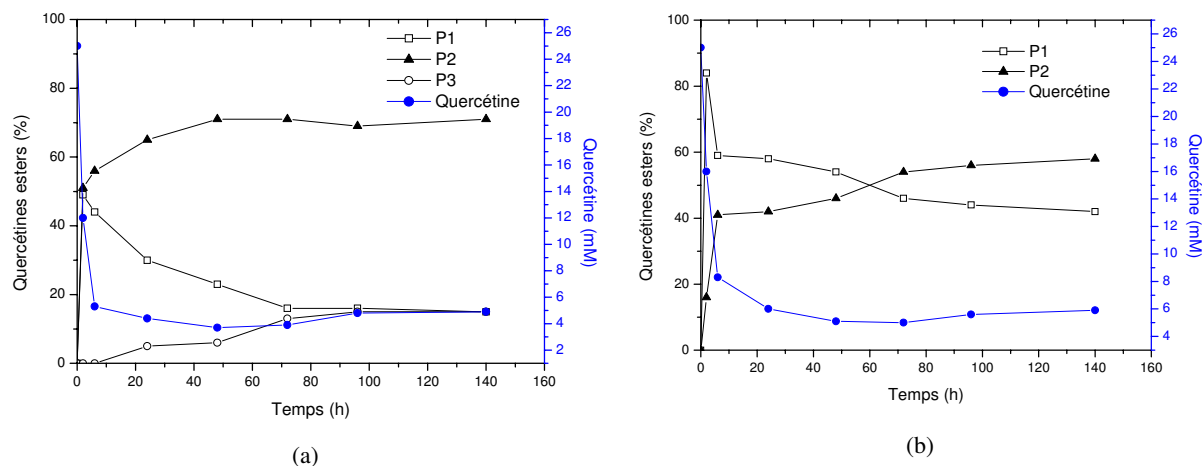


Figure 2. cinétique d'acylation de la quercétine en présence de vinyle propionate (a) et de vinyle butyrate (b)

Les résultats obtenus en présence de vinyle propionate montrent un profil semblable à celui observé lors de l'acylation de la quercétine par du vinyle acétate (Chapitre IV.1). Trois produits P1, P2 et P3 sont synthétisés. P1 est rapidement consommé, en même temps que la quercétine, pour former P2 et P3. L'équilibre réactionnel est atteint au bout de 96h. En présence de vinyle butyrate, seulement 2 produits sont synthétisés (P1 et P2). Ainsi, il semble que l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée affecte la régiosélectivité de la lipase.

Les produits issus des deux réactions ont été identifiés par LC-MS et RMN (^{13}C). Le tableau 1 récapitule les masses et les déplacements chimiques des différents produits synthétisés.

Tableau 1. Masse et déplacements chimiques de la quercétine et de ses esters

	Quercétine [M-H ⁻ , m/z 301]	Quercétine 4'-butyrate [M-H ⁻ , m/z 371]	Quercétine 4',3'-dibutyrate [M-H ⁻ , m/z 441]	Quercétine 4'- propionate [M-H ⁻ , m/z 357]	Quercétine 4',3'- dipropionate [M-H ⁻ , m/z 413]	Quercétine 4',3',7- tripropionate [M-H ⁻ , m/z 469]
C al1		17.43	17.54	26.71	26.91	26.97
C al1'		17.45			26.92	27.11
C al1''						27.23
C al2		34.58	34.79			
C al2'		34.74				
OC ₃ OCH ₃		12.78			8.91	8.76
OC ₇ OCH ₃						8.97
OC ₄ OCH ₃		12.74	12.83	9.15	8.94	8.62
C4	175.87	175.35	175.58	175.97	176.05	177.01
C3	135.75	135.59	136.51	135.96	136.29	137.21
C2	146.82	145.01	144.67	145.33	145.43	145.18
C8	93.38	93.09	93.97	93.52	93.64	104.10
C6	98.21	98.04	97.87	98.31	98.46	107.54
C10	103.05	102.89	102.82	103.11	103.32	103.48
C2'	115.10	123.11	118.20	116.43	122.78	123.05
C5'	115.63	122.22	122.12	122.40	123.01	123.02
C6'	120.01	125.87	125.15	125.80	126.20	126.49
C1'	122.00	129.15	128.94	129.32	129.54	129.70
C3'	145.07	143.30	151.01	151.07	143.45	143.45
C4'	147.71	142.51	139.34	138.53	141.32	141.32
C7	163.90	163.79	164.18	164.22	164.31	155.21
C9	156.17	156.17	155.89	155.95	156.47	156.61
C5	160.75	160.63	160.54	161.06	161.13	160.05
COO ₃		169.41			171.49	171.77
COO ₄		169.41	169.96	171.26	171.26	171.98
COO ₇						172.05

Le tableau 1 montre qu'il s'agit de mono, di et triesters de quercétine. En comparant ces résultats à ceux obtenus précédemment avec le vinyle acétate, il s'avère que la longueur de la chaîne carbonée n'a pas d'influence sur la position d'acylation, mais par contre sur le nombre de produits synthétisés. L'acylation est favorisée en premier lieu en position 4'-OH suivie par 3'-OH et 7-OH.

REFERENCES

1. Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H., Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* **2005**, 116, (3), 295-304.
2. Katsoura, M. H.; Polydera, A. C.; Tsironis, L.; Tselepis, A. D.; Stamatis, H., Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof.
3. Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; Engasser, J. M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M., Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology* **2004**, 110, (3), 265-272.
4. Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N., Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Europ. J. Lip. Sci. Technol* **2001**, 103, 655-660.
5. Min Sin, Y.; Woong Choo, K.; Ho Lee, T., Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas sp.* lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnology letters* **1998**, 20, (1), 91-94.
6. Gao, C.; Mayon, O.; MacManus, D. A.; Vulfson, E. N., Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnology and bioengineering* **2001**, 71, (3), 235-243.
7. Ishihara, K.; Nakajima, N., Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 23, (2-6), 411-417.
8. Nakajima, N.; Ishihara, K.; Hamada, H.; Kawabe, S.-I.; Furuya, T., Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2000**, 90, (3), 347-349.
9. Lambusta, D.; Nicolosi, G.; Patti, A.; Piattelli, M., Enzyme-mediated regioprotection-deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin. *Synthesis* **1993**, 11, 1155-1158.
10. Keller, R.; Holla, W.; Fulling, G., Method for the enzymatic racemate resolution of racemic alcohols with/in vinyl esters by transesterification. *US4963492* **1990**.
11. Degueil-castaing, M.; De jeso, B.; Drouillard, S.; Maillard, B., Enzymatic reactions in organic synthesis: 2-ester interchange of vinyl esters. *Tetrahedron letters* **1987**, 28, (9), 953-954.

CHAPITRE V

*MODELISATION MOLÉCULAIRE
APPLIQUÉE AUX FLAVONOÏDES*

CHAPITRE V.1

Modélisation moléculaire de flavonoïdes dans le vide

CHAPITRE V.1. MODELISATION MOLECULAIRE DE FLAVONOÏDES DANS LE VIDE

1. ETUDE CONFORMATIONNELLE DES FLAVONOÏDES	154
1.1. Cas de la quercétine, de chrysin, de l'isoquercitrine et leurs dérivés acétylés.....	154
1.1.1. Cas de la quercétine, de la chrysin et de l'isoquercitrine	154
1.1.2. Cas des dérivés acétylés	156
1.2. Cas de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés.....	158
1.3. Conclusion.....	159
2. ETUDE DES PROPRIETES ELECTRONIQUES DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS RADICAUX.....	159
2.1 Cas des molécules parents.....	160
2.2. Cas des radicaux cations	164
3. RELATION DES PROPRIETES ELECTRONIQUES, STERIQUES ET HYDROPHOBES AVEC L'ACTIVITE ANTI-RADICALAIRE.....	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173

*****FIGURES*****

Figure V.1.1. graphe « cluster » de la quercétine 4'-acétate construit après dynamique moléculaire : choix des conformères les plus probables	153
Figure V.1.2. localisation des angles de torsion.....	154
Figure V.1.3. structures optimisées (AM1) de la quercétine (a), la chrysin (b) et l'isoquercitrine (c).....	154
Figure V.1.4. structures optimisées des dérivés acétylés de la quercétine, de la chrysin et de l'isoquercitrine	156
Figure V.1.5. structures optimisées de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés.....	158

Figure V.1.6. représentation de la HOMO des différents flavonoïdes étudiés (méthode semi-empirique AM1).....	164
Figure V.1.7. densité de spin du radical cation de la quercétine, l'isoquercitrine, la chrysinine, la naringénine, l'hésperitine et leurs dérivés acétylés.....	167
Figure V.1.8. relations entre l'activité anti-radicalaire et le potentiel d'ionisation (IP) (a), l'excès de charge sur la double liaison C2-C3 (Q C2-C3) (b), la charge sur l'O4' (Q4') (c), l' E_{LUMO} (d), l' E_{HOMO} (e), la différence entre l' E_{LUMO} et l' E_{HOMO} (Eg) (f) et le moment dipolaire (μ) (g).....	169

*****TABLEAUX*****

Tableau V.1.1. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires de la quercétine, de la chrysinine et de l'isoquercitrine.....	155
Tableau V.1.2. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des dérivés acétylés de la quercétine, de la chrysinine et de l'isoquercitrine.	157
Tableau V.1.3. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires de la naringénine, de l'hésperitine et de leurs dérivés acétylés.....	159
Tableau V.1.4. comparaison des propriétés électroniques de la quercétine, de l'isoquercitrine et de la chrysinine avec leurs dérivées acétylés.....	161
Tableau V.1.5. comparaison des propriétés électroniques de la naringénine et l'hésperitine avec leurs dérivées acétylés.....	162
Tableau V.1.6. propriétés énergétiques, électroniques et structurales des radicaux cations de quercétine, de l'isoquercitrine, la chrysinine et de leurs dérivées acétylés.....	165
Tableau V.1.7. propriétés énergétiques, électroniques et structurales des radicaux cations de la naringénine, de l'hésperitine et de leurs dérivées acétylés.....	165
Tableau V.1.8. Propriétés stériques, hydrophobe et TEAC des flavonoïdes étudiés.....	168
Tableau V.1.9. comparaison des grandeurs IP, QC2-C3, Eg, μ et Q4' des dérivés acétylés par rapport à celles des molécules natives et évolution du TEAC attendue.....	171

CHAPITRE V.1. MODELISATION MOLECULAIRE DE FLAVONOÏDES DANS LE VIDE

La modélisation moléculaire de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la chryisine, de la naringénine, de l'hésperitine et de leurs dérivés acétylés, dans le vide, a été effectuée en combinant des calculs de dynamique moléculaire, de mécanique moléculaire et de mécanique quantique (AM1) avec les logiciels Insight II et Hyperchem[®] 7.5. Ces approches ont été utilisées par de nombreux auteurs pour l'étude de la structure des flavonoïdes. Elles semblent donner des résultats concluants pour des temps de calcul limités.

Pour déterminer les conformères de plus basse énergie, nous avons utilisé en première étape la dynamique moléculaire, qui elle permet d'explorer de manière exhaustive l'espace conformationnel du système. Les conditions de la simulation de la dynamique moléculaire, réalisée avec Insight II (module Discover), sont une température élevée de 600°K (afin d'explorer également les conformations de haute énergie), un temps de calcul de 1 ns avec un pas de temps pour intégrer les équations du mouvement de 1fs, un champ de force type CVFF (Consistent Valence Force Field) et une génération de 1000 conformères. La « ressemblance » de structure entre les différents conformères de flavonoïdes est évaluée en calculant le RMSD (*Root Mean Square Distance*).

Le RMSD est la distance moyenne entre les positions des atomes de deux structures superposées. Il est calculé par la formule suivante:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

où δ est la distance entre N paires d'atomes équivalents.

En traçant un graphe « *cluster* » (figure V.1.1), qui est une représentation sur deux dimensions du RMSD de chaque conformation par rapport à toutes les autres, on extrait les structures les plus probables. Les différents intervalles de RMSD sont représentés par différents codes de couleurs.

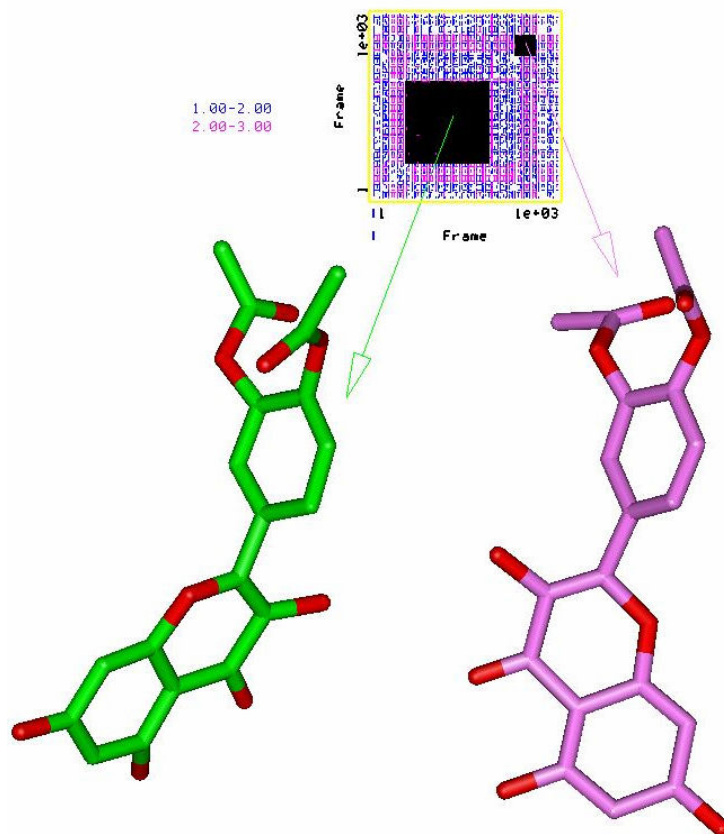


Figure V.1.1. graphe « cluster » de la quercétine 4'-acétate construit après dynamique moléculaire : choix des conformères les plus probables

Les structures sélectionnées, ayant la probabilité la plus élevée, sont minimisées par mécanique moléculaire (CVFF). L'optimisation de la géométrie des conformères minimisés a été ensuite réalisée par la méthode semi-empirique AM1 en utilisant une méthode de gradient conjugué avec les équations de Hartree-Fock (HF) non-restreint. Ainsi, les descripteurs moléculaires reliés aux propriétés électroniques, stériques et hydrophobiques (chapitre II, paragraphe 6.4) du conformère ayant l'énergie la plus basse ont pu être calculés par le biais du logiciel HyperChem[®] 7.5.

Les radicaux cations des flavonoïdes et de leurs esters, résultants de l'abstraction d'un électron, ont été modélisés par la méthode semi-empirique AM1 avec un traitement Hartree-Fock non-restreint.

Les résultats issus de la modélisation moléculaire ont été exploités, dans ce qui suit, pour comparer la conformation et les propriétés électroniques des différents flavonoïdes et de leurs dérivés modifiés par acétylation et essayer de retrouver d'éventuelles corrélations entre structure et activité, de manière à prédire les propriétés des produits acétylés.

1. ETUDE CONFORMATIONNELLE DES FLAVONOÏDES

Dans le cas des molécules aglycones (quercétine, naringénine, chrysin et hespéritine), les changements au niveau de la structure sont essentiellement dus à l'angle dièdre θ entre le cycle B et le reste de la molécule (figure V.1.2). Cet angle est affecté par la présence ou non d'une double liaison en position C2-C3. Pour les flavonoïdes porteurs d'un sucre comme l'isoquercitrine (glucose en position C3 de la génine), d'autres angles sont susceptibles de varier (figure V.1.2).

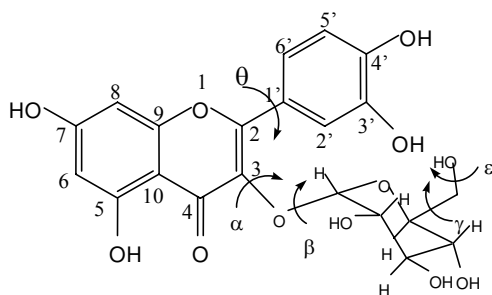


Figure V.1.2. localisation des angles de torsion

1.1. Cas de la quercétine, de chrysin, de l'isoquercitrine et leurs dérivés acétylés

1.1.1. Cas de la quercétine, de la chrysin et de l'isoquercitrine

Les structures de la quercétine, de l'isoquercitrine et de la chrysin, obtenues après minimisation sont regroupées dans la figure V.1.3.

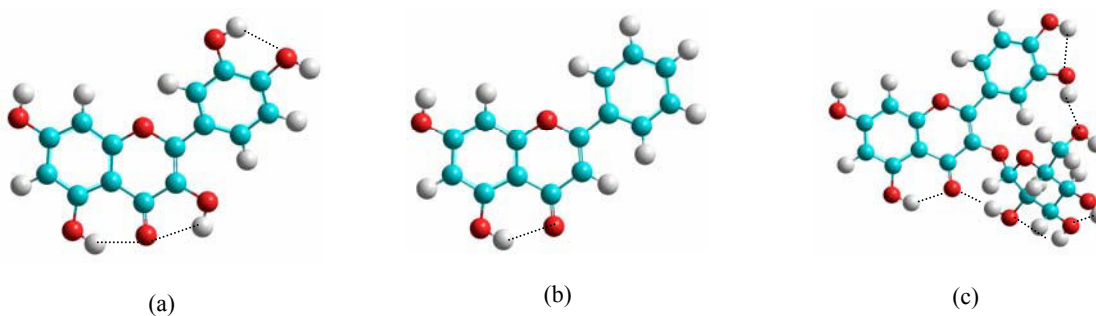


Figure V.1.3. structures optimisées (AM1) de la quercétine (a), la chrysin (b) et l'isoquercitrine (c)

Les conformations ayant les plus basses énergies ont été obtenues pour la quercétine, la chryisine et l'isoquercitrine avec des valeurs de θ respectivement de -26.5° , -25.3° et -24.4° (tableau V.1.1). Ces résultats montrent que ces structures ne sont pas planes. Pour la quercétine, la présence de trois liaisons hydrogènes entre C4=O et O3-H, entre C4=O et O5-H et entre O4'-H et O3'-H permettent sa stabilisation. Pour la chryisine, la liaison hydrogène entre C4=O et O5-H est la seule présente. Pour l'isoquercitrine, nous retrouvons les liaisons C4O-H-O5 et O4'-H-O3' présentes dans la quercétine plus d'autres liaisons hydrogènes (O3'-H-O6'', O3''-H-O4'', O2''-H-O3'', O2''-H-C4O). Ce réseau de liaisons hydrogène (6) observé est accompagné par le repliement du glucose du côté du cycle B de la génine pour former une liaison hydrogène entre O3'-H et O6''-H de 2.10 Å.

