



HAL
open science

Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes

Julie Anthoni

► **To cite this version:**

Julie Anthoni. Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL097N . tel-01752858

HAL Id: tel-01752858

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752858>

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**

THESE

Présentée à l'INPL par

Julie ANTHONI

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de
flavonoïdes

Soutenue publiquement le 10 Décembre 2007 devant la commission d'examen

Rapporteurs :	Mr S. Kermasha Mr S. Lamare	Professeur à l'Université Mc Gill, Canada Professeur à l'Université de La Rochelle
Examineurs :	Mme E.R. Maïa Mr J.M. Engasser Mr M. Ghoul Mme C. Humeau-Virot	Professeur à l'Université de Brasilia, Brésil Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy M. de Conférences à l'ENSAIA-INPL, Nancy
Invités :	Mr J.M. Wieruszeski Mr F. Lionneton	Ingénieur de Recherche CNRS, Université de Lille Ingénieur de Recherche CNRS, 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 ma gratitude à Monsieur Jean-Marc Engasser, 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.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Selim Kermasha, professeur à l'université Mc Gill, Montréal et à Monsieur Sylvain Lamare professeur à l'université de La Rochelle pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Monsieur Mohamed Ghoul, qui m'a encadré, conseillé et soutenu durant ces 3 années de thèse. Toujours disponible, quelque fois contrariant et souvent de bons conseils, je suis honorée d'avoir pu mener ce travail sous sa direction. Sa compétence, son acharnement et ses larges connaissances m'ont permis d'apprendre beaucoup à ses côtés.

Je remercie Madame Catherine Humeau, Maître de conférence à l'ENSAIA, au cours de ces 3 ans de thèse, elle a su m'épauler, me soutenir et me conseiller. Médiatrice lors des réunions de travail, je n'oublie pas qu'elle a toujours su m'écouter et m'encourager. Merci pour tout.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu l'honneur de côtoyer des personnes, qui m'ont permis d'approcher leur domaine de compétence.

Je remercie Monsieur Magdalou professeur à l'UHP et l'ensemble de la plateforme IFR111 qui m'ont permis d'utiliser le MALDI-TOF. Au cours de mes travaux, j'ai eu l'occasion de connaître Monsieur Frédéric Lionneton, qui bien plus qu'un spécialiste MALDI-TOF, m'a conseillé et soutenu tout au long des méandres de ce travail. Merci Fred !

Je remercie Monsieur Mutzenhardt professeur à l'UHP qui m'a initié à la RMN et à la diffusion et Monsieur Olivier Fabre du LCPM qui m'a fait découvrir la HRMAS. Mais ma découverte du monde des RMNistes n'aurait pas été complète sans l'aide de Monsieur Wieruszkeski de l'université de Lille, que je remercie tout particulièrement pour son accueil chaleureux, ses nombreuses explorations et ses innombrables conseils.

Je remercie Monsieur Christian Sanchez, Professeur au LBB, précédemment mon encadrant de DEA, pour ses encouragements et ses conseils en rhéologie et en infra-rouge.

Je remercie tout particulièrement Elaine Maia professeur à l'université de Brasilia pour avoir accepté d'examiner ce travail et surtout pour m'avoir initié au monde de la modélisation moléculaire. Merci de tes conseils, de ton soutien et de ta joie de vivre qui ont su nous motiver à plonger à corps perdu dans la modélisation moléculaire.

Merci à ceux qui m'ont épaulé dans mon activité de tous les jours, merci à Monsieur Brice, Olivier, Adrien, et surtout à Evelyne. Je n'oublie pas les nombreuses heures passées avec Elaine et Evelyne devant l'ordinateur pour installer Discovery studio.

Mes remerciements vont à toutes les personnes des différents labo qui m'ont accompagné durant ces 3 ans : Madame Marchal, Marie-Noël, Cédric, Guillaume, Nizar, Fadi, Delphine, Lionel, Monsieur Rovel, Madame Maucourt, les Carole's, Anne, Sylvia, Sandrine, Reine, Ilef, Nidhal, Nidal, Aude, Karima... et bien d'autres.

Je n'oublie pas ceux qui m'ont supporté au quotidien et qui m'ont soutenu jour après jour. Merci tout particulier à Céline et à Latifa, qui m'ont aidé, soutenu, réconforté et accompagné tout au long de ce travail.

Je remercie également les bout en train du labo sans qui les journées seraient bien moins pétillantes : merci à Nicolas, Fayçal, Naïma et Eduardo. Et un grand merci à Jennifer qui égaye nos journées de sa joie de vivre et de sa bonne humeur.

Je tient également à remercier mes amis qui m'ont écouté et soutenu, merci à Seb, Caro, Alima, Nicolas qui à chaque pose midi étaient là et aux autres Benoît, Thomas, David, Christophe, Chon, Anne-Lise,...

Merci à tous les membres de ma famille qui ont été mon premier soutien et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci maman de m'avoir soutenu, merci Anne et Denis pour vos encouragements quand le moral n'était pas au beau fixe.

Merci tout particulier à Pierre qui en première ligne à du me supporter et me soutenir tout au long de ses 3 ans, merci à ma moitié.

Cette thèse m'a permis de connaître d'innombrables personnes qui m'ont appris scientifiquement mais surtout humainement, merci à vous tous d'avoir été là !!!

Je dédie ce travail à mon père !

LISTE DES ABRÉVIATIONS

\overline{M}_n	Masse moléculaire moyenne en nombre
\overline{M}_w	Masse moléculaire moyenne en poids
5SCA	Acide 5-chlorosalicylique
9NA	9-nitroanthracene
A	Aire superficielle (Å ²)
ABTS	3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
ACN	Acétonitrile
AM1	Austin Model 1
ATR	Cristal à réflexion totale atténuée
B ₀	Champ magnétique
BDE	<i>Bond Dissociation Energy</i> , variation d'enthalpie entre le radical phenoxy (ArO [•]) et la molécule parent (ArOH) (kcal/mol)
C*	Concentration critique
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i> , RMN 2D ¹ H/ ¹ H, couplage scalaire
CPG	Chromatographie par perméation gel
CFE	<i>Consistent Force Field</i>
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMF	Diméthylformamide
DOSY	Spectroscopie RMN par ordre de diffusion
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
E	Energie du système
E ⁰	Potentiel redox
EDTA	Acide EthyleneDiamineTetraAcétique
E _g	Différence entre E _{HOMO} et E _{LUMO}
E _{HOMO}	Energie de l'orbitale moléculaire la plus haute occupée
E _{LUMO}	Energie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante
F	Farad
FTIR	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
H	Opérateur <i>hamiltonien</i>
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoïque
HCCA	Acide 4-hydroxy-R-cyanocinnamique
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> : 2D ¹ H/ ¹³ C, couplage scalaire
HOMO	Orbitale moléculaire la plus haute occupée
HRMAS	<i>High resolution magic angle sepctroscopy</i> , RMN du solide
HRP	<i>Horseradish</i> peroxydase : peroxydase de raifort
IAA	Acide trans-3-indoleacrylique
IC50	Concentration aboutissant à 50% de l'activité détectée
IDA	Acide <i>trans</i> -3-indoleacrylique
I _m	Indice de masse moléculaire moyenne en poids
IP	Potentiel d'ionisation, variation d'enthalpie entre le radical cation (ArOH ^{•+}) et la molécule parent (ArOH) (kcal/mol)
IR	Rayonnement infra-rouge
J	Constante de couplage en RMN
Log P	Coefficient de partition octanol/eau
LUMO	Orbitale moléculaire la plus basse vacante
m/z	Rapport masse sur charge
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> , technique de spectrométrie de masse
MM	Masse molaire (g/mol)
NPT	Ensemble isobare-isotherme
NVE	Ensemble microcanonique
NVT	Ensemble canonique

P	Pression
PBC	<i>Periodic bond chain</i> , système périodique utilisé en modélisation moléculaire
PDI	Polydispersité
pF/m	Picofarad/mètre, unité de la constante diélectrique (ϵ)
POL	Polarisabilité moléculaire (a.u.)
PS	Polystyrène
QOn	Charge partielle sur l'oxygène n
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i> , relation structure-activité
QSPR	<i>Quantitative structure-property relationship</i> , relation structure-propriété
R	Rayon
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	<i>Root Mean Square Distance</i>
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect spectroscopy</i> Y: 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ couplage dipolaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espèce radicalaire portée par l'oxygène
S	Solubilité ($S_{\text{rutine(eau)}}$) : solubilité de la rutine dans l'eau)
SA	Acide sinapinique
SBP	<i>Soybean peroxidase</i> : peroxydase de soja
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , chromatographie par exclusion de taille
T	Température
TFA	Acide trifluoroacétique
THAP	2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate
THF	Tétrahydrofurane
TOF	<i>Time of flight</i> , technique de séparation selon la masse
VOL	Volume moléculaire (\AA^3)
$\Delta\Delta\text{H}$ (BDE)	Variation d'enthalpie entre le radical phenoxy et la molécule parent (kcal/mol)
E	Constante diélectrique (F/m)
μ	Moment dipolaire
X	Électronégativité (eV)

SOMMAIRE GÉNÉRAL

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I. Etude bibliographique	4
Chapitre II. Matériels et Méthodes	71
Chapitre III. Mise au point des techniques analytiques	102
Chapitre IV. Oligomérisation enzymatique.....	118
Chapitre IV.1. Oligomérisation de la rutine.....	118
Chapitre IV.2. Oligomérisation de l'esculine.....	144
Chapitre V. Modélisation moléculaire	165
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	208
ANNEXES.....	223

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Les constituants majeurs de notre organisme (lipides, protéines, ADN) peuvent être oxydés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) incluant des radicaux libres (ROO^\bullet , RO^\bullet , O_2^\bullet , HO^\bullet). Les ROS sont produits continuellement à partir de l'oxygène que nous respirons. Les dommages oxydatifs provoqués par les ROS portent le nom de Stress Oxydant, qui est responsable de nombreuses maladies dégénératives. Dans les conditions physiologiques normales, nos cellules sont équipées de systèmes de défense antioxydante, qui leur permettent de neutraliser les ROS pour les maintenir à un faible taux dans les cellules et par conséquent, empêcher le déclenchement d'un stress oxydant. La première barrière de défense est synthétisée par les cellules. C'est le cas des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) mais également du glutathion, de l'acide urique, de l'acide lipoïque, du coenzyme Q10, de la mélatonine, de la bilirubine, de l'albumine. La seconde barrière de défense nous est apportée par notre alimentation, par l'apport de molécules antioxydantes. Cet apport alimentaire est variable selon l'individu et le mode d'alimentation.

Afin d'apporter une dose journalière suffisante quel que soient le régime alimentaire et la nature des ingrédients consommés, des compléments alimentaires ont été développés ces dernières années. Ces suppléments en antioxydant, issus de plantes ou synthétisés, se font par l'intermédiaire de gélules ou directement par l'enrichissement de certains aliments.

Les principaux antioxydants végétaux sont au nombre de quatre : la vitamine C ou acide L-ascorbique, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols. Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes sont de plus en plus utilisés dans la préparation des compléments alimentaires. En effet, ces composés sont utilisés dans de nombreux domaines agroalimentaire (antioxydant, colorant, astringent), pharmaceutique (anti-inflammatoire, anti-cancer, anti-HIV, traitement amincissant) et cosmétique (contre le vieillissement cutané, dépigmentation de la peau, anti-acnéique, anti-UV). Mais leur utilisation se heurte à leur faible solubilité dans les milieux de formulation (aqueux, solvants), et à leur grande instabilité à la lumière et à la chaleur. Plusieurs méthodes de fonctionnalisation ont été décrites pour palier ces inconvénients tout en conservant ou en améliorant leurs propriétés antioxydantes. L'acylation, l'hydroxylation, la glycosylation et la polymérisation sont quelques unes des voies de fonctionnalisation utilisées.

La polymérisation est une voie qui se développe de plus en plus. Cette technique consiste en l'initiation d'une chaîne radicalaire qui en se propageant va permettre la polymérisation d'unités monomériques. Cette voie de fonctionnalisation peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique. La voie enzymatique présente les avantages d'apporter une certaine régio- et énantio-sélectivité, d'être effectuée en conditions douces de pH et de température tout en conservant le label de « chimie verte ».

La polymérisation des composés phénoliques affecte leurs propriétés biologiques et structurales. Les premières études sur le sujet ont montré de grande variabilité d'impact de l'oligomérisation, notamment sur les propriétés antioxydantes, la solubilité et la stabilité thermique. Selon le substrat, le type d'enzyme, le mode de synthèse et les conditions réactionnelles, les propriétés des polymères seront accrues, identiques ou diminuées par rapport aux propriétés du monomère. Ces effets antagonistes de la polymérisation sont dus à la complexité de la réaction. En effet, la polymérisation se décompose en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les différents paramètres de la réaction (enzyme, substrat, pH, température, solvant, ...) vont agir spécifiquement sur chacune des ces étapes. Chaque paramètre réactionnel est susceptible d'influencer le mécanisme de polymérisation et ainsi d'avoir un impact sur la structure des polymères formés. C'est cette structure qui va gouverner les propriétés des polymères. Ainsi pour maîtriser ces réactions de polymérisation enzymatique, et synthétiser des biomolécules avec des propriétés recherchées, il s'avère nécessaire d'identifier et de quantifier les effets des facteurs réactionnels, de préciser leurs effets sur les structures des oligomères synthétisés (taille, type de pontage, ...) et de déterminer la relation structure-activité des oligomères obtenus.

Dans un premier temps, compte tenu de la complexité de la réaction de polymérisation enzymatique et du grand nombre de facteurs impliqués dans son contrôle, nous avons mis au point une plateforme de synthèse automatisée. Cette plateforme comprend un plateau de plusieurs réacteurs de synthèse en parallèle et permet le dépôt sur cible MALDI (détermination des masses absolues) ainsi que l'injection en ligne sur SEC (détermination des masses relatives).

Dans un second temps, nous avons quantifié les effets des conditions opératoires (concentration d'enzyme et de substrat, pH, température, nature et pourcentage de solvant) sur les cinétiques de consommation de substrat et de formation des produits, sur la polydispersité, la masse moyenne en poids et la masse absolue des polymères synthétisés.

Puis, nous avons évalué les structures des biomolécules synthétisées. Le nombre, le type et la localisation du pontage reliant les unités monomériques ont été analysés par UV, FTIR, MALDI-TOF et RMN. L'approche expérimentale a été corrélée à l'approche par modélisation moléculaire afin d'expliquer le mécanisme réactionnel permettant d'aboutir aux pontages observés.

Enfin, nous avons déterminé expérimentalement la solubilité, les activités antiradicalaires et d'inhibition de la xanthine oxydase. Ces propriétés ont été corrélées à la structure ainsi qu'aux descripteurs moléculaires des polymères définis par modélisation moléculaire.

Ces axes d'études vont permettre de comprendre et de relier les mécanismes réactionnels à la structure et aux propriétés des polymères, tout en évaluant le rôle joué par la modulation des conditions réactionnelles.

Deux substrats, la rutine et l'esculine ont été utilisés comme modèle d'étude dans ce travail. La rutine est un flavonoïde issu de la famille des flavonols glycosylés, comportant un glucose et un rhamnose. Alors que l'esculine est une coumarine glycosylée, comportant un glucose. La laccase de *Trametes versicolor* a été utilisée comme biocatalyseur.

CHAPITRE I.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Etude Bibliographique

1. STRUCTURE ET ORIGINE DES FLAVONOÏDES.....	4
1.1. LES FLAVONOÏDES	4
1.2. LES COUMARINES	7
2. PROPRIÉTÉS ET ACTIVITÉS DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMÈRES.....	8
2.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	9
2.1.1. <i>Solubilité des flavonoïdes</i>	9
2.1.2. <i>Absorption dans le domaine UV-visible</i>	10
2.1.3. <i>Stabilité des flavonoïdes</i>	12
2.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES	14
2.2.1. <i>Propriétés antioxydantes et antiradicalaires</i>	14
2.2.2. <i>Propriétés complexantes</i>	17
2.2.3. <i>Inhibition d'enzymes</i>	18
2.2.4. <i>Activité de photoprotection</i>	20
2.2.5. <i>Toxicité</i>	21
3. PROPRIÉTÉS ET ACTIVITÉS DES COUMARINES	21
3.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	21
3.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES	22
4. POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOÏDES ET DES COUMARINES.....	23
4.1. LES OXYDOREDUCTASES	23
4.2. MÉCANISMES DE POLYMERISATION	26
4.2.1. <i>Mécanisme radicalaire</i>	26
4.2.2. <i>Type de pontage mis en jeu</i>	27
4.3. PROCÉDES DE POLYMERISATION	30
4.4. INCIDENCE DU MODE PONTAGE ET DU DEGRE DE POLYMERISATION SUR LES PROPRIETES	62
5. LA MODÉLISATION MOLÉCULAIRE APPLIQUÉE AUX FLAVONOÏDES	63
5.1. ETUDE CONFORMATIONNELLE	63
5.2. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	64
5.3. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE PRO-OXYDANTE.....	66
5.4. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE INHIBITRICE D'ENZYMES	69

Tableaux

Tableau I.1.	Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol	11
Tableau I.2.	Effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes	17
Tableau I.3.	Absorption UV des coumarines dans l'éthanol.....	22
Tableau I.4.	Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines	22
Tableau I.5.	Modes de pontage répertoriés dans la littérature.....	29
Tableau I.6.	Eléments structuraux nécessaires à une bonne activité antioxydante dans le cas des deux mécanismes par transfert d'hydrogène et d'électron	66
Tableau I.7.	Exemple de relation structure-activité cytotoxique.....	68
Tableau I.8.	Exemples de relation structure –activité inhibitrice de la xanthine oxydase ...	70

Figures

Figure I.1.	Squelette de base et numérotation adoptée	4
Figure I.2.	Schéma de biosynthèse des flavonoïdes et des coumarines.....	5
Figure I.3.	Les différentes classes de flavonoïdes	6
Figure I.4.	Structure de la rutine	7
Figure I.5.	Exemples des différentes classes de coumarines	8
Figure I.6.	Structure de l'esculine.....	8
Figure I.7.	Domaine d'absorption dans le domaine UV-visible	11
Figure I.8.	Exemples d'auto-oxydation de flavonoïdes	13
Figure I.9.	Principaux éléments structuraux nécessaires à l'activité antioxydante des flavonoïdes	16
Figure I.10.	Chélation des métaux par les flavonoles	18
Figure I.11.	Structure d'un monomère de la laccase de <i>Trametes versicolor</i>	18
Figure I.12.	Mécanisme réactionnel de la laccase utilisée comme détecteur biologique	25
Figure I.13.	Pontage observé dans le cas de l'oligomérisation de la catéchine par HRP	27
Figure I.14.	Simple et double pontage de polyflavane	28
Figure I.15.	Clivage oxydatif et polymérisation de la quercétine	30
Figure I.16.	Pontage par photodimérisation de coumarine	30
Figure I.17.	Structures optimisées d'énergie minimale de la rutine	64

Chapitre I. Etude bibliographique**1. Structure et origine des flavonoïdes**

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, excepté les chalcones, les aurones et les isoflavones, ont une origine biosynthétique commune et comportent un même élément structural de base formé par quinze atomes de carbone appartenant à deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Figure I.1).

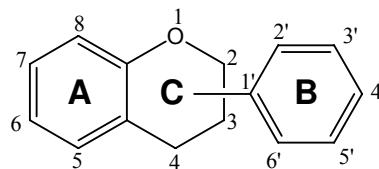


Figure I.1. Squelette de base et numérotation adoptée [1]

Les flavonoïdes dérivent 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 Figure I.2.

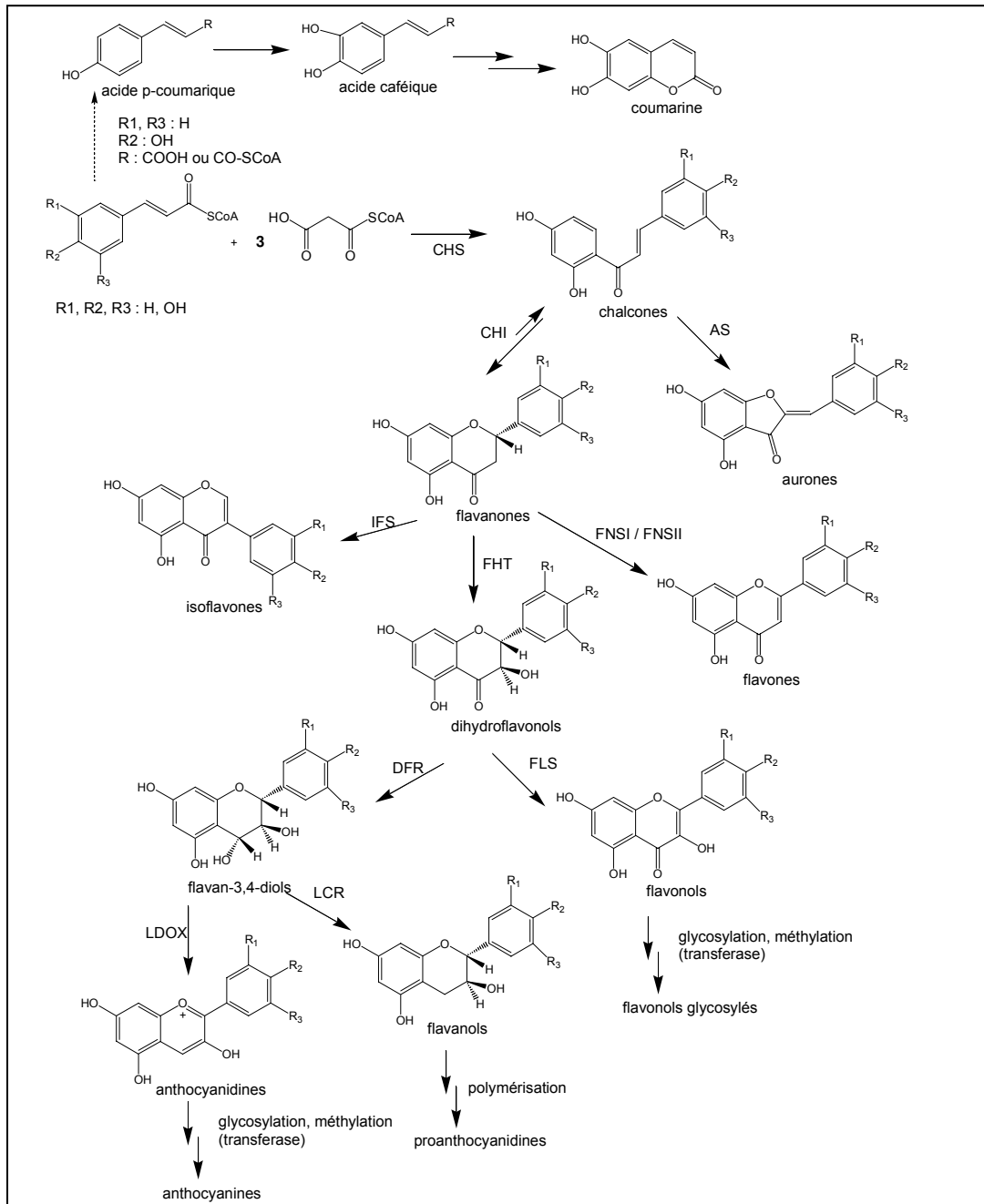


Figure I.2. Schéma de biosynthèse des flavonoïdes et des coumarines (adaptées de [2-4]. AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol-4-réductase, FHT : flavanone-3-hydrolase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : licochalcone dioxygénase, LCR : leucoanthocyanidin réductase

Les flavonoïdes sont subdivisés, comme indiqué en Figure I.3., en différentes classes en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C. Les composés appartenant à la même classe diffèrent entre eux par leur degré et la position d'hydroxylation, la présence de substituant sur la génine et le degré de polymérisation. Les modifications les plus couramment rencontrées sont l'hydroxylation, l'alkylation (méthylation ou prénylation), la glycosylation et l'acylation, soit directement par un groupement phénolique, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose.

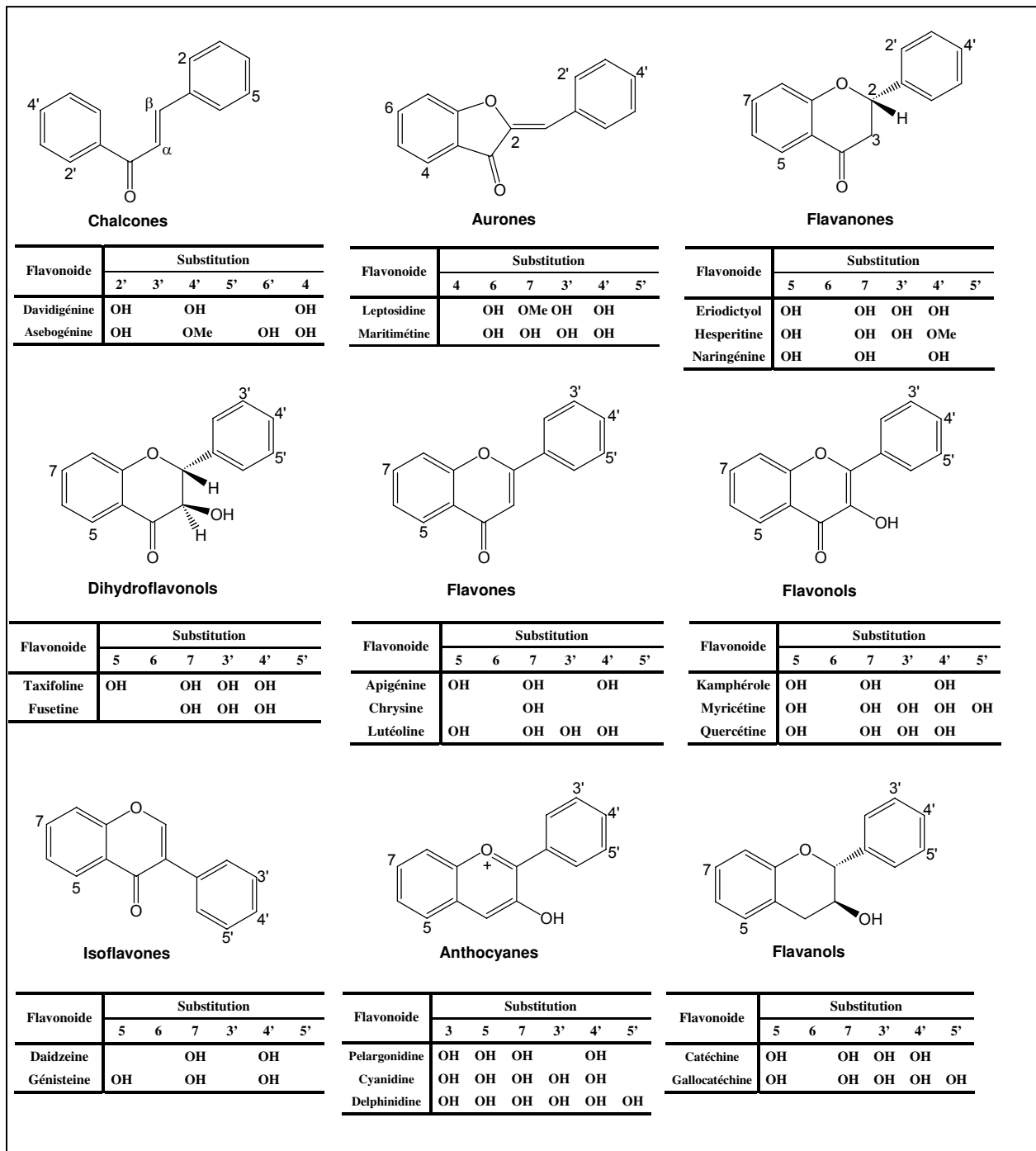
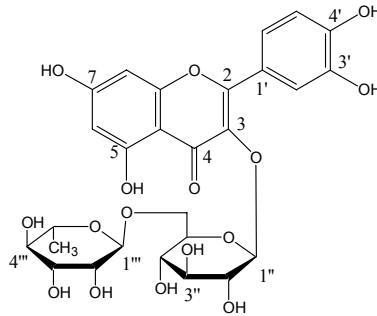


Figure I.3. Les différentes classes de flavonoïdes [5, 6]

Dans cette étude, nous nous sommes intéressé à la rutine (Figure I.4.). Il s'agit d'un disaccharide naturel de la quercétine (3-[6-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucosyl] quercétine) présent dans de nombreuses plantes (sarrasin, fleur de Sophora, agrumes, feuille d'eucalyptus, tomate, ...).



Structure de la rutine

La rutine comme les autres flavonoïdes a de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine. Il a été établi que la rutine présente des activités de vasorelaxation [7, 8], anti-inflammatoire [9, 10], hépatoprotecteur [11] et possède, entre autres, des propriétés antioxydantes, de piégeage de radicaux [12, 13], de complexation des métaux [14] et de protection contre les dommages de l'ADN [15].

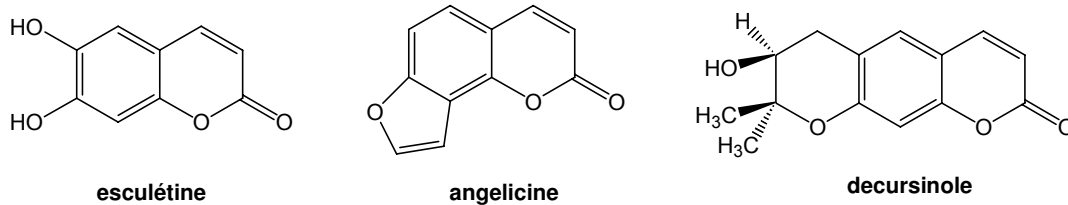
Les coumarines

Plus de 1300 coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires dans les plantes, mais aussi dans les champignons et les bactéries. Ces composés sont utilisés principalement dans les produits agro-alimentaires et cosmétiques comme agent fixant et exhausteur de parfums.

Il existe trois classes principales de coumarines (Figure I.5) :

- les hydroxycoumarines (umbélliférone, esculétine) et leurs dérivés glycosylés sont trouvés dans les végétaux supérieurs,
- les furanocoumarines (angélicine),
- les pyranocoumarines (decursinole).

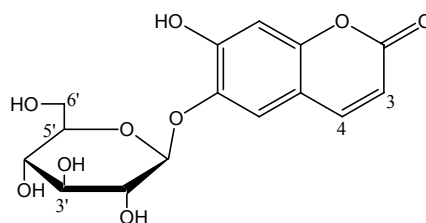
Les composés de la première classe sont synthétisés par les végétaux supérieurs, alors que ceux appartenant aux deux dernières classes sont produits par les Umbelliferae et les Rutaceae.



Exemples des différentes classes de coumarines

Les coumarines possèdent de nombreuses propriétés biochimiques et pharmaceutiques. Leurs activités dépendent de la structure et de la nature des substituants. On peut citer par exemple, des activités de réduction d'oedèmes, de vasorelaxation, anti-inflammatoire, d'inhibition d'enzyme, antimicrobienne, antivirale, anticancer et des propriétés antioxydantes [16, 17].

Dans ce travail, l'esculine (6-glucopyranosyl esculétine) (Figure I.6.) a été retenue comme modèle d'étude. Ce composé est un monosaccharide de l'esculétine. Il est extrait des écorces de Hippocastanaceae, Rosaceae, Oleaceae (*Fraxinus*, *Aesculus hippocastanum*, *Crataegus oxyacantha*) et des feuilles de Pittosporaceae et l'on en retrouve dans les fruits du Kiwi.



Structure de l'esculine

2. Propriétés et activités des flavonoïdes et de leurs oligomères

Comme il a été mentionné précédemment, les activités biologiques et les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes sont variables selon leurs structures. Dans cette étude

bibliographique, nous nous sommes principalement intéressés à leur solubilité, leur absorption UV-visible, leur stabilité et aux activités antioxydantes, d'inhibition d'enzyme et de photoprotection.

2.1. Propriétés physico-chimiques

2.1.1. Solubilité des flavonoïdes

Selon la structure du flavonoïde, différentes interactions peuvent se développer en présence d'un solvant [18]:

- des interactions hydrophobes au niveau des cycles aromatiques (A et B) et des substituants carbonés aliphatiques en présence des solvants apolaires;
- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogène 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.

Cependant, Saidman *et al.* [19] ont rapporté que le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogène avec le solvant.

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile de prédire la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, les flavonoïdes non glycosylés sont en général solubles dans des solvants apolaires ou de faibles polarités tels que l'éther éthylique, les solvants halogénés, l'hexane. En revanche, les hétérosides sont plutôt solubles dans des solvants polaires (acétone, alcools) et dans l'eau.

La solubilité dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du pH [20]. La solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20 °C sont respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10 mg/L [21, 22]. Benavente-Garcia *et al.* [23] ont évalué la solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. Ils ont rapporté que 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.

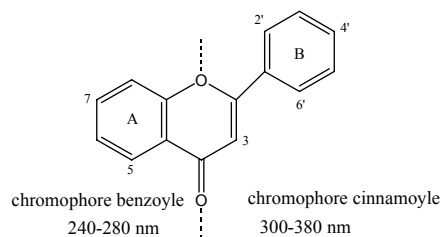
Cette faible solubilité dans des phases aqueuses et lipophiles, c'est-à-dire dans un milieu biologique, pose des problèmes d'une part, de biodisponibilité du produit *in vivo* et donc de son efficacité et d'autre part, de formamilité du produit et donc de son administration. La métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation) de ces composés par les cellules de l'intestin permettent leur absorption par l'organisme [24].

Différentes techniques ont été utilisées pour pallier ces problèmes :

- 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 (2-phosphono-myo-inositol) succinate de quercétine [22], l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine [25] ont une solubilité dans l'eau respectivement 15 000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine.
- 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 [26].
- La complexation de la naringénine et de l'hésperitine avec de la β cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité des milieux hydrophiles à différents pH [27].
- La polymérisation de la rutine et de la catéchine a permis d'augmenter leur solubilité dans l'eau [28, 29].

2.1.2. Absorption dans le domaine UV-visible

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV [30, 31]. Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm (Figure I.7). 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 :



Domaine d'absorption dans le domaine UV-visible

Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes comme la nature du solvant, le pH, la nature des substituants (hydroxylation, méthylation, glycosylation, acylation) et leur position, et la présence d'interaction intra et/ou inter-moléculaire (π -stacking, liaison hydrogène). La présence et le nombre d'hydroxyle sur la génine provoquent un déplacement bathochrome des bandes d'absorption (Tableau I.1).

Tableau I.1. Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol [32, 33]

classe des flavonoïdes	absorption UV-visible λ_{\max}	
	Bande II (nm)	Bande I (nm)
Flavone	250-280	310-350
Chrysin	247s, 268	313
Apigénine	267, 296s	336
Flavonol	250-280	330-385
Quercétine	255, 269s	301s, 370
quercétine 3-O-glucoside	257, 269s	299s, 362
flavanone et dihydroflavanol	275-295	300-330
Hespéretine	288	300s
Taxifoline	290	327s
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
Flavanol	270-280	-

En absence d'hydroxyle en position 4, 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 et 4' provoquent un déplacement hypsochrome vers les

longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet [32].

La polymérisation des flavonoïdes aboutit à des bandes d'absorption plus larges dues à un phénomène de conjugaison entre monomère [28] et un déplacement hypsochrome de 20 nm de la bande I [34].

2.1.3. Stabilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes étant des molécules très réactives, sont plus ou moins sensibles à certains facteurs selon leur structure.

▪ Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes

La lumière [27, 35], le pH [36, 37], la température [38, 39], la nature du solvant [27, 40], la présence d'enzyme [41, 42], d'ion métallique [37, 43] et d'oxydant [40, 41] ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des flavonoïdes.

Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. 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, Fargeix [40] a observé la formation de produits différents en milieu protique et aprotique. De même, Tommasini *et al.* [27] 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

L'auto-oxydation de flavonoïdes a été décrite par Barhaes *et al.*, Fargeix *et al.*, Balogh-Hergovich et Speier, Mochizuki *et al.*, Ramos-Tejada *et al.* ainsi que par Duran *et al.* [37, 40, 44-46]. Ces auteurs se sont principalement intéressés aux cinétiques et aux mécanismes d'oxydation de divers flavonoïdes. Mochizuki *et al.* [37], quant à eux, ont montré en étudiant l'auto-oxydation de la catéchine en milieu aqueux que la réaction est affectée par le pH, la

présence d'ion métallique et de borate. 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.8).

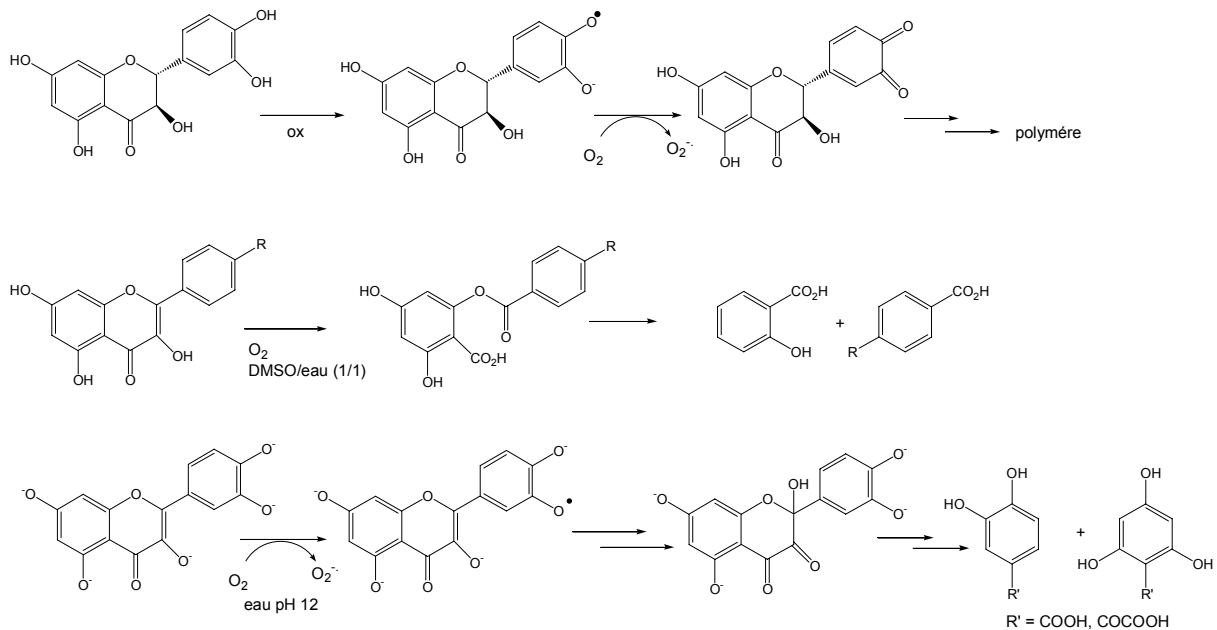


Figure I.4. Exemples d'auto-oxydation de flavonoïdes [37, 40, 44]

▪ Effet de la structure du flavonoïde sur la stabilité

La stabilité des flavonoïdes est affectée par leur structure et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). En effet, Friedman et Jurgensen [36] 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 [47]. 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, Makris et Rossiter [41] n'ont pas observé d'effet sur la stabilité en comparant les mécanismes de dégradation de la quercétine et de la morine. Par contre, les mécanismes de dégradation à la température de la génisteine et de la daidzeine sont différents [39].

Smith *et al.* [47] et Makris et Rossiter [41] 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 la polymérisation sur la stabilité de l'épicatéchine a été décrit par Zhu *et al.* [48]. Ils ont rapporté que les dimères d'épicatéchine sont plus sensibles au pH que le monomère. Cette instabilité est d'autant plus importante que le pH est élevé.

2.2. Activités biologiques

Pour les flavonoïdes, de nombreuses activités biologiques ont été décrites dans la littérature. Elles seraient la conséquence des propriétés antioxydantes, d'inhibition d'enzyme et de complexation des métaux.

2.2.1. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

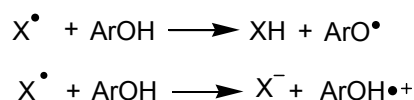
L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études, afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leurs faibles potentiels redox [49], les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène.

▪ 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) en réagissant soit avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules.

L'activité antiradicalaire a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes [50].

→ 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 [50, 51].

→ inhibition d'enzyme

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs d'enzyme, notamment des oxydoréductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, protéine kinase...).

▪ *Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes*

L'effet de la structure sur l'activité antioxydante a été évalué et les éléments structuraux impliqués dans cette activité ont été définis (Figure I.9.). Ces critères structuraux sont:

→ 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 [50].

→ 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 [52].

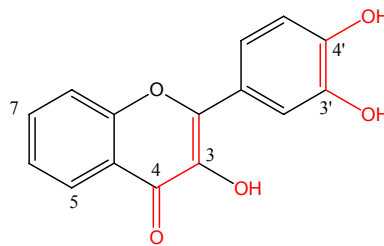
→ La présence de groupement hydroxyle en position 3

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 [53].

→ La présence de groupement hydroxyle sur le cycle A

La présence de groupements hydroxyles sur la partie catéchole peut compenser l'absence de fonctions hydroxyles sur le cycle B et permettre le maintien de l'activité antioxydante [54].



Principaux éléments structuraux nécessaires à l'activité antioxydante des flavonoïdes

De plus, la nature des substituants influe sur les activités ; ainsi, plus le degré d'hydroxylation est important, plus le pouvoir antioxydant est élevé [55]. La glycosylation des flavonoïdes fait diminuer l'activité antioxydante, mais l'effet est modulé par la position de la glycosylation, la nature du sucre et leur nombre [53, 56]. L'effet de la polymérisation de flavonoïde sur l'activité antiradicalaire est controversé; certains auteurs ont rapporté une augmentation de cette activité [57, 58], d'autres une diminution [59] du pouvoir antiradicalaire. Il apparaîtrait, en outre, que la masse des polymères ait une incidence sur le pouvoir antioxydant ; ainsi le dimère de catéchine présente un pouvoir antioxydant plus faible par rapport à celui de polymères de plus hautes masses [60]. Williamson [61] quant à lui, évoque une augmentation du pouvoir antioxydant des oligomères de catéchine-épicatéchine jusqu'au trimère, puis une chute de l'activité pour les degrés de polymérisation supérieurs.

En fonction du mécanisme de l'activité antiradicalaire étudiée, quelques différences dans les relations structure-activité ont été observées. Le Tableau I.2. résume l'effet des éléments structuraux des flavonoïdes sur les activités antiradicalaires, de complexation des métaux, d'inhibition de la peroxydation des lipides et d'inhibition de la xanthine oxydase.

Tableau I.2. Effet de la structure sur les activités antioxydantes des flavonoïdes [49, 50, 53, 55, 56, 62-64]

Activité	Facteurs accroissant le pouvoir antioxydant
Antiradicalaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nombre de groupements OH libres ▪ la présence C4'-OH ▪ les flavanones possédant une double liaison C2-C3 et un seul OH en position 4' ▪ fonction catéchol sur le cycle B. ▪ la méthylation a des effets variables et son effet est difficile à quantifier.
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 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
Inhibition de la xanthine oxydase	<ul style="list-style-type: none"> ▪ une structure plane (double liaison en C2-C3) ▪ la présence d'un groupement carbonyle en C₄ ▪ la présence de groupement hydroxyle en C₅, C₇ ▪ un angle de torsion entre le cycle B et C entre 26 et 27°

2.2.2. Propriétés complexantes

2 types de complexation sont envisageables : réversible ou irréversible.

▪ *Complexation réversible*

Les flavonoïdes sont capables d'interagir et/ou de complexer un grand nombre de molécules et biomolécules telles que les phénols (phénomène de copigmentation), les protéines (comme l'albumine de sérum, [65]), les polysaccharides (en particulier les cyclodextrines [27, 66] ou l'ADN [67]). Cette complexation peut avoir lieu d'une part, par les groupements phénoliques *via* des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques et d'autre part, par les noyaux aromatiques *via* des interactions de van der Waals et des effets hydrophobes [68, 69].

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 [70] et du pH [71, 72]. 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 1.10.).

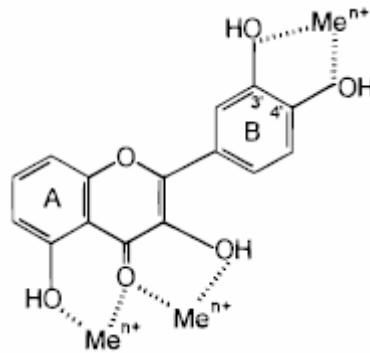


Figure I.5. Chélation des métaux par les flavonoïdes [73]

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

- *Complexation irréversible*

Des phénomènes de complexation irréversibles avec les protéines ont été aussi décrits. L'oxydation des flavonoïdes conduit généralement à la formation de quinone ou de radicaux phénoxy qui réagissent rapidement avec des fonctions amines et thiols présentes dans les acides aminés des protéines pour former un complexe polyphénol/protéine lié de façon covalente [74].

2.2.3. Inhibition d'enzymes

De nombreuses enzymes sont inhibées par les flavonoïdes telles que les hydrolases, les oxydoréductases, ADN synthétases, ARN polymérase, phosphatases, protéine kinases, oxygénases, amino acide oxydases [75]. 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.

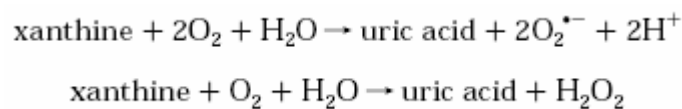
→ Inhibition des lipooxygénases

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, Sadik *et al.* [76] ont étudié l'oxydation de l'acide linoléique par une lipooxygénase en présence de quercétine. Leurs résultats suggèrent que le mécanisme d'inhibition des lipooxygénases 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).

Comme pour l'activité antioxydante, certains éléments structuraux (déjà cités Tableau I.2.) accentuent l'activité inhibitrice [76-78]. Les substituants ont par contre des effets variables. Ainsi, la glycosylation diminue sévèrement l'effet inhibiteur alors que la présence de groupes alkyles en position C₆ ou C₈ semble favoriser ce phénomène.

→ Inhibition de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase (E.C. 1.1.3.22) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et xanthine en acide urique, qui joue un rôle important dans la maladie de la goutte et est responsable des dommages oxydatifs des tissus. Durant la réoxydation de la xanthine oxydase, il y a formation d'un radical superoxyde et d'un hydrogène peroxyde :



Cette enzyme est donc considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Il apparaît que la structure planaire des flavonoïdes, due à la double liaison C2-C3, leur confère leur activité inhibitrice [79]. De plus, la présence d'un groupement carbonyle en C4 ainsi que de groupement hydroxyle en C5, C7 permet l'interaction électrostatique au sein du site actif améliorant l'activité inhibitrice. La haute affinité de certains flavonoïdes est probablement due au grand nombre d'interactions stables se formant dans le site actif : les groupements O₉, OH en positions 5 et 7 stabilisent l'ensemble dans le site actif. En revanche, la glycosylation ou la méthylation d'un groupement hydroxyle diminue l'activité inhibitrice [79-81].

Le mode d'inhibition est variable selon le type de flavonoïdes, une inhibition incompétitive en présence de baicaleine et compétitive en présence de quercétine, apigénine, myricétine, isovitexine, genistéine, allpurinol [63, 82, 83], alors que la morine et la galagénine montrent une inhibition de type mixte (ce qui explique la faible concordance entre la

prédiction et l'IC50 expérimental) [82]. Iio *et al.* et Nagao *et al.* [84, 85] suggèrent dans l'ensemble un mécanisme mixte, une inhibition compétitive au niveau du site actif, mais ils suggèrent que les flavonoïdes se fixent également en dehors du site actif.

La polymérisation de flavonoïdes semble accroître leur capacité d'inhibition de l'activité xanthine oxydase [86].

2.2.4. Activité de photoprotection

L'exposition chronique de la peau aux radiations solaires est la principale cause de mélanomes cutanés. Les radiations UV solaires affectant la peau sont limitées aux UVA (320-400 nm) et aux UVB (280-300 nm). Alors que les UVB n'atteignent que l'épiderme et les couches superficielles du derme, les UVA pénètrent plus profondément. La réponse biologique à ce stress peut être immédiate et passagère (inflammation, brûlure), retardée et chronique (vieillesse de la peau, cancer). Ce stress oxydant induit entre autre une augmentation des radicaux libres, qui dégradent les composants cellulaires : lipides, protéines, bases nucléiques. L'utilisation des antioxydants, comme les flavonoïdes, peut prévenir ou diminuer les dommages de la peau induits par les stress oxydants en particulier ceux des radiations UV [87], en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées. En effet, plusieurs brevets ont revendiqué l'utilisation des flavonoïdes dans des préparations anti-UV [25, 88-90].

Ainsi, Bonina *et al.* [88] 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.

Saliou *et al.* [89] ont rapporté l'inhibition de l'activation de la réponse inflammatoire ou immunitaire de cellules de kératinocyte exposées aux radiations UV par le silymarin.

2.2.5. Toxicité

Les flavonoïdes sont largement décrits dans les traitements cancéreux. Néanmoins, leur activité pro-oxydante et leur habilité à induire un dysfonctionnement mitochondrial peuvent engendrer une toxicité.

La notion de toxicité est controversée. Ainsi, il apparaît que la quercétine à haute dose induit la formation de tumeur chez le rat après un traitement de 2 ans [91], mais une autre étude à long terme n'observe aucun effet [92]. Au contraire, plusieurs études mettent en avant l'activité antimutagène de la quercétine *in vivo* [93-97]. A faible concentration (nM- μ M), les flavanols de type épicatechine agissent comme antioxydants et interviennent dans la voie des protéines kinases, mais à hautes doses, les flavonoïdes maintiennent l'activation de cette voie de synthèse induisant une apoptose [98]. La principale cause de cet effet est la capacité des flavonoïdes à se fixer aux sites ATP des enzymes diminuant la spécificité enzymatique.

Les polymères de quercétine montrent une activité pro-oxydante au-delà de 180 μ g/ml [59]. En revanche, les polymères de rutine ne montrent pas d'activités pro-oxydantes (en dessous de 300 μ M) alors que la rutine présente une activité pro-oxydante à 100 μ M [28]. Le même constat a été réalisé sur les oligomères de catéchine et la catéchine [99]. Kurisawa *et al.* [28] observent qu'à 400 μ M la rutine induit une cytotoxicité fatale aux cellules alors qu'à la même concentration, l'oligomère agit comme un protecteur contre le stress oxydatif.

3. Propriétés et activités des coumarines

Les coumarines sont le plus souvent englobées dans l'étude des flavonoïdes. Néanmoins, elles peuvent présenter certaines spécificités succinctement abordées dans cette partie.

3.1. Propriétés physico-chimiques

Les coumarines présentent une couleur bleu-vert dans le spectre visible. Peu de publications font état des absorbances UV des coumarines (Tableau I.3.).

Tableau I.3. Absorption UV des coumarines dans l'éthanol [100]

Substitution	absorption UV-visible λ_{\max}
5-Me	315
6-Cl	321
7,8-diOH	335
6,7-DiOH	354
6-NH ₂	370

3.2. Activités biologiques

Les modes d'action des coumarines sont similaires à ceux rapportés pour les flavonoïdes, toutefois l'impact structural sur leurs activités peut varier (Tableau I.4.).

Kaneko *et al.* [101] et Zhang et Wang [102] ont étudié en particulier l'influence de la structure des coumarines sur leur activité antiradicalaire. Ils ont mis en évidence que la structure caractéristique des coumarines, c'est-à-dire la 1,2-pyrone, affecte peu l'activité antioxydante de ces molécules. Par contre, la présence d'une fonction catéchole a un rôle important pour les propriétés antiradicalaires.

Tableau I.4. Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines [101, 103-105]

Activité	Facteurs accroissant l'activité
Antiradicalaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nombre de groupements OH libres ▪ la présence d'une partie catéchol
inhibition de la xanthine oxydase	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absence de groupement en C5 ▪ Présence de la double liaison C4-C3 ▪ groupement OH libres en C7, C6 ▪ la petite taille des groupements substituants la position C4
Cytotoxique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ présence d'une partie catéchol ▪ 2 groupements phénoliques en positions 6,7 ou en 6,8

Les coumarines ont un potentiel cytotoxique pouvant s'avérer intéressant dans le cas de traitement anticancer [106]. En effet, il est apparu que la cytotoxicité des coumarines est dépendante de la cellule ciblée. De part leur propriété chélatante, antioxydante et anticoagulante, les coumarines apparaissent comme des molécules potentiellement cytotoxiques à intérêts thérapeutiques [106].

4. Polymérisation enzymatique des flavonoïdes et des coumarines

4.1. Les oxydoréductases

Une différence est observée dans la structure des polymères phénoliques selon qu'ils sont issus de la voie chimique ou enzymatique ; la voie enzymatique permet la synthèse de polymères conjugués en continu, alors que la synthèse par catalyseur acide/base ou inorganique entraîne des pontages (méthylène ; CH₃ ou éther ; O) entre les résidus [107]. En outre, la catalyse enzymatique se réalise en conditions douces de pH et de température, tout en permettant une certaine regio-, chemo- et enantio-sélectivité [108-110]. Les enzymes impliquées peuvent être classifiées en six groupes [110]: transférases, hydrolases notamment les lipases qui sont largement étudiées [111], lyases, isomérases, ligases et les oxydoréductases. Parmi ces dernières, on compte notamment les peroxydases (HRP : *horseradish* peroxydase, SBP : *soybean* peroxydase), les tyrosinases, les laccases et les bilirubine oxydases [109, 112]. Les peroxydases utilisant comme accepteur d'électron l'H₂O₂, notre intérêt se portera sur les laccases utilisant l'O₂ (benzenediol oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2). Cette enzyme fait partie des polyphénols oxydases tout comme les tyrosinases et les catécholases (ces dernières se différencient par des valences de cuivre différentes respectivement Cu⁺ et Cu²⁺).

Les laccases peuvent être d'origine fongique ou végétale [113]. La laccase est une oxydase bleue à site cuivrique multiple [114, 115]. C'est une phénol oxydase d'environ 70 KDa [116], de structure dimérique ou tétramérique comptant quatre atomes de cuivre par monomère (Figure I.11.).

Les quatre atomes de cuivre sont classés selon leur caractéristique spectroscopique, type 1 (610 nm, ou bleu, paramagnétique), type 2 (non bleu, paramagnétique) et type 3 (330nm (ox.) dimagnétique). Le phénomène d'oxydation se développe à partir du cuivre 1 [114], c'est également l'étape limitante du processus. Le Km est généralement de 1-10 mM, ce qui suggère une faible spécificité, l'oxydation se ferait donc par l'intermédiaire d'une sphère externe. Ces observations sont à corréliser avec la théorie de Marcus pour laquelle, le stade déterminant serait la réduction du substrat via le site T1 par une réaction de sphère externe dans laquelle, le taux de transfert des électrons augmente avec la différence de potentiel entre le potentiel redox du substrat donneur et celui du site T1 accepteur [117-119]. On différencie les laccases à faible (500 mV par rapport à une électrode à hydrogène normale) et à hauts

(700-800 mV) E^0 . Les laccases catalysent l'oxydation de complexes métalliques organiques ou non, aniline, thiols, et spécialement les phénols (mono- ou di-phénols), pourvu que leur potentiel redox soit suffisamment bas [113, 118]. Elles présentent en revanche une préférence marquée pour l' O_2 comme substrat oxydé [113, 114, 120]. La poche de fixation du substrat réduit est peu profonde entraînant une simple limitation stérique de la taille du phénol reconnu [118]. Ce spectre d'activité peut encore être élargi par l'utilisation d'un médiateur.

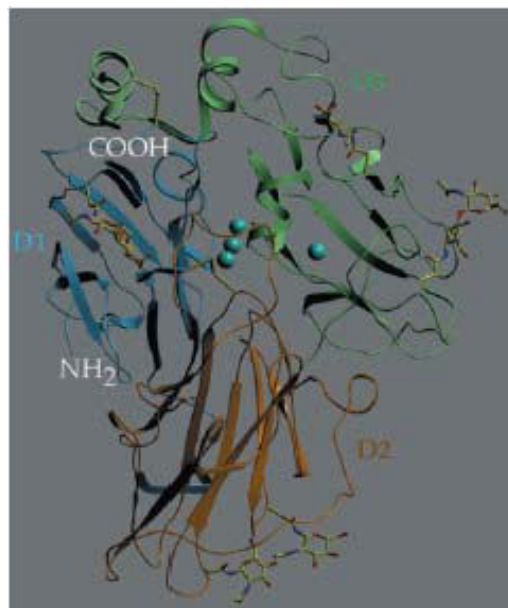


Figure I.6. Structure d'un monomère de la laccase de *Trametes versicolor* [116]. Les 4 cuivres sont représentés par des sphères bleues : un cuivre de type 1 à 12.5 Å du cluster T2/T3 composé de 1 cuivre de type 2 et de 2 cuivres de type 3.

- Inhibiteurs

Les tolérances et inhibitions varient d'une laccase à une autre [113]. De petites molécules exogènes (telles que O_2 , H_2O , OH^- ou F^-) sont capables de se fixer à T2 et ainsi d'inhiber l'activité enzymatique en régulant le transfert interne d'électrons de T1 au cluster T2/T3 [121, 122]. L'ordre d'inhibition par les ions halogènes $F^- > Cl^- > Br^-$ est attribué à la limitation de l'accessibilité des atomes de cuivre T2/T3 [118]. L'inhibition dépend de la taille du canal aboutissant à T2/T3, il y a donc une variation d'une laccase à l'autre. L'effet inhibiteur a lieu si le diamètre du canal un « seuil de coupure » inférieur au diamètre des inhibiteurs potentiels. Notons que l'ion halogène I^- ne rentre pas dans la catégorie des inhibiteurs, puisqu'il réagit avec le site T1 servant de substrat à la laccase [123].

D'autres inhibiteurs répertoriés par Gianfreda *et al.* [113] peuvent être envisagés, tels que les ions métalliques (tels que Hg^{2+}), acides gras, ... Ces inhibiteurs provoquent des modifications des acides-aminés, des chélation du cuivre ou des changements conformationnels. L'ensemble des effets des conditions réactionnelles sur l'activité laccasique sera décrit dans la partie « procédés de polymérisation ».

▪ Applications

Les laccases sont largement étudiées dans le cadre de la dépollution des eaux usées [124-129], de la délignification [130] ainsi que dans le blanchiment [131-134], mais aussi dans d'autres domaines :

- Elle est utilisée en tant que détecteur biologique. La laccase peut être adsorbée sur un support solide et ainsi créer une électrode ampérométrique détectant les composés phénoliques ou d'autres composés en présence de médiateurs spécifiques [135-138]. Cette détection repose sur la variation de potentiel entre l'espèce phénolique oxydée et l'espèce réduite (Figure I.12.)

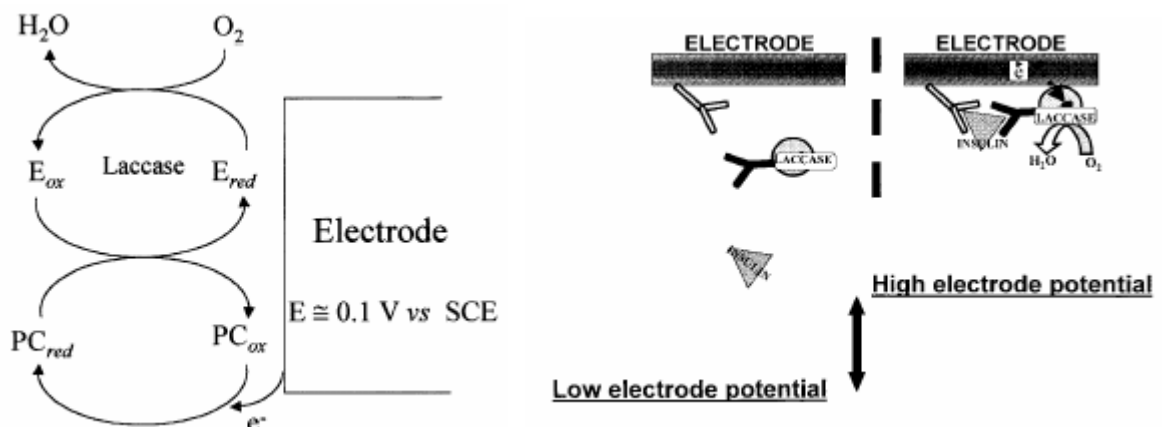


Figure I.7. Mécanisme réactionnel de la laccase utilisée comme détecteur biologique [135, 139]

- Suivant le même principe de détection, la laccase est utilisée comme immuno-détecteur (Figure I.12.) [139].
- La laccase est utilisée dans le cadre de la clarification du vin [140].
- La laccase est également utilisée dans le cadre de synthèse, notamment de colorants [141, 142].

4.2. Mécanismes de polymérisation

4.2.1. Mécanisme radicalaire

L'oxydation enzymatique génère des radicaux qui diffuseront du site actif de l'enzyme à la solution, où ils pourront interagir avec d'autres monomères, formant des polymères [143]. Les réactions radicalaires se décomposent en 3 étapes :

$M \rightarrow M^{\bullet}$: L'initiation ou l'amorçage consiste en la formation des radicaux à partir d'une espèce qui n'en possède pas, mais qui peut en générer facilement. Dans ces travaux, l'initiation est catalysée par la laccase. C'est la première étape de la chaîne cinétique.

$M^{\bullet} + M \rightarrow MM^{\bullet}$: La propagation est une étape rapide. La molécule formée par l'initiation est porteuse d'un centre actif et est donc capable d'attaquer une nouvelle molécule de monomère, et ainsi de suite. La chaîne cinétique se poursuit par un grand nombre de réactions de cette nature.

$M^{\bullet} + M^{\bullet} \rightarrow MM$; $MM^{\bullet} + MM^{\bullet} \rightarrow MMMM$:

La réaction de terminaison consiste en la destruction du centre actif qui est localisé à l'extrémité de la chaîne en croissance. Dans leur grande majorité les réactions de terminaison se font par combinaison ou par couplage, c'est-à-dire que deux radicaux se couplent pour former une seule molécule. Dans certains cas, un mécanisme par dismutation peut avoir lieu ainsi : $CH_2C^{\bullet}HX + XC^{\bullet}HCH_2 \rightarrow CH=CHX + XCH_2CH_2$.

En marge de ces 3 étapes, des réactions de transfert peuvent avoir lieu. Une réaction de transfert implique que le centre actif de l'extrémité de la chaîne soit transféré sur un autre composé, qui est dit alors agent de transfert : $\sim CH_2C^{\bullet}HX + CH_2=CHX \rightarrow \sim CH_2CH_2X + CH_2=C^{\bullet}X$. Le plus souvent, cette réaction provoque l'activation de l'agent de transfert, qui peut alors amorcer la croissance d'une autre chaîne. La réaction de transfert arrête la croissance de la chaîne initiale, ce qui affecte la masse molaire moyenne du polymère. Plus il y aura de transferts, plus la masse molaire sera limitée.

En outre, un phénomène de transfert par le solvant peut avoir lieu. Il a été établi que plus ce type de transfert est favorisé, plus le mécanisme de terminaison sera prépondérant [144]. Ainsi, le contrôle d'une réaction radicalaire nécessite une durée d'amorçage des chaînes radicalaire courte par rapport à celle de la propagation et des réactions de terminaison fortement minimisées [145].

Dans le cas d'une polymérisation radicalaire, la principale difficulté pour maintenir la propagation est de contrôler la très grande réactivité des radicaux vis-à-vis du transfert et, surtout, vis-à-vis de la terminaison. En effet, les constantes de vitesses des réactions de terminaison sont élevées ; dans le cas des polymères synthétiques elles sont de l'ordre de 10^6 à 10^8 s^{-1} .

4.2.2. Type de pontage mis en jeu

Différents types de pontage ont été décrits dans la littérature dans le cadre de polymérisation enzymatique d'espèces phénoliques, de type C-O, C-C mais aussi C-N [146].

Ainsi, l'oligomérisation de la catéchine par la HRP aboutit à un dimère formé par un pontage C5'-C8 ou C2-C8 (Figure I.13.) [147].

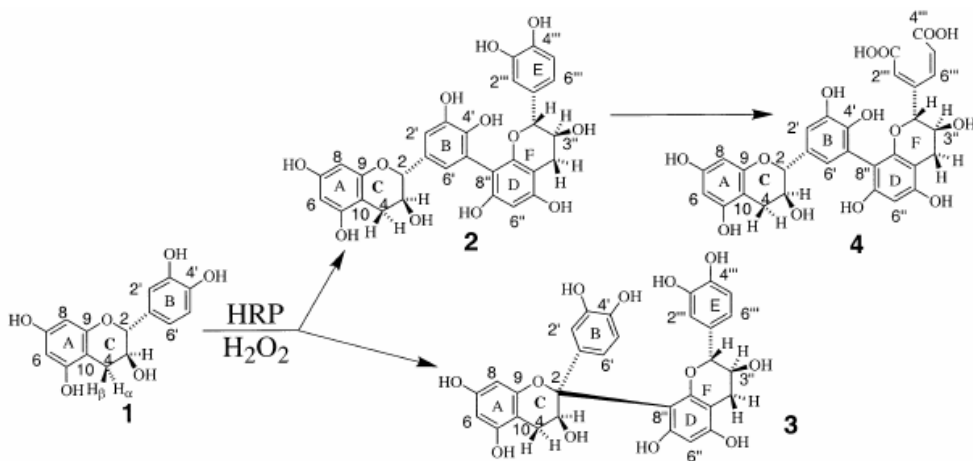


Figure I.8. Pontage observé dans le cas de l'oligomérisation de la catéchine par HRP [147]

A l'état naturel, dans le cas de l'oligomérisation de la catéchine, un simple et un double pontage ont été décrit [148-150] (Figure I.14.).

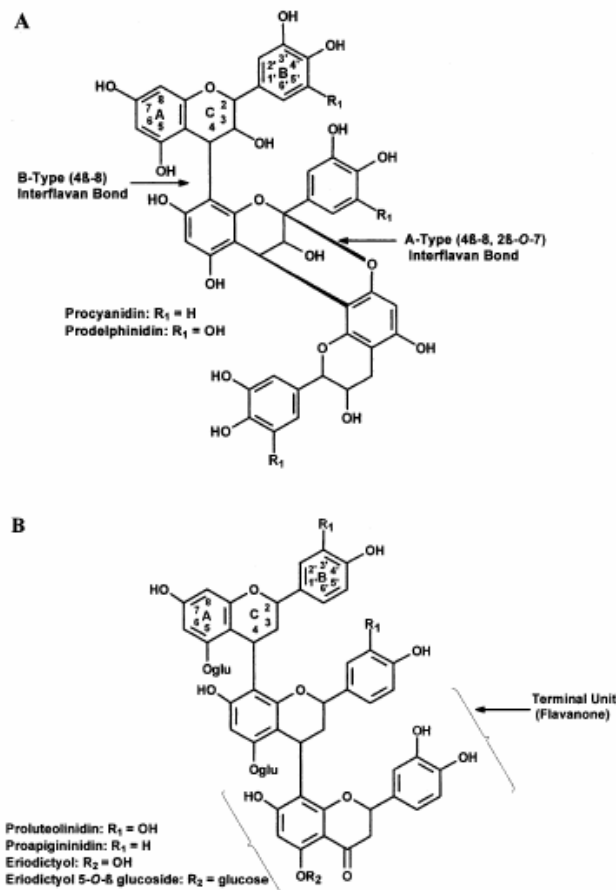


Figure I.9. Simple et double pontage de polyflavane [150]

Certains auteurs démontrent la structure des oligomères formés par catalyse enzymatique, mais la majorité d'entre eux ne font que formuler des hypothèses (Tableau I.5.). Ainsi Pinelo *et al.* [151] proposent un pontage de la quercétine de type C5'-C8 dans le cas d'une polymérisation sans catalyse enzymatique (Figure I.15.), Mejias *et al.* [34] observent une bande infra-rouge vers 1158 cm^{-1} correspondant à un pontage éther, puis s'appuient sur les délocalisations électroniques pour supposer un pontage de type C-O au niveau du cycle B lors de l'oligomérisation de la rutine par HRP et SBP.