Tableau V.1.1. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires de la quercétine, de la chryisine et de l'isoquercitrine.

	Quercétine	Chryisine	Isoquercitrine
Enthalpie (kcal/mol)	-216.41	-85.06	-449.34
Angle ($^\circ$)			
θ	-26.5	-25.3	-24.4
α			127.68
β			-95.87
γ			-73.29
ε			-69.74
Liaisons hydrogènes (Å)			
O3-H-C4O	2.20		
C4O-H-O5	2.00	1.99	1.99
O4'-H-O3'	2.25		2.25
O3'-H-O6''			2.18
O3''-H-O4''			2.36
O2''-H-O3''			2.50
O2''-H-C4O			2.21

En ce qui concerne la quercétine, des résultats similaires (non planéité) ont été observés par Russo *et al.* (2000) (1) et Rodriguez *et al.* (2). D'autres auteurs ont reporté au contraire une planéité de la quercétine. C'est le cas de Van Acker *et al.* (1996) (3), Erkoç *et al.* (2003) (4), Mendoza-Wilson *et al.* (2004) (5), Kim *et al.* (2006) (6) qui ont observé un angle θ allant de 0 à 1.2° . Ces variations sont dues aux méthodes de calculs qui diffèrent d'un travail à un autre. Il paraît donc que la méthode AM1 ne reproduit pas la planéité de telles molécules mais elle reste valable pour comparer, dans les mêmes conditions, différentes molécules du point de vue angles de torsion et formation de liaisons hydrogènes.

Pour l'isoquercitrine, le seul travail réalisé par Cornard *et al.* (1999) (7) montre que la structure ayant la plus faible énergie a la même enthalpie de formation et les mêmes

paramètres structuraux (angles de torsions et liaisons hydrogènes) que le conformère obtenu dans ce travail.

1.1.2. Cas des dérivés acétylés

Les conformères les plus stables des dérivés acétylés de la quercétine, la chryisine et l'isoquercitrine sont représentés dans la figure V.1.4.

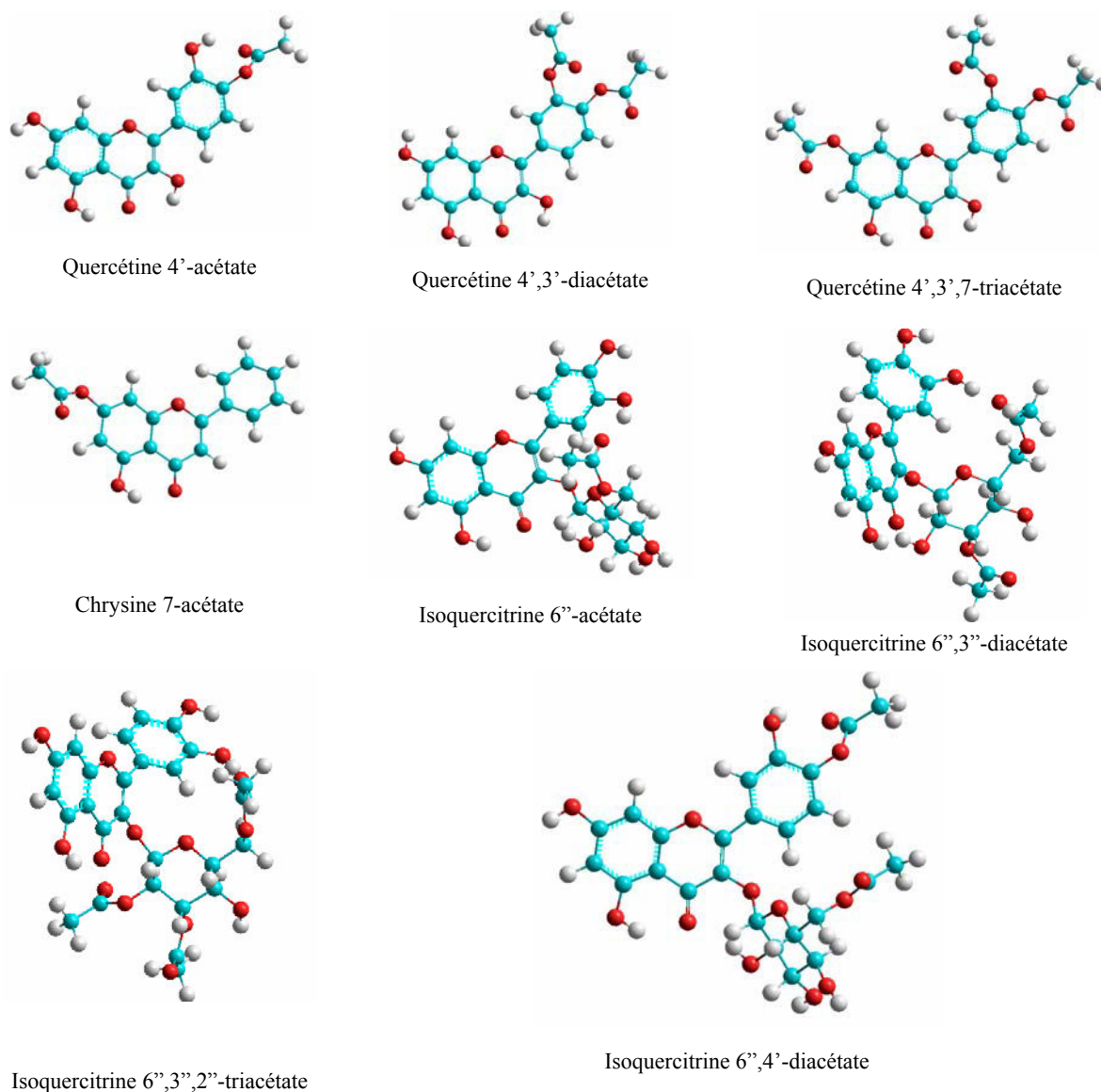


Figure V.1.4. structures optimisées des dérivés acétylés de la quercétine, de la chryisine et de l'isoquercitrine

Les conformations des molécules acétylées diffèrent de celles des molécules initiales et ceci en fonction du nombre de groupements acétates et de leurs positions. Le tableau V.1.2, récapitule les paramètres structuraux qui montrent le changement de conformation des molécules initiales. Il s'agit essentiellement de la valeur des angles de torsions et du nombre

et de la position des liaisons hydrogènes. En effet, pour la quercétine 4'-acétate, l'ajout d'un groupement acétate augmente l'angle θ de 6° et conduit à la formation d'une nouvelle liaison hydrogène (Cester O-H-O3') suite à la rupture de la liaison O4'-H-O3'. Pour la quercétine 4',3'-diacétate et la quercétine 4',3',7-triacétate, une diminution de l'angle θ a été observée. Une diminution du nombre total de liaisons hydrogènes est observée.

En ce qui concerne la chryisine 7-acétate, l'angle θ est de même ordre de grandeur que celui de la chryisine (-25.3°). De plus, aucun changement n'a été noté au niveau des liaisons hydrogènes. Donc, l'acétylation en position 7 semble ne pas avoir d'effet sur la conformation de la chryisine.

Pour les isoquercitrines acylées uniquement sur la partie sucre, une diminution de la valeur de l'angle θ a été observée et ceci avec le rajout de groupement acétate. Ceci a été accompagné d'une diminution du nombre de liaisons hydrogènes. De plus, les angles γ et ε diminuent, ce qui éloigne la partie sucre du cycle B.

Pour l'isoquercitrine 6'', 4'-diacétate, une légère augmentation de la valeur des angles θ et ε a été observée au niveau de l'isoquercitrine. La faible variation de l'angle ε pourrait être due à la forte liaison hydrogène qui s'est créée entre Cester O et O3'-H.

Tableau V.1.2. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des dérivés acétylés de la quercétine, de la chryisine et de l'isoquercitrine.

	Quercétine 4'-acétate	Quercétine 4',3'-diacétate	Quercétine 4',3',7-triacétate	Chryisine 7-acétate	Isoquercitrine 6''-acétate	Isoquercitrine 6'',3''-diacétate	Isoquercitrine 6'',3'',2''-triacétate	Isoquercitrine 6'',4''-diacétate
Enthalpie (kcal/mol)	-248.14	-274.05	-310.95	-116.73	-487.05	-522.22	-554.88	-513.90
Angle ($^\circ$)								
θ	-20.2	20.1	20.4	-25.3	-35.7	-39.2	-50.9	-19.9
α					131.70	130.55	131.85	126.35
β					-100.88	-99.72	-86.13	-96.26
γ					-179.52	-179.08	-171.51	-170.22
ε					83.02	86.53	77.95	-65.11
Liaisons hydrogènes (Å)								
O3-H-C4O	2.20	2.20	2.21					
C4O-H-O5	2.00	2.00	1.99	1.99	1.99	1.99	1.97	1.99
O4'-H-O3'					2.25	2.25	2.25	
CesterO-H-O3'	2.20				2.15	2.15	2.19	2.10
CesterO-H-O4''						2.24		
O4''-H-O6''					2.41			
O3''-H-O4''					2.40			2.44
O2''-H-O3''					2.46			2.47
O2''-H-C4O					2.20	2.20		2.25

1.2. Cas de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés

La figure V.1.5 regroupe les conformations les plus stables de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés.

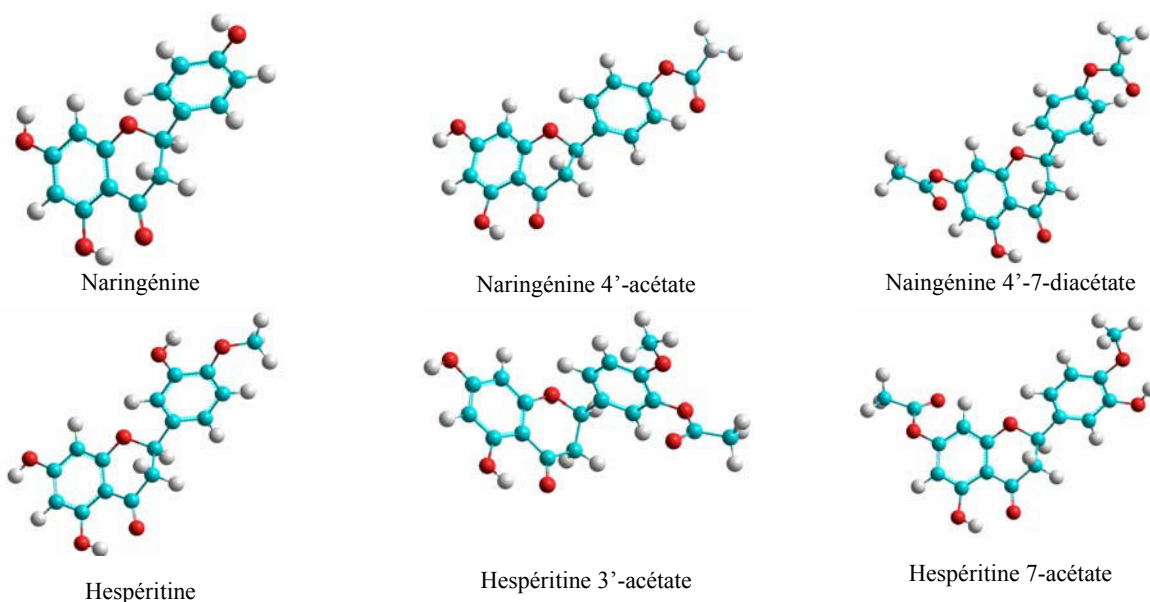


Figure V.1.5. structures optimisées de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés

Pour la naringénine et l'hespéritine, l'absence de double $C2_{sp^2}-C3_{sp^3}$ leur donne un angle θ d'environ 40° . La naringénine possède une seule liaison hydrogène ($C4O-H-O5$) et qui existe dans presque la totalité des structures. L'hespéritine possède en plus une liaison hydrogène entre $O3'-H-O4'$ (tableau V.1.3).

La structure de la naringénine a été optimisée par Erkoç *et* Erkoç (2002) (8) et Van Acker *et al.* (1996) (3) en utilisant respectivement la méthode AM1 et HF/STO-3G. Ces auteurs ont observé que la structure de la naringénine est non plane.

Pour les dérivés acétylés de la naringénine, l'angle θ a une valeur de 35° . En ce qui concerne l'hespéritine 7-acétate, l'ajout d'un groupement acétate en position 7 n'a pas d'effet sur le nombre de liaisons hydrogène, ni l'angle θ . Pour l'hespéritine 3'-acétate, l'ajout d'une fonction acétate en position 3' accentue le repliement du cycle B vers la partie génine du fait de la diminution de l'angle θ de 30° .

Tableau V.1.3. enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés

	Naringénine	Naringénine 4'-acétate	Naringénine 4',7 -diacétate	Hespéritine	Hespéritine 3'-acétate	Hespéritine 7- acétate
Enthalpie (kcal/mol)	-153.55	-179.00	-217.73	-191.28	-221.21	-222.71
Angle θ ($^{\circ}$)	40.5	34.2	35.8	39.9	-170.2	-149.8
Liaisons hydrogènes (Å)						
C4O-H-O5	1.99	1.99	1.99	1.99	1.99	1.99
O3'-H-O4'				2.23		2.23

1.3. Conclusion

L'optimisation de la géométrie de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la chrysin, de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés a montré que :

- l'angle de torsion θ est affecté par le degré de saturation de la liaison C2-C3.
- l'acétylation semble avoir, dans certains cas, un effet sur l'orientation du cycle B par rapport au reste de la génine et de la partie sucre par rapport au reste de la molécule.

Ces modifications au niveau des conformations sont dues à des différents types d'interaction. Elles sont essentiellement guidées par la formation de liaisons hydrogènes. Ces variations peuvent affecter les propriétés physiques et chimiques des différentes molécules.

Toutefois, les résultats obtenus doivent être analysés avec précaution. En effet, ces calculs réalisés, dans ce travail, par la méthode utilisée (AM1) doivent être confirmés par d'autres méthodes plus poussées. Egalement, il faudrait avec des moyens de calcul plus importants, mener d'une manière plus exhaustive la recherche conformationnelle pour les différentes molécules.

2. ETUDE DES PROPRIETES ELECTRONIQUES DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS RADICAUX

Les propriétés électroniques des flavonoïdes et de leurs radicaux ont été souvent utilisées pour corréler la structure à l'activité antioxydante. En effet, dans la plupart des travaux, le radical phénoxy en position O4'H, le plus stable, a été choisi pour comparer la capacité anti-radicalaire de plusieurs flavonoïdes à travers la différence entre l'enthalpie de formation du radical et celle de la molécule parent (BDE, Bond Dissociation Enthalpie) (1, 3,

4, 9-12). Sachant que cette position (O4'H) est réactive dans la plupart des réactions d'acétylation, il est impossible de procéder de cette manière pour les dérivés acétylés. Une autre approche consiste à générer des radicaux cation, par abstraction d'un électron, pour essayer de trouver des corrélations entre les propriétés électroniques des molécules et pouvoir anti-radicalaire.

2.1 Cas des molécules parents

En utilisant les structures optimisées des différents flavonoïdes initiaux et de leurs dérivés acétylés, un certain nombre de propriétés électroniques a pu être déterminé (tableaux V.1.4 et V.1.5).

A partir des valeurs de l'énergie des orbitales moléculaires, la plus haute occupée (HOMO) et la plus basse vacante (LUMO), le caractère donneur et accepteur d'électron peut être déduit. Les valeurs obtenues pour la quercétine et la naringénine sont comparables à celles reportées respectivement par Erkoç *et* Erkoç (2003) (4) et Erkoç *et* Erkoç (2002) (8).

En ce qui concerne le reste des propriétés électroniques, des valeurs comparables à celle reportées par Da silva *et al.* (2004) (13) ont été obtenues pour la quercétine et la naringénine.

Tableau V.1.4. comparaison des propriétés électroniques de la quercétine, de l'isoquercitrine et de la chryisine avec leurs dérivées acétylés

	Quercétine	Quercétine 4'-acétate	Quercétine 4',3'- diacétate	Quercétine 4',3',7'- triacétate	Isoquercitrine	Isoquercitrine 6''-acétate	Isoquercitrine 6'',3''-diacétate	Isoquercitrine 6'',3'',2''- triacétate	Isoquercitrine 6'',4''-diacétate	Chryisine	Chryisine 7-acétate
E _{HOMO}	-8.96	-9.05	-8.93	-9.01	-8.92	-8.90	-8.73	-8.8	-9.29	-9.27	-9.185
E _{LUMO}	-0.97	-0.98	-0.76	-0.84	-1.08	-1.07	-1.02	-0.85	-1.16	-0.93	-0.88
E _g	7.99	8.07	8.17	8.16	7.84	7.83	7.71	7.75	8.12	8.34	8.30
χ	4.95	5.01	4.84	4.92	5.00	4.98	4.87	5.40	5.22	5.1	5.03
μ	2.89	2.04	5.36	6.11	1.61	3.71	3.04	3.29	2.19	5.15	5.19
POL	28.53	32.30	36.05	39.81	41.96	45.72	49.47	49.47	53.23	26.63	30.09
QO1	-0.123	-0.119	-0.126	-0.111	-0.127	-0.123	-0.121	-0.119	-0.126	-0.135	-0.133
QO3	-0.234	-0.233	-0.234	-0.210	-0.190	-0.182	-0.181	-0.173	-0.189		
QO4	-0.356	-0.358	-0.292	-0.305	-0.375	-0.371	-0.374	-0.356	-0.367	-0.346	-0.344
QO7	-0.235	-0.235	-0.239	-0.235	-0.234	-0.234	-0.236	-0.237	-0.235	-0.237	-0.237
QO5	-0.243	-0.246	-0.206	-0.245	-0.243	-0.244	-0.247	-0.250	-0.246	-0.247	-0.245
QO3'	-0.243	-0.242	-0.224	-0.221	-0.276	-0.276	-0.280	-0.278	-0.273		
QO4'	-0.262	-0.232	-0.228	-0.219	-0.241	-0.243	-0.244	-0.244	-0.221		
QC2	0.073	0.071	0.058	0.016	0.145	0.146	0.167	0.137	0.139	0.138	0.141
QC3	-0.078	-0.075	-0.076	-0.065	-0.112	-0.118	-0.135	-0.103	-0.106	-0.288	-0.291
QC2-C3	-0.005	-0.004	-0.018	-0.049	0.033	0.028	0.032	0.034	0.033	-0.15	-0.15

E_{HOMO} (eV): énergie de l'orbitale la plus haute occupée ; E_{LUMO} (eV): énergie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante ; E_g (eV): différence d'énergie entre la LUMO et la HOMO ; χ (eV): électronégativité ; μ (D): moment dipolaire; POL : (\AA^3) : polarisabilité ; Q : excès de charge

Tableau V.1.5. comparaison des propriétés électroniques de la naringénine et l'hésperitine avec leurs dérivés acétylés
 E_{HOMO} (eV): énergie de l'orbitale la plus haute occupée ; E_{LUMO} (eV): énergie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante ;

	Naringénine	Naringénine 4'-acétate	Naringénine 4',7- diacétate	Hésperitine	Hésperitine 7- acétate	Hésperitine 3'- acétate
E_{HOMO}	-9.32	-8.74	-9.20	-9.1	-9.07	-9.11
E_{LUMO}	-0.587	-0.335	-0.682	-0.55	-0.68	-0.53
Eg	8.73	8.40	8.52	8.55	8.39	8.58
χ	4.95	4.53	4.94	4.82	4.87	4.82
μ	3.74	3.62	5.41	3.45	4.72	2.48
POL	27.46	31.21	34.97	29.93	33.69	33.69
QO1	-0.204	-0.196	-0.203	-0.198	-0.201	-0.198
QO4	-0.333	-0.336	-0.329	-0.335	-0.329	-0.332
QO7	-0.238	-0.242	-0.237	-0.239	-0.236	-0.240
QO5	-0.248	-0.246	-0.246	-0.251	-0.250	-0.251
QO3'				-0.243	-0.245	-0.226
QO4'	-0.247	-0.240	-0.234	-0.227	-0.227	-0.199
QC2	0.080	0.093	0.080	0.082	0.054	0.085
QC3	-0.235	-0.235	-0.235	-0.235	-0.237	-0.232
QC2-C3	-0.155	-0.142	-0.155	-0.153	-0.183	-0.147

Eg (eV): différence d'énergie entre la LUMO et la HOMO ; χ (eV): électronégativité ; μ (D): moment dipolaire ; POL (\AA^3) : polarisabilité ; Q : excès de charge

Pour visualiser la contribution des différents atomes pour la HOMO, cette dernière a été représentée sous forme de surfaces pour toutes les molécules (figures V.1.6).

Pour la quercétine, la quercétine 4'-acétate, la quercétine 4',3'-diacétate, l'isoquercitrine et ses dérivés acétylés, la contribution de la HOMO est localisée sur le cycle B, la double liaison C2-C3 et la fonction carbonyle C4=O. Pour la quercétine 4',3',7-triacétate, la chrysinine et la chrysinine 7-acétate, cette orbitale est localisée majoritairement au niveau du cycle A, la double liaison C2-C3 et la fonction carbonyle C4=O. L'effet de l'acylation sur la position de la HOMO n'a été observé que dans le cas de la quercétine 4',3',7-triacétate.

Pour la naringénine et ses dérivés acétylés, la contribution de la HOMO est localisée uniquement au niveau du cycle A.

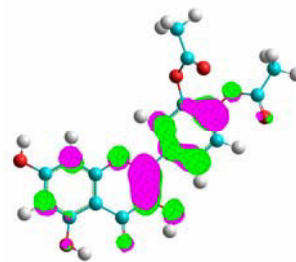
En ce qui concerne l'hésperitine et ses dérivés acétylés, la HOMO est présente sur le cycle B. A travers cette répartition de la HOMO, la localisation des cycles à partir desquels le transfert d'électron peut avoir lieu est déterminée.



Quercétine



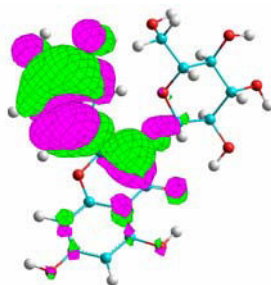
Quercétine 4'-acétate



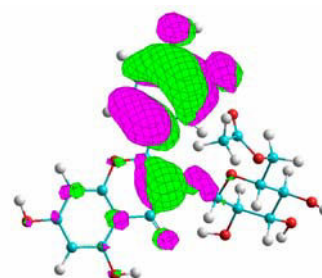
Quercétine 4',3'-diacétate



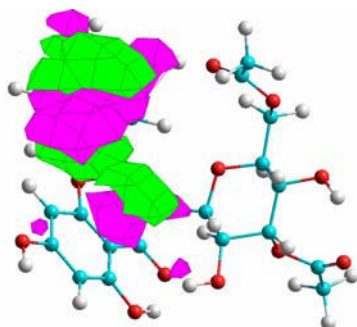
Quercétine 4',3',7-triacétate



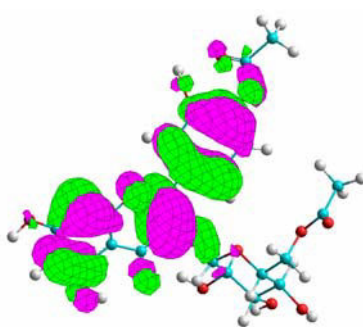
Isoquercitrine



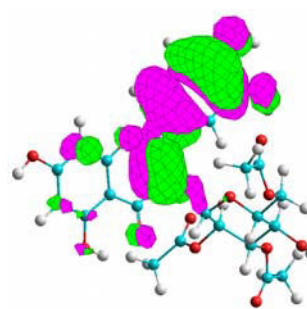
Isoquercitrine 6''-acétate



Isoquercitrine 6'',3''-diacétate



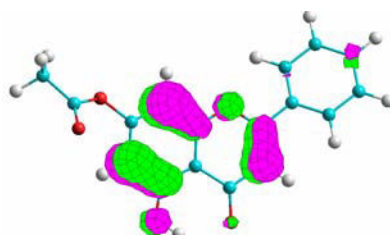
Isoquercitrine 6'',3'',2''-triacétate



Isoquercitrine 6'',4''-diacétate



Chryisine



Chryisine 7-acétate



Naringénine

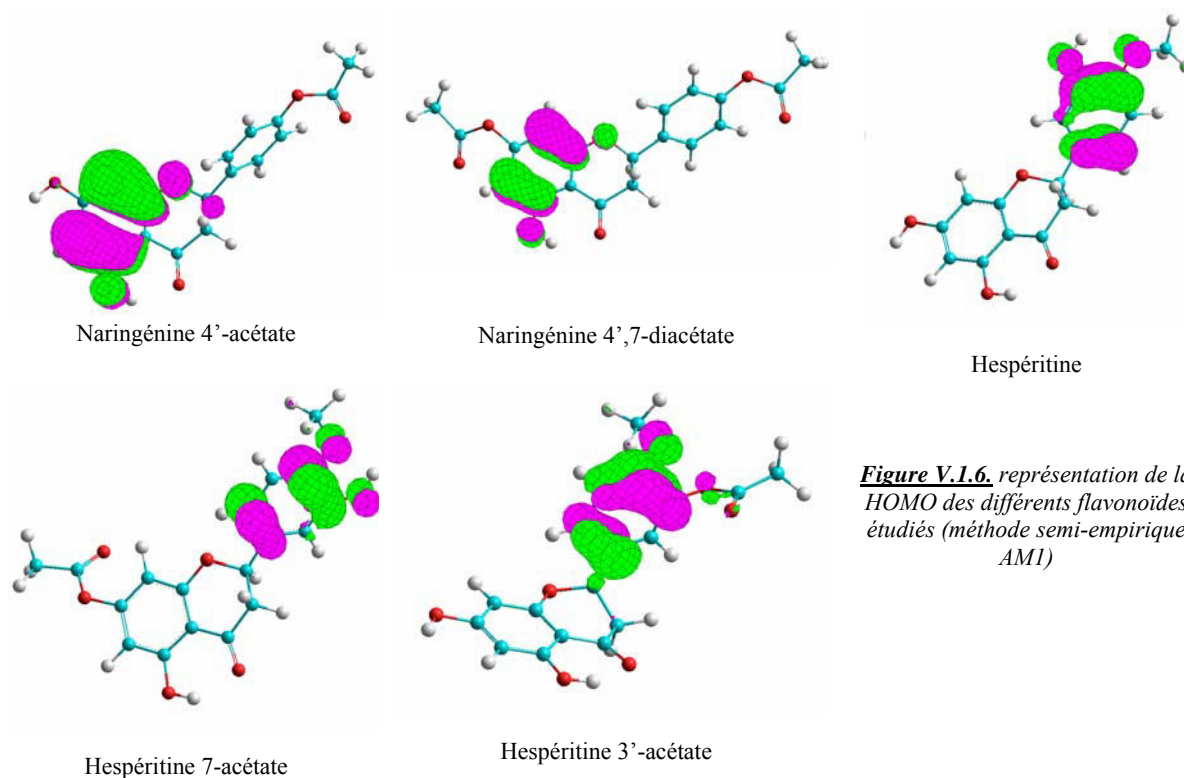


Figure V.1.6. représentation de la HOMO des différents flavonoïdes étudiés (méthode semi-empirique AM1)

2.2. Cas des radicaux cations

Dans le but d'étudier l'activité anti-radicalaire par le mécanisme de transfert mono-électronique, un électron a été éliminé de la HOMO des molécules parents pour obtenir des radicaux cations ($\text{ArOH}^{\bullet+}$). Les paramètres énergétiques, électroniques et structuraux des radicaux cations sont récapitulés dans le tableau V.1.6 pour la quercétine, l'isoquercitrine, la chrysin et leurs dérivés acétylés et dans le tableau V.1.7 pour la naringénine, l'hespéritine et leurs dérivés acétylés.

En comparant les paramètres des radicaux avec ceux des molécules parents (tableau V.1.4 et tableau V.1.5), il en ressort que suite à l'élimination d'un électron de la HOMO :

- l'enthalpie de formation des espèces radicalaires est plus élevée que celle des flavonoïdes parents. La différence entre ces enthalpies (potentiel adiabatique, IP) varie entre 174.80 et 196.51 kcal/mol. Pour les flavonoïdes non acétylés, la quercétine et la naringénine présentent respectivement le IP le plus faible (182.39 kcal/mol) et le plus élevé (196.51 kcal/mol). Pour les molécules acétylés, l'isoquercitrine 6'',3'',2''-triacétate et l'hespéritine 3'-acétate ont respectivement le IP le plus faible (174.80 kcal/mol) et le plus élevé (189.49 kcal/mol).

Tableau V.1.6. propriétés énergétiques, électroniques et structurales des radicaux cations de quercétine, de l'isoquercitrine, la chrysinne et de leurs dérivées acétylés

	Quercétine (R)	Quercétine 4'-acétate (R)	Quercétine 4',3'- diacétate (R)	Quercétine 4',3',7'- triacétate (R)	Isoquercitrine (R)	Isoquercitrine 6''-acétate (R)	Isoquercitrine 6'',3''-diacétate (R)	Isoquercitrine 6'',3'',2''- triacétate (R)	Isoquercitrine 6'',4'-diacétate (R)	Chrysinne (R)	Chrysinne 7-acétate (R)
ΔH	-34.02	-65.20	-96.16	-124.70	-268.98	-307.88	-344.81	-380.08	-328.39	108.73	73.26
μ (D)	8.26	3.17	3.43	5.91	10.05	11.55	11.01	7.16	7.32	4.91	3.90
Angle ($^\circ$)											
θ	0.3	-6.5	5.4	-124.7	-8.4	-8.7	-22.5	-18.5	-10.6	-25.3	-24.4
α					135.5	140.3	140.2	155.8	140.9		
β					-101.7	-109.3	-109.3	-102.3	-103.9		
γ					-144.8	-166.8	-163.6	-171.2	-152.5		
ε					-83.7	77.1	77.1	71.6	-67.8		
IP	182.39	183.12	177.89	182.52	180.36	179.17	177.41	174.80	185.51	193.79	188.99

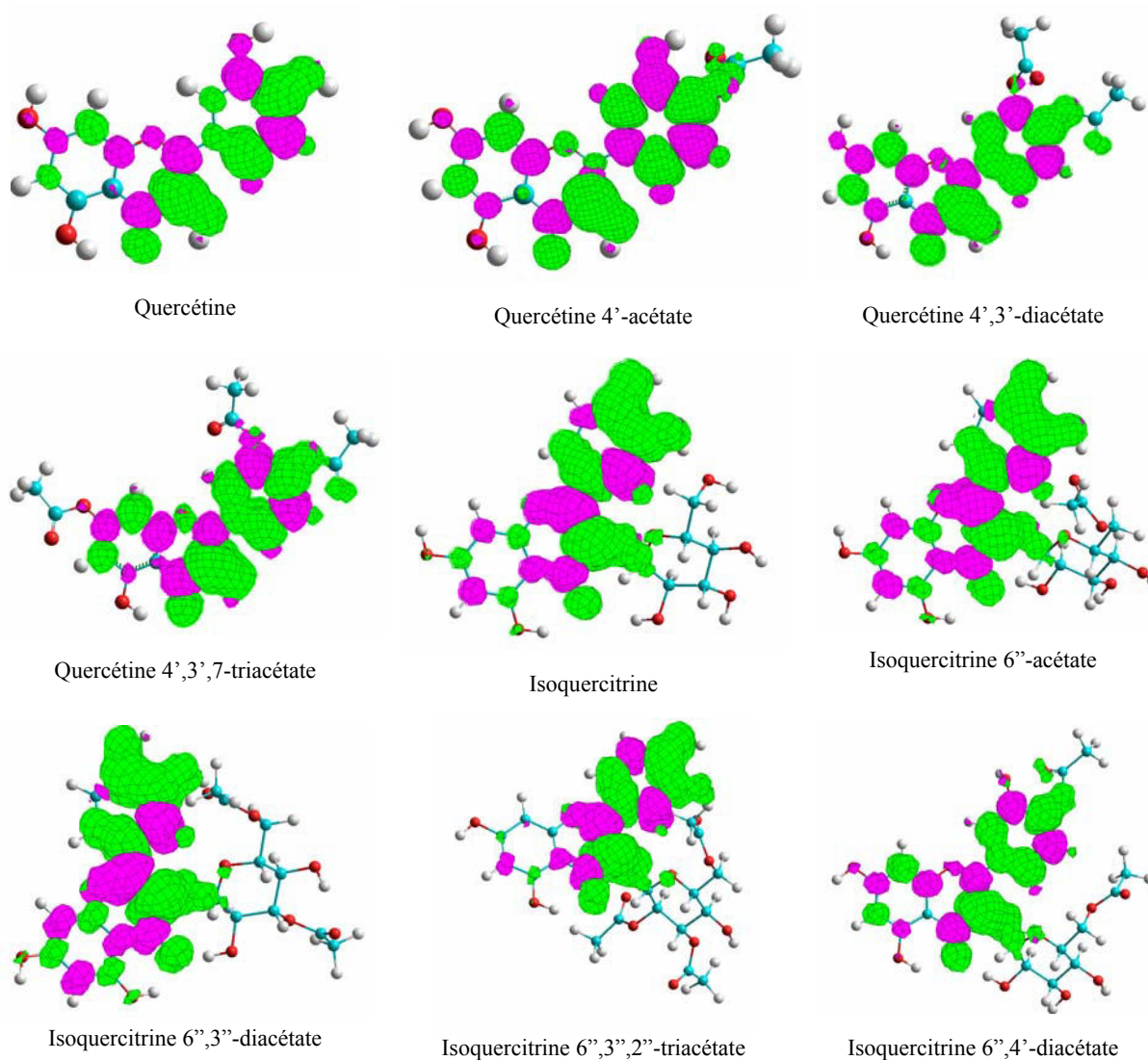
(R) : radical cation ; ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol) ; IP: potentiel adiabatique, différence entre l'enthalpie de formation du radical et de la molécule parent (kcal/mol)

Tableau V.1.7. propriétés énergétiques, électroniques et structurales des radicaux cations de la naringénine, de l'hésperitine et de leurs dérivées acétylés

	Naringénine (R)	Naringénine4'- acétate (R)	Naringénine 4',7'- diacétate (R)	Hésperitine (R)	Hésperitine 7- acétate (R)	Hésperitine 3'- acétate (R)
ΔH	42.96	3.41	-31.26	-3.90	-36.15	-31.72
μ (D)	18.59	10.55	7.71	16.84	18.14	10.45
Angle θ ($^\circ$)	-171.2	65.7	64.9	10.1	-171.9	-170.6
IP	196.51	182.41	186.47	187.38	186.56	189.49

- pour certaines molécules, les espèces radicalaires possèdent un moment dipolaire plus élevé que la molécule parent. Pour d'autres, il s'agit du contraire.
- les espèces radicalaires de la quercétine et la naringénine sont planes. Dans le cas de l'isoquercitrine et de l'héspéritine, une augmentation et une diminution respectives de l'angle θ de 16 à 29° ont été observées. Par contre, pour l'espèce radicalaire de la chryisine, l'angle θ reste constant.

La densité de spin des radicaux cations de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la chryisine, de la naringénine, de l'héspéritine et de leurs dérivés acétylés est donnée dans la figure V.1.7.