Tableau I.5. Modes de pontage répertoriés dans la littérature

Enzyme	Substrat	pH	Pontage (technique analytique)	Référence
Laccase <i>R.vernificera</i>	Hydroquinone	7.4	C-C (RMN)	[147]
Laccase <i>Picnoporus coccineous</i>	2,6- dimethylphenols	5.0	C-O (IR)	[152]
Aucune	Quercétine	6.7-6.5	C-C supposé	[151]
HRP, SBP	Quercétine	7.0	C-O (FTIR)	[34]
Laccase <i>Myceliophthora</i>	Rutine	5.0	Aucune bande en IR	[28]
Laccase <i>Myceliophthora</i>	Catéchine	5.0	C-C (FTIR)	[99]
Laccase <i>Trametes villosa</i>	Bisphenol A	6.0	C-C (RMN)	[153]
Laccase <i>T. versicolor</i>	α -naphтол	5.0	C-O (FTIR)	[143]
Laccase <i>picnoporus coccineous</i>	Acide syringique	5.0	C-O (RMN)	[154]
Laccase <i>picnoporus coccineous</i>	Phénols	5.0	C-O suggéré (FTIR)	[155]
Laccase <i>Trametes pubescens</i>	Totarol	5.0	C-O et C-C observés sur le dimères (RMN)	[156]
Laccase <i>Pycnoporus coccineus</i>	Phénols	5.0	C-O et C-C (FTIR, méthode de titrage des liaisons éther)	[155]

HRP : *Horseradish* peroxydase, SBP : *Soybean* peroxydase

Le type de pontage peut être modifié selon les conditions de synthèse, ainsi un pH acide favorisera un pontage C-C, alors que le C-O sera favorisé à pH basique [157]. La nature du solvant organique influe sur la localisation du pontage [158], ainsi que sur le type de pontage [155, 156]. Cet aspect de contrôle du mode de pontage sera abordé plus largement dans la partie « procédés de polymérisation ».

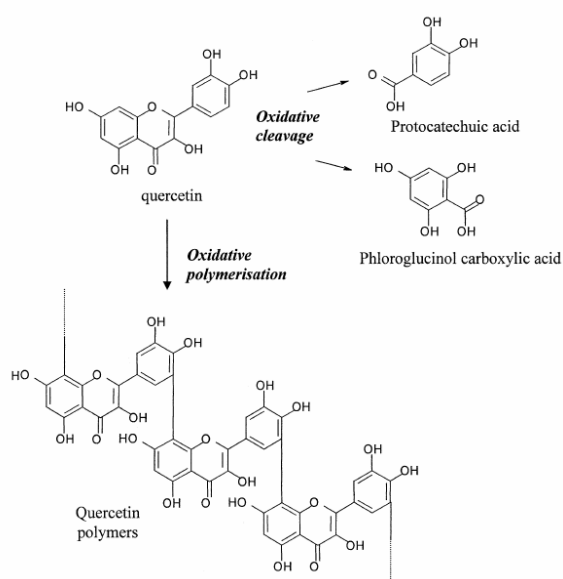


Figure I.10. Clivage oxydatif et polymérisation de la quercétine [151]

La synthèse d'oligocoumarines a été très peu étudiée ; néanmoins, des dimères obtenus par photodimérisation ont été répertoriés [159, 160] (Figure I.16.).

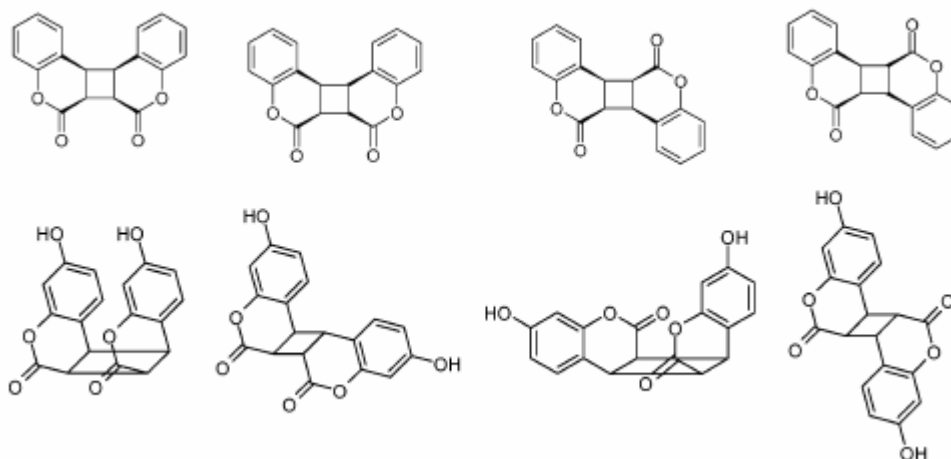


Figure I.11. Pontage par photodimérisation de coumarine [159, 160]

4.3. Procédés de polymérisation

Cette partie a fait l'objet d'un projet de revue intitulée: "Process of enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases".

**PROCEDES DE POLYMERISATION ENZYMATIQUE DE COMPOSES PHENOLIQUES PAR DES
OXYDOREDUCTASES**

Julie Anthoni, Jean-Marc Engasser, Catherine Humeau, Mohamed Ghouli *
Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre les Nancy, France

author for correspondence E-mail : mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr,
fax : 0033383595778

Résumé

La polymérisation enzymatique de composés phénoliques suscite de plus en plus d'intérêt dans les domaines alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. L'utilisation de ces composés pour leurs propriétés antioxydantes est limitée par leurs faibles solubilités et stabilité thermique. Leur polymérisation permet d'améliorer leur solubilité et/ou leur stabilité thermique, tout en augmentant ou en créant de nouvelles propriétés. Ces propriétés sont dépendantes de la masse moléculaire et de la structure des polymères. Le rendement de la réaction, la polydispersité, la masse moléculaire, la structure et donc les propriétés des polymères synthétisés peuvent être contrôlés par le mode de conduite de la réaction et par les conditions réactionnelles. Dans cette revue, nous analysons les procédés utilisés et les facteurs clefs (température, solvant, origine de l'enzyme, structure du substrat, architecture du réacteur, ...) qui contrôlent la polymérisation enzymatique d'espèces phénoliques par les oxydoréductases, pour obtenir des polymères avec des caractéristiques et des propriétés voulues.

Mots clefs : procédés, polymérisation, enzyme, oxydoréductases, phénols.

INTRODUCTION.....	33
1. MÉCANISME DE LA POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE PAR DES OXYDORÉDUCTASES	33
2. DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE POLYMÉRISATION.....	34
2.1. SYSTÈME MONOPHASIQUE.....	36
2.2. SYSTÈME BIPHASIQUE.....	36
2.3. EFFETS DES CONDITIONS OPERATOIRES	39
2.3.1. <i>Effet de l'enzyme.....</i>	<i>47</i>
2.3.1.1. Forme libre.....	48
2.3.1.2. Forme immobilisée.....	48
2.3.2. <i>Effet du substrat.....</i>	<i>50</i>
2.3.3. <i>Effet du pH.....</i>	<i>51</i>
2.3.4. <i>Effet des espèces ioniques.....</i>	<i>52</i>
2.3.5. <i>Effet de la température</i>	<i>53</i>
2.3.6. <i>Effet du solvant.....</i>	<i>53</i>
2.4. EFFET DU MODE DE CONDUITE DE LA REACTION.	54
2.4.1. <i>Ajout du peroxyde d'hydrogène</i>	<i>55</i>
2.4.2. <i>Les différents modes de conduite de la réaction.....</i>	<i>55</i>
CONCLUSION	56

Introduction

Ces dernières années les composés polyphénoliques ont suscité un vif intérêt pour des applications alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Cet intérêt est dû principalement à leur activité antioxydante. Cependant, leur faible solubilité et stabilité thermique limitent leur utilisation. Pour contourner ces difficultés, la polymérisation de ces composés a été présentée comme une alternative prometteuse. La polymérisation permet l'obtention de nouveaux dérivés avec des propriétés physiques et biologiques améliorées. En effet, les polymères obtenus ont une solubilité [1-4], stabilité thermique [4-7] et activité antioxydante améliorées [1, 8, 9] par comparaison au monomère. La polymérisation peut être obtenue par voies chimiques [10, 11] ou enzymatiques. La voie enzymatique est plus attrayante, parce qu'elle se déroule dans des conditions plus douces de pH et de température et permet l'obtention de polymères avec des structures plus contrôlées grâce à la régio-, chemo-, et à l'énantio-sélectivité des enzymes. Différentes classes d'enzyme peuvent être utilisées pour catalyser une polymérisation enzymatique comme les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases ou les isomérases. De même, plusieurs procédés peuvent être mis en application pour effectuer ces réactions. Les conditions de fonctionnement de la réaction et le procédé utilisé affectent la polydispersité (PDI), la masse moléculaire et les activités biologiques des polymères synthétisés.

Dans cet article, nous allons analyser les procédés utilisés et les principaux facteurs contrôlant les réactions de polymérisation enzymatique des polyphénols par des oxydoréductases.

1. Mécanisme de la polymérisation enzymatique par des oxydoréductases

Les deux principaux groupes de phénoloxydases utilisés dans le procédé de polymérisation des composés phénoliques sont les laccases (E.C. 1.10.13.2) et les polyphénoloxydases (E.C. 1.14.18.1). La différence principale entre ces deux groupes réside dans la nature du co-substrat utilisé: de l'oxygène pour les laccases et du H₂O₂ pour les polyphénoloxydases.

Les laccases sont produites soit par des champignons (*Trametes versicolor*, *Myceliophotore*, *Pycnoporus*,...) soit par des plantes (*Rhus vernicifera*, *pinus taeda*,...) [12,

13]. Quatre cuivres de type T1, T2 et T3 font partie du site actif de ses oxydases, dans lequel, le substrat est oxydé pour produire des espèces radicalaires, qui initieront la réaction de polymérisation. L'oxydation est contrôlée par la différence de potentiel redox entre le substrat réducteur et le cuivre de type 1 [14]. Deux types de laccases existent, les laccases avec un potentiel redox faible (500 mV) et les laccases avec un potentiel redox élevé (700-800 mV). Les laccases ont une forte spécificité pour leur co-substrat (l'oxygène) mais une faible spécificité pour leur substrat. Le spectre large de substrats susceptibles d'être réduit par les laccases (ferrocyanidine, anilines, phénols...), peut de surcroît être élargie par l'utilisation d'un médiateur tel que l'ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [15, 16].

L'activité peroxydasique a été identifiée dans les plantes (peroxydase de cytochrome c, peroxydase d'ascorbate de plante,...), les micro-organismes, et les animaux (myeloperoxydase, lactoperoxydase,...)[17]. Les peroxydases sont largement distribuées dans la nature, les plus utilisées sont celles issues du raifort (HRP) et du soja (SBP). Ces peroxydases ont un site actif composé d'un hème-protéinique avec une porphyrine ferrique. Elles catalysent l'oxydation du substrat en présence de peroxyde d'hydrogène, libérant deux molécules d'eau et formant une espèce radicalaire qui initialise la réaction de polymérisation.

Les laccases et les peroxydases sont à l'origine de l'initiation des réactions de polymérisation de différentes espèces phénoliques. Même si le transfert des radicaux n'est pas encore décrit avec précision, il a été établi que les conditions opératoires de mise en oeuvre de ces réactions affectent le degré de polymérisation, la masse moléculaire, la polydispersité et le type de liaisons entre monomères [18].

2. Différents systèmes de polymérisation

Quatre systèmes de synthèse enzymatique des polymères phénoliques ont été décrits : système monophasique, système biphasique, système par micelle inverse et par balance de Langmuir (Tableau 1).

Tableau 1. Different systems of enzymatic polymerization of phenolic compounds

System	Solvent/phase	Enzyme	Substrat	Observations	References
Monophasic system	1,4dioxane, DMF or methanol with water	HRP	phenol	Higher yield: 1,4 dioxane 20-60 %, DMF 20 or 40 % at 30 °C, 4h	[19]
	Dioxane/acetate buffer	HRP	phenol	Activity of enzyme up to 95 % of solvent	[20]
	<i>Tert</i> -butanol, Ionic liquid: [(4-MBP)BF ₄], [(BMIM)PF ₆]	Laccase C, HRP, SBP	Syringaldazine, 2-methoxyphenol, anthracene	Higher yield of anthracene oxidation by laccase C in [(4-MBP)BF ₄] compared at <i>Tert</i> -butanol medium, in presence of mediator	[21]
	Ionic liquid: [bmim][Tf ₂ N], [bmim][PF ₆], [omim][PF ₆]	Microperoxidase-11	2-methoxyphenol	Higher activity in [bmim][Tf ₂ N]	[22]
	Succinate buffer/1,4 dioxane	Glucose oxidase/HRP	phenol	Higher yield: 1,4 dioxane/succinate buffer (15/10)	[23]
	Phosphate buffer/DMF (80/20 %)	Tri-enzymatic system: invertase/glucose oxidase/SBP	<i>p</i> -cresol, sucrose	The three enzymes are immobilized on glass microfluidic channels, the kinetic properties are nearly identical to SBP catalysis in solution	[24]
Biphasic system	Isooctane/buffer	HRP	<i>p</i> -ethylphenol	Good monomer conversion, fair polymer yield	[25]
	Sodium acetate buffer/solvent (v:v) Solvent: AcOEt, CHCl ₃ , methyl <i>tert</i> -butyl ether, <i>t</i> -amyl alcohol or toluene	Laccase <i>Trametes pubescens</i>	totalol	The reaction were observed to proceed very slowly	[26]
Reversed micelle	AOT/isooctane AOT/isooctane/CHCl ₃	HRP	<i>p</i> -ethylphenol	Higher yield: 100 % isooctane Higher M _w : isooctane/ CHCl ₃ (25/75 %)	[5]
	AOT/isooctane	laccase	<i>o</i> -chlorophenol	Laccase hosted in the AOT reversed micelle exhibited high catalytic activity in isooctane, whereas lyophilized laccase did not exhibit catalytic activity in organic solvents.	[27]
Langmuir Blodgett	HEPES buffer	HRP	Aniline, phenol	The polymers are ordered and have a good thermal stability and significant optical and electronic properties.	[28]

DMF: dimethylformamide, HRP: Horseradish peroxidase, SBP: Soybean peroxidase, AOT: dioctylsodiumsulfosuccinate, [bmim][Tf₂N]: 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [bmim][PF₆]: hexafluorophosphates of 1-octyl-3methylimidazolium, [omim][PF₆]: hexafluorophosphates of 1-octyl-3methylimidazolium, [(4-MBP)BF₄]: 4-methyl-N-butylpyridinium tetrafluoroborate, [(BMIM)PF₆]: 1-butyl-3-methylimidazolium, HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

2.1. Système Monophasique

Dans ce système, la réaction est affectée par plusieurs facteurs comme la nature et le pourcentage de solvant organique, le pH, la température, les concentrations d'enzyme et de substrat. Pour les composés phénoliques simples, les polymères obtenus précipitent facilement, ce qui facilite leur extraction [19, 20] tandis que pour des molécules phénoliques plus complexes comme les flavonoïdes, les polymères synthétisés peuvent être hydrosolubles. En plus des solvants organiques, les liquides ioniques ((BMIM) PF₆, (BMIM) Tf₂N, (OMIM) PF₆) sont également utilisés dans ce système [29-31]. Ils offrent les avantages d'être non-volatiles, non-inflammables, thermiquement stables, faciles à séparer et réutilisables [32]. Les composés phénoliques sont solubles dans ces solvants et les enzymes y préservent leur activité.

2.2. Système biphasique

Ce système est fait de deux phases non-miscibles comme le tampon HEPES et eau-isooctane ou eau-chloroforme. Ces deux phases sont dispersées par agitation pour former une microémulsion où l' H₂O₂ est ajouté graduellement pour initier la réaction de polymérisation par les peroxydases. Ce système évite la contamination bactérienne et l'utilisation d'émulsifiant [25]. Il évite également l'inhibition de l'enzyme par le substrat et sa dénaturation par les solvants organiques. Plusieurs travaux ont étudié ce système comme illustré dans le Tableau 2 [5, 25, 33, 34].

Ces travaux rapportent notamment que la masse moyenne en poids (Mw) et le rendement de conversion sont dépendants des phases utilisées, et que les vitesses de ces réactions sont souvent faibles du à la limitation du transfert de matière entre les phases [35].

Tableau 2. Effect of solvent composition on polymerization by *Horseradish* peroxidase in biphasic system.

Substrate	Synthesis medium	M _w	Monomer conversion (%)	Polymer yield (%)	References
<i>p</i> -ethylphenol	85/15 dioxane/water	3000	80 ^a	15 ^b	[5]
	AOT reversed micelle in 100% isooctane (w ₀ :15)	2500	100 ^a	100 ^b	
	AOT reversed micelle in 100% isooctane (w ₀ :9)	2500	90 ^a	100 ^b	
	AOT reversed micelle in 100% CHCl ₃ (w ₀ :7; phase separation)	1000	20 ^a	10 ^b	
<i>p</i> -ethylphenol	Isooctane/buffer biphasic system	1700			[25]
Catechol	80/20 dioxane/phosphate buffer			18	[33]
	AOT reversed micelle in 100% isooctane			36	
Ethylphenol	85/15 dioxane/water		95	~20	[34]
	AOT reversed micelle in isooctane (w ₀ :15)		~95	~95	

AOT: dioctylsodiumsulfosuccinate, W₀: molar ratio of water to surfactant, a: monomer converted/ monomer added initially, b: ratio of the amount of polymer recovered as an insoluble fraction in isooctane to the amount of monomer converted

▪ **Micelles inverses:**

Le système le plus utilisé en micelle inverse se compose d'isooctane/eau/sodium dioctylsulfosuccinate (Figure 1) [5, 25, 33, 36]. Cependant, d'autres agents tensio-actifs peuvent être utilisés comme le bromure cétylique et le bromure d'éthyle poly(éthylène imine) [37]. Les micelles inverses nanostructurées induisent une activité enzymatique élevée dans les solvants organiques, car dans ces systèmes les enzymes maintiennent leur structure tridimensionnelle grâce à l'eau renfermée dans les micelles. Ainsi, l'activité des peroxydases est plus de 20 fois plus élevée dans ce système que dans l'eau [38].

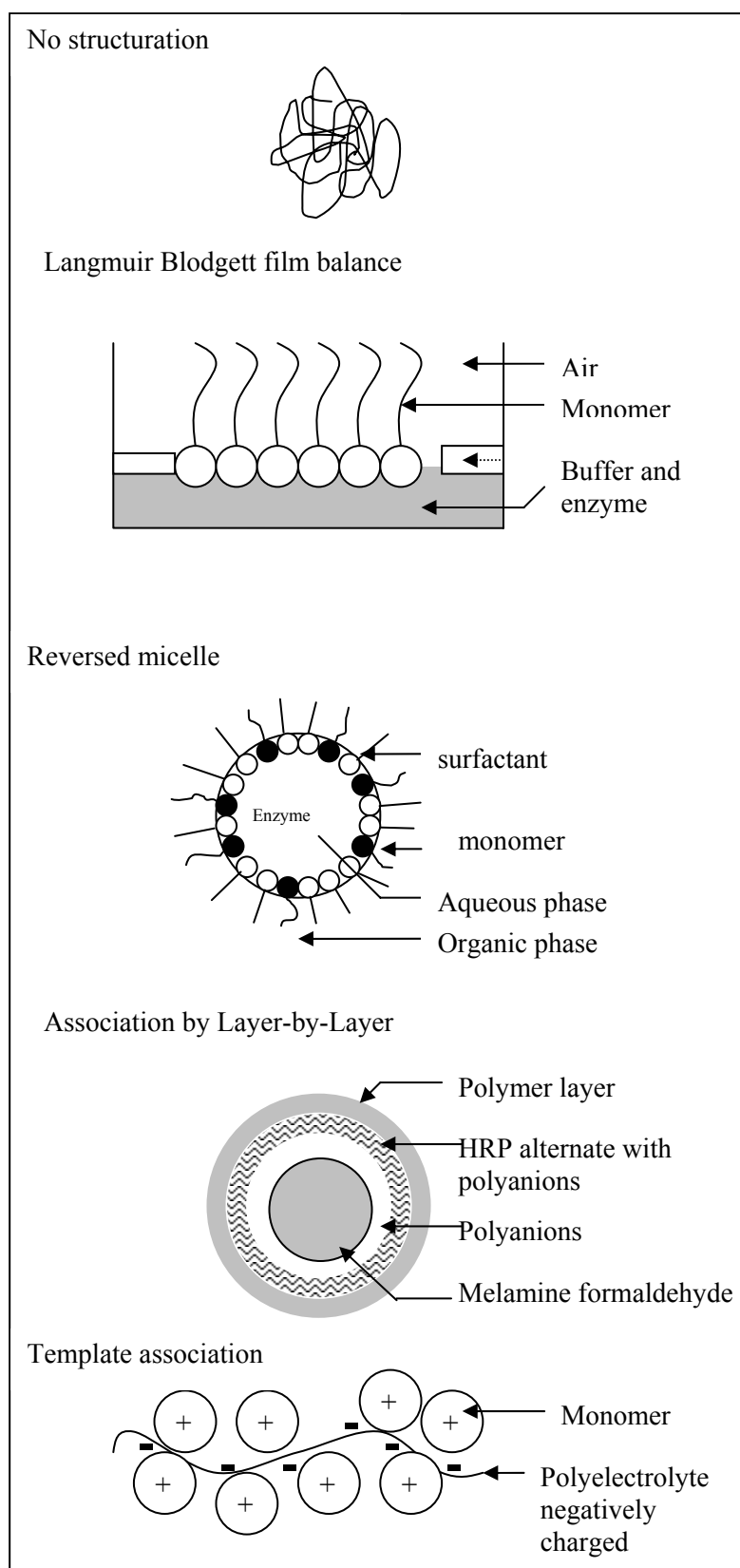


Figure 1. Type of association used for the enzymatic polymerization of phenolic compounds.

Les rendements de conversion sont identiques ou accrus par rapport à ceux obtenus dans un milieu dioxane/eau (Tableau 2). Ils sont affectés par le rapport molaire eau/agent tensio-actif [5] et par la présence de certains sels comme LiBr qui entraîne une dissociation complète de l'agrégation. Cependant, la présence de LiBr à faible concentration permet le contrôle de la Mw de polymères [5].

- **Balance de Langmuir**

Cette technique permet l'orientation des molécules amphiphiles à l'interface du système air-eau pour obtenir des structures en monocouches. Cette organisation permet de contrôler le type de liaison mis en jeu entre monomères et évite la formation des structures para.-para. Elle limite également le phénomène de liaisons croisées et de branchement des polymères [28, 39, 40]. Ce système permet d'accroître la stabilité thermique et les propriétés électroniques des polymères synthétisés [28].

2.3. Effets des conditions opératoires

Les conditions de synthèse doivent permettre de maintenir l'activité de l'enzyme et d'assurer la solubilité du substrat. Le milieu naturel de l'enzyme est l'eau alors que les substrats phénoliques sont plutôt solubles dans les solvants organiques. Il apparaît donc nécessaire de chercher un compromis entre ces deux critères. Dans cette partie, nous avons analysé et synthétisé les effets de l'origine de l'enzyme, de la nature du substrat et des conditions opératoires sur la réaction de polymérisation comme indiqué dans le Tableau 3.

Tableau 3. Modifications and impacts of reaction conditions of enzymatic polymerization of phenolic compounds.

Catalyst	Substrate	Factors					Note	references
		Solvents (%)	Buffer (pH)	Co-factor	Temperature	Time		
Laccase (TP) (3 U/ml)	Totarol (0.5 g/l)	Methanol, acetonitrile, acetone, AcOEt, CHCl ₃ , methyl <i>tert</i> -butyl ether, <i>t</i> -amyl alcohol, toluene (50)	Δsodium acetate buffer (4-7)	Under air	20-30-40-50	24 h	Optimal: pH 4.5-5, 30 °C, acetone	[26]
Laccase (TP) (0.6 U/ml)	8-hydroxyquinoline	Acetone (8)	Sodium acetate (5)	Under air	20-30-40-50-65	Up to 72 h	Optimal: 30 °C	[41]
ΔLaccase (TV) (0-275U/L)	Δpyrogallol (0-3g/l)		ΔTampon sodium acetate (3-7)	ΔO ₂ (0-20mg/l)	Δ 25-55	60 min	Optimal : pH 4,5, 45°C and 18 mg/l dissolved oxygen	[42]
ΔLaccase (TV)	Δα-naphtol (23-13636 g.m ⁻³)	Δacetone (0-80)	Δsodium-acetate buffer (3-5) sodium phosphate buffer (6-8)	ΔO ₂ (12-20 g.m ⁻³)	24-50°C	Up to stabilization	Optimal: 50 %acetone, pH 5, 3409gm ⁻³ monomer, 20.3gm ⁻³ in dissolved O ₂ , 0.173U/cm ⁻³ Average molecular weight 4920 Da	[43]
Laccase (TV) (25U/L)	Catechol (0.3 g/l)	Δacetone (10-20)	ΔTampon sodium-acetate (4,5- 5,5)	O ₂	Δ 35-45	60 min	Optimum conditions estimate by RSM at 43,5 °C, pH 4,87, 13,5 % acetone, 300 mg/ml catechol and 0,025 U/ml to obtain 0,128 mg DO/min L for initial oxidation rate	[44]
ΔLaccase (TV) (0-30 U/L)	Δcatechol (0.025-10 g/l)	Δacetone (0-70)	Δsodium-acetate buffer (3-5) sodium phosphate buffer (6-8)	ΔO ₂ (250; 10 mg/l)	Δ 25-60	250 min	Maximal initial rate : 10 %acetone, pH 5, 25 °C, 0,02 U/ml, 250 mg/L S, 10mg/l dissolved oxygen	[45]

ΔLaccase (MYL) (1.45 10 ⁻³ ; 5.5 10 ⁻³ ; 14.5 10 ⁻³ U/L)	Rutin (10 g/l) derivate of rutin	ΔMethanol (30;50;70;100)	Δ phosphate buffer(7) acetate buffer (5)	Under air	Room temperature	24 h	Higher yield (81 %) with pH 5, 30%MeOH, 5.5*10 ⁻³ U/L Higher M _n (11.10 ⁻³) with pH 5, 100%buffer, 5.5*10 ⁻³ U/L	[1]
ΔLaccase (MYL) (1.2 10 ³ ;2.0 10 ³ 2.8 10 ³ ;3.6 10 ³ U/L)	Catechin (g/l)	ΔAcetone (3-20) Ethanol (5) ΔMethanol (3-20) Isopropanol (5)	Acetate buffer (5)	Under air	Room temperature	24 h	Higher yield: 95% (80% acetate buffer pH5, 20% acetone) Higher M _n : Mn:7000-8000 (93% acetate buffer pH5, 7% acetone)	[9]
Laccase (PCL) (2.95mg)	Syringic acid (20 g/l)	Acetone 50 Acetonitrile 50 1,4-dioxane50 ethanol 50 methanol 50 methyl ethyl ketone 50 THF 50 Acetone 40 acetone /chloroform/buffer 33/17/50 acetone/chloroform/buffe r 25/37.5/37.5	Acetate buffer (5)	Under air	Room temperature	24 h	Higher yield: 86% (50% 1,4-dioxane, 50% acetate buffer pH5) Higher M _w : 18000 (25% acetone, 37,5% chloroform, 37,5% acetate buffer pH5)	[46]
Laccase (PCL) 50μl	Phenol <i>m</i> -cresol bisphenol A 4-TBP (30g/l)	Methanol 2-propanol 1-propanol ethylene glycol 1,4-dioxane	Acetate buffer (5) in an equivolume mixture solvent and buffer		Room temperature	24h	Higher conversion with 4-TBP in acetone/buffer (50:50): 100 % Higher Mn with bisphenol A in 2-propanol/buffer (Mn: 21300)	[47]

		acetone 50						
Laccase (PCL) 2.95 mg HRP 10mg, SBP	2,6-dimethylphenol (12.4 g/l)	ΔAcetone 20-90 1,4-dioxane 60 Ethanol 60 Methanol 60	Acetate buffer (3-12)	Laccase: under air Peroxidases:H ₂ O ₂ is added to the mixture every 15 min for 10 min Under air	Room temperature	24 h	Laccase: Higher yield: 61% (40% 1,4-dioxane, 60% acetate buffer pH5) Higher M _w : 8140 (40% acetonitrile, 60% acetate buffer pH5) HRP: Higher yield: 33% (40%acetone, 60% acetate buffer) Higher M _w : 6290 (40% ethanol, 60% acetate buffer)	[48]
PCL 2.95 mg, HRP, SBP 10mg	4-hydroxybenzoic acid derivatives (16.8g/l)	Acetone 40 Methanol 40 1,4-dioxane 40	Acetate buffer (3-12)	H ₂ O ₂ (30 %, 28μl, 0.25 mM)is added to the mixture every 15 min for 10 min Under air	Room temperature	24 h	Laccase: Higher yield: 86% (50% 1,4 dioxane, 50% acetate buffer pH5) Higher Mw: 7700 (40%acetone, 60% acetate buffer pH5) HRP: Higher yield: 79% (40% acetone, 60% acetate buffer pH5) Higher Mw: 15100 (40% acetone, 60% acetate buffer pH7)	[49]
HRP (10mg)	Phenol (18.8 g/l)	Δ1,4-dioxane (60;80) Acetonitrile (15/10) Acetone (15/10) 1,4-dioxane (15/10) Ethanol (15/10) Ethyl acetate (15/10)	Acetate buffer (5) Succinate buffer (5,5) Phosphate buffer (7) Succinate buffer (5,5)	H ₂ O ₂ formed in-situ by glucose oxidase (10mg): glucose 36.4 g/L Under air or oxygen	Room temperature	48h	The ratio of DMF-soluble part of polymers dependent on the polymerization condition, mainly the mixed ratio of 1,4-dioxane and a buffer. The higher Mn (14700) with pH 5, 80 % 1,4-dioxane, in air atmosphere. Higher yield (78 %) with pH 5.5, 60 % 1,4-dioxane in oxygen. Higher yield 78% (60% methanol, 40% succinate buffer pH 5,5) Higher Mn 7500 (20% 1,4 dioxane, 40% ethyl acetate, 40% succinate buffer pH 5.5)	[50]

		Methanol (15/10) <i>iso</i> -propanol (15/10) 1,4 dioxane/ethyl acetate (10/5/10 ; 7,5/7,5/10 ; 5/10/10)						
HRP (10mg)	<i>p</i> -cresol <i>p</i> -ethylphenol <i>p-n</i> -propylphenol <i>p-n</i> -butylphenol <i>p-n</i> -pentylphenol at (18.8g/l)	1,4 dioxane (60)	Succinate buffer (5.5)				Higher Mn (4400) with <i>p</i> -cresol Higher yield (72 %) with <i>p-n</i> -pentylphenol	
HRP (95 10 ³ U/l)	Phenols <i>p</i> -methoxyphenol <i>p</i> -cresol <i>p</i> -chlorophenol 2,6-dimethylphenol 4,4'-biphenol aniline 1-naphtol 2-naphtol <i>p</i> -tert-butylphenol <i>p</i> -phenylphenol at 5-100mM	ΔDioxane (0-100)	Acetate buffer (5)	H ₂ O ₂ , 20μl at 30 % (20mM)			Activity of enzyme up to 95 % solvent Average molecular weight up to 2.6. 10 ⁴ Da with <i>p</i> -phenylphenol in 85 % dioxane	[20]
HRP (16 10 ³ U/L)	Phenols (2.235g, 2.50mmol)	Δ1,4-dioxane ΔDMF ΔMethanol 0,20,40,60,80,100	distilled water	Solution at 30 % H ₂ O ₂ added 16 times at an interval of 10 min	10-60 °C	10 min, 4 h, 48 h	Higher yield: >98 % (1,4 dioxane 20-60 %, DMF 20 or 40 % at 30 °C, 4 h)	[19]
HRP	4,4'-biphenyldiol	Acetonitrile Acetone 1,4-dioxane ethyl acetate	Phosphate buffer (7)	H ₂ O ₂ (batch)	Room temperature	24 h	Higher yield 97 % (80% THF, 20% phosphate buffer pH7) Higher M _n 26000 (80% isopropyl alcohol, 20% phosphate buffer pH7)	[51]

		isopropyl alcohol THF						
HRP (0.1g/l)	<i>m</i> -cresol (0.1M;0.2M)	ΔEthanol (0-100)	HEPES buffer	Dropwise addition H ₂ O ₂ in excess of 30% compared to monomer	Room temperature	24 h	Higher yield (over 90%) and M _w (7000) with 20%ethanol	[52]
HRP, SBP 40-120 10 ³ U/l	Catechol (1.32 g/l)	1,4-dioxane (80)	Phosphate buffer (7), acetate buffer (5)	30 % H ₂ O ₂ (28μl, 0.25mM) addition every 15min for 16 times	25 °C	24 h	HRP<SBP Yield of polymer is pH-dependant Higher yield: 60.6 % (phosphate buffer)	[33]
HRP (17.6 U/l)	4-CHP, 4-TBP, 4-IPP, 4-EP, 4-MP (30g/l)	Ethylene glycol 1,4dioxane 1,3-dioxane 2-propanol 1-propanol ethylene glycol DMF Methanol Acetone t-butyl alcohol ethylene glycol 50	Phosphate buffer (7)	H ₂ O ₂ (3.2ml 5 %, 5.3 mmol) added dropwise over 2h under air	Room temperature	3h	Log P and monomer substituent dependant With 4-TBP: Higher yield 98% (50% 1,4-dioxane, 50% phosphate buffer pH7 Higher M _w) 2400 (50% 1-propanol or t-butyl alcohol, 50% phosphate buffer pH7)	[53] → After 1h the precipitate materials were collected
ΔHRP 10-50mg (10U/mg)	Phenols 10.6 mmol	ΔMethanol 25,50,75	4, 5, 8 (phosphate	ΔH ₂ O ₂ added dropwise for	Room temperature	30h	Enzyme origin, buffer pH, mixed ratio of alcohol and buffer, purity and amount of HRP, concentration and	[4]

			buffer for pH 7)	25h			addition rate of hydrogen peroxide strongly affected the molecular weight and solubility of the polymer. Higher yield (80%) in 2-propanol/buffer (pH5) (1:1), and higher Mw (8.10^{-3}) in 2-propanol/buffer (pH 7) (1:1)	
HRP (20mg/50ml)	Phenols with different substituents (32.8g/l): <i>p</i> -CH ₃ <i>p</i> - <i>n</i> -C ₃ H ₇ <i>p</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ <i>p</i> - <i>t</i> -C ₄ H ₉ <i>p</i> - <i>n</i> -C ₅ H ₁₁ <i>p</i> - <i>n</i> -C ₇ H ₁₅ <i>o</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ <i>m</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ H	1,4-dioxane (80)	Phosphate buffer (7)	0,5 mmol (0.56μl) of hydrogen peroxide was added 20 times after 15 min intervals	Room temperature	24h	Higher yield with <i>p</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ (95%) Higher Mn with no substituent phenol 35000	[6]
HRP	<i>m</i> -ethynylphenol 24 g/l	Methanol (50)	Phosphate buffer (7)	Hydrogen peroxide (5%, 1.7ml, 2.5mmol) added dropwise for 2h	Room temperature under air	3h	Mw: 1700	[7]
HRP SBP 20mg in 25ml	Cardanol 24g/l	Methanol Ethanol 2-propanol <i>t</i> -butanol 1,4-dioxane 50	Phosphate buffer (7)	H ₂ O ₂ added continuously by a perfusion pump for 6h	Room temperature	24h	With SBP: Higher yield 62% (50% 2-propanol, 50% phosphate buffer pH7) Higher M _w 12808 (50% methanol, 50% phosphate buffer pH7) HRP is inefficient for polymerization of cardanol.	[54]
HRP 8.8 U/ml SBP 8.32 U/ml	Bisphenol Dihydroxydiphenylmeth	Acetone	Phosphate buffer (7)	H ₂ O ₂ (5%, 3.5ml, 5mmol)	Room temperature	3h	With bisphenol HRP	[55]

	ane 5.0 mmol in 25ml	2-propanol methanol acetone 50		added dropwise to the reaction mixture for 2h			Higher yield 100% (50% 2-propanol, 50% phosphate buffer pH7) Higher M _w 5400 (50% 2-propanol, 50% phosphate buffer pH7) SBP Higher yield 99% (50% 2-propanol, 50% phosphate buffer pH7) Higher M _w 3040 (50% 2-propanol, 50% phosphate buffer pH7)	
--	-------------------------	---	--	--	--	--	--	--

Δ: variation of this parameter (15/10): ratio 15 solvent and 10 buffer

M_w: weight-average molecular mass, M_n: number-average molecular mass, DMF: dimethylformamide, THF: tetrahydrofuran

HRP: Horseradish peroxidase, SBP: Soybean peroxidase, TV: Laccase *Trametes Versicolor*, PCL: Laccase *Picnoporus coccineous*, CCP: Laccase *Coprinus cinerius*,

TP: laccase *Trametes pubescens*, MYL: Laccase *Myceliophthora*

2.3.1. Effet de l'enzyme

Le type (laccase, peroxydase) et l'origine (HRP, SBP, CCP,) de l'oxydoréductase utilisée lors de la polymérisation peuvent avoir un impact sur les performances de cette réaction, la structure et les propriétés des polymères obtenus (Tableau 4). Ainsi, Ikeda *et al.* [41, 42] ont observé en présence de 2-6 diméthylphénol ou de l'acide 4-hydroxybenzoïque des rendements et des Mw variables selon le type de catalyseur utilisé, en l'occurrence une laccase ou une peroxydase. De même, ces auteurs ont noté que les Mw des polymères synthétisés diffèrent selon l'origine de la peroxydase (HRP ou SBP). L'origine de l'enzyme affecte aussi la conductivité des polymères synthétisés. Ainsi, la conductivité des poly(catéchol) obtenu par catalyse par HRP est de $5.00 \times 10^{-9} \text{ S.cm}^{-1}$, contre $0.25 \times 10^{-9} \text{ S.cm}^{-1}$ pour ceux obtenus par catalyse par SBP [33].

Tableau 4. Polymerization of 2,6-dimethylphenol or 4-hydroxybenzoic acid by different source of catalyst, in acetone and acetate buffer (40:60% vol.), at room temperature for 24h under air.

Monomer	Group	Species	Yield (%)	M _w	PD	References
2,6-dimethylphenol	Peroxidase	HRP	33	57600	1.8	[48]
		SBP	38	81000	1.8	
	Laccase	CCP	57	5400	2.0	
4-hydroxybenzoic acid	Peroxidase	HRP	79	13200	–	[49]
		SBP	72	14700	–	
	Laccase	CCP	62	11500	–	
		PCL	80	7700	–	
		MYL	83	9600	–	
POL	O	–	–	–		

Mw: weight average molecular mass; PD: polydispersity; CCP: laccase *Coprinus cinerius*; PCL: laccase *Pycnoporus coccineus*; MYL: laccase *Myceliophthora*; POL: laccase *Pyricularia oryzae*

Pour une enzyme donnée, l'activité varie également selon qu'elle est utilisée sous forme libre, immobilisée, co-lyophilisée ou en présence de surfactants.

2.3.1.1. Forme libre

L'utilisation de l'enzyme sous forme libre en solvant organique est rendue possible grâce à l'ajout, d'un surfactant, soit par sa co-lyophilisation avec une molécule hydrophobe. En effet, ces procédures permettent de limiter la dénaturation enzymatique. Ainsi, Paradkar et Dordick, Kamiya *et al.*, Bindhu et Emilia Abraham [43-45] ont montré que l'activité des oxydoréductases est maintenue, même dans un milieu presque anhydre, grâce à l'association ionique avec une molécule de surfactant. Pour éviter l'effet toxique de l' H_2O_2 , Angerer *et al.* [46] remplacent ce dernier par le *tert*-butyl hydroperoxyde, qui est de surcroît plus soluble dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions, un turnover total de 5000 μmol de substrat transformé/ μmol HRP a été obtenu sans changement de la masse moléculaire en comparaison aux réactions menées en micelles inverses.

L'activité des oxydoréductases varie également selon qu'elles sont pré-solubilisées dans une solution aqueuse ou dispersées sous forme solide directement dans le milieu réactionnel [47, 48]. La lyophilisation de l'enzyme en présence du substrat, ou d'un composé hydrophobe, ou encore en présence d'un lyoprotectant hydrophile augmente son activité par rapport à son utilisation sous forme dispersée. La co-lyophilisation augmente aussi sa régiosélectivité. Yu et Klibanov [49] observent une plus grande régiosélectivité de la HRP lyophilisée à pH 9.5 en présence de 75 mM D-proline par rapport à la même enzyme non co-lyophilisée.

2.3.1.2. Forme immobilisée

Pour diminuer l'effet dénaturant des solvant organiques, différents types de supports ont été utilisés pour immobiliser les oxydoréductases (sépharose[50], chitosan [51, 52], gel de polyacrylamide [53], résine [54], billes de verre poreuses [55], l'ensemble des supports utilisés a été répertorié par Duran *et al.* [56]). Ainsi, la laccase immobilisée sur un mélange de dextran et gel Sepharose CL-6B reste active même dans un milieu ne contenant que 3.5 % d'eau [50]. Pour générer les cofacteurs *in situ*, les peroxydases ont été co-immobilisées avec des glucoses oxydases (Figure 2) [23, 24]. En outre, lors de l'oxydation du thioanisole par la SBP, Van de Velde *et al.* [57] ont rapporté que ce système de co-immobilisation permet d'accroître l'énantiosélectivité sur le produit qui passe de 24 % à 50% (S).

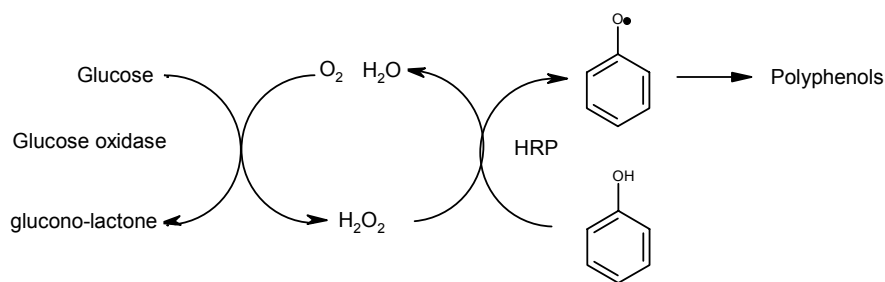


Figure 2. Bi-enzymatic system used for the polymerization of phenols [23]

Certains travaux ont rapporté la co-immobilisation de peroxydase et des glucoses oxydases sur des puces fixées dans un canal avec un apport du milieu réactionnel en continu. Ce système permet de séparer en ligne les polymères synthétisés [24].

En plus des supports classiques, les peroxydases ont été immobilisées sous forme de microcapsules nanoorganisées en couches successives assemblant l'enzyme et des polyélectrolytes (LbL : *Layer by Layer*) [58, 59] (Figure 1). Cette forme d'immobilisation permet d'avoir une importante concentration dans un volume confiné. De plus, grâce à sa perméabilité sélective, les petites molécules peuvent diffuser facilement d'un compartiment à un autre alors que les polymères sont soit piégés à l'intérieur ou adsorbés en surface [58-61].

L'immobilisation sur des supports ou par encapsulation peut affecter l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Pour remédier à ce problème, la technique d'immobilisation dans un réacteur à membrane a été proposée [62] et appliquée avec succès aux laccases (Tableau 5) [63].

Tableau 5. Kinetic parameters to relative to the soluble and insoluble laccase from *Rhus vernicifera* [76].

	Optimum pH	Optimum temperature	K _m (mM)	v _{max} (μmoles.min ⁻¹)	K _m /V _m
Soluble enzyme	7.5	40°C	69.00	9.58	7.20
Immobilized enzyme isothermal conditions	7.5	50°C	11.30	0.27	41.85
Immobilized enzyme non-isothermal conditions (Δt =20°C)			5.85	0.32	18.28

2.3.2. Effet du substrat

Pour une même enzyme, le type de substrat affecte le rendement de conversion et la taille des polymères (Tableau 6). Ceci est dû, selon Mita *et al.* [64], à l'augmentation de solubilité de certains substrats en fonction du log P. Ces auteurs ont observé en présence de HRP que le pourcentage d'unités phényles (pontage C-C) augmente par rapport aux unités oxyphényles (C-O) quand le paramètre hydrophobique (π) du substrat augmente.

Tableau 6. Influence of phenol-substituent on polymerization by *Horseradish* peroxidase

Molecule	Mw	Yield	References
Phenols	1400	-	[20]
p-methoxyphenol	2000	-	
p-cresol	1900	-	
p-chlorophenol	600	-	
2,6-dimethylphenol	500	-	
4,4'-biphenol	400	-	
Aniline	1700	-	
1-naphtol	Very high	-	
2-naphtol	2000	-	
p-tert-butylphenol	1900	-	
p-phenylphenol	26000	-	
4-cyclohexylphenol	1200	86	[53]
4- <i>t</i> -butylphenol	1674	98	
4-isopropylphenol	2380	99	
4-methoxyphenol	1159	100	
<i>p</i> -CH ₃	6	7920	[6]
<i>p-n</i> -C ₃ H ₇	70	12200	
<i>p-i</i> -C ₃ H ₇	95	11960	
<i>p-t</i> -C ₄ H ₉	24	10800	
<i>p-n</i> -C ₅ H ₁₁	92	10400	
<i>p-n</i> -C ₇ H ₁₅	90	10080	
<i>o-i</i> -C ₃ H ₇	0	-	
<i>m-i</i> -C ₃ H ₇	0	-	
H	72	122500	

Pour résoudre le problème de faible solubilité du substrat certains auteurs ont vectorisés les substrats phénoliques par des polymères chargés, et des micelles. Cette vectorisation a permis non seulement l'augmentation de leur solubilité mais aussi d'éviter les branchements parasites [65]. Kim *et al.* [66] ont quant à eux observé que l'utilisation de polymères solubles dans l'eau tels que le poly(éthylène glycol)(PEG), le poly(2-méthyl-2-oxazoline)(PMOZ) ou le

poly(2-éthyl-2-oxazoline)(PEOZ) comme agent de vectorisation favorise le couplage de type C-C.

2.3.3. Effet du pH

Les effets du pH sont dus à la balance entre 2 processus opposés [67], d'une part, une augmentation de l'activité à pH élevé, favorisée par la baisse du potentiel redox du substrat oxydé, provoquant une importante différence entre le potentiel du substrat et celui du cuivre de type 1 de la laccase et d'autre part, une décroissance de l'activité due à la fixation des anions hydroxyles sur les cuivres de type 2 et 3. Les effets du pH sur la réaction de polymérisation peuvent aussi être attribué à son effet sur le substrat. Pour les substrats présentant un potentiel redox indépendant du pH (ABTS, $K_4Fe(CN)_6$), l'activité décroît avec l'augmentation du pH. En revanche, pour les autres substrats, l'activité laccasique dépend plus du type de laccase que du substrat [67].

Le pH optimum pour les laccases fongiques est en général situé entre 3 et 7. Par contre, celui des laccases issues des plantes peut être supérieur à 9 [12]. Ces plages de pH ne correspondent pas toujours au microenvironnement optimal pour la conversion lors de la réaction de polymérisation. En effet, Kim et Nicell [68], en présence de laccase de *Trametes versicolor*, ont obtenu le taux de conversion le plus élevé (60 %) à pH 5, alors que le pH idéal pour cette enzyme est de l'ordre de 6 à 8.

De plus, le pH influence le taux de conversion et la masse moléculaire des oligomères (Figure 3) [42]. Néanmoins, cette influence est variable selon le milieu réactionnel utilisé [4, 23, 33].

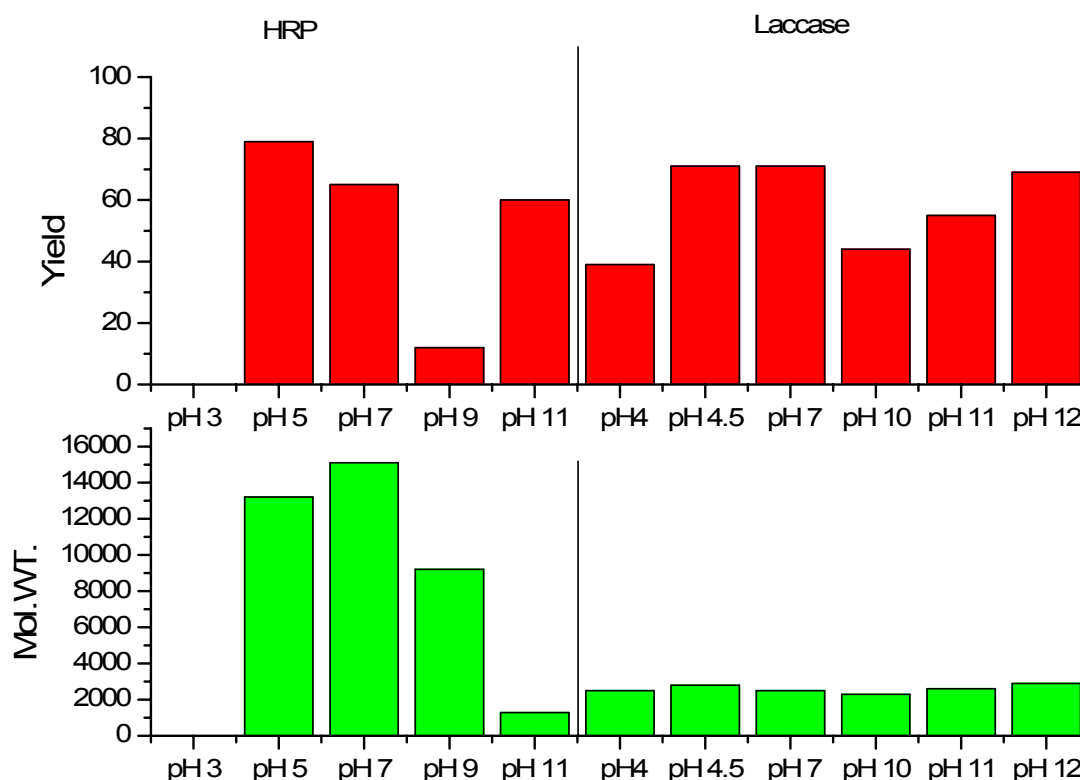


Figure 3. Impact of pH variation on polymerization of phenol by HRP or laccase in 60 % acetone or 50 % acetone respectively [42].

Il a été également rapporté que le pH affecte le type de pontage entre unités monomériques. Un pH acide favorise les pontages C-C alors que les pontages C-O sont majoritaires à pH basiques [69].

2.3.4. Effet des espèces ioniques

Selon Xu *et al.* [70] de petites molécules exogènes telles que OH^- , F^- , ou Cl^- sont capables de se lier au site cuivrique T2 et d'inhiber le transfert électronique entre le site T1 et le cluster T2/T3 de la laccase. En outre, il a été démontré que des molécules à propriétés chélatantes comme les flavonoïdes inhibent les laccases. Cette inhibition peut être évitée par l'ajout des ions Cu^{2+} [71].

L'effet des sels inorganiques et de métaux lourds sur la polymérisation des phénols par HRP et par la laccase *Trametes versicolor* ont été étudiés. La présence de NaCl, CaCl₂, MgCl₂, NH₄Cl et (NH₄)₂SO₄ diminue les taux de conversions de la HRP et de la laccase par comparaison aux réactions menées dans l'eau distillée [72]. De même, la présence de sulfide (H₂S) inhibe la transformation de phénol par ces enzymes par réduction des radicaux phenoxy ; alors que la présence de Mn(II) et Zn(II) favorise l'activité de la HRP [68].

2.3.5. Effet de la température

Plusieurs études ont abordé l'influence de la température sur les performances de la polymérisation catalysée par les laccases [73-76]. Ces études ont montré que ce facteur affecte l'activité laccasique, le taux de conversion et la solubilité des phénols. L'intensité de cet effet est variable selon les substrats et l'enzyme utilisés. Ainsi, lors de l'étude d'une conversion du bisphenol A par la laccase de *Trametes versicolor*, Kim et Nicell [68] ont observé une plus grande conversion de ce substrat à 45 °C qu'à 25 °C alors que l'activité de cette enzyme est plutôt favorisée à 25 °C. De même, Akita *et al.* [19] ont observé, en présence de HRP comme catalyseur et de 1,4 dioxane comme solvant, un rendement élevé (80 %) de polymérisation tant que la température est inférieure à 40 °C, au-delà, le rendement chute, à 60 °C, il est de 31 %. Cette diminution du rendement est expliquée par ces auteurs par une diminution de l'activité catalytique de la HRP due à l'altération thermique de l'apo-protéine.

2.3.6. Effet du solvant

En milieu aqueux, les réactions de polymérisation des composés phénoliques sont souvent limitées par la faible solubilité du substrat. En revanche, en milieu organique, la réactivité est plutôt freinée suite à la dénaturation des enzymes dans cet environnement. L'effet des solvants a été répertorié d'une façon détaillée par Rodakiewicz-Nowak [77].

Le ratio solvant organique/tampon affecte sévèrement le rendement, la solubilité et la masse moyenne des polymères [9, 41, 42, 64]. Ainsi, une simple variation du pourcentage de dioxane de 10 à 85 % dans de l'eau mène à des variations de masse moléculaire de 500 à 26000 [20]. En parallèle, l'activité enzymatique décroît quand le pourcentage de dioxane

augmente mais les polymères restent en suspension ce qui permet l'allongement de la chaîne polymérique. L'ajout de chloroforme dans le milieu en présence de la laccase permet d'accroître le Mw des polymères formé [78]. Selon Ikeda *et al.* [78], ce comportement est dû au phénomène d'interaction entre l'enzyme, le solvant, le monomère et le polymère, et notamment à la diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

De plus, les solvants ont des effets sur la structure des polymères et la sélectivité de la réaction et ceci aussi bien pour la HRP que pour la laccase. Ainsi, lorsque le log P du solvant augmente, la proportion d'unité phényle diminue [64, 79, 80]. Ce comportement est modulable selon la nature des substrats. Dans le cas, de l'oligomérisation du totarol par la laccase de *Trametes pubescens*, le pontage C-O est favorisé quand l'hydrophobicité du co-solvant diminue. Cette sélectivité pourrait être attribuée à un effet intrinsèque du solvant sur la formation de pontage ou à un effet solvant sur l'enzyme. Pour déterminer l'origine de cette sélectivité, cette réaction a été comparée à une réaction chimique avec le même substrat et en présence de FeCl₃ ou MnO₂ comme catalyseurs. La réaction chimique ne met en évidence aucune stéréosélectivité marquée; il apparaît donc que le solvant affecte la sélectivité via son effet sur l'enzyme. En outre, le solvant influence la sélectivité de polymérisation par sa nature. En effet, Intra *et al.* [81] ont observé que les solvants aromatiques (benzène, toluène) mènent à la formation des structures dimériques C1-C1' alors que les solvants type tert-amyl alcool, chloroforme, favorisent les liaisons C1-C3'.

2.4. Effet du mode de conduite de la réaction.

L'alimentation en substrat et notamment en co-substrat, l' O₂ pour les laccases et le H₂O₂ pour les peroxydases peut contrôler la réaction de polymérisation. En général, le dioxygène est introduit initialement dans le milieu réactionnel. Par contre, le H₂O₂ est ajouté au cours de la réaction selon deux modes : contrôlé par sonde ou non contrôlé [82, 83]. De même, pour le substrat principal, différentes configurations de réacteurs ont été étudiées.

2.4.1. Ajout du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est à la fois un co-substrat indispensable et un inhibiteur à forte concentration de l'activité péroxydasique. Son ajout dans le milieu réactionnel a fait l'objet de plusieurs travaux [84, 85]. Pour pallier les défauts d'une alimentation continue Akita *et al.* [19] ont réalisé des ajouts juste en quantité nécessaire et suffisante à différents intervalles et à différentes concentrations. Ils ont observé que l'ajout de faibles concentrations favorise le rendement de conversion. Seelbach *et al.* [83] quant à eux ont contrôlé l'alimentation du peroxyde d'hydrogène par l'utilisation d'une sonde. Cette procédure a permis de réduire la durée de la réaction et d'augmenter le rendement.

2.4.2. Les différents modes de conduite de la réaction

Majoritairement, les réactions de polymérisation enzymatique des composés phénoliques sont menées en discontinu (Tableau 3). Pour améliorer les performances de ces réactions, le mode continu a été testé selon deux configurations. Pilz *et al.* [86] ont mené cette réaction en réacteur à membrane en continu (EMR) où l'ajout de l'oxygène a été assuré par diffusion pour éviter les inconvénients du bullage. De même, Seelbach *et al.* [83] ont testé un EMR avec élimination en continue des polymères. Ce dispositif a permis d'obtenir une productivité de l'ordre de 119.5 g/(L.j) et un total turnover de 192.8. Il est nettement plus performant que le mode batch pour la productivité, qui ne permet d'atteindre que 42.2 g/(L.j), mais avec un turnover trois fois plus fort.

Une autre configuration a été expérimentée par Ayyagari *et al.* [25, 87] (Figure 4). Elle consiste en un réacteur alimenté en continu avec le substrat, le co-substrat et l'enzyme. Le réacteur est couplé à un module d'ultrafiltration pour séparer en ligne les polymères formés. Ce dispositif vise à contrôler la distribution de la masse molaire, tout en minimisant l'effet du solvant et en maximisant l'utilisation de l'enzyme.

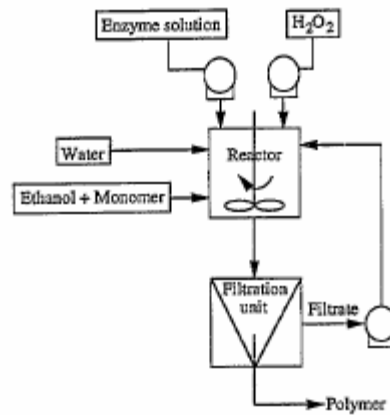


Figure 4. Fed-batch reactor with continuous filtration [93]

Conclusion

L'utilisation des laccases et des peroxydases dans le domaine de la polymérisation des composés phénoliques offre une alternative intéressante pour la synthèse des molécules à la carte en fonction des applications et des propriétés recherchées. Cependant, ces réactions sont affectées par des nombreux facteurs (température, pH, solvant, origine de l'enzyme, structure des substrats, architecture du réacteur, ...). Ces facteurs ont souvent des effets antagonistes comme l'effet des solvants organiques qui d'un côté favorise la solubilité des substrats et de l'autre côté altère les activités enzymatiques. L'optimisation de ces réactions nécessite une approche pluridisciplinaire et constitue un défi scientifique exaltant. Compte tenu de l'intérêt majeur des polymères à base des composés phénoliques, les années à venir verront une intensification des investigations dans ce domaine et il est fort à parier que de nouveaux procédés verront le jour prochainement.

References

1. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003;4:1394-1399.
2. Bruno FF, Nagarajan S, Nagarajan R, Kumar J, Samuelson LA. Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins). *J Macromol Sci Pure Appl Chem* 2005;42:1547-1554.
3. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of phenol in an aqueous solution in the presence of a catalytic amount of cyclodextrin. *Macromol Chem Phys* 2002;203:127-130.
4. Oguchi T, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi M. Enzymatic synthesis of soluble polyphenol. *Bull Chem Soc Jpn* 2000;73:1389-1396.
5. Ayyagari MS, Marx KA, Tripathy SK, Akkara JA, Kaplan DL. Controlled free-radical polymerization of phenol derivatives by enzyme-catalyzed reactions in organic solvents. *Macromolecules* 1995;28:5192-5197.
6. Kurioka H, Komatsu I, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of alkylphenols. *Macromol Rapid Comm* 1994;15:507-510.
7. Tonami H, Uyama H, Kobayashi S, Fujita T, Taguchi Y, Osada K. Chemoselective Oxidative Polymerization of m-Ethynylphenol by Peroxidase Catalyst to a New Reactive Polyphenol. *Biomacromolecules* 2000;1:149-151.
8. Kurisawa M, Chung JE, Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization. *Biomacromolecules* 2003;4:469-471.
9. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol Biosci* 2003;3:758-764.
10. Fulcrand H, Doco T, Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1996;752:85-91.
11. Kim Y-J, Chung JE, Kurisawa M, Uyama H, Kobayashi S. New Tyrosinase Inhibitors, (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates. *Biomacromolecules* 2004;5:474-479.
12. Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biochem J* 1999;3:1-25.
13. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem.Rev.* 1996;96:2563-2605.
14. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 1996;35:7608-7614.
15. Fernandez-Sanchez C, Tzanov T, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A. Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochem* 2002;58:149-156.
16. Potthast A, Rosenau T, Koch H, Fischer K. The reaction of phenolic model compounds in the laccase-mediator system (LMS)-investigations by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Holzforschung* 1999;53:175-180.
17. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 1992;2:388-393.
18. Kobayashi S, Higashimura H. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog Polym Sci* 2003;28:1015-1048.
19. Akita M, Tsutsumi D, Kobayashi M, Kise H. Structural change and catalytic activity of horseradish peroxidase in oxidative polymerization of phenol. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1581-1588.

20. Dordick JS, Marletta MA, Klibanov AM. Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotech Bioeng* 1987;30:31-36.
21. Hinckley G, Mozhaev VV, Budde C, Khmelnitsky YL. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnol Lett* 2002;24:2083.
22. Laszlo JA, Compton DL. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids. *J Mol Catal B: Enzym* 2002;18:109-120.
23. Uyama H, Kurioka H, Kobayashi S. Novel bienzymatic catalysis system for oxidative polymerization of phenols. *Polym J* 1997;29:190-192.
24. Lee MY, Srinivasan A, Ku B, Dordick JS. Multienzyme catalysis in microfluidic biochips. *Biotech Bioeng* 2003;83:20-28.
25. Ayyagari M, Akkara JA, Kaplan DL. Characterization of phenolic polymers synthesized by enzyme-mediated reactions in bulk solvents and at oil-water interfaces. *Mat Sci Eng, C* 1996;4:169-173.
26. Ncanana S, Baratto L, Roncaglia L, Riva S. Laccase-mediated oxidation of totarol. *Adv Synth Catal* 2007;349:1507-1513.
27. Michizoe J, Goto M, S. F. Catalytic Activity of Lactase Hosted in Reversed Micelles. *J Biosci Bioeng* 2001;92:67-71.
28. Bruno FF, Akkara JA, Samuelson LA, Kaplan DL, Mandal BK, Marx KA, Kumar J, Tripathy SK. Enzymatic mediated synthesis of conjugated polymers at the Langmuir trough air-water interface. *Langmuir* 1995;11:889-892.
29. Yang Z, Pan W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 2005;37:19.
30. Hinckley G, Mozhaev VV, Budde C, Khmelnitsky YL. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnology Letters* 2002;24:2083-2087.
31. Laszlo JA, Compton DL. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002;18:109.
32. van Rantwijk F, Madeira Lau R, Sheldon RA. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology* 2003;21:131.
33. Dubey S, Singh D, Misra RA. Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb Technol* 1998;23:432-437.
34. Rao AM, John VT, Gonzales RD, Akkara JA, Kaplan DL. Catalytic and interfacial aspects of enzymatic polymer synthesis in reversed micellar systems. *Biotech Bioeng* 1993;41:531-540.
35. Carrea G. Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends Biotechnol* 1984;2:102-106.
36. Premachandran RS, Banerjee S, Wu XK, John VT, MxPherson GL. Enzymatic synthesis of fluorescent naphthol-based polymers. *Macromolecules* 1996;29:6452-6460.
37. Khmelnitsky YL, Gladilin AK, Roubailo VL, Martinek K, Levashov AV. Reversed micelles of polymeric surfactants in nonpolar organic solvents. A new microheterogeneous medium for enzymatic reactions. *Eur J Biochem* 1992;206:737-745.
38. Martinek K, Levashov AV, Khmelnitsky NL, Klyachko NL, Berezin IV. Colloidal solution of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions. *Science* 1982;218:889-891.
39. Akkara JA, Kaplan DL, Samuelson LA, Mandal BK, Tripathy SK, Bruno FF, Marx KA, *Method for synthesizing an enzyme-catalyzed polymerized monolayer*. 1992, The

- United States of America as represented by the secretary of the army: Lowell, Massachusetts.
40. Reihmann MH, Ritter H. Enzymatically catalyzed synthesis of photocrosslinkable oligophenols. *Macromol.Chem.Phys.* 2000;201:1593-1597.
 41. Ikeda R, Sugihara J, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol. *Macromolecules* 1996;29:8702-8705.
 42. Ikeda R, Sugihara J, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of 4-hydroxybenzoic acid derivatives to poly(phenylene oxide)s. *Polym Int* 1998;47:295-301.
 43. Paradkar VM, Dordick JS. Aqueous-like activity of alpha-chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 1994;116:5009.
 44. Paradkar VM, Dordick JS. Mechanism of extraction of chymotrypsin into iso-octane at very low concentrations of aerosol OT in the absence of reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering* 1994;43:529.
 45. Kamiya N, Inoue M, Goto M, Nakamura N, Naruta Y. Catalytic and structural properties of surfactant-horseradish peroxidase complex in organic media. 2000;16:52-58.
 46. Angerer PS, Studer A, Witholt B, Li Z. Oxidative polymerization of a substituted phenol with ion-paired horseradish peroxidase in an organic solvent. *Macromolecules* 2005;38:6248-6250.
 47. Dai L, Klibanov AM. Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9475-9478.
 48. Kazandjian RZ, Klibanov AM. Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. *J Am Chem Soc* 1985;107:5448-5450.
 49. Yu JH, Klibanov AM. Co-lyophilisation with Δ -proline greatly enhances peroxidase's stereoselectivity in a non-aqueous medium. *Biotechnology Letters* 2006;28:555-558.
 50. Milstein O, Nicklas B, Hüttermann A. Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;31:70-74.
 51. Bindhu LV, Abraham ET. Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media. *J Appl Polym Sci* 2003;88:1456-1464.
 52. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme MicrobTechnol* 2004;35:126-139.
 53. Osiadacz J, Al-Adhami AJH, Bajraszewska D, Fischer P, Peczyńska-Czoch W. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *Journal of Biotechnology* 1999;72:141.
 54. Peralta-Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL, Moraes SG, Rosa MA, Minussi RC, Duran N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. 2003;42:131.
 55. Rogalski J, Jozwik E, Hatakka A, Leonowicz A. Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 1995;95:99-108.
 56. Duran N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme MicrobTechnol* 2002;31:907-931.
 57. Van De Velde F, Lourenco ND, Bakker M, Van Rantwijk F, Sheldon RA. Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotech Bioeng* 2000;69:286-291.