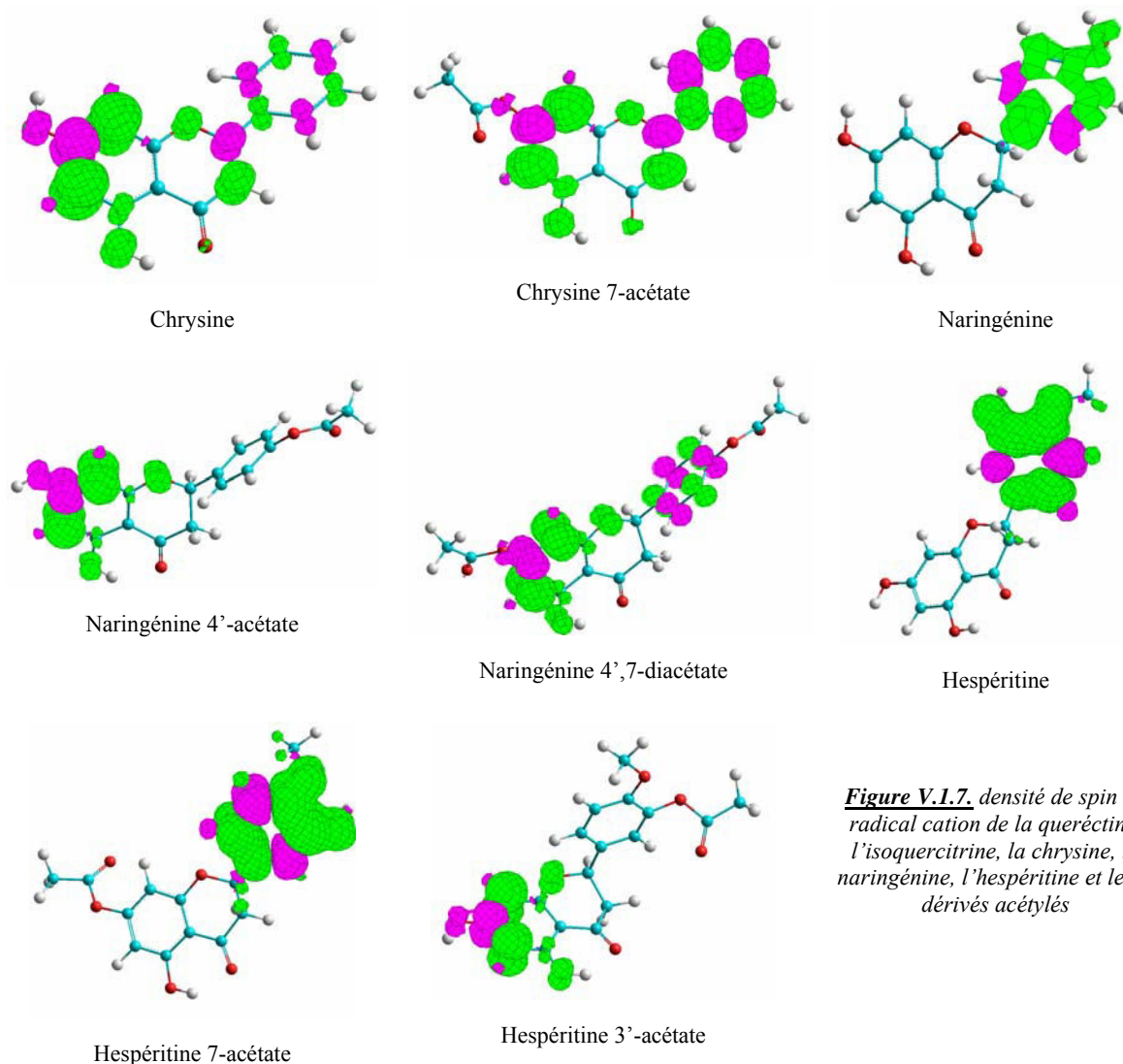


Figure V.1.7. densité de spin du radical cation de la quercétine, l'isoquercitrine, la chrysin, la naringénine, l'hespéritine et leurs dérivés acétylés

Selon la molécule parent, la distribution de spin est différente. En effet, pour la quercétine, l'isoquercitrine et leurs dérivés acétylés, les radicaux cations ont une délocalisation de l'électron non apparié principalement sur le cycle B et C. Pour les radicaux cations de la chrysin et de la chrysin 7-acétate, l'électron non apparié semble être plus réparti sur le cycle A que sur les deux autres cycles. Ceci pourrait être dû à l'absence de groupements OH sur le cycle B et C. La densité de spin des radicaux cations de la naringénine et de l'hespéritine est localisée uniquement sur le cycle B, vu l'absence de double liaison C2-C3 et d'un groupement OH en position 3 sur le cycle C. L'acétylation de la naringénine et de l'hespéritine respectivement en position 4' ou 3' provoque une délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle A. Ceci est compatible avec la localisation de la HOMO.

3. RELATION DES PROPRIETES ELECTRONIQUES, STERIQUES ET HYDROPHOBES AVEC L'ACTIVITE ANTI-RADICALAIRE

En plus des descripteurs électroniques (tableaux V.1.4, V.1.5, V.1.6 et V.1.7), des propriétés stériques et hydrophobes des flavonoïdes ont été déterminées. Ces descripteurs sont souvent évoqués dans la littérature lors des études de relation structure-activité biologique.

Nous avons sélectionné les descripteurs les plus utilisés pour essayer de les corrélés avec l'activité anti-radicalaire.

Le tableau V.1.8 résume les propriétés stériques (volume (VOL) et aire (A)) et hydrophobe (Log P) et le pouvoir antioxydant (Trolox Equivalent Antioxydant Concentration (TEAC)) de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la chrysrine, de la naringénine et de l'hésperitine.

Tableau V.1.8. Propriétés stériques, hydrophobe et TEAC des flavonoïdes étudiés

	Quercétine	Isoquercitrine	Chrysrine	Naringénine	Hésperitine
A (\AA^2) ¹	369	476	349	366	415
VOL (\AA^3) ¹	759	1091	704	742	819
Log P ¹	0.28	-1.18	1.75	1.99	1.73
TEAC ²	4.72	1.65	1.43	1.73	1.49

¹ déterminé par Hyperchem, ² déterminé expérimentalement

Selon les valeurs du TEAC, les flavonoïdes testés peuvent être classés dans l'ordre suivant : quercétine>naringénine>isoquercitrine>hésperitine≈chrysrine.

La quercétine a le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé et ceci pourrait être relié aux propriétés électroniques, stériques ou hydrophobes de cette molécule.

D'après le tableau V.1.8, il n'existe aucune relation entre le VOL, le Log P et le TEAC. Toutefois, ces descripteurs ont été corrélés par Da Silva *et al.* (2004) (13) au pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase. Par contre, la valeur du TEAC semble être corrélée à plusieurs descripteurs électroniques tels que le potentiel d'ionisation (figure V.1.8 a), l'excès de charge sur la double liaison C2-C3 (figure V.1.8 b), la charge sur l'O4' (figure V.1.8 c), l' E_{LUMO} (figure V.1.8 d), l' E_{HOMO} (figure V.1.8 e), la différence entre l' E_{LUMO} et l' E_{HOMO} (E_g) (figure V.1.8 f) et le moment dipolaire (figure V.1.8 g).

En examinant ces figures, il en ressort que l'augmentation du TEAC est accompagnée d'une diminution du IP, de l' E_{LUMO} , l' E_{HOMO} , de la E_g , du moment dipolaire, et de la charge sur l'O4' sauf pour l'isoquercitrine. Par contre, l'augmentation de l'excès de charge sur C2-C3 est reliée à des valeurs élevées de TEAC, sauf pour l'isoquercitrine.

Le fait que l'isoquercitrine ne suit pas l'évolution observée ci-dessus pourrait être dû à sa structure glycosylée contrairement aux autres molécules qui sont aglycones.

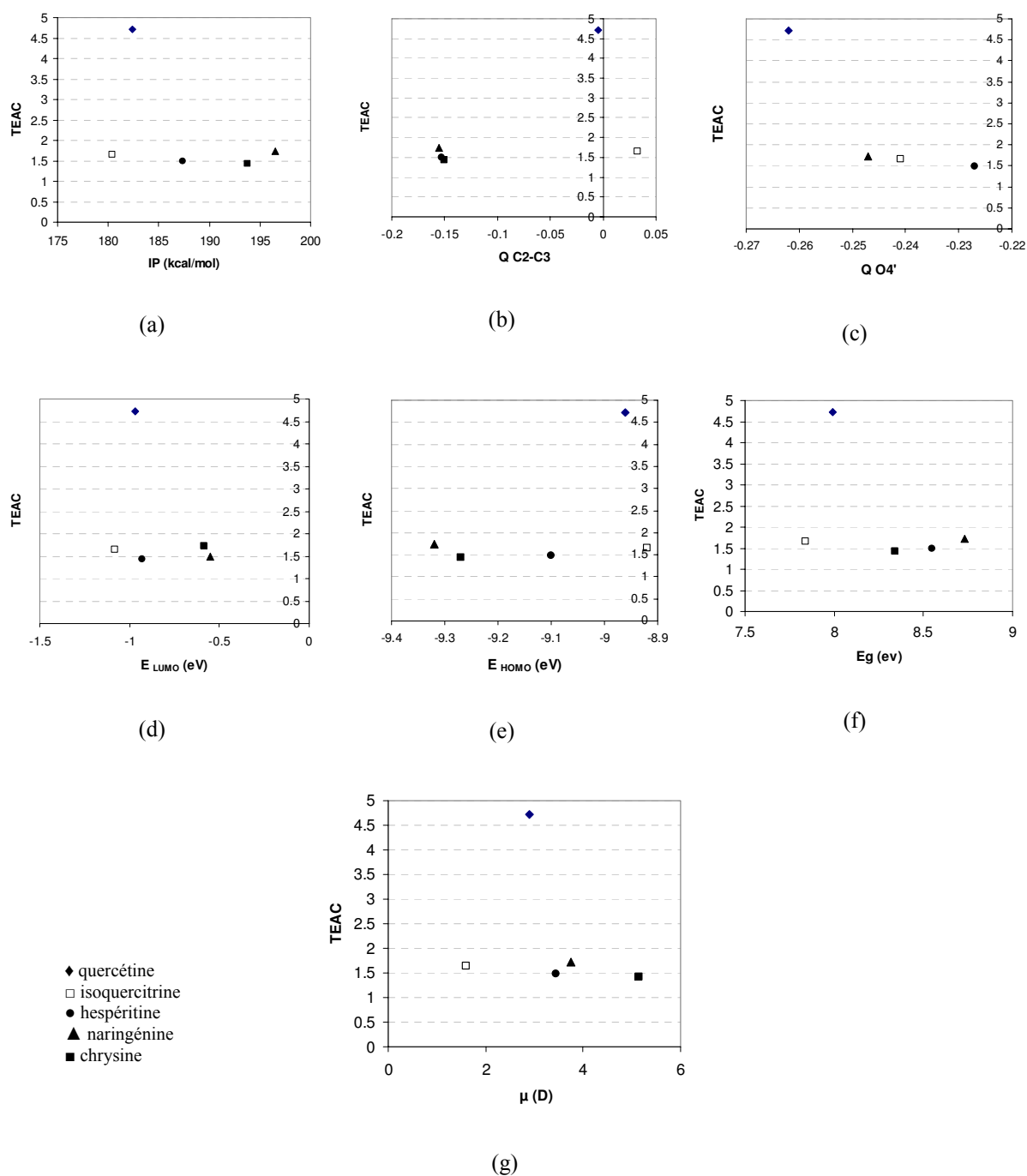


Figure V.1.8. relations entre l'activité anti-radicalaire et le potentiel d'ionisation (IP) (a), l'excès de charge sur la double liaison C2-C3 (Q C2-C3) (b), la charge sur l'O4' (Q4') (c), l'E_{LUMO} (d), l'E_{HOMO} (e), la différence entre l'E_{LUMO} et l'E_{HOMO} (Eg) (f) et le moment dipolaire (μ) (g)

En ce qui concerne le IP, des corrélations semblables ont été faites par Wright *et al.* (2002) (12) et Trouillas *et al.* (2004) (11) respectivement pour des composés phénoliques et en comparant le IP de la quercétine et la taxifoline.

Les valeurs élevées de l'excès de charge sur C2-C3 donnent aux flavonoïdes un caractère anti-radicalaire plus élevé et ceci pourrait être dû aussi à la présence simultanée de groupement OH en position 3. En effet, Smith *et al.* (2000) (14) ont reporté que la présence d'une densité électronique importante sur la double liaison C2-C3 des flavonols, avec un groupe hydroxyle en position 3 libre, peut conduire à une plus grande réactivité de ces molécules avec l'oxygène singulet.

Aucune relation entre la valeur des charges et l'activité anti-radicalaire n'a été observée dans la littérature. Cependant, l'effet de la charge a été reporté lors de corrélations faites avec l'activité anti-HIV (15).

Des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus pour l' E_{HOMO} ont été reportés par Ghiotto *et al.* (2004) (16). En effet, ces auteurs ont constaté que le TEAC augmente avec la diminution de l' E_{HOMO} .

Pour le moment dipolaire, une corrélation peut être faite avec le TEAC. Olivero-Verbel *et al.* (2002) (15) ont observé aussi une corrélation entre le moment dipolaire et l'activité anti-HIV. Par contre, Rodriguez *et al.* (2004) (2) ont étudié la corrélation entre le pouvoir d'inhibition de la lipoxygénase et quelques descripteurs et ils n'ont pas observé de relation avec le moment dipolaire.

En se basant sur ces corrélations, nous avons essayé d'étudier la répercussion de l'acétylation des flavonoïdes sur l'activité anti-radicalaire.

En confrontant les résultats relatifs aux dérivés acétylés de la quercétine, de la chrysin, de la naringénine et de l'hespéridine (tableaux V.1.4, V.1.5, V.1.6 et V.1.7) aux corrélations descripteurs-activité anti-radicalaire (figure V.1.8), il en ressort que (tableau V.1.9) :

- selon les valeurs des IP des dérivés acétylés, qui sont majoritairement plus faibles ou comparables à celles des molécules natives, leur pouvoir anti-radicalaire ne doit pas changer ou augmenter légèrement.
- pour l'excès de charge sur la liaison C2-C3, les produits acétylés présentent des valeurs comparables ou faibles par rapport aux molécules natives. Ceci devrait diminuer leur pouvoir anti-radicalaire.
- selon les valeurs des E_g , les produits acétylés de la quercétine auront une activité anti-radicalaire moins importante que la molécule native, alors que pour la

chryisine, la naringénine et l'hésperitine, l'acétylation conserve ou augmente légèrement cette activité.

- le moment dipolaire augmente après l'acétylation de la quercétine, l'isoquercitrine en position 4'-OH et la naringénine, ce qui reflète une diminution de l'activité anti-radicalaire. Pour l'hésperitine et la chryisine, pas d'effet observé de l'actylation.
- l'acétylation en position 4' et 3' diminue la charge négative de l'O4' et de l'O3', ce qui engendre une diminution de l'activité anti-radicalaire. Par contre, pour une acétylation sur une position O7, la valeur de la charge sur cet atome reste la même que celle de la molécule native. L'effet de l'acétylation de la quercétine sur le pouvoir anti-radicalaire est plus marqué : diminution de la charge négative de O4' de 0.03 pour la quercétine et de 0.007 pour la naringénine.

Dans plusieurs travaux, il a été mentionné que le blocage du 4'-OH diminue l'activité anti-radicalaire. Cet effet est renforcé lors du blocage simultané du 4'-OH et du 3'-OH (17-19). Foti *et al.* (1996) (20) ont reporté que l'efficacité anti-radicalaire relative de la 3,3',4'-triacétoxy-catéchine est 20 fois moins importante que celle de la catéchine.

Tableau V.1.9. comparaison des grandeurs IP, QC2-C3, Eg, μ et Q4' des dérivés acétylés par rapport à celles des molécules natives et évolution du TEAC attendue

	QE4'- ac	QE4'3'- -ac	QE4'3'7'- ac	IQ6'' -ac	IQ6''3''- ac	IQ6''3''2'' -ac	IQ6''4' -ac	CH7 -ac	NA4'- ac	NA4'7'- ac	HE3'- ac	HE7 -ac
IP	≈	<	≈	≈	<	<	>	<	<	<	>	≈
QC2-C3	≈	<	<	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	<
Eg	>	>	>	≈	<	<	>	≈	<	<	<	≈
μ	≈	>	>	>	>	>	>	≈	≈	>	<	>
Q4'	>	>	>	≈	≈	≈	>	-	>	>	≈	≈
TEAC attendu	<	<	<	<	≈	≈	<	≈	<	<	≈	≈

QE4'-ac : Quercétine 4'-acétate ; QE4',3'-ac : Quercétine 4',3'-diacétate ; QE4'3'7'-ac : Quercétine 4',3',7-triacétate ; IQ6''-ac : Isoquercitrine 6''-acétate ; IQ6''3''-ac : Isoquercitrine 6'',3''-diacétate ; IQ6''3''2''-ac : Isoquercitrine 6'',3'',2''-triacétate ; IQ6''4'-ac : Isoquercitrine 6'',4'-diacétate ; CH7 : Chryisine 7-acétate ; NA4' : Naringénine 4'-acétate ; NA4'7'-ac : Naringénine 4',7-diacétate ; HE3'-ac : Hésperitine 3'-acétate ; HE7-ac : Hésperitine 7-acétate.

Les résultats ainsi obtenus montrent que le descripteur moléculaire IP évolue d'une manière contradictoire par rapport à l'évolution observée avec les molécules natives.

Pour la QC2-C3, la Eg, le μ et la Q4' une diminution pour certains dérivés acétylés et une conservation pour d'autres de l'activité anti-radicalaire sont attendues. Il paraît donc que l'acétylation en position 7 ne modifie pas les propriétés anti-radicalaires. Toutefois, il est difficile de prédire le TEAC à partir de corrélations faites sur cinq molécules. Il est donc nécessaire d'élargir le nombre de molécules et de choisir des flavonoïdes ayant des valeurs de TEAC éloignées.

REFERENCES

1. Russo, N. T., M.; Uccella, N., Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (8), 3232-3237.
2. Rodriguez, M. R.; Cano, A. T.; Pinto, M. D. C.; Macias, P., Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 674, (1-3), 121-124.
3. van Acker, S. A. B. E. d. G., M. J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, (8), 1305-1312.
4. Erkoc, S.; Erkoc, F.; Keskin, N., Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2003**, 631, (1-3), 141-146.
5. Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D., CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, 68, 171-176.
6. Kim, H.; Jeong, K.; Jung, S., Molecular dynamics simulations on the coplanarity of quercetin backbone for the antioxidant activity of quercetin-3-monoglycoside. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2006**, 27, (2), 325-328.
7. Cornard, J. P.; Boudet, A. C.; Merlin, J. C., Theoretical investigation of the molecular structure of the isoquercitrin molecule. *Journal of Molecular Structure* **1999**, 508, (1-3), 37-49.
8. Erkoc, F.; Erkoc, S., Theoretical investigation of flavonoids naringenin and genistein. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2002**, 583, (1-3), 163.
9. Leopoldini, M. P., I. P.; Russo, N.; Toscano, M., Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A.* **2004**, 108, (1), 92-96.
10. Lien, E. J.; Ren, S.; Bui, H.-H.; Wang, R., Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, (3-4), 285.
11. Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L., A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry* **2004**, 88, (4), 571-582.
12. Wright, J. S. J., E. R.; DiLabio, G. A., Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (6), 1173-1183.
13. da Silva, S. L.; da Silva, A.; Honorio, K. M.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.; da Silva, A. B. F., The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 684, (1-3), 1.
14. Smith, G.; Thomsen, S.; Markham, K.; Andary, C.; Cardon, D., The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry* **2000**, 136, 87-91.
15. Olivero-Verbel, J.; Pacheco-Londono, L., Structure-Activity Relationships for The Anti-HIV Activity of Flavonoids. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42, (5), 1241-1246.
16. Ghiotto, R. C. T.; Lavarda, F. C.; Ferreira, F. J. B., Antioxidant Activity of Flavonols. *International Journal of Quantum Chemistry* **2004**, 97, (5), 949-952.

17. Aliaga, C.; Lissi, A. E., Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.* **2004**, 82, 1668-1673.
18. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20, (7), 933-956.
19. Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D.-j.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20, (3), 331.
20. Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M. T.; Ruberto, G., Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 42, (2), 497-501.