58. Ghan R, Shutava T, Patel A, John VT, Lvov Y. Enzyme-catalyzed polymerization of phenols within polyelectrolyte microcapsules. *Macromolecules* 2004;37:4519-4524.
59. Ghan R, Shutava T, Patel A, John V, Lvov Y. Layer-by-layer engineered microreactors for bio-polymerization of 4-(2-aminoethyl) phenol hydrochloride. in *Materials Research Society Symposium - Proceedings*. 2003.
60. Shutava T, Zheng Z, John VT, Lvov Y. Microcapsule modification with peroxidase-catalyzed phenol polymerization. *Biomacromolecules* 2004;5:914-921.
61. Antipov AA, Sukhorukov GB, Leporatti S, Radtchenko IL, Donath E, Mohwald H. Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2002;198-200:535.
62. Stellato S, Portaccio M, Rossi S, Bencivenga U, La Sala G, Mazza G, Gaeta FS, Mita DG. A novel bioreactor operating under non-isothermal conditions. *J Membr Sci* 1997;129:175-184.
63. Durante D, Casadio R, Martelli L, Tasco G, Portaccio M, De Luca P, Bencivenga U, Rossi S, Di Martino S, Grano V, Diano N, Mita DG. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J Mol Catal B: Enzym* 2004;27:191-206.
64. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromol Biosci* 2003;3:253-257.
65. Samuelson LA, Tripathy SK, Bruno F, Nagarajan R, Kumar J, Liu W, *Enzymatic polymerization of anilines or phenols around a template*. 2003: The united states of america as represented by the secretary of the army, lowell, Massachusetts.
66. Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic template polymerization of phenol in the presence of water-soluble polymers in an aqueous medium. *Polymer Journal* 2004;36:992-998.
67. Xu F. Effect of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272:924-928.
68. Kim YJ, Nicell JA. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresour Technol* 2006;97:1431-1442.
69. Roubaty JL, Bréant M, Lavergne M, Revillon A. Mechanism of the oxidative coupling of phenols: influence of pH upon the electrochemical oxidation of xylenol in methanol. *Makromol Chem* 1978;179:1151-1157.
70. Xu F, Berka RM, Wahleithner JA, Nelson BA, Shuster JR, Brown SH, Palmer AE, Solomon EI. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem J* 1998;334 (Pt 1):63-70.
71. Fenoll LG, Garcia-Ruiz PA, Varon R, Garcia-Canovas F. Kinetic Study of the Oxidation of Quercetin by Mushroom Tyrosinase. *J Agric Food Chem* 2003;51:7781-7787.
72. Wagner M, Nicell JA. Impact of dissolved wastewater constituents on peroxidase-catalyzed treatment of phenol. *J Chem Technol Biotechnol* 2002;77:419-428.
73. Aktas N. Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM). *Enzyme Microb Technol* 2005;37:441-447.
74. Aktas N, Kibarar G, Tanyolaç A. Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed alpha-naphthol polymerization. *J Chem Technol Biotechnol* 2000;75:840-846.
75. Aktas N, Tanyolaç A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour Technol* 2003;87:209-214.
76. Guresir M, Aktas N, Tanyolac A. Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. *Process Biochem* 2005;40:1175-1182.

77. Rodakiewicz-Nowak J. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 2000;11/12:419-434.
78. Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide). laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules* 1996;29:3053-3054.
79. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. *Bull Chem Soc Jpn* 2000;73:1389.
80. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Precise structure control of enzymatically synthesized polyphenols. *Bull Chem Soc Jpn* 2004;77:1523-1527.
81. Intra A, Nicotra S, S. R, Danieli B. Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphtol derivatives. *Adv Synth Catal* 2005;347:973-977.
82. van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon RA. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol* 2001;19:73-79.
83. Seelbach K, Van Deurzen MPJ, Van Rantwijk F, Sheldon RA, Kragl U. Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotech Bioeng* 1997;55:283-288.
84. Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *BBA-Protein Struct M* 1990;1041:43-47.
85. Nicell JA, Saadi KW, Buchanan ID. Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresour Technol* 1995;54:302-310.
86. Pilz R, Hammer E, Schauer F, Kragl U. Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;60:708.
87. Ayyagari M, Akkara JA, Kaplan DL. Solvent-enzyme-polymer interactions in the molecular-weight control of poly(m-cresol) synthesis in nonaqueous media. In: *Enzymes in polymer synthesis*, Gross R.A., Kaplan D.L., and Swift G., editors. Washington: ACS symposium series 684;1998. p. 112-124.
88. Ayyagari M, Akkara JA, Kaplan DL. Enzyme-mediated polymerisation reactions: peroxidase-catalyzes polyphenol synthesis. *Acta Polymer* 1996;47:193-203.
89. Ncanana S, Burton S. Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer. *J Mol Catal B: Enzym* 2007;44:66.
90. Uyama H, Kurioka H, Kobayashi S. Novel bienzymatic catalysis system for oxidative polymerization of phenols. *Polymer Journal* 1997;29:190.
91. Kobayashi S, Kurioka H, Uyama H. Enzymatic synthesis of a soluble polyphenol derivative from 4,4'-biphenyldiol. *Macromol Rapid Comm* 1996;17:503-508.
92. Kim YH, An ES, Song BK, Kim DS, Chelikani R. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnol Lett* 2003;25:1521-1524.
93. Uyama H, Maruichi N, Tonami H, Kobayashi S. Peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of bisphenols. *Biomacromolecules* 2002;3:187-193.

4.4. Incidence du mode pontage et du degré de polymérisation sur les propriétés

Comme nous l'avons démontré précédemment, les conditions expérimentales influent sur le nombre, le type et la localisation du pontage. Ces différents paramètres vont agir sur les propriétés des polymères formés.

Guyot *et al.* [161] démontrent au cours de leurs travaux sur la catéchine que le type et la localisation du pontage ont une influence sur la couleur des produits obtenus. Les polymères obtenus à pH 6 sont colorés en jaune, ceux obtenus à pH 3 sont faiblement colorés. A pH 3, seuls des pontages éther ont été décrits alors qu'à pH 6, les pontages sont de type C-C, C=C ou C-O. En outre, ces derniers peuvent présenter de 1 à 4 pontages simultanés contrairement à ceux obtenus à pH 3 qui n'ont qu'un seul pontage.

Kurisawa *et al.* [99] observent une incidence de la proportion en solvant dans le milieu de synthèse sur la solubilité des polymères formés. Les polymères synthétisés dans 20 % d'acétone sont moins solubles dans le DMF que ceux synthétisés dans 5 % d'acétone.

Desentis-Mendoza *et al.* [59] démontrent que les oligomères obtenus à pH 7 ont un pouvoir antiradicalaire plus élevé que ceux obtenus à pH 5.

De nombreuses études traitent de l'influence du degré de polymérisation sur diverses activités biologiques. Le plupart de ces études portent sur les procyanidines. Ainsi, les dimères et les trimères de procyanidines présentent une grande activité antiradicalaire face à la lipoperoxydation, contrairement aux pentamères et hexamères qui pour leur part possèdent des propriétés anti-élastase plus marquées [162].

Il a été mis en évidence que l'augmentation du degrés de polymérisation accroît le pouvoir antiradicalaire des procyanidines vis-à-vis d'un grand nombre d'espèce radicalaire [163]. Cet effet est imputé au grand nombre de conjugaison possible entre le groupe catéchole, le cycle B et les groupements hydroxyles du squelette polymérique engendrant une grande stabilité du radical aryloxy formé [164].

Il a été démontré aussi que l'augmentation du degré de polymérisation des procyanidines influe sur leur affinité vis-à-vis de certaines protéines. L'affinité des tannins pour la protéine salivaire humaine s'accroît avec leur degré de polymérisation [165], et l'affinité pour l'oenine est plus marquée sur les dimères liés en C4-C6 par rapport à ceux liés

en C4-C8 [166]. En fait, cette affinité est dépendante de la capacité à établir des liaisons hydrogène avec l'eau, elle-même dépendante de la conformation des oligomères dans l'eau.

5. La modélisation moléculaire appliquée aux flavonoïdes

Les études abordant la structure des coumarines par modélisation moléculaire étant très rares [167, 168], cette partie s'attachera essentiellement à décrire la modélisation moléculaire appliquée aux flavonoïdes.

La stabilité, la réactivité et les effets physiologiques des flavonoïdes sont couramment reliés à leur famille, la nature de leurs substituant et à leur structure moléculaire (géométrie) [12, 55, 104, 168]. 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.

A travers la mécanique quantique ou moléculaire plusieurs paramètres peuvent être obtenus :

- paramètres structuraux de la molécule : longueurs de liaison, angles de valences, angles de torsion, liaisons hydrogène
- paramètres énergétiques : énergie de liaison, enthalpie de formation
- paramètres électroniques : charges, densité de spin, énergies et délocalisation des orbitales (HOMO, LUMO), E_g (différence entre E_{HOMO} et E_{LUMO}), électronégativité (χ), électroaffinité (EA), polarisabilité (POL)
- paramètres stériques : volume et surface moléculaire
- paramètres hydrophobiques : $\log P$

De nombreuses études ont pour but 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.

5.1. Etude conformationnelle

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

De nombreuses études traitent des flavonoïdes aglycones et notamment de la forme aglycone de la rutine, la quercétine [169-172]. Mais les études abordant les structures des flavonoïdes glycosylées telle que la rutine sont très rares. Van Acker *et al.* [173] ont étudié la rutine et ont rapporté qu'un angle θ (C6'C1'C2C1) de 27.17° entraîne la perte de la coplanéité observée sur la quercétine. L'analyse conformationnelle a été effectuée par rotation de la liaison entre la partie chromone et le cycle B (angle θ), en utilisant le champ MM (AMBER). Les structures obtenues ont été optimisées par méthode *ab initio* (STO-G3).

Alluis [174] a déterminé aussi, la conformation la plus stable de la rutine par RMN dans des solutions de rutine préparées dans le DMSO. L'étude par ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) réalisée par cet auteur a fait apparaître des corrélations entre les positions 5' et 6'', entre les positions 6' et 1'' et entre les positions 5' et 2''. Pour chaque paire de protons corrélés, une distance de 4 Å a été imposée lors de l'étude par modélisation moléculaire. Cet auteur procède à une optimisation par mécanique moléculaire (champ de force MM+). La structure obtenue présente entre autre une liaison hydrogène entre le glucose (C2''-H) et la fonction carbonyle du cycle C (C4=O) et une poche hydrophobe entre le rhamnose et le cycle B (Figure I.17.).

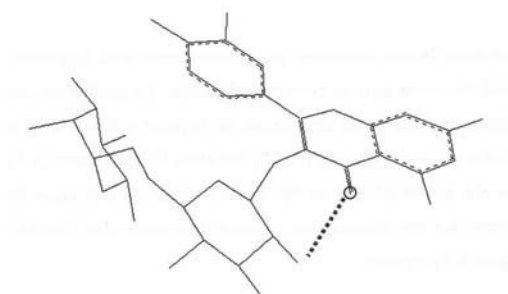


Figure I.12. Structures optimisées d'énergie minimale de la rutine (calculs mécaniques moléculaires, champs de force MM+) [174]

5.2.Relation structure-activité antioxydante

Différents facteurs ont pu être corrélés à l'activité antioxydante :

- Descripteurs énergétiques

Un antioxydant peut jouer son rôle soit par un mécanisme de transfert de proton, soit par un mécanisme de transfert mono-électronique [175].

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 du nombre de liaisons hydrogène 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 [175, 176]. 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).

- Descripteurs électroniques

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 évalué. L'énergie de la HOMO nous renseigne sur les capacités réductrices de la molécule : plus l'énergie de la HOMO est élevée, plus son potentiel d'ionisation est faible et plus son caractère réducteur est grand [177, 178].

Dans le cas des flavonoïdes, une corrélation a été observée entre l'excès de charges entre les atomes C₂ et C₃. En effet, il a été rapporté que la présence d'une densité électronique importante sur la double liaison C₂-C₃ des flavonols, avec un groupe hydroxyle libre en position 3, peut conduire à une plus grande réactivité de ces molécules avec l'oxygène singulet [47].

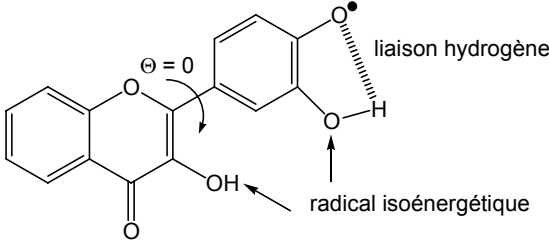
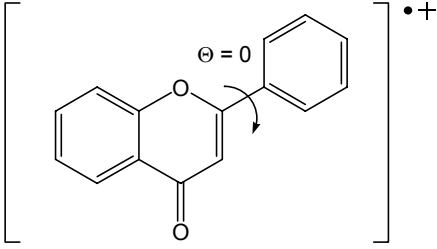
L'excès de charge au niveau de l'oxygène susceptible de réagir a été corrélé avec le pouvoir antioxydant, ainsi plus cette charge est négative, plus le pouvoir antioxydant sera élevé.

- Descripteurs géométriques

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. Ces éléments structuraux conduiraient probablement à la formation d'un radical stable en raison de nombreux groupes phénoliques et d'une délocalisation électronique étendue.

Les facteurs structuraux des radicaux des flavonoïdes non glycosylés impliqués dans le pouvoir antioxydant sont présentés dans le Tableau I.6.

Tableau I.6. Eléments 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 ($O_4\cdot$)</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 anti-radicalaire 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 Θ : 101°), 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 (lié à l'énergie de la HOMO)</p> <p><u>Flavonoïde</u> : quercétine, apigénine, lutéoline, épicatechine, kaempférole</p>

Plusieurs études sur les flavonoïdes et des molécules analogues Wright, Zhang et Wang ainsi que Trouillas *et al.* [103, 175, 179] ont relié l'activité antiradicalaire aux enthalpies de dissociation des OH phénoliques. De même, le potentiel d'ionisation des structures étudiées a été aussi corrélé avec les données expérimentales d'activité antiradicalaire mais de manière moins précise [179, 180]. 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.

Enfin, un moment dipolaire faible sera corrélé avec un fort pouvoir antioxydant. (Ces deux constatations ont été faites lors des travaux de L.Chebil au sein du laboratoire).

5.3.Relation structure-activité pro-oxydante

La cytotoxicité des flavonoïdes est majoritairement due à leur potentiel pro-oxydant. Tout comme pour leur activité antioxydante, leur potentiel de toxicité peut être relié à leur

structure. Les différentes relations structure-activité pro-oxydante sont répertoriées dans le Tableau I.7..

Tableau I.7. Exemple de relation structure-activité cytotoxique

Références	Flavonoïdes ou coumarines	Cellules testées	Paramètres	calcul modélisation	méthode de corrélation
[181]	23 flavonoïdes	Lymphoblastes Jurkat T	Diminution de la cytotoxicité : - hydroxyle en C3 - nombre d'hydroxyle - forte solubilité dans le milieu de culture Augmentation : - double liaison C2-C3 -groupement carbonyle en C4 - <i>ortho</i> -hydroxyle plus toxique que le <i>meta</i> -hydroxyle -O-méthylation ou glucuronidation -présence du cycle B		F-test
[182]	Quercétine, myricétine, morine, kaempferol, taxifoline, hespétine	Fibroblastes issus de reins d'agneau (FLK), cellules HL-60	Diminution de la cytotoxicité: -couple redox radical phenoxy/phenol élevé Augmentation : - log P élevé - log D (coefficient de distribution octanol/eau à pH7) élevé		Statistica (StatSoft)
[183]	Chrysin, biochanine, galangine, phloretine, naringénine, morine, apigénine, genistéine, kaempférole, luteoline, quercétine, eriodictyol, fisetine, taxifoline, catéchine, baicaleine, myricétine	Hépatocytes de rat	Diminution de l'activité : - potentiel redox élevé -BDE élevé Augmentation de l'activité : -log P élevé		
[184]	Quercétine, morine, kaempférole, taxifoline, hespétine, naringénine, acide gallique,	HL-60	Diminution de l'activité : -potentiel redox élevé Augmentation de l'activité : -log P élevé	PM3, DFT B3LYP/6-311G**//HF//3-21G* (gaussian)	
[185]	20 coumarines	Cellules du carcinome humain : HSC-2	Pas de corrélation avec ΔH , μ , potentiel d'ionisation, énergie de la LUMO. Relation hyperbolique avec le Log P (maximum à 2.5) Augmentation de la cytotoxicité : Faible potentiel d'ionisation, E_{HOMO} élevée, forte $\Delta\epsilon$ et faible η .	Conflex/PM3 et ACD log P pour le calcul du log P	CaChe Worksystem 4.9

Selon Plochmann *et al.* [181], la structure plane des flavonoïdes due à la présence de la double liaison C2-C3 augmente la cytotoxicité en induisant l'inhibition de la glycoprotéine P (transporteur membranaire exportant les agents thérapeutiques).

La cytotoxicité est proportionnelle à l'hydrophobicité des flavonoïdes [181, 182]. Celle-ci serait due à la plus forte perméabilité membranaire des espèces lipophiles, engendrant une accumulation intracellulaire des flavonoïdes.

Dans le cas des coumarines, leur cytotoxicité est reliée à leur électronégativité [185].

5.4. Relation structure-activité inhibitrice d'enzymes

Les flavonoïdes étant connus pour leurs activités d'inhibition d'enzymes. Des corrélations entre la structure de flavonoïdes et des activités biologiques ont été étudiées par plusieurs auteurs grâce à des paramètres moléculaires (énergétiques, stériques, hydrophobiques). Le Tableau I.8. donne quelques exemples de corrélation dans le cas de l'inhibition de la xanthine oxydase.

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 multivariable 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 d'analyse de la composante principale, par hiérarchisation des groupes, discriminant 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.

Tableau I.8. Exemples de relation structure –activité inhibitrice de la xanthine oxydase

Références	Flavonoïdes	Paramètres	calcul modélisation	méthode de corrélation
[64]	Apigénine, quercétine, myricétine, isovitexine, genistéine, allopurinol, naringénine	Diminution de l'activité : présence d'un groupement hydroxyle en C3 présence d'un sucre en C6 Augmentation : structure plane -présence d'un groupement carbonyle en C4 -présence de groupement hydroxyle en C5, C7	Mécanique moléculaire (trapos)	Comparaison structure par docking dans le site actif
[82]	Chrysin, galagine, apigénine, lutéoline, fisetine, kaempferol, quercétine, myricétine, morine, taxifoline, daidzéine, genistéine, épicatechine, épigallocateching allate, allopurinol	Diminution de l'activité : -hydroxyle en 3, 8 et 2' Augmentation de l'activité : - hydroxyle en position 5 et 7 - petite amélioration en présence d'hydroxyl en 3', 4' -hydroxyle en 4 - le nombre d'hydroxyle accroît l'inhibition (5>7>4'=3')		Méthode de calcul de la contribution des groupements hydroxyles
[81]	Variation des groupements hydroxyle sur des flavones, flavanones, chalcone	Diminution de l'activité : -méthylation d'un groupement hydroxyle Augmentation de l'activité : -hydroxyle en 5 et 7 -double liaison en 2-3 - fonction catéchol ou 3',4',5'-pyrogallol sur le cycle B		Calcul par l'indice de connectivité de Kier et Hall
[63]	Allopurinol, apigénine, quercétine, myricétine, genistéine, isovitexine, naringénine	Diminution de l'activité : Angle D3 supérieur à 27° Forte polarisabilité, forte réfractivité molaire, forte aire superficielle, fort volume moléculaire Faible log de P Augmentation de l'activité : Angle de torsion D3 (cycle C/B) entre 26 et 27° Petite taille Fort caractère hydrophobique	i) Analyse conformationnelle par MM (MM+) ii) Optimisation par méthode semi-empirique (AM1)	Comparaison entre les structures et les résultats

CHAPITRE II.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre II: Matériels et méthodes

1. MATÉRIELS	71
1.1. BIOCATALYSEUR	71
1.2. REACTIFS.....	71
1.2.1. Flavonoïdes.....	71
1.2.2. Solvants.....	72
1.2.3. Solutions tampons	72
2. CONDUITE DE L'OLIGOMÉRISATION	73
3. SÉPARATION DES OLIGOMÈRES PAR FILTRATION TANGENTIELLE	74
4. ETUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMÈRES	75
4.1. ETUDE DE LA SOLUBILITE	76
4.2. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE	76
4.2.1. Principe.....	76
4.2.2. Protocole.....	76
4.3. ACTIVITE D'INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE	77
4.3.1. Principe.....	77
4.3.2. Matériels et protocole	78
4.4. ETUDE RHEOLOGIQUE.....	79
4.4.1. Principe.....	79
4.4.2. Matériels et protocole	79
5. MÉTHODES ANALYTIQUES	80
5.1. ANALYSE DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMERES PAR SEC	80
5.1.1. Principe.....	80
5.1.2. Matériels et protocole	80
5.2. ANALYSE DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMERES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	82
5.2.1. Principe.....	82
5.2.2. Matériels et protocole	83
5.3. ANALYSE DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMERES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	83
5.3.1. Principe général de l'analyse par spectrométrie de masse.....	83
5.3.2. Principe de l'ionisation de type MALDI	84
5.3.3. Principe de l'analyseur par temps de vol.....	87
5.3.4. Protocole.....	88
5.4. ANALYSE DES FLAVONOÏDES ET DE LEURS OLIGOMERES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	88
5.4.1. Principe.....	88

5.4.2. Protocole.....	91
6. MODÉLISATION MOLÉCULAIRE.....	92
6.1. MECANIQUE QUANTIQUE	92
6.2. MECANIQUE MOLECULAIRE	93
6.3. METHODES D'ANALYSE DES SURFACES D'ENERGIE POTENTIELLE.....	94
6.3.1. Optimisation de géométries.....	94
6.3.2. Dynamique moléculaire	94
6.4. SYSTEME PERIODIQUE.....	95
6.5. CHEMINEMENT DE L'ANALYSE CONFORMATIONNELLE	98
6.6. DESCRIPTEURS MOLECULAIRES	101

Tableaux

Tableau II.1.	Flavonoïdes utilisés.....	71
Tableau II.2.	Solvants utilisés.....	72
Tableau II.3.	Lavages successifs durant la filtration tangentielle des milieux réactionnels.	75
Tableau II.4.	Matrices utilisées dans le cadre de l'analyse de flavonoïdes par MALDI- TOF.....	86
Tableau II.5.	Matrices utilisées dans l'analyse MALDI-TOF.....	88
Tableau II.6.	Etude par modélisation moléculaire des flavonoïdes dans un solvant.....	97

Figures

Figure II.1.	Plateforme Chemspeed et réacteurs Chemspeed pour synthèse en parallèle ...	74
Figure II.2.	Principe du dosage de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes par piégeage du radical DPPH [•]	91
Figure II.3.	Détermination graphique de l'IC50 (a) à partir d'une courbe de régression exponentielle (b).....	77
Figure II.4.	Détermination graphique de l'IC50 (a) à partir d'une courbe de régression logistique à 4 paramètres (b).	78
Figure II.5.	Représentation schématique de la concentration critique de recouvrement (C*) séparant les domaines dilués ($C < C^*$) et semi dilués ($C > C^*$).....	79
Figure II.6.	Représentation schématique de la séparation par exclusion stérique.....	80
Figure II.7.	Courbe d'étalonnage de PS	82
Figure II.8.	Représentation schématique de la désorption laser.....	85
Figure II.9.	Représentation schématique de l'analyseur par temps de vol en mode réflectron.....	87
Figure II.10.	Expérience menée en 2D-J-DOSY sur un mélange de sucres	89
Figure II.11.	Spectre 1H-RMN de la catéchine et des oligomères de catechine.....	90
Figure II.12.	Représentation schématique de l'angle magique	91
Figure II.13.	Conditions périodiques pour un système à 3 dimensions (a), représentation schématique du seuil de coupure sur un système à 2 dimensions (b).	95
Figure II.14.	Méthodologie de l'étude d'une molécule par modélisation moléculaire.	99

Figure II.15. Différentes représentations graphiques utilisées lors du choix des conformères d'intérêt dans le cas d'une dynamique à 600 K de la rutine dans le vide . 100

Chapitre II. Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Biocatalyseur

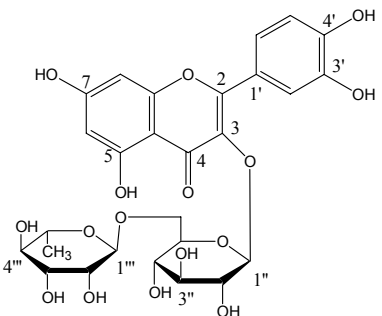
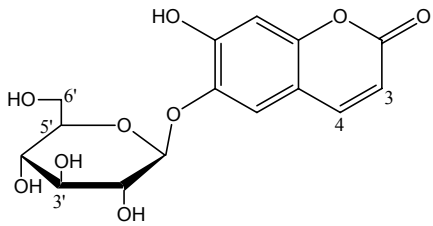
L'enzyme utilisée pour l'oligomérisation est la laccase de *Trametes versicolor* (1.10.3.2.) ayant une activité de 21,4 U/mg. L'unité correspond à la quantité d'enzymes convertissant 1 μmol de catéchol par minute à pH 4.5 et à 25 °C.

1.2. Réactifs

1.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes étudiés (Tableau II.1.) proviennent de 2 familles différentes : flavonols et coumarines.

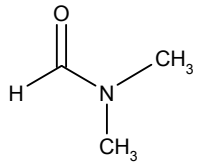
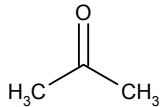

Tableau II.1. Flavonoïdes utilisés.

Flavonoïde, Masse Molaire (g/mol), Fournisseur, Pureté	
Flavonol	Coumarine
Rutine (3-rutinoside quercétine) (MM 610.5) (Sigma, >95%)	Esculine sesquihydrate (6- β -D-glucopyranoside esculétine) (MM 367.61) (Fluka, >98%)
	

1.2.2. Solvants

Les solvants utilisés lors de ce travail sont de qualité CLHP (Tableau II.2).

Tableau II.2. Solvants utilisés.

Solvant, abréviation, Masse Molaire (g/mol), Densité, Fournisseur	μ (D)	Constante diélectrique (ϵ) (F/m)	Log P	Structure
Méthanol, MM 32.4, d 0.79, VWR	1.71	32.7	-0.82	CH ₃ OH
Acétonitrile (ACN), MM 41.05, d 0.786, SDS	3.45	37.5	-0.34	CH ₃ CN
Diméthylformamide (DMF), MM 73.10, d 0.944 BDH	3.87	37.0	-1.01	
Ethanol, MM 46.07, d 0.803, Riedel-de Haën	1.74	24.5	-0.32	CH ₃ CH ₂ OH
Acétone, MM 58.081, d 0.790, Carlo Erba	2.86	20.7	-0.24	
Tétrahydrofurane (THF), MM 72.11, d 0.889, VWR	1.75	7.58	0.49	

1.2.3. Solutions tampons

Les solutions tampons utilisées pour les milieux réactionnels ont été préparées avec des sels d'ammonium afin d'éviter les interférences d'ionisation lors de l'analyse par MALDI-TOF. Les différentes solutions tampons utilisées sont :

- tampon phosphate d'ammonium, pH 7, 10 mM
- tampon phosphate d'ammonium, pH 5, 10 mM
- tampon citrate d'ammonium, pH 4, 10 mM

Ces solutions ont été ajustées au pH désiré par ajout d'une solution de H_3PO_4 . Le pH de la solution finale a été vérifié au pH-mètre avec une erreur de 0.1 unité pH.

Dans le cadre du suivi de l'inhibition de la xanthine oxidase, du tampon phosphate à pH 7.5, 50 mM a été préparé à partir d'une solution de phosphate monosodique à 0.2 M et d'une solution de phosphate de sodium dibasique 0.2 M.

2. Conduite de l'oligomérisation

Les réactions d'oligomérisation ont été menées sur une plateforme automatisée ASW2000 (Chemspeed Ltd). Cette installation est équipée d'un bloc de 8 réacteurs (27 ml) (Figure II.1.). L'installation est totalement automatisée et permet de mener plusieurs synthèses en parallèle. La température, l'agitation par vortex ainsi que l'atmosphère sont contrôlées. Le protocole général suivi se décompose en plusieurs étapes :

- ajout manuel du substrat sous forme de poudre dans chaque réacteur (3 g/l final)
- ajout automatique de 7 ml d'eau ou de tampon et de 3 ml de solvant
- mise sous agitation de l'ensemble à 600 rpm, 20 °C
- déclenchement de la réaction par ajout de la solution enzymatique (3 U/ml final)
- prélèvement et dilution automatiques dans 9 volumes de DMF, 1% LiBr
- injection automatique de la solution diluée sur la colonne de chromatographie d'exclusion de taille (SEC)
- prélèvements et injections réguliers pendant 72 h

En parallèle de l'étude cinétique par SEC-UV, un protocole de dépôt automatique sur cible MALDI a été mis au point. Celui-ci sera détaillé ultérieurement dans la partie Résultats portant sur la mise point des techniques analytiques.

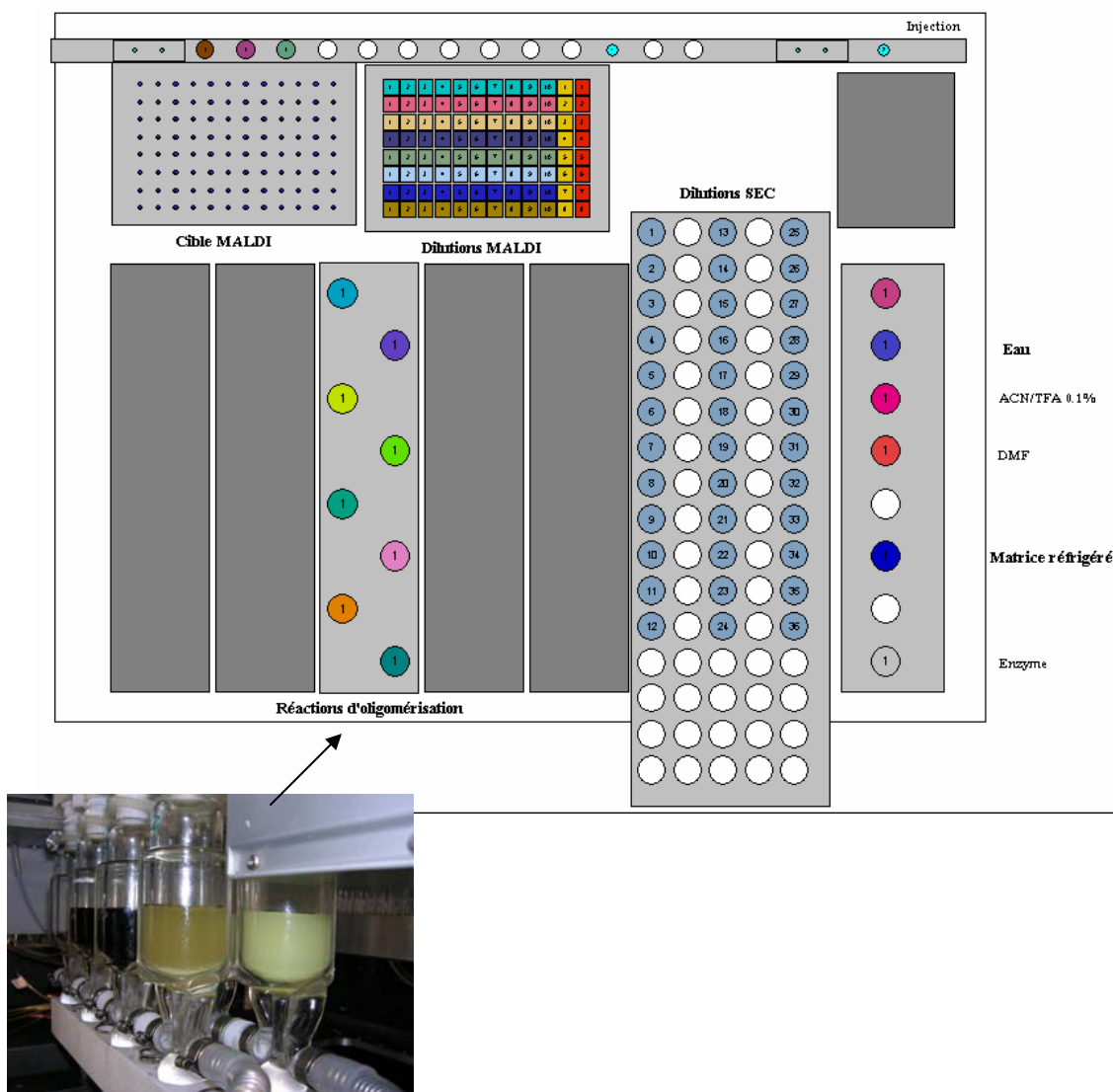


Figure II.1. Plateforme Chemspeed et réacteurs Chemspeed pour synthèse en parallèle

3. Séparation des oligomères par filtration tangentielle

La filtration tangentielle est une technique qui met en oeuvre une membrane, considérée comme une barrière poreuse et sélective, permettant de traiter un fluide brut en vue de le purifier. Contrairement à la filtration frontale, le sens de circulation du fluide n'est pas perpendiculaire au média filtrant, mais parallèle à la membrane filtrante. Ce flux tangentiel permet de minimiser les phénomènes de dépôt et de colmatage. Après filtration, un rétentat et un perméat sont recueillis.

Protocole :

2 l de milieu réactionnel ont été récupérés à la fin de la réaction et filtrés sur différentes membranes de 50, 8, 5 et 3 KDa successivement. Dans le cas de l'oligomérisation de l'esculine, une filtration supplémentaire est effectuée sur une membrane de 1 KDa. Au cours de la filtration plusieurs volumes d'eau ou de méthanol sont ajoutés au rétentat pour lessiver les molécules capables de traverser la membrane (Tableau II.3.).

Tableau II.3. Lavages successifs durant la filtration tangentielle des milieux réactionnels.

Porosité membranaire	Milieux réactionnels					
	Oligorutine			Oligoesculine		
	Volume ajouté (ml)	Volume rétentat (ml)	Volume perméat (ml)	Volume ajouté (ml)	Volume rétentat (ml)	Volume perméat (ml)
50 KDa	0	100	1800	300 ml de méthanol	500	1800
8 KDa	800 ml d'eau milliQ	200	2400	800 ml d'eau milliQ	400	2200
5 KDa	400 ml d'eau milliQ	600	2000	400 ml d'eau milliQ	600	2000
3 KDa	400 ml d'eau milliQ	200	2200	400 ml d'eau milliQ	400	2000
1 KDa	—			400 ml d'eau milliQ	400	2000

Les membranes utilisées sont des membranes INSIDE CeRAMTM (TAMI industries). Ces membranes sont en ZrO₂-TiO₂ de 10 mm de diamètre. L'ensemble des rétentats et le perméat est lyophilisé afin d'être analysé. Une étape d'évaporation est effectuée avant la lyophilisation pour éliminer toute trace de solvant.

4. Etude des propriétés physico-chimique et biologiques des flavonoïdes et de leurs oligomères

L'ensemble des propriétés des oligomères a été évalué à partir de poudres obtenues par lyophilisation.

Les régressions et lissages appliqués dans les étapes de traitement des résultats ont été établis avec le logiciel SigmaPlot version 9.0.

4.1. Etude de la solubilité

Dans un premier temps, la solubilité de la rutine, de l'esculine et de leurs oligomères a été évaluée dans l'eau à 30 °C (600 rpm). Les échantillons prélevés régulièrement durant 3 jours ont été filtrés sur 0.2 µm (afin d'analyser la fraction soluble) et analysés par SEC-UV. Les filtres, les seringues ainsi que les vials ont été maintenus à 30 °C pour éviter tout phénomène de précipitation.

Dans un second temps, selon le même protocole, la solubilité de la rutine et de l'esculine a été évaluée dans les conditions (pH, solvant, température, ...) utilisées lors de la mise en œuvre des réactions.

4.2. Activité antiradicalaire

4.2.1. Principe

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes et de leurs oligomères a été évaluée par leur capacité à piéger les radicaux DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) (Figure II.2.).

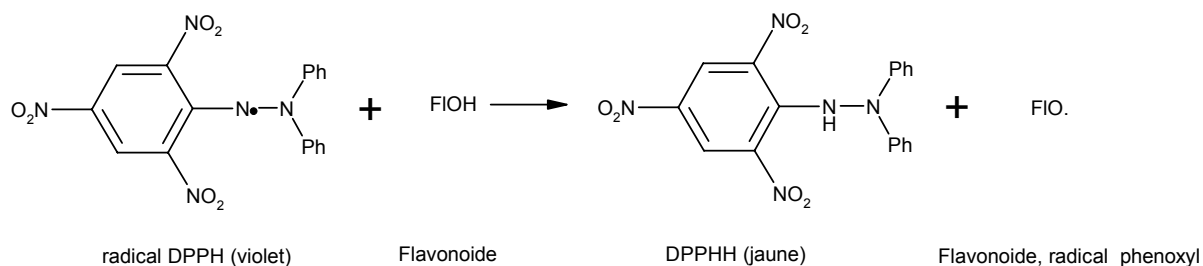


Figure II.2. Principe du dosage de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes par piégeage du radical DPPH[•].

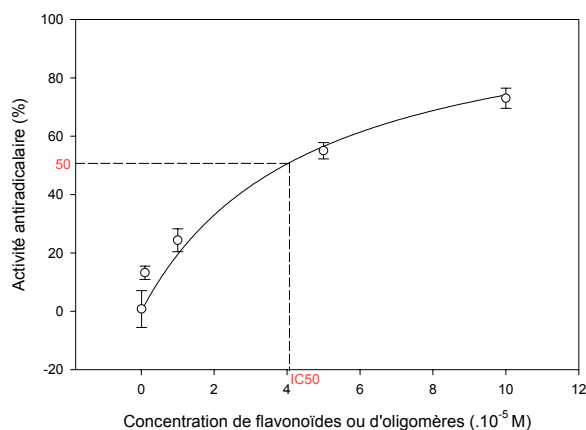
4.2.2. Protocole

Les tests ont été réalisés par ajout de 1 mL de solution contenant les oligomères ou les monomères (10^{-6} - 10^{-4} M dans du méthanol) et de 2 mL de solution de DPPH (10 mg/ml dans méthanol/eau, 80 :20, v/v) [56]. Les différentes concentrations d'oligomères ont été calculées à partir de la masse moyenne en poids du mélange d'oligomères. Le test de référence a été

réalisé avec 1 mL de méthanol et 2 mL de solution de DPPH, alors que le témoin permettant d'apprécier la coloration intrinsèque des molécules a été réalisé avec 1 mL de solution oligomérique et 2 mL de méthanol. Après 15 min, à 23 °C, les absorbances des flavonoïdes et de leurs oligomères ont été évaluées à 527 nm. L'activité antiradicalaire a été calculée à partir du pourcentage de décoloration du DPPH selon l'équation :

$$\text{activité antiradicalaire} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbance de l'échantillon} - \text{absorbance de l'oligomère}}{\text{absorbance de la référence}} \right)$$

L'activité antiradicalaire est exprimée comme la concentration permettant d'engendrer 50 % de décoloration de la solution de DPPH (IC₅₀) (Figure II.3.a). L'IC₅₀ est déterminée à partir d'une régression exponentielle à 2 paramètres (Figure II.3.b). L'ensemble des mesures a été réalisé en triple.



$$y = y_0 + a(1 - e^{-bx})$$

a)

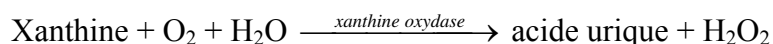
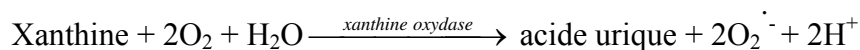
b)

Figure II.3. Détermination graphique de l'IC₅₀ (a) à partir d'une courbe de régression exponentielle (b)

4.3. Activité d'inhibition de la xanthine oxydase

4.3.1. Principe

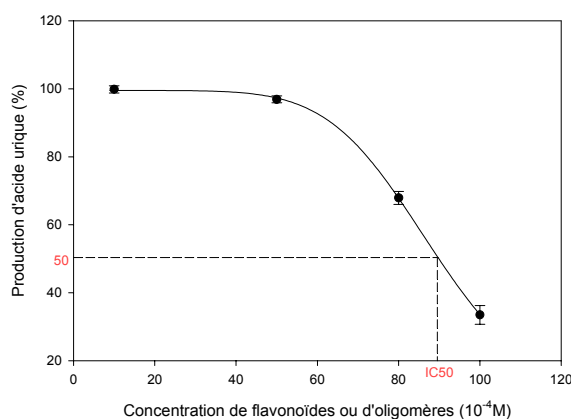
L'étude de l'inhibition de la xanthine oxydase consiste à suivre la production d'acide urique à 295 nm :



4.3.2. Matériels et protocole

Ce test d'inhibition a été réalisé sur la xanthine oxydase de grade IV provenant de lait bovin (E.C. 1.17.3.2) [186].

La xanthine a été préalablement dissoute dans un volume minimal de soude 2 % et rapidement diluée dans le tampon phosphate (pH 7.5 ± 0.1 , 50 mM). La rutine et l'esculine ont été préalablement dissoutes dans une petite quantité de diméthylsulfoxyde puis aussitôt dans du tampon phosphate. Les autres solutions ont été réalisées directement dans du tampon phosphate. Les tests ont été préparés par ajout de 1600 μl de tampon, de 300 μl de flavonoïde ou d'oligomères (10^{-5} - $4 \cdot 10^{-4}$ M) et de 1000 μl de xanthine. La réaction est initiée par l'ajout de 100 μl de solution de xanthine oxydase (0.2 U/ml). L'absorbance à 295 nm est suivie pendant 6 min. 2 solutions test ont été préparées, la première ne contenant pas de flavonoïdes pour mesurer la production d'acide urique totale, la seconde ne contenant pas d'enzyme afin d'évaluer l'absorbance des flavonoïdes et de leurs oligomères à 295 nm. L'inhibition de la xanthine oxydase est exprimée comme la concentration aboutissant à la diminution de 50 % de l'activité enzymatique (Figure II.4.a). L'IC₅₀ est déterminée à partir d'une courbe de régression des données expérimentales (Figure II.4.b). L'ensemble des mesures a été réalisé et reproduit trois fois.



a)

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{Hillslope}}$$

b)

Figure II.4. Détermination graphique de l'IC₅₀ (a) à partir d'une courbe de régression logistique à 4 paramètres (b).

4.4. Etude rhéologique

4.4.1. Principe

Lorsque l'on part d'une solution diluée et que l'on augmente progressivement la concentration en polymère, il existe une concentration critique C^* à partir de laquelle intervient le recouvrement des chaînes macromoléculaires. La concentration de recouvrement géométrique, d'après De Gennes [203], peut être définie par la valeur à laquelle la concentration moyenne en segments dans la solution devient égale à la concentration des segments au sein de la chaîne isolée (Figure II.5.).

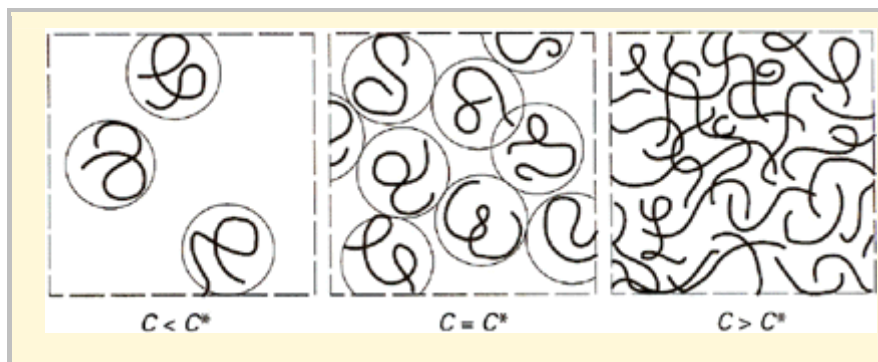


Figure II.5. Représentation schématique de la concentration critique de recouvrement (C^*) séparant les domaines dilués ($C < C^*$) et semi dilués ($C > C^*$)

4.4.2. Matériels et protocole

Afin d'analyser les caractéristiques rhéologiques des oligomères de rutine, différentes solutions à des concentrations variables ont été réalisées dans l'eau à 20 °C. L'analyse a été réalisée par un rhéomètre StressTech couplé à un bain-marie (RMS Lauda). L'ensemble des tests a été conduit avec un module plan de 40 mM de diamètre. Un couvercle a été placé au-dessus de l'échantillon pendant l'analyse afin de limiter l'évaporation. La viscosité a été mesurée pour une force appliquée comprise entre 0.05 et 10 Pa selon les concentrations en oligomères. La concentration critique a été obtenue par la représentation graphique de la viscosité au plateau pour une vitesse de cisaillement de 300 s^{-1} en fonction de la concentration en oligomères. L'ensemble des mesures a été répété trois fois.

5. Méthodes analytiques

5.1. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par SEC

5.1.1. Principe

La chromatographie par perméation gel (CPG) ou chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique chromatographique de séparation selon la masse. Cette séparation est basée sur la diminution d'entropie d'une macromolécule lorsqu'elle pénètre dans un pore de diamètre comparable à ses propres dimensions. Le nombre de conformations permises pour un polymère flexible diminue fortement à l'approche d'une paroi solide. Pour éviter ces régions de faible entropie, le polymère garde une distance de séparation entre son centre de gravité et l'interface solvant/gel qui est, en moyenne, de l'ordre du rayon hydrodynamique de la molécule. La rétention d'un soluté en SEC peut être exprimée en fonction de différentes variables : le coefficient de partage, le volume de la phase mobile et le volume des pores. Le coefficient de partage dépend de la taille relative de la macromolécule par rapport au diamètre des pores. Les molécules qui sont exclues des pores sortent les premières, alors que celles qui peuvent explorer la totalité du volume des pores sortent en même temps que le solvant (Figure II.6.).

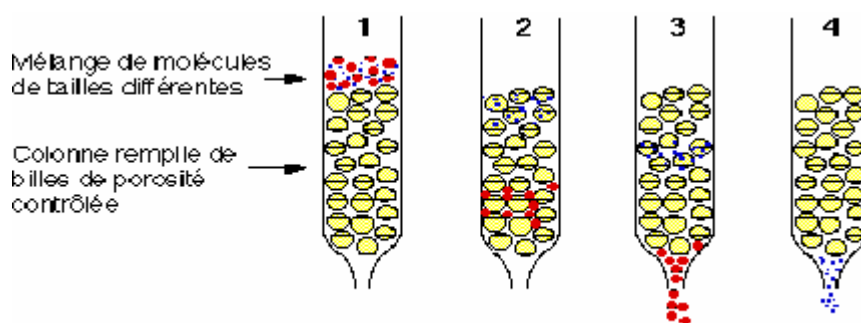


Figure II.6. Représentation schématique de la séparation par exclusion stérique

5.1.2. Matériels et protocole

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

- une colonne TSKGel α -3 000 (30x7.8 mm, 7 μ m, constitué d'une résine polyvinyle, Tosoh).

- un four de colonne (L-7350, Merck)
- une pompe (L-7100, Merck)
- un détecteur à ultraviolet (Merck).
- un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogramme EZ-Chrom®.

Les échantillons prélevés du milieu réactionnel renferment des molécules de masse différentes qui sont séparées sur SEC. La phase mobile est du DMF avec 1 % LiBr à 1 ml/min. La colonne est maintenue au sein du four à 60 °C. Ces échantillons sont prélevés automatiquement, dilués et injectés à partir de la plateforme Chemspeed. La détection des composés phénoliques se fait par UV à 280 nm.

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées pour la rutine et l'esculine. Afin de s'affranchir du chevauchement du pic du monomère et des oligomères, la hauteur du pic du monomère a été utilisée pour la gamme étalon. La masse moléculaire moyenne du mélange oligomérique a été déduite d'une gamme étalon de polystyrène (PS) (Figure II.7.), et définie selon :

$$\rightarrow \overline{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} : \text{masse moléculaire moyenne en nombre}$$

$$\rightarrow \overline{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} : \text{masse moléculaire moyenne en poids}$$

$$\rightarrow I_m = \frac{\overline{M}_w}{M_1} : \text{indice de la masse moléculaire moyenne en poids}$$

$$\rightarrow PDI = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} : \text{polydispersité } (\geq 1)$$

Où n_i représente le nombre d'oligomères ayant une masse M_i au degré de polymérisation i , et s_i la fraction massique de chaîne polymérique de degrés i .

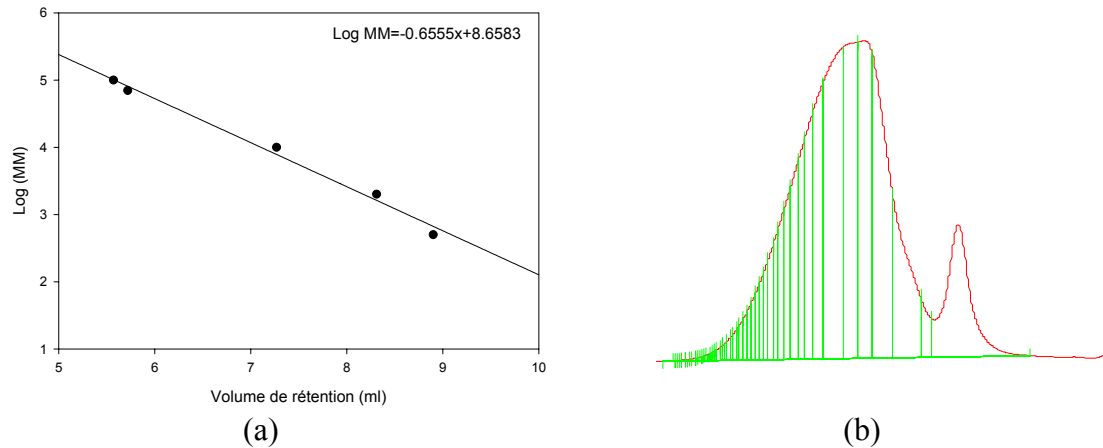


Figure II.7. Courbe d'étalonnage de PS (a) permettant le découpage du chromatogramme (b) en vue du calcul de \overline{M}_w

5.2. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par spectroscopie infrarouge

5.2.1. Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR) 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 de l'infrarouge entre $4\,000\text{ cm}^{-1}$ et 400 cm^{-1} ($2.5\text{-}25\text{ }\mu\text{m}$) 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 de l'identifier.

5.2.2. Matériels et protocole

L'analyse infrarouge a été effectuée avec un cristal à réflexion totale atténuée (ATR) sur un spectromètre à transformée de Fourier (FTIR) Tensor 27 (Bruker). Les solutions de flavonoïdes ou d'oligomères dans un le mélange méthanol/eau (30 :70, v/v) sont déposées sur le cristal ATR puis évaporées sous vide à 50 °C. Des dépôts successifs de la même solution sont effectués afin de concentrer l'échantillon. Le film obtenu est alors analysé. Les spectres sont obtenus par l'accumulation de 1024 scans avec une résolution de 2 cm⁻¹. Le traitement des spectres a consisté en une correction des bandes H₂O/CO₂, un lissage de Savitzky-Golay à 9 points et une normalisation.

5.3. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par spectrométrie de masse

5.3.1. Principe général de l'analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse d'une molécule selon son rapport masse/charge (m/z). Cette analyse consiste en trois étapes, une étape d'ionisation, une étape d'accélération et une étape de détection. Un spectromètre de masse est composé d'un système d'introduction de l'échantillon, d'une source d'ions, d'un analyseur qui séparent les ions selon leur m/z et d'un détecteur.

- *Le système d'introduction de l'échantillon* : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme liquide (infusion directe, couplage à un système chromatographique, ...) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque, ...).
- *La source d'ionisation* : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. La source d'ion peut être utilisée en mode positif ($M + H^+$) ou négatif ($M - H^-$). Si l'échantillon présente des groupements fonctionnels accepteurs d' H^+ , le mode positif est choisi (amine sur protéine ou peptides), à l'inverse si les groupements sont donneurs de protons, le mode négatif est retenu (acide carboxylique, groupements alcools sur les sucres, oligonucléotides). Plusieurs types de sources existent et sont utilisées en fonction du résultat recherché et des molécules analysées. Citons par exemple, l'ionisation électronique, l'ionisation chimique, l'ionisation chimique à pression atmosphérique

(APCI), l'électrospray (ESI) ou encore l'ionisation-desorption laser assistée par matrice (MALDI).

- *L'analyseur* : permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), citons par exemple : le quadripôle, le piège à ions ou encore le temps de vol (TOF).

Aux vues des travaux précédents abordant l'analyse de polymères de flavonoïdes (tannins, anthocyanes), nous nous sommes plus particulièrement intéressés au MALDI couplé à l'analyseur TOF.

5.3.2. Principe de l'ionisation de type MALDI

Le MALDI, pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, est une technique d'ionisation par désorption laser assistée par une matrice. Ce mode d'ionisation provoque très peu de fragmentations, et est donc bien adapté à l'analyse des macromolécules. Le composé à étudier est d'abord incorporé dans une matrice organique généralement cristallisée. Ce mélange est déposé sur un support et placé dans le spectromètre au point d'impact d'un faisceau laser pulsé. Au point d'impact, l'énergie reçue est transférée par la matrice au composé qui se trouve à la fois désorbé et ionisé de façon douce (Figure II.8.). L'ionisation ainsi que la détection sont réalisées sous un vide poussé (-10^6 à -10^8 atm). Les petites molécules ($M < 500$ Da) sont difficiles à étudier du fait de la présence des ions produits par la décomposition de la matrice. Pour ces études, d'autres supports à base de silicium poreux par exemple sont maintenant utilisés pour remplacer les matrices traditionnelles [187].

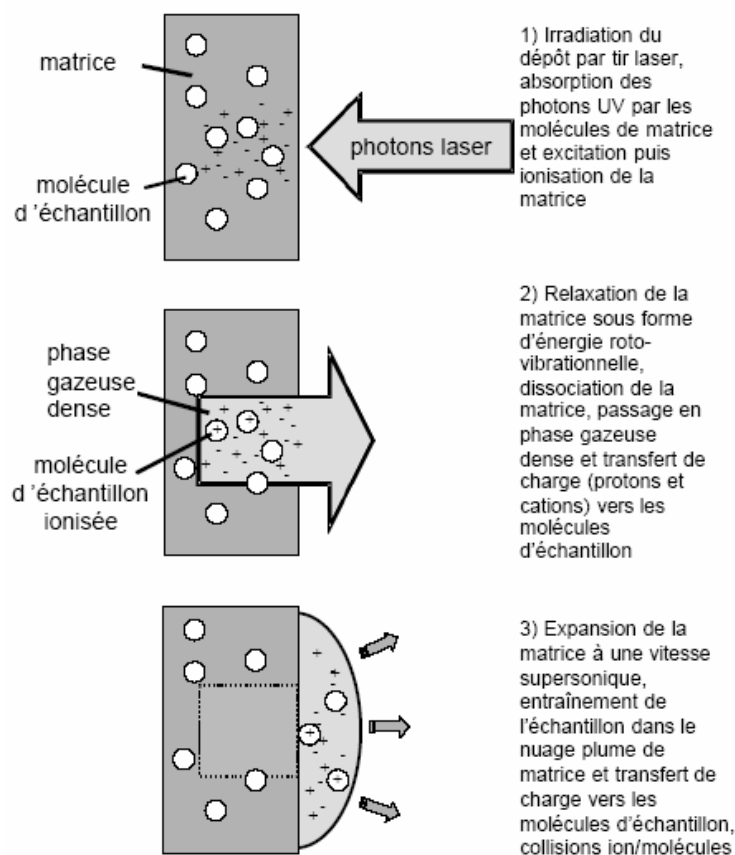


Figure II.8. Représentation schématique de la désorption laser [187].

Le succès de la méthode MALDI dépend en grande partie du choix de la matrice et de la préparation de l'échantillon. Le rôle de la matrice consiste en :

- l'incorporation de la molécule par co-cristallisation
- l'absorption de l'énergie du rayonnement
- la mise en phase gazeuse de la molécule par codésorption [188].

Différentes matrices ont été utilisées dans le cadre de l'analyse des flavonoïdes, certaines d'entre elles sont répertoriées dans le Tableau II.4..

Tableau II.4. Matrices utilisées dans le cadre de l'analyse de flavonoïdes par MALDI-TOF.

Molécules	Matrice	Mode de dépôt	Cation	Détection (ionisation)	Référence
Proanthocyanidine	DHB	Dried-droplet	Iodide de sodium	TOF (+)	[189]
Tannins	DHB	Dried-droplet	NaCl	TOF (+)	[190]
Flavonol glycosides	THAP	Dépôt matrice/séchage puis analyte	NaCl	TOF (+)	[191]
Polygalloyl polyflavan-3-ols	t-IAA	Dried-droplet		TOF (+)	[192]
Oligomères catéchiques	IAA, DHB, CCA, SA, HABA , dithranol , 9NA , 5SCA	Dried-droplet	Sel d'argent	TOF (+)	[193]
Procyanidins	IAA	Dried-droplet	Sel d'argent	TOF	[194]
Tannins	DHB	Matrice/polymère /matrice	Na ⁺	TOF (+)	[195]
Flavonol glycosides	HCCA, THAP , IDA, HABA, DHB	Dried-droplet	NaCl	TOF + ou -, le + étant favorable	[196]
Rutine	DHB	Dried-droplet	LiCl ou KCl	TOF +	[197]

HCCA: 4-hydroxy-R-cyanocinnamic acid ; THAP: 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate ; HABA: 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid ; IDA: *trans*-3-indoleacrylic acid ; DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid ; IAA: *trans*-3-indoleacrylic acid ; 9NA: 9-nitroanthracene ; 5SCA: 5-chlorosalicylic acid ; SA: sinapinic acid ; **HABA** : matrice la plus appropriée selon les auteurs

La qualité du spectre dépend de certains facteurs liés à la préparation de l'échantillon :

- la méthode de préparation des cristaux,
- la sélection et la nature de la matrice,
- la présence de tampons,
- le pH des solutions,
- les caractéristiques intrinsèques de la molécule d'analyte,
- le ou les solvants utilisés,
- la pureté de l'échantillon (présence de polymères synthétiques, plastiques, sels).

Différents modes de dépôts sont envisageables [214, 215] notamment:

- « dried droplet method » : La solution d'analyte est mélangée à la matrice en concentration beaucoup plus élevée dans le même solvant. Le ratio matrice/analyte varie de 100 à 10 000 dépendant de la chimie et de la masse du polymère. 1 µl de cette solution est placé sur la cible du MALDI puis séché.

▪ « layer » méthode, la solution de matrice à saturation ou à forte concentration est d'abord déposée sur la cible puis séchée, l'échantillon est alors déposé.

5.3.3. Principe de l'analyseur par temps de vol

L'analyse en temps de vol (TOF) est bien adaptée à la nature pulsée de la désorption MALDI. À une énergie cinétique donnée, la vitesse v d'un ion est inversement proportionnelle à la racine carrée de sa masse moléculaire :

$qV = mv^2 / 2$, d'où $v = [(2qV)/m]^{1/2}$ avec $q = ze$, z nombre de charges de l'ion, V potentiel d'accélération de l'ion, m masse moléculaire de l'ion.

Après accélération, des ions de masses différentes seront séparés, dans un tube, selon leur temps de vol. L'ensemble du tube est placé sous un vide poussé. Les ions légers sont détectés les premiers, les ions les plus lourds parviennent au détecteur après un certain délai qui dépend de leur masse.

Le mode de détection peut être linéaire ou par réflectron (Figure II.9.). Le mode linéaire permet l'analyse de haute masse moléculaire allant au-delà de 1 000 000 Da. Dans le cas du réflectron, le miroir électrostatique permet d'allonger la distance de vol sans augmenter la taille de l'instrument. Le détecteur du réflectron est placé sur le plan de focalisation des ions de même rapport m/z . Le réflectron corrige la dispersion en énergie cinétique, mais il ne corrige pas la dispersion en temps. Il permet d'augmenter la résolution, mais il est limité à des masses inférieures à 6 000 Da.

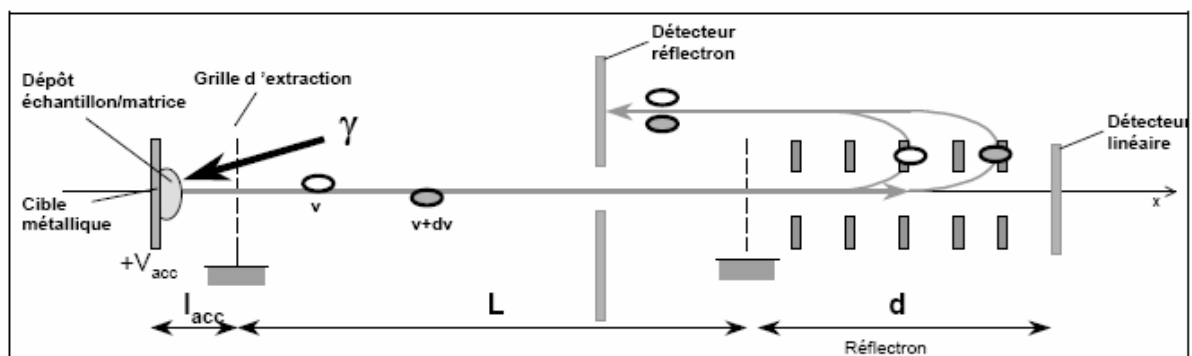


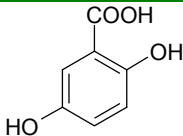
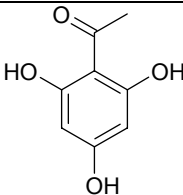
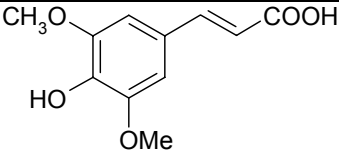
Figure II.9. Représentation schématique de l'analyseur par temps de vol en mode réflectron [187].

5.3.4. Protocole

La préparation de l'échantillon ainsi que de la matrice et le dépôt sur cible MALDI sont réalisés automatiquement sur la plateforme Chemspeed. L'ensemble de l'analyse par MALDI-TOF a été optimisé et fera l'objet d'un paragraphe ultérieur dans la partie résultats.

Au cours de cette mise au point, trois matrices ont été testées :

Tableau II.5. Matrices utilisées dans l'analyse MALDI-TOF.

Nom (abréviation)	Structure
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)	
2,4,6'-trihydroxyacetophenone (THAP)	
Acide sinapinique (SA)	

5.4. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par résonance magnétique nucléaire (RMN)

5.4.1. Principe

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique développée par Bloch et Purcell (Prix Nobel 1952). Cette technique se différencie des spectroscopies UV-visible et infra-rouge, du fait que les niveaux d'énergie entre lesquels s'effectue la transition n'existent pas en l'absence de champ magnétique. Cette technique spectroscopique est basée sur l'excitation des molécules permettant la transition entre niveaux d'énergie de spins nucléaires dans un champ magnétique (B_0).

De nos jours, la RMN est couramment utilisée pour déterminer des structures, préciser l'enchaînement des différents atomes le long de la chaîne carbonée, examiner les formes tautomères et déterminer la stéréochimie. L'analyse de mélanges présente quant à elle quelques difficultés notamment dans le cas de mélanges polymériques.

Principe de la RMN de diffusion

La spectroscopie par ordre de diffusion RMN (DOSY) est basée sur un gradient de champ pulsé appliqué au cours de l'expérimentation RMN durant laquelle les composés diffusent. Il en résulte que le signal de chaque composé décroît en fonction des différents taux de diffusion, permettant la construction de données RMN bilinéaire du mélange. Par calcul du coefficient de diffusion pour chaque composé, il est possible d'obtenir un spectre RMN à 2 dimensions : une dimension pour les déplacements chimiques conventionnels et l'autre dimension pour les coefficients de diffusion (Figure II.10.). Ce type de technique permet de séparer le spectre de différentes espèces contenues dans un mélange [198], si tant est que les molécules du mélange aient un coefficient de diffusion différent.

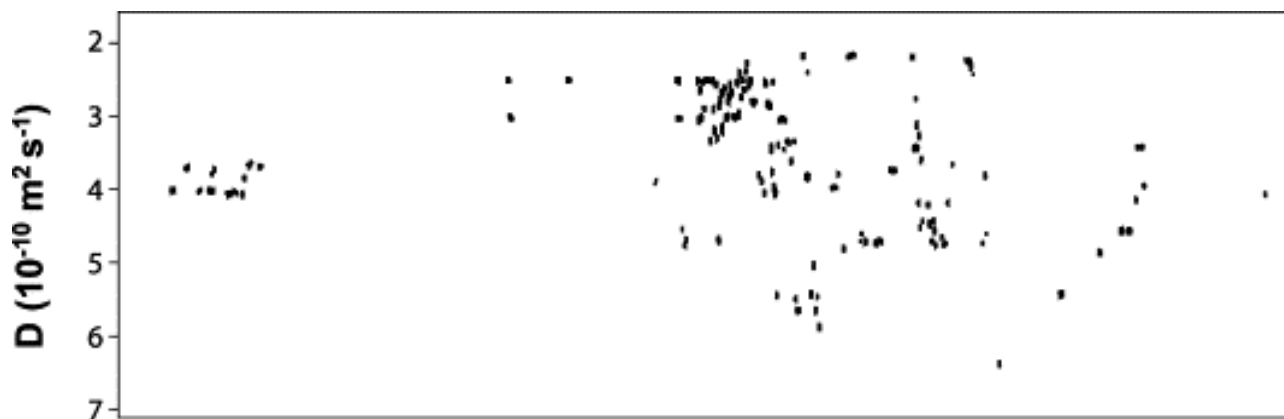


Figure II.10. Expérience menée en 2D-J-DOSY sur un mélange de sucres (sucrose/rafinose)[199].

Principe de la RMN du solide

Dans le cas d'échantillons dits « mous » comme les résines, polymères, gels, ... la haute résolution à l'angle magique (HRMAS) est utilisée. En effet, la rigidité du réseau cristallin accentue fortement l'influence sur la relaxation d'interactions d'origines diverses. De plus, les

études se font principalement sur des échantillons de poudre puisqu'il est difficile d'obtenir des monocristaux de taille suffisante ($>1 \text{ mm}^3$). Ainsi, le caractère anisotrope des interactions et la présence de cristallites aux orientations multiples génèrent des élargissements de raies de résonance (Figure II.11.).