CHAPITRE V.2

*Modélisation moléculaire de la quercétine dans des
solvants organiques*

CHAPITRE V.2. MODELISATION DE LA QUERCETINE DANS DES SOLVANTS ORGANIQUES

1. SOLVANTS	175
1.1. Cas de l'acétonitrile.....	176
1.2. Cas de l'acétone	177
1.3. Cas du <i>tert</i> -amyl alcool	179
2. QUERCETINE.....	181
3. ETUDE DE L'EFFET DES SOLVANTS SUR LA QUERCETINE	185
3.1. Comparaison de la structure de la quercétine dans les trois solvants.....	186
3.2. Interactions solvant-quercétine	190
4. CONCLUSION.....	192
REFERENCES.....	194

***** FIGURES *****

Figure V.2.1. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte d'acétonitrile (cube d'environ 36.5 Å de côté)	176
Figure V.2.2. fonctions de distribution radiale pour l'acétonitrile obtenues par dynamique moléculaire.....	176
Figure V.2.3. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence des arrangements parallèle et anti-parallèle des molécules d'acétonitrile	177
Figure V.2.4. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte d'acétone (cube d'environ 40 Å de côté).....	178
Figure V.2.5. fonctions de distribution radiale pour l'acétone obtenues par dynamique moléculaire.....	178
Figure V.2.6. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence des arrangements parallèle et anti-parallèle des molécules d'acétone	179
Figure V.2.7. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte de <i>tert</i> -amyl alcool (cube d'environ 46 Å de côté).....	180

Figure V.2.8. fonction de distribution radiale (O-H) pour le tert-amyl alcool obtenue par dynamique moléculaire	181
Figure V.2.9. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence du réseau de liaisons hydrogènes connectant deux à deux les molécules de tert-amyl alcool	181
Figure V.2.10. numérotation des atomes de la quercétine	182
Figure V.2.11. énergie potentielle de la quercétine en fonction de l'angle dièdre θ (B3LYP/6-31 G* et potentiel OPLS)	183
Figure V.2.12. représentation de la quercétine immergée dans un bain de molécules d'acétonitrile (a), d'acétone (b) et de tert-amyl alcool (c), quelques liaisons hydrogènes sont mises en évidence	186
Figure V.2.13. évolution de l'angle dièdre θ au cours des trajectoires de la dynamique moléculaire	186
Figure V.2.14. évolution de l'angle dièdre H30-O18-C14-C13 au cours des trajectoires de dynamique moléculaire	187
Figure V.2.15. orientation de l'hydroxyle O18-H30 : (1) H30-O18-C14-C13=0° et (2) H30-O18-C14-C13=180°	188
Figure V.2.16. orientation de l'hydroxyle O18-H30 dans le cas du tert-amyl alcool (H30-O18-C14-C13=-45°)	188
Figure V.2.17. évolution des angles dièdres H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4 pour l'acétonitrile (1) l'acétone (2) et le tert-amyl alcool (3) au cours des trajectoires de dynamique moléculaire	189
Figure V.2.18. orientation des hydroxyles O21-H31 et O22-H32, (1) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4=0°, (2) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4=180°, (3) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4 hors du plan.	190
Figure V.2.19. fonctions de distribution radiale quercétine-solvant déduites des trajectoires de dynamique moléculaire	191

*****TABLEAUX*****

Tableau V.2.1. angles de valences de la quercétine	182
---	-----

Tableau V.2.2. charges des différents atomes de la quercétine calculées dans le vide, dans l'acétone, l'acétonitrile et le tert-amyl alcool.....	183
Tableau V.2.3. quelques distances, angles et dièdres de la quercétine, calculés par la méthode AM1, B3LYP/6-31 G*, OPLS* et expérimentaux	184
Tableau V.2.4. longueurs des liaisons H29-O20 et H28-O20.....	187

CHAPITRE V.2. MODELISATION DE LA QUERCETINE DANS DES SOLVANTS ORGANIQUES

La plupart des travaux de modélisation moléculaire de flavonoïdes sont réalisés dans le vide. Les études expérimentales de solubilité et de synthèse d'esters de flavonoïdes montrent que les résultats obtenus dépendent fortement du solvant dans lequel sont conduit ces expériences.

Dans cette partie, nous essayons de rationaliser ces effets de solvants par l'intermédiaire de simulations de dynamique moléculaire. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'effet de trois solvants (acétonitrile, acétone et *tert*-amyl alcool) sur l'équilibre conformationnel de la quercétine.

Dans un premier temps, nous avons construit des « boîtes » d'acétonitrile, d'acétone et de *tert*-amyl alcool permettant de modéliser les phases condensées de ces solvants. Puis, nous avons développé des paramètres spécifiques permettant de modéliser la quercétine. Enfin, nous avons inséré notre modèle de quercétine dans les trois boîtes de solvants construites au préalable.

1. SOLVANTS

Pour modéliser les phases condensées des trois solvants, nous avons utilisé le champ de force OPLS-AA (1) de Jorgensen, particulièrement bien adapté pour ce type de systèmes.

Des boîtes de 512 molécules ont été construites pour chacun des solvants. Toutes les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel Namd[®] (2). La visualisation et l'analyse des trajectoires ont été faites avec le logiciel VMD[®] (3). Les trajectoires de dynamique moléculaire ont été générées dans l'ensemble thermodynamique NPT, à une température de 300°K et une pression de 1 atm. Les équations du mouvement ont été intégrées toutes les 1 fs. Après 200 ps de thermalisation, des trajectoires de 500 ps ont été générées. Dans ces études, l'algorithme PME (Particle Mesh Ewald) a été utilisé pour traiter les interactions électrostatiques à longue distance.

1.1. Cas de l'acétonitrile

La phase condensée d'acétonitrile (modèle OPLS) a été déjà modélisée par la méthode Monte Carlo (4). Les auteurs ont montré que ce modèle reproduit bien certaines propriétés thermodynamiques du liquide à 300°K ($\rho=0.765 \text{ g/cm}^3$; $\Delta H_{\text{vap}}=7.59 \text{ kcal/mol}$; $C_{pL}=26.7 \text{ cal/mol } ^\circ\text{K}$). De plus, ce modèle donne une bonne description de la structure du liquide.

La structure de la molécule d'acétonitrile, ainsi qu'une représentation instantanée de la boîte de simulation prélevée au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire sont représentées sur la figure V.2.1.

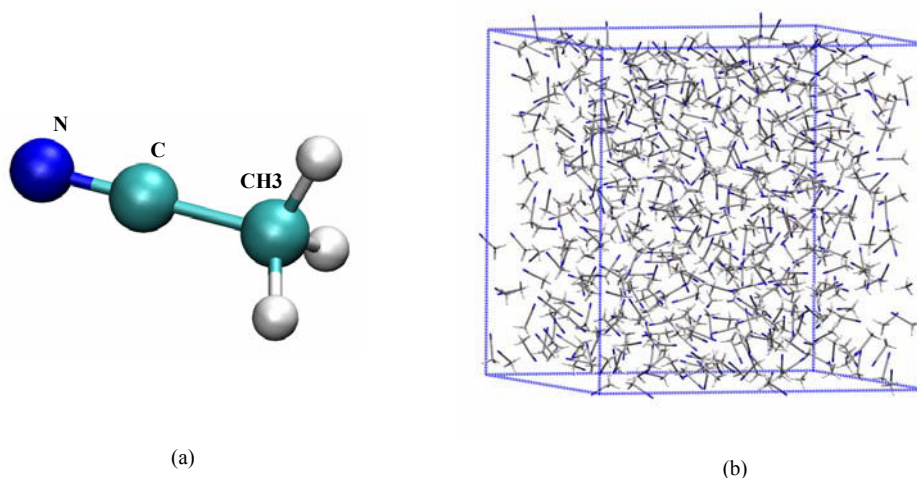


Figure V.2.1. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte d'acétonitrile (cube d'environ 36.5 Å de côté)

La figure V.2.2 montre les fonctions de distribution radiale (RDF) (représentant la probabilité de trouver une paire d'atomes à une distance donnée) pour différentes paires d'atomes obtenues par dynamique moléculaire. Ces RDF sont comparables à celles calculées par la méthode Monte Carlo (4).

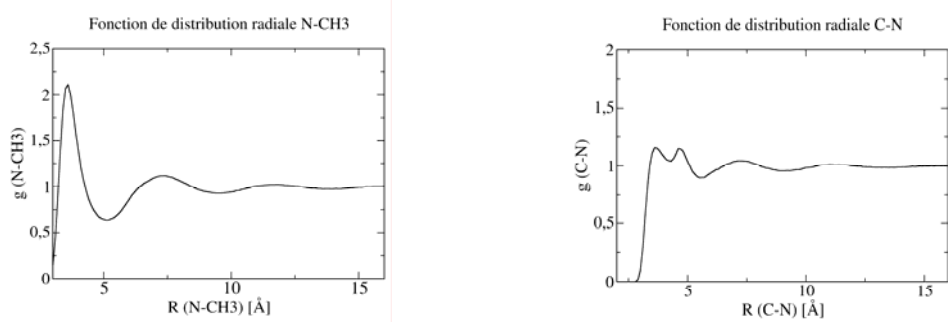


Figure V.2.2. fonctions de distribution radiale pour l'acétonitrile obtenues par dynamique moléculaire

Le premier pic, bien structuré de la RDF N-CH3 met en évidence l'organisation « tête-queue » (figure V.2.3) des molécules d'acétonitrile due à l'interaction électrostatique attractive entre les dipôles des molécules ainsi organisées. L'intégration de ce pic entre 0 et 5.1 Å indique un nombre moyen de 6.1 voisins. Donc, pour chaque molécule, il y a environ 12 à 13 contacts N-CH3 dans cette gamme de distances. Les RDF C-N montrent deux pics distincts pouvant être attribués à une organisation en double couche du solvant. L'intégration du premier pic indique que pour chaque molécule d'acétonitrile, il y a entre 9 et 10 contacts C-N par molécule. Cette structuration des contacts C-N provient d'un arrangement anti-parallèle des chaînes (figure V.2.3).

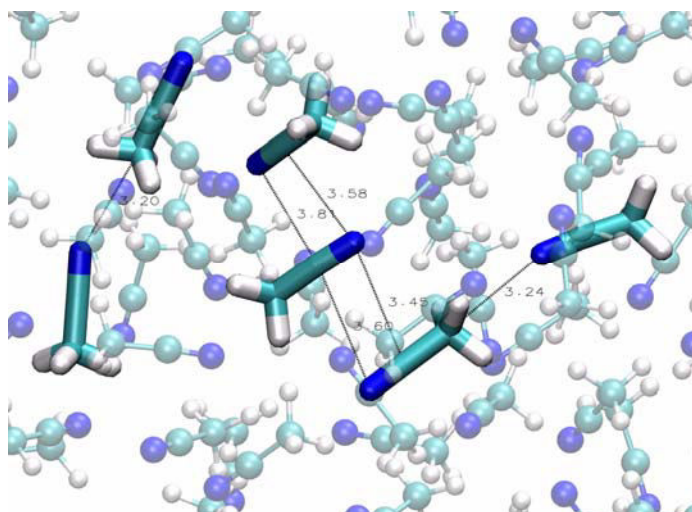


Figure V.2.3. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence des arrangements parallèle et anti-parallèle des molécules d'acétonitrile

1.2. Cas de l'acétone

Une étude Monte carlo de la phase condensée de l'acétone modélisée par le champ de force OPLS a été reportée dans la littérature (5). Dans ce travail, les auteurs ont calculé l'enthalpie de vaporisation ΔH_{vap} de l'acétone à plusieurs températures et ont montré que dans une gamme de température de 300-400°K, les valeurs obtenues sont compatibles avec les valeurs expérimentales.

Par ailleurs, l'analyse de notre trajectoire de dynamique moléculaire montre que le modèle OPLS reproduit bien la densité du liquide à 300°K ($\rho_{\text{expérimental}} 0.79 \text{ g/cm}^3$; $\rho_{\text{calculé}} 0.77 \text{ g/cm}^3$).

La structure de l'acétone, ainsi qu'une représentation instantanée de la boîte de simulation prélevée au cours de la trajectoire de dynamique moléculaires, sont représentées sur la figure V.2.4.

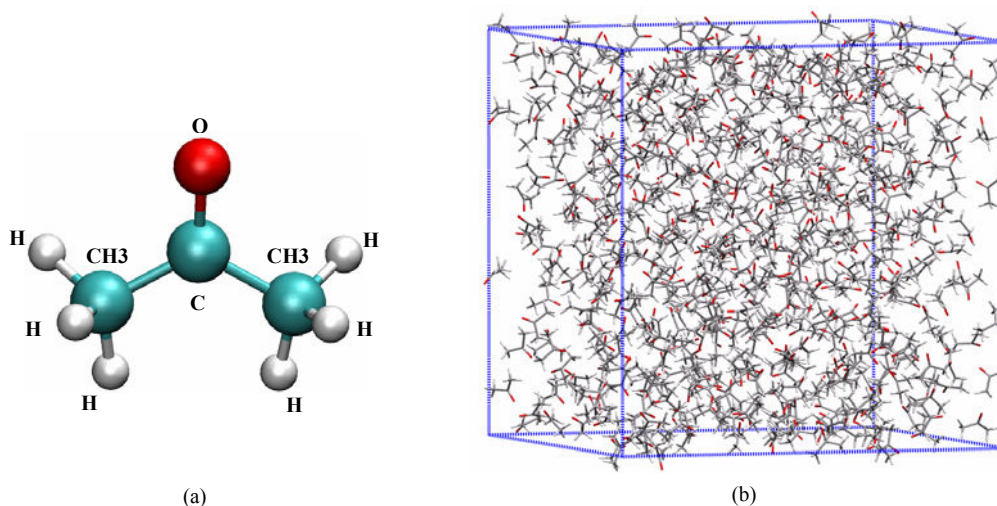


Figure V.2.4. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte d'acétone (cube d'environ 40 Å de côté)

Nous avons construit les RDF des paires CH3-O et C-O à partir de notre trajectoire de dynamique moléculaire (figure V.2.5). Les caractéristiques structurales de l'acétone sont similaires à celles observées dans le cas de l'acétonitrile. En particulier, la RDF CH3-O présente un premier pic traduisant une organisation en « tête-queue » (figure V.2.6). L'intégration de ce pic entre 0 et 4.9 Å montre qu'il y a en moyenne 6 contacts CH3-O par molécule d'acétone. La gamme de distance dans laquelle interviennent ces contacts est tout à fait similaire à celle observée pour les contacts N-CH3 dans le cas de l'acétonitrile.

La RDF C-O présente un double pic. L'intégration du premier pic entre 0 et 4.9 Å montre qu'il y a entre 9 et 10 contacts C-O. Comme dans le cas de l'acétonitrile, cette structuration des contacts C-O provient d'un arrangement anti-parallèle des chaînes (figure V.2.6).

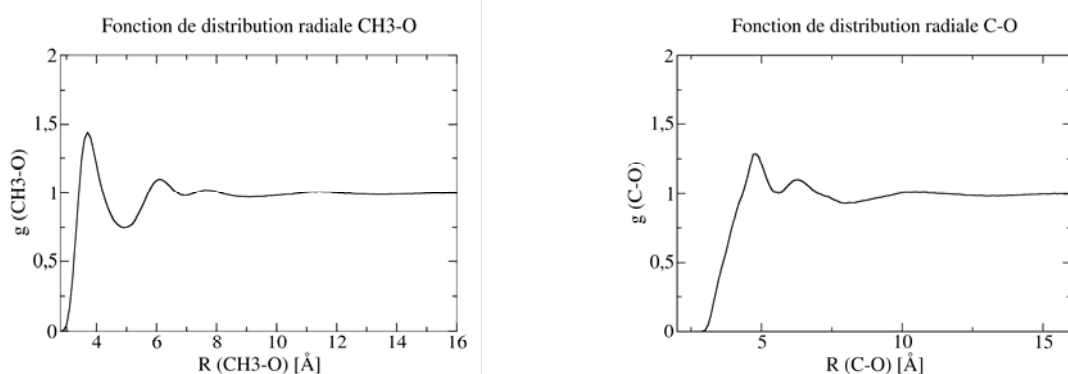


Figure V.2.5. fonctions de distribution radiale pour l'acétone obtenues par dynamique moléculaire

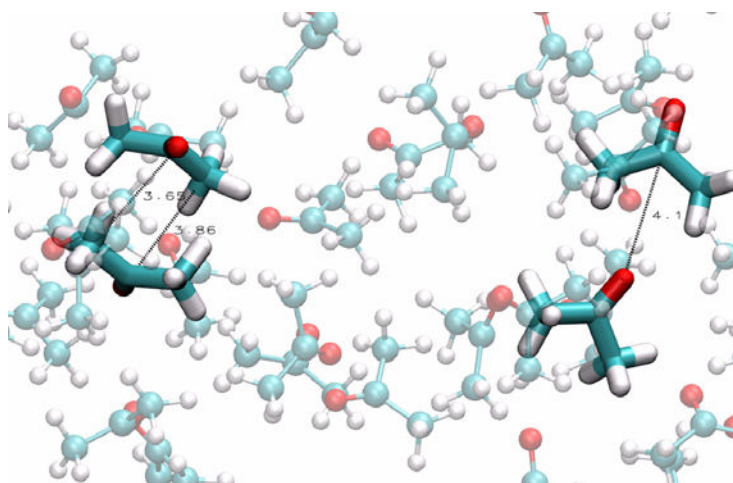


Figure V.2.6. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence des arrangements parallèle et anti-parallèle des molécules d'acétone

Les RDF calculés ont été comparées à celles obtenues par une étude combinant des expériences de diffraction de neutrons et une approche d'affinage de structure par potentiel empirique (EPSR) (6). L'allure des courbes obtenues par les deux méthodes est tout à fait similaire. En particulier, la localisation des pics ainsi que le nombre de voisins pour les différentes paires d'atomes présentent une très bonne concordance.

1.3. Cas du *tert*-amyl alcool

Aucune étude de simulation de *tert*-amyl alcool n'a été réalisée antérieurement dans la littérature. De plus, il existe peu de données expérimentales sur les propriétés physico-chimiques de ce solvant. Nous avons utilisé le champ de force OPLS pour modéliser les propriétés du *tert*-amyl alcool en phase condensée à 300°K (Figure V.2.7).

La densité calculée à partir de la trajectoire de dynamique est en bon accord avec la densité expérimentale ($\rho_{\text{expérimental}} 0.81 \text{ g/cm}^3$; $\rho_{\text{calculé}} 0.77 \text{ g/cm}^3$).

L'enthalpie de vaporisation ΔH_{vap} peut être calculée par la formule suivante, si l'on considère que la phase gazeuse suit la loi des gaz parfaits :

$$\Delta H_{\text{vap}}^i = U_v - U_l + RT$$

où U_v et U_l sont respectivement l'énergie potentielle d'une molécule de *tert*-amyl alcool en phase gazeuse et liquide, R est la constante des gaz parfaits et T est la température la simulation est réalisée.