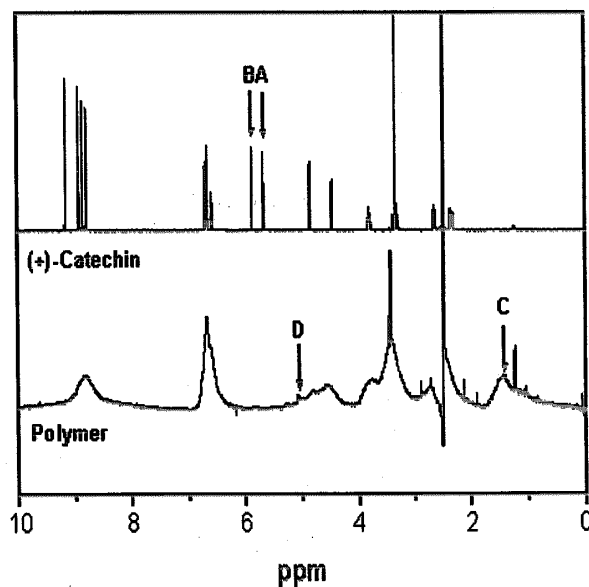


Figure II.11. Spectre ^1H -RMN de la catéchine et des oligomères de catechine [200]. Disparition des pics A et B, et apparition de 2 larges bandes D et C signent de la formation d'un pontage éther selon les auteurs.

La technique la plus utilisée, pour éliminer, ou tout du moins réduire ces élargissements consiste à mettre l'échantillon en rotation à l'angle magique (angle de 54.7° par rapport au champ magnétique statique) (Figure II.12.). Les expériences HRMAS permettent d'étudier par RMN des échantillons dont les propriétés se situent entre celles des liquides et des solides : polymères sous forme de gels, membranes, molécules synthétisées sur résines, lipides... La mobilité limitée des substances associée à leur grande hétérogénéité explique que les spectres RMN du proton obtenu en mode statique soient des spectres très larges et souvent inexploitable. Le fait de travailler à l'angle magique va moyenniser certaines interactions présentes à l'intérieur de l'échantillon (interactions dipôle-dipôle homonucléaire, anisotropie de déplacements chimiques) [201].

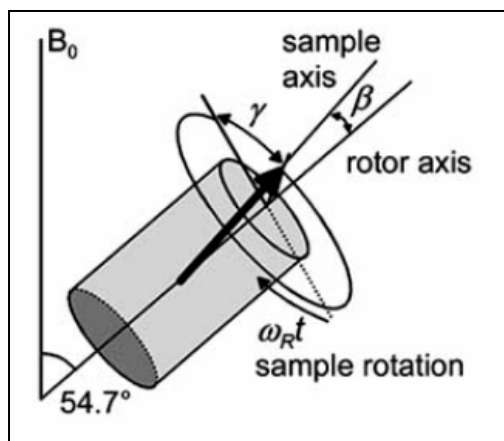


Figure II.12. Représentation schématique de l'angle magique

Principe de la détection par cryosonde

La cryosonde installée sur le spectromètre est refroidie à l'hélium liquide à 30 K par une unité cryogénique, ce qui entraîne une forte diminution du bruit de fond. Ceci permet de multiplier par 4 la sensibilité et donc de diviser par un facteur de 16 la durée des expériences sur les échantillons standard [202].

Ainsi, un spectromètre 600 MHz équipé d'une cryosonde possède la sensibilité d'un spectromètre RMN 800 MHz.

5.4.2. Protocole

Les spectres RMN ^1H ont été effectués sur les monomères et sur les oligomères sur un spectromètre à 300, 600 et 800 MHz, avec sonde classique, cryosonde et sonde HRMAS. La mise au point de la technique d'analyse par RMN fera l'objet d'un paragraphe ultérieur dans la partie résultats.

Les structures de la rutine, de l'esculine et de la dirutine ont été étudiées à partir de différents spectres :

- Spectre ^1H à une dimension
- COSY : *Correlated spectroscopy Y* : 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$, couplage scalaire
- HMQC : *Heteronuclear multiple Quantum Correlation* : 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, couplage scalaire

- ROESY : *Rotating frame Overhauser Effect spectroscopy* Y: 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ couplage dipolaire (analyse supplantant le NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) pour des molécules ayant une masse moléculaire inférieure à 1000).

Les résultats pertinents de RMN ont été analysés dans le chapitre IV. et l'ensemble des investigations menées en RMN a été placé en annexe 1.

6. Modélisation moléculaire

Dans ce travail, la modélisation moléculaire a été utilisée pour étudier la conformation et les propriétés électroniques de la rutine, de l'esculine et de leurs oligomères.

Nous présentons dans ce paragraphe l'ensemble des méthodologies suivies au cours de cette étude.

6.1. Mécanique quantique

Les méthodes quantiques lient les propriétés moléculaires et l'état solide aux interactions entre les électrons. Elles permettent d'étudier la structure électronique des molécules et par suite les états de transition et des orbitales moléculaires. Le système est décrit par une fonction multiparticulaire ψ , solution de l'équation de Schrödinger :

$$H\psi = E\psi$$

Où H est l'opérateur *hamiltonien* et E l'énergie du système.

Les algorithmes sont très précis ; cependant, l'approximation quantique présente des limitations dues au nombre d'orbital du système moléculaire étudié. Les calculs sont donc fortement dépendants de la puissance des ordinateurs utilisés. On distingue les calculs de mécanique quantique selon qu'ils sont *ab initio* ou semi-empiriques. La méthode de calcul utilisée au cours de ce travail est la méthode AM1 (Austin Model 1) développée par Dewar *et al.* [203]. Le modèle AM1 est basé sur une approche Hartee-Fock semi-empirique. A la différence d'une approche *ab initio*, où toutes les intégrales bi-électroniques sont calculées, on réalise dans une approche semi-empirique un certain nombre d'approximations de manière à réduire ce nombre d'intégrales et ainsi alléger le temps de calcul.

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 comme 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 en fonction de 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 :

$$E = \overbrace{E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dièdre}} + E_{\text{distorsion de plan}}}^{E_{\text{intramoléculaire}}} + \overbrace{E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{électrostatiques}}}^{E_{\text{intermoléculaire}}}$$

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, un potentiel électrostatique le plus souvent de type Coulombien et un potentiel de Lennard Jones.

Habituellement, on distingue dans l'équation de l'énergie du champ de force des termes intramoléculaires concernant les atomes liés chimiquement, et des termes intermoléculaires concernant les interactions entre les atomes non liés chimiquement.

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

Les champs de force diffèrent les uns des autres notamment par la fonction mathématique et les paramètres qui leurs sont associés. Le champ de force utilisé dans cette étude est le champ de force cff (*Consistent ForceField*).

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

6.3.1. Optimisation de géométries

La géométrie d'une molécule est stabilisée par un ensemble de forces exercées sur chaque atome. La mécanique moléculaire essaie de reproduire une surface d'énergie de potentiel correspondant aux mouvements de tous les atomes d'une molécule. Une minimisation d'énergie implique une computation successive et interactive d'une molécule à partir d'une conformation initiale, laquelle est soumise à une optimisation géométrique complète. Tous les paramètres définissant la géométrie du système sont systématiquement modifiés par petits incréments jusqu'à ce que l'énergie structurale moyenne atteigne un minimum local, sans pour autant atteindre le minimum global.

L'optimisation de la géométrie des molécules a été réalisée par un ensemble de 3 algorithmes : Steepest descent, gradient conjugué et enfin Newton-Raphson, implémentés dans le module Discover3 d'Insight II.

6.3.2. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une technique de modélisation par laquelle l'évolution en fonction du temps (ou trajectoire) d'une molécule est décrite par les principes de la mécanique classique newtonienne. En dynamique moléculaire, on essaie de simuler les mouvements intramoléculaires que l'on peut visualiser ensuite en temps réel.

La dynamique moléculaire consiste donc à simuler les mouvements intramoléculaires au cours du temps. Ces mouvements correspondent à des vibrations autour d'un minimum, ou au passage d'un minimum à un autre minimum d'énergie. Si l'énergie fournie virtuellement au système est suffisamment élevée, des barrières énergétiques importantes peuvent être franchies. Les champs de force utilisés sont identiques à ceux qui sont utilisés dans les méthodes de minimisation.

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.

6.4. Système périodique

Dans leur grande majorité, les études par modélisation moléculaire sont réalisées dans le vide. Cependant, il est souvent plus judicieux de se placer dans les mêmes conditions que les tests biologiques. Ces calculs permettent de comparer la stabilité relative des différentes conformations en solution et en phase gazeuse.

Différentes méthodes permettent de modéliser un solvant (Tableau II.6.):

- Une simple minimisation de la molécule en présence d'un nombre réduit de molécules de solvant permet une première évaluation des interactions soluté/solvant.
- Le solvant peut être simulé implicitement par sa constante diélectrique; ainsi, une constante de 80 pF/m sera utilisée dans le cas de l'eau. Cette approche plus rigoureuse permet de simuler la conformation la plus stable en milieu liquide sans donner des informations sur les interactions intermoléculaires.
- Enfin, une solution peut être modélisée explicitement en l'assimilant à une structure périodique, dont le motif élémentaire est une boîte contenant une molécule de soluté et n molécules de solvant (Figure II.13). Cette boîte initiale est répliquée dans toutes les directions afin de simuler un milieu infini. Si une particule quitte la boîte centrale durant la simulation, elle est immédiatement remplacée par une particule image qui rentre par le côté opposé. Les atomes images sont employés pour calculer les énergies et les forces des atomes réels dans l'unité centrale. Les énergies et les forces des atomes images ne sont pas calculées puisque leurs mouvements sont calculés comme opération de symétrie sur les vrais atomes.

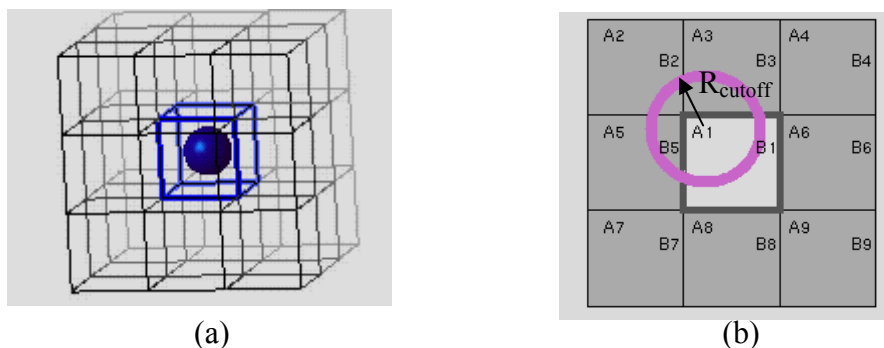


Figure II.13. Conditions périodiques pour un système à 3 dimensions (a), représentation schématique du seuil de coupure sur un système à 2 dimensions (b) [204].

Pour limiter les temps de calculs, un modèle d'image minimale est utilisé, c'est-à-dire qu'on permet à des molécules dans l'unité centrale d'interagir seulement avec la molécule ou l'image la plus proche d'elle. Un seuil de coupure (R_{cutoff}) est défini, au-delà duquel, les interactions sont considérées comme nulles.

Tableau II.6. Etude par modélisation moléculaire des flavonoïdes dans un solvant

Référence	Molécule	Modélisation moléculaire	Solvant	Observations
[170]	Quercétine, quercetine-3- monoglycoside	-minimisation par steepest-descent, constante diélectrique de 1, PBC, NPT -dynamique (AMBER8)	Couche d'eau de 9 Å	-variation de conformation dans l'eau par rapport au vide, la quercétine conserve sa conformation plane
[205]	Isoflavone, chryisine	-minimisation par steepest-descent et conjugate gradient -dynamique (cvff de Discover 972, Insight)	Boîte cubique de 30 Å, contenant 321 ou 324 molécules de méthanol	-étude de la probabilité de trouver une molécule de solvant à proximité d'un groupement -le coefficient de diffusion peut être corrélé aux nombres de liaisons hydrogène formées
[206]	Quercétine, myricetine, kaempferol, morine, apigenine, luteoline, silychristin	-l'environnement est simulé suivant une loi linéaire de Poisson implémentée dans le module Delphi (Insight)	Simulation avec une constante diélectrique de 80 (correspondant à l'eau) à l'extérieur de la protéine et de 4 dans le site actif	- la constante diélectrique influe sur le mode de présentation du substrat dans la cavité, sur la conformation ainsi que sur l'énergie de fixation lors du Docking
[19]	Flavone	-minimisation par AM1 (CS Chem3D 5.0)	2 molécules d'éthanol autour de la molécule	-la solubilité des flavones dans l'éthanol est due au nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires et non au moment dipolaire

6.5. Cheminement de l'analyse conformationnelle

L'analyse conformationnelle des différentes molécules étudiées se décompose en plusieurs étapes décrites Figure II.14..

Pour déterminer les conformères de plus basse énergie, nous avons utilisé tout d'abord la dynamique moléculaire, qui permet d'explorer de manière exhaustive l'espace conformationnel du système. 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 » (Figures II.15.) qui est une représentation en trois 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. Les structures sélectionnées sont celles représentatives d'une famille conformationnelle.

Une seconde représentation consiste à créer un graphique en 3 dimensions représentant les conformères en fonction de leur énergie totale et de l'étirement du système. L'étirement du système est évalué à partir de la distance séparant 2 extrémités de la molécule. Les structures extrêmes seront sélectionnées (Figures II.15.).

A partir des 2 représentations précédemment citées, un groupe de molécules représentatives de la dynamique moléculaire est obtenu. Après minimisation, la structure la plus stable est conservée pour les calculs ultérieurs.

L'ensemble des calculs effectués dans une boîte de solvant tient compte des conditions périodiques.

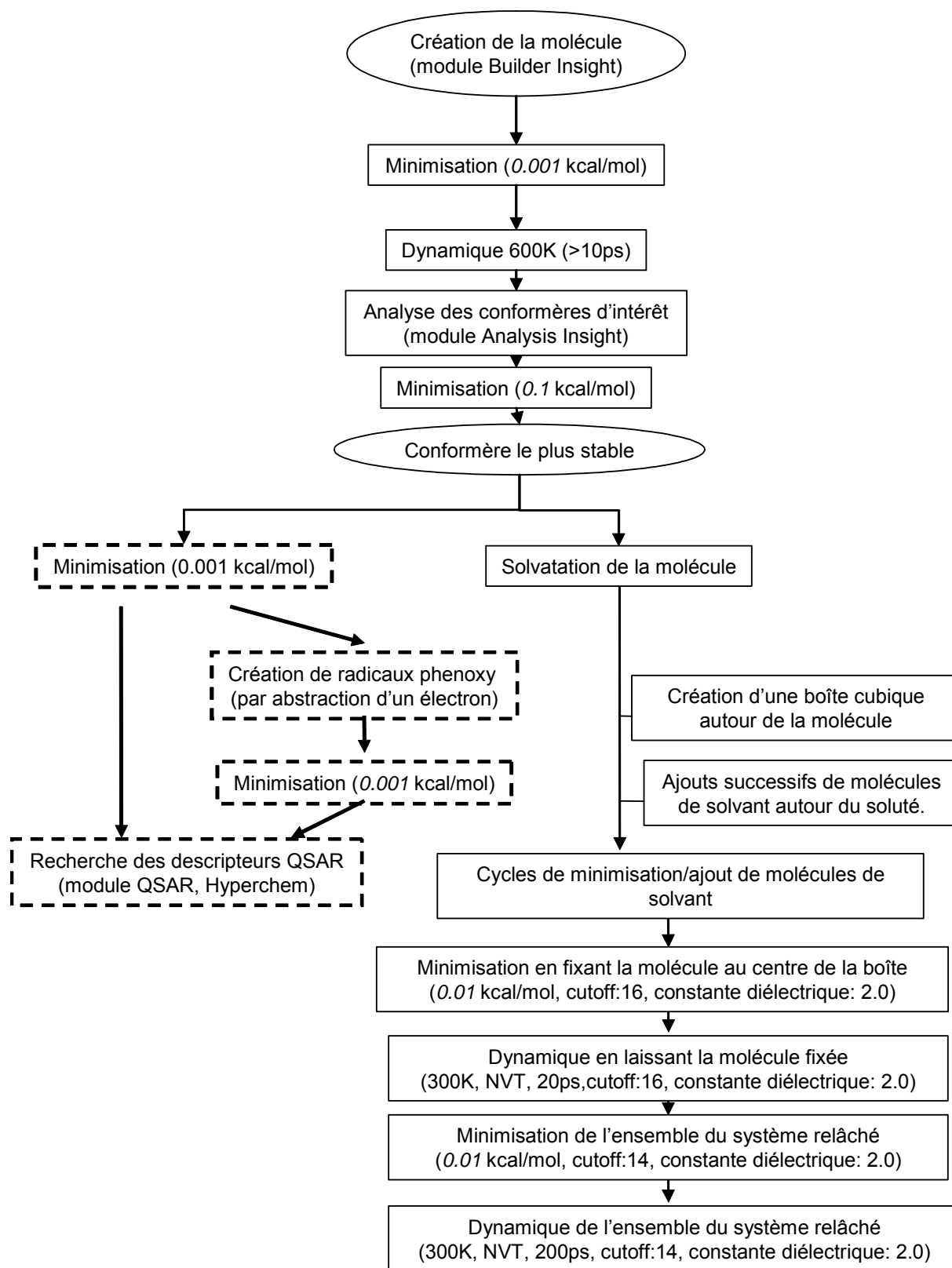
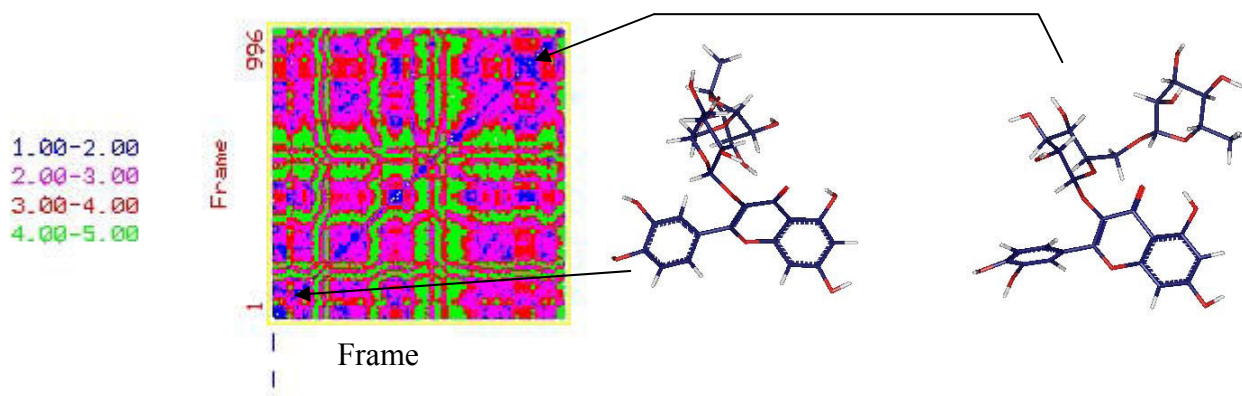
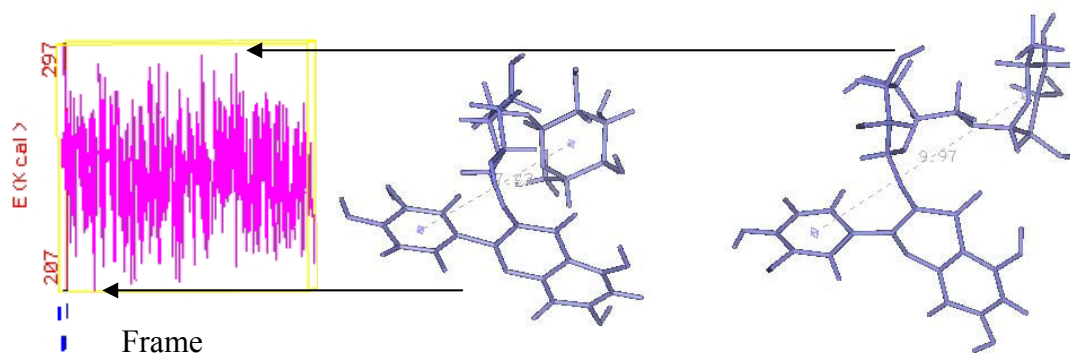


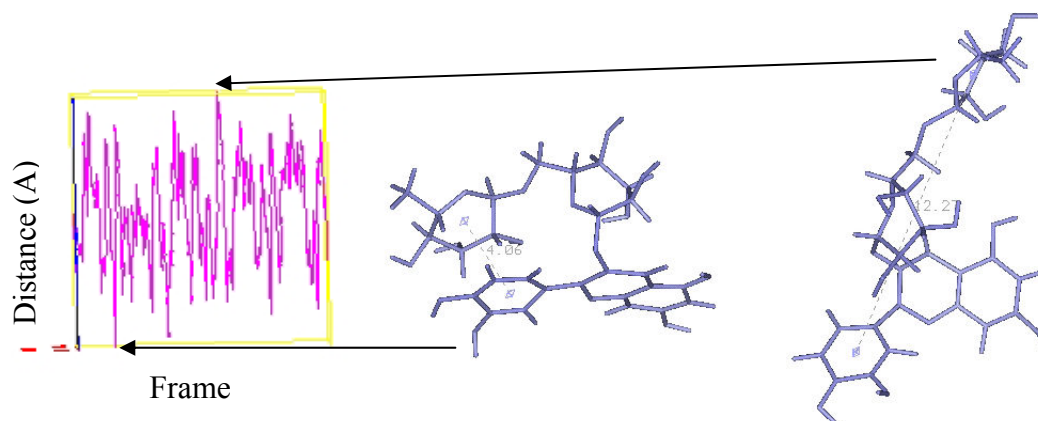
Figure II.14. Méthodologie de l'étude d'une molécule par modélisation moléculaire.
 0.01 kcal/mol : convergence atteinte lors d'une étape de minimisation
 ---- : calculs effectués par méthode semi-empirique AM1 avec un traitement Hartree-Fock non-restreint (Hyperchem ® 7.5)
 — : calculs effectués par mécanique moléculaire avec le champ de force cff (Discover3, Insight II)



a) graphique RMSD (cluster) de la rutine, représentation de 2 conformères caractéristiques chacun d'une famille conformationnelle



b) graphique de fluctuation de l'énergie totale du système au cours de la dynamique, représentation de 2 conformères de basse et de haute énergie



c) graphique de variation de la distance séparant 2 pseudo-atomes au cours de la dynamique, représentation de 2 conformères sous forme repliée (4.06 Å) et étirée (12.27 Å)

Figure II.15. Différentes représentations graphiques utilisées lors du choix des conformères d'intérêt dans le cas d'une dynamique à 600 K de la rutine dans le vide

6.6. Descripteurs moléculaires

Après optimisation des structures tridimensionnelles sur HyperChem® 7.5, des descripteurs peuvent être déterminés. Certains de ces descripteurs peuvent être corrélés aux propriétés biologiques selon la relation :

$$P = P_0 + \alpha_1 D_1 + \alpha_2 D_2 + \alpha_3 D_3 + \dots$$

où P est la propriété étudiée (variable dépendante), D_i est le descripteur (variable indépendante) et α_i mesure le poids de chaque descripteur qui entre dans la relation. On peut distinguer les descripteurs structuraux, énergétiques, électroniques, stériques et hydrophobiques.

Différents descripteurs ont été calculés au cours de cette étude, par le module QSAR de Hyperchem :

- 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) = $0.5 (-E_{HOMO} + E_{LUMO})$
- μ : moment dipolaire (D) calculé à partir des charges partielles)
- POL : polarisabilité moléculaire (a.u.) (estimée à partir d'un schéma d'additivité)
- A : aire superficielle (\AA^2) (approximé par la méthode de grille développée par Still et Coll. [207, 208])
- VOL : volume moléculaire (\AA^3) (approximée 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. [209])
- 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 de Gasteiger et Marsili [210])
- $\Delta\Delta H$ (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).

CHAPITRE III.

*MISE AU POINT DES TECHNIQUES
ANALYTIQUES*

Chapitre III. Mise au point des techniques analytiques

Introduction

Cette étude porte sur la synthèse enzymatique de polymères de rutine et d'esculine, et notamment sur les effets des conditions réactionnelles sur la masse des oligomères obtenus. Au préalable, ce travail a nécessité la mise au point d'un protocole de synthèse et des méthodes de caractérisation de ces oligomères. En effet, il a été démontré que les conditions réactionnelles (pH, température, solvant, ...) affectent la masse moléculaire et la structure des oligomères, et par conséquent les propriétés de ces composés. Les méthodes de séparation et de détection par SEC-UV et MALDI-TOF sont des techniques reconnues de caractérisation de mélanges polymériques. La SEC-UV permet la séparation des oligomères selon leur taille, la détermination de la polydispersité, de la distribution massique, de la masse moyenne ainsi que l'analyse quantitative des oligomères synthétisés. Le MALDI-TOF permet, quant à lui, la détermination des masses absolues des oligomères permettant d'aboutir à la caractérisation du mode de pontage. Ces deux techniques combinées permettent donc une bonne caractérisation de l'échantillon oligomérique. Cependant, l'analyse par MALDI-TOF nécessite la prise en compte de plusieurs facteurs qui influencent les performances de l'analyse. De plus, compte tenu de la complexité et parfois de la rapidité de certaines étapes de polymérisation, il nous est apparu utile de développer une plateforme automatisée, permettant la synthèse en parallèle dans différentes conditions et l'analyse en ligne afin d'aboutir aux grandeurs caractéristiques de cette réaction. Ainsi, l'objectif de ce travail est la mise au point des techniques analytiques par MALDI-TOF et SEC-UV et leur couplage à une station automatisée Chemspeed pour assurer le suivi en ligne de cette réaction de polymérisation.

- Optimisation de la méthode MALDI-TOF

L'application de la spectrométrie par MALDI-TOF à nos échantillons oligomériques a nécessité l'optimisation des différents facteurs clefs de cette technique : choix et préparation de la matrice d'incorporation des échantillons, mode de détection, mode d'ionisation, mode de dépôt, solution de dilution. Tous ces facteurs ont été variés afin d'aboutir aux conditions optimales d'analyse.

- Mise en œuvre de la plateforme automatisée

Il a été nécessaire de configurer et de reprogrammer la plateforme Chemspeed afin de réaliser 8 synthèses en parallèle, les dilutions, les injections sur SEC-UV et les dépôts sur cible MALDI-TOF de manière automatique.

- Suivi cinétique

Après la mise en place de ces différents protocoles de synthèse et de caractérisation, un suivi cinétique des réactions d'oligomérisation de la rutine et de l'esculine a été réalisé d'une part par SEC-UV, d'autre part par MALDI-TOF.

- Comparaison des techniques SEC-UV/MALDI-TOF

Ces deux techniques aboutissant à la caractérisation massique du mélange oligomérique, une étude comparative a été réalisée, afin de cerner les atouts et les limites de chacune.

Cette partie fait l'objet d'un projet de publication intitulé « An automated platform for rutin and esculin oligomers syntheses: online preparation and SEC-UV, MALDI-TOF analysis ».

An automated platform for rutin and esculin oligomers syntheses: online preparation and SEC-UV, MALDI-TOF analysis

Julie Anthoni^a, Frederic Lionneton^b, Jacques Magdalou^b, Jean-Marc Engasser^a, Catherine Humeau^a, Mohamed Ghoul^{a*}

^aLaboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre les Nancy, France

^bLaboratoire de Pharmacologie UMR7561 CNRS-Université Henri Poincaré, Vandoeuvre les Nancy, France

* author for correspondence (E-mail: mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr)

Abstract

An automated platform containing 8 parallel reactors, coupled with SEC-UV and MALDI-TOF analysis was developed. The conditions of MALDI-TOF analysis were adapted to the characterization rutin and esculin oligomers. The best conditions of use of this technique requires the 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) as matrix, a proportion of 1:2 (acetonitrile/water TFA 0.1 %) as a dilution solvent, a ratio of 3:1 analyte /matrix, a positive ionization and a reflectron detection modes. The use of this platform was validated by following the kinetic of the rutin and esculin polymerization during 72 h. All steps of these reactions were carried out in an automatic way. The MALDI-TOF technique allows the detection of oligomers up to rutin hexamer and esculin nonamer, and identify a simple bridge between monomeric units. The SEC-UV allows the detection of 18-mer and 17-mer for rutin and esculin respectively.

Keywords: MALDI-TOF, SEC-UV, parallel synthesis, automated platform, oligomerization

The polymerization of phenolic species is an interesting way to generate new derivatives with new or improved properties [1-10]. However, these properties depend on operating conditions of the reaction which affect the polymerization degree and the nature of the linkage occurred between monomers. To evaluate the effect of the operating conditions on the oligomer structure, different techniques are used: osmometry [11], tonometry, cryometry, size exclusion chromatography, mass spectrometry. The last two techniques are the most used for the biopolymers characterization.

The size exclusion chromatography (SEC) is a well-known technique in the polymer field, but it needs standards with similar chemical structure to synthesized molecules. Among the mass spectrometry, the matrix assisted laser desorption ionization coupled with a time of flight detector (MALDI-TOF) was often mentioned for the structural investigation of biopolymers. This technique avoids the fragmentation phenomena observed with others mass spectrometry and ions are detected as single-charged which facilitates the spectrum identification. The TOF is adapted to a broad domain of molecular masses of polymers. However, its use for biopolymer analysis requires a judicious choice of the small organic molecules “the matrix” used to embed analyte, the mode of ionization and detection. The matrix co-crystallizes selectively with the analyte minimizing salt contamination of the obtained crystals. The spectrum quality depends of crystal preparation, nature of matrix, presence of tensio-active or buffer, pH of solutions, characteristics of analyte and solvent. The ionization could be realized in positive or negative mode. If the analyte has proton acceptor function, the positive mode is recommended whereas, if the molecule is proton donor, the negative mode is selected. In the bibliography the flavonoids are analyzed by mass spectrometry as well into negative [12, 13] and positive mode [12-15].

The detection can be carried out under linear or reflectron modes. The reflectron mode allows an increase in the time of the flight without increasing the size of the apparatus. The combination of increased flight length and conserved time distribution increases the resolution of the signal. But this mode is limited to masses inferior to 60 KDa. For the high-molecular mass the linear mode is more adapted. Nevertheless, to investigate the whole domain of masses, these two detection modes could be combined.

The solvent proportion is also an important factor, it allows accelerating or slowing down the crystallization phenomena. In the same way the ratio analyte/matrix effects the crystallisation and the analyte ionization.

The objective of this work is to develop an automated platform based on the use of a Chemspeed station and a two on line detectors MALDI-TOF and SEC- HPLC. This platform will be used to evaluate the effect of the operational conditions and the nature of the used flavonoids on the properties of the synthesized oligomers. To attempt this goal, in a first step the optimized operating condition of MALDI-TOF analysis have established , in a second the coupling of the two analytical techniques to Chemspeed station was realized and finally the performance of this system was validated by the kinetic of rutin and esculin oligomerization.

Experimental section

Materials

Laccase *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.13.2., 21.4 U/mg) was purchased from Fluka and rutin (>95%) from Sigma. All solvents were HPLC grade from VWR.

Parallel synthesis of oligorutin

To synthesized and analyzed oligoflavonoids, a Chemspeed ASW2000 (Chemspeed Ltd, August, Switzerland) platform has been used. The rutin or esculin powders (final concentration 3 g/l) have been introduced in 8 parallel thermostated vessels of 27 ml total volume. All the later operations have been automatically realized. Methanol and water have been added in each vessel (final volume 10 ml at the ratio 30:70, v/v). The reaction has been started by adding the enzymatic solution of laccase (final concentration 3 U/ml). The system has been stirred at 600 rpm. To follow the kinetic of oligomerization, DMF has been transferred to the SEC dilution zone. Reaction media samples have been added to the DMF (final ratio DMF/reaction media, 9:1, v/v). The diluted solutions have been stirred then injected on line on the SEC-UV system. To avoid precipitation phenomenon, the SEC dilution zone has been also kept at same temperature as the reaction. SEC analysis has allowed the determination of weight average masses.

To determinate the absolute masses of rutin oligomers, samples have been automatically diluted two fold in Acetonitril/Water with 0.1% Trifluoroacidic acid (30:70, v/v) on the MALDI-TOF dilution zone. Homogenization has been realised by a repetitive (3 times) suction/pouring. For the spotting, a needle with 0.4 mm diameter has been used in combination with a Bruker MTP 384 massive MALDI target. A special support has been created to adapt this target on the Chemspeed platform. 3 µl of the diluted solutions have been spotted on-line then 1 µl of the refrigerated matrix solution to ovoid rapid degradation of

DHB) has been dropped on the surface of the analyte. The spots have been let for crystallization at room temperature. The positions of the samples on the MALDI target have been located with xyz coordinates and programmed using the synthesizer software. All samples have been automatically spotted in triplicate.

SEC analysis

Relative masses of oligomers have been evaluated by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom (Merck), UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSK Gel α 3000 column, 60 °C). DMF with 1% LiBr has been used as the mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. Polystyrene standards have been used to define molecular mass calibration.

MALDI-TOF analysis:

Absolute masses have been determined by MALDI-TOF. Three matrices have been tested: synapinic acid (SA), 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB).

MALDI-TOF-MS experiments have been performed on an Ultraflex spectrometer (Bruker) in reflectron mode. Ionization has been performed with 337 nm pulsed nitrogen laser. After time delayed extract, ionic species have been accelerated under 20 kV potential for TOF mass spectrometry analysis. All spectra have been obtained in positive ion mode with an accumulation of at least 600 shots. Spectra have been calibrated with statistic calibration of FlexAnalysis software (Bruker). The resolution is defined by the peak width at the half-height.

Results – Discussion

The MALDI-TOF is a very powerful analytical tool for the investigation of polymers. This technique led to the determination of the mode of linkage and the mass distribution. However, its use for a given substrate needs the optimisation of several factors affecting the amplitude and the reproducibility of the spectrum signal. So, in a first step the effect of different parameters on MALDI-TOF analysis was investigated.

1. The matrix and detection mode

To determinate the absolute mass of oligomers and so, the linkage between two units of rutin, three parameters have been varied off-line to optimize MALDI-TOF protocol: the

matrix, the ionisation mode and the detection mode. In this work, to limit the pH influence, the analyte is diluted in solution of acetonitril/water containing 0.1 % of TFA.

For a given polymer the choice of the matrix is crucial, some matrices are particularly sensitive to impurities whereas for other the loss of efficiency is small, and hence such matrices are preferred when salts are available in the medium. The ideal matrix should have a high electronic absorption at the employed laser wavelength, good vacuum stability, low vapor pressure, good solubility in solvent and good miscibility with analyte in solid state. To select the most adapted matrix to rutin and esculin oligomers analysis, three matrices have been tested: DHB, SA and THAP. Various alternatives of preparation of these matrices were formulated (Table 1).

Table 1: Mode of preparation of matrix used in MALDI-TOF analysis

Matrix	Designation	Concentration of matrix	Solvent	Reference
DHB	DHB1	5 mg/ml	ACN/water+TFA 0.1% (1:2, v/v)	[16]
	DHB2	20 mg/ml	ACN/water+TFA 0.1% (1:2, v/v)	
SA	SA1	1 mg/ml	ACN/water+TFA 0.1% (9:1, v/v)	[17]
	SA2	Step 1: saturated Step 2: 0.1 %	Step 1: ACN Step 2: final ratio ACN/water+TFA of 1:2 v/v	
THAP	THAP1	10 mg/ml	ACN/ammonium citrate (100 mM, 1:1, v/v)	[18, 19]
	THAP2	Saturated	Acetone	[13]

DHB: dihydroxybenzoic acid; SA: sinapinic acid; THAP: trihydroxyacetophenone; ACN: acetonitrile.

Different criteria have been considered to determine the most appropriate conditions: the resolution, the quality of the crystallization and the peaks intensity.

The obtained results showed that for all tested matrices and alternatives of preparation only DHB1 and DHB2 in linear and reflectron modes and THAP2 in reflectron mode led to exploitable spectra. The corresponding data are given figure 1. Whatever the matrix used, the positive and the negative mode of ionization leads to similar results.

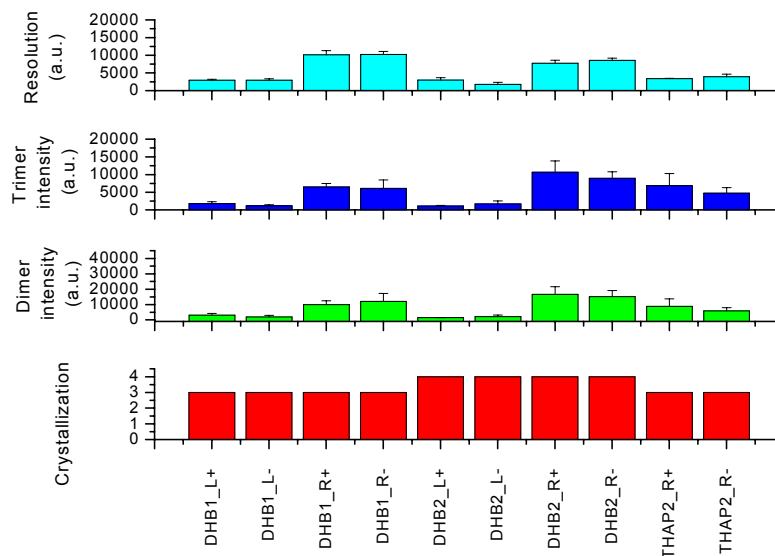


Figure 1: Impact of type of matrix, mode of ionization and mode of detection on crystallization, dimer and trimer intensity and resolution for the MALDI-TOF analysis of oligomers of rutin. Three matrix tested: dihydroxybenzoic acid (DHB), trihydroxyacetophenone (THAP), in linear (L) or reflectron (R) mode in positive (+) or negative (-) ionization. A ratio analyte/matrix of 3/1 is applied.

DHB matrix allows a best resolution compared to THAP2. While DHB2 matrix has the best crystallization and DHB1 has a better resolution. For DHB matrix, higher intensity of dimer or trimer and an enhanced resolution is obtained with the reflectron mode. So, with the sight of these results the effects of the other factors were analyzed in the presence of DHB1 in positive mode of ionization and in reflectron mode of detection.

2. Developing of SEC and MALDI-TOF on-line analysis

MALDI-TOF and SEC analysis can be used to find the optimal reaction factors such optimal temperature, pH, ratio of solvent or reactant concentration for the production of oligomers with a given properties. However the analysis must be fast. Thus, the analysis off line is not adapted for these optimizations. To accelerate the analysis by MALDI-TOF and SEC-HPLC, these two techniques were coupled with Chemspeed platform (Figure 2).

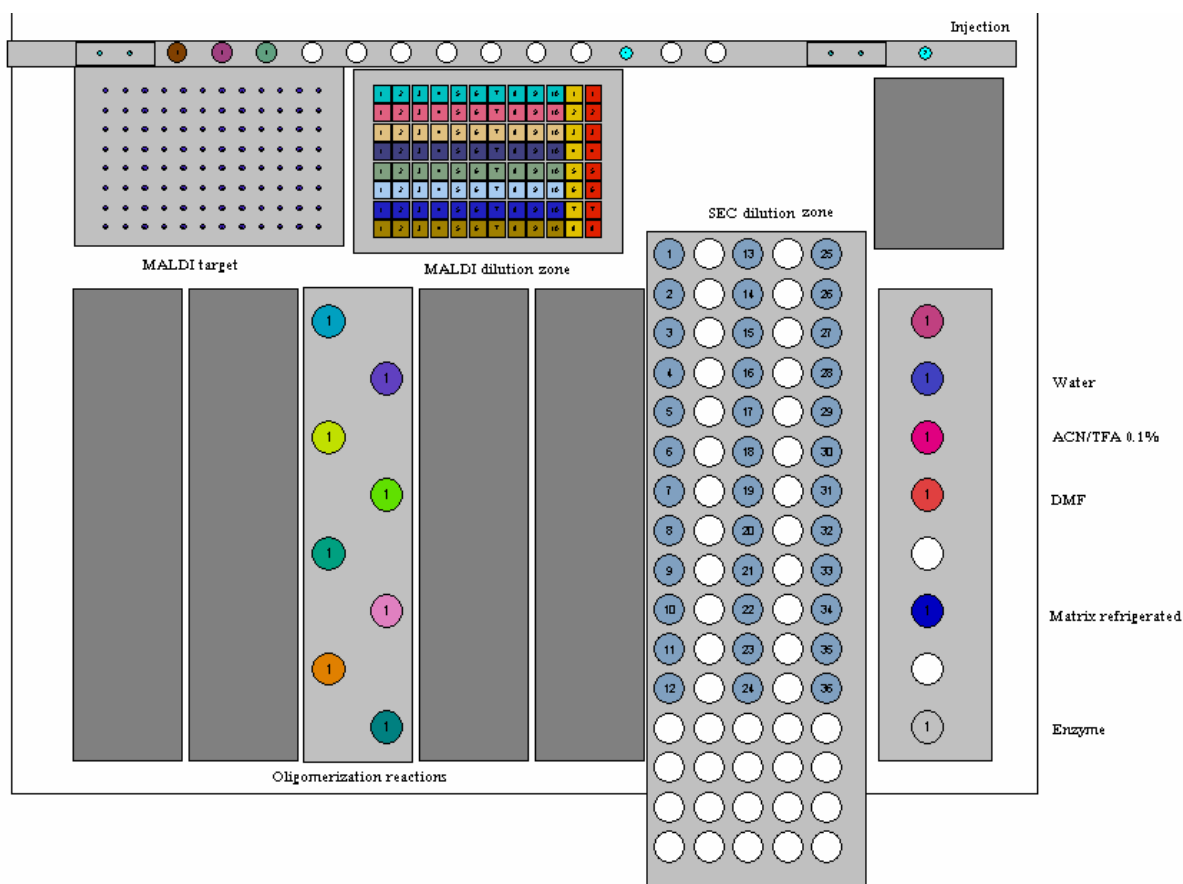


Figure 2: ASW2000 synthesizer for the oligomerization of rutin. The preparation of reaction media, SEC samples and MALDI-TOF samples was executed on-line. HPLC injections and MALDI spotting are controlled by the computing interface of the synthesizer.

This platform allows the realize 8 parallel reaction or operating conditions and to follow the kinetic of the reaction. The stirring, the temperature, the handling of sample, the dilution, the injection and the spotting were automatically controlled. The advantages of this automated method are the facility of implementation, the saving of time, the repeatability and reproducibility of data and the absence of contamination. However before being able to use this station in routine way the conditions of spotting must be optimized. In fact optimum results are obtained when the polymer and the matrix are soluble in the same solvent. So, to solubilize, at the same time, the oligomers and the matrix, a mixture of ACN/water containing 0.1 % of TFA was used. As the kinetic of the crystallisation is affected by the solvent/water ratio, three preparations (1:4, 1:2 and 1:1, v/v) were tested. The ratio analyte matrix is also an important factor to allow an optimal desorption of analyte. For this reason 3 levels analyte/matrix (3:1, 1:1 and 1:3, v/v) were studied. The obtained results are summarized in figure 3. It appears that the highest intensity of dimer or trimer is reached for a ratio analyte/matrix equal to 3/1. In such conditions, a comparable resolution is obtained with the three

proportions of the used solution of dilution ACN/water (TFA 0.1 %). However, highest crystallization and dimer intensity are obtained with a ratio of 1:2 ACN/water TFA 0.1%.

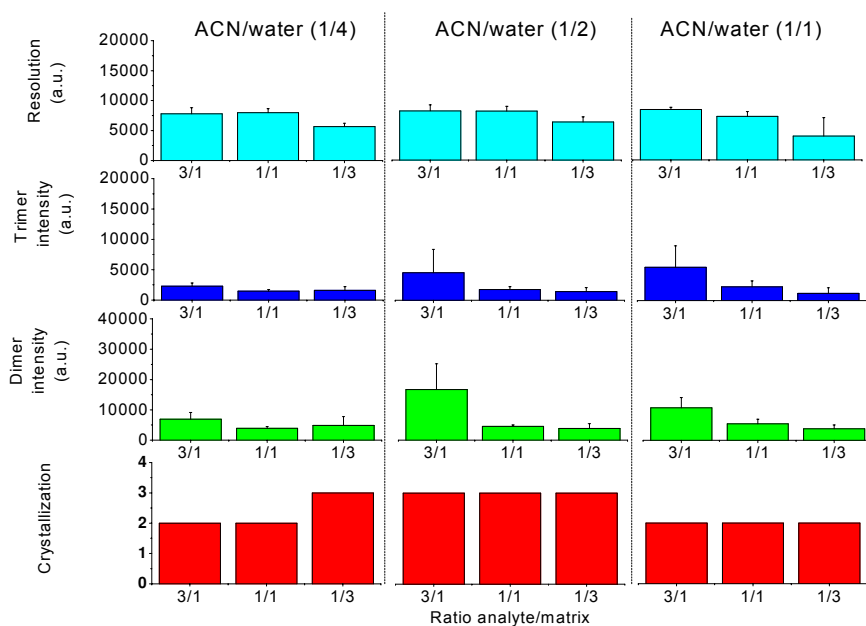


Figure 3: Impact of ratio analyte/matrix (DHB) and proportion of solvent on resolution, intensity of dimer and trimer and crystallization on MALDI-TOF analysis of media containing rutin and oligomers of rutin (positive ionization mode and reflectron mode detection).

In conclusion, DHB1 as matrix, a proportion of 1:2 (ACN/water TFA 0.1%) as a dilution solvent, a ratio of 3:1 analyte /matrix, a positive ionization mode and a reflectron detection mode were retained as optimal conditions for the use of the MALDI-TOF in the field of the characterization of the oligoflavonoids.

For SEC-HPLC coupling with the Chemspeed platform; the samples were taken under agitation and diluted in an automatic way in vials heated at same temperature to that of the reaction. This dilution was realized in a DMF-LiBr mixture. This solvent allows the instantaneous solubilisation of the flavonoids and the synthesized oligomers. From this preparation 20 μ l were injected via a rheodyne valve. The elution solvent was DMF LiBr at a flux rate of 1 ml/min. The all steps in this procedure are supervised by Chemspeed software.

3- Validation of the developed platform

This platform was validated by studying the reaction of the polymerization of the esculin and the rutin.

The kinetic of oligomerization of rutin and esculin has followed during 72 h of incubation by the on line sampling and analysis described previously. The SEC obtained spectra are given on figure 4 and 5.

These chromatograms show that the formed oligomers can reach 18 and 17 unities respectively for rutin and esculin.

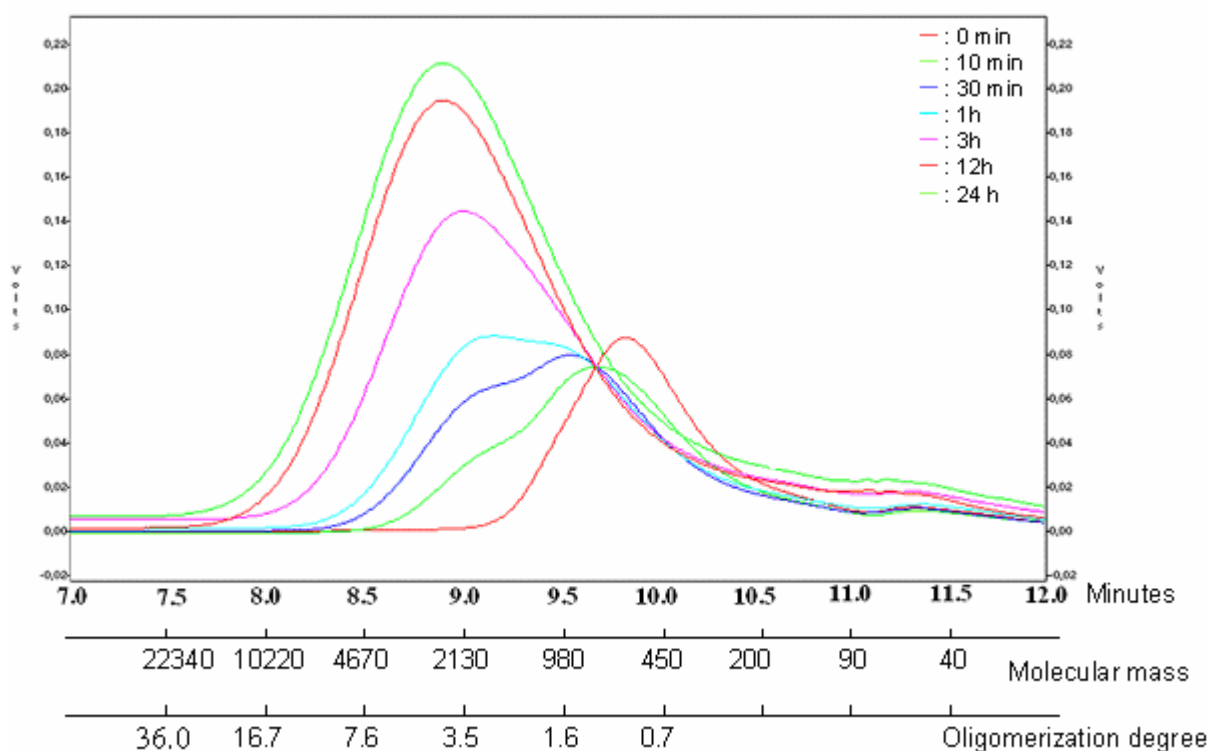


Figure 4: SEC chromatogram of rutin oligomers at different time of reaction, and molecular mass distribution determined by polystyrene standard calibration. The reaction of oligomerization of rutin (3 g/l) is catalyzed by the laccase from *Trametes versicolor* (3 U/ml) at 20 °C in methanol/water media (30:70, v/v).

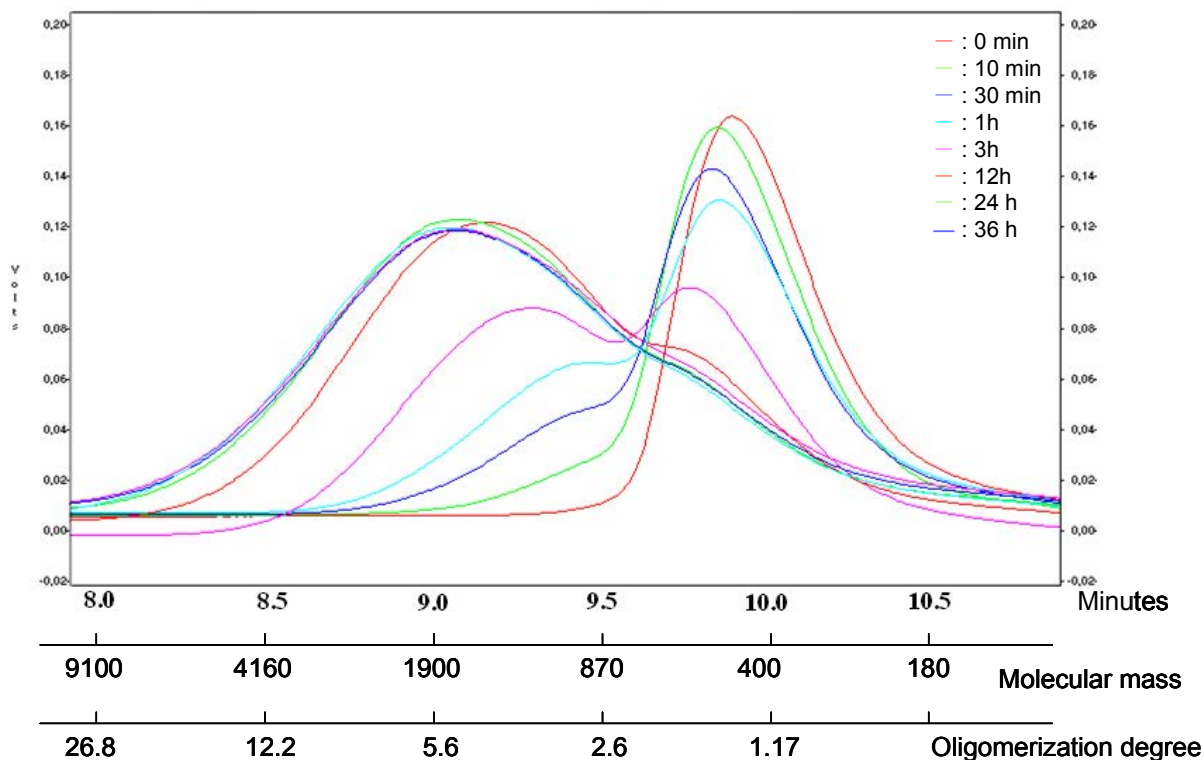


Figure 5: SEC chromatogram of esculin oligomers at different time of reaction, and molecular mass distribution determined by polystyrene standard calibration. The reaction of oligomerization of esculin (3 g/l) is catalyzed by the laccase from *Trametes versicolor* (3 U/ml) at 20 °C in methanol/water media (30:70, v/v).

The MALDI-TOF results are summarized on figures 6.

Dimer, trimer and tetramer are synthesized immediately at the beginning of the reaction, thus the enzymatic polymerization of flavonoids is not a sequential process. This technique allows the detection of oligomers up to pentamer (m: 3044.5 g/mol) and nonamer (m: 3044 g/mol) for rutin and esculin respectively (Figure 5 a and b). However the comparison of the SEC and MALDI-TOF results indicated that these two techniques lead to very different results. The molecular mass distribution is underestimated by MALDI-TOF analysis compared to SEC-UV. This behaviour could be to weak ionization of oligomers having molar masses higher than 3000 Da.

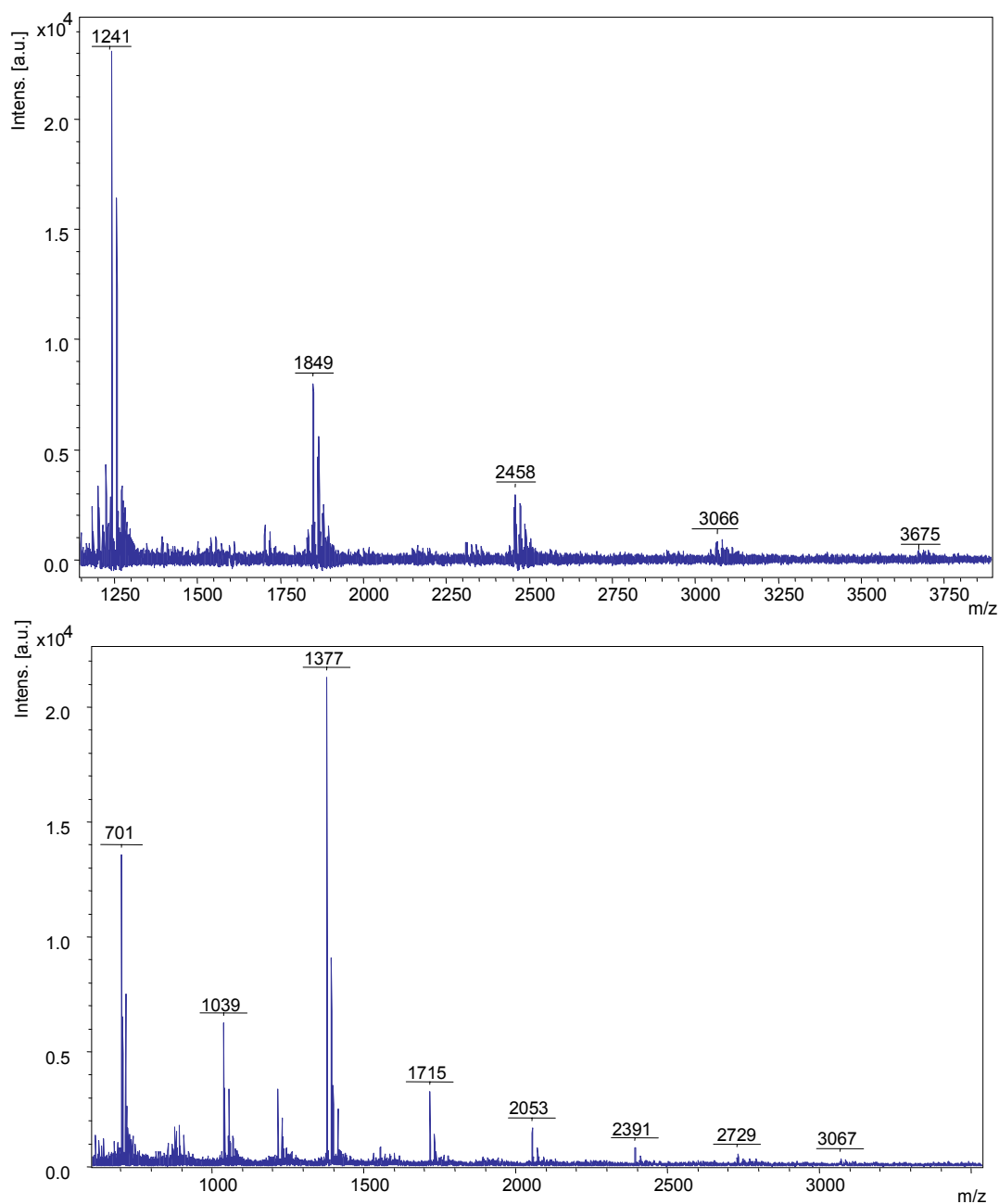


Figure 5: MALDI-TOF positive ion spectrum ($[M + Na \text{ or } K]^+$) in the reflectron mode of rutin (a) and esculin (b) oligomerization media. Dihydroxybenzoic acid was used as matrix.

Conclusion:

An automated platform allowing realising 8 parallel syntheses or operating conditions with on line sample preparation, MALDI-TOF spotting and SEC analysis SEC has developed. This platform will be used to study the effect of different factors on the kinetic and structural properties of enzymatic polymerization of flavonoids by laccase.

References

1. Akita M, Tsutsumi D, Kobayashi M, Kise H. Structural change and catalytic activity of horseradish peroxidase in oxidative polymerization of phenol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65:1581-1588.
2. Dordick JS, Marletta MA, Klibanov AM. Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotech. Bioeng.* 1987;30:31-36.
3. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromol. Biosci.* 2003;3:253-257.
4. Oguchi T, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi M. Enzymatic synthesis of soluble polyphenol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2000;73:1389-1396.
5. Uyama H, Kurioka H, Kobayashi S. Novel bienzymatic catalysis system for oxidative polymerization of phenols. *Polym. J.* 1997;29:190-192.
6. Ayyagari M, Akkara JA, Kaplan DL, Solvent-enzyme-polymer interactions in the molecular-weight control of poly(m-cresol) synthesis in nonaqueous media, in *Enzymes in polymer synthesis*, Gross R.A., Kaplan D.L., and Swift G., Editors. 1998, ACS symposium series 684: Washington. p. 112-124.
7. Bruno FF, Nagarajan S, Nagarajan R, Kumar J, Samuelson LA. Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins). *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* 2005;42:1547-1554.
8. Dubey S, Singh D, Misra RA. Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb. Technol.* 1998;23:432-437.
9. Kurisawa M, Chung JE, Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization. *Biomacromolecules* 2003;4:469-471.
10. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol. Biosci.* 2003;3:758-764.
11. Porter LJ. Number- and weight-average molecular weights for some proanthocyanidin polymers (condensed tannins). *Australian Journal of Chemistry* 1986;39:557-562.
12. Foo LY, Newman R, Waghorn G, McNabb WC, Ulyatt MJ. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. 1996;41:617-624.
13. Wang J, Sporns P. MALDI-TOF MS analysis of food flavonol glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1657-1662.
14. Ohnishi-Kameyama M, Yanagida A, Kanda T, Nagata T. Identification of Catechin Oligomers from Apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in Matrix-assisted Mass Spectrometry and Fast-atom Bombardment Mass Spectrometry. *rapid communication in mass spectrometry* 1997;11:31-36.
15. Shaikh AA, Schwarz G, Kricheldorf HR. Macrocycles 23. Odd-even effect in the cyclization of poly(ester imide)s derived from catechols. 2003;44:2221.
16. Keki S, Deak G, Zsuga M. Fragmentation study of rutin, a naturally occurring flavone glycoside cationized with different alkali metal ions, using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2001;36:1312-1316.
17. Kussmann M, Roepstorff P. Sample preparation techniques for peptides and proteins analyzed by MALDI-MS. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2000;146:405.
18. Kobayashi T, Yang X, Walker LA, Van Breemen RB, Solaro RJ. A non-equilibrium isoelectric focusing method to determine states of phosphorylation of cardiac troponin I: Identification of Ser-23 and Ser-24 as significant sites of phosphorylation by protein kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005;38:213.

19. Yang X, Wu H, Kobayashi T, Solaro RJ, Van Breemen RB. Enhanced ionization of phosphorylated peptides during MALDI TOF Mass spectrometry. *Anal Chem* 2004;76:1532-1536.

Contribution de l'article

Cet article décrit les protocoles mis en place afin de mener d'une façon automatique et en ligne la préparation, le contrôle des conditions opératoires et les analyses par MALDI-TOF et SEC-UV d'une réaction d'oligomérisation de composés phénoliques. Ce dispositif a permis l'analyse en ligne de 8 réactions en parallèle, tout en garantissant la répétabilité et la reproductibilité des manipulations et en diminuant les contraintes du manipulateur.

L'optimisation de la technique d'analyse par MALDI-TOF a montré que les conditions optimales d'analyse des oligomères de rutine sont :

- dépôt de 3 μ l d'analyte dilué 2 fois dans ACN/eau (30 :70, v/v), 0.1 % TFA, puis ajout de 1 μ l de matrice DHB à 5 mg/ml ;
- analyse en mode positif réflectron.

Cette technique a permis de mettre en évidence un simple pontage entre unités monomériques et la formation d'oligomères allant jusqu'à l'hexamère et le nonamère durant l'oligomérisation de la rutine et de l'esculine respectivement.

L'analyse SEC-UV révèle la présence d'oligomères allant jusqu'à des degrés de polymérisation de 18 dans le cas de la rutine et de 17 dans le cas de l'esculine, selon les conditions d'étalonnage employées lors de ce travail. Afin de conforter cette analyse, il serait envisageable de déterminer le coefficient d'extinction molaire des espèces oligomériques.

Cette variation selon la méthode d'analyse utilisée serait due à la nature même de ces deux techniques. La détection par MALDI-TOF aboutit aux masses absolues des oligomères, mais est dépendante de l'aptitude des molécules à être ionisées. A l'inverse, la détection par SEC-UV est une technique entropique basée sur le rayon hydrodynamique des molécules, aboutissant à des masses relatives.

La sous-estimation de la taille des oligomères obtenue par l'analyse MALDI-TOF est due en grande partie à la polydispersité du milieu réactionnel. Ainsi, un fractionnement du milieu réactionnel, après filtration sur SEC, permettrait une analyse plus « fine » des masses des oligomères par MALDI-TOF.

CHAPITRE IV.

OLIGOMÉRIISATION ENZYMATIQUE

CHAPITRE IV.1.

*OLIGOMÉRIISATION
DE LA RUTINE*

Chapitre IV.1. Oligomérisation de la rutine

Introduction

La rutine est un flavonoïde glycosylé issu du groupe des flavonols. Bien qu'ayant des propriétés antioxydantes intéressantes, la formulation de la rutine est limitée par sa faible solubilité dans les solvants aqueux et son instabilité thermique. La polymérisation est l'une des méthodes de fonctionnalisation des espèces phénoliques, qui peut être utilisée dans le cas des flavonoïdes. La polymérisation d'espèces phénoliques et notamment de flavonoïdes est susceptible de modifier leur solubilité, leur stabilité tout en maintenant ou en augmentant leurs capacités antioxydantes. Cependant, l'amplitude de ces modifications dépend des conditions opératoires et des structures des polymères générés. Ainsi, pour déterminer l'incidence des conditions de synthèse sur la cinétique, la structure et les propriétés antiradicalaires et d'inhibition de la xanthine oxydase, cette réaction a été étudiée sous différentes conditions opératoires. La laccase de *Trametes versicolor* a été utilisée comme biocatalyseur.

Les premières études parues dans la littérature ont montré que les conditions de synthèse affectent la masse moléculaire et la structure (type de liaison mis en place entre unités monomériques) des oligomères obtenus. Ainsi, afin de contrôler les propriétés des polymères de rutine, 3 axes d'études ont été entrepris :

- Effet des conditions réactionnelles :

Les propriétés des polymères varient selon leur masse moléculaire. Il apparaît donc judicieux de déterminer les conditions de mise en œuvre de cette réaction qui permettent d'obtenir des masses molaires bien définies et par conséquent des propriétés contrôlées. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude détaillée de l'effet des conditions réactionnelles (pH, température, concentration d'enzyme, concentration en substrat, type et proportion de solvant) sur la polydispersité, la masse moyenne et la production des oligomères de rutine.

- Etude structurale :

La structure des oligomères et notamment le pontage reliant deux unités monomériques influence les propriétés des polymères. Une étude de la structure des oligomères synthétisés par UV, FTIR, MALDI-TOF et H-RMN a donc été réalisée.

- Impact de la polymérisation:

Le but de la polymérisation étant d'améliorer la solubilité de la rutine tout en conservant voir en améliorant ses propriétés antioxydantes, ces deux propriétés ont été évaluées. En outre, l'impact de la masse moyenne des oligomères sur leur activité antioxydante a été déterminé.

En parallèle, de ces trois axes d'étude, une analyse par modélisation moléculaire dans le vide et dans le solvant a été entreprise afin de compléter et d'interpréter les résultats expérimentaux.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication : « Investigation of enzymatic rutin oligomerization » soumise dans Enzyme and Microbial Technology.

Investigation of enzymatic oligomerization of rutin

Julie Anthoni^a, Frederic Lionneton^b, Jean-Michel Wieruszeski^c, Jacques Magdalou^b, Jean-Marc Engasser^a, Catherine Humeau^a, Mohamed Ghoul^{a*}

^a Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, France

^b Laboratoire de Pharmacologie UMR7561 CNRS-Université Henri Poincaré,
Vandoeuvre les Nancy, France

^c Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS/USTL 8576-
Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

* author for correspondence (E-mail : mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr)

Abstract

The enzymatic polymerization of rutin catalyzed by laccase from *Trametes versicolor* was investigated under different operating conditions of temperature, pH, solvent, enzyme and substrate concentrations. The highest weight-average molecular mass (\overline{M}_w) was about 3900 g/mol. Highest masses were obtained for lowest pH and temperature set point. The production of oligomers was favored when using a cosolvent with a high dielectric constant.

MALDI-TOF analyses showed the presence of rutin oligomers with a polymerization degree up to 6, resulting from simple bridges between rutin unities. H-NMR analyses showed the presence of C-C or C-O linkages in the structure of oligomers, involving both the sugar part and the phenolic part of rutin.

Oligomers were characterized by a solubility 4200 times higher than rutin. A molecular modeling study of the hexamer indicated a dense network of H-bonds with water molecules. Fractions enriched with oligomers were obtained by tangential diafiltration. The antioxidant activity of oligomers was shown to decrease with \overline{M}_w , while the xanthine oxidase inhibitory activity increased.

Introduction

Flavonoids are a class of phenolic secondary metabolites of plant that have recently received keen attention due to their antioxidant, antimicrobial, anticarcinogenic properties. Many of these compounds are already used in pharmaceutical, cosmetic and food preparations. Unfortunately, the use of some of them is limited by their low solubility and stability in both lipophilic and aqueous media. Therefore, to improve these properties different techniques of derivatisation are suggested, among them the enzymatic polymerisation. This way allows the control of polymer structure due to the regioselectivity of the enzyme and can be conducted under mild operating conditions of temperature, pH and pressure. Different sources of enzyme are used in polymerization processes: transferases, hydrolases, lyases, isomerases, ligases and oxidoreductases (peroxidases and laccases) [1]. This latest class is the most often used [2-7]. Laccases compared to peroxidases present the advantage of using dioxygen instead of hydrogen peroxide [8] and are able to catalyze a large panel of substrates (ferrocyanidine, anilines, phenols...).

First data obtained in the case of the enzymatic polymerization of simple phenols and some flavonoids (rutin, catechin, quercetin) indicated that the polymerization of these compounds affects their solubility in the water [9-11] and their radical scavenging activity [12-15]. The magnitude of these effects depends on the degree of polymerization of the synthesized oligomers [14]. However, for flavonoids, the exact effect of the operating conditions both on the weight-average molecular mass (\overline{M}_w) of the oligomers and their biological activities is not yet clear. In the case of simple phenols and aglycone flavonoids, some authors observed that the nature of the solvent affects the molecular mass and the structure of the oligomers. Two dimeric products resulting from either C-C or C-O bonds between monomeric unities were described, depending on the nature and the ratio of the solvent. The structure of the oligomers was also influenced by the pH [16, 17]; a low pH favored the formation of C-C bridges [18]. The temperature affected only the conversion yield of the reaction [19].

Reported data concerning the antioxidant activity of flavonoid oligomers like rutin and catechin are still subject to controversy. Kurisawa *et al.* (2003) [11] observed an increase of the antioxidant power of the oligomers compared to that of rutin, while Desentis-Mendoza *et al.* (2006) [15] reported a decrease of the antioxidant activity. The xanthine oxydase

inhibitory activity, reported by Kurisawa *et al.* (2003) in the case of catechin oligomers [12, 13], increased compared to that of catechin. For rutin oligomers, no data are available concerning this activity. These contradictions could be due to the variability of oligomer structure (\overline{M}_w , PDI, C-C or C-O bridges) from one study to another.

The aims of this paper are i) to investigate the effect of temperature, pH, substrate and enzyme concentration, and solvent nature on the \overline{M}_w and the polydispersity (PDI) of rutin oligomers, ii) to identify the type and the localization of the linkage occurring during rutin oligomerization and, iii) to investigate some physical and biological properties of rutin oligomers (solubility, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities) in function of their \overline{M}_w .

Rutin oligomerization was catalyzed by the laccase of *Trametes versicolor*, under different operating conditions of temperature, pH, in several solvents. MALDI-TOF, SEC-UV, FTIR and NMR techniques were used to characterize the mass distribution and the structure of the oligomers. Rutin was chosen in this study for its known vasorelaxation [20], anti-inflammatory [21], and hepatoprotective [22] activities. Moreover, rutin is a glycosylated compound with several reactive hydroxyl groups both on sugar and phenolic parts. However, the implication of the glycosidic hydroxyl groups for oligomers synthesis has never been reported.

1. Materials and methods

Materials

Laccase from *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2, 21.4 U/mg) and dihydroxybenzoic acid (DHB, matrix for MALDI-MS) were purchased from Fluka. Rutin, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), xanthine and xanthine oxidase (E.C. 1.17.3.2, grade IV from bovine milk, 0.2 U/mg protein) were from Sigma. All chemical solvents were of HPLC grade from VWR.

Oligomerization reactions

Reactions were carried out in a Chemspeed ASW2000 automated synthesizer (Chemspeed Ltd). This platform allows automatic preparation of samples for analyzes: sampling from reaction media, dilution of samples and injection to HPLC system or spotting

on MALDI target for MS analysis. Eight reactions were simultaneously performed. Rutin was suspended in 27 ml reactor vessels in 10 ml of methanol/water, solvent/water or methanol/buffer mixture (30:70, v/v) (citrate or phosphate ammonium buffer 0.01 M at different pH \pm 0.2). Laccase solution (3 U/ml) was added to the mixture. The reactions media were stirred at 600 rpm for at least 24 h, at different temperatures (\pm 1 °C).

SEC analyzes

Relative masses of oligomers were evaluated by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom, UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSKgel α 3000 column, 60 °C). Dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr was used as the mobile phase (1 ml/min). Molecular mass calibration was obtained by using standards of polystyrene. The obtained data allowed the determination of number-average molecular mass, weight-average molecular mass, weight-average molecular mass index and polydispersity:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} : \text{number-average molecular mass}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} : \text{weight-average molecular mass}$$

$$I_M = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} : \text{weight-average molecular mass index}$$

$$PDI = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} : \text{polydispersity } (\geq 1)$$

Where n_i represents the number of molecules of oligomers having a mass of M_i at a polymerization degree of i , and w_i weight fraction of chains at a polymerization degree i . The quantity of oligomers was expressed in arbitrary units of area (a.u.). Error values were determined by three repetitions of the same reaction.

MALDI analyzes

Absolute masses were determined by MALDI-TOF technology using DHB matrix (5 mg/ml in acetonitrile/water (30:70, v/v) with 0.1 % TFA). After 24 h of reaction, samples were automatically withdrawn from reaction media and diluted two fold (acetonitrile/water (30:70, v/v) with 0.1 % TFA). Solutions (3 μ l) were spotted online on MALDI target with DHB matrix (1 μ l).

Samples analyzes were realized on MALDI-TOF Ultraflex (Bruker Daltonik) using the reflectron operating mode. All spectra were obtained in the positive ion mode and ionization was performed with a 337 nm pulsed nitrogen laser. Spectra were obtained by accumulation of at least 600 laser shots and calibrated using the statistical method of FlexAnalysis software (Bruker). All samples were spotted in triplicate.

UV analyzes

The UV spectra of rutin solutions and of reaction media containing oligomers were determined on a UV6000LP spectrometer (Spectra System, Thermofinnigan).

FTIR analyzes

IR analyzes were achieved by ATR-FT-IR spectroscopy using FT-IR spectrometer Tensor 27 (Bruker). The solutions containing oligomers were diluted with water/methanol (70:30, v/v) then deposited on the ATR unit. Solvents were evaporated under vacuum at 50 °C, to give a film which was analyzed. Spectra were obtained by the accumulation of 1024 scans, with a 2 cm⁻¹ resolution. Spectra treatment included H₂O/CO₂ correction and smoothing by Savitzky-Golay relation (9 points) and normalization.

NMR analyzes

¹H NMR analyzes of rutin and 3 KDa permeat powders was performed on a Bruker DRX 300 MHz spectrometer, at 300 K, after dissolution in DMSO-*d*₆. ¹H NMR spectra of the 4 powders of the aliquots obtained at 30 min, 1 h, 2 h and 3 h of reaction (0.2 g/l of rutin and 0.3 U/ml of laccase in methanol/water, 30:70, v/v) were recorded on a Bruker 600 MHz spectrometer with a cryoprobe at 293 K in CD₃OD/D₂O (30:70, v/v) at a concentration of 3 g/l.

A diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) NMR technique was used to aid the deconvolution of the complex system. A diffusion delay time of 100 ms was applied, in CD₃OD/D₂O (30/70, v:v). The self-diffusion coefficient is affected by the viscosity of the solvent. The mobility of the molecules can be converted into their hydrodynamic radius (R), which is more informative to determine the size of the particles and to follow the formation of aggregates through the Stokes-Einstein law expression:

$$R = \frac{k_B T}{Df\pi\eta}$$

where η is the viscosity of the solvent ($\eta_{\text{methanol}} = 0.156 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ and $\eta_{\text{water}} = 1.000 \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$), k_B the Boltzmann constant ($1.38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$), T the

temperature (293 K) and R the hydrodynamic radius of the soluble molecule, f a constant between 4 (slip) and 6 (stick) depending on the boundary conditions. Here the stick value is used.

Peaks related to rutin:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 0.99$ -5.36 (H of sugars), 6.20 (6-H), 6.39 (8-H), 6.85 ($J_{\text{H5'/H6'}} = 0.2$ Hz, 5'-H), 7.54 (2'-H), 7.55 ($J_{\text{H5'/H6'}} = 0.2$ Hz, 6'-H), 9.17 (3'-OH), 9.65 (4'-OH), 10.85 (7-OH), 12.60 (5-OH) ppm.

Peaks related to rutin oligomers:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 0.99$ -6.17 (H of sugars), 6.18 (6-H), 6.40 (8-H), 6.86 ($J_{\text{H5'/H6'}} = 0.2$ Hz, 5'-H), 7.97 ($J_{\text{H5'/H6'}} = 0.2$ Hz, 6'-H) ppm.

Antioxidant activities determination

Scavenging activity and xanthine oxidase inhibitory activity of different pools of oligomers were analyzed. Samples were prepared from reaction media after 24 h of synthesis (methanol/water, 30:70, v/v, 20 °C), by successive filtration processes: on a 50 KDa membrane to remove the enzyme, then on 8, 5 and 3 KDa membranes by a tangential diafiltration process (V/V). Then, the fractions were lyophilized. Scavenging free radical power was evaluated by the DPPH test as described by Burda and Oleszek [23]. A solution of rutin or oligomers (1 ml), at different concentrations (from 10^{-6} to 10^{-4} M, concentrations were calculated from \overline{M}_w) in methanol, was added to 2 ml of a DPPH solution (10 mg/l in methanol/water, 80:20, v/v). A reference sample was prepared by adding 1 ml of methanol in 2 ml of DPPH solution. Rutin and oligomers absorbance for each concentration was evaluated at 527 nm, after 15 min, at 23 °C. The antiradical activity was calculated as a percentage of DPPH discoloration using the following equation:

$$\text{antiradical activity} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of oligorutin}}{\text{absorbance of reference}} \right).$$

The antiradical activity of flavonoids is expressed as the final concentration that results in half-maximal DPPH discoloration (IC50) and calculated by exponential regression analysis. Each absorbance was evaluated in triplicate.

To determine the inhibition of xanthine oxidase activity the oligomeric powders were solubilized in phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM). The rutin was dissolved in a minimum of DMSO and then in buffer. Tests solutions were prepared by adding 1600 μl of buffer, 300 μl of flavonoids solution (10^{-5} – $4 \cdot 10^{-4}$ M), 1000 μl of a solution of xanthine (0.15 mM, initially

dissolved in a minimum of NaOH 2 % (w/v), then diluted in buffer) and 100 μ l of a solution of xanthine oxidase (0.2 U/ml). The reaction was monitored for 6 min at 295 nm. 2 samples were prepared, the first without flavonoids to determine the total uric acid production, and the second without enzyme to measure the absorbance of flavonoids at 290 nm for the range of concentrations. The inhibition of xanthine oxidase by flavonoids is expressed as the final concentration that results in half-maximal enzyme velocity (IC50) and calculated by standard curve regression analysis. All measurements were realized in triplicate.

Solubility and rheological characterization

The solubility of rutin oligomers was evaluated at 30 °C in water while the solubility of rutin was determined for all operating conditions of the reaction.

To obtain a rheological characterization of the oligomers, a reaction medium (methanol/water, 30:70, v/v, 24 h of reaction) was lyophilized and analyzed. Several samples of oligomers were prepared at different concentrations in water and analyzed at 20 °C on a StressTech rheometer coupled with a RMS Lauda temperature controller. All tests were conducted with 40 mm diameter parallel-plate geometry at 20 °C. A solvent trap was used during measurement to limit evaporation. Viscosity was then measured at shear stress ranging from 0.05 to 10 Pa, according to the concentrations. The overlap concentration was obtained by the representation of the viscosity at the plateau for a shear rate of 300 s^{-1} depending on oligomer concentration. All measures were realized in triplicate.

Molecular modeling analyzes

The molecular dynamic (MD) simulations were performed with Insight II (msi) programs, on an O2 SGI workstation, employing the force-field cff, on Discover3. The first step was a minimization in vacuum by using a steepest descent, a conjugate gradient descent and a Newton-Raphson algorithm until the energy gradient was smaller than 0.1 kcal/(mol.Å). A dielectric constant $\epsilon = 2.0$ F/m was used in all minimizations. The second step is a molecular dynamic simulation to explore the conformational space of rutin and its oligomers. The dynamics run for 10 ps, at 600 K. The lowest-energy conformation was minimized with a convergence of 0.1 kcal/(mol. Å). This conformation was selected for molecular modeling in solvent and for enthalpic study.

Enthalpic study was carried out using the semiempirical AM1 method, with HyperChem software. Optimization was performed with conjugated gradient (algorithm Polak-Ribiere) with a self consistent field (SCF) of 0.001 kcal/mol in vacuum. The bond

dissociation energy (BDE) was calculated as the energy of the radical resulting from the abstraction of one hydrogen minus the energy of the neutral molecule. The most stable radicals localized either on oxygen or a carbon atom were obtained by the abstraction of the hydrogen atom of the 4'-OH, and the hydrogen atom of the 6'-CH.

Molecular modeling in water was performed in a cubic cell with periodic boundary conditions. NVT molecular dynamic was carried out in a box of 40.0 Å side length containing 1294 water molecules plus one molecule of rutin with a cutoff of 14.0 Å and a dielectric constant of 2.0, at 300 K. The MD simulations run for 200 ps. For the simulation of the hexamer of rutin, the same conditions were used, with a cubic cell of 50.0 Å side length containing 1679 water molecules. Successive and short minimization/dynamic procedures were applied with a convergence of 0.001 kcal/(mol. Å) and a run duration of 8 ps.

3. Results and discussion

To investigate the kinetic of the enzymatic polymerization of rutin catalyzed by the laccase, two reactions, with and without addition of the enzyme, were carried out in a methanol/water medium with an initial pH of 7.0, at a constant temperature of 20 °C. The rutin consumption, the weight-average mass index (I_M) and the polydispersity (PDI) of synthesized oligomers were followed during 55 hours of incubation. The results indicated that in the absence of the enzyme, the concentration of rutin remained constant without any change of the medium coloration. In the presence of the enzyme (Figure 1), the rutin was completely depleted from the medium during the four first hours of the reaction. Both I_M and PDI increased respectively up to 3.44 and 1.24 during the first 24 hours of incubation and then decreased slightly. The increase of I_M , even after the total consumption of the monomer, indicated the presence of an enzyme reactivity towards oligomeric species, which leads to the elongation of the chain length.

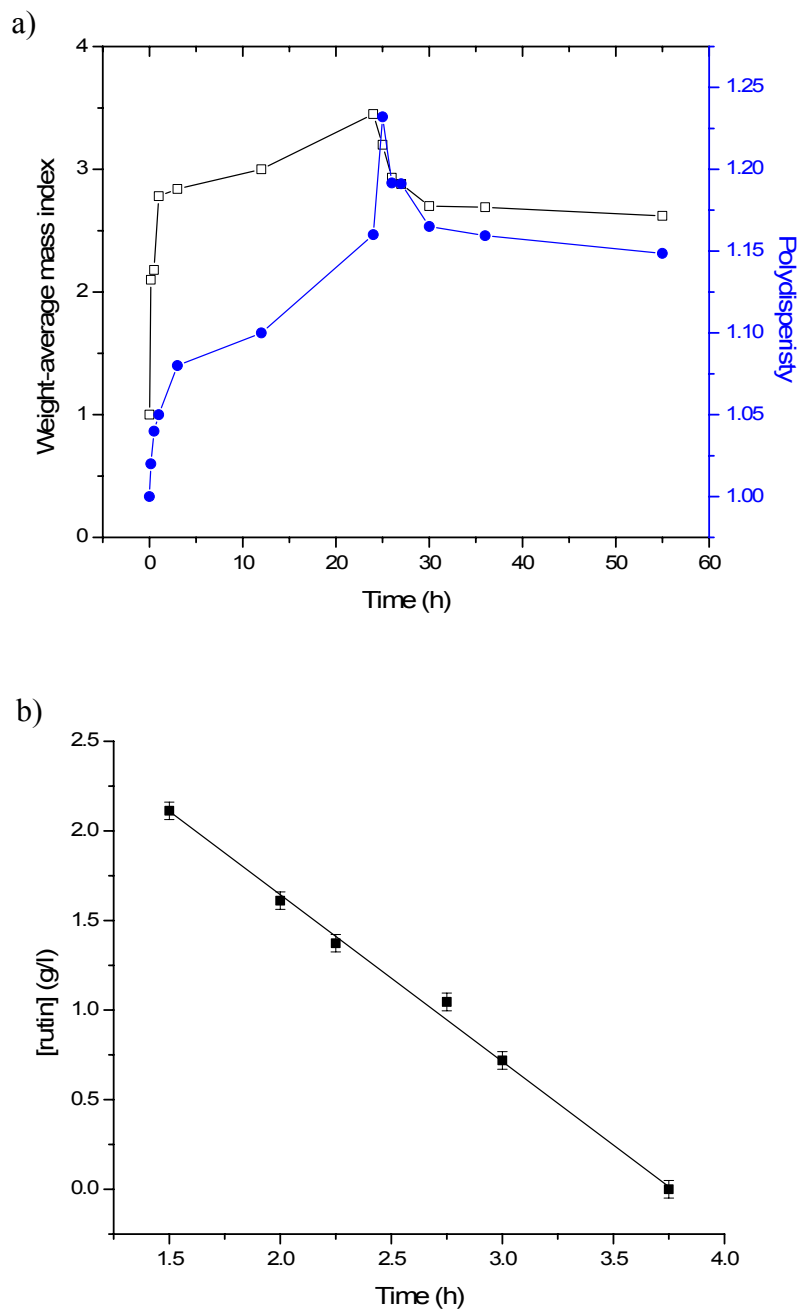


Figure 1: Kinetics of rutin (3 g/l) oligomerization by laccase from *Trametes versicolor* (3 U/ml) in methanol/water (30:70, v/v) at 20 °C: -□-: weight-average molecular mass index \pm 10 % and -●- : polydispersity \pm 2 % (a), and kinetic of consumption of rutin (b).

3.1. Influence of pH and temperature on polydispersity, weight-average molecular mass and production of oligomers

The oligomerization of rutin, in the presence of the laccase from *Trametes versicolor* was studied at different pH and temperatures. The results, after 24 h of incubation, are summarized in Figure 2. For a given temperature, 20 °C, the increase of pH led to a slight decrease of the PDI and a variable I_M . The highest I_M was reached at a pH of 5.0, when the enzyme activity is optimal [24].

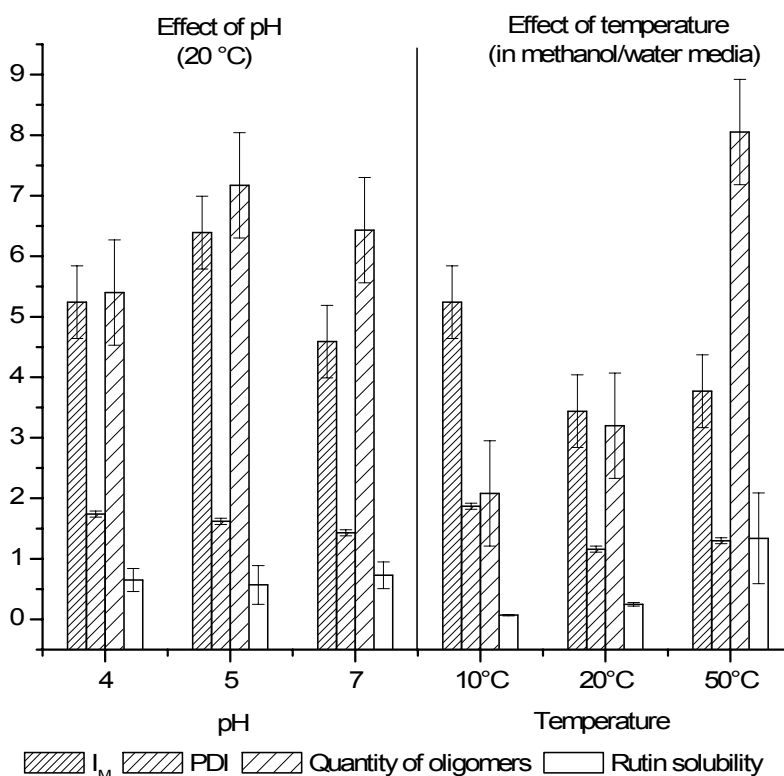


Figure 2: influence of pH and temperature on weight-average molecular mass index (I_M), polydispersity (PDI), production of oligomers and solubility of rutin. Rutin (3 g/l) oligomerization was catalyzed by laccase from *Trametes versicolor* (3 U/ml), for 24 h, in methanol/water media at different temperatures (10, 20 or 50 °C) or methanol/ buffer media at pH 4, 5 or 7.

In methanol/water medium, a higher I_M and heterogeneity in oligomers size were observed at 10 °C compared to 20 and 50 °C. These results could be explained by a thermic

deactivation of the laccase, which leads to a lower concentration of radical species. In such conditions, the elongation of the chains would be favored. The diminution of I_M at 50 °C could be attributed to a larger concentration of radical species which favor coupling reactions and so, the termination of the synthesis. The comparison of these data to that reported by Kurisawa *et al.* [11] with the laccase from *Myceliophthora*, indicating that the effect of pH and temperature is independent to the origin of laccase.

The effects of pH and temperature were also quantified on the oligomers production. The results are summarized in Figure 2. The pH has no significant influence on oligomers production, while an increase of temperature favors their synthesis. The highest production of oligomers was reached at 50 °C, when the solubility of rutin and the laccase activity [24] are favored.

3.2. Effect of enzyme and rutin concentrations

The enzyme is responsible for the generation of radical species in the medium. The concentration of these radical species can affect the chain length of the oligomers. The elongation of the oligomeric chains can also be affected by the initial concentration of rutin. So, both enzyme and rutin concentrations were varied. The results (Table 1) showed that, the initial concentration of enzyme and substrate has no significant influence neither on the PDI nor the I_M .

Table 1. Influence of enzyme and substrate concentration on oligomerization of rutin catalyzed by laccase from *Trametes versicolor*.

Enzyme (U/ml)	Rutin (g/l)	I_M	PDI	Quantity of oligomers (a.u. area)
3.0	3.0	3.44 ± 0.6	1.24 ± 0.05	3.2 ± 0.87
3.0	9.0	3.44 ± 0.6	1.16 ± 0.05	4.6 ± 0.87
0.1	3.0	2.79 ± 0.6	1.13 ± 0.05	1.0 ± 0.87

Rutin oligomers were obtained by polymerization of rutin catalyzed by laccase from *Trametes versicolor* in methanol/water (30:70, v/v), at 20 °C, for 24 h. Weight-average molecular mass index (I_M) and polydispersity (PDI) were determined by SEC-UV analyzes.

This observation is in agreement with those reported by Kurisawa *et al.* [11]. The concentration of enzyme influences the kinetic of the reaction but not the chain length of the oligomers. For a high concentration of rutin (9 g/l), the I_M remained constant (3.44) although the rutin was not totally consumed. This behavior could be attributed to the enzyme deactivation or to a sequestering effect of the oligomers toward the enzyme, leading to its inactivation.

To verify this assumption, either 30 U of enzyme or 30 U of enzyme and 30 mg of rutin were added after 24 hours of reaction (standard reaction, with 3 g/l of rutin). In spite of the feeding with fresh enzyme with or without additional rutin, no change was observed. These data suggested an inactivation of the laccase which could be due, to a sequestering effect of rutin or/and its oligomers toward the copper of the active site of the enzyme, as it mentioned by Desentis-Mendoza *et al.* [15].

3.3. Effect of solvent:

Different works reported the effect of the solvent on the enzymatic oligomerization of simple phenols [3, 25-27]. These studies indicated that the nature and the proportion of the solvent modify the yield, the I_M and the structure of the polymers. For more complex phenols like flavonoids, there are no data available concerning the effect of the solvent on their oligomerization.

To investigate the effect of the solvent on the enzymatic oligomerization of rutin, seven protic polar, aprotic polar and aprotic apolar solvents were tested (Figure 3a) at a solvent/water ratio equal to 30:70 (v/v). In the case of methanol, three ratios (70, 50 and 30 %) were used. The influence of each solvent was evaluated at 20 °C after 24 h of reaction. The results indicated that the nature of the solvent affects mainly the production of oligomers. For a given ratio (30:70 v/v), no significant change was observed for I_M and PDI. The highest and the lowest production of oligomers were obtained in water (8.11 a.u. area) and THF/water medium (0.28 a.u. area), respectively. These results can not be attributed to the solubility of rutin in such media which is 0.14 g/l in water versus 9.25 g/l in THF/water. However, a correlation was observed between the dielectric constant (ϵ) of the cosolvent and the production of oligomers (Figure 3b).

The increase of methanol/water ratio, led to a decrease of the I_M , PDI and the oligomers production, as it has reported by Kurisawa *et al.* [11] in the presence of the laccase from *Myceliophthora*. For methanol/water ratio superior to 70 % no activity was observed.

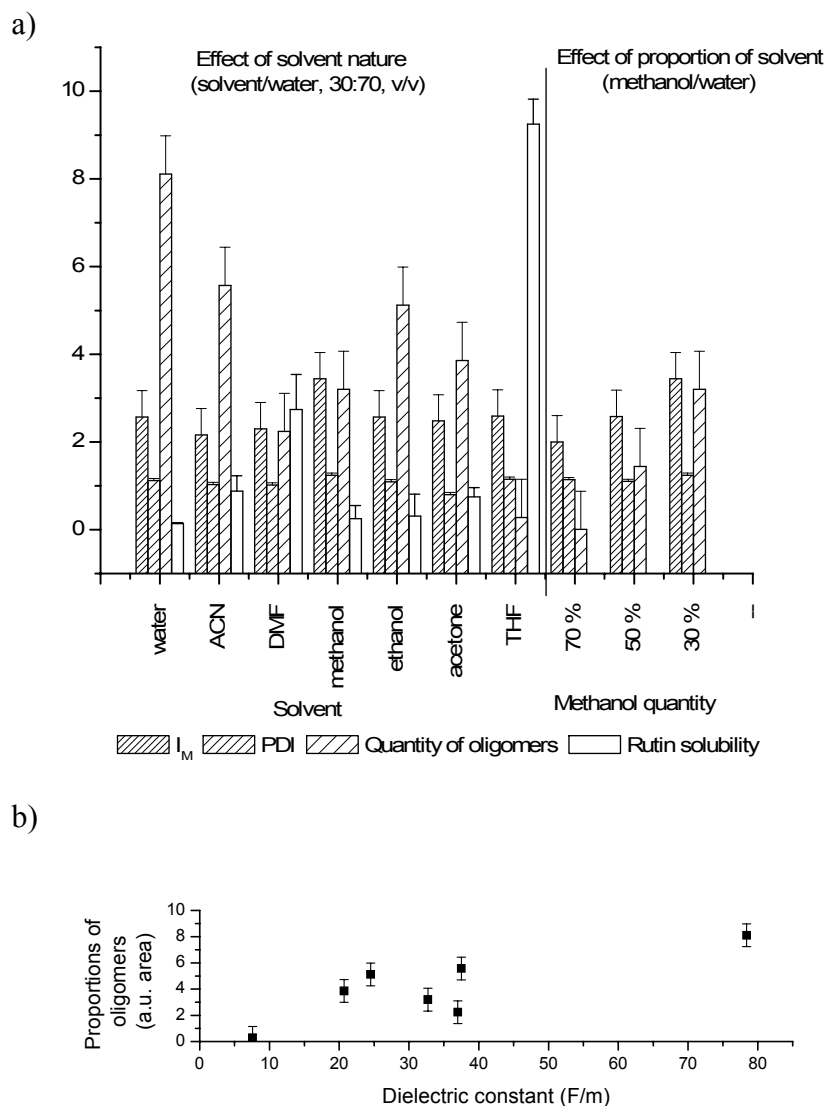


Figure 3: effect of nature and ratio of solvent on weight-average molecular mass index (I_M), polydispersity (PDI), production of oligomers and solubility of rutin (a), and influence of the dielectric constant of the cosolvent on the proportion of oligomers (b). Rutin (3 g/l) oligomerization was catalyzed by laccase from *Trametes versicolor* (3 U/ml), for 24 h, in solvent/water media (30:70, v/v), at 20 °C.

In conclusion, our data showed that the dielectric constant (ϵ) is an important factor to explain the effect of the solvent on the enzymatic oligomerization of rutin. The ϵ is implicated in dissociation phenomena and is likely to diminish the chelation effect of rutin and its oligomers, which is supposed to decrease the activity of the enzyme. In fact, the enzymatic

inhibition by a chelation phenomenon was already demonstrated by Kim *et al.* [28], which studied the effect of catechin-aldehyde polycondensates on xanthine oxidase activity. Another effect of the solvent could be the alteration of the enzyme stability.

3.4. Structural investigation

To characterize the structure of the oligomers, MALDI-TOF, UV, FTIR and NMR analyzes were realized after 24 h of incubation in a methanol-water medium (70:30, v/v).

MALDI-TOF analysis allowed the determination of the absolute masses of rutin oligomers. These were identified as di-, tri-, tetra-, penta- and hexamers of rutin (Figure 4). No higher masses were observed whatever the operating conditions tested. The relative percentage of each oligomer depends on the operating conditions (pH, temperature, concentration of enzyme, ...).

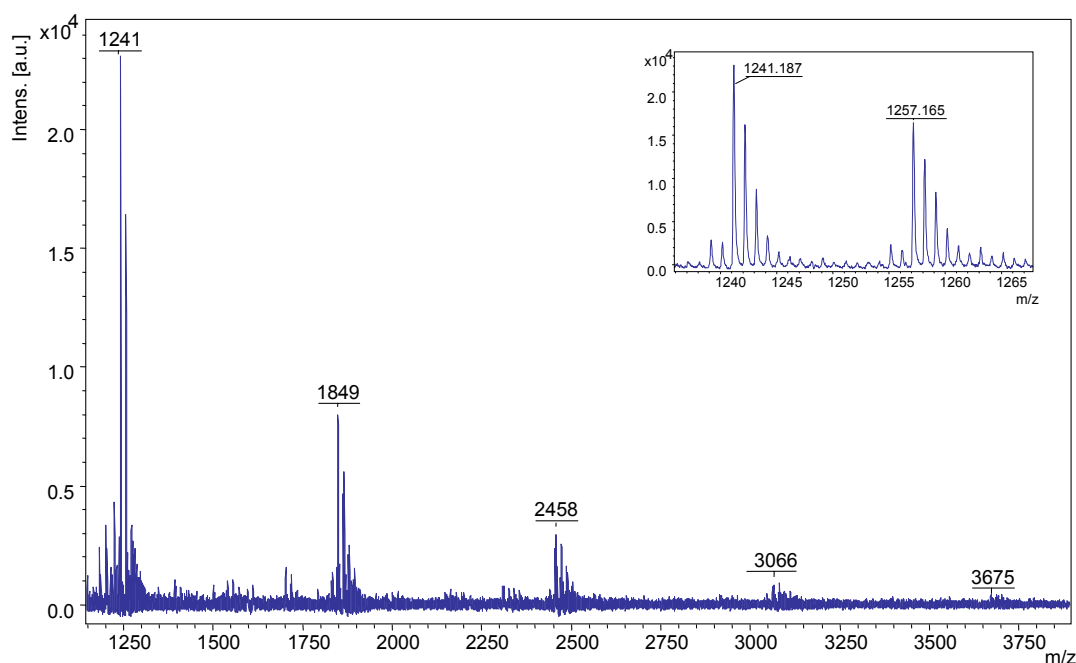


Figure 4: MALDI-TOF positive ion spectrum ($[M - H + Na \text{ or } K]^+$) in the reflectron mode of rutin oligomerization media and isotopic distribution of dimer. Dihydroxybenzoic acid was used as matrix.

The gap of mass due to the addition of one rutin shows the abstraction of two hydrogen atoms. This result indicates that the connection mode between rutin units is a simple bridge. According to the bibliographic data this linkage could occur between two B rings of rutin [29]. Depending on the pH [16, 30] and the solvent [26], it could be either a C-O or a C-C linkage.

Rutin presents several reactive hydroxyl groups both on the phenolic rings and the sugar part. So, this linkage could be also localized on the sugar moiety. To elucidate the type and the localization of the linkage between two units of rutin, further investigations using UV, FTIR, H-NMR at 300 MHz, diffusion ordered spectroscopy NMR (DOSY) and H-NMR at 600 MHz with cryoprobe analyzes were realized.

The UV-visible spectrum of rutin, in methanol, presented two maxima of absorption at 282 and 359 nm due to the π - π^* transition of the aromatic electrons. For rutin oligomers the 359 nm band was much larger and presented a hypsochromic shift of 11 nm. This behaviour suggests an implication of the B ring of rutin in the formation of oligomers. In fact, Marckam [31] observed that the presence of a substitution on the 5, 7 and 4' positions of phenolic rings led all time to an hypsochromic shift.

In comparison to rutin spectrum, the IR analyses of oligomers showed a broadening of the absorption bands and a new peak at 1130 cm^{-1} (Figure 5). This peak indicated the formation of a new ether bond (C-O). Similar results were reported by Mejias *et al.* [29] in the presence of peroxidase.

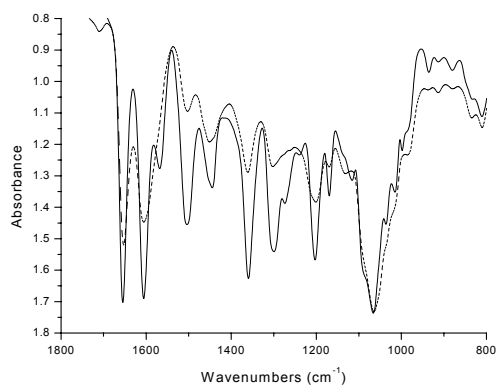


Figure 5: FTIR (diamond ATR) spectra of rutin (—) and reaction media containing rutin and oligomers (---). A film of reaction media has been realized on the diamond ATR for this analysis.

The $^1\text{H-NMR}$ analysis of rutin oligomers was already reported by Kurisawa *et al.* [11]. These authors observed 3 broad peaks at δ 0.8-1.3, 3.0-4.0, 4.4-5.0 ppm but these data didn't allow to identify the type and the localisation of the linkage established during the oligomers

formation. In order to complete these results, different complementary techniques were used: DOSY and $^1\text{H-NMR}$ with cryoprobe.

The DOSY analysis was expected to separate the oligomers in function of their hydrodynamic radius and then improve the spectrum resolution. Unfortunately, this analysis didn't permit to separate the oligomers and the spectrum was similar to that reported by Kurisawa *et al.* [11]. However, this technique gave the global self-diffusion coefficients ($8.4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and the hydrodynamic radius (29.8 \AA) of the oligomers.

To overcome the heterogeneity of the reaction medium and then to increase the resolution of $^1\text{H-NMR}$ analysis, four aliquots were taken from the reaction medium after 30 minutes, 1 h, 2 h and 3 h of synthesis. These samples were heated at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 minutes to inactivate the enzyme, then lyophilized and analyzed by $^1\text{H-NMR}$, at 600 MHz, with cryoprobe, at a concentration of 3 mg/ml ($\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$, 70:30, v/v). For the first sample (30 min of reaction), the $^1\text{H-NMR}$ spectrum revealed four new signals with a multiplicity of 2 at 7.17, 7.26, 7.31, 7.52 ppm (Figure 6).

These peaks could result from the upfield shift of the $6'\text{H}$ signal and the downfield shift of the $5'\text{H}$ signal of rutins linked together, by a C-O bridge ($\text{C}2'-\text{O}4'$). The evolution with time of NMR spectra revealed a progressive broadening of all signals both in aromatic and sugar zones. This profile suggests that several types of bridges should occur during the oligomerization of rutin, involving both the aromatic and the sugar parts of the flavonoid.

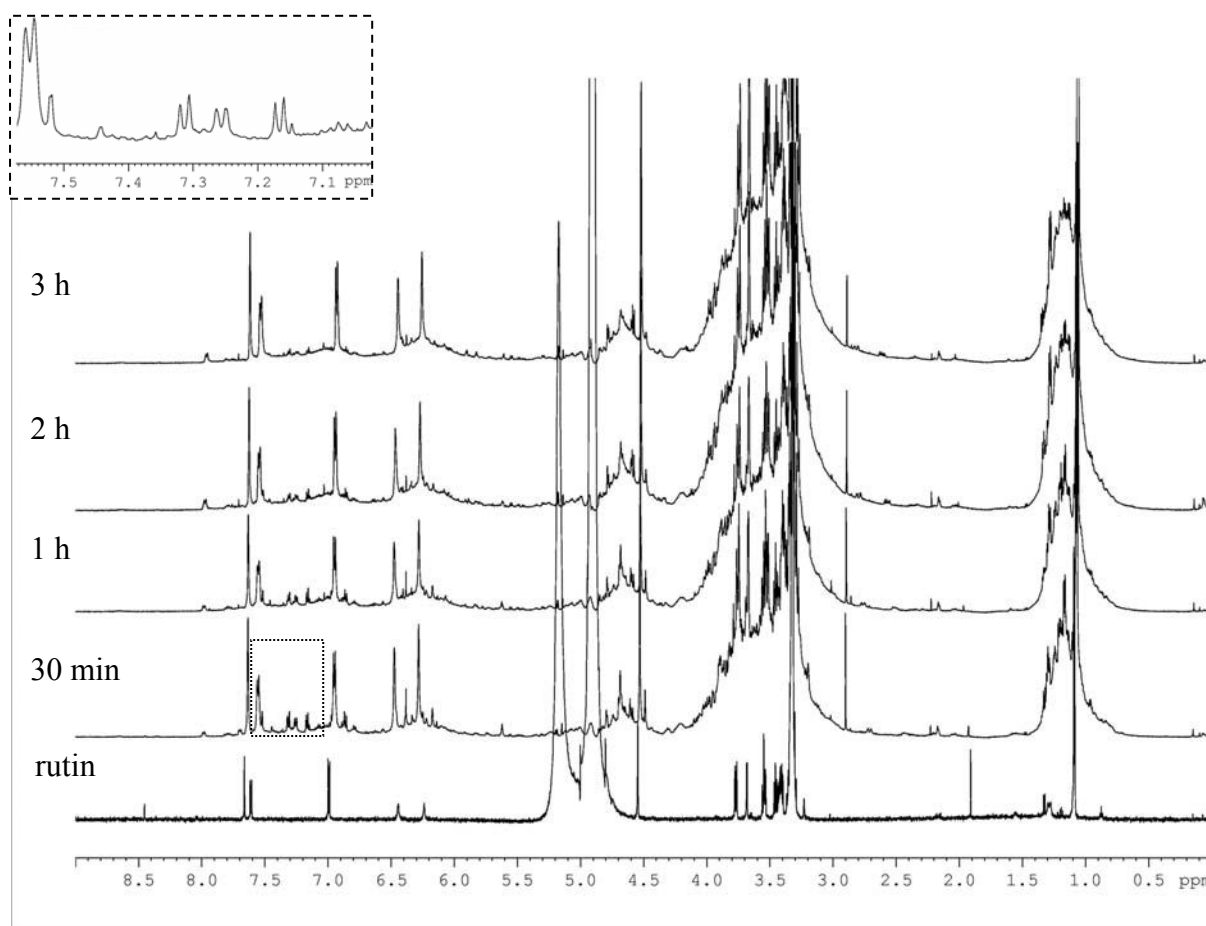


Figure 6: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz by cryoprobe) spectra of media containing rutin and oligomers of rutin at four times (30 min, 1 h, 2 h, 3 h) of reaction. Rutin (0.2 g/l) oligomerization was catalyzed by laccase from *Trametes versicolor* (0.3 U/ml) in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (30:70, v/v), at 20 °C.

The data obtained by different techniques confirm the presence of a C-O linkage and suggest that this linkage occurs on the phenolic and sugar parts of rutin. However these data don't allow to conclude about the presence or the lack of the C-C linkage. For this reason, the reaction medium was filtrated on a 3000 Da membrane by tangential flow filtration to obtain a fraction enriched with oligomers with low molecular weight. As expected, the permeate contained mainly residual rutin and dirutin. This was lyophilized then dissolved in $\text{DMSO-}d_6$ and analyzed by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. The analysis of the spectrum showed a limited number of signals in the aromatic zone, a downfield shift of the 6'H signal and the absence of the 2'H peak. This behaviour suggests a symmetrical structure which results from a C2'-C2' bridge between two rutin units (Figure 7). So, it is clear that both C-C and C-O linkages were established during rutin oligomerization.

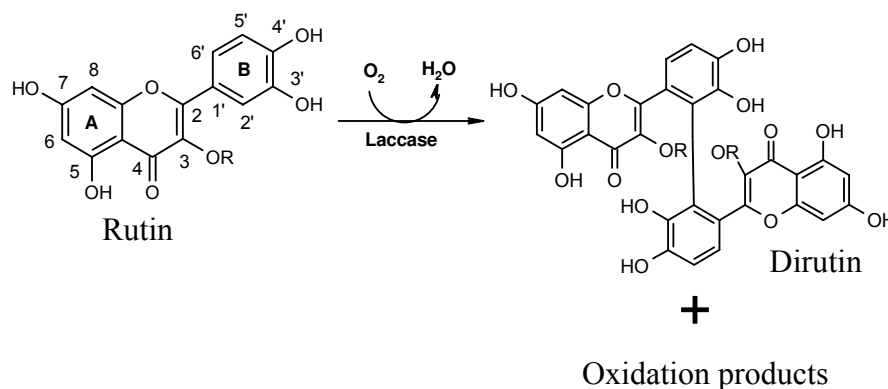


Figure 7: Polymerization reaction of rutin (R: 6-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl) catalyzed by laccase.

3.4. Solubility, antioxidant activity and inhibitory effect on xanthine oxidase of rutin oligomers:

To study the solubility, reaction media containing rutin oligomers were lyophilized. The powder was dissolved in water, at 30 °C. The solubility was about 600 g/l. This solubility is 4200 fold higher than rutin solubility value. The solubility of polymers could also be described by a critical overlap concentration (C^*). This parameter characterizes the beginning of the contact between macromolecular coils [32]. In the case of oligomers with an I_M of 3.44, the rheological investigation showed that this factor was around 20 wt %.

To explain the high solubility of rutin oligomers, the interactions and especially the H-bonds between these molecules and water were evaluated by a molecular modeling study. The lowest-energy conformation of rutin monomer and rutin hexamer furnished by molecular dynamics were introduced into two distinct water cells. The hexamer was built on the basis of O4'-C6' bridges which implicate the most stable radicals (O^\bullet , C^\bullet). In water, rutin showed a folded structure where the rhamnose and the ring A become closer together. Six intermolecular H-bonds were established with the water molecules. The hexamer revealed an unfolded structure where sugars offer a large contact with the surrounding solvent. The number of intermolecular H-bonds between the hexamer and water molecules was evaluated to 94. This dense network of H-bonds could explain the high solubility of the hexamer compared to rutin.

The radical scavenging activity of rutin and rutin oligomers was evaluated for each fraction obtained by tangential flow diafiltration with a cut-off of 50, 8, 5, 3 KDa respectively.

These fractions, corresponding to retentates and permeate, were characterized by I_M of 4.59, 2.95, 2.46, 2.38 and 2.02. As indicated in Figure 8, the IC50 increased progressively versus I_M , which means a decrease of the radical scavenging activity. The retentate fraction obtained with a membrane of 50 KDa (I_M of 4.59) led to a high IC50 (11.7 μ M) compared to the IC50 value obtained for rutin (1 μ M). This diminution of the antioxidant activity could be attributed to the loss of the free hydroxyl group on C-4' and/or C-3'. In fact Burda and Oleszek [23] reported that these groups play a major role in the antioxidant power. The diminution of the antioxidant activity was also observed by Desentis-Mendoza *et al.* [15], using also the DPPH test.

The xanthine oxidase inhibitory activity of rutin and oligomers was evaluated for each fraction of tangential flow filtration. As indicated in Figure 8, the IC50 decreased progressively versus I_M . The oligomers of high \overline{M}_w showed a greater inhibitory activity than rutin. The inhibition of the xanthine oxidase activity was followed by Kurisawa *et al.* [12] during the oligomerization of catechin by peroxidase but these authors didn't analyze the effect of \overline{M}_w . This behaviour suggests that the hydroxyl groups on C-5 and C-7, the carbonyl group on C-4 and the double bond between C-2 and C-3 are not implicated in the reaction of polymerization. In fact, several authors [33-36] reported that the presence of these groups are responsible for the inhibition of the xanthine oxidase activity.

Moreover, Kim *et al.* [28] observed the chelation of the catechin-aldehyde polycondensates onto the Fe/S and/or the flavin adenine dinucleotide (FAD) center of the xanthine oxidase. So, the high inhibitory activity of the oligomers reported in our study could also be linked to their high chelating capacity.

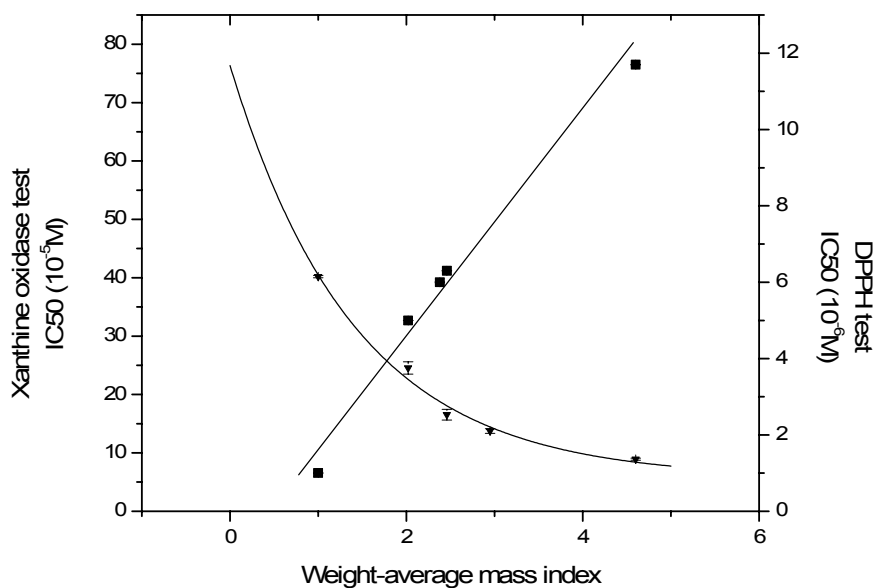


Figure 8: Influence of weight-average molecular mass index of rutin and rutin oligomers on antiradical activity determined by DPPH test (■) and on xanthine oxidase inhibitory activity (▼). The antiradical activity of flavonoids is expressed as the final concentration that results in half-maximal DPPH discoloration (IC50). The inhibition of xanthine oxidase by flavonoids is expressed as the final concentration that results in half-maximal enzyme activity (IC50).

4. Conclusion

This work showed that the oligomerization of rutin catalyzed by *Trametes versicolor* laccase led to a complex mixture of oligomers containing up to 6 units of rutin linked together by with C-C and C-O bridges involving both the sugar part and the phenolic part of rutin. The \overline{M}_w , the amount of oligomers and the PDI depended on pH and temperature conditions. High temperatures led to low \overline{M}_w and high production of oligomers whereas high \overline{M}_w were obtained at low temperature or a pH of 5. The lowest PDI (1.16) was obtained at 20 °C. The solvent nature influenced also the production of oligomers. The increase of dielectric constant medium increases these concentrations.

Rutin oligomers exhibited a solubility 4200 fold higher than that of rutin. A decrease of the antioxidant power and an increase of the xanthine oxidase inhibitory activity were observed when increasing \overline{M}_w .

References

1. Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic Polymerization. *Chem. Rev.* 2001;101:3793-3818.
2. Ikeda R, Sugihara J, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of 4-hydroxybenzoic acid derivatives to poly(phenylene oxide)s. *Polym. Int.* 1998;47:295-301.
3. Ikeda R, Sugihara J, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol. *Macromolecules* 1996;29:8702-8705.
4. Uyama H, Kurioka H, Kobayashi S. Novel bienzymatic catalysis system for oxidative polymerization of phenols. *Polym. J.* 1997;29:190-192.
5. Dubey S, Singh D, Misra RA. Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb. Technol.* 1998;23:432-437.
6. Oguchi T, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi M. Enzymatic synthesis of soluble polyphenol. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 2000;73:1389-1396.
7. Kurioka H, Komatsu I, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of alkylphenols. *Macromol. Rapid Comm.* 1994;15:507-510.
8. Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *BBA-Protein Struct. M.* 1990;1041:43-47.
9. Bruno FF, Nagarajan S, Nagarajan R, Kumar J, Samuelson LA. Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins). *J.Macromol.Sci. Pure Appl.Chem.* 2005;42:1547-1554.
10. Bruno FF, Nagarajan R, Stenhouse P, Yang K, Kumar J, Tripathy SK, Samuelson LA. Polymerization of water-soluble conductive polyphenol using horseradish peroxidase. *J.Macromol.Sci. Pure Appl.Chem.* 2001;38:1417-1426.
11. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003;4:1394-1399.
12. Kurisawa M, Chung JE, Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization. *Biomacromolecules* 2003;4:469-471.
13. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol.Biosci.* 2003;3:758-764.
14. Williamson G, Plumb GW, Garcia-Conesa MT, Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties, in *Plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, Gross G.G., et al., Editors. 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. p. 483-494.
15. Desantis-Mendoza RM, Hernandez-Sanchez H, Moreno A, Rojas del C E, Chel-Guerrero L, Tamariz J, Jaramillo-Flores ME. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* 2006;7:1845-1854.
16. Takahama U. Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products. *Biochim. Biophys. Acta* 1986;882:445-451.
17. Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 1996;42:1279-1288.

18. Roubaty JL, Bréant M, Lavergne M, Revillon A. Mechanism of the oxidative coupling of phenols: influence of pH upon the electrochemical oxidation of xylenol in methanol. *Makromol.Chem.* 1978;179:1151-1157.
19. Kim YJ, Nicell JA. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresour. Technol.* 2006;97:1431-1442.
20. Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract. *Clin. Chim. Acta* 2004;339:129.
21. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* 2001;56:683.
22. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2002;73:557.
23. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:2774-2779.
24. Aktas N, Tanyolaç A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour. Technol.* 2003;87:209-214.
25. Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide). laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules* 1996;29:3053-3054.
26. Intra A, Nicotra S, S. R, Danieli B. Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphtol derivatives. *Adv. Synth. Catal.* 2005;347:973-977.
27. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromol.Biosci.* 2003;3:253-257.
28. Kim YJ, Chung JE, Kurisawa M, Uyama H, Kobayashi S. Superoxide anion scavenging and xanthine oxidase inhibition of (+)-catechin-aldehyde polycondensates. Amplification of the antioxidant property of (+)-catechin by polycondensation with aldehydes. *Biomacromolecules* 2004;5:547-552.
29. Mejias L, Reihmann MH, Sepulveda-Boza S, Ritter H. New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase. *Macromol.Biosci.* 2002;2:24-32.
30. Kobayashi S, Higashimura H. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog. Polym. Sci.* 2003;28:1015-1048.
31. Markham K, *Techniques of flavonoid identification.* 1982: Academic Press. 36-93.
32. De Gennes PG, *Scaling concept in polymers physics,* ed. Press C.U. 1979, New York.
33. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 1998;61:71.
34. Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;294:167.
35. Iio M, Moriyama A, Matsumoto Y, Takaki N, Fukumoto M. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* 1985;49:2173-2176.
36. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Nat. Prod.* 1988;51:345.

Contribution de l'article

Ces travaux se sont portés sur la polymérisation enzymatique de la rutine catalysée par la laccase de *Trametes versicolor* et plus particulièrement sur les effets des conditions opératoires sur la cinétique, la structure et les propriétés des oligomères synthétisés.

L'analyse cinétique de la réaction a permis de mettre en évidence que cette réaction permet d'atteindre un I_M de l'ordre de 3.44 au bout de 24 h de réaction. L'arrêt observé de la réaction n'est pas dû ni à l'absence de substrat, ni à l'inactivation de l'enzyme, mais plutôt à son inhibition par les oligomères. En effet, il semble que les propriétés chélatantes de la rutine soient amplifiées dans le cas de polymères. Les oligorutines piègent les cuivres du site actif de l'enzyme, provoquant son inhibition.

- L'étude de l'effet des conditions réactionnelles a mis en évidence que les plus hauts I_M sont obtenus à de faibles pH et température. La nature du solvant a très peu d'impact sur l' I_M , en revanche il influe sur les quantités d'oligomères formés. Ainsi, un solvant hydrophile permettra la synthèse d'une plus grande quantité d'oligomères. En outre, au-delà de 70 % de solvant aucune réactivité n'a été observée. La diminution du pourcentage de solvant permet d'augmenter la quantité d'oligomères formés sans effet significatif sur l' I_M . Une corrélation a pu être établie entre la constante diélectrique du co-solvant et la quantité d'oligomères: plus la constante diélectrique du solvant est élevée, plus la quantité d'oligomères est importante. Ceci peut être dû à :

- des capacités de dissociation du co-solvant d'autant plus importantes que sa constante diélectrique est élevée. Ainsi, plus ϵ est élevée, plus les propriétés de chélation sont défavorisées, ce qui diminuera l'effet inhibiteur de l'activité laccasique des oligomères.
- la plus importante dénaturation de l'enzyme dans des co-solvants à faible ϵ , engendrant une plus faible activité enzymatique.

- L'étude structurale des oligomères de rutine a mis en évidence la formation d'un simple pontage entre unité monomérique. Le pontage mis en place est de type C-C ou C-O et s'établit tant sur la partie phénolique que sur la partie sucre. En outre, une structure de dirutine a pu être caractérisée; les deux unités de rutine sont reliées par un pontage C2'-C2', formant ainsi une structure dimérique symétrique.

- L'étude des propriétés des oligomères a permis de mettre en évidence une solubilité dans l'eau 4200 fois plus importante après polymérisation. L'étude menée par modélisation moléculaire a pu démontrer que, cette importante augmentation de solubilité est due à une conformation ouverte des oligomères dans l'eau, permettant la mise en place d'un réseau dense de liaisons hydrogène. En outre, plus les I_M sont importantes plus leur pouvoir antiradicalaire diminue, à l'inverse de leur potentiel d'inhibition de la xanthine oxydase qui lui augmente avec l'accroissement de l' I_M .

CHAPITRE IV.2.

OLIGOMÉRIISATION DE L'ESCULINE

Chapitre IV.2. Oligomérisation de l'esculine

Introduction

Après l'étude de l'oligomérisation de la rutine, notre intérêt s'est porté sur une autre classe de polyphénols, les coumarines et en particulier l'esculine. L'esculine est une esculetine glycosylée. Initialement cette molécule a une solubilité dans l'eau plus importante que celle de la rutine, mais présente un pouvoir antioxydant plus faible. Compte tenu de sa solubilité relativement élevée dans les solutions aqueuses et de son faible coût, cette molécule est une cible de choix pour évaluer le développement d'un procédé de polymérisation enzymatique, mais il faut que les polymères obtenus aient des activités intéressantes et que les conditions opératoires permettent une polymérisation régiosélective. En effet, les activités des coumarines sont dépendantes de leur structure moléculaire. Ainsi pour conserver les activités initiales de l'esculine, les groupements essentiels impliqués dans ces activités ne doivent pas être altérés par la polymérisation. La structure des oligomères formés joue donc un rôle crucial dans la modification des propriétés.

Afin d'explorer les relations structure-activité des oligomères d'esculine, deux approches d'investigation ont été combinées. Une première approche expérimentale basée sur l'analyse par UV, FTIR, MALDI-TOF et RMN, et une seconde approche par modélisation moléculaire dans le vide et dans le solvant. Les informations obtenues sur les structures des oligomères par ces deux approches ont été corrélées aux propriétés de solubilité, antiradicalaires et d'inhibition de la xanthine oxydase.

Ainsi, les objectifs de cet article sont :

- l'analyse structurale par approche expérimentale basée sur l'utilisation de l'UV, FTIR, MALDI-TOF et RMN ;
- l'analyse structurale par modélisation moléculaire dans le vide et dans le solvant ;
- l'analyse des propriétés des oligomères, c'est-à-dire, la solubilité, le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase.

Les résultats obtenus ont été utilisés pour chercher d'éventuelles corrélations structure-activité des oligomères synthétisés.

L'ensemble de ce travail fait l'objet d'un projet de publication intitulée « Enzymatic synthesis of oligoesculin : structure and biological activities characterizations ».

Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations
Julie Anthoni^a, Frederic Lionneton^b, Jean-Michel Wieruszkeski^c, Jacques Magdalou^b, Jean-
Marc Engasser^a, Catherine Humeau^a, Mohamed Ghou^{a*}

^a Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre les Nancy, France

^b Laboratoire de Pharmacologie UMR7561 CNRS-Université Henri Poincaré, Vandoeuvre les
Nancy, France

^c Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS/USTL 8576-Université des
Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

* author for correspondence (E-mail : mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr)

Abstract

The oligomerization of esculin, catalyzed by the laccase from *Trametes versicolor* was realized in an attempt to improve the properties of this glycosydic coumarin. MALDI-TOF analyses showed a degree of oligomerization up to 9 whereas NMR spectra revealed the formation of C-C and C-O bridges which involve both the phenolic and the glucosidic part of the coumarin. Oligomers were characterized by a solubility in water which is 189 fold higher than esculin solubility. Moreover antioxidant properties of oligomers were correlated to their mass: the more the mass is high, the more the xanthine oxidase inhibitory activity and the radical scavenging activity are important. These experimental results were completed by *in silico* structural investigations which suggested the preferential formation of C8-C8 linkages between esculin unites during the oligomerization reaction.

Keywords: Oligomerization, esculin, laccase from *Trametes versicolor*, solubility, antioxidant activity, molecular modeling

Introduction

Esculin is a glycosylic coumarin belonging to a group of phenolic compounds widely distributed in natural plants¹. Coumarins are naturally occurring derivatives of benzopyrene. They are used in beverages², food³, perfumes⁴, cosmetics⁵ and as additives in polymers for their fluorescence, photodimerization, photocleavage or liquid crystalline properties. They have recently attracted much attention due to their antiradical⁶⁻⁸, xanthine oxidase inhibitory⁹, anti-inflammatory¹⁰, anticarcinogenic¹¹ and anti-HIV¹² activities. The magnitude of coumarins activities depends upon the degree and the localization of hydroxyl, glycosyl or methoxy group on their backbone.

Esculin or aesculin is a monosaccharide of esculetin characterized by a fine blue fluorescent solution. It is extracted from the *Aesculus hippocastanum*, or horse-chestnut tree. It exhibits an UV-B protective effect and antiflogistic, cytostatic and antimutagenic properties. Contrary to the majority of phenolic species, esculin is soluble in water and relatively stable in this media.

The enzymatic polymerization of several phenolic species like hydroxybenzene¹³⁻¹⁷, cresol^{14, 17, 18}, cardanol¹⁹, catechol²⁰, catechin^{21, 22} or rutin^{23, 24} have been yet reported. In some cases, these modifications led to a higher solubility in water, thermal stability and an increase of antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities, and in other cases a lost of these activities was observed. This behaviour is due to the fact that such activities are correlated with the structure and the functional groups of the molecules. Different studies have demonstrated that, an *ortho*-catechol moiety^{25, 26}, a 1,2-pyrone in B ring²⁷, two phenolic hydroxyl groups in the *ortho* position²⁸, an O-glucopyranoside group and more globally hydroxyl functions²⁶ increase the antioxidant activity of coumarins. Moreover a substitution in position 8 (hydroxyl group or glucosyl group)²⁸, a methyl substitution in positions 3, 4 and 8 or a double bond on positions 4,3 increase the xanthine oxidase inhibitory activity.

In spite of the interesting properties of esculin, the polymerisation of this compound has not been yet studied. The aim of this paper is to investigate the relationships between the structure of esculin oligomers and their solubility, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities. To attempt this goal experimental and molecular modeling approaches were used. UV, FTIR, MALDI-TOF and NMR analyses were used to investigate the structure of esculin oligomers. Properties results (stacking, solubility and antioxidant activity) were correlated to structural descriptors which were calculated by molecular modeling in vacuum and in solvent environment.

Experimental Section

Materials. Laccase *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2., 21.4 U/mg) and esculin sesquihydrate (>98 %) were purchased from Fluka and xanthine, xanthine oxidase (1.17.3.2., grade IV from bovine milk, 0.2 U/mg protein) from Sigma. All solvents were HPLC grade from VWR.

Oligomerization reaction. Reactions were carried out on a Chemspeed ASW2000 automated synthesizer (Chemspeed Ltd). Eight parallel reactions were realized simultaneously. Esculin (3 g/l) was suspended in 27 ml vessels in 10 ml of methanol/water (30:70, v/v). Laccase solution (3 U/ml) was added to the mixture. The reactions were stirred at 600 rpm, for 24 h, at 20 °C.

SEC analysis. Relative masses of oligomers were evaluated on-line by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom (Merck), UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSK Gel α 3000 column, 60 °C). DMF with 1% LiBr was used as the phase mobile at a flow rate of 1ml/min. Polystyrene standards were used to define molecular mass calibration. Average molecular masses were defined by:

$$\rightarrow \overline{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} : \text{number-average molecular mass}$$

$$\rightarrow \overline{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} : \text{weight-average molecular mass}$$

$$\rightarrow PD = \frac{M_w}{M_n} : \text{polydispersity } (> 1)$$

n_i represents the number of oligomer molecules having a mass of M_i at a polymerization degree of i , and w_i the weight fraction of chain at a polymerization degree of i . The quantity of oligomers was expressed in arbitrary units of area (a.u.). Error values were determined by three repetitions of the same reaction.

Properties determination. Scavenging activity and xanthine oxidase inhibitory activity of different pools of oligomers were analyzed. Fractions enriched with oligomers of various mass were prepared from 24 h reaction medium (methanol/water, 30:70, v/v, 20 °C), by successive filtration processes on a 50 KDa membrane to remove the enzyme, then successively on 8, 5 and 3 KDa membranes by a tangential diafiltration process (V/V). Then, the fractions were lyophilized.

Scavenging free radical power was evaluated by the DPPH test as described by Burda et Oleszek ²⁹. 1 ml of solution of esculin or oligomers at different concentrations (10^{-6} – 10^{-4} M, concentration were calculated from \overline{M}_w) in methanol was added to 2 ml of DPPH at 10 mg/l in methanol/water (80:20, v/v). A reference sample was prepared with 1 ml of methanol in 2 ml of DPPH solution. Esculin and oligomers absorbance for each concentration was evaluated at 527 nm. After 15 min, at 23 °C, the absorbance at 527 nm was measured. The antiradical activity was calculated as a percentage of DPPH decoloration using the following equation:

$$\text{antiradical activity} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of oligoesculin}}{\text{absorbance of reference}} \right).$$

The antiradical activity of the molecules is expressed as the final concentration that results in half-maximal DPPH decoloration (IC₅₀) and calculated by exponential regression analysis.

Each absorbance was measured in triplicate.

A second property tested the capacity to inhibit the activity of xanthine oxidase. All solutions were prepared in phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM), except for esculin which was initially dissolved in a minimum of DMSO, then rapidly diluted in buffer. Test solutions were prepared by adding 1600 μ l of buffer, 300 μ l of solution of esculin or its oligomers (concentration varying from 10^{-5} to $4 \cdot 10^{-4}$ M and calculated from \overline{M}_w), 1000 μ l of a solution of xanthine (0.15 mM, initially dissolved in a minimum of NaOH 2 %, then rapidly diluted in buffer) and 100 μ l of a solution of xanthine oxidase (0.2 U/ml). The reaction was monitored for 6 min at 295 nm. 2 test mixtures were prepared, the first containing no phenolic species to measure the total production of uric acid, and the second containing no enzyme to measure the absorbance of phenols at 290 nm for the range of concentrations. The capacity of the molecules to inhibit the xanthine oxidase is expressed as the final concentration that results in half-maximal enzyme velocity (IC₅₀) and calculated by standard curve regression analysis.

Each absorbance was measured in triplicate.

MALDI analysis. Absolute masses were determined by MALDI-TOF. The concentration of DHB matrix is 5 mg/ml in acetonitrile/water (30:70, v/v) with 0.1 % TFA.

After 24h of reaction, samples were automatically taken from reaction media and diluted two fold in acetonitrile/water (30:70, v/v) with 0.1 % TFA. Solutions (3 μ l) were spotted online on MALDI target with DHB (1 μ l), and crystallized at room temperature. All samples were spotted automatically in triplicate, on the Chemspeed ASW2000 (Chemspeed Ltd, August, Switzerland) platform.

MALDI-TOF-MS was performed on Ultraflex (Bruker) in reflectron operation mode. All spectra were obtained in positive ion mode. Ionization was performed with 337nm pulsed nitrogen laser and accelerated under 20kV with time-delayed extraction. Spectra were obtained by accumulating of at least 300 shots. Spectra were calibrated with statistic calibration of FlexAnalysis software (Bruker).

FTIR analysis. IR analyses were achieved by ATR-FT-IR spectroscopy using a FT-IR spectrometer Tensor 27 (Bruker). The solutions containing oligomers were diluted with water/methanol (70:30, v/v) then deposited on the ATR unit. Solvents were evaporated under vacuum at 50°C, to give a film which was analyzed.

UV analyzes. The UV spectra of esculin solutions and oligomers in methanol were determined on a UV6000LP spectrometer (Spectra System, Thermofinnigan).

NMR analysis. ^1H NMR spectra of reaction media were recorded on a Bruker 600 MHz spectrometer with a cryoprobe, at low concentration of esculin (0.2 g/l) and 0.6 U/ml of laccase in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (30:70, v/v), at 300 K.

A diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) NMR technique was also used to aid the deconvolution of the system. A diffusion delay time of 100 ms was applied, in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (30:70, v/v), at 293 K.

Esculin ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 70 :30, v/v): $\delta = 3.52$ (2d $J_{\text{H}3'/\text{H}4'/\text{H}5'}$ H4'), 3.62 (m $J_{\text{H}2'/\text{H}3'/\text{H}4'/\text{H}5'/\text{H}6'}$ H2',H3',H5'), 3.77 (d,d $J_{\text{H}5'/\text{H}6'/\text{H}6'}$ H6' 5.8 + 12.5 Hz), 3.95 (dd $J_{\text{H}6'/\text{H}6'/\text{H}5'}$ H6' 2.0 + 12.5 Hz), 5.06 (d $J_{\text{H}1'/\text{H}2'}$ H1' β 7.5 Hz), 6.31 (d $J_{\text{H}3/\text{H}4}$ H3 9.6Hz), 6.91 (s H8), 7.37 (s H5), 7.93 (d $J_{\text{H}4/\text{H}3}$ H4 9.6Hz) ppm.