La valeur de l'enthalpie de vaporisation, calculée à partir de la trajectoire de la dynamique moléculaire, est $\Delta H_{\text{vap}} = 8.84$ kcal/mol. Notre modèle sous-estime sensiblement cette grandeur dont la valeur expérimentale se situe autour de 12 kcal/mol à 300°K. Les paramètres OLPS que nous avons utilisés ont été ajustés pour reproduire principalement les propriétés d'alcools tertiaires. Un travail d'affinage des paramètres d'interactions intermoléculaires serait nécessaire pour améliorer la reproduction de ΔH_{vap} . Toutefois, l'utilisation de ce modèle pour étudier qualitativement l'interaction quercétine/*tert*-amyl alcool reste raisonnable.

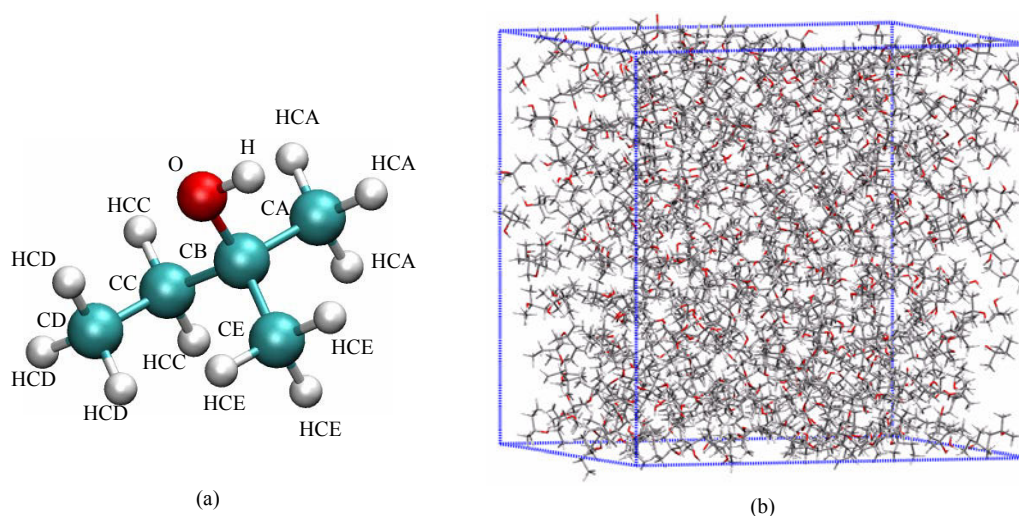


Figure V.2.7. (a) structure et (b) vue instantanée de la boîte de *tert*-amyl alcool (cube d'environ 46 Å de côté)

La RDF O-H (figure V.2.8) présente deux pics intenses traduisant une grande structuration du liquide. L'intégration du premier pic indique la présence d'un hydrogène à une distance moyenne de 2 Å de chaque oxygène, longueur caractéristique de la liaison hydrogène. L'intégration du second pic révèle la présence d'un autre hydrogène à une distance moyenne de 3.2 Å. Ceci traduit le fait que chaque groupement OH est impliqué dans 2 liaisons hydrogènes faisant intervenir deux autres molécules. Ainsi, la structure globale de la phase condensée du *tert*-amyl alcool repose sur un réseau de liaisons hydrogènes très structuré connectant tous les OH de proche en proche (figure V.2.9).

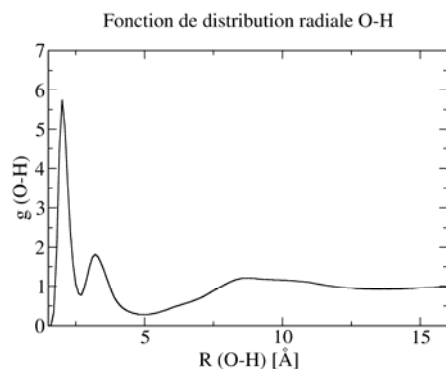


Figure V.2.8. fonction de distribution radiale (O-H) pour le tert-amyl alcool obtenue par dynamique moléculaire

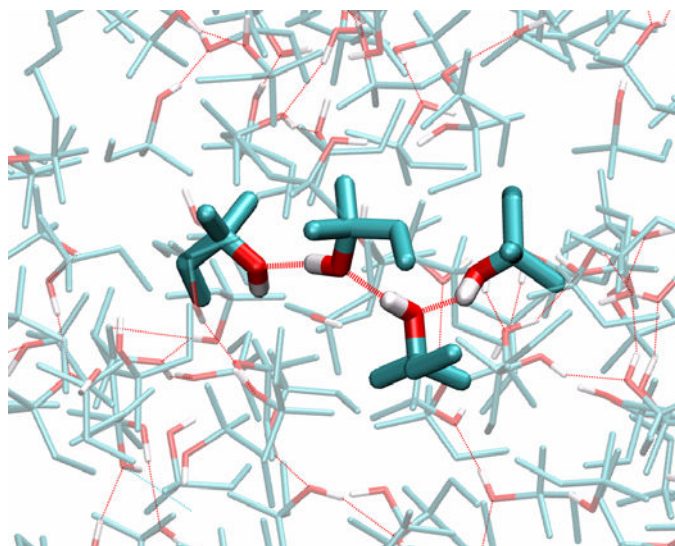


Figure V.2.9. vue instantanée de la trajectoire de dynamique moléculaire : mise en évidence du réseau de liaisons hydrogènes connectant deux à deux les molécules de tert-amyl alcool

2. QUERCÉTINE

Les paramètres nécessaires pour modéliser la quercétine (figure V.2.10) ne sont pas tous disponibles dans le champ de force OPLS-AA. En particulier, certains angles de valence manquants ont été adaptés de la structure cristallographique (7). Le détail de ces paramètres est donné dans le tableau V.2.1.

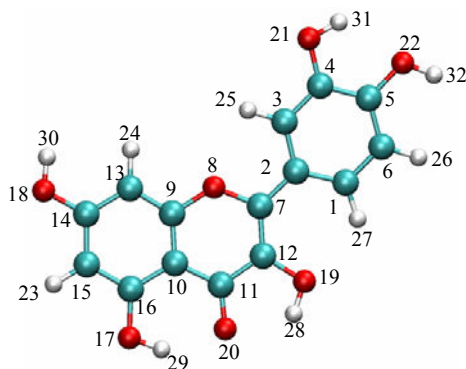


Figure V.2.10. numérotation des atomes de la quercétine

Tableau V.2.1. angles de valences de la quercétine

Angle de valence	k_0 (kcal/mol)	θ_{eq} (°)
C7-O8-C9	70.00	121.7
C12-C7-O8	70.00	120.1
C11-C10-C9	63.00	121.1
C13-C9-O8	70.00	117.1
C12-C10-O20	80.00	120.6
C10-C11-O20	80.00	122.7
C13-C9-C10	63.00	123.0
C14-C13-C9	63.00	117.4
C15-C16-C10	63.00	121.6
C11-C12-C7	63.00	120.5
C11-C12-O19	70.00	117.6
C7-C12-O19	70.00	121.1
C2-C7-C12	63.00	128.4

Un des termes essentiels manquant au champ de force OPLS est le potentiel de torsion associé à la déformation de l'angle dièdre θ (O8-C7-C2-C1). Pour déterminer les paramètres du champ de force associés à cet angle, nous avons, dans un premier temps, déterminé par un calcul quantique précis (B3LYP/6-31G*) le profil d'énergie associé à la variation de θ (par pas de 10°). Puis, nous avons ajusté la courbe obtenue par la fonction mathématique utilisée dans OPLS (série de Fourier) pour modéliser les déformations des angles dièdres :

$$E_{\text{dièdre}} = \sum_i \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\theta_i)] + \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\theta_i)] + \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\theta_i)]$$

La courbe de référence B3LYP/6-31G* ainsi que le potentiel ajusté avec $V_1 = -0.40096$, $V_2 = 6.58312$ et $V_3 = 0$ sont représentés dans la figure V.2.11.

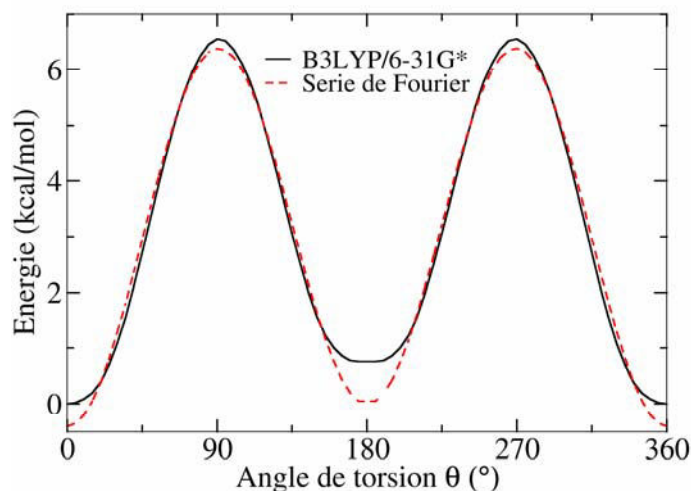


Figure V.2.11. énergie potentielle de la quercétine en fonction de l'angle dièdre θ (B3LYP/6-31 G* et potentiel OPLS)

Une autre étape de notre travail de paramétrisation a consisté à mettre au point des jeux de charges atomiques permettant de modéliser la quercétine dans les trois solvants étudiés (acétonitrile, acétone et *tert*-amyl alcool).

Nous avons pour cela utilisé l'approche des charges dérivées du potentiel telle qu'implantée dans le programme Opep (8). Une grille d'environ 15000 points (distribués sur des enveloppes situées entre 2 et 4 fois le rayon de van der Waals des atomes) a été construite autour de la molécule. Pour chacun de ces points, le potentiel électrostatique a été calculé par la méthode B3LYP/6-31G*. Nous avons utilisé le logiciel Gaussian 03 (9) pour déterminer le potentiel électrostatique en chaque point de la grille pour la quercétine optimisée dans le vide ainsi que pour la quercétine optimisée successivement dans l'acétonitrile, l'acétone et le *tert*-amyl alcool (les solvants étant représentés ici par un continuum diélectrique (méthode PCM)). Dans chacun des cas, une méthode d'ajustement de moindre carrés nous a permis de déterminer un jeu de charges atomiques portées par la quercétine reproduisant au mieux le potentiel électrostatique cible calculé par la mécanique quantique (tableau V.2.2).

Tableau V.2.2. charges des différents atomes de la quercétine calculées dans le vide, dans l'acétone, l'acétonitrile et le *tert*-amyl alcool

N°Atome	Type atome	Vide	Acétone	Acétonitrile	<i>Tert</i> -amyl alcool
1	C	-0.1083	-0.1153	-0.1165	-0.1110
2	C	-0.0408	-0.0551	-0.0550	-0.0518
3	C	-0.2694	-0.2922	-0.2943	-0.2839
4	C	0.2728	0.2703	0.2705	0.2718
5	C	0.2403	0.2777	0.2784	0.2668
6	C	-0.3191	-0.3531	-0.3541	-0.3430

7	C	0.2832	0.2980	0.2980	0.2957
8	O	-0.2944	-0.2974	-0.2979	-0.2963
9	C	0.4605	0.4819	0.4832	0.4753
10	C	-0.5205	-0.5564	-0.5578	-0.5463
11	C	0.6175	0.6521	0.6534	0.6431
12	C	-0.0815	-0.0980	-0.0986	-0.0940
13	C	-0.5214	-0.5597	-0.5618	-0.5471
14	C	0.4210	0.4743	0.4765	0.4584
15	C	-0.3980	-0.4545	-0.4571	-0.4370
16	C	0.4514	0.4766	0.4773	0.4708
17	O	-0.5580	-0.5986	-0.6003	-0.5871
18	O	-0.5450	-0.5962	-0.5983	-0.5810
19	O	-0.5057	-0.5246	-0.5257	-0.5179
20	O	-0.5970	-0.6390	-0.6405	-0.6272
21	O	-0.5574	-0.5999	-0.6021	-0.5871
22	O	-0.5993	-0.6255	-0.6262	-0.6185
23	H	0.2164	0.2279	0.2283	0.2249
24	H	0.1845	0.2223	0.2244	0.2096
25	H	0.2018	0.2042	0.2050	0.2029
26	H	0.1565	0.1922	0.1937	0.1809
27	H	0.1735	0.1695	0.1695	0.1702
28	H	0.4314	0.4570	0.4589	0.4470
29	H	0.4608	0.4681	0.4685	0.4660
30	H	0.4367	0.4978	0.5001	0.4785
31	H	0.4510	0.4844	0.4866	0.4729
32	H	0.4564	0.5110	0.5133	0.4943

Les charges obtenues dans le vide et dans les solvants sont différentes principalement au niveau des hydroxyles. Ces différences de charges sont accompagnées d'une augmentation du moment dipolaire (5 D dans le vide contre 7 D dans l'acétonitrile ou l'acétone) traduisant la polarisation de la quercétine par son environnement.

Par la suite, les différents jeux de charges seront utilisés pour modéliser la quercétine dans les différents environnements.

Les propriétés structurales de la quercétine dans le vide, obtenues par les méthode AM1, B3LYP/6-31 G* et OPLS*, ont été comparées à celles obtenues expérimentalement (tableau V.2.3).

Tableau V.2.3. quelques distances, angles et dièdres de la quercétine, calculés par la méthode AM1, B3LYP/6-31 G*, OPLS* et expérimentaux

Liaisons	AM1	B3LYP/6-31 G*	OPLS*	Expérience
O8-C7	1.39	1.38	1.40	1.37
C7-C12	1.36	1.37	1.40	1.36
O17-H29	0.97	0.99	0.96	-
C16-O17	1.37	1.34	1.37	1.35
C7-C2	1.46	1.46	1.40	1.46
C4-C5	1.41	1.41	1.41	1.39
Angles				
C9-O8-C7	118.76	122.77	125.80	121.7
O8-C7-C2	110.84	112.40	113.86	111.5
C10-C11-C12	115.07	116.96	119.92	116.7

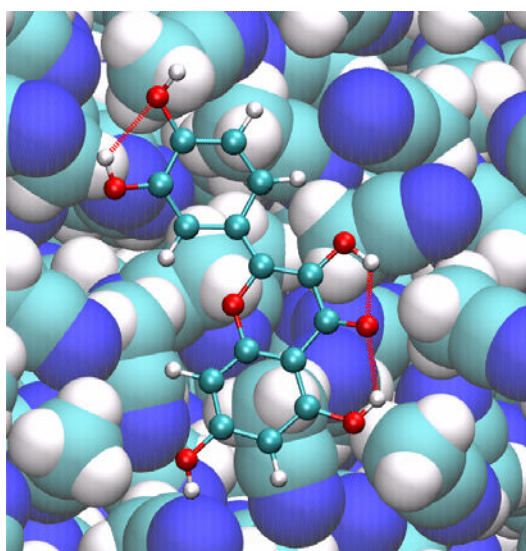
C15-C14-C13	121.78	122.11	120.02	121.8
O21-C4-C5	116.03	120.42	118.07	117.8
Dièdres				
O8-C7-C2-C1	-26.50	-180.00	-178.10	-179.00
C7-C2-C3-C4	-179.41	-180.00	-179.81	
O8-C7-C12-O19	-179.13	-180.00	-179.53	
O18-C14-C13-C9	-180.00	-180.00	-179.76	

L'ensemble des méthodes conduit à des longueurs de liaisons, des angles de valence et des angles dièdres proches des valeurs expérimentales, excepté pour la méthode AM1 incapable de rendre compte de la planéité de la molécule.

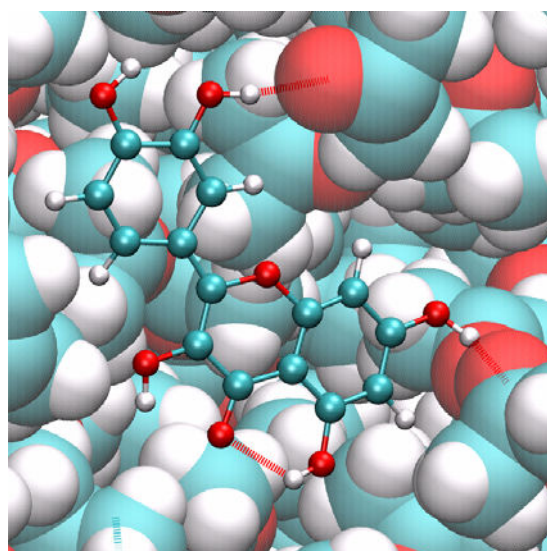
Le modèle empirique de la quercétine, mis au point dans notre travail (OPLS*), est quand à lui en très bon accord avec la structure cristallographique.

3. ETUDE DE L'EFFET DES SOLVANTS SUR LA QUERCÉTINE

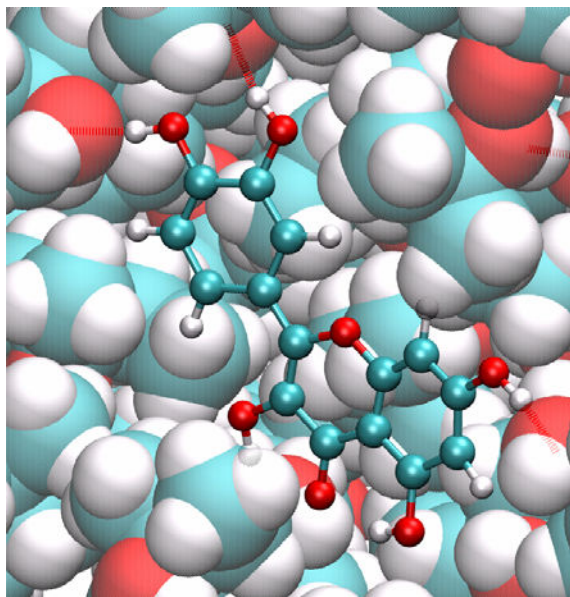
Les modèles de quercétine construits ont été immergés dans les trois boîtes de solvants thermalisées. Pour cela, nous avons placé la molécule de soluté au centre des boîtes et supprimé toutes les molécules de solvants situées à moins de deux fois le rayon de van der Waals des atomes (figure V.2.12). Les systèmes ont été thermalisés à 300°K pendant 200 ps. L'acquisition des données a été faite sur une période de 500 ps. Le pas d'intégration des équations du mouvement est égal à 1 fs et les trajectoires de dynamique moléculaire ont été réalisées dans l'ensemble NPT.