Molecular Dynamic Simulation. The molecular dynamic (MD) simulations were performed with Insight II programs, on an O2 SGI workstation, employing the force-field cff, on Discover3. The first step was a minimization to optimize the geometry of molecules in vacuum by using a steepest descent, a conjugate gradient descent and Newton-Raphson algorithm until the energy gradient was smaller than 0.1 kcal/(mol.Å). A dielectric constant $\epsilon = 2.0$ F/m was used in all minimizations. The second step was a molecular dynamic simulation to explore the conformational space of esculin and its oligomers. The dynamic run during 20 ps, at 600 K. The lowest-energy conformation was minimized with a convergence of 0.1 kcal/(mol. Å). This conformation was selected.

Enthalpic study was carried out using the semiempirical AM1 method, with HyperChem software. Optimization was made with conjugated gradient (algorithm Polak-Ribiere) with a self consistent field (SCF) of 0.001 kcal/mol in vacuum. The bond dissociation energy (BDE) was calculated as the energy of the radical resulting from hydrogen atom abstraction minus

the energy of the neutral molecule. For the dimers, the BDE was calculated with the radical species formed in position 7. For dimers which present two hydroxyls in position 7, two radical species and so two BDE were obtained.

For simulation of water, a cubic cell with periodic boundary conditions was used. NVT molecular dynamic (MD) was carried out in a box of 40.0 Å side length, with a cutoff of 14.0 and a dielectric constant of 2.0 at 300 K. The box contained 1370 water molecules plus one molecule of esculin or 418 water molecules and one molecule of diesculin (O7-C4 linkage). The MD simulation run 200 ps. To simulate the operating conditions, the same conditions were used with a cell of 60.0×40.0×40.0 Å side length containing 138 methanol molecules and 725 water molecules plus 4 molecules of esculin or 395 methanol molecules and 2073 water molecules plus 2 molecules of diesculine (cutoff 14.0, dielectric constant 2.0, 300 K). For the 4 esculins system, three short dynamic runs were realized of 2400, 90 and 260 fs. Each dynamic was followed by a minimization with a convergence of 0.01 kcal/mol. For the 2 diesculins system, the molecular dynamic run 112 ps.

Results and Discussion

Production of esculin oligomers

The oligomerization of esculin was conducted in a methanol/water medium with an initial pH of 7.0, at 20 °C. After 72 h of incubation, the \overline{M}_w of esculin oligomers and the residual concentration of esculin were respectively equal to 1800 g/mol (corresponding to a degree of oligomerization of 5) and 0.7 g/l (Figure 1). This stable value of \overline{M}_w was reached after 12 h of reaction, whereas the consumption of esculin was stabilized after 48 h of reaction. The polydispersity was stabilized around 0.6 after 12 h of reaction. The limit value of \overline{M}_w is due neither to the limitation of the substrate, which is not totally consumed, nor to the denaturation of enzyme, which remains active after 12 h. After 12 hours of reaction, the esculin continues to diminish showing that the enzyme is always active, but the size of the oligomers has reached its ceiling. This could be due to a lower reactivity of large oligomers comparing to smaller ones. The enzyme continues to catalyze the formation of esculin radical species, but these radicals are supposed to react preferentially with each other, rather than with large oligomers which are less reactive.

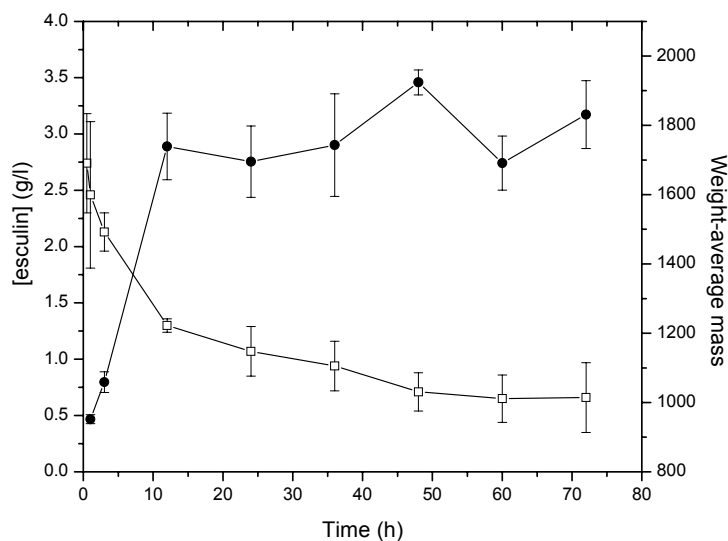


Figure 1: Kinetic study of the oligomerization reaction of esculin catalyzed by laccase from *Trametes versicolor*, in methanol/water (30:70, v/v), at 20 °C. □: concentration of esculin, ●: weight-average mass.

To establish the structure of esculin oligomers MALDI-TOF, UV, FTIR and NMR analyse were realized both on the bulk medium and on the enriched fractions of oligomers.

Structural investigation by MALDI-TOF, UV, and FTIR:

The determination of the absolute masses of oligomers by MALDI-TOF showed that, under the used conditions, the longer oligomer was a nonamer (Figure 2). The gap of mass due to the addition of one esculin monomer indicated the abstraction of two hydrogen atoms, showing that the connection mode between esculin units is a simple bridge. The UV-visible spectra of esculin and reaction medium containing the mixture of oligoesculins revealed two peaks around 204 and 336 nm. However, oligomers peaks were broader than those of esculin, which could be attributed to conjugated oligomeric structure²⁴. FTIR spectra of esculin and oligoesculin were similar; no new characteristic band was observed.

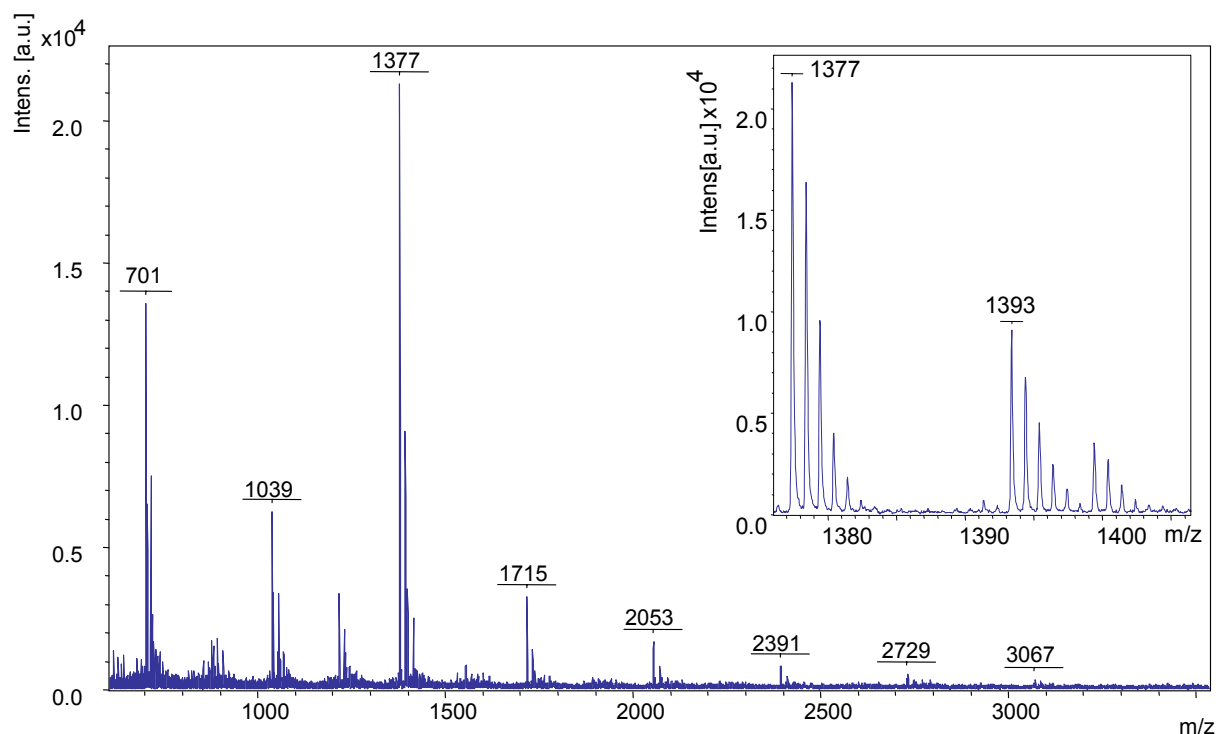


Figure 2: MALDI-TOF positive ion spectrum ($[M + Na \text{ or } K]^+$) in the reflectron mode of esculin oligomerization media and isotopic distribution of tetramer. Dihydroxybenzoic acid was used as matrix.

Structural investigation by NMR

The bulk medium after 24 h of incubation and oligomers enriched fractions were analyzed. ¹H-NMR spectra revealed broad signals both in aromatic and sugar zones and the apparition of new peaks around 7.5 ppm (Figure 3). These peaks could correspond to a downfield shift of the 5 H signal, due to the formation of a C4-O7 bridge, or an upfield shift of the 4 H signal due to the formation of a C3-C bridge. This profile suggests that several types of bridges should occur during the oligomerization of esculin, involving both the aromatic and the sugar parts of this compound. Moreover, NMR spectra indicated in one hand, the presence of residual esculin (340 g/mol) even in the retentat obtained with a 50 KDa membrane and in an other hand, a signal shift in the aromatic zone for sample issued from 1 KDa membrane retentat. The presence of residual esculin for high cut off membrane and the signal shift suggest a stacking phenomenon between aromatic rings. The stacking of phenolic species due to hydrophobic interactions is well known³⁰ and has already been observed in the case of quercetin by Desentis-Mendoza et al.²³.

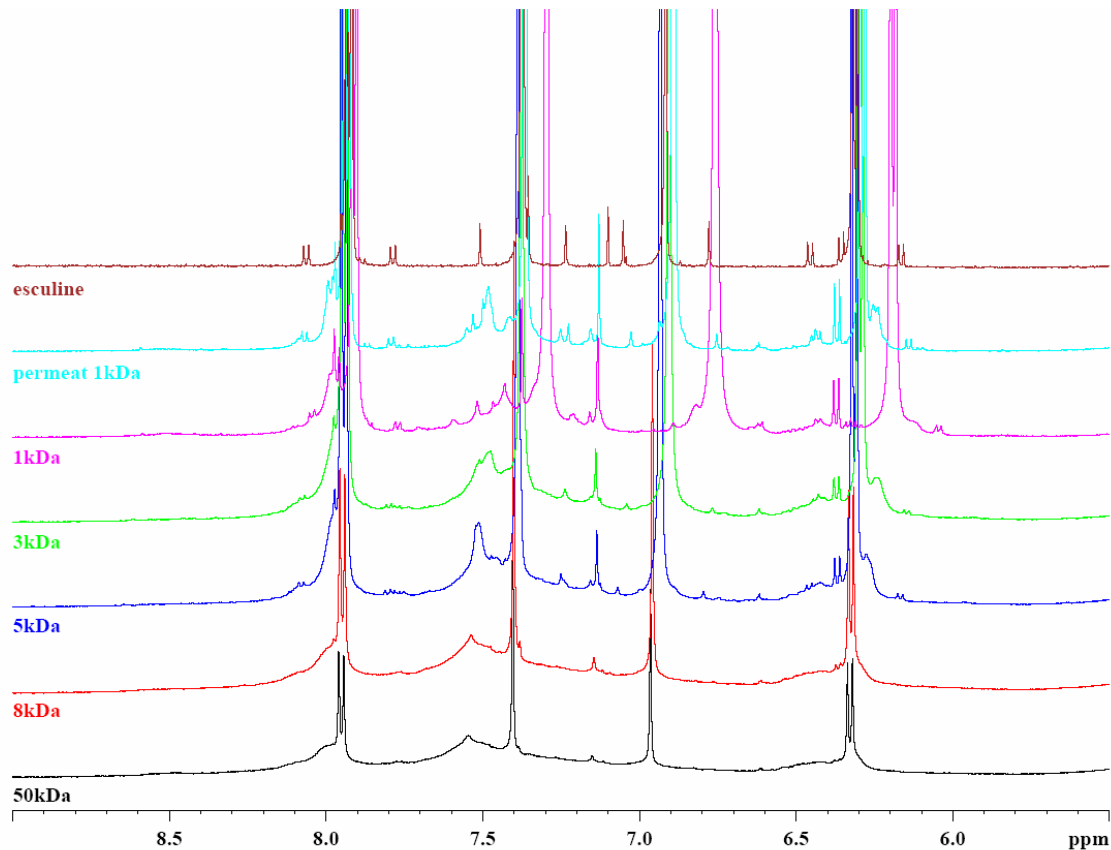


Figure 3: ^1H -NMR spectra (600 MHz by cryoprobe) of media containing esculin and its oligomers enriched fraction. Esculin (3 g/l) oligomerization was catalyzed by laccase *Trametes versicolor* (3 U/ml) in methanol/water (30:70, v/v), at 20 °C.

This stacking phenomenon was studied by molecular modeling. Four molecules of esculin (A,B,C, D) were introduced in a methanol/water cell and were minimized as described before. At the equilibrium of the system two esculins C and D were clearly piled up and positioned head to tail (Figure 4). The distances between their aromatics rings were about 3.64 and 4.08 Å.

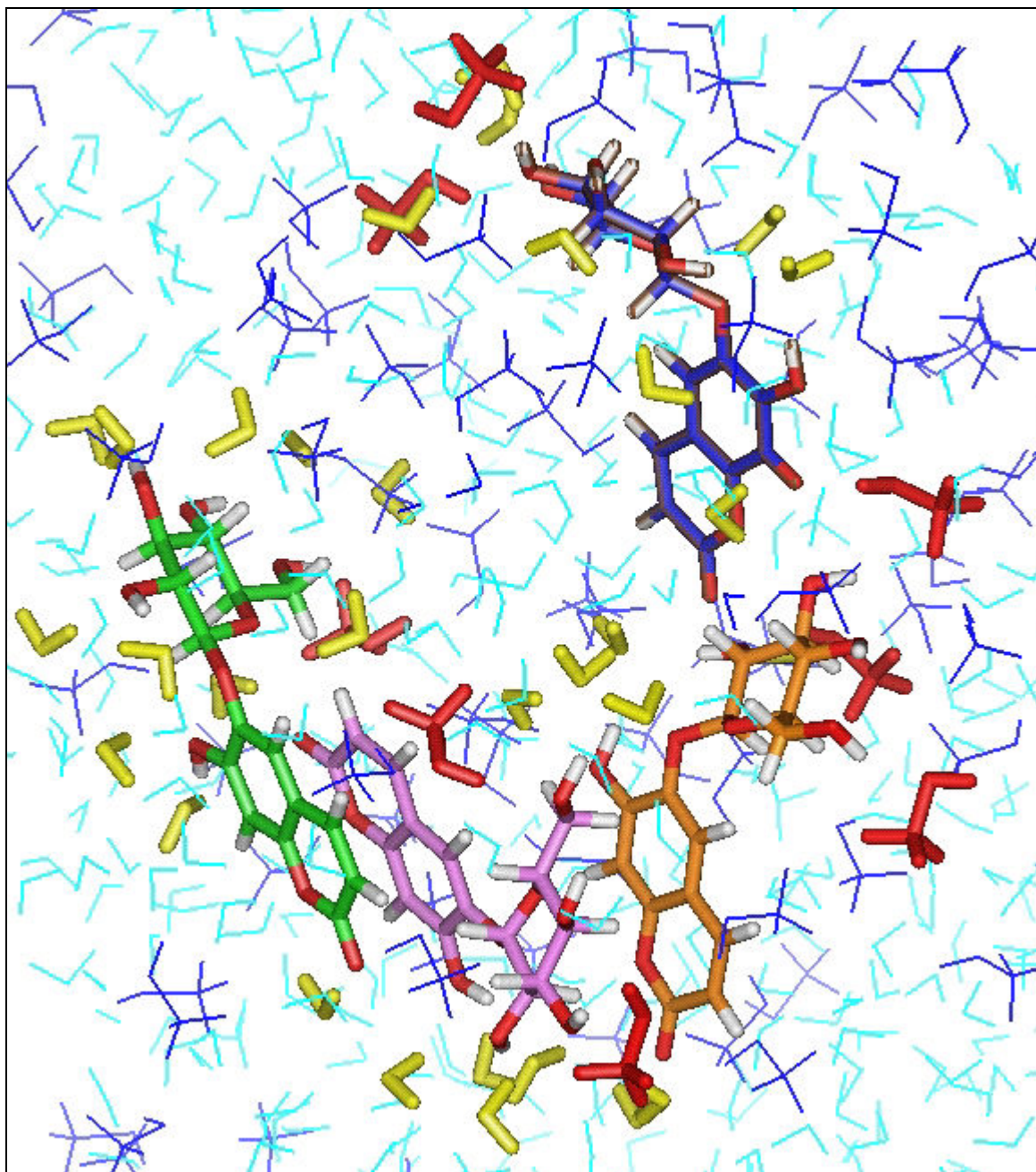


Figure 4 : Graphical representation of a 4 esculins system (A, B, C, D in blue, orange, violet and green respectively) in a methanol/water cell (30:70, v/v), the water and methanol molecules implicated in hydrogen bond with the esculins are indicated in yellow and red, respectively.

Solubility study.

The solubility of esculin was 3.70 in water and 5.96 g/l in methanol/water (30:70, v/v, 20 °C). The solubility of oligomers of esculin was around 700 g/l in water and 0.4 g/l in methanol/water. In order to understand such variations of solubility and especially the low solubility of oligomers in methanol/water mixture, the interactions between esculin, diesculin

(O7-C4) and the solvent (water or methanol/water) were studied by molecular modeling then compared. The stable conformation of esculin was shown to form 9 H-bonds with water molecules and 11 H-bonds in the case of a methanol/water medium. These observations could explain why esculin is slightly less soluble in water than in methanol/water medium. For esculin dimer (based on a O7-C4 linkage) 22 H-bonds (Figure 5) were established with water molecules while only 4 H-bonds were observed with methanol/water medium. This behavior is consistent with experimental results.

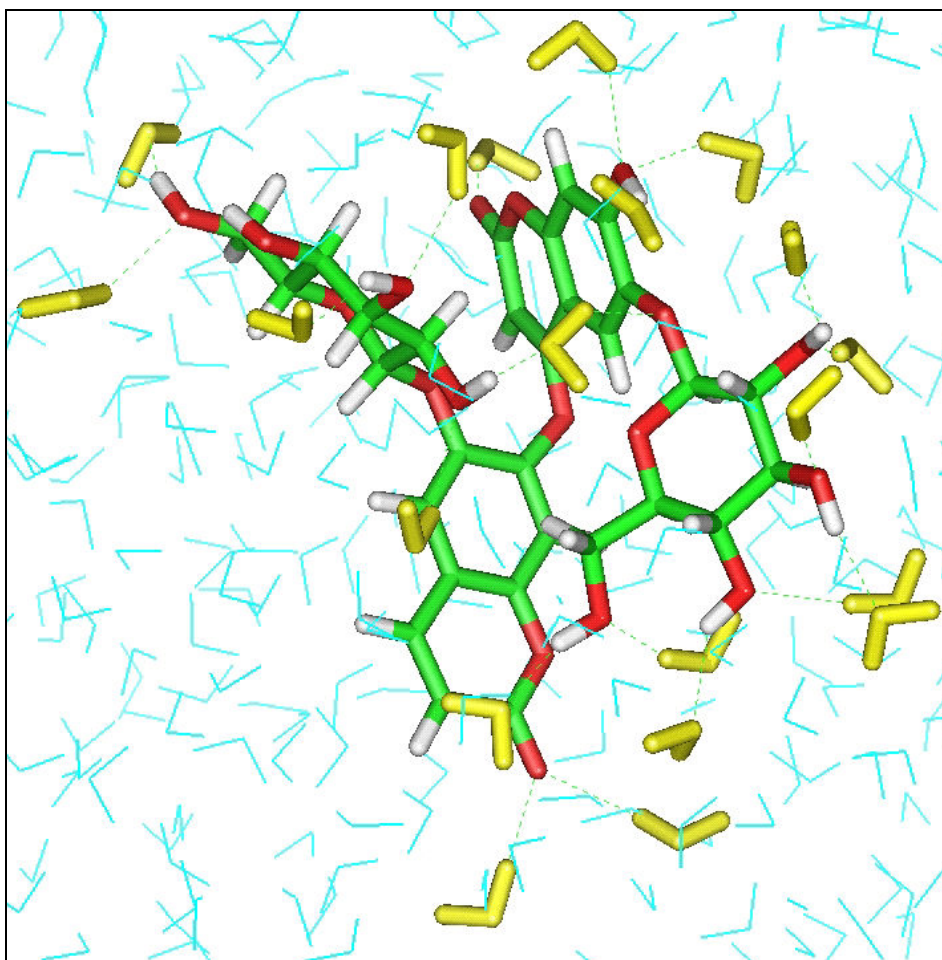


Figure 5: Graphical representation of esculin dimer (based on a O7-C4 linkage) in water, water molecules implicated in intermolecular hydrogen bonds with diesculin are indicated in yellow.

Study of xanthine oxidase inhibitory activity

Figure 6 shows xanthine oxidase inhibition activity of esculin and its oligomers, assessed by measuring uric acid formation from xanthine oxidase. IC 50 of oligomers appeared to be

lower than the IC₅₀ of esculin (770 μM). The IC₅₀ fell when increasing \overline{M}_w and stabilized around 150 μM. This evolution of the IC₅₀ with mass has been yet reported for catechin oligomers²¹. Taking into account the data described by Chang and Chiang²⁸ this behavior could be due to a substitution in the position 8.

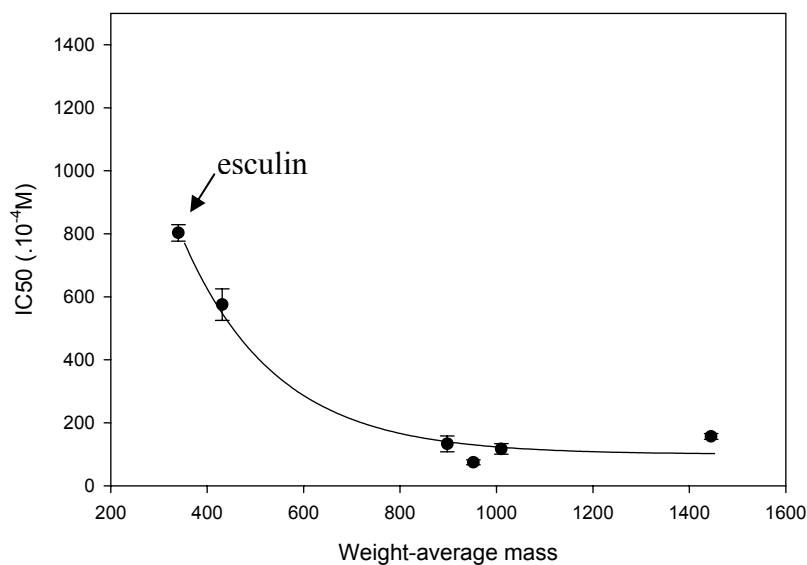


Figure 6: Influence of \overline{M}_w of esculin oligomers on their xanthine oxidase inhibitory activity. The inhibition of xanthine oxidase is expressed as the final concentration of inhibitor species that results in half-maximal velocity (IC₅₀), and compared to esculin activity.

Study of antiradical activity

The antiradical activity for each oligomeric fraction was evaluated. Results are reported on Figure 7. The IC₅₀ of esculin (9 mM) is 18 fold higher than the IC₅₀ of oligomers (0.5 mM). However, the degree of polymerization doesn't affect this activity. Different authors reported that the absence of the catechol moiety^{25,26} and/or the hydroxyl groups^{26,28} led to a decrease of the antiradical activity. These results show that these essential groups are not affected during the oligomerization of esculin. Moreover, the high scavenging activity of oligomers indicates a high capacity to stabilize radical species, which can be evaluated by the BDE³¹.

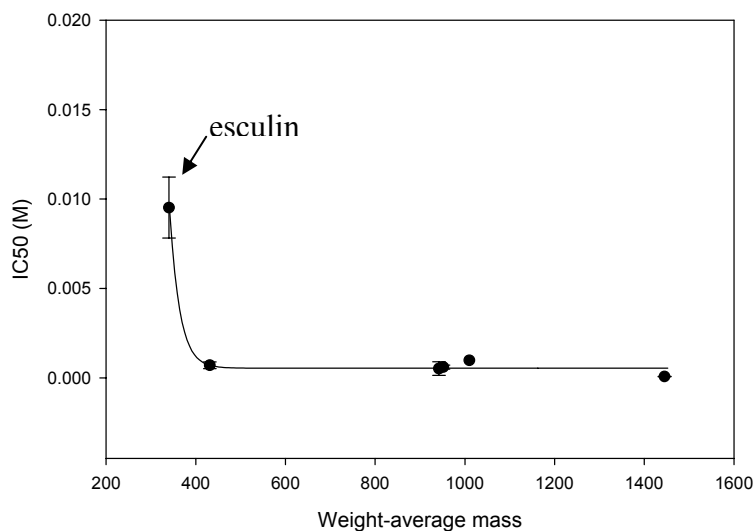


Figure 7: Influence of \overline{M}_w of esculin oligomers on their antiradical activity, determined by DPPH test. The antiradical activity is expressed as the final concentration of scavenger species that results in half-maximal DPPH decoloration (IC50), and compared to esculin activity.

To verify these assumptions molecular modeling of esculin and dimers was realized in vacuum. Four different structures of dimer corresponding to four linkage modes were modeled: O7-C4, C4-C5, C4-O2', C8-C8 (Figure 8).

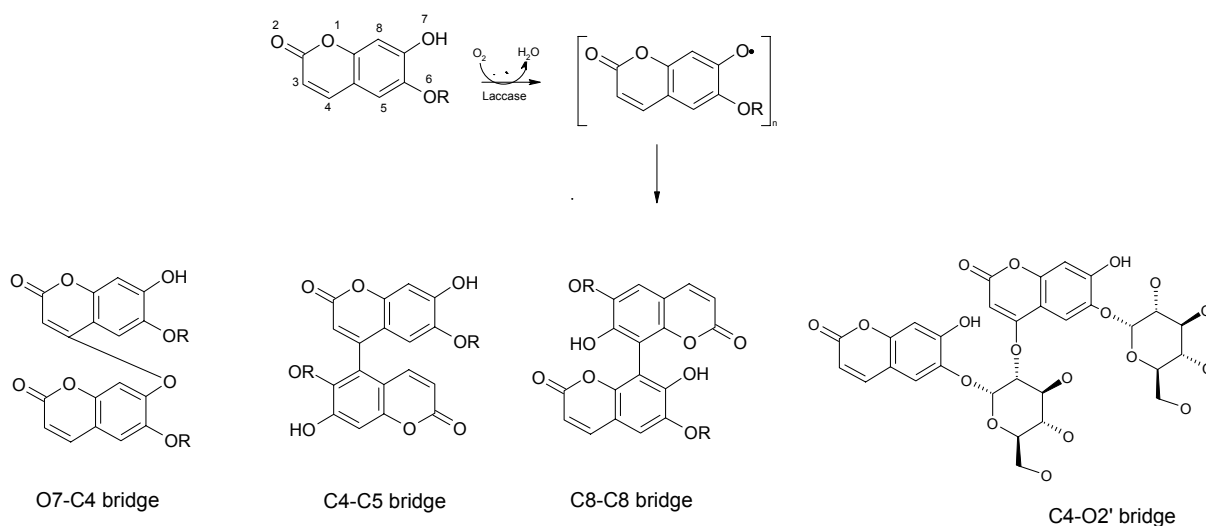


Figure 8: Reaction of esculin oligomerization catalyzed by laccase and molecular structures of four diesculins study by molecular modeling (R: glucose)

The dimers O7-C4, C4-C5 were chosen because they result from the association of the most stable radicals (Table 1).

Table 1: Heat of formation of esculin and its radicals in different positions, obtained from molecular minimization in vacuum, calculated by AM1.

	Esculin	Radical species : abstraction of a hydrogen atom from:				
		C3	C4	C5	O7	C8
ΔH (kcal/mol)	-350,17	-295,49	-298,34	-295,84	-321,74	-292,37
$\Delta H_{\text{esculin}} - \Delta H_{\text{radical}} = \text{BDE}^a$ (kcal/mol)		54,68	51,83	54,33	28,43	57,80

^a: Bond Dissociation Energy

NMR analysis of oligomers showed that linkage between aromatic part and glycosidic part of esculin units could occurred. That's why, the dimer C4-O2' was modeled. Finally, the dimer C8-C8 was studied because all essential groups remain free. The dimers were minimized as described before. Their BDE were estimated and compared to that of esculin (Table 2).

Table 2: Bond dissociation energy (BDE) of the O₇-H bond of esculin and its dimers, obtained from molecular minimization in vacuum, calculated by AM1.

	Esculin	Diesculin with linkage between:				
		O7-C4	C4-C5	C8-C8	C4-O2'	
ΔH (kcal/mol)	-350.17	-677.30	-688.15	-690.59	-681.71	
$\Delta \Delta H$ (kcal/mol)	BDE ₁	28.43	30.54	30.65	25.98	30.65
	BDE ₂			22.34	27.43	27.46

At least one BDE value of the dimers (C4-C5), (C8-C8) and (C4-O2') is lower than that of esculin. The dimer C8-C8 is characterized by two low BDE values which suggests a high scavenging activity. The dimer O7-C4 seems to be the less probable structure because its BDE is higher than that of esculin. The high antioxidant activity measured for esculin oligomers suggests that the dimer C8-C8 is the most probable, and the dimer O7-C4 the less

one. This assumption is in accordance with data reported by Ncanana *et al.*³², Intra *et al.*³³ and Mita *et al.*¹⁵ who observed a majority of C-C linkages, in the case of totarol, tetrahydro-2-naphtol and phenol polymerization.

Conclusions

Structural analyses of esculin oligomers showed that esculin units are linked by a simple bridge, which can occurred on both sugar part and phenolic part of the coumarin. Esculin oligomers are characterized by a very high solubility in water and a very bad one in methanol/water mixture. These observations have been correlated with the number of hydrogen bonds between oligomers and the solvent. The oligomers show a very high antioxidant activity compared with esculin. This interesting result suggests the preferential formation of C8-C8 linkages during esculin oligomerization.

References

- (1) Egan, D.; O'Kennedy, R.; Moran, E.; Cox, D.; Prosser, E.; Thornes, R. D., *Drug Metabol. Rev.* **1990**, 22, (5), 503.
- (2) Glenn, R. 2007.
- (3) Hiramoto, T.; Saiki, K.; Masumura, S.; Shimizu, T.; Yamashita, T.; Kaneko, N.; Maruta, Y. 2002.
- (4) Soeda, M.; Umehara, H.; Seiga, K.; Yoshida, T. 1997.
- (5) Sung Woo, K. KR20040097115, 2004.
- (6) Kostova, I., *Mini-Rev.Med.Chem.* **2006**, 6, (4), 365.
- (7) Yu, J.; Wang, L.; Walzem, R. L.; Miller, E. G.; Pike, L. M.; Patil, B. S., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (6), 2009.
- (8) Martin-Aragon, S.; Benedi, J.; Villar, A., *Phytother.Res.* **1996**, 10, (SUPPL. 1).
- (9) Chang, W. S.; Chiang, H. C., *Anticancer Res.* **1995**, 15, (5 B), 1969.
- (10) Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D., *J.Enzym.Inhib.Med.Chem.* **2003**, 18, (1), 63.
- (11) Cai, Y.; Baer-Dubowska, W.; Ashwood-Smith, M.; DiGiovanni, J., *Carcinogenesis* **1997**, 18, (1), 215.
- (12) Yu, D.; Suzuki, M.; Xie, L.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H., *Med.Res.Rev.* **2003**, 23, (3), 322.
- (13) Akita, M.; Tsutsumi, D.; Kobayashi, M.; Kise, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, 65, (7), 1581-1588.
- (14) Dordick, J. S.; Marletta, M. A.; Klibanov, A. M., *Biotech.Bioeng.* **1987**, 30, 31-36.
- (15) Mita, N.; Tawaki, S. I.; Uyama, H.; Kobayashi, S., *Macromol.Biosci.* **2003**, 3, 253-257.
- (16) Oguchi, T.; Tawaki, S. I.; Uyama, H.; Kobayashi, M., *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **2000**, 73, 1389-1396.
- (17) Uyama, H.; Kurioka, H.; Kobayashi, S., *Polym. J.* **1997**, 29, (2), 190-192.
- (18) Ayyagari, M.; Akkara, J. A.; Kaplan, D. L., Solvent-enzyme-polymer interactions in the molecular-weight control of poly(m-cresol) synthesis in nonaqueous media. In *Enzymes in polymer synthesis*, Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G., Eds. ACS symposium series 684: Washington, 1998; pp 112-124.
- (19) Kim, Y. H.; An, E. S.; Song, B. K.; Kim, D. S.; Chelikani, R., *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 1521-1524.
- (20) Dubey, S.; Singh, D.; Misra, R. A., *Enzyme Microb.Technol.* **1998**, 23, 432-437.
- (21) Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Kim, Y. J.; Uyama, H.; Kobayashi, S., *Biomacromolecules* **2003**, 4, (3), 469-471.
- (22) Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S., *Macromol.Biosci.* **2003**, 3, 758-764.
- (23) Desentis-Mendoza, R. M.; Hernandez-Sanchez, H.; Moreno, A.; Rojas del C, E.; Chel-Guerrero, L.; Tamariz, J.; Jaramillo-Flores, M. E., *Biomacromolecules* **2006**, 7, (6), 1845-1854.
- (24) Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S., *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1394-1399.
- (25) Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M. T.; Ruberto, G., *J.Agric.Food Chem.* **1996**, 44, 497-501.
- (26) Kaneko, T.; Baba, N.; Matsuo, M., *Chemico-Biological Interactions* **2003**, 142, (3), 239.
- (27) Zhang, H. Y.; Wang, L. F., *THEOCHEM* **2004**, 673, (1-3), 199.
- (28) Chang, W. S.; Chiang, H. C., *Anticancer Research* **1995**, 15, 1969-1974.
- (29) Burda, S.; Oleszek, W., *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2774-2779.
- (30) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2001**, (5), 651.

- (31) Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L., *Food Chemistry* **2004**, 88, (4), 571-582.
- (32) Ncanana, S.; Baratto, L.; Roncaglia, L.; Riva, S., *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1507-1513.
- (33) Intra, A.; Nicotra, S.; S., R.; Danieli, B., *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, (7-8), 973-977.
- (34) Nicotra, S.; Intra, A.; Ottolina, G.; Riva, S.; Danieli, B., *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, (18), 2927.

Contribution de l'article

Ces travaux se sont portés sur la polymérisation enzymatique de l'esculine catalysée par la laccase de *Trametes versicolor*.

Les résultats obtenus montrent que la cinétique de l'oligomérisation de l'esculine est lente. A 72 h, la Mw et la concentration en substrat résiduelle sont respectivement de 1800 g/mol et 0.7 g/l.

L'analyse par MALDI-TOF a démontré la formation d'un simple pontage liant deux unités successives d'esculine et ce jusqu'au degrés de polymérisation 9.

Les analyses structurales par UV, FTIR et RMN n'ont pu aboutir à la détermination du type et de la localisation du mode de pontage. Néanmoins, la présence de nouveaux pics aux alentours de 7.5 ppm, sur le spectre ¹H-RMN des oligomères d'esculine, a été observée. Ils pourraient être due à la formation d'un pontage de type C4-O7 ou C3-C. L'analyse par RMN a permis, également, de mettre en évidence un phénomène d'empilement de l'esculine ; ce phénomène a été corrélé aux résultats obtenus par modélisation moléculaire.

L'oligomérisation de l'esculine permet d'augmenter sa solubilité dans l'eau, en revanche, elle diminue sa solubilité dans un milieu méthanol/eau. Pour expliquer cette observation nous avons entrepris des investigations de modélisation moléculaire. Les résultats obtenus ont permis de corrélérer les observations expérimentales aux nombres de liaisons hydrogène établies entre la molécule de soluté et les molécules de solvant identifiées par modélisation moléculaire.

Enfin, les résultats obtenus indiquent que l'augmentation de la masse des oligomères se traduit par un accroissement du pouvoir antiradicalaire tout comme de l'activité d'inhibition de la xanthine oxydase. Grâce à la modélisation moléculaire, l'accroissement du pouvoir antiradicalaire a pu être mis en relation avec un pontage de type C-C localisé en position 8 de l'esculine. En effet, ce pontage mène, selon les résultats obtenus par modélisation moléculaire, à la plus forte augmentation du pouvoir antioxydant

En conclusion, au cours de ce travail, différentes corrélations ont pu être établies entre l'étude structurale par approche expérimentale, l'étude structurale par modélisation moléculaire et les augmentations de propriétés observées.

CHAPITRE V.

MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

Chapitre V. : Modélisation Moléculaire

1. CONTRIBUTION DE LA MODELISATION MOLECULAIRE A LA DETERMINATION DE LA REACTIVITE DES ESPECES RADICALAIRES	165
1.1. DÉTERMINATION DES CONFORMÈRES LES PLUS STABLES	166
1.1.1. Cas de la rutine	166
1.1.2. Cas de l'esculine.....	168
1.2. DÉTERMINATION DE L'ESPÈCE RADICALAIRE LA PLUS STABLE.....	170
1.2.1. Cas de la rutine	170
1.2.2. Cas de l'esculine.....	172
1.3. CONCLUSIONS	173
2. CONTRIBUTION DE LA MODELISATION MOLECULAIRE A L'ANALYSE DE LA VARIATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES	174
2.1. DÉFINITION DU PONTAGE LE PLUS PROBABLE PAR ÉTUDE DES OLIGOMÈRES DANS LE VIDE	175
2.1.1. Cas des oligorutines	175
2.1.2. Cas des oligoesculines.....	178
2.2. RECHERCHE DE CORRÉLATIONS DESCRIPTEURS/ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE.....	181
2.2.1. Cas des dimères de rutine	182
2.2.2. Cas des oligoesculines	185
2.3. CONCLUSIONS	188
3. ANALYSE DES INTERACTIONS SOLUTE/SOLVANT ET SOLVANT/SOLUTE PAR MODELISATION MOLECULAIRE	189
3.1. MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE LA RUTINE ET DE SES OLIGOMÈRES DANS L'EAU ET DANS UN MILIEU MÉTHANOL/EAU	189
3.1.1. Modélisation moléculaire de la rutine et de ses oligomères dans l'eau	190
3.1.1.1. Cas de la rutine.....	190
3.1.1.2. Cas des dirutines.....	191
3.1.1.3. Cas de l'héxarutine.....	193
3.1.2. Etude des interactions d'un mélange de rutine ou de dirutine dans un milieu méthanol/eau.....	195
3.1.2.1. Etude du système: quatre rutines dans un mélange méthanol/eau	195
3.1.2.2. Etude du système: deux dirutines dans un mélange méthanol/eau	196
3.1.3. Interprétations structure/fonction et conclusions	198
3.2. MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE L'ESCULINE ET DE SES OLIGOMÈRES DANS L'EAU OU DANS UN MILIEU MÉTHANOL/EAU	199
3.2.1. Modélisation moléculaire de l'esculine et de ses oligomères dans l'eau.....	199
3.2.1.1. Cas de l'esculine.....	199
3.2.1.2. Cas des diesculines.....	200
3.2.1.3. Cas du nonamère d'esculine	202
3.2.2. Etude des interactions d'un mélange de molécules d'esculine ou de diesculine dans un milieu méthanol/eau	204
3.2.2.1. Etude du système: quatre esculines dans un mélange méthanol/eau.....	204

3.2.2.2. Etude du système: deux diescalines dans un mélange méthanol/eau.....	205
3.2.4. <i>Interprétations structure/fonction et conclusions</i>	207

Tableaux

Tableau V.1. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des conformères de la rutine.....	168
Tableau V.2. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des conformères de l'esculine.....	170
Tableau V.3. Comparaison des enthalpies de formation et du moment dipolaire de la rutine et de ses radicaux.	171
Tableau V.4. Comparaison des propriétés énergétiques et structurales de l'esculine et de ses radicaux.	173
Tableau V.5. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des dirutines obtenues par mécanique moléculaire (cff).	175
Tableau V.6. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des diesculines par mécanique moléculaire (cff).	179
Tableau V.7. Comparaison des propriétés électroniques et énergétiques de la rutine et de ses dimères.	183
Tableau V.8. Impact des descripteurs des dirutines sur le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase.....	184
Tableau V.9. Comparaison des propriétés électroniques et énergétiques de l'esculine et de ses dimères.	186
Tableau V.10. Impact des descripteurs des diesculines sur le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase.	187
Tableau V.11. Analyse de la trajectoire des dirutines liées en O4'-C6', C6'-C6' et C2'-C2'.	192
Tableau V.12. Impacts de l'oligomérisation de la rutine sur la solubilité et sur l'agrégation.	198
Tableau V.13. Analyse de la trajectoire des diesculines liées en O7-C4 et C4-C5.....	201
Tableau V.14. Impacts de l'oligomérisation de l'esculine sur la solubilité et sur l'agrégation.	207

Figures

Figure V.1. Définition des angles de flexibilité et numérotation de la rutine.	166
Figure V.2. Analyse de la trajectoire issue de la dynamique à 600 K de la rutine.....	167

Figure V.3.	Définition des angles de flexibilité et numérotation de l'esculine.....	169
Figure V.4.	Analyse de la trajectoire issue de la dynamique à 600 K de l'esculine.....	169
Figure V.5.	Représentation de la HOMO et de la LUMO de la structure optimisée de la rutine.	171
Figure V.6.	Représentation de la HOMO et de la LUMO de la structure optimisée de l'esculine.	172
Figure V.7.	Formes de résonance du radical phenoxy dans le cas de la rutine et l'esculine.	174
Figure V.8.	Conformère le plus stable et ensemble des conformères des dirutines liées en O4'-C6', C6'-C6' et C2'-C2'.....	177
Figure V.9.	Conformation la plus stable et analyse de la trajectoire de l'héxarutine liée en O4'-C6'.....	178
Figure V.10.	Conformère le plus stable et ensemble des conformères des diesculines liées en O7-C4 et C4-C5.....	180
Figure V.11.	Conformation la plus stable du nonamère d'esculine liée en O7-C4.....	181
Figure V.12.	Modélisation d'une molécule de rutine dans une cellule cubique d'eau de 40 Å de côté, contenant 1294 molécules d'eau, cutoff de 14.0 Å.....	190
Figure V.13.	Modélisation des liaisons hydrogène rutine/eau.....	191
Figure V.14.	Modélisation des liaisons hydrogène des dirutines liées en O4'-C6', C6'-C6' et C2'-C2' avec l'eau.....	192
Figure V.15.	Modélisation des liaisons hydrogène héxarutine/eau.....	194
Figure V.16.	Modélisation des interactions hydrogène établies dans un mélange de 4 rutines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v : v).....	196
Figure V.17.	Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 2 dirutines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v).....	197
Figure V.18.	Modélisation des liaisons hydrogène esculine/eau.....	200
Figure V.19.	Modélisation des liaisons hydrogène entre les diesculines liées en O7-C4 et C4-C5 avec l'eau.....	201
Figure V.20.	Modélisation des liaisons hydrogène nonamère d'esculine/eau.....	203
Figure V.21.	Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 4 esculines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v).....	205
Figure V.22.	Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 2 diesculines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v).....	206

Chapitre V. Modélisation moléculaire

Les résultats de l'oligomérisation de la rutine et de l'esculine ont montré expérimentalement, la formation de pontage de type C-C et C-O localisés tout aussi bien sur la partie sucre que sur la partie phénolique des unités monomériques. De plus, l'oligomérisation de la rutine a induit une baisse du pouvoir antiradicalaire et une augmentation de l'activité d'inhibition de la xanthine oxydase et de la solubilité dans l'eau des oligomères formés, alors que l'oligomérisation de l'esculine a permis d'augmenter à la fois la solubilité, l'activité antiradicalaire et l'activité d'inhibition de la xanthine oxydase. Pour comprendre et expliquer ces résultats expérimentaux, une approche par modélisation moléculaire a été réalisée. Elle porte sur :

- L'étude de la stabilité des espèces radicalaires de la rutine et de l'esculine afin de comprendre le mécanisme de la réaction radicalaire ayant abouti aux pontages observés expérimentalement.
- L'étude de descripteurs électroniques, énergétiques et géométriques afin de déterminer d'éventuelles corrélations entre ces descripteurs et les variations du pouvoir antioxydant observées expérimentalement.
- L'étude conformationnelle dans un solvant des monomères et des oligomères afin d'expliquer les modifications de solubilité et de dispersion observées expérimentalement.

Ces trois axes d'étude ont été menés sur la rutine, l'esculine et leurs oligomères

1. Contribution de la modélisation moléculaire à la détermination de la réactivité des espèces radicalaires

Pour comprendre les mécanismes réactionnels aboutissant à la formation des oligomères, une étude conformationnelle a été réalisée par mécanique moléculaire utilisant le champ de force *eff*. Cette étude permet d'une part, d'identifier, pour chaque flavonoïde, la conformation

la plus stable à partir de laquelle seront générées les espèces radicalaires, et d'autre part, d'analyser les repliements et la flexibilité de la molécule.

A partir de la conformation la plus stable, une analyse par méthode semi-empirique (AM1) de la molécule parent et de ses radicaux a été réalisée. La comparaison des enthalpies de formation de la molécule parent et de ses radicaux, nous renseigne sur la réactivité de chaque espèce et ainsi peut nous informer sur le mécanisme réactionnel susceptible d'avoir lieu au cours de la réaction de polymérisation.

1.1. Détermination des conformères les plus stables

1.1.1. Cas de la rutine

La flexibilité de la rutine est caractérisée par 5 angles de torsion θ , α , β , γ , δ . Ces angles définissent la position du cycle B par rapport à la partie chromane (θ), celle du glucose par rapport à la génine (α , β) et celle du rhamnose par rapport au glucose (γ , δ). La définition des angles de flexibilité et la numérotation sont indiquées Figure V.1.

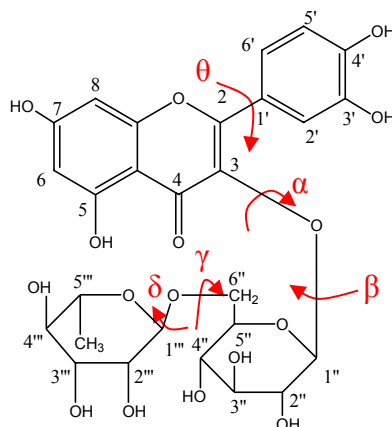


Figure V.1. Définition des angles de flexibilité et numérotation de la rutine.

Suite à une dynamique moléculaire à 600 K, un ensemble de conformères a été retenu, selon des critères énergétiques et structuraux. Après élimination des conformères redondants, les 16 structures restantes sont à nouveau minimisées à 300 K puis analysées. L'étude de ces 16 conformations indique que la partie glycosylée de la rutine est très flexible et se déplace de part et d'autre de la partie aglycone (Figure V.2), et que le cycle B décrit un mouvement circulaire autour de la liaison C2-C1'.

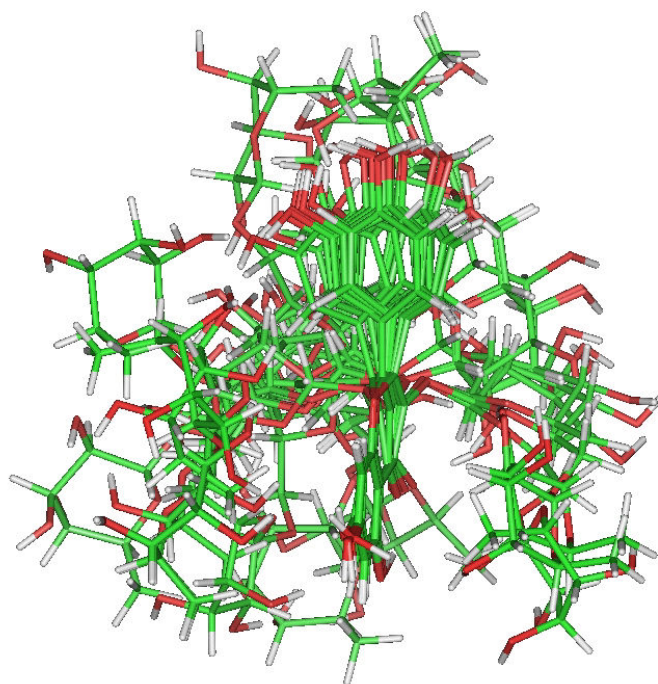


Figure V.2. Analyse de la trajectoire issue de la dynamique à 600 K de la rutine (superposition par les cycles A et C).

La mise en place de plusieurs liaisons hydrogène intramoléculaires a été mise en évidence (Tableau V.1.). Le nombre et la localisation des liaisons hydrogène intramoléculaires varient en fonction de la conformation, mais la liaison hydrogène $\text{OH}_5\text{---O}_4$ entre l'hydroxyle en C_5 et la fonction carbonyle est maintenue quelque soit le conformère. En revanche, le nombre et la position des autres liaisons intramoléculaires sont variables et s'établissent, selon les conformations, entre:

- le cycle B et le rhamnose entraînant un repliement de la molécule (conformère 1)
- la fonction carbonyle et le rhamnose ou le glucose (conformères 3, 4 et 5)
- la fonction hydroxyle en C_7 et le rhamnose (conformère 6)
- la fonction hydroxyle en C_3' du cycle B et le rhamnose (conformère 5)
- entre le glucose et le rhamnose (conformères 3, 8, 10, 14 et 16)

La proximité spatiale entre la partie sucre et les hydroxyles du cycle B observée dans ce travail est conforme aux résultats rapportés par Zhang et Brodbelt [211]. De même, la formation d'une liaison hydrogène entre OH_2'' et la fonction carbonyle est conforme aux observations de Alluis [174]. Ces deux observations sont à corrélérer respectivement avec les conformères (1 et 5) et (4 et 5) observés dans cette étude.

Tableau V.1. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des conformères de la rutine.

Conformères	Enthalpie (kcal/mol)	Distance entre le cycle A et le rhamnose (Å) ^a	Liaisons H			
			Nombre	Type		
1	-20.42	5.59	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₃ '---OH ₄ '''	
2	-18.64	4.84	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₄ '''---O ₅ H	
3	-15.80	12.09	3	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---O ₄	OH ₂ '''---OH ₄ '''
4	-15.42	11.42	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---O ₄	
5	-15.12	11.74	3	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---O ₄	OH ₃ '---O _{rha}
6	-15.04	5.52	3	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---O _{glc}	OH ₇ '---OH ₄ '''
7	-14.81	5.28	1	OH ₅ ---O ₄		
8	-14.63	8.61	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---OH ₄ '''	
9	-14.35	5.61	1	OH ₅ ---O ₄		
10	-14.29	4.67	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---O _{glc}	
11	-13.98	5.17	1	OH ₅ ---O ₄		
13	-12.47	5.18	1	OH ₅ ---O ₄		
14	-11.40	8.64	3	OH ₅ ---O ₄	OH ₂ '''---OH ₃ '	OH ₄ '''---O _{pont} osidique
15	-9.97	11.56	1	OH ₅ ---O ₄		
16	-9.10	9.49	2	OH ₅ ---O ₄	OH ₄ '''---O _{pont} osidique	

^a: pour chaque cycle un pseudo-atome (localisé à équidistance des 6 atomes du cycle) a été pris comme référence

Afin d'évaluer le repliement de la rutine, 2 pseudo-atomes ont été créés au centre du cycle A et au centre du rhamnose. La distance les séparant fluctue entre 4.67 et 12.09 Å (Tableau V.1). Selon ces résultats, le nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires et le repliement de la molécule n'expliquent pas à eux seuls la stabilité des conformations.

La conformation la plus stable (conformère 1 du tableau V.1.), c'est-à-dire celle présentant la plus faible enthalpie a été retenue pour les calculs de réactivité.

1.1.2. Cas de l'esculine

La flexibilité de l'esculine est caractérisée par 2 angles de torsion α et β . Ces angles définissent la position du glucose par rapport à la génine (α , β). La définition des angles de flexibilité et la numérotation sont indiquées Figure V.3.

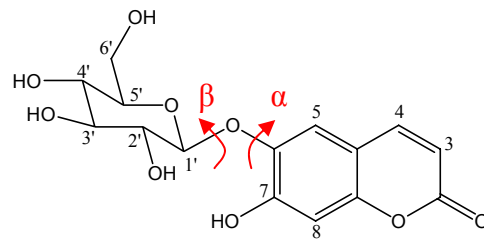


Figure V.3. Définition des angles de flexibilité et numérotation de l'esculine.

Après dynamique moléculaire (600 K) et minimisation, les 7 conformères retenus montrent que l'esculine présente une structure beaucoup moins flexible que celle de la rutine. Lors de l'analyse de la trajectoire, il apparaît que de nombreuses liaisons hydrogène s'établissent au sein du glucose à haute température, mais que ces interactions sont en nombre plus limité au sein du système minimisé à 300 K (Figure V.4., Tableau V.2.).

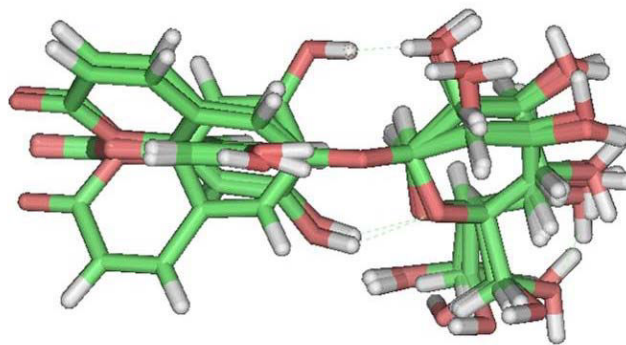


Figure V.4. Analyse de la trajectoire issue de la dynamique à 600 K de l'esculine (superposition par les atomes C6-O-C1').

Le groupement hydroxyle en position 7 est souvent impliqué dans une liaison hydrogène avec le glucose.

La distance séparant les deux pseudo-atomes créés dans le cycle A et le glucose varie peu, ce qui indique que cette molécule est rigide.

Tableau V.2. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des conformères de l'esculine.

Conformères	Enthalpie (kcal/mol)	Distance entre le cycle A et le glucose (Å) ^a	Liaisons H	
			Nombre	Type
1	12.71	7.28	2	OH ₇ ---OH ₂ , OH ₄ '---OH ₅ '
2	14.17	7.69	1	OH ₇ ---OH ₂ '
3	17.03	7.55	2	OH ₇ ---O _{glc} , OH ₄ '---OH ₅ '
4	19.90	7.00	0	
5	21.24	6.76	0	
6	22.19	7.44	1	OH ₇ ---O _{glc}
7	23.62	6.97	0	

^a: pour le cycle A un pseudo-atome (localisé à équidistance des 6 atomes du cycle) a été pris comme référence

Le conformère 1 caractérisé par la plus faible enthalpie a été retenu pour les calculs de réactivité (Tableau V.2.).

1.2. Détermination de l'espèce radicalaire la plus stable

Afin de déterminer la position du radical qui est susceptible d'être formé en priorité par l'enzyme, les propriétés électroniques, représentatives de la distribution de charges des conformères les plus stables et les propriétés énergétiques de leurs radicaux ont été déterminées par AM1.

1.2.1. Cas de la rutine

L'espèce radicalaire attaquera préférentiellement les atomes présentant une forte densité électronique, c'est-à-dire sur la HOMO [212]. Ainsi, pour déterminer la localisation de l'espèce radicalaire susceptible d'être formée en priorité au cours de la réaction d'oligomérisation, les localisations de la HOMO et de LUMO de la conformation la plus stable de la rutine ont été évaluées par méthode semi-empirique. Dans le cas de la rutine, la conformation la plus stable présente une HOMO et une LUMO de -8.81 eV et -0.88 eV respectivement, toutes deux localisées sur la partie aglycone de la rutine (Figure V.5.).

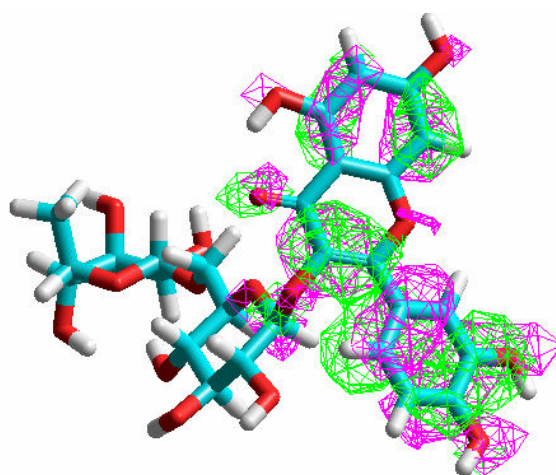


Figure V.5. Représentation de la HOMO (rose) et de la LUMO (vert) de la structure optimisée de la rutine.

Compte tenu du fait que la HOMO est localisée préférentiellement sur la partie aglycone de la rutine, 5 radicaux carbonés et 4 radicaux hydroxyles ont été créés sur cette partie. Afin de définir le radical le plus probablement formé, les enthalpies de formation de ces radicaux ont été reportées dans le Tableau V.3 et comparées à ceux de la rutine. En plus de ce descripteur, un ensemble de descripteurs électroniques, énergétiques et structuraux a été déterminé et reporté en annexe 2.

Tableau V.3. Comparaison des enthalpies de formation de la rutine et de ses radicaux.

	Rutine	Radicaux phénoxy en position :				Radical carbone en position:				
		O3'	O4'	O7	O5	C2'	C5'	C6'	C8	C6
ΔH (kcal/mol)	-630.08	-604.35	-609.11	-598.29	-594.51	-537.06	-578.41	-578.30	-570.83	-572.85
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol): BDE		25.73	20.97	31.79	35.57	93.02	51.67	51.78	59.25	57.23

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), $\Delta\Delta H$ (BDE) : variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol)

Il apparaît de ce tableau que les enthalpies de formation des radicaux hydroxyles sont plus faibles que les enthalpies de formation des radicaux carbonés. Le radical formé en position C2' possède le plus fort BDE, et l'enthalpie de formation la plus élevée; il semble donc être le radical le plus instable. Par contre, le radical formé en position O4' a le BDE et l'enthalpie de formation les plus faibles; il serait le radical le plus stable. Ce résultat est

comparable à celui rapporté par de Russo *et al.* [213] qui observent que les radicaux formés en 4' et 3' de la quercétine sont les plus stables.

Selon ces résultats, il est probable qu'au cours de la réaction d'oligomérisation de la rutine catalysée par la laccase, une espèce radicalaire portée par l'hydroxyle en 4' soit formée. Il en ressort également que parmi les radicaux portés par un carbone, les positions 5' et 6' sont les plus favorables pour générer le radical le plus stable.

1.2.2. Cas de l'esculine

Dans le cas de l'esculine, la conformation la plus stable présente une HOMO et une LUMO de -9.14 eV et -0.92 eV respectivement. Toutes deux localisées sur la partie aglycone de l'esculine (Figure V.6).

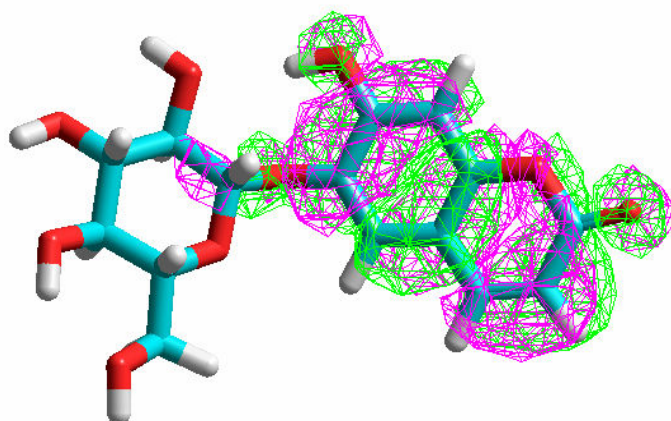


Figure V.6. Représentation de la HOMO (rose) et de la LUMO (vert) de la structure optimisée de l'esculine.

Afin de déterminer les radicaux susceptibles d'être créés lors de la réaction d'oligomérisation, 4 radicaux carbonés et 1 radical hydroxyle ont été générés, comme pour la rutine, sur la partie aglycone de l'esculine. Pour déterminer le radical susceptible d'être formé, les enthalpies de formation de ces radicaux ont été calculés et reportés dans le Tableau V.4 et comparés à ceux de l'esculine. En plus de ce descripteur, un ensemble de descripteurs électroniques, énergétiques et structuraux complémentaires a été évalué et reporté en annexe 3.

Tableau V.4. Comparaison des propriétés énergétiques et structurales de l'esculine et de ses radicaux.

	Esculine	Radical phénoxy en position:	Radical carbone en position:			
		O7	C3	C4	C5	C8
ΔH (kcal/mol)	-350.17	-321.74	-295.49	-298.34	-295.84	-292.37
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol): BDE		28.43	54.68	51.83	54.33	57.80

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol) , $\Delta\Delta H$ (BDE) : variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol)

Ce tableau montre que les enthalpies de formation du radical phénoxy en position 7 de l'esculine et le radical carbone en position 4 sont les plus faibles. Il est donc probable que l'espèce radicalaire majoritairement formée soit portée par l'oxygène en position 7 de l'esculine. De plus, si l'espèce radicalaire formée est portée par un carbone, le radical sera préférentiellement localisé en position 4.

1.3. Conclusions

D'après cette étude de modélisation moléculaire, il apparaît que le radical O_4^\bullet de la rutine est le plus stable. Une fois dans le milieu, celui-ci peut agir comme propagateur de la réaction formant ainsi des pontages C-O. Il peut aussi se délocaliser (Figure V.7.) ou encore agir comme agent de transfert radicalaire conduisant à la formation de divers radicaux, notamment de type C^\bullet . Cette étude a également démontré que le radical $C2'^\bullet$ est le plus réactif. Cette réactivité est susceptible de favoriser les mécanismes de terminaison par combinaison de type : $C2'^\bullet + C2'^\bullet \rightarrow C2'-C2'$. Ceci expliquerait la présence du dimère ($C2'-C2'$) identifié par RMN.

En ce qui concerne l'esculine, il a été démontré au cours de cette étude que le radical $O7^\bullet$ est le plus stable. Tout comme pour le radical phénoxy de la rutine, une fois dans le milieu, ce radical peut être propagé ou délocalisé, formant des pontages de type C-C comme C-O.

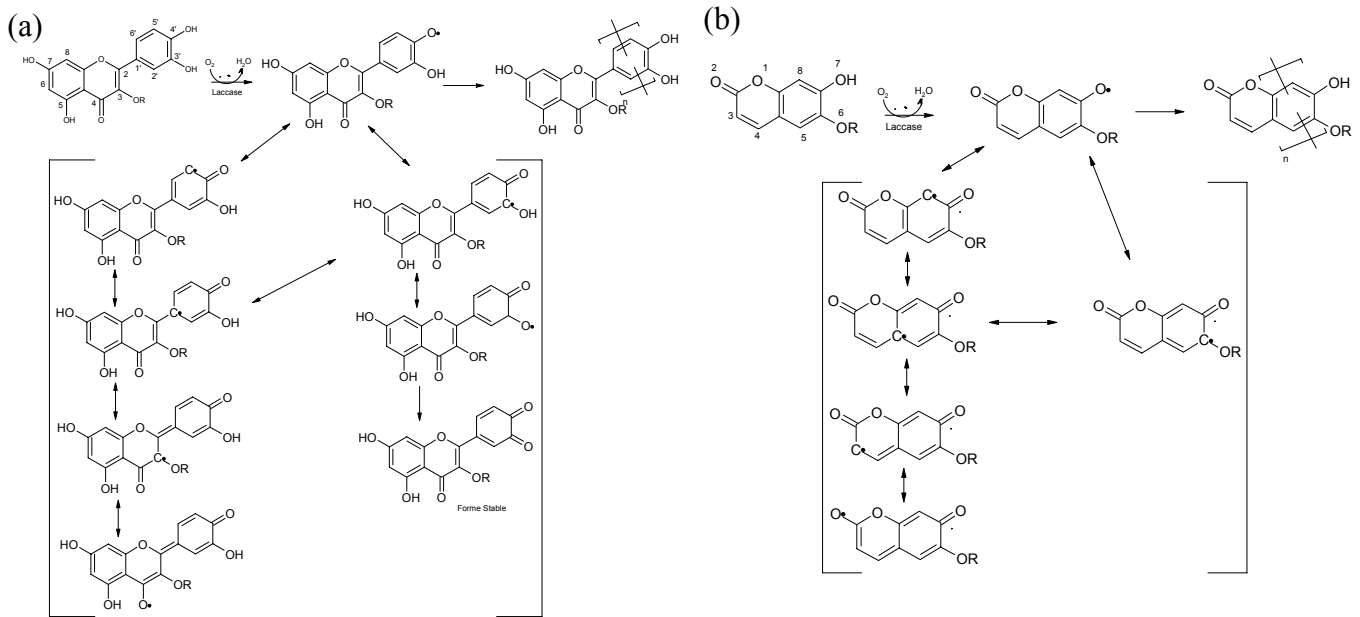


Figure V.7. Formes de résonance du radical phenoxy dans le cas de la rutine (a) et l'esculine (b).

2. Contribution de la modélisation moléculaire à l'analyse de la variation des activités antioxydantes

Pour comprendre les variations des activités antioxydantes observées expérimentalement, différentes étapes de modélisation moléculaire ont été nécessaires :

- les propriétés énergétiques et géométriques des différents types de dimères susceptibles d'être formés ont été évaluées et comparées, afin de définir les pontages les plus probablement formés lors de la réaction d'oligomérisation.

- En se basant sur le mode de pontage le plus probable, des structures oligomériques ont été créées et une étude conformationnelle par mécanique moléculaire de ces structures a été faite, afin de définir les conformations les plus stables.

- Enfin, une analyse par méthode semi-empirique des structures monomériques et dimériques les plus stables a permis d'aboutir aux différents descripteurs électroniques, énergétiques et géométriques. Ces différents descripteurs ont ensuite été corrélés aux activités antioxydantes expérimentales.

2.1. Définition du pontage le plus probable par étude des oligomères dans le vide

2.1.1. Cas des oligorutines

- Cas des dirutines

Dans le cas de la rutine, les radicaux formés sur le cycle B présentant des enthalpies de formation plus faibles que ceux des cycles A et C, l'ensemble des pontages impliquant le cycle B a été analysé. Les caractéristiques des conformères les plus stables obtenus pour chaque type de pontage sont regroupées dans le Tableau V.5..