(a)



(b)



(c)

Figure V.2.12. représentation de la quercétine immergée dans un bain de molécules d'acétonitrile (a), d'acétone (b) et de tert-amyl alcool (c), quelques liaisons hydrogènes sont mises en évidence

3.1. Comparaison de la structure de la quercétine dans les trois solvants

Nous nous intéressons ici à l'effet du solvant sur la structure de la quercétine. En particulier, nous avons regardé de manière détaillée la valeur de l'angle dièdre θ et le comportement des groupements OH au cours des trajectoires de dynamique moléculaire.

Tout d'abord, nous avons suivi l'évolution de l'angle dièdre θ au cours du temps (figure V.2.13).

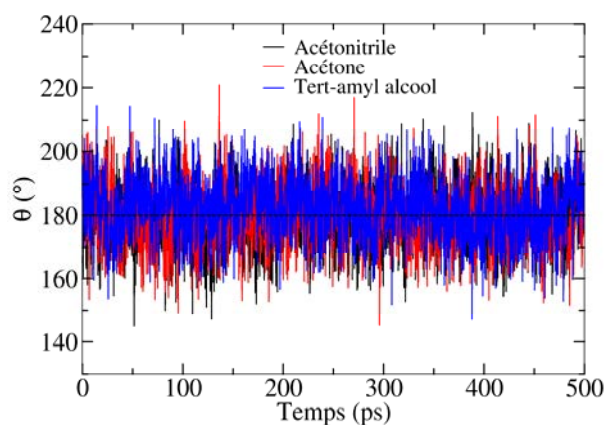


Figure V.2.13. évolution de l'angle dièdre θ au cours des trajectoires de la dynamique moléculaire

Les courbes obtenues montrent que cet angle oscille autour de la valeur d'équilibre de 180° (molécule plane). Il apparaît également que le comportement de cet angle est similaire dans les trois solvants modélisés.

Puis, nous avons étudié le comportement du motif composé de deux groupements hydroxyles O17-H29 et O19-H28 et le carbonyle C11-O20. Pour cela, nous avons suivi l'évolution des distances H29-O20 et H28-O20. Les valeurs moyennes de ces distances ainsi que leurs déviations standard sont reportées dans le tableau V.2.4.

Tableau V.2.4. longueurs des liaisons H29-O20 et H28-O20

solvant	d (H29-O20) Å	d (H28-O20) Å
acétonitrile	1.91±0.12	2.04±0.14
acétone	1.90±0.12	2.02±0.13
tert-amyl alcool	1.92±0.14	2.15±0.12

Ces deux distances varient très peu au cours du temps et ce quelque soit le solvant. L'hydrogène H29 impliqué dans un pseudo cycle à 6 est à une distance moyenne de 1.9 Å caractéristique d'une liaison hydrogène. L'hydrogène H28 formant avec les atomes voisins un pseudo cycle à 5 est à une distance de l'oxygène, un peu plus grande, de 2.1 Å.

Au cours de nos trajectoires, ce motif est très bien conservé. Les deux hydroxyles qui restent dans le plan de la molécule tout au long des trajectoires sont fortement associés à l'oxygène O20 du carbonyle, association qui ne semble pas être affectée par le choix du solvant.

Pour l'hydroxyle O18-H30, l'angle dièdre H30-O18-C14-C13 a été représenté au cours du temps pour les trois solvants (figure V.2.14).

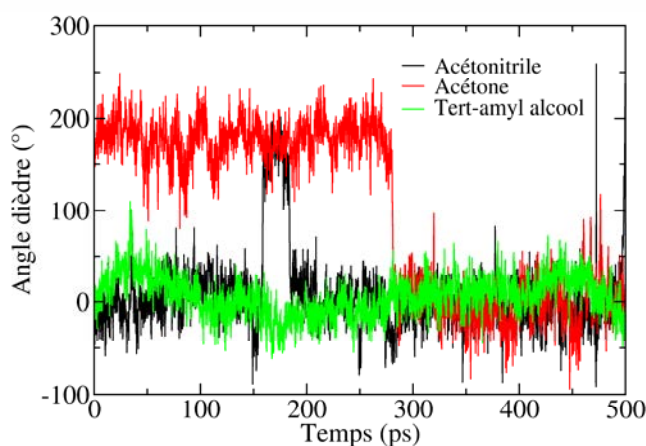


Figure V.2.14. évolution de l'angle dièdre H30-O18-C14-C13 au cours des trajectoires de dynamique moléculaire

Dans le cas de l'acétonitrile et de l'acétone deux orientations du OH semblent être possibles (angles moyens de 180° et de 0°) (figure V.2.15). Dans les deux cas, le groupement hydroxyle reste dans le plan de la molécule formant ainsi un pseudo cycle à 5. Notons que la transition d'un angle de 180° à 0° reste un événement relativement rare au cours de la trajectoire.

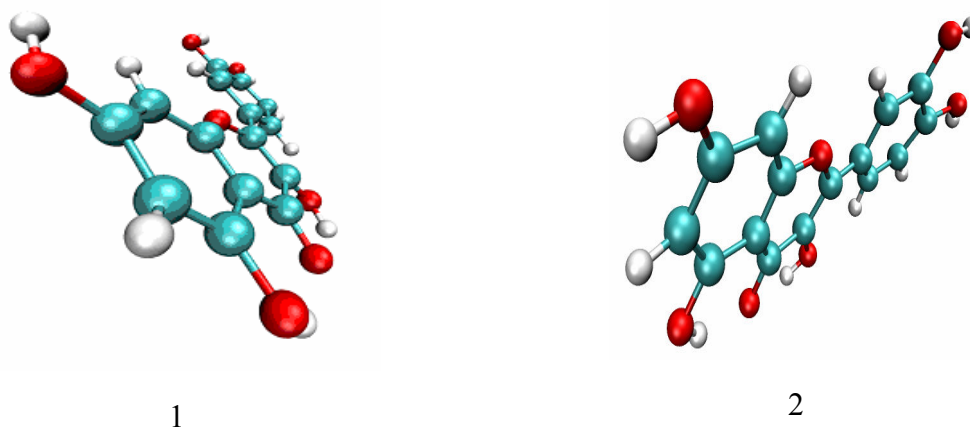


Figure V.2.15. orientation de l'hydroxyle O18-H30 : (1) $H30-O18-C14-C13=0^\circ$ et (2) $H30-O18-C14-C13=180^\circ$

Pour le *tert*-amyl alcool, la situation est un peu différente, cet angle semble prendre des valeurs moyennes situées autour de $45/-45^\circ$ permettant ainsi au groupement O18-H30 de former des liaisons hydrogènes avec l'alcool (figure V.2.16).

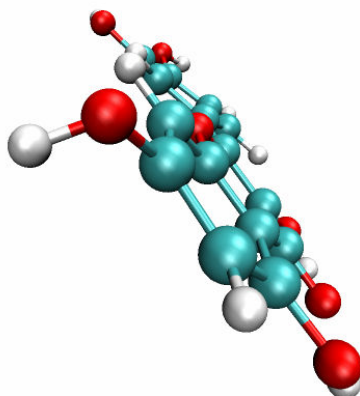


Figure V.2.16. orientation de l'hydroxyle O18-H30 dans le cas du *tert*-amyl alcool ($H30-O18-C14-C13=-45^\circ$)

Enfin, nous avons étudié le motif composé des deux hydroxyles O21-H31 et O22-H32. Les courbes représentant les angles dièdres $H31-O21-C4-C5$ et $H32-O22-C5-C4$ (figure V.2.17) montrent clairement que pour le cas de l'acétonitrile et l'acétone, trois conformations sont possibles : deux conformations planes pour lesquelles les deux angles valent simultanément 180° (figure V.2.18 (1)) ou 0° (figure V.2.18 (2)), et une conformation pour

laquelle les deux hydroxyles pointent l'un vers l'autre et sont légèrement hors du plan. Cette dernière conformation est stabilisée par deux molécules d'acétone formant chacune une liaison hydrogène avec les deux hydroxyles (figure V.2.18 (3)).

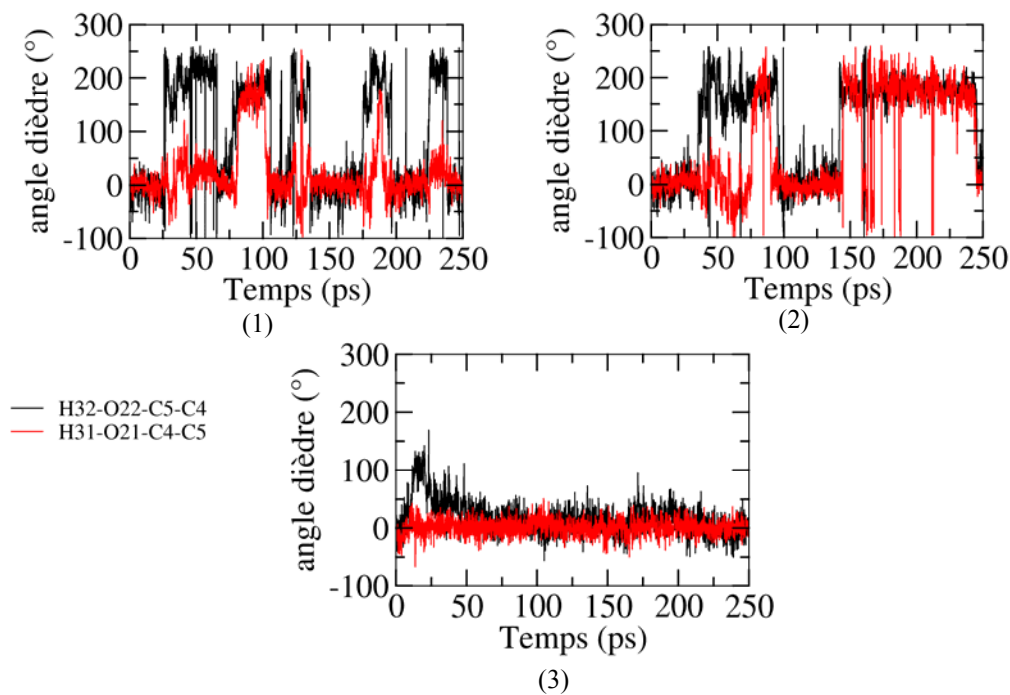
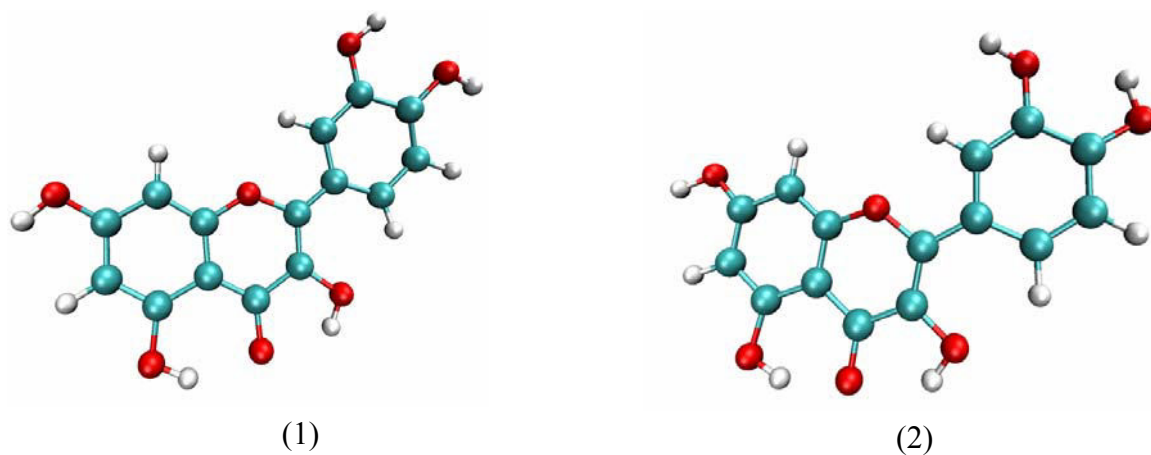
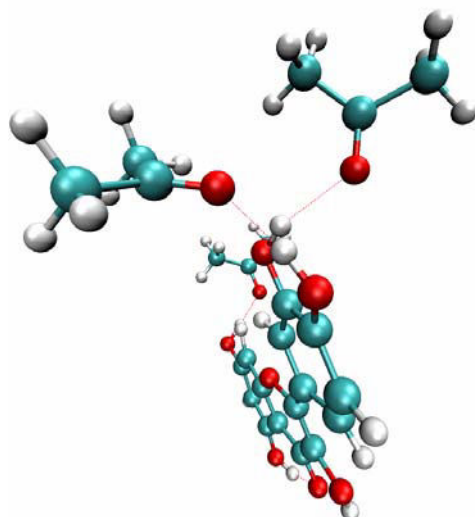


Figure V.2.17. évolution des angles dièdres H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4 pour l'acétonitrile (1) l'acétone (2) et le tert-amyl alcool (3) au cours des trajectoires de dynamique moléculaire





(3)

Figure V.2.18. orientation des hydroxyles O21-H31 et O22-H32, (1) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4=0°, (2) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4=180°, (3) H31-O21-C4-C5 et H32-O22-C5-C4 hors du plan.

Pour s'assurer du sens physique de cette conformation (3), nous avons isolé ce motif quercétine/2-acétone dont nous avons optimisé la géométrie par une méthode semi-empirique. La géométrie obtenue après minimisation est tout à fait comparable avec la conformation observée en dynamique moléculaire.

Dans le cas du *tert*-amyl alcool, le motif impliquant ces deux hydroxyles est beaucoup plus stable, les deux angles dièdres oscillent autour d'une valeur de 0° (OH dans le plan de la molécule) sans qu'aucune transition 0°-180° soit observée. Ceci traduit la conservation au cours de notre trajectoire de la liaison hydrogène intramoléculaire H31-O22.

3.2. Interactions solvant-quercétine

Nous avons construit les RDF des paires impliquant les hydrogènes des hydroxyles de la quercétine, et les atomes N (acétonitrile) ou O (acétone, *tert*-amyl alcool) des solvants à partir des simulations de dynamique moléculaire (figure V.2.19).

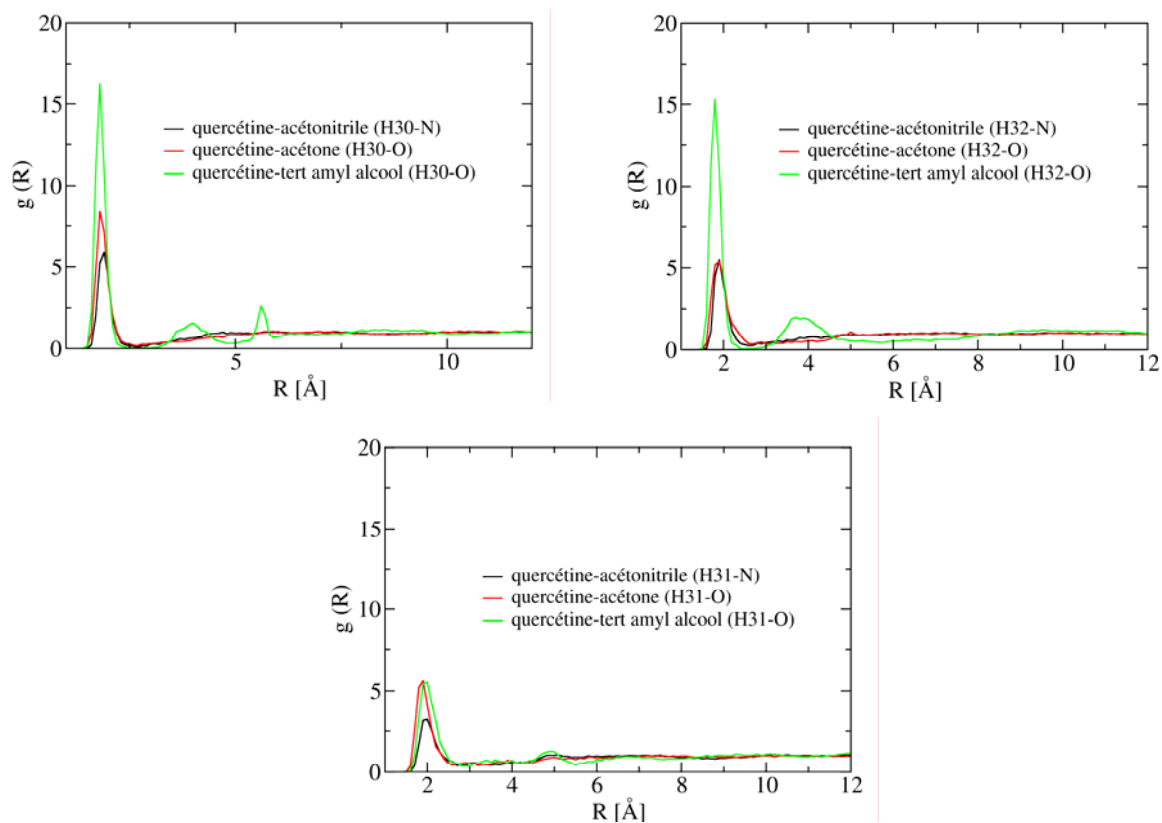


Figure V.2.19. fonctions de distribution radiale quercétine-solvant déduites des trajectoires de dynamique moléculaire

Les RDF représentant les interactions de H30 avec N de l'acétonitrile ou O de l'acétone et du *tert*-amyl alcool présentent un premier pic très structuré aux environs de 2 Å caractérisant une liaison hydrogène. Le premier pic très intense pour le *tert*-amyl alcool montre que la liaison hydrogène H30-O est un peu plus structurée que pour les liaisons H30-N et H30-O dans les deux autres solvants. Le deuxième pic, non observé dans le cas des deux autres solvants, indique la présence de liaisons hydrogènes qui se forment entre les OH de proche en proche, comme décrit dans la structure de ce solvant.

Pour les hydrogènes H32 et H31, les RDF traduisent la présence d'une liaison hydrogène ; les courbes sont similaires dans l'acétone et l'acétonitrile. En effet, dans ces deux solvants les deux hydroxyles font des rotations de 180° rendant les deux hydrogènes H31 et H32 équivalents.

Dans le cas du *tert*-amyl alcool, la situation est différente. L'hydrogène H31 reste impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire tout au long de la trajectoire rendant ainsi cet atome peu disponible pour former une liaison hydrogène avec le solvant (pic peu intense sur la figure V.2.19).

En revanche, l'hydrogène H32 est lui toujours disponible pour interagir avec le solvant, de ce fait son comportement est identique à l'hydrogène H30.