Tableau V.5. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des dirutines obtenues par mécanique moléculaire (cff).

Pontage	Enthalpie de formation (kcal/mol)	Nombre de liaison H	Distance entre les 2 rhamnose (Å) ^a
O4'-C6'	-30.70	5	21.21
O3'-C6'	-28.50	2	12.27
O4'-C5'	-22.67	3	16.37
O3'-C5'	-21.79	3	15.12
O3'-C2'	-21.76	3	8.81
O4'-C2'	-21.34	10	9.45
C6'-C6'	62.88	2	11.45
C2'-C6'	67.99	2	3.28
C6'-C5'	69.63	3	14.37
C5'-C5'	70.92	3	10.64
C2'-C5'	74.82	3	13.03
C2'-C2'	78.05	4	13.10

^a: pour chaque cycle un pseudo-atome (localisé à équidistance des 6 atomes du cycle) a été pris comme référence

Il apparaît que selon le type de pontage, la structure dimérique de la rutine peut être stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires dont le nombre varie de 2 à 10. La liaison hydrogène précédemment observée sur la rutine entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en C5 est maintenue sur chacune des unités monomériques quel que soit le type de pontage.

La distance séparant les deux rhamnoses, caractéristique du degré de repliement de la dirutine, est comprise entre 3.28 et 21.21 Å selon le type de dirutine. La flexibilité de la partie

sucres de la rutine est conservée sur le dimère, seule la rotation du cycle B impliquée dans le pontage est altérée.

Les pontages O4'-C6' et O3'-C6' ont les enthalpies de formation les plus faibles avec respectivement des valeurs de -30.70 et -28.70 eV. Il est donc probable que ces deux types de liaisons soient favorisés lors du processus d'oligomérisation. A l'inverse, l'enthalpie de formation de la dirutine comportant une liaison C2'-C2' est la plus élevée avec une valeur de 78.05 eV, ce qui impliquerait que ce type de pontage soit défavorisé. Hors expérimentalement, ce type de structure a été détecté par RMN. Dans le cas d'un mélange, l'analyse par RMN caractérise les espèces majoritaires, il est donc probable que les autres types de pontage soient présents dans le milieu mais à des quantités plus faibles, comme démontré par Ncanana *et al.* [156]. Le radical en position C2' est le plus instable (Tableau V.3.), donc le plus réactif. Cette importante réactivité a pour effet de faciliter les couplages (C2'', C2''), ce qui peut expliquer la formation de dirutines liées en C2'-C2'.

D'après l'étude par RMN, il apparaît que l'oligomérisation de la rutine entraîne différents types de pontage. De plus, plusieurs études bibliographiques ont mis en évidence la présence de pontages C-O et C-C lors de l'oligomérisation d'espèces phénoliques catalysée par des oxydoréductases [155, 156, 214, 215]. Afin d'étudier ces deux types de pontages, les deux dirutines présentant les enthalpies de formation les plus faibles (O4'-C6' et C6'-C6') et la dirutine (C2'-C2) démontrée expérimentalement ont été retenues pour la suite de ce travail.

Une analyse conformationnelle de ces 3 structures a été réalisée par dynamique moléculaire. L'ensemble des conformations extraites de la dynamique ainsi que les structures les plus stables pour ces 3 pontages sont représentées Figure V.8..

Dans le cas des pontages O4'-C6' et C6'-C6', la flexibilité de la molécule permet aux sucres de se placer de part et d'autre des cycles aromatiques. En revanche dans le cas du pontage C2'-C2', les sucres se positionnent préférentiellement d'un seul côté de la molécule, ce qui conduit aux conformères les plus stables.

Dans le cas des conformères les plus stables, des liaisons hydrogène intramoléculaires s'établissent au nombre de 5, 2 et 3 pour les pontage O4'-C6', C6'-C6' et C2'-C2'

respectivement.

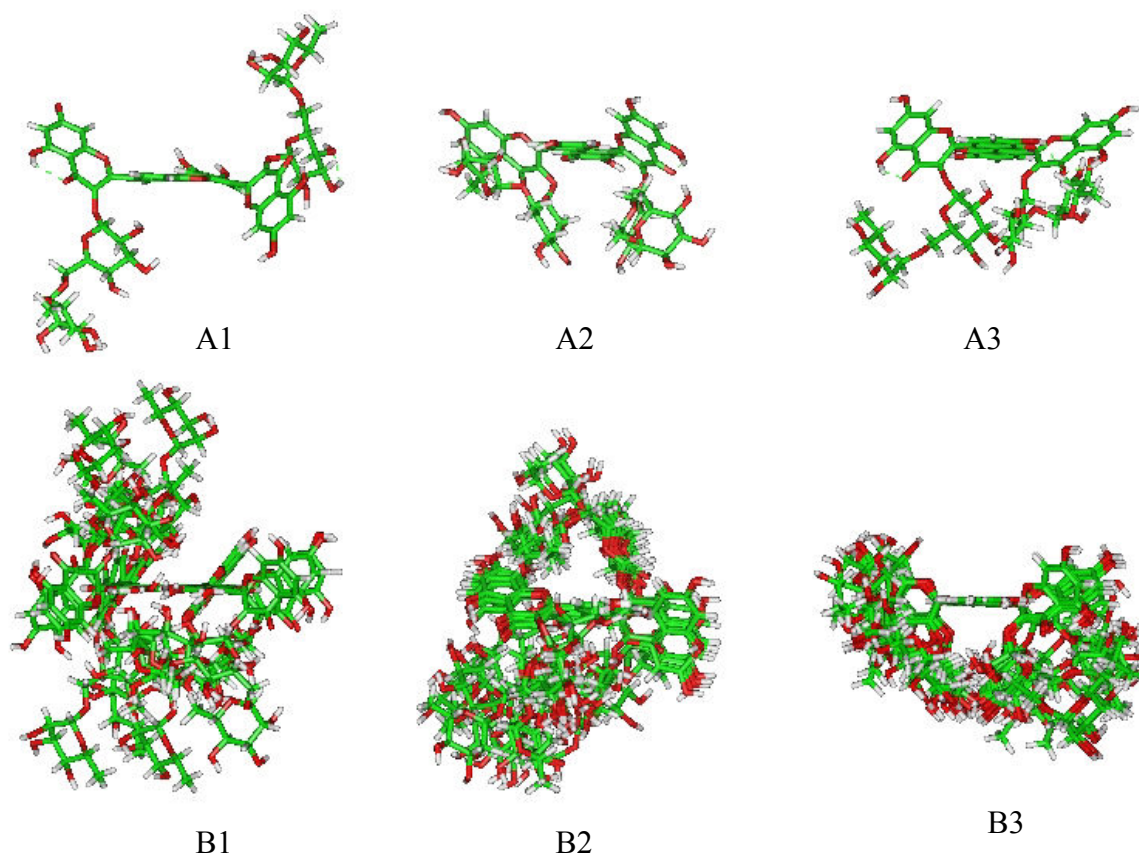


Figure V.8. Conformère le plus stable (A) et ensemble des conformères (B) des dirutines liées en O4'-C6' (1), C6'-C6' (2) et C2'-C2' (3) (superposition par les cycles B). Cycles B dans le plan.

- Cas de l'héxarutine

Afin de simuler un oligomère de haut poids moléculaire, l'oligomère présentant la plus haute masse détectée en MALDI-TOF a été analysé. L'enthalpie de formation obtenu avec le pontage de type O4'-C6' étant le plus bas, l'hexamère lié en O4'-C6' a été choisi.

La superposition de certains des conformères extraits de la dynamique à 600 K ainsi que la conformation la plus stable sont représentées Figure V.9..

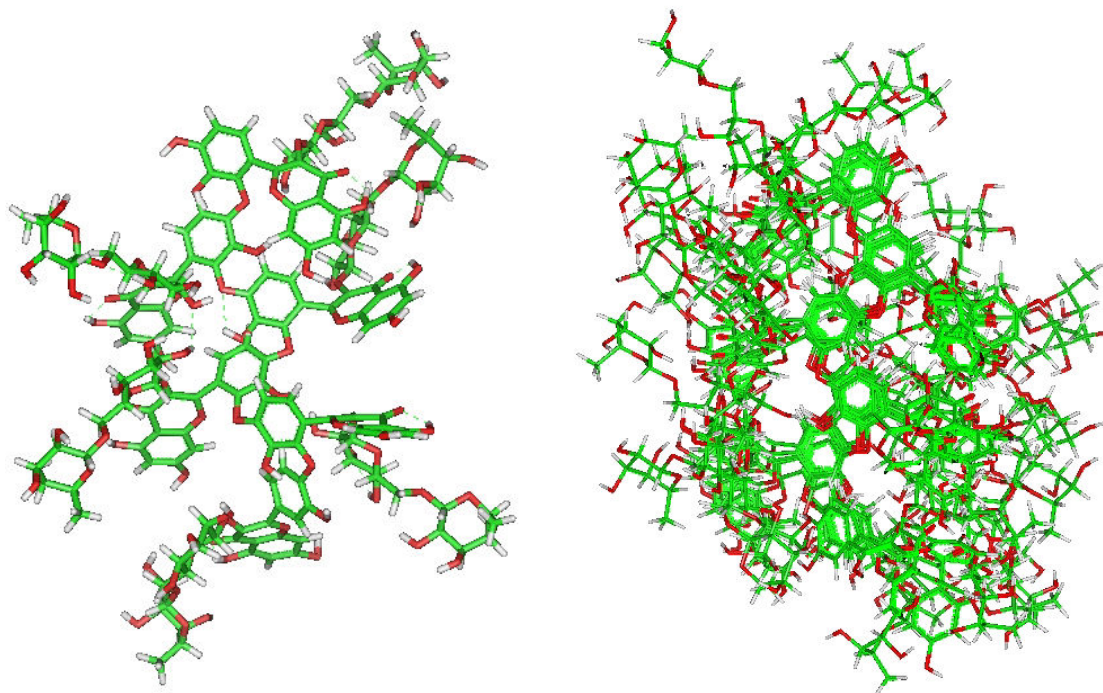


Figure V.9. Conformation la plus stable et analyse de la trajectoire de l'héxarutine liée en O4'-C6' (superposition par les cycles B).

La superposition des atomes O4'-C6' de plusieurs conformères d'héxarutine fait apparaître une structuration symétrique où les sucres se positionnent alternativement d'un côté et de l'autre de la chaîne formée par les cycles aromatiques.

Dans le cas de la conformation la plus stable, 9 liaisons hydrogène intramoléculaires ont été établies entre les sucres d'une part et les cycles aromatiques d'autre part. L'ensemble de la molécule s'étend sur 34.03 Å (distance entre les deux groupements méthyles des rhamnoses finaux).

2.1.2. Cas des oligoesculines

- Cas des diesculines

L'ensemble des pontages impliquant la partie aglycone de l'esculine a été analysé. Les caractéristiques des conformères les plus stables obtenus pour chaque type de pontage sont regroupées dans le Tableau V.6..

Tableau V.6. Enthalpie de formation et principaux paramètres moléculaires des diesculines par mécanique moléculaire (cff).

Pontage	Enthalpie de formation (kcal/mol)	Nombre de liaison H	Distance entre les 2 atomes C6' (Å)
C4-C5	26.24	3	4.51
O7-C4	27.24	2	9.09
C4-C8	30.84	2	4.21
C4-C4	31.41	3	7.56
C3-C4	40.68	4	12.93
C3-C5	44.11	3	7.23
C3-C8	46.25	3	17.68
O7-C5	46.56	2	5.06
O7-C3	48.26	3	14.57
C3-C3	48.30	2	18.67
O7-C8	54.50	3	4.59
C5-C5	140.40	3	10.77
C5-C8	144.65	6	9.72
C8-C8	152.28	5	14.37

Les structures de la diesculine sont stabilisées par des liaisons hydrogène intramoléculaires dont le nombre varie entre 2 et 6. Des liaisons hydrogène sont fréquemment établies entre groupements hydroxyles d'un même glucose.

La distance séparant les deux groupements méthyles des deux glucoses, caractéristique du repliement du dimère est comprise entre 4.21 et 18.67 Å.

Les pontages impliquant la position C4 ont les enthalpies de formation les plus faibles, alors que les pontages impliquant les positions C5 et C8 ont les enthalpies de formation les plus élevées. Les enthalpies les plus faibles étant obtenues avec les pontages de type O7-C4 et C4-C5, il est probable que ses deux types de pontage soient favorisés lors de la réaction d'oligomérisation. Ainsi, ces deux pontages ont été retenus pour la recherche d'éventuelles corrélations entre descripteurs et activités antiradicalaires.

Les structures les plus stables pour ces deux pontages ainsi que la superposition de certains conformères générés au cours de l'étude par dynamique moléculaire sont représentées Figure V.10.

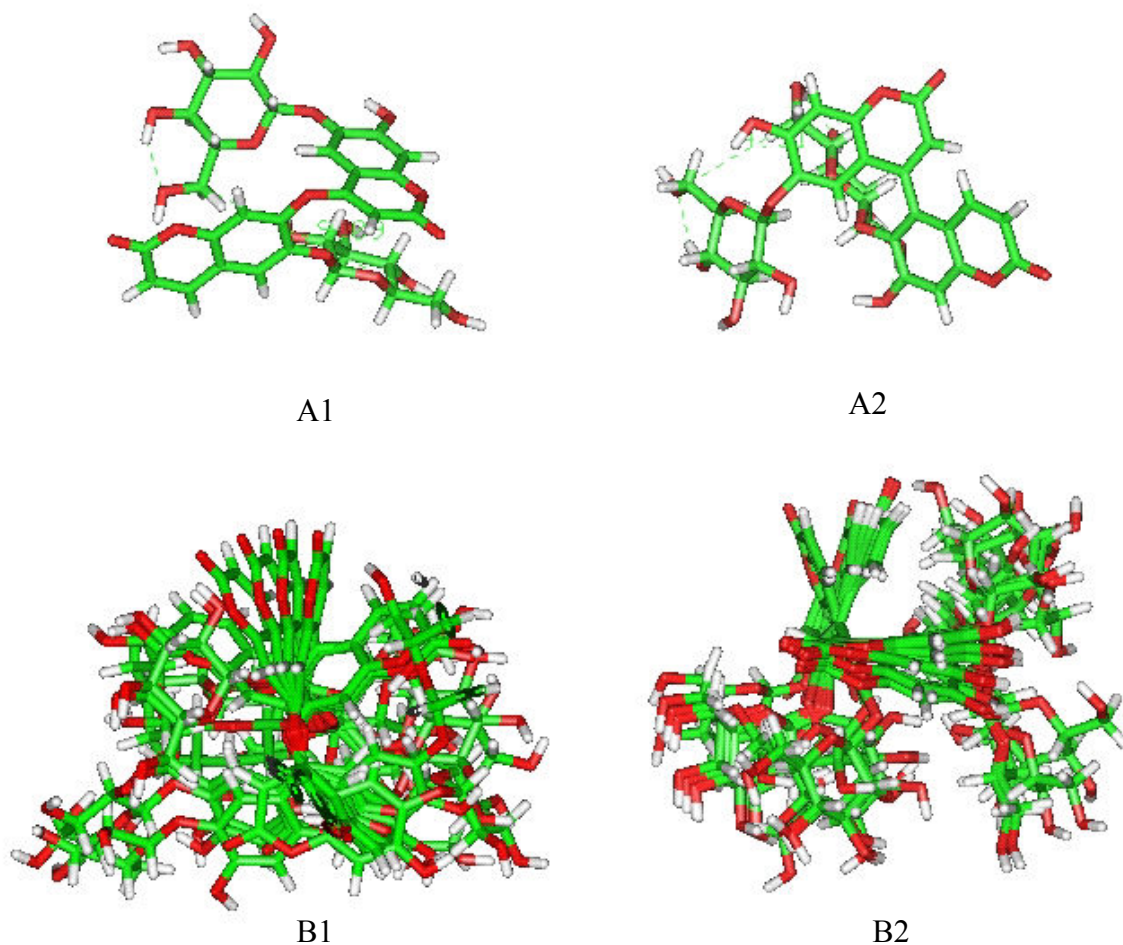


Figure V.10. Conformère le plus stable (A) et ensemble des conformères (B) des diesculines liées en O7-C4 (1) et C4-C5 (2) (superposition par les atomes impliqués dans le pontage).

La diesculine liée par un pontage C-O apparaît plus flexible que celle liée par un pontage C-C.

- Cas de la nona-esculine

Afin de simuler un oligomère de haut poids moléculaire, l'oligomère présentant la plus haute masse observée en MALDI-TOF a été analysé. L'enthalpie de formation la plus basse étant obtenue avec le radical formé en position O7, le nonamère lié en O7-C4 a été choisi.

Des analyses conformationnelles par dynamique moléculaire à 600 et 800 K ont été réalisées. La conformation la plus stable est représentée Figure V.11..

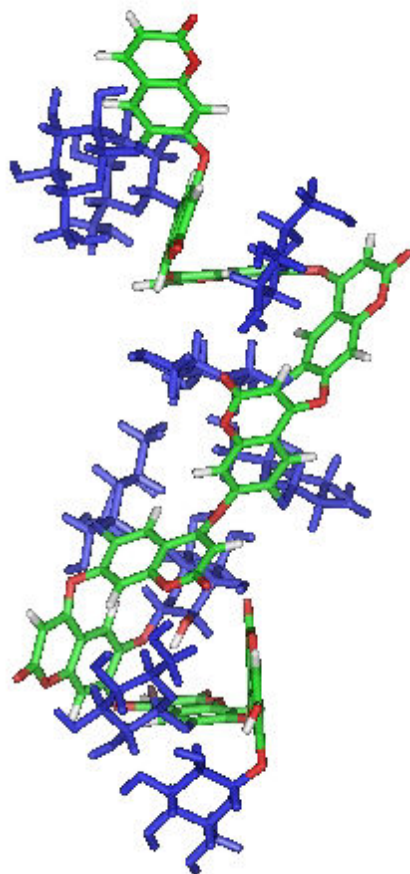


Figure V.11. Conformation la plus stable du nonamère d'esculine liée en O7-C4. Glucose en bleu.

Durant la dynamique moléculaire, les structures phénoliques sont peu flexibles, contrairement aux sucres qui gardent une grande mobilité. Dans le cas de la conformation la plus stable, 15 liaisons hydrogène intramoléculaires stabilisent le système. Ces liaisons hydrogène s'établissent entre la partie catéchol et le glucose, entre deux glucoses consécutifs ou au sein d'un même glucose. Le nonamère d'esculine a une structure étendue de 34.86 Å, de la fonction catéchole du premier monomère jusqu'à la fonction méthyle du dernier glucose.

2.2. Recherche de corrélations descripteurs/activité antioxydante

Pour comprendre et expliquer la variation des activités antiradicalaire et d'inhibition de la xanthine oxydase observée expérimentalement, différents paramètres structuraux, électroniques et énergétiques ont été évalués pour chaque type de dimères et comparés aux

valeurs obtenues pour le monomère initial. Ces descripteurs sont : E_{HOMO} , E_{LUMO} , E_g , χ , μ , polarisabilité, aire, volume, Log P, charges, BDE et IP.

Pour déterminer ces descripteurs, les conformères les plus stables obtenus par dynamique moléculaire ont été à nouveau minimisés par méthode semi-empirique AM1. Cette méthode pouvant s'appliquer à des systèmes d'au plus 166 atomes, notre étude se limitera aux cas des monomères et des dimères de rutine et d'esculine.

2.2.1. Cas des dimères de rutine

Afin d'évaluer l'activité antiradicalaire des dimères de rutine par un mécanisme de transfert mono-électronique, un électron a été éliminé de la HOMO des molécules parents pour obtenir un radical cation ($\text{ArOH}^{\bullet+}$). Le radical phénoxy en position 4' étant le plus stable, il a été choisi afin de déterminer la valeur de BDE. Après minimisation des structures par AM1, différents descripteurs ont pu être déterminés et sont regroupés dans le Tableau V.7. . En plus des dirutines liées en C6'-C6', C2'-C2' et O4'-C2' étudiées précédemment, une dirutine liée par le rhamnose (O4'''-C2') a également été analysée afin de confirmer ou d'infirmer les observations expérimentales par RMN, qui suggèrent que la partie sucre est impliquée dans le processus de l'oligomérisation.

Tableau V.7. Comparaison des propriétés électroniques et énergétiques de la rutine et de ses dimères.

		Rutine	Dirutine liée en :			
			C6'-C6'	C2'-C2'	O4'-C6'	C2'-O4''
ΔH (kcal/mol)		-630.08	-1253.52	-1253.99	-1235.72	-1239.54
E_{HOMO} (eV)		-8.81	-9.020	-9.248	-9.153	-8.965
E_{LUMO} (eV)		-0.88	-1.013	-1.247	-1.132	-1.012
E_g (eV)		7.93	8.007	8.001	8.021	7.953
χ (eV)		4.845	5.016	5.247	5.142	4.988
μ (D)		3.40	5.082	6.312	7.47	4.463
POL (au)		54.75	108.72	108.72	108.72	108.72
A (\AA^2)		634.82	970.08	977.56	1136.60	1048.80
VOL (\AA^3)		1458.47	2541.05	2567.07	2740.44	2652.04
log P		-1.61	-3.59	-3.59	-3.56	-3.22
Unité monomérique 1	QO _{4'}	-0.266	-0.239	-0.238	-0.263	-0.264
	QC ₂	0.122	0.162	0.112	0.103	0.165
	QC ₃	-0.096	-0.124	-0.082	-0.075	-0.096
	Excès de charge C ₂ -C ₃	0.218	0.286	0.194	0.178	0.261
Unité monomérique 2	QO _{4'}		-0.240	-0.239	-0.152 ^P	-0.272
	QC ₂		0.107	0.154	0.080	0.144
	QC ₃		-0.078	-0.120	-0.055	-0.121
	Excès de charge C ₂ -C ₃		0.185	0.274	0.135	0.265
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)	BDE ₁	20.97	25.12	25.94	19.58	23.73
	BDE ₂		27.03	25.59		24.96
	IP	180.04	177.32	183.45	170.11	177.92

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV), E_{LUMO} : énergie de l'orbitale la plus basse vacante (eV), E_g : différence d'énergie entre le LUMO et la HOMO, χ : électronégativité (eV), μ : moment dipolaire (D), A: aire (\AA^2), VOL: volume (\AA^3), POL: polarisabilité (\AA^3), Q: excès de charge, $\Delta\Delta H$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol), $\Delta\Delta H$ (IP): variation d'enthalpie entre le radical cation et la molécule parent (kcal/mol), P: atome impliqué dans le pontage

Afin de faciliter la lecture de l'effet de l'oligomérisation et du mode de pontage des flavonoïdes sur leur activité antioxydante, un code couleur a été adopté: une couleur rouge a été attribuée aux descripteurs relatifs aux dimères impliquant une baisse du pouvoir antioxydant par rapport au monomère de départ et une couleur verte a été attribuée aux descripteurs impliquant une hausse du pouvoir antiradicalaire (Tableau V.8.). Les valeurs de descripteurs similaires à ceux du monomère initial ne sont pas colorées.

Tableau V.8. Impact des descripteurs des dirutines sur le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase.

		Dirutine liée en :				
		C6'-C6'	C2'-C2'	O4'-C6'	C2'-O4''''	
Descripteurs de l'activité antiradicalaire	E_{HOMO} (eV)	■	■	■	■	
	μ (D)	■	■	■	■	
	QO _{4'}	■	■	□	□	
	Excès de charge C _{2'} -C _{3'}	■	■	■	■	
	QO _{4'}	■	■	■	■	
	Excès de charge C _{2'} -C _{3'}	■	■	■	■	
	$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)	BDE	■	■	□	■
		BDE	■	■	□	■
		IP	■	■	■	■
	Hydroxyles libres	■	■	■	■	
Descripteurs de l'activité anti-xanthine oxydase	Log P	■	■	■	■	
	POL	■	■	■	■	
	Planéité	□	□	□	□	
	Angle θ	□	□	□	□	
	Hydroxyles libres	■	■	■	■	

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV) μ : moment dipolaire (D), POL: polarisabilité (\AA^3), Q: excès de charge, $\Delta\Delta H$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical phenoxy et la molécule parent (kcal/mol), $\Delta\Delta H$ (IP): variation d'enthalpie entre le radical cation et la molécule parent (kcal/mol)

■: impact positif sur l'activité par rapport au monomère; ■: impact négatif sur l'activité par rapport au monomère; □: sans impact par rapport au monomère

▪ Activité antiradicalaire

L'implication du groupement hydroxyle en position 4' dans le pontage n'influence pas les valeurs du BDE du dimère, mais diminue l'excès de charge ainsi que la charge portée par l'atome O_{4'}. Dans le cas des pontages C-C ou C2'-O4''', le BDE est augmenté.

En revanche, quelque soit le type de pontage, la dimérisation de la rutine entraîne une augmentation de E_{HOMO} .

Selon ces résultats, il apparaît que plusieurs descripteurs suggèrent une baisse du pouvoir antiradicalaire quelque soit le type de pontage des dirutines, ce qui est en accord avec les mesures expérimentales présentées chapitre IV.1..

- Activité d'inhibition de la xanthine oxydase

D'après la bibliographie, l'activité de la xanthine oxydase est favorisée par un angle θ de l'ordre de 26 à 27 ° ou par une certaine planéité, or initialement, la rutine ne présente ni l'un ni l'autre, et la dimérisation ne l'améliore pas cet état de fait. En outre, il a observé que l'augmentation de la taille des molécules entraîne une forte polarisabilité défavorable à l'activité de cette enzyme.

Selon ces résultats, il apparaît que plusieurs descripteurs suggèrent une baisse du pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase quelque soit le type de pontage des dirutines, ce qui n'est pas concordant avec les mesures expérimentales.

2.2.2. Cas des oligoesculines

Tout comme pour l'étude de la rutine, le PI et le BDE de l'esculine et de ses dimères ont été calculés afin d'évaluer leur potentiel antiradicalaire. Le radical phénoxy en position 7 étant le plus stable, il a été choisi afin de déterminer la valeur de BDE. A partir des structures minimisées par AM1, différents descripteurs ont été déterminés et regroupés dans le Tableau V.9.. En plus des diesculines liées en O7-C4 et C4-C5, choisies du fait de leur stabilité, les propriétés des diesculines liées en C8-C8 et C4-O2' ont été évaluées afin de vérifier l'hypothèse formulée sur l'implication de la partie sucre dans le processus d'oligomérisation.

Tableau V.9. Comparaison des propriétés électroniques et énergétiques de l'esculine et de ses dimères.

		Esculine	Diesculine liée en :			
			O7-C4	C4-C5	C8-C8	C4-O2'
ΔH (kcal/mol)		-350.17	-677.30	-688.15	-690.59	-681.71
E_{HOMO} (eV)		-9.254	-9.350	-9.431	-9.187	-9.283
E_{LUMO} (eV)		-0.819	-1.367	-1.403	-1.044	-1.071
E_g (eV)		8.435	7.983	8.028	8.143	8.212
χ (eV)		5.036	4.675	4.715	5.115	5.177
μ (D)		7.81	7.696	6.096	9.120	9.57
POL (au)		30.39	60.01	60.01	60.01	60.01
A (\AA^2)		409.44	653.06	670.90	649.92	680.53
VOL (\AA^3)		866.74	1535.39	1567.10	1580.85	1587.92
log P		-0.21	-1.50	-1.10	-0.79	-1.15
Unité monomérique 1	QO ₇	-0.239	-0.141 ^P	-0.236	-0.247	-0.235
	QC ₃	-0.243	-0.208	-0.229	-0.217	-0.355
	QC ₄	-0.013	-0.042	0.059 ^P	-0.033	0.193
	Excès de charge C ₃ -C ₄	0.203	0.166	0.288	0.184	0.548
Unité monomérique 2	QO ₇		-0.233	-0.247	-0.256	-0.238
	QC ₃		-0.325	-0.208	-0.223	-0.220
	QC ₄		0.184 ^P	-0.042	-0.028	-0.031
	Excès de charge C ₃ -C ₄		0.509	0.166	0.195	0.189
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)	BDE ₁	28.43	30.54	30.65	25.98	27.46
	BDE ₂			22.34	27.43	30.65
	IP	189.34	193.45	191.19	190.82	185.63

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV), E_{LUMO} : énergie de l'orbitale la plus basse vacante (eV), E_g : différence d'énergie entre la LUMO et la HOMO, χ : électronégativité (eV), μ : moment dipolaire (D), A: aire (\AA^2), VOL: volume (\AA^3), POL: polarisabilité (\AA^3), Q: excès de charge, $\Delta\Delta H$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol), $\Delta\Delta H$ (IP): variation d'enthalpie entre le radical cation et la molécule parent (kcal/mol), P: atome impliqué dans le pontage

Tout comme pour la rutine, un code couleur a été attribué à chaque modification de la valeur des descripteurs (Tableau V.10.).

Tableau V.10. Impact des descripteurs des diesculines sur le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase.

		Diesculine liée en :				
		O7-C4	C4-C5	C8-C8	C4-O2'	
Descripteurs de l'activité antiradicalaire	E_{HOMO} (eV)	■	■	■	■	
	μ (D)	■	■	■	■	
	QO ₇	■	■	■	■	
	Excès de charge C ₃ -C ₄	■	■	■	■	
	QO ₇	■	■	■	■	
	Excès de charge C ₃ -C ₄	■	■	■	■	
	$\Delta\Delta\text{H}$ (kcal/mol)	BDE	■	■	■	■
		BDE	■	■	■	■
		IP	■	■	■	■
		Hydroxyles libres	■	■	■	■
Descripteurs de l'activité anti-xanthine oxydase	Log P	■	■	■	■	
	POL	■	■	■	■	
	planéité	■	■	■	■	
	Angle θ	■	■	■	■	
	Hydroxyles libres	■	■	■	■	

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV) μ : moment dipolaire (D), POL: polarisabilité (\AA^3), Q: excès de charge, $\Delta\Delta\text{H}$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical phenoxy et la molécule parent (kcal/mol), $\Delta\Delta\text{H}$ (IP): variation d'enthalpie entre le radical cation et la molécule parent (kcal/mol)

■ impact positif sur l'activité par rapport au monomère; ■ impact négatif sur l'activité par rapport au monomère; □ sans impact par rapport au monomère

▪ Activité antiradicalaire

Dans le cas de l'esculine, il apparaît que l'implication de l'hydroxyle OH₇ dans le pontage défavorise l'activité antiradicalaire du dimère, par rapport aux autres types de pontage. Au contraire les pontages impliquant deux carbones de la partie phénolique de l'esculine engendrent un pouvoir antioxydant plus élevé. Ceci pourrait être dû au fait que le pontage C-C permet une résonance plus importante du radical. Le pontage par le sucre (C4-O2'), tout en ayant un groupement hydroxyle de plus que l'esculine susceptible de réagir avec une espèce radicalaire, présente des descripteurs avec des valeurs similaires à celles de

l'esculine de départ. De plus, le greffage d'un groupement électroattracteur (cycle aromatique) permet d'accroître l'excès de charge de la liaison C3-C4 de l'unité d'esculine liée par sa position C4.

Etant donné qu'expérimentalement une augmentation importante du pouvoir antioxydant est observée, il est donc fort probable que la majorité des pontages mis en jeu soient de type C-C ou C-O_{glucose}.

- Activité d'inhibition de la xanthine oxydase

De même que la rutine, l'esculine ne présente pas initialement une planéité et un angle θ favorables à l'activité anti-xanthine oxydase, sa dimérisation n'a pas d'incidence sur ce critère. En revanche, la dimérisation induit une augmentation de la taille de la molécule ainsi que de sa polarisabilité, ce qui diminue le pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase.

Selon ces résultats, il apparaît que plusieurs descripteurs suggèrent une baisse du pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase quelque soit le type de pontage des diesculines, ce qui n'est pas concordant avec les mesures expérimentales.

2.3. Conclusions

En ce qui concerne l'activité antioxydante des dirutines, l'étude de modélisation moléculaire a suggéré une baisse du pouvoir antiradicalaire quelque soit le type de pontage. Ceci est en accord avec les mesures expérimentales.

En revanche, l'étude par modélisation moléculaire suggère une baisse du pouvoir inhibiteur de l'activité xanthine oxydase, ce qui est contraire aux observations expérimentales. Ceci pourrait être dû à un effet chélatant, vis à vis du Cu^{2+} de l'enzyme, accru dans le cas des oligomères. Or cet effet n'a pas été pris en compte lors de l'étude par modélisation moléculaire.

L'étude par modélisation moléculaire de l'esculine et des ses oligomères a suggéré que les pontages de type C-C et C-O_{glucose} engendraient une augmentation du pouvoir antiradicalaire, et particulièrement le pontage de type C8-C8. L'augmentation d'activité antiradicalaire observée expérimentalement suggère donc que les pontages de types C-C ou C-O_{glucose} soient favorisés par rapport au pontage C-O.

En ce qui concerne le pouvoir inhibiteur de l'activité xanthine oxydase, contrairement à l'observation expérimentale, l'étude par modélisation moléculaire suggère une baisse de cette activité. Ceci pourrait être attribué, comme pour les dimères de rutine, à un effet chélatant des dimères d'esculine plus important que celui de l'esculine.

3. Analyse des interactions soluté/solvant et solvant/soluté par modélisation moléculaire

Afin d'expliquer les variations de solubilité et les interactions intermoléculaires observées expérimentalement, une étude par modélisation moléculaire dans le solvant a été réalisée. Les deux objectifs de cette étude sont :

- l'étude des interactions soluté/solvant afin d'expliquer les variations de solubilité entre monomère et oligomères.
- l'étude des interactions soluté/soluté dans un milieu type de synthèse afin d'évaluer les propriétés d'agrégation des monomères et de leurs dimères.

Pour mener cette étude, des cellules de solvant (eau ou méthanol/eau) ont été créées et des molécules de soluté (monomère ou dimère) y ont été introduites, puis une analyse conformationnelle de ces différents systèmes a été effectuées.

3.1. Modélisation moléculaire de la rutine et de ses oligomères dans l'eau et dans un milieu méthanol/eau

Afin d'explorer les conformations des molécules dans un solvant, d'étudier les interactions soluté/solvant et d'interpréter les variations de solubilité observées expérimentalement, les différentes molécules de monomères et d'oligomères ont été placées dans une cellule contenant des molécules d'eau ou méthanol/eau. Dans la bibliographie, le nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires a été corrélé à la solubilité [19], nous sommes donc particulièrement intéressés à leur caractérisation. Afin d'identifier les liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires, les conformations aboutissant au plus grand nombre de ces liaisons ont été sélectionnées.

3.1.1. Modélisation moléculaire de la rutine et de ses oligomères dans l'eau

3.1.1.1. Cas de la rutine

Une molécule de rutine a été placée dans une maille ou cellule cubique de 40 Å de côté contenant, lors de la dernière étape de dynamique à 300 K, 1294 molécules d'eau (Figure V.12.).

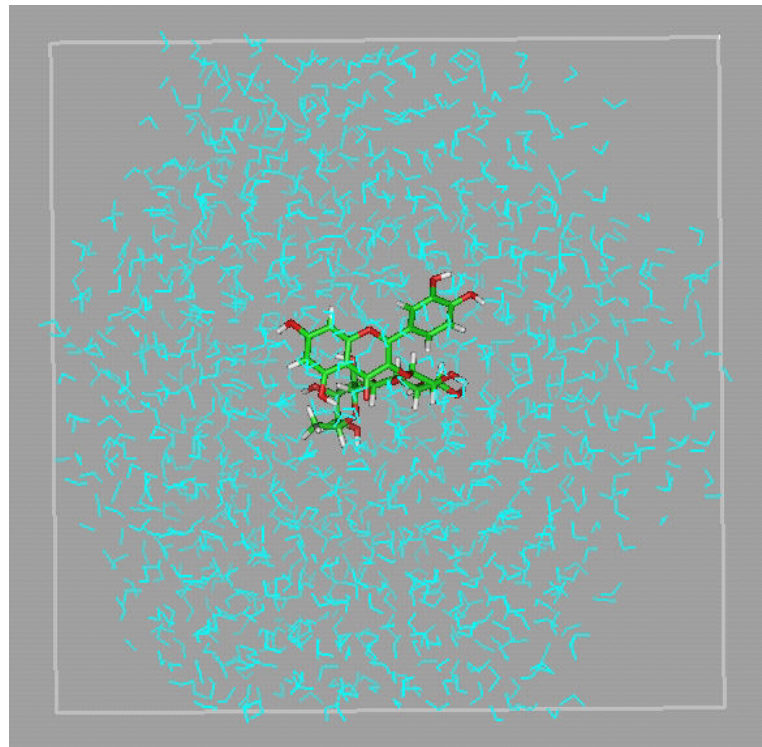


Figure V.12. Modélisation d'une molécule de rutine dans une cellule cubique d'eau de 40 Å de côté, contenant 1294 molécules d'eau, cutoff de 14.0 Å.

Au cours de la dynamique, la flexibilité des sucres de la rutine est maintenue et la forme repliée est prépondérante, tout comme dans le vide.

Différentes liaisons hydrogène intramoléculaires s'établissent durant la dynamique :

- OH₅---O₄ : conservée comme dans le vide
- OH₅---OH₄'''
- Entre les 2 hydroxyles du cycles B
- OH₄'''---O_{pont osidique}
- OH₂'''---O₃
- glucose---rhamnose
- glucose---glucose/rhamnose---rhamnose

La stabilisation du système se fait par la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre la rutine et le solvant comme indiqué dans la Figure V.13.. Ces liaisons hydrogène font intervenir aussi bien la partie sucre, les hydroxyles des cycles aromatiques, que la fonction carbonyle. Sur le système représenté sur la Figure V.13., 6 liaisons hydrogène rutine/eau sont formées.

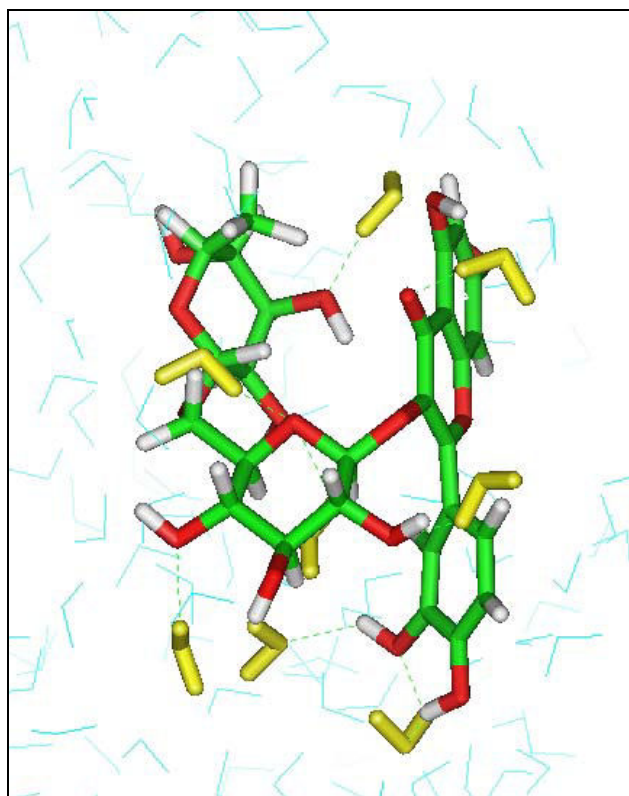


Figure V.13. Modélisation des liaisons hydrogène rutine/eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec la rutine sont représentées en jaune.

3.1.1.2. Cas des dirutines

Afin d'analyser le comportement des dimères de rutines dans l'eau, 3 structures dimériques ont été modélisées dans des cellules cubiques de 40 Å de côté. Ces 3 structures correspondent d'une part, aux pontages les plus probables (O4'-C6' et C6'-C6'), d'autre part à la dirutine observée expérimentalement par RMN (C2'-C2') (Figure V.15.). L'ensemble des caractéristiques de ces 3 dirutines est reporté dans le Tableau V.11..

Ces résultats indiquent une variation du nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires et une variation de la conformation, ce qui suggère que le type de pontage mis en jeu lors de la formation des dimères de rutine a un impact non seulement sur la conformation de la

dirutine, mais aussi sur les capacités des dimères à interagir avec le solvant. Il semble qu'un pontage éther défavorise les interactions soluté/solvant, contrairement aux pontages C-C.

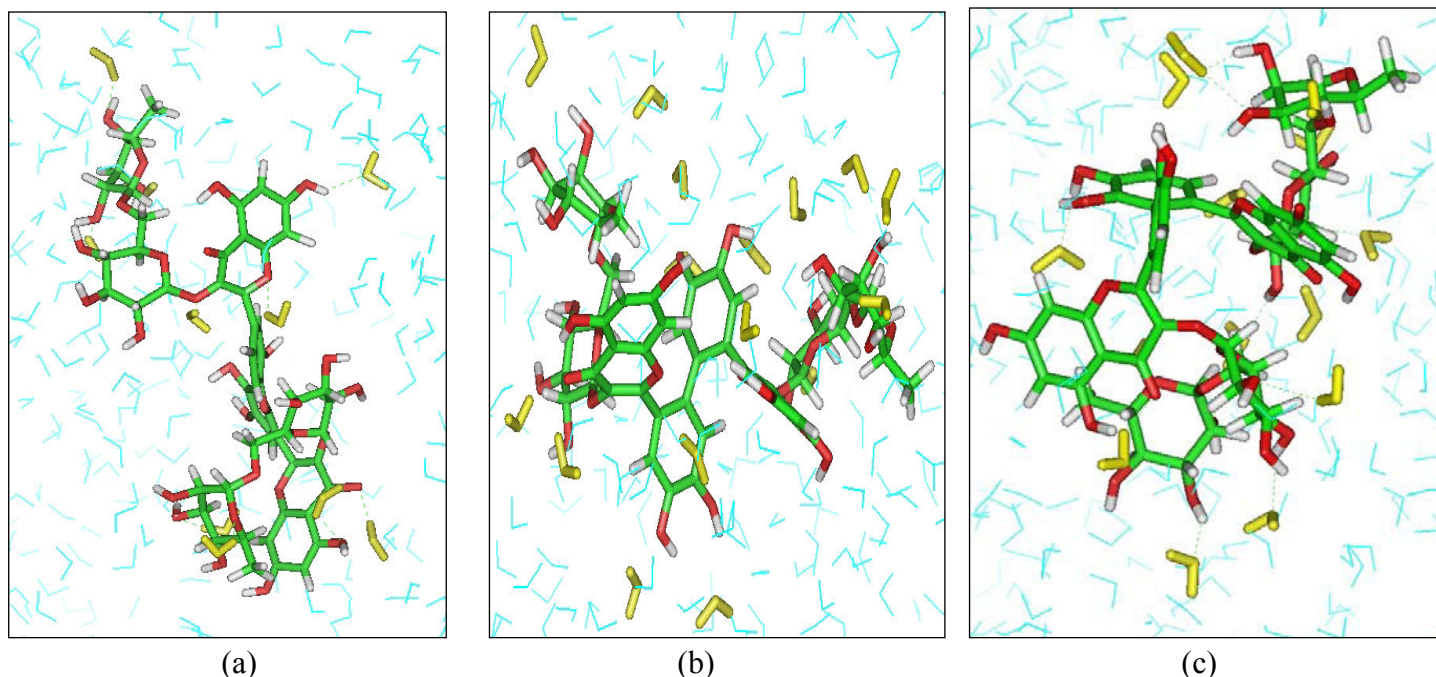


Figure V.14. Modélisation des liaisons hydrogène des dirutines liées en O4'-C6' (a), C6'-C6' (b) et C2'-C2' (c) avec l'eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec le dimère sont représentées en jaune.

Tableau V.11. Analyse de la trajectoire des dirutines liées en O4'-C6', C6'-C6' et C2'-C2'.

		Dirutine liée en :		
		O4'-C6' ^a	C6'-C6'	C2'-C2'
Nombre de molécules d'eau dans la cellule		706	1222	1451
Distance rhamnose ₁ /rhamnose ₂ (Å)		[18.6 ; 23.5]	[9.70 ; 17.3]	[11.0 ; 14.3]
Forme		Allongée	Repliée	Repliée
Liaisons intramoléculaires		-OH ₅ ---O ₄ (quasi permanente) -sucre---sucre - OH ₅ ---O _{rhamnose}	-OH ₅ ---O ₄ (quasi permanente) -sucre---sucre - OH ₅ ---O _{rhamnose} - OH ₇ ---O _{rhamnose} -OH _{cycleB} ---rhamnose	-OH ₅ ---O ₄ (quasi permanente) -sucre---sucre -OH _{cycle B} --- OH _{cycle B} -OH _{cycle B} ---rhamnose
Nombre		10	17	15
Liaisons intermoléculaires observées sur les représentations de la figure V.14.	Localisation			
	Sucres	6	8	12
	Carbonyle	1	2	1
	Ether	1	1	0
	Hydroxyles cycle A	2	1	0
Hydroxyles cycle B	0	5	2	

^a : dans le cas de la dirutine liée en O4'-C6', 6 cycles de minimisation/dynamiques courtes ont été réalisés (minimisation à une convergence de 0.001 kcal/mol, dynamique de 500, 500, 200, 6900, 7900 et 4400 fs).

3.1.1.3. Cas de l'héxarutine

Afin de modéliser l'héxarutine formée par 5 pontages de type O4'-C6', une cellule cubique de 50 Å de côté a été créée. Pour limiter le temps de calcul, la cellule n'a pas été remplie d'eau. Une couche d'eau de 15 Å d'épaisseur a été réalisée autour de l'hexamère. Lors de la dernière étape de dynamique, 1679 molécules d'eau entourent l'hexamère.

L'instabilité du système n'a pas permis d'explorer la totalité de l'espace conformationnel. Plusieurs étapes de minimisation/dynamique courte ont été réalisées afin d'évaluer le comportement de l'hexamère dans l'eau. Au cours de la dynamique, l'allongement de l'hexamère varie de 32.86 Å à 36.10 Å.

Sur la conformation représentée Figure V.16., 9 liaisons hydrogène intramoléculaires sont observées. Sur ces 9 liaisons, 6 liaisons correspondent aux liaisons de type OH₅---O₄, 2 liaisons sont établies entre le cycle B et le glucose, et enfin une liaison s'est formée entre 2 glucoses appartenant respectivement aux résidus 2 et 4 dans l'ordre d'enchaînement. De plus 94 liaisons hydrogène intermoléculaires se sont établies entre l'héxarutine et l'eau. Sur ces 94 liaisons, 37 s'établissent avec les unités rhamnose, 30 avec les motifs glucose, 20 avec les cycles A et C et 7 avec le cycle B.

L'héxarutine expose ses motifs sucres à l'eau, permettant ainsi la mise en place d'un réseau dense d'interactions avec le solvant. Ceci pourrait expliquer la forte solubilité observée expérimentalement.

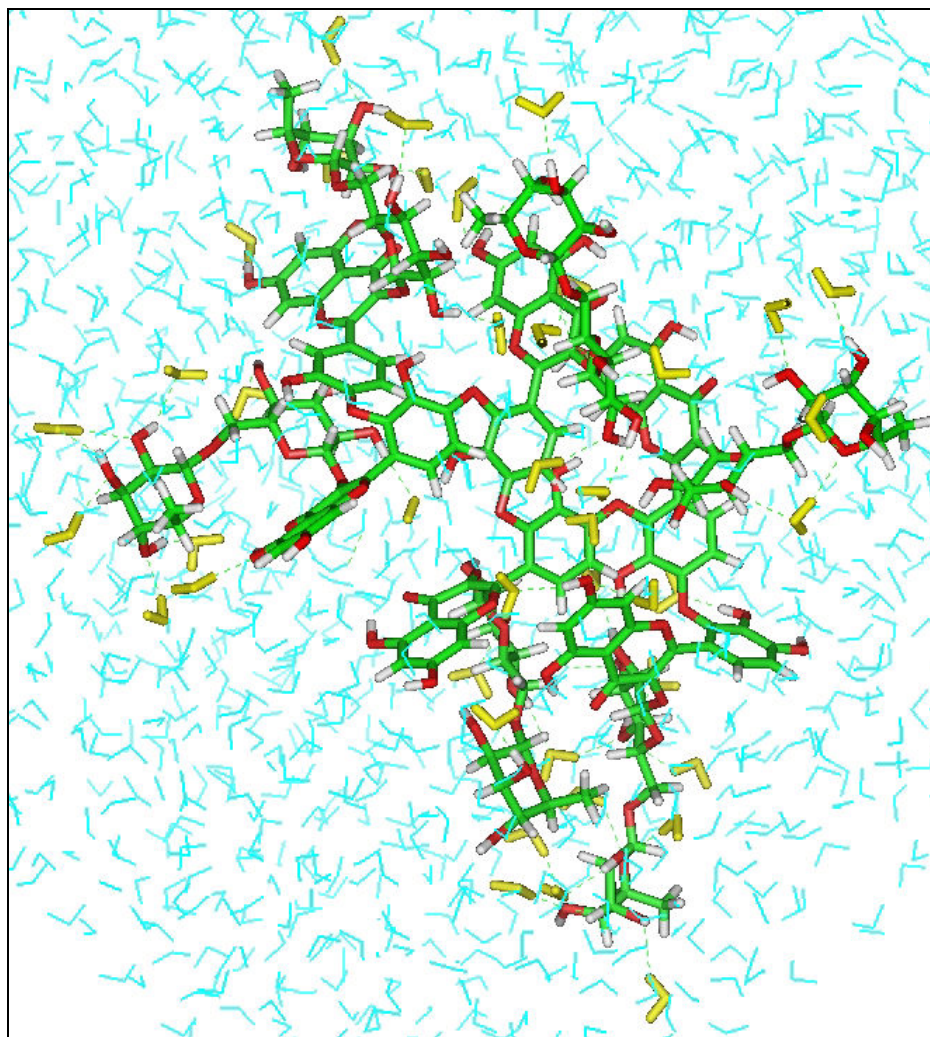


Figure V.15. Modélisation des liaisons hydrogène hexarutine/eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec l'hexamère sont représentées en jaune.

Après avoir évalué les interactions soluté/eau, nous nous sommes intéressés d'une part à la solubilité des monomères et des dimères dans un milieu de synthèse (méthanol/eau), puis d'autre part, aux propriétés de dispersion et d'agrégation de ces molécules. Afin de simuler le milieu de synthèse, plusieurs molécules de monomères ou de dimères ont été placées dans des cellules de méthanol/eau, dans les proportions: 30 :70, v/v.

Les systèmes réalisés présentant des écarts énergétiques très importants entre deux conformations successives, des cycles de minimisation/dynamique courte ont été réalisés afin d'obtenir la trajectoire la plus longue possible.

3.1.2. Etude des interactions d'un mélange de rutine ou de dirutine dans un milieu méthanol/eau

3.1.2.1. Etude du système: quatre rutines dans un mélange méthanol/eau

4 rutines (a, b, c et d) ont été placées dans une cellule cubique de 40 Å de côté, dans un mélange méthanol/eau dans les proportions de synthèse 30:70, v/v. Lors de la dernière étape de dynamique, la cellule contient 269 molécules de méthanol, 1411 molécules d'eau et 4 molécules de rutine. Cette dernière dynamique a une trajectoire de 60 ps.

4 pseudo-atomes (A, B, C et D) ont été définis afin de suivre les mouvements relatifs des molécules au cours de la dynamique. Chaque pseudo-atome se trouve à équidistance entre la position C2' et la position C4'''. Les distances séparant les monomères sont indiquées Figure V.16.. Les rutines b, c et d se sont rapprochées tout au long de la dynamique alors que la rutine a s'est éloignée progressivement.

Outre les liaisons hydrogène intramoléculaires, des liaisons hydrogène intermoléculaires sont observables entre 3 rutines, impliquant à la fois les fonctions hydroxyles des sucres, du cycle B et la fonction carbonyle d'une rutine. Il semble donc que la stabilisation du système implique la formation de liaisons intermoléculaires entre le soluté et le solvant : les rutines a, b, c et d établissent respectivement 4, 2, 1 et 3 liaisons hydrogène avec les molécules de méthanol, et 4, 4, 7 et 1 avec les molécules d'eau (Figure V.16.). Le rapprochement des rutines b, c et d diminue leur capacité à interagir avec les molécules de méthanol à l'inverse de la rutine a. En revanche, leur rapprochement n'altère pas leur capacité à se lier à l'eau.

La rutine dans l'eau ne forme en moyenne que 6 liaisons hydrogène avec le solvant contre 8 liaisons quand elle est isolée dans un milieu méthanol/eau. Ainsi, il apparaît que la présence du solvant organique dans l'eau favorise la solubilisation de la rutine. Ceci est confirmé par les mesures expérimentales de solubilité de la rutine qui sont de 0.14 g/l dans l'eau et 0.25 g/l dans méthanol/eau (30/70).

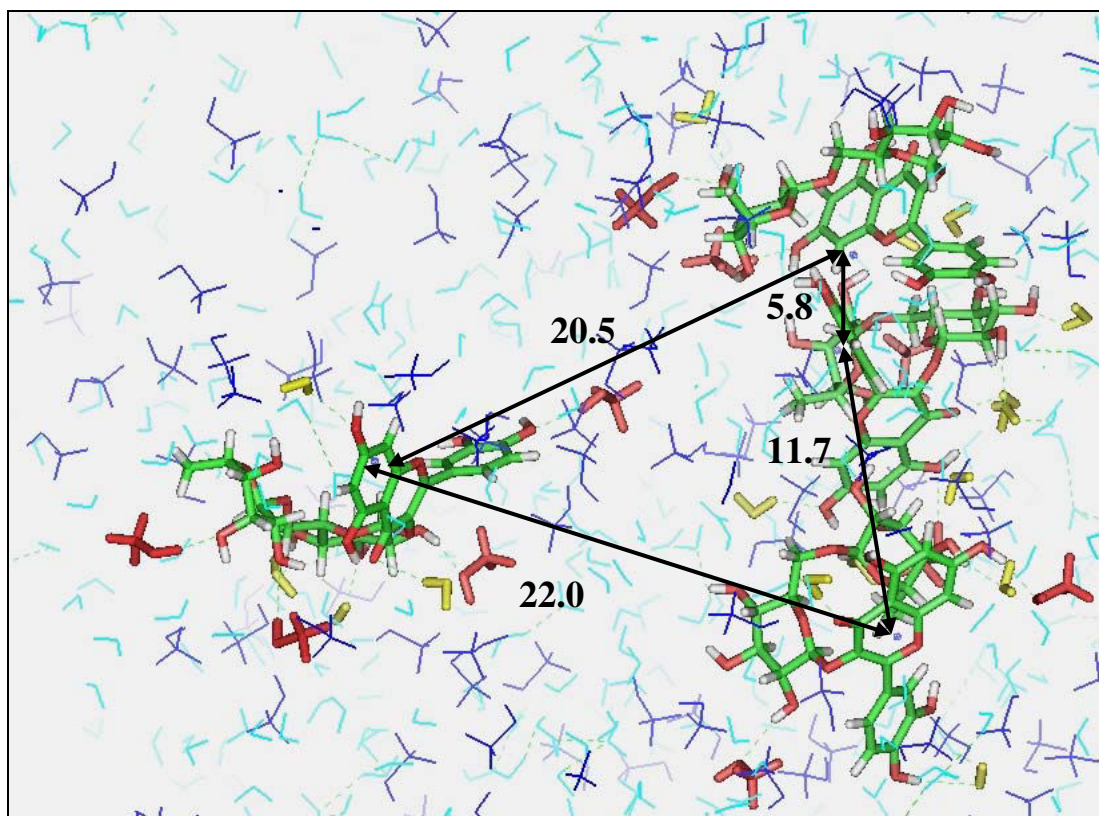


Figure V.16. Modélisation des interactions hydrogène établies dans un mélange de 4 rutines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v : v). Les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec une rutine sont représentées en jaune et les molécules de méthanol formant une liaison hydrogène avec une rutine en rouge. Les distances séparant les pseudo-atomes A, B, C et D à l'équilibre sont indiquées en Å.

3.1.2.2. Etude du système: deux dirutines dans un mélange méthanol/eau

Pour simuler les interactions intermoléculaires qui ont lieu dans le milieu réactionnel, deux dirutines liées en C2'-C2' ont été placées dans une cellule cubique de 60 Å de côté. Lors de la dernière étape de la dynamique, la cellule contient 257 molécules de méthanol, 1343 molécules d'eau et 2 molécules de dirutine. Cette dernière dynamique a une trajectoire de 21 ps.

4 pseudo-atomes (A, B, C et D) ont été définis afin d'évaluer l'éloignement des molécules au cours de la dynamique. Chaque pseudo-atome se trouve à équidistance entre la position C2' et la position C4''' d'une même unité de rutine. Les distances à l'équilibre séparant ces pseudo-atomes sont reportées Figure V.17..

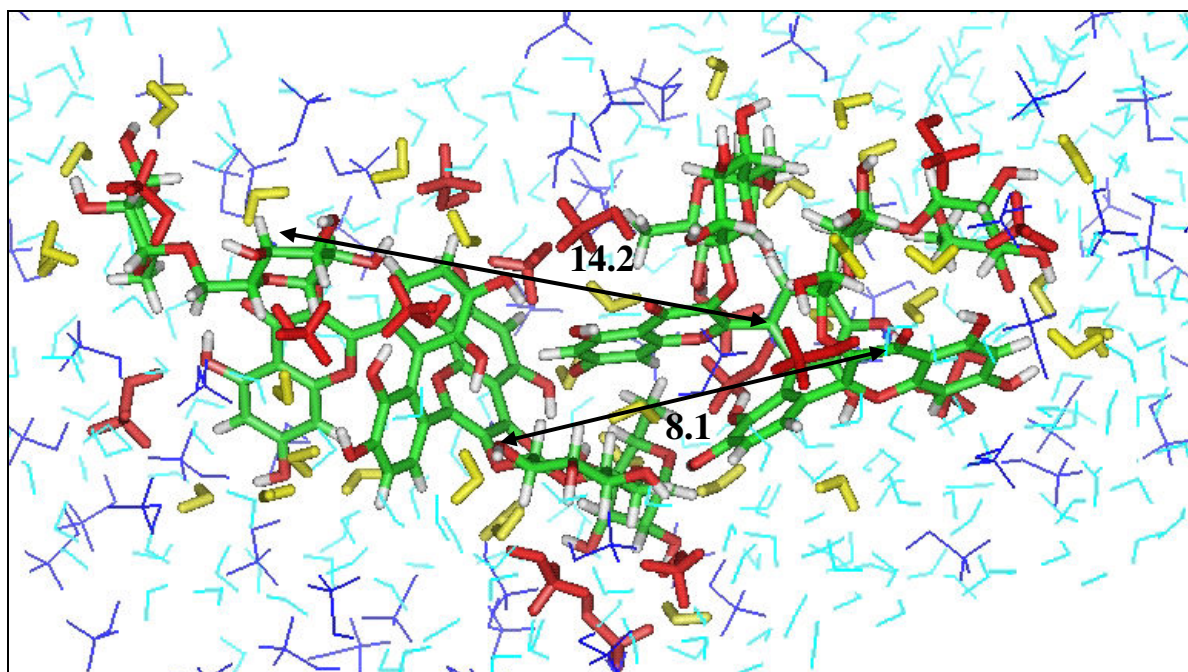


Figure V.17. Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 2 dirutines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v). Les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec une rutine sont représentées en jaune et les molécules de méthanol formant une liaison hydrogène avec une rutine en rouge. Les distances séparant les pseudo-atomes A, B, C et D à l'équilibre sont indiquées en Å.

A la stabilisation du système, des liaisons hydrogène s'établissent entre les 2 unités de dirutine, celles-ci venant s'ajouter aux liaisons hydrogène intramoléculaires formées au sein de chaque unité dimérique. Sur la conformation représentée Figure V.17., une interaction hydrogène $\text{OH}_4 \cdots \text{OH}_5$ est établie entre les 2 dirutines. 15 liaisons hydrogène sont formées avec les molécules de méthanol (9 et 6 respectivement pour les 2 dirutines) et 43 avec les molécules d'eau. Les liaisons formées avec des molécules de méthanol impliquent les glucoses, les rhamnoses, les hydroxyles du cycle A, les hydroxyles du cycle B ainsi que le groupement carbonyle, pour respectivement 7, 2, 3, 3 et 1 d'entre elles. Les liaisons hydrogène formées avec des molécules d'eau impliquent les rhamnoses, les glucoses, les hydroxyles du cycle A, les hydroxyles du cycle B, le groupement carbonyle pour respectivement 20, 8, 5, 9 et 1 d'entre elles.

Le rapprochement des molécules de dirutine limite leur accessibilité au solvant en favorisant les interactions soluté/soluté. Malgré cela, les interactions entre la dirutine et le solvant sont nombreuses. Ceci suggère :

- $S_{\text{dirutine}}(\text{méthanol/eau}) > S_{\text{dirutine}}(\text{eau})$
- $S_{\text{dirutine}} > S_{\text{rutine}}$

Ces résultats sont en accord avec les résultats expérimentaux : $S_{\text{oligomères}}(\text{eau}) : 600 \text{ g/l} > S_{\text{rutine}}(\text{eau}) : 0.14 \text{ g/l}$.

3.1.3. Interprétations structure/fonction et conclusions

Il apparaît que le nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires établies entre le soluté et les molécules de solvant est un bon indicateur de la solubilité (Tableau V.12.).

La structure de l'héxarutine permet la mise en place d'un réseau dense de liaisons hydrogène, ce qui expliquerait la grande solubilité obtenue expérimentalement.

Aucun phénomène de dispersion des molécules oligomérisées n'a été observé, contrairement à l'agrégation des molécules de rutine.

Tableau V.12. Impacts de l'oligomérisation de la rutine sur la solubilité et sur l'agrégation.

Unité monomérique	Rutine				
	1	2		6	
Degré d'oligomérisation					
Pontage		O4'C6'	C6'C6'	C2'C2'	O4'C6'
Liaison H dans l'eau par unité monomérique	6	5	8.5	7.5	15.7
Liaison H dans un milieu méthanol/eau par unité monomérique	8	n.d.	n.d.	14.5	n.d.
Solubilité dans l'eau, 20 °C (g/l)	0.14	~600 ^a			
Solubilité dans un milieu méthanol/eau, 20 °C (g/l)	0.25	~500 ^a			
Distance entre molécule (Å)	11	n.d.	n.d.	11	n.d.

a : valeur déterminée sur le mélange oligomérique ; n.d. : non déterminé

3.2. Modélisation moléculaire de l'esculine et de ses oligomères dans l'eau ou dans un milieu méthanol/eau

Tout comme pour la rutine, l'esculine et ses oligomères ont été placées dans une cellule contenant des molécules d'eau ou méthanol/eau, afin d'explorer les conformations des molécules dans un solvant, d'étudier les interactions soluté/solvant et d'interpréter les variations de solubilité observées expérimentalement.

3.2.1. Modélisation moléculaire de l'esculine et de ses oligomères dans l'eau

3.2.1.1. Cas de l'esculine

Une molécule d'esculine a été placée dans une cellule cubique de 40 Å de côté contenant, lors de la dernière étape de dynamique à 300 K, 1370 molécules d'eau.

En raison de sa rigidité, l'esculine expose l'ensemble de ses fonctions au solvant.

Différentes liaisons hydrogène intramoléculaires s'établissent durant la dynamique :

- OH₇---O_{glucose}
- OH₇---OH_{glucose}
- OH₇---O_{pont osidique}
- glucose---glucose

Des liaisons hydrogène intermoléculaires se forment entre la molécule d'esculine et le solvant, ce qui stabilise le système (Figure V.18.). La majorité de ces liaisons s'établissent entre les groupements hydroxyles du glucose et des molécules d'eau. Par ailleurs, l'hydroxyle en position 7 est fréquemment impliqué dans ce type d'interactions et plus rarement la fonction catéchole. Dans le cas de l'esculine représentée Figure V.18., 9 liaisons hydrogène intermoléculaires sont formées impliquant 8 molécules d'eau.

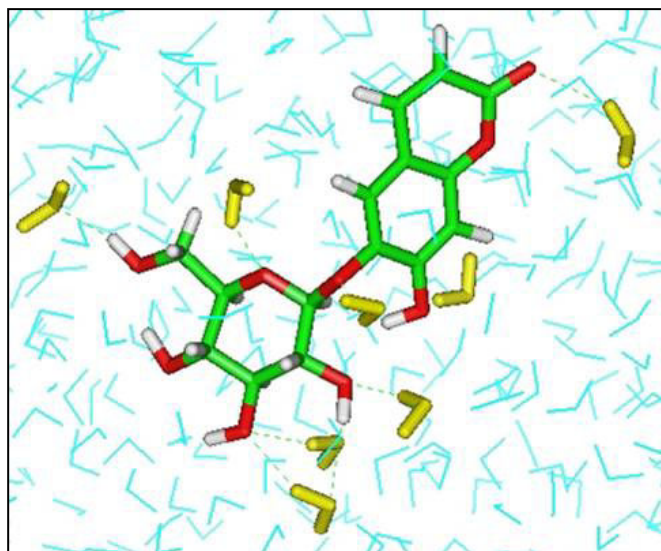


Figure V.18. Modélisation des liaisons hydrogène esculine/eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec l'esculine sont représentées en jaune.

Le nombre de liaisons hydrogène formées d'une part, entre la rutine et les molécules d'eau (6 liaisons) et d'autre part, entre l'esculine et les molécules d'eau (9 liaisons) suggèrent une meilleure solubilité de l'esculine. Ce résultat est en accord avec les résultats expérimentaux de solubilité (S) : $S_{rutine} : 0.14 \text{ g/l}$; $S_{esculine} : 3.70 \text{ g/l}$.

3.2.1.2. Cas des diescalines

Les deux types de pontages, les plus probables, O7-C4 et C4-C5 de la diescaline ont été modélisés (Figure V.19.). Deux cellules cubiques de 30 Å de côté ont été créées. L'ensemble des caractéristiques de ces deux diescalines dans l'eau est indiqué dans le Tableau V.13. .