4. CONCLUSION

Ce travail nous a conduit à construire des modèles tout atomes permettant d'étudier par dynamique moléculaire la quercétine dans des phases condensées d'acétonitrile, d'acétone et de *tert*-amyl alcool.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le champ de force OPLS pour modéliser les phases condensées à 300°K de ces trois solvants purs. Les propriétés physico-chimiques calculées pour ces modèles sont comparables à l'expérience. De plus, l'étude de la structure de ces solvants a montré que l'acétone et l'acétonitrile s'organisent de manière similaire (en optimisant l'arrangement des dipôles de ces modèles), alors que le *tert*-amyl alcool est structuré différemment grâce à un réseau de liaisons hydrogènes.

Pour la quercétine, nous avons développé des modèles spécifiques pour les différents solvants. En particulier, nous avons utilisé les paramètres du champ de force OPLS aux quels nous avons ajouté un potentiel de torsion pour l'angle θ ainsi que des jeux de charges atomiques.

Les dynamiques moléculaires réalisées sur les systèmes quercétine-solvant ont montré des similitudes au niveau de la structure de la quercétine quelque soit le solvant. Les interactions quercétine-solvant semblent plus structurées dans le cas du *tert*-amyl alcool. Les molécules d'acétonitrile et d'acétone sont arrangées de manière similaire autour de la quercétine.

Il est clair que les différences de structure et d'interactions observées pour la quercétine et les trois solvants ne permettent pas de conclure quant aux différences de propriétés expérimentales en particulier au niveau de la solubilité. Toutefois, le travail réalisé ici, qui va au-delà des simples modèles dans le vide utilisés couramment dans la littérature pour étudier les flavonoïdes (10-14), nous permet de disposer de modèles robustes pour aller plus loin que l'étude structurale. En particulier, nous envisageons la mise au œuvre des calculs d'énergie libre (15, 16) qui devraient nous permettre d'évaluer les différences d'énergie libre de solvation de la quercétine dans les trois solvants et ainsi d'éclaircir les variations de solubilité observées.

Une autre étude est envisageable à partir de nos modèles serait de modéliser des concentrations élevées de quercétine dans les trois solvants afin de caractériser par dynamique moléculaire la formation ou non d'agrégats.

REFERENCES

1. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J., Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11225-11236.
2. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1781-1802.
3. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, 14, 33-38.
4. Price, M. L. P.; Ostrovsky, D.; Jorgensen, W. L., Gas-Phase and Liquid-State Properties of Esters, Nitriles, and Nitro Compounds with the OPLS-AA Force Field. *Journal of computational Chemistry* **2001**, 22, (13), 1340-1352.
5. Martin, M. G.; Biddu, M. J., Monte Carlo molecular simulation predictions for the heat of vaporization of acetone and butyramide. *Fluid Phase Equilibria* **2005**, 236, 53-57.
6. McLain, S. E.; Soper, A. K.; Luzar, A., Orientational correlations in liquid acetone and dimethyl sulfoxide: A comparative study. *The Journal of Chemical Physics* **2006**, 124, 074502.
7. Jin, B. G.-Z.; Yamagata, Y.; Tomita, K.-I., Structure of Quercetin Dihydrate. *Acta Cryst.* **1989**, C46, 310-313.
8. Angyan, J. G.; Chipot, C.; Dehez, F.; Hatting, C.; Jansen, G.; Millot, C., *J Comput Chem* **2002**, 24, 997-1008.
9. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, J., T.,; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian, Inc.; Wallingford CT, 2004.
10. Erkoc, S.; Erkoc, F.; Keskin, N., Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2003**, 631, (1-3), 141-146.
11. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20, (7), 933-956.
12. Rodriguez, M. R.; Cano, A. T.; Pinto, M. D. C.; Macias, P., Lipoxigenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 674, (1-3), 121-124.
13. Russo, N. T., M.; Uccella, N., Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (8), 3232-3237.
14. van Acker, S. A. B. E. d. G., M. J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, (8), 1305-1312.
15. Darve, E.; Pohorille, A., *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 9169-9183.
16. Hénin, J.; Chipot, C., *J. Chem. Phys.* **2004**, 121, 2904-2914.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

CONCLUSIONS~PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons étudié la solubilité, l'acylation enzymatique et la conformation des flavonoïdes. Dans une première étape, la solubilité de différents flavonoïdes a été étudiée dans trois solvants (acétone, acétonitrile, *tert*-amyl alcool) souvent utilisés en synthèse organique. Par la suite, les effets de la nature des substrats (flavonoïde, donneur d'acyle), de l'origine de la lipase (CAL-B, PSL-C), du rapport molaire (DA/F) et de la nature du solvant sur la performance d'acylation et la régiosélectivité ont été identifiés. Enfin, une étude structurale, par modélisation moléculaire, a été menée pour identifier la conformation des différents flavonoïdes dans le vide et dans les solvants déjà utilisés pour la synthèse organique. Dans cette dernière partie, quelques éléments de relation structure-activité ont été établis.

Les résultats issus de ces différentes expériences ont mené aux conclusions suivantes :

Résultats de l'étude de la solubilité des flavonoïdes

- La solubilité dans l'acétonitrile est caractérisée par une cinétique très rapide. Les valeurs à l'équilibre varient en fonction de la nature du flavonoïde. Ainsi, pour la naringénine et l'hespéritine cette solubilité, dans l'acétonitrile, avoisine les 80 mM alors qu'elle n'est que de 0.5 mM pour la rutine. De même, les propriétés thermophysiques dépendent de la nature du flavonoïde. Les flavonoïdes glycosylés possèdent un point de fusion moins élevé et une enthalpie de fusion plus élevée que ceux aglycones. La différence de solubilité observée à l'équilibre n'est corrélée ni à l'hydrophobicité des molécules (Log P), ni aux propriétés thermophysiques (T_m , ΔH_f , ΔC_p , a^s , γ). Ces dernières ont été déterminées pour la première fois dans ce travail. Néanmoins, ces différences semblent être liées à la structure des flavonoïdes. Ainsi, il a été observé que l'absence de double liaison entre C2-C3 (un angle dièdre OC2C1'C6' de 40°) est corrélée à la forte solubilité de la naringénine et de l'hespéritine dans l'acétonitrile.

Contrairement à ce qui a été observé dans de précédents travaux, la solubilité n'est pas reliée aux interactions soluté-solvant.

- Dans l'acétone, la solubilité de la quercétine (aglycone) est élevée (80 mM) comparée à l'isoquercitrine (30 mM) et à la rutine (13.5 mM). La solubilité de ces trois molécules dans le *tert*-amyl alcool est comparable (60-67 mM).

- L'utilisation du vinyle acétate comme co-solvant avec l'acétonitrile augmente respectivement la valeur de la solubilité de la quercétine et de l'isoquercitrine de 14 et de 5%.

- Pour la quercétine, l'isoquercitrine et la rutine, une augmentation de la température de 50 à 70° ne se traduit pas par une augmentation significative de la solubilité. En revanche, une légère augmentation de 8 à 13% a été notée pour la naringénine et l'hespéritine.

Résultats de l'acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*

- La performance d'acétylation (vitesse initiale et rendement de conversion) dépend fortement de l'origine de la lipase, de la nature du solvant, du rapport molaire et de la structure du flavonoïde.

- Avec CAL-B, seule l'isoquercitrine (glycosylée) a pu être acétylée. Cette enzyme n'accepte pas la forme aglycone, alors que PSL-C est capable d'acétyler les deux formes de flavonoïdes, mais la présence de donneur d'acyle activé et à courte chaîne est obligatoire.

- Avec la forme aglycone, des rendements de conversions élevés ont été obtenus avec la quercétine et la naringénine (99%) dans l'acétonitrile avec un rapport molaire vinyle acétate/flavonoïde de 40. Dans les mêmes conditions opératoires d'acétylation, les rendements de conversions de la chrysin et de l'hespéritine, relativement faibles, sont de 15 et 30%, respectivement. La faible réactivité de ces deux molécule a été expliquée par l'absence d'un groupement OH en position 4'. Avec l'isoquercitrine, quelque soit la lipase (CAL-B ou PSL-C) et le solvant, le rendement de conversion est de 100%. La vitesse initiale a été affectée uniquement par l'origine de la lipase. Elle est deux fois plus élevée avec CAL-B (8 mM.h⁻¹).

- Le nombre et les proportions relatives des produits, obtenus avec les deux formes de flavonoïdes, varient en fonction de l'origine de l'enzyme, du rapport molaire et de la structure

du flavonoïde. Pour la chryisine, un seul produit a été obtenu, alors qu'avec l'isoquercitrine, trois et deux produits ont été obtenus en présence de PSL-C et de CAL-B, respectivement.

- L'utilisation d'un excès de vinyle acétate a favorisé la formation de triesters.

- La régiosélectivité d'acétylation dépend essentiellement de l'origine de l'enzyme et de la structure du flavonoïde. En effet, l'acétylation avec CAL-B a lieu uniquement sur la partie sucre, alors que PSL-C réagit à la fois sur la partie sucre et sur la génine. Avec CAL-B, l'acétylation a lieu dans l'ordre suivant : 6''-OH, 3''-OH et 2''-OH. Pour PSL-C, en présence de l'isoquercitrine, l'ordre de réactivité est le suivant : 6''-OH et 4'-OH. Lors de l'acétylation des formes aglycone, l'ordre de réactivité est le suivant : 4'-OH, 3'-OH et 7'-OH.

- La comparaison des performances de conversion de la quercétine par différents vinyles esters montre que le rendement de conversion dépend de la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle. Le rendement le plus élevé, 99%, a été obtenu avec le vinyle acétate suivi du vinyle propionate, 84%, du vinyle butyrate, 76% et du vinyle palmitate, 19%.

- La longueur de la chaîne carbonée n'a pas d'influence sur la position d'acylation, mais par contre sur le nombre de produits synthétisés. Dans le cas du vinyle propionate, trois produits sont synthétisés, alors qu'en présence de vinyle butyrate deux produits sont synthétisés. L'acylation est favorisée en premier lieu en position 4'-OH suivie par 3'-OH et 7-OH.

- L'utilisation de l'acide laurique et du méthyle laurate comme donneurs d'acyle n'a pas permis l'acylation de la quercétine. Il s'avère que la présence d'une fonction vinylique est essentielle pour l'activité de PSL-C.

Résultats de l'étude conformationnelle des flavonoïdes dans le vide et relation structure activité anti-radicalaire

L'optimisation de la structure de la quercétine, de l'isoquercitrine, de la chryisine, de la naringénine, de l'hespéritine et de leurs dérivés acétylés, par la méthode AM1 et dans le vide, a montré que :

- l'angle de torsion θ est d'environ -25° dans le cas des flavonoïdes possédant une double liaison entre C2-C3 (quercétine, isoquercitrine, rutine et chryisine) et de 40° dans le cas où la double liaison est absente (naringénine et hespéritine).

- l'acétylation semble avoir, dans certains cas, un effet sur l'orientation du cycle B par rapport au reste de la génine et de la partie sucre par rapport au reste de la molécule.

Ces modifications au niveau des conformations sont dues à des différents types d'interactions. Elles sont essentiellement guidées par la formation de liaisons hydrogènes. Ces variations peuvent affecter les propriétés physiques, chimiques et biologiques des différentes molécules.

Bien que la méthode AM1 est la plus utilisée dans la littérature pour étudier la structure des flavonoïdes, cette méthode n'est pas la plus adaptée pour ce type de molécules. Pour cela nous avons testé la méthode DFT/B3LYP (6-31G*). Cette méthode a aboutie, dans le cas de la quercétine, à un angle θ différent ; il est de 0° comparé à -27° obtenu par AM1. D'où la nécessité d'interpréter les résultats obtenus par AM1 avec précaution.

La corrélation de l'activité anti-radicalaire, évaluée par la mesure du TEAC, montre que l'augmentation de cette grandeur est accompagnée d'une diminution du IP, de l' E_{LUMO} , l' E_{HOMO} , de la E_g , du moment dipolaire, et de la charge sur l'O4' sauf pour l'isoquercitrine. Par contre, l'augmentation de l'excès de charge sur C2-C3 est reliée à des valeurs élevées de TEAC, sauf pour l'isoquercitrine. Le fait que l'isoquercitrine ne suit pas l'évolution observée avec les autres molécules pourrait être dû à sa structure glycosylée.

En confrontant ces corrélations aux résultats relatifs aux produits acétylés, il a été observé que le descripteur moléculaire IP évolue d'une manière contradictoire par rapport à l'évolution observée avec les molécules natives.

Pour la QC2-C3, la E_g , le μ et la Q4', une diminution pour certains dérivés acétylés et une conservation pour d'autres de l'activité anti-radicalaire sont attendues. Il apparaît donc que l'acétylation en position 7 ne modifie pas les propriétés anti-radicalaires. Toutefois, il est difficile de prédire le TEAC à partir de corrélation faites sur cinq molécules.

Résultats de la modélisation moléculaire de la quercétine dans des solvants organiques

Ce travail nous a permis de construire des modèles tout atomes permettant d'étudier par dynamique moléculaire la quercétine dans des phases condensées d'acétonitrile, d'acétone et de *tert*-amyl alcool.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le champ de force OPLS pour modéliser les phases condensées à 300°K de ces trois solvants purs. Les propriétés physico-chimiques calculées pour ces modèles sont comparables à l'expérience. De plus, l'étude de la structure de ces solvants a montré que l'acétone et l'acétonitrile s'organisent de manière similaire (en optimisant l'arrangement des dipôles de ces modèles), alors que le *tert*-amyl alcool est structuré différemment grâce à un réseau de liaisons hydrogènes.

Pour la quercétine, nous avons développé des modèles spécifiques pour les différents solvants. En particulier, nous avons utilisé les paramètres du champ de force OPLS auxquels nous avons ajouté un potentiel de torsion pour l'angle θ ainsi que des jeux de charges atomiques.

Les dynamiques moléculaires réalisées sur le système quercétine-solvant ont montré des similitudes au niveau de la structure de la quercétine quelque soit le solvant. Les interactions quercétine-solvant semblent plus structurées dans le cas du *tert*-amyl alcool. Les molécules d'acétonitrile et d'acétone sont arrangées de manière similaire autour de la quercétine.

Il est clair que les différences de structures et d'interactions observées pour la quercétine et les trois solvants ne permettent pas de conclure quant aux différences de propriétés expérimentales en particulier au niveau de la solubilité. Toutefois, le travail réalisé ici va au-delà des simples modèles dans le vide utilisés couramment dans la littérature pour étudier les flavonoïdes.

Perspectives

A partir de ces résultats, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées.

- Du point de vue solubilité des flavonoïdes et synthèse d'esters

Il est nécessaire d'étudier l'effet de la teneur en eau sur la solubilité des flavonoïdes. Ce facteur pourrait fortement affecter l'organisation et la structure du flavonoïde en milieu organique.

Utiliser des solvants moins toxiques, tels que les liquides ioniques pour une éventuelle application industrielle.

Tester le mode d'alimentation des substrats (donneur d'alcool et d'acyle) en semi-continu et en continu.

- Du point de vue modélisation moléculaire

Les calculs réalisés, dans ce travail, par la méthode AM1 doivent être complétés par la méthode DFT/B3LYP (6-31G*). Il faudrait aussi, avec des moyens de calcul plus importants, étudier d'une manière plus exhaustive la recherche conformationnelle des différentes molécules.

Pour vérifier l'existence de corrélations entre TEAC et structure, il est nécessaire d'étudier des molécules ayant des valeurs de TEAC éloignées et surtout d'établir ces corrélations pour les molécules acétylées.

Il est également intéressant de poursuivre les investigations en modélisation moléculaire. En effet, nous disposons maintenant de modèles robustes pour aller plus loin que l'étude structurale. En particulier, nous envisageons la mise au œuvre des calculs d'énergie libre qui devraient nous permettre d'évaluer les différences d'énergie libre de solvation de la quercétine dans les trois solvants et ainsi d'éclaircir les variations de solubilité observées.

Une autre étude est envisageable à partir de nos modèles serait de modéliser des concentrations élevées de quercétine dans les trois solvants, afin de caractériser par dynamique moléculaire la formation ou non d'agrégats.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Selim KERMASHA, Professeur, McGill University, Québec, Canada

Monsieur Eric DUBREUCQ, Professeur, ENSA.M-INRA, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame CHEBIL Latifa

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Acylation des flavonoides par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle"

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 28 novembre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Titre : Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle

Résumé : Ce travail a pour objectif d'étudier les performances et la régiosélectivité de deux lipases lors de l'acylation de flavonoïdes en milieu organique. Cette étude a permis de montrer que la solubilité dans l'acétonitrile, l'acétone et le *tert*-amyl alcool dépend de la nature du flavonoïde. La solubilité la plus élevée a été obtenue avec la naringénine et l'hespéritine et la plus faible pour la rutine et l'isoquercitrine. Les propriétés thermophysiques sont également affectées par la nature du flavonoïde. Ainsi, les flavonoïdes glycosylés possèdent un point de fusion moins élevé et une enthalpie de fusion plus élevée que ceux des aglycones. Du point de vue cinétique d'acylation, des rendements de conversion de 99% ont été obtenus avec la quercétine. Ces rendements varient en fonction de la nature du flavonoïde et du donneur d'acyle, du rapport molaire (vinyle acétate/ flavonoïde) et de la nature du solvant. Le rendement le plus faible a été obtenu avec l'hespéritine. La modélisation moléculaire de flavonoïdes dans le vide et dans des solvants a permis d'étudier le rôle de la conformation sur la solubilité et de dégager des relations structure-activité pour un certain nombre de descripteurs moléculaires. Enfin des modèles OPLS tout atomes ont été construits pour étudier par dynamique moléculaire la quercétine dans des phases condensées de solvants organiques.

Mots clés : flavonoïdes, acylation, CAL-B, PSL-C, solubilité, structure, activité anti-radicalaire, modélisation moléculaire

Abstract : This work aims to study the performances and the regioselectivity of two lipases throughout the acylation of flavonoids in organic medium. This study showed that the solubility in acetonitrile, acetone and *tert*-amyl alcohol depends on the nature of the flavonoid. The highest solubility, in acetonitrile, was obtained with the naringenin and hesperitin and the lowest with rutin and isoquercitrin. The thermophysical properties are also affected by the nature of flavonoids. Thus glycosylated flavonoids are characterized by a low melting point and a high enthalpy of fusion compared to the aglycon ones. From the kinetic acylation data, the highest conversion yields of 99% were obtained with quercetin. These conversion yields vary according to the nature of the flavonoid and the acyl donor, the molar ratio (vinyl acetate/flavonoid) and the nature of the solvent. The lowest conversion yield was obtained with hesperitin. Molecular modeling of flavonoids in vacuum and solvents allows to study the role of conformation structure on solubility and to release the structure-activity relationship with many electronic descriptors. Finally, OPLS all atoms were built to study, by molecular dynamics, quercetin in condensed phases of organic solvents.

Key words : flavonoids, acylation, CAL-B, PSL-C, solubility, structure, anti-radical activity, molecular modeling