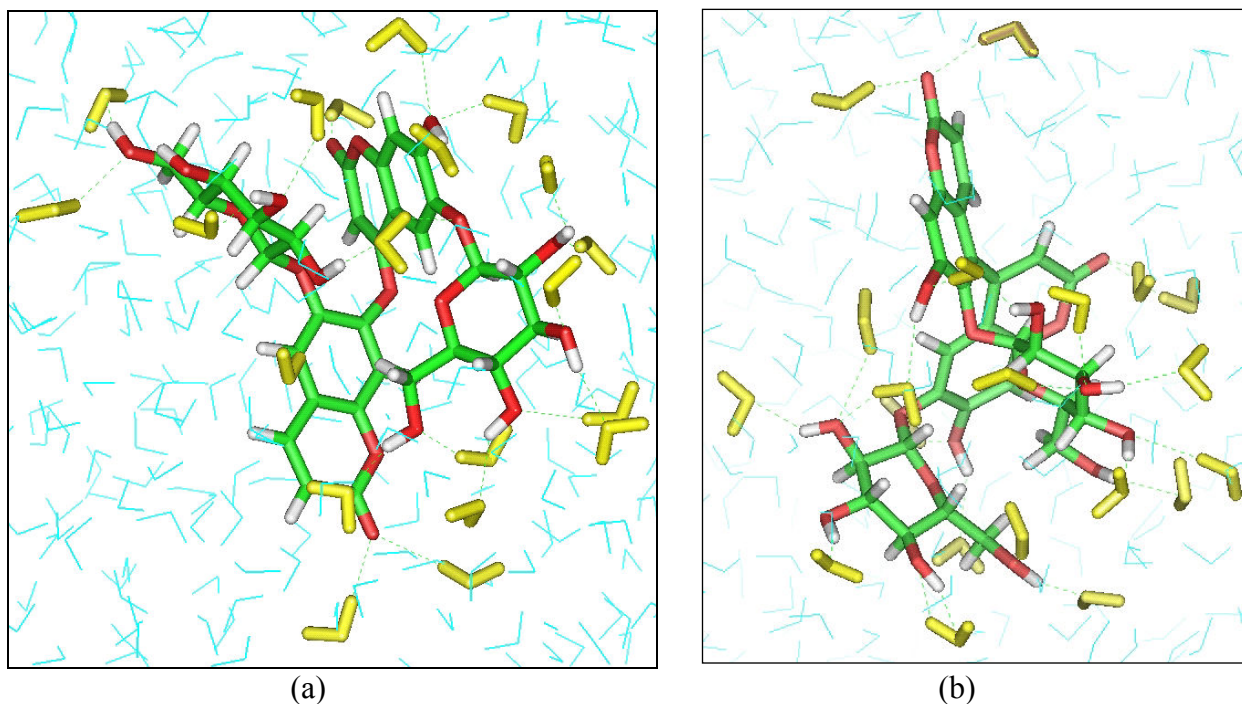


Figure V.19. Modélisation des liaisons hydrogène entre les diesculines liées en O7-C4 (a) et C4-C5 (b) avec l'eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec le dimère sont représentées en jaune.

Tableau V.13. Analyse de la trajectoire des diesculines liées en O7-C4 et C4-C5.

		Diesculine liée en :	
		O7-C4	C4-C5
Nombre de molécules d'eau dans la cellule		418	385
Distance glucose ₁ /glucose ₂ (Å)		[6.3 ; 11.1]	[5.6 ; 10.5]
Liaisons intramoléculaires		-glucose---glucose - OH ₇ ---glucose -catéchol---glucose	-glucose---glucose - OH ₇ ---glucose -catéchol---glucose (rare)
Liaisons intermoléculaires observées sur les représentations de la figure V.19.	Nombre	21	22
	Localisation		
	Sucres	15	14
	Fonction catéchole	3	4
	Hydroxyle en position 7	2	4

Selon ces résultats, il apparaît que le type de liaison mis en jeu lors de la formation des diesculines a peu d'impact sur la structure et sur les interactions du dimère avec le solvant.

3.2.1.3. Cas du nonamère d'esculine

Pour modéliser le nonamère d'esculine, formé par 8 pontages de type O7-C4, une cellule de dimension 40x60x50 Å a été créée. Afin de limiter le temps de calcul, la cellule n'a pas été remplie d'eau. Une couche de 15 Å d'épaisseur a été réalisée autour du nonamère. Lors de la dernière étape de la dynamique, 683 molécules d'eau entourent le nonamère.

Au cours de la dynamique de 200 ps, la distance séparant les glucoses (symbolisés par deux pseudo-atomes) des unités d'esculine des extrémités du nonamère varie de 12.2 à 29.1 Å pour se stabiliser vers 19.2 Å.

4 liaisons hydrogène intramoléculaires sont observées. Ces liaisons sont toutes établies entre groupements hydroxyles d'un même sucre sur les unités 1, 2, 4, 5. 22 liaisons hydrogène intermoléculaires sont formées entre le nonamère et l'eau (Figure V.20.). Sur ces 22 liaisons, 2 impliquent les fonctions catécholes, 20 impliquent des groupements du glucose.

Ce nombre de liaisons hydrogène est peu élevé. Ce résultat semble contradictoire avec la forte solubilité des oligomères constatée expérimentalement.

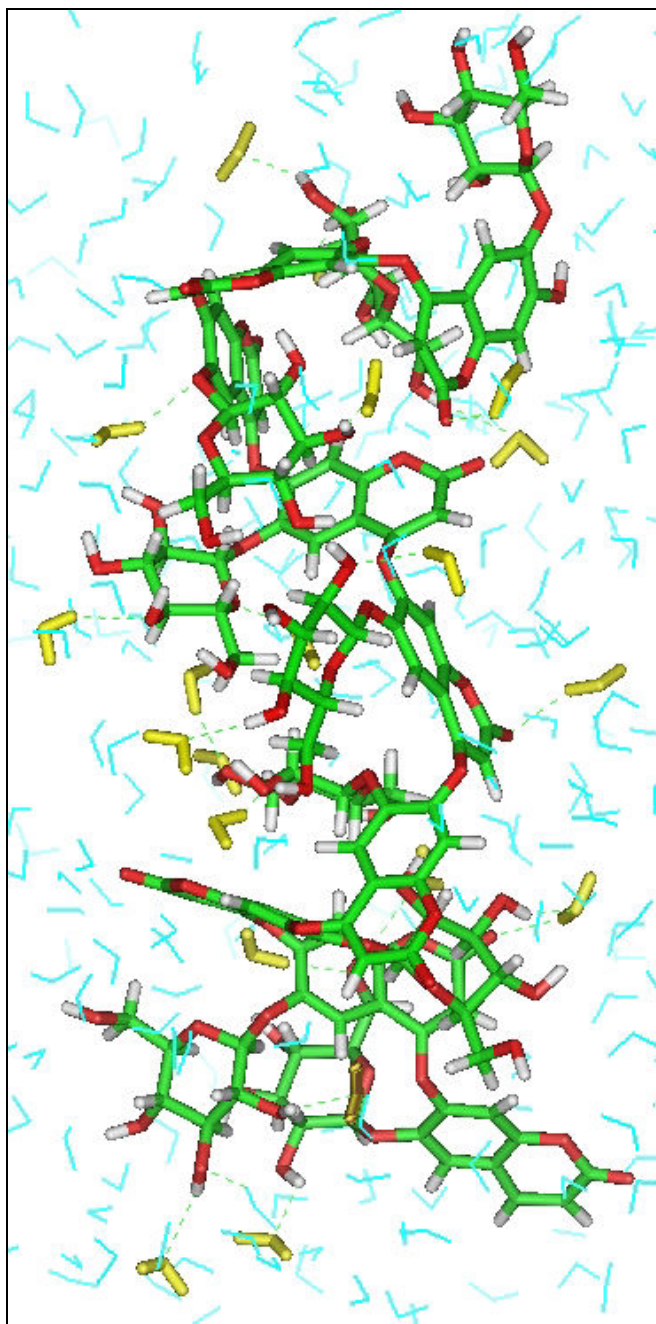


Figure V.20. Modélisation des liaisons hydrogène nonamère d'esculine/eau, les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec le nonamère sont représentées en jaune.

3.2.2. Etude des interactions d'un mélange de molécules d'esculine ou de diesculine dans un milieu méthanol/eau

3.2.2.1. Etude du système: quatre esculines dans un mélange méthanol/eau

Afin de modéliser les interactions entre esculines au sein du mélange réactionnel, quatre esculines ont été placées dans une cellule de dimension $60 \times 40 \times 40$ Å, contenant, 138 molécules de méthanol et 725 molécules d'eau. Quatre cycles de minimisation/dynamique très courte de respectivement 100, 2400, 90 et 260 fs à une convergence de 0.01 kcal/mol ont été effectués. La dernière étape de minimisation est analysée ici.

Afin de caractériser les mouvements relatifs des molécules d'esculine, un pseudo-atome a été défini sur chaque monomère. Ce pseudo-atome est à égal distance des atomes C4', O1' et O2. Chaque monomère est noté respectivement a, b, c et d. Les distances à l'équilibre séparant ces pseudo-atomes sont reportées Figure V.21.. Excepté les 3 liaisons hydrogène intramoléculaires, aucune liaison hydrogène n'est observable à ce stade entre les unités d'esculine. En revanche, un phénomène d'empilement a été observé entre monomère (Figure V.21.).

Les molécules d'esculine a, b, c et d forment respectivement 2, 3, 2 et 1 liaisons hydrogène avec des molécules de méthanol. Toutes ses liaisons font intervenir le glucose des esculines. Les esculines a, b, c et d forment respectivement 9, 8, 5 et 9 liaisons hydrogène avec des molécules d'eau. Ces liaisons avec le solvant font intervenir aussi bien la partie sucre que les 2 autres cycles de l'esculine (Figure V.21.).

Ces résultats suggèrent une légère amélioration de la solubilité de l'esculine dans un mélange méthanol/eau par rapport à l'eau. Ceci est confirmé par les mesures de solubilité expérimentales de l'esculine : $S_{\text{esculine}}(\text{eau}) : 3.70 \text{ g/l} < S_{\text{esculine}}(\text{méthanol/eau}) : 5.96 \text{ g/l}$.

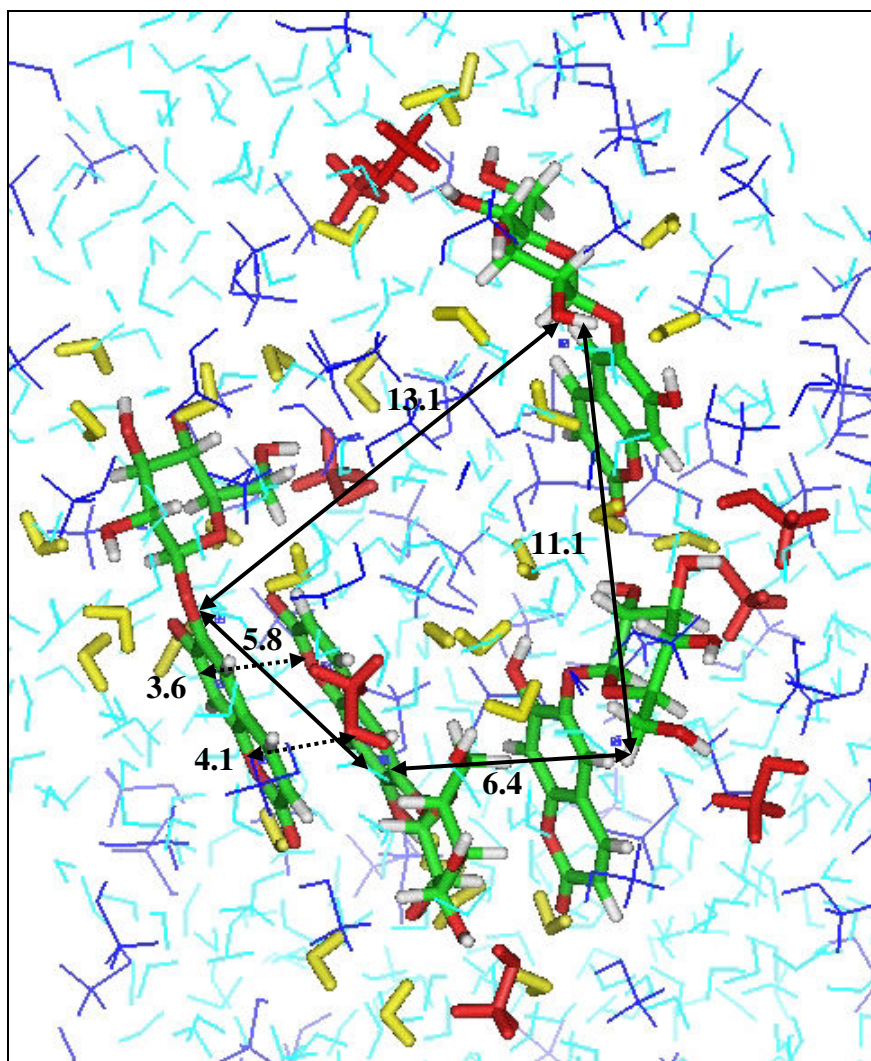


Figure V.21. Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 4 esculines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v). Les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec une rutine sont représentées en jaune et les molécules de méthanol formant une liaison hydrogène avec une rutine en rouge. Les distances séparant les pseudo-atomes A, B, C et D à l'équilibre sont indiquées en Å.

3.2.2.2. Etude du système: deux diesculines dans un mélange méthanol/eau

Afin de simuler les interactions intermoléculaires dans le milieu réactionnel, deux diesculines liées en O7-C4 ont été placées dans une cellule cubique de 60 Å de côté. Lors de la dernière étape de dynamique, la cellule contient 395 molécules de méthanol, 2073 molécules d'eau et 2 molécules de diesculines. Cette dernière dynamique a une trajectoire de 119 ps.

4 pseudo-atomes ont été définis afin d'évaluer l'éloignement des molécules au cours de la dynamique. Chaque pseudo-atome se trouve à équidistance entre la position C4', O1' et la position O2 d'une même unité d'esculine. Les distances séparant ces pseudo-atomes à l'équilibre sont reportées Figure V.22..

A la stabilisation du système, une liaison hydrogène intramoléculaire est établie sur chacune des diesculines, celle-ci étant localisée sur le glucose. Sur la conformation représentée Figure V.22., 9 liaisons hydrogène sont formées avec les molécules d'eau (3 et 4 respectivement pour les 2 diesculines) et aucune avec des molécules de méthanol. Ces liaisons impliquent toutes les glucoses.

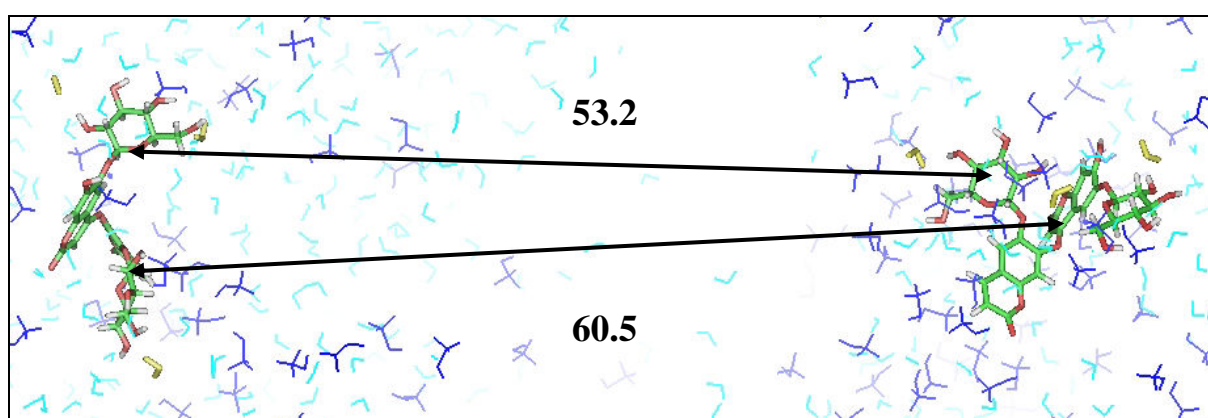


Figure V.22. Modélisation des liaisons hydrogène établies dans un mélange de 2 diesculines dans un milieu méthanol/eau (30/70, v :v). Vue zoomée du système. Les molécules d'eau formant une ou deux liaisons hydrogène avec une diesculine sont représentées en jaune. Les distances séparant les pseudo-atomes A, B, C et D à l'équilibre sont indiquées en Å.

Ces résultats suggèrent :

- $S_{\text{diesculine}}(\text{méthanol/eau}) < S_{\text{diesculine}}(\text{eau})$,
- $S_{\text{diesculine}} < S_{\text{esculine}}$

Ces résultats sont confirmés par les mesures expérimentales : $S_{\text{oligomères}}(\text{méthanol/eau}) : 0.4 \text{ g/l} < S_{\text{oligomères}}(\text{eau}) : 700 \text{ g/l}$ et $S_{\text{oligomères}}(\text{méthanol/eau}) : 0.4 \text{ g/l} < S_{\text{esculine}}(\text{méthanol/eau}) : 5.96 \text{ g/l}$.

Les phénomènes d'empilement constatés pour l'esculine ne sont pas observés pour la diesculine.

3.2.4. Interprétations structure/fonction et conclusions

Tout comme pour la rutine, il apparaît que le nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires établies entre le soluté et les molécules de solvant est un bon indicateur de la solubilité (Tableau V.14.).

Néanmoins, une contradiction subsiste. Dans le cas du nonamère d'esculine, 22 liaisons hydrogène intermoléculaires ont été établies entre la molécule et les molécules d'eau, soit moins de 3 liaisons par unité d'esculine. Ceci devrait se traduire par une moindre solubilité dans l'eau, or les données expérimentales indiquent une augmentation. Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de ce résultat dont: i) le pontage utilisé dans le modèle ne correspond pas à celui établi expérimentalement ; ii) le nombre de liaisons hydrogène n'est pas un indicateur suffisant de la solubilité. En effet, la géométrie de la molécule (forme, volume, distribution de la masse), la topologie (masse moléculaire, branchement, flexibilité), les caractéristiques électrostatiques (charge d'un atome, surface des liaisons hydrogène) ainsi que les caractéristiques chimiques (polarisabilité, énergie des orbitales, enthalpie, entropie, Cp, moment dipolaire, ...) sont autant de paramètres pouvant aussi intervenir dans la prédiction de la solubilité [216].

Tableau V.14. Impacts de l'oligomérisation de l'esculine sur la solubilité et sur l'agrégation.

Unité monomérique	Esculine			
	1	2	9	
Degré d'oligomérisation				
Pontage		O7C4	C4C5	O7C4
Liaison H dans l'eau par unité monomérique	9	10.5	11	< 3
Liaison H dans un milieu méthanol/eau par unité monomérique	11	4	n.d.	n.d.
Solubilité dans l'eau, 20 °C (g/l)	3.70	~700 ^a		
Solubilité dans un milieu méthanol/eau, 20 °C (g/l)	5.96	~0.4 ^a		
Distance entre molécule (Å)	9	55	n.d.	n.d.

a : valeur déterminée sur le mélange oligomérique ; n.d. : non déterminé

Initialement, les esculines forment en moyenne 11 liaisons avec les molécules d'eau et de méthanol, mais une fois dimérisées, seules les liaisons hydrogène établies avec des molécules d'eau sont conservées. Ceci suggère que les molécules de diesculine ont moins d'affinité pour le méthanol que pour l'eau. Ce résultat est en accord avec les mesures expérimentales de solubilité des oligomères. De plus, il a été démontré par RMN qu'au cours de l'oligomérisation l'environnement des molécules change. Au départ, les molécules sont entourées d'eau et de méthanol, puis progressivement, seule l'eau est détectée.

Dans le cas de l'esculine, un phénomène d'empilement a pu être démontré, ce qui corrobore les résultats obtenus par RMN. Cet empilement n'est pas observé dans le cas des dimères d'esculine. Cette observation est en accord avec les mécanismes proposés par de Desentis-Mendoza *et al.* [59] qui suggèrent une diminution du potentiel d'agrégation due à l'oligomérisation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a porté sur l'étude de la réaction d'oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et de coumarines, en présence de la laccase de *Trametes versicolor*. Cette étude a eu pour but de comprendre les mécanismes réactionnels mis en jeu, d'identifier et de déterminer les facteurs clefs de cette réaction et de quantifier leurs effets sur les performances et la structure des oligomères, et enfin d'évaluer les propriétés de ces oligomères et d'essayer de déterminer la relation structure-activité de ces oligomères.

Cette étude a nécessité, au préalable, la mise au point d'une plateforme de synthèse en parallèle et d'analyse en ligne par MALDI-TOF et SEC-UV. Les conditions optimales d'analyse par MALDI-TOF varient selon les molécules étudiées, nous avons donc cherché le type de matrice, le pourcentage de solvant, le ratio de dépôt ainsi que les modes de détection et d'ionisation les plus appropriés pour les molécules étudiées dans ce travail. Les conditions optimales d'analyse des oligomères de rutine sont : 3 μ l d'analyte dilué deux fois dans ACN/eau TFA 0.1 % (30 :70, v/v), 1 μ l DHB (5 mg/ml) dans ACN/eau TFA 0.1 % (30 :70, v/v), et une détection en mode reflectron positif. La validation de cette plateforme a mis en évidence la sous-estimation de la masse moyenne des oligomères par l'analyse par MALDI-TOF, et sa sur-estimation par l'analyse par SEC-UV.

Du point de vue cinétique, cette étude a démontré que quel que soit le monomère utilisé (rutine ou esculine) et quel que soient les conditions opératoires appliquées (température, pH, ...) les masses molaires moyennes en poids des oligomères synthétisés ne dépassent pas une valeur maximale variable selon la nature de l'oligomère. Dans le cas de l'oligomérisation de la rutine, l' I_M des oligomères est limité à 3.44, ceci pourrait être dû à un phénomène de chélation de l'enzyme par les oligomères formés, conduisant à son inhibition. Dans le cas de l'oligomérisation de l'esculine, l' I_M des oligomères est limité à 5, ceci serait dû à la moindre réactivité des oligomères de haut poids moléculaire. L'étude de l'impact des conditions réactionnelles sur l'oligomérisation de la rutine a permis de constater qu'un faible pH (4 ou 5) permet l'obtention d'oligomères à haut poids moléculaire, que l'augmentation de la température réactionnelle aboutit à une diminution de la longueur des chaînes et à une augmentation de la production d'oligomères et qu'enfin, l'augmentation de la constante diélectrique du co-solvant induit un accroissement de la production d'oligomères.

Du point de vue structurale, l'étude par MALDI-TOF a permis de révéler la formation d'un simple pontage entre unité monomérique, allant jusqu'au degré d'oligomérisation 6 pour la rutine et 9 pour l'esculine. L'analyse par FTIR a mis en évidence la formation d'un pontage éther dans le cas des oligomères de rutine. L'analyse par RMN a indiqué, d'une part, la mise en place de liaisons tant C-C que C-O localisées tout aussi bien sur la partie sucre que sur la partie phénolique des monomères de rutine et d'esculine. D'autre part, elle a révélé la formation d'un dimère de rutine lié en C2'-C2'. L'approche par modélisation moléculaire a permis de corrélérer cette observation à la forte réactivité des radicaux C2'', favorisant les phénomènes de couplage (C2'', C2'') engendrant la formation de dirutines liées en C2'-C2'.

Du point de vue de la caractérisation des propriétés, une forte augmentation de la solubilité dans l'eau a été observée tant sur les oligorutines, que sur les oligoesculines. Cette forte augmentation de la solubilité des oligorutines a été corrélée à la mise en place d'un réseau dense de liaison hydrogènes, grâce à la conformation dépliée prise par l'hexamère. En revanche, la solubilité dans un milieu méthanol/eau est diminuée lors de l'oligomérisation de l'esculine. L'analyse par RMN tout comme l'analyse par modélisation moléculaire ont mis en évidence un phénomène d'empilement des molécules d'esculine, tandis que les oligomères sont dispersés. En ce qui concerne les propriétés antioxydantes, une diminution des propriétés antiradicalaires par rapport au monomère a été observée dans le cas des oligorutines, alors que cette même activité a été accrue par l'oligomérisation de l'esculine. Quel que soit le type de pontage, l'analyse par modélisation moléculaire des dimères de rutine prévoit une baisse du pouvoir antiradicalaire, ce qui corrobore les données expérimentales. En revanche, l'augmentation du pouvoir antioxydant des oligomères d'esculine laisse supposer un pontage de type C-C ou C-O_{glucose} d'après les résultats obtenus par modélisation moléculaire. Dans le cas de la rutine comme de l'esculine, l'oligomérisation a permis d'augmenter leur pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase. Ceci peut être imputé au pouvoir chélatant accru des oligomères qui provoque l'inhibition de l'enzyme.

Cette étude a permis de confirmer certains travaux antérieurs mais a également permis d'approfondir les connaissances concernant l'oligomérisation enzymatique de molécules phénoliques glycosylées. Ainsi, une inhibition de l'enzyme par les produits a été démontrée, ce qui corrobore les résultats de Desentis-Mendoza *et al.* [59], l'effet du pH et de la concentration en solvant sur la Mw a été démontré ce qui est en accord avec les résultats de Kurisawa *et al.* [28], un accroissement de la solubilité dans l'eau des oligomères de rutine en

comparaison à la rutine a été observé tout comme Kurisawa *et al.* [28] et enfin, une diminution de l'activité antiradicalaire des oligomères de rutine comparé à la rutine a été observée ce qui est en accord avec les observations de Desentis-Mendoza *et al.* [59]. En outre cette étude a permis pour la première fois la détermination structurale d'une dirutine en C2'-C2', la mise en évidence d'une multitude de pontage de type C-C et C-O sur la partie sucre et sur la partie phénolique. De plus, pour la première fois, la cinétique d'oligomérisation d'une coumarine (l'esculine) a été suivie et il a été mis en évidence l'impact de la Mw sur les propriétés antiradicalaires et d'inhibition de la xanthine oxydase ainsi que l'impact de la constante diélectrique du solvant sur la quantité d'oligomères de rutine formée. Enfin, l'un des côtés novateur de cette étude et l'approche par modélisation moléculaire qui nous a permis d'interpréter les résultats expérimentaux.

Perspectives

Cette étude a permis de démontrer la formation de pontage de type C-C et C-O reliant les unités monomériques, l'impact des conditions réactionnelles sur la taille des oligomères ainsi que l'effet de cette taille sur les activités biologiques des oligomères synthétisés. A partir de ces résultats un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées.

Bien que de nombreuses techniques de caractérisation structurale aient déjà été utilisées au cours de ce travail, elles n'ont pas permis de caractériser l'ensemble des structures oligomériques. Pour affiner la caractérisation structurale des molécules synthétisées, il est primordial de développer des outils spécifiques de caractérisation et probablement de séparation de ces molécules.

L'effet de la masse des oligomères sur leurs propriétés a pu être évalué au cours de cette étude, néanmoins d'autres facteurs structuraux influencent ces propriétés. Il serait notamment intéressant d'évaluer l'impact du type de pontage (C-C ou C-O) sur ces propriétés.

Les facteurs réactionnels influençant la production et la taille des oligomères ont pu être évalués au cours de ce travail. Ces informations peuvent être exploitées pour mettre au point des modes de conduite appropriés afin d'obtenir des oligomères avec des structures et des propriétés ciblées.

RÉFÉRENCES

References

1. Cook NC, Samman S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1996;7:66.
2. Cabello-Hurtado F, Durst F, Jorrián JV, Werck-Reichhart D. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 1998;49:1029.
3. Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin Biotechnol.* 2001;12:155.
4. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2002;5:218.
5. 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.
6. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 1999;37:937.
7. Ajay M, Gilani AUH, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;74:603.
8. Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clin. Chim. Acta* 2004;339:129-133.
9. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, De La Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research* 2003;48:601.
10. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* 2001;56:683-687.
11. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2002;73:557.
12. Dugas AJ, Castaneda-Acosta, J.J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H. and Winston GW. Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *J. Nat. Prod.* 2000;63:327-331.
13. Afanas'ev IB, Afanas'ev II, Deeva IB, Korkina LG. Free radical formation and oxyhemoglobin oxidation in B-thalassemic red blood cells in the presence of prooxidants: Effects of the free radical scavenger rutin and oral chelator L1. *Transfusion Science* 2000;23:237.
14. Kostyuk VA, Potapovich AI, Vladykovskaya EN, Korkina LG, Afanas'ev IBA. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001;385:129.
15. Aherne SA, O'Brien NM. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;29:507.
16. Hoult JRS, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology* 1996;27:713.
17. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12:887-916.
18. Mompon B, Lemaire B, Mengal P, Surbled M. *Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle.* in *Polyphenols.* 1996. Bordeaux.
19. Saidman E, Yurquina A, Rudyk R, Molina MAA, Ferretti FH. A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *J. Mol. Struct. Theochem* 2002;585:1-13.

20. Abou El Hassan MAI, Touw DJ, Wilhelm AJ, Bast A, van der Vijgh WJF. Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *International Journal of Pharmaceutics* 2000;211:51-56.
21. Pulley G. Solubility of naringin in water. *Industrial and Engineering Chemistry* 1936;8:360.
22. 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.
23. 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;49:189 - 191.
24. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biolo. Med.* 2004;36:829-837.
25. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Luisa Pellegrino M, Tita B, Messina C, Bonina FP, Rocco C, Nicolosi G, Castelli F. 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003;56:167-174.
26. Lee SJ, Kim J-C, Kim MJ, Kitaoka M, Park CS, Lee SY, Ra M-J, Moon TW, Robyt JF, Park KH. Transglycosylation of Naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase To Give Glycosylated Naringin. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47:3669-3674.
27. 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. Pharm. Sci.* 2004;35:379-387.
28. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003;4:1394-1399.
29. Bruno FF, Nagarajan S, Nagarajan R, Kumar J, Samuelson LA. Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins). *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* 2005;42:1547-1554.
30. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481-504.
31. Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003;64:923-933.
32. Markham K, Techniques of flavonoid identification. 1982: Academic Press. 36-93.
33. Harborne J, Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1 Plant Phenolics. 1989: Academic Press.
34. Mejias L, Reihmann MH, Sepulveda-Boza S, Ritter H. New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase. *Macromol. Biosci.* 2002;2:24-32.
35. 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;23:411-417.
36. Friedman M, Jurgens HS. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2101-2110.
37. 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;1569:35-44.
38. Grohmann K, Manthey JA, Cameron RG. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research* 2000;328:141-146.

39. Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E. Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:4394-4399.
40. 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.* 2000, Université Claude Bernard- Lyon 1: Lyon.
41. Makris DP, Rossiter JT. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymatic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. 2002;77:177.
42. Kubo I, Nihei K-i, Shimizu K. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004;12:5343-5347.
43. Makris DP, Rossiter JT. High performance liquid chromatography studies on free radical oxidation of flavonols. *Special Publication-Royal Society of Chemistry* 2000;225:249-251.
44. Balogh-Hergovich E, Speier G. Kinetics and Mechanism of the Base-Catalyzed Oxygenation of Flavonol in DMSO-H₂O Solution. *J. Org. Chem.* 2001;66:7974-7978.
45. Barhaes L, Kaizer J, Speier G. Kinetics and Mechanism of the Oxygenation of Potassium Flavonolate. Evidence for an Electron Transfer Mechanism. *J. Org. Chem.* 2000;65:3449-3452.
46. Ramos-Tejada MM, Duran JDG, 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 Surf., B* 2002;24:297-308.
47. 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.
48. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Ensunsa JL, Hammerstone JF, Schmitz HH, Keen CL. Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1700-1705.
49. Rice-Evans CA, Miller, N.J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20:933-956.
50. Van Acker SABE, Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P.V., Van Der Vijgh, W.J.F. and Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20:331-342.
51. Afanas, rsquo, eva IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal, rsquo, chik EV, Ibragimova GA, Korkina LG. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol.* 2001;61:677-684.
52. Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* 1996;16:517-544.
53. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. 2002;13:572.
54. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Rastija V, Lucic B, Trinajstic N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* 2007;14:827-845.
55. Cao G, Sofic, E. and Prior, R.L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;22:749-760.

56. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:2774-2779.
57. Kurisawa M, Chung JE, Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Amplification of antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization. *Biomacromolecules* 2003;4:469-71.
58. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003;4:1394-9.
59. Desentis-Mendoza RM, Hernandez-Sanchez H, Moreno A, Rojas del C E, Chel-Guerrero L, Tamariz J, Jaramillo-Flores ME. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* 2006;7:1845-1854.
60. Es-Safi NE, Guyot S, Ducrot PH. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:6969.
61. Williamson G, Plumb GW, Garcia-Conesa MT. Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties, in *Plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, Gross G.G., et al., Editors. 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. p. 483-494.
62. Sroka Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C* 2005;60:833-843.
63. Da Silva SL, Da Silva A, Honorio KM, Marangoni S, Toyama MH, Da Silva ABF. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *THEOCHEM* 2004;684:1.
64. Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;294:167-172.
65. 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. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65:447-456.
66. Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, Calabro ML, Di Bella MR, Rustichelli C, Gamberini MC, Ficarra P. Study of flavonoids/[beta]-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J. Pharm. Sci.* 2002;29:1005-1014.
67. Zhu Z, Li C, Li N-Q. Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA. *Microchemical Journal* 2002;71:57-63.
68. Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1593-1601.
69. Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.* 1996;59:205-215.
70. 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;357:775-784.
71. Cornard JP, Merlin JC. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002;92:19.
72. Cornard JP, Merlin JC. Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron* 2002;21:2801.
73. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants: reviews. *J. Nat. Prod.* 2000;63:1035-1042.

74. Walle T, Vincent TS, Walle UK. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65:1603-1610.
75. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therap.* 2002;96:67-202.
76. Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65:773-781.
77. Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* 2001;62:1185-1191.
78. Babu AM, Shakya N, Prathipati P, Kaskhedikar SG, Saxena AK. Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase antagonists: chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2002;10:4035-4041.
79. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 1998;61:71-76.
80. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Nat. Prod.* 1988;51:345-348.
81. Ponce AM, Blanco SE, Molina AS, Garcia-Domenech R, Galvez J. Study of the Action of Flavonoids on Xanthine-Oxidase by Molecular Topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2000;40:1039.
82. Van Hoorn DEC, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PAM, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DBA, Van Norren K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;451:111.
83. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* 1993;13:2165.
84. Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999;63:1787.
85. Iio M, Moriyama A, Matsumoto Y, Takaki N, Fukumoto M. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* 1985;49:2173-2176.
86. Kurisawa M, Chung JE, Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization. *Biomacromolecules* 2003;4:469-471.
87. Zhai H, Maibach H. Skin antioxidants. *Cosmetics & Toiletries* 2002;117:28-32.
88. 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;145:87-94.
89. Saliou C, Kitazawa M, McLaughlin L, Yang J-P, Lodge JK, 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 Radic. Biolo. Med.* 1999;26:174-183.
90. Zhang K, Yang E-B, Tang W-Y, Wong KP, Mack P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 1997;54:1047-1053.
91. Dunnick JK, Hailey JR. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundamental and Applied Toxicology* 1992;19:423.
92. Bao Ting Z, Ezell EL, Liehr JG. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:292.
93. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 1995;33:1061-1080.

94. Kato K, Mori H, Fujii M. Lack of promotive effect of quercetin on methylazoxymethanol acetate carcinogenesis in rats. *Journal of Toxicological Sciences* 1984;9:319.
95. Plakas SM, Lee TC, Wolke RE. Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin, to rainbow trout. (*Salmo gairdneri*). *Food Chem.Toxicol.* 1985;23:1077.
96. Knekt P, Kumpulainen J, Ja?rvinen R, Rissanen H, Helio?vaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:560.
97. Knekt P, Jarvinen R, Seppa?nen R, Helio?vaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* 1997;146:223.
98. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biolo. Med.* 2004;36:838.
99. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol.Biosci.* 2003;3:758-764.
100. Grasselli JG, *The Atlas of spectral data and physical constants for organic compounds*, ed. Press C. 1973, Cleveland, OH.
101. Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 2003;142:239.
102. Zhang HY, Wang LF. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *THEOCHEM* 2004;673:199.
103. Zhang H-Y, Wang L-F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *J. Mol. Struct. Theochem* 2004;673:199.
104. Chang WS, Chiang HC. Structure-activity relationship of coumarin in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Research* 1995;15:1969-1974.
105. Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag HJ, Van Uden W, Pras N. Structure - Cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C - Journal of Biosciences* 1997;52:240.
106. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem.- Anti-cancer Agents* 2005;5:29-46.
107. Ayyagari M, Akkara JA, Kaplan DL. Enzyme-mediated polymerisation reactions: peroxidase-catalyzes polyphenol synthesis. *Acta Polymer.* 1996;47:193-203.
108. Kaplan DL, Dordick JS, Gross RA, Swift G, *Enzymes in polymer science: an introduction*, in *Enzymes in polymer synthesis*, Gross R.A., Kaplan D.L., and Swift G., Editors. 1998: Washington. p. 2-17.
109. Uyama H, Kobayashi S. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2002;19-20:117-127.
110. Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic Polymerization. *Chem. Rev.* 2001;101:3793-3818.
111. Gross RA, Kumar A, Khalra B. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chem.Rev* 2001;101:2097-2124.
112. Wang L, Kobatake E, Ikariyama Y, Aizawa M. Regioselective oxidative polymerization of 1,5-dihydroxynaphthalene catalyzed by bilirubin oxidase in a water-organic solvent mixed solution. *Journal of polymer science part A* 1993;31:2855-2861.
113. Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 1999;3:1-25.
114. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem.Rev.* 1996;96:2563-2605.
115. Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35 2004;35:93-96.

116. Piontek K, Antorini M, Choinowsky T. Crystal structure of a laccase from the *Fungus Trametes versicolor* at 1.90Å resolution containing a full complement of coppers. the journal of biological chemistry 2002;277:37663-37669.
117. Marcus RAaS, N. Electron transfers in chemistry and biology: partie 1. Biochim. Biophys. Acta 1985;811:265-322.
118. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry 1996;35:7608-7614.
119. Garavaglia S, Teresa Cambria M, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scalonì A, Rizzi M. The Structure of Rigidoporus lignosus Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair. 2004;342:1519-1531.
120. Peterson L, Degn H. steady-state kinetics of laccase from *Rhus vernicifera*. Biochim. Biophys. Acta 1978;526:85-92.
121. Xu F, Berka RM, Wahleithner JA, Nelson BA, Shuster JR, Brown SH, Palmer AE, Solomon EI. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem J 1998;334 (Pt 1):63-70.
122. Xu F. Effect of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. The Journal of Biological Chemistry 1997;272:924-928.
123. Xu F. Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase. Applied biochemistry and biotechnology 1996;59:221-230.
124. Jolivalt C, Brenon S, Caminade E, Mougins C, Pontié M. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. J. Membr. Sci. 2000;180:103-113.
125. Robles A, Lucas R, de Cienfuegos GA, Gálvez A. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. Enzyme Microb. Technol. 2000;26:484-490.
126. Casa R, D'Annibale A, Pieruccetti F, Stazi SR, Giovannozzi Sermanni G, Lo Cascio B. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. Chemosphere 2003;50:959-966.
127. Durante D, Casadio R, Martelli L, Tasco G, Portaccio M, De Luca P, Bencivenga U, Rossi S, Di Martino S, Grano V, Diano N, Mita DG. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2004;27:191-206.
128. Wagner M, Nicell JA. Impact of dissolved wastewater constituents on peroxidase-catalyzed treatment of phenol. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2002;77:419-428.
129. Ryan D, Leukes W, Burton S. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. Bioresour. Technol. 2007;98:579.
130. Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. journal of biotechnology 1997;53:215-236.
131. Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. Appl Microbiol Biotechnol 1997;48:261-266.
132. Soares GMB, Amorim MTP, Hrdina R, Costa-Ferreira M. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. Process Biochem. 2002;37:581-587.

133. Peralta-Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL, Moraes SG, Rosa MA, Minussi RC, Duran N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. 2003;42:131.
134. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and Environmental Microbiology 2000;66:3357-3362.
135. Freire RS, Dura'n N, Kubota LT. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. Talanta 2001;54:681-686.
136. Fernandez-Sanchez C, Tzanov T, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A. Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. Bioelectrochem 2002;58:149-156.
137. Achilli G, Cellerino, G.P., Melzi d'Eril, G. and Bird, S. Simultaneous determination of 27 phenols and herbicides in water by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. J. Chromatogr. A 1995;697:357-362.
138. Haghighi B, Gorton L, Ruzgas T, Jonsson LJ. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. Analytica Chimica Acta 2003;487:3.
139. Milligan C, Ghindilis A. Laccase based sandwich scheme immunosensor employing mediatorless electrocatalysis. Electroanalysis 2002;14:415.
140. Matthews A, Grimaldi A, Walker M, Bartowsky E, Grbin P, Jiranek V. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. Applied and Environmental Microbiology 2004;70:5715.
141. Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. Food Research International 2005;38:995.
142. Anderson JS. The chemistry of hair colorants. Journal of the Society of Dyers and Colourists 2000;116:193.
143. Aktas N, Kibarar G, Tanyolaç A. Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed alpha-naphthol polymerization. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2000;75:840-846.
144. Hutchinson RA, Free-radical polymerization: Homogeneous, in Handbook of polymer reaction engineering, Meyer T. and Keurentjes J., Editors. 2005, WILEY-VCH: Darmstadt. p. 153-212.
145. Fontanille M, Gnanou Y, Chime et physico-chimie des polymères. 2002, Paris: Dunod.
146. Pilz R, Hammer E, Schauer F, Kragl U. Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003;60:708.
147. Hosny M, Rosazza PN. Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase. J. Agric. Food Chem. 2002;50:5539-5545.
148. Lopez-Serrano M, Ros Barcelo A. Reversed-phase and size-exclusion chromatography as useful tools in the resolution of peroxidase-mediated (+)-catechin oxidation products. J. Chromatogr. A 2001;919:267.
149. Yang Y, Chien M. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2000;48:3990-3996.
150. Krueger CG, Vestling MM, Reed JD. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. J. Agric. Food Chem. 2003;51:538-543.
151. Pinelo M, Manzocco L, Jose Nunez M, Cristina Nicoli M. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. Food Chemistry 2004;88:201.

152. Ikeda R, Sugihara J, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol. *Macromolecules* 1996;29:8702-8705.
153. Uchida H, Fukuda T, Miyamoto H, Kawabata T, Suzuki M, Uwajima T. Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;287:355-358.
154. Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide). laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules* 1996;29:3053-3054.
155. Mita N, Tawaki SI, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromol.Biosci.* 2003;3:253-257.
156. Ncanana S, Baratto L, Roncaglia L, Riva S. Laccase-mediated oxidation of totarol. *Adv. Synth. Catal.* 2007;349:1507-1513.
157. Kobayashi S, Higashimura H. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog. Polym. Sci.* 2003;28:1015-1048.
158. Intra A, Nicotra S, S. R, Danieli B. Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphtol derivatives. *Adv. Synth. Catal.* 2005;347:973-977.
159. Hartner S, Kim HC, Hampp N. Photodimerized 7-hydroxycoumarin with improved solubility in PMMA: Single-photon and two-photon-induced photocleavage in solution and PMMA films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007;187:242.
160. Trenor SR, Shultz AR, Love BJ, Long TE. Coumarins in polymers: from light harvesting to photo-cross-linkable tissue scaffolds. *Chem.Rev* 2004;104:3059-3077.
161. Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 1996;42:1279-1288.
162. Bos MA, Vennat B, Meunier MT, Pouget MP, Pourrat A, Fialip J. Procyanidins from tormentil: Antioxidant properties towards lipoperoxidation and anti-elastase activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1996;19:146.
163. Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P. Procyanidins from tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1994;17:1613.
164. Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Del Rio JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1738.
165. Bacon JR, Rhodes MJC. Development of a Competition Assay for the Evaluation of the Binding of Human Parotid Salivary Proteins to Dietary Complex Phenols and Tannins Using a Peroxidase-Labeled Tannin. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:5083.
166. Berke B, de Freitas VAP. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry* 2005;90:453.
167. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Lucic 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. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 1997;37:581.
168. 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;44:497-501.

169. Erkoç S, Erkoç F, Keskin N. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *J. Mol. Struct. Theochem* 2003;631:141-146.
170. 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;27:325-328.
171. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D. CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *J. Mol. Struct. Theochem* 2005;716:67.
172. Rodriguez MR, Cano AT, Pinto MDC, Macias P. Lipoygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *J. Mol. Struct. Theochem* 2004;674:121-124.
173. van Acker SABE, de Groot MJ, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Donne-Op den Kelder G, van der Vijgh WJF, Bast A. A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 1996;9:1305-1312.
174. Alluis B, *Modifications chimiques de flavonoïdes, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydants*. 2000, Université Claude Bernard Lyon I: Lyon. p. 300.
175. Wright JSJ, 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;123:1173-1183.
176. Leopoldini M, Pitarch IP, 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;108:92-96.
177. Dangles O, Propriétés chimiques des polyphénols, in *Les polyphénols en agroalimentaire*, TEC&DO, Editor. 2006: Paris. p. 29-54.
178. Ghiotto RCT, Lavarda FC, Ferreira FJB. Antioxidant activity of flavonols. *International Journal of Quantum Chemistry* 2004;97:949.
179. Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux JL. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* 2006;97:679.
180. 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;88:571-582.
181. Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007;460:1.
182. Nemeikaite-Ceniene A, Imbrasaite A, Sergediene E, Cenas N. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant of polyphenols: role of potential of phenoxy radical/phenol redox couple. *Archives of biochemistry and biophysics* 2005;441:182-190.
183. Moridani MY, Galati G, O'Brien PJ. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem.-Biol. Interact.* 2002;139:251.
184. Sergediene E, Jonsson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IMCM, Cenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett.* 1999;462:392.
185. Ishihara M, Yokoto Y, Sakagami H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semiempirical molecular orbital method. *Anticancer Res.* 2006;26:2883-2886.
186. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M, *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press Inc. ed, ed. Bergmeyer H.U. Vol. 1. 1974, New York. 521-522.

187. Vinh J, *Caractérisation par spectrométrie de masse des modifications post-traductionnelles de la tubuline.*, in *Paris VI*. 1999, Université Pierre et Marie Curie: Paris.
188. Constantin E, *Spectrométrie de masse, principes et applications*. Lavoisier ed, ed. TEC&DO. 1996, Paris.
189. Nonier MF, Absalon C, Vivas N, Vivas de Gaulejac N. Application of off-line size-exclusion chromatographic fractionation-matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for proanthocyanidin characterization. 2004;1033:291.
190. Pasch H, Pizzi A, Rode K. MALDI -TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *polymer* 2001;42:7531-7539.
191. Frison-Norrie S, Sporns P. Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in Almond Seedcoats Using MALDI-TOF MS. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:2782-2787.
192. Krueger CG, Dopke NC, Treichel PM, Folts J, Reed JD. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1663-7.
193. Ohnishi-Kameyama M, Yanagida A, Kanda T, Nagata T. Identification of Catechin Oligomers from Apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in Matrix-assisted Mass Spectrometry and Fast-atom Bombardment Mass Spectrometry. *rapid communication in mass spectrometry* 1997;11:31-36.
194. Yanagida A, Kanda T, Shoji T, Ohnishi-Kameyama M, Nagata T. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. 1999;855:181.
195. Perret C, *Analyse des tannins inhibiteurs de la stibène oxydase produite par Botrytis cinerea Pers.: Fr.* 2001, université de Neufchâtel.
196. Wang J, Sporns P. MALDI-TOF MS analysis of food flavonol glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1657-1662.
197. Keki S, Deak G, Zsuga M. Fragmentation study of rutin, a naturally occurring flavone glycoside cationized with different alkali metal ions, using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2001;36:1312-1316.
198. Huo R, Wehrens R, Duynhoven Jv, Buydens LMC. Assessment of techniques for DOSY NMR data processing. *Analytica Chimica Acta* 2003;490:231.
199. Bradley SA, Krishnamurthy K, Hu H. Simplifying DOSY spectra with selective TOCSY edited preparation. *Journal of Magnetic Resonance* 2005;172:110.
200. Kim Y-J, Chung JE, Kurisawa M, Uyama H, Kobayashi S. Regioselective synthesis and structures of (+)-catechin-aldehyde polycondensates. *Macromol. Chem. Phys.* 2003;204:1863-1868.
201. Schnell I. Merging concepts from liquid-state and solid-state NMR spectroscopy for the investigation of supra- and biomolecular systems. *Current Analytical Chemistry* 2005;1:3-27.
202. Chapdelaine G, Cleon P. NMR cryogenic probe: a new step to sensitivity. 2003;32:35-38.
203. Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 1985;107:3902.
204. Allen MP, Tildesley D, *Computer simulation of liquids*. Clarendon Press Oxford ed. 1987.
205. Sandoval C, Rezende MC, Gonzalez-Nilo F. Solute-solvent interactions of flavonoids in organic solvents. *J. Solution Chem.* 2003;32:781.

206. Checa A, Ortiz AR, De Pascual-Teresa B, Gago F. Assessment of solvation effects on calculated binding affinity differences: Trypsin inhibition by flavonoids as a model system for congeneric series. *Journal of Medicinal Chemistry* 1997;40:4136.
207. Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112:6127.
208. Hasel W, Hendrickson TF, Still WC. *Tet. Comput. Meth.* 1988;1:103-116.
209. Viswanadhan VN, Ghose AK, Revankar GN, Robins RK. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1989;29:163.
210. Gasteiger J, Marsili M. *Tetrahedron* 1980;36:3219-3288.
211. Zhang J, Brodbelt JS. Gas-Phase Hydrogen/Deuterium Exchange and Conformations of Deprotonated Flavonoids and Gas-Phase Acidities of Flavonoids. *J. Am. Chem. Soc.* 2004;126:5906-5919.
212. Vretik L, Ritter H. Synthesis and characterization of new polymethacrylate bearing cyclopropane ring as side group. *Polymer* 2006;47:1886.
213. Russo N, Toscano M, Uccella N. Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:3232-3237.
214. Nicotra S, Intra A, Ottolina G, Riva S, Danieli B. Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* 2004;15:2927.
215. Roubaty JL, Bréant M, Lavergne M, Revillon A. Mechanism of the oxidative coupling of phenols: influence of pH upon the electrochemical oxidation of xylenol in methanol. *Makromol. Chem.* 1978;179:1151-1157.
216. Katritzky AR, Oliferenko AA, Oliferenko PV, Petrukhin R, Tatham DB, Maran U, Lomaka A, Acree Jr WE. A General Treatment of Solubility. 1. The QSPR Correlation of Solvation Free Energies of Single Solutes in Series of Solvents. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2003;43:1794.

ANNEXES

Investigations supplémentaires menées en RMN

A la suite de la mise au point et de l'optimisation des procédés de synthèse et de détection par SEC-UV et MALDI-TOF, nous avons cherché à identifier le type et la localisation du pontage reliant les unités monomériques. Pour ce faire, l'analyse par RMN a été utilisée. Le faible nombre d'analyses RMN répertoriées dans la bibliographie sur l'étude de mélanges oligomériques et la complexité du milieu réactionnel ont nécessité l'utilisation d'un large panel de techniques RMN.

Initialement, une solution réactionnelle (méthanol/eau, 30/70, v:v, 20 °C, 24 h) a été lyophilisée afin d'être analysée par RMN à 300 MHz. Le spectre ¹H-RMN obtenu est composé de 3 larges pics à δ 0.8-1.3, 3.0-4.0, 4.4-5.0 ppm, tout comme observé par Kurisawa *et al.* [28]. Afin d'éliminer tout problème de solubilité de l'analyte, trois solvants de dissolution ont été testés : DMSO- *d*₆, D₂O, DMF- *d*₆ et la température a été ajustée à 323 K. Mais même dans ces conditions, les trois mêmes larges pics ont été observés. Afin de résoudre ce problème de résolution, différentes techniques RMN ont été employées.

- Dans un premier temps, un ensemble de filtrations tangentielles du milieu réactionnel a été réalisé, afin de limiter l'hétérogénéité du milieu. Par une seule filtration tangentielle sur une membrane de 3 KDa, le perméat obtenu est enrichi en molécules dimériques ce qui a permis l'identification d'un dimère de rutine de type C2'-C2' (la structure ainsi que les déplacements chimiques de cette structure seront détaillées dans le chapitre IV.1.). En revanche, la succession de filtrations tangentielles sur des membranes de porosité décroissantes (50, 8, 5, 3 KDa) n'a pas permis d'identifier précisément d'autres structures. Il apparaît néanmoins que l'accroissement de la taille des oligomères engendre une importante variation de l'environnement chimique des protons des molécules, ce qui provoque l'élargissement des signaux (Figure 1.). Cet élargissement à la base des signaux serait dû à une grande diversité dans le type et la localisation du pontage entre unités monomériques.

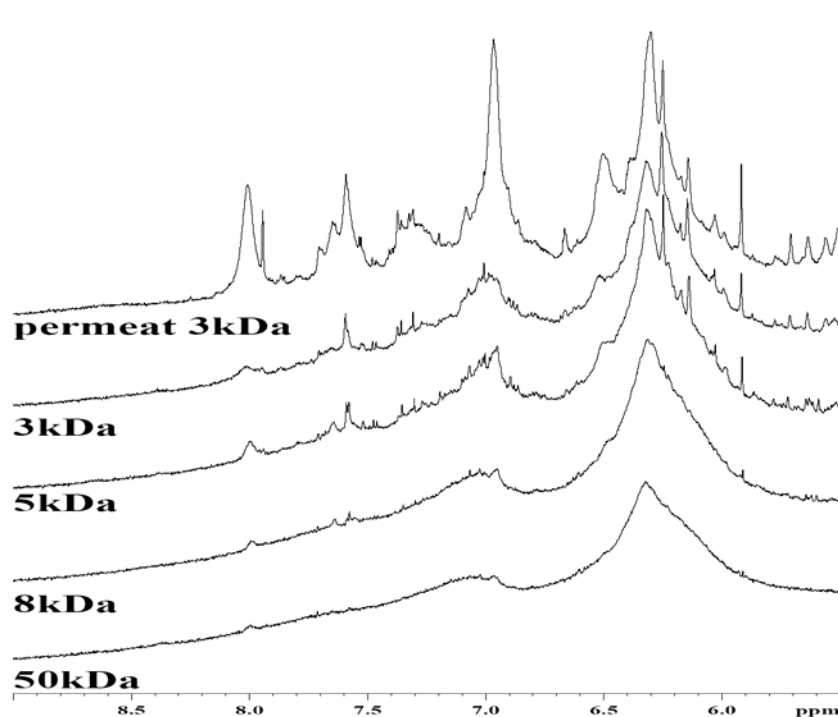


Figure 1. Spectres ^1H -RMN à 600 MHz avec cryosonde du milieu réactionnel filtré sur des membranes de porosité décroissante (50, 8, 5 et 3 kDa). Le milieu réactionnel est obtenu à partir de l'oligomérisation de la rutine (3 g/l), catalysée par la laccase de *Trametes versicolor* (3 U/ml), dans un milieu méthanol/eau (30/70, v:v, 20 °C, 24 h).

- Dans un second temps, une analyse RMN par diffusion (DOSY) a été entreprise, afin de séparer les spectres RMN des différents oligomères. Malheureusement, les oligomères ont des coefficients de diffusion trop proches pour que leurs spectres soient séparables par DOSY. En revanche, le coefficient de diffusion des particules étant relié à leur rayon hydrodynamique, nous avons pu situer le rayon hydrodynamique des oligomères de rutine aux alentours de 29.8 Å (correspondant à un coefficient de diffusion de $8.4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).
- Dans un troisième temps, une analyse par RMN du solide (HRMAS) a été envisagée. L'analyse par HRMAS du milieu réactionnel a permis de diminuer la largeur des signaux (Figure 2.). En plus des pics de la structure dimérique identifiée, un nouveau pic ainsi qu'un massif de pics sont observés à $\delta = 7.44$ et 7.25 ppm. Néanmoins, la résolution reste insuffisante pour permettre la détermination du type et de la localisation du pontage. La largeur de la base des pics suggère à nouveau une grande diversité d'environnements chimiques des protons des molécules, suggérant une grande diversité de mode de pontage.

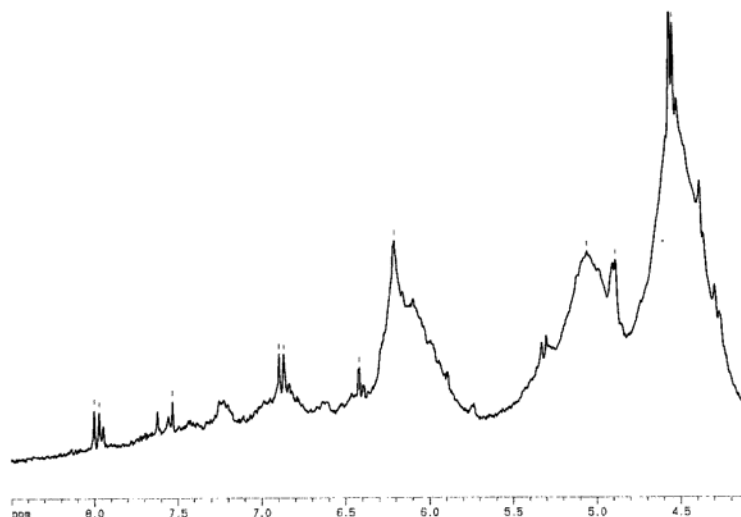


Figure 2. Spectres ^1H -RMN à 300 MHz avec sonde HRMAS du milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est obtenu à partir de l'oligomérisation de la rutine (3 g/l), catalysée par la laccase de *Trametes versicolor* (3 U/ml), dans un milieu méthanol/eau (30/70, v:v, 20 °C, 24 h).

- Dans un quatrième temps, afin d'observer l'apparition progressive des oligomères, un suivi de la cinétique d'oligomérisation de la rutine au sein de l'appareil de RMN a été entrepris. Pour garantir la totale solubilisation de la rutine ainsi que pour diminuer la vitesse de la réaction, les concentrations initiales ont été fixées à 0.2 g/l de rutine et à 0.3 U/ml de laccase de *Trametes versicolor*. Lors de ce suivi, seule la consommation de la rutine a pu être observée. Les signaux des protons aromatiques disparaissent progressivement (8H, 6H, 2'H, 6'H puis le 5'H) alors que les protons des sucres sont conservés (Figure 3.). Ces changements dans la zone aromatique peuvent être attribués à des phénomènes d'empilements provoqués par des interactions π - π inter- et/ou intra-moléculaires

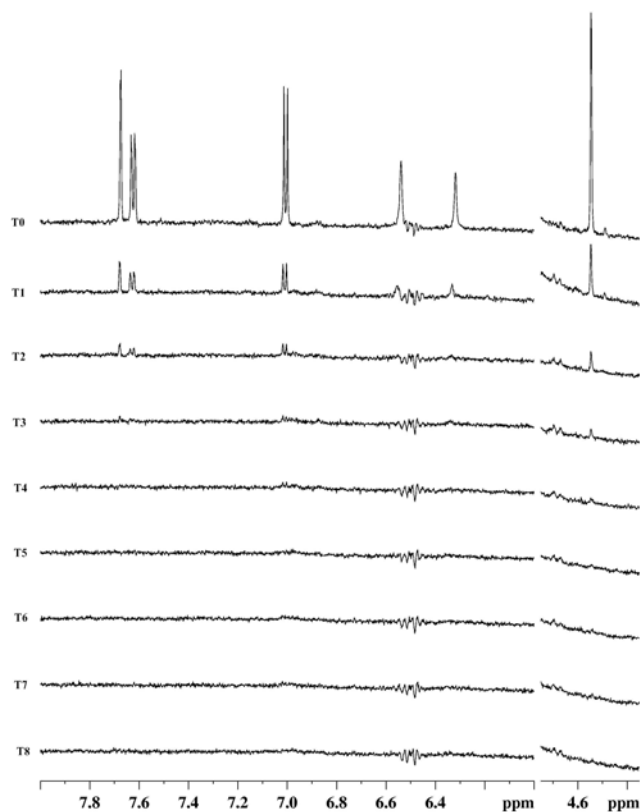


Figure 3. Suivi cinétique *in-situ* de l'oligomérisation de la rutine par ^1H -RMN (spectromètre 600 MHz avec cryosonde). L'oligomérisation de la rutine (0.2 g/l) a été catalysée par la laccase de *Trametes versicolor* (0.3 U/ml) dans un milieu $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (30:70, v/v), 293 K. Un spectre est obtenu toute les 10 min 33 sec durant 14 h, et un spectre est représenté toutes les 1 h 46 min.

- Pour finir, afin d'accroître la résolution et d'augmenter la concentration en oligomères, 4 aliquots ont été prélevés du milieu réactionnel à 30 minutes, 1 h, 2 h et 3 h. Après dénaturation thermique de l'enzyme et lyophilisation, ces 4 aliquots ont été analysés par ^1H -RMN à 600 MHz avec une cryosonde. Le spectre de l'aliquot prélevé à 30 minutes a mis en évidence 3 doublets aux alentours de 7.2 ppm (les spectres obtenus ainsi que la description des déplacements sont détaillés dans le chapitre IV.1.).

L'utilisation de ce large panel de techniques RMN a permis d'améliorer la résolution des spectres ^1H -RMN et ainsi d'aboutir, en partie, à la résolution structurale des oligomères de rutine. Les résultats pertinents de l'analyse RMN ont été détaillés dans la partie IV.1.

Tableau. Comparaison des propriétés électroniques, énergétiques et structurales de la rutine et de ses radicaux.

	Rutine	Radicaux phénoxy en position :				Radicaux carbonés en position:				
		O3'	O4'	O7	O5	C2'	C5'	C6'	C8	C6
ΔH (kcal/mol)	-630.08	-604.35	-609.11	-598.29	-594.51	-537.06	-578.41	-578.30	-570.83	-572.85
$E_{HOMO} \alpha$	-8.82	-9.132	-9.259	-9.022	-8.873	-8.687	-9.173	-9.032	-8.868	-8.888
$E_{LUMO} \alpha$	-0.88	-1.125	-0.680	-1.141	-0.883	-1.128	-0.576	-1.017	-0.956	-0.941
Eg α	7.94	8.007	8.579	7.881	7.990	7.559	8.597	8.015	7.912	7.947
$E_{HOMO} \beta$	-8.81	-9.337	-9.358	-9.006	-8.859	-8.541	-9.072	-9.151	-8.863	-8.879
$E_{LUMO} \beta$	-0.89	-1.266	-1.746	-2.119	-1.956	-2.347	-1.026	-0.532	-1.004	-1.046
Eg β	7.92	8.071	7.612	6.887	6.903	6.054	8.046	8.619	7.859	7.833
E_{HOMO} (eV)	-8.81	-9.234	-9.308	-9.014	-8.866	-8.614	-9.122	-9.091	-8.865	-8.883
E_{LUMO} (eV)	-0.88	-1.195	-1.213	-1.630	-1.419	-1.737	-0.801	-0.774	-0.980	-0.993
Eg (eV)	7.93	8.039	8.095	7.384	7.466	6.877	8.321	8.316	7.885	7.889
Angle (°)										
Θ	153.75	153.97	157.66	154.25	154.65	146.33	155.87	179.59	153.85	153.707
α	-75.49	-75.52	-75.94	-77.13	-77.77	-77.31	-76.77	-81.02	-76.17	-76.36
β	-62.62	-63.53	-63.49	-63.15	-62.92	-65.90	-62.71	-54.44	-63.28	-63.23
γ	-153.89	153.13	153.03	153.25	152.94	153.51	153.14	153.76	153.22	153.32
δ	-77.67	-77.98	-77.95	-77.94	-78.45	-78.23	-78.07	-78.01	-78.03	-78.03
χ (eV)	4.845	5.214	5.260	5.322	5.142	5.175	3.461	4.932	4.922	4.938
μ (D)	3.40	6.164	6.502	5.334	2.785	2.906	4.245	3.972	4.205	3.445
POL (au)	54.75	54.29	54.29	54.29	54.29	54.29	54.29	54.29	54.29	54.29
A (\AA^2)	634.82	638.77	637.31	632.77	637.95	650.75	654.77	643.75	654.79	655.35
VOL (\AA^3)	1458.47	1451.45	1449.59	1449.93	145.51	1459.60	1454.10	1453.83	1452.86	1453.54
log P	-1.61	-0.19	-0.19	-0.19	-0.19	-1.80	-1.80	-1.80	-1.80	-1.80
Q ₁	-0.126	-0.127	-0.137	-0.127	-0.126	-0.086	-0.125	-0.129	-0.100	-0.124
QO ₃ -gluc	-0.178	-0.181	-0.182	-0.177	-0.180	-0.181	-0.181	-0.176	-0.178	-0.178
QO ₄	-0.321	-0.311	-0.307	-0.288	-0.230	-0.327	-0.314	-0.313	-0.310	-0.312
QO ₇	-0.239	-0.237	-0.237	-0.228	-0.239	-0.241	-0.238	-0.239	-0.214	-0.223
QO ₅	-0.253	-0.251	-0.251	-0.247	-0.213	-0.255	-0.252	-0.252	-0.251	-0.227
QO _{3'}	-0.245	-0.227	-0.219	-0.244	-0.246	-0.149	-0.236	-0.239	-0.244	-0.245
QO _{4'}	-0.266	-0.199	-0.275	-0.264	-0.266	-0.205	-0.246	-0.257	-0.265	-0.265
QC ₂	0.122	0.082	0.074	0.140	0.108	0.149	0.095	0.095	0.127	0.129
QC ₃	-0.096	-0.06	-0.048	-0.109	-0.089	-0.119	-0.068	-0.044	-0.101	-0.100
Excès de charge C ₂ -C ₃	0.218	0.142	0.122	0.249	0.197	0.268	0.163	0.139	0.228	0.229
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)		25.73	20.97	31.79	35.57	93.02	51.67	51.78	59.25	57.23

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV), E_{LUMO} : énergie de l'orbitale la plus basse vacante (eV), Eg : différence d'énergie entre la LUMO et la HOMO, χ : électronégativité (eV), μ : moment dipolaire (D), A : aire (\AA^2), VOL : volume (\AA^3), POL : polarisabilité (\AA^3), Q : excès de charge, $\Delta\Delta H$ (BDE) : variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol)

Tableau. Comparaison des propriétés électroniques, énergétiques et structurales de l'esculine et de ses radicaux.

	Esculine	Radical phénoxy en position:	Radical carbone en position:			
		O7	C3	C4	C5	C8
ΔH (kcal/mol)	-350.175	-321.74	-295.49	-298.343	-295.84	-292.37
E_{HOMO} α	-9.142	-9.489	-9.80	-9.165	-9.213	-9.725
E_{LUMO} α	-0.910	-0.638	-0.647	-1.073	-1.119	-0.643
Eg α	8.2321	8.851	9.153	8.092	8.094	9.082
E_{HOMO} β	-9.131	-10.02	-9.172	-9.731	-9.749	-9.297
E_{LUMO} β	-0.922	-1.932	-0.828	-0.538	-0.492	-1.122
Eg β	8.209	8.088	8.344	9.193	9.257	8.175
E_{HOMO} (eV)	-9.136	-9.754	-9.486	-9.448	-9.481	-9.511
E_{LUMO} (eV)	-0.916	-1.285	-0.737	-0.805	-0.805	-0.882
Eg (eV)	8.220	8.469	8.749	8.649	8.676	8.629
Angle ($^{\circ}$)						
α	-94.58	-167.57	-94.51	-95.50	-95.72	-93.16
β	-96.32	-78.11	-96.25	-96.16	-100.59	-96.81
χ (eV)	5.026	5.519	5.111	5.126	5.143	5.196
μ (D)	7.821	7.367	7.657	6.867	6.943	8.849
POL (au)	30.39	29.94	29.93	29.93	29.93	29.93
A (\AA^2)	408.34	426.76	430.87	430.17	427.08	429.54
VOL (\AA^3)	866.17	865.07	859.70	860.55	863.89	861.34
log P	-0.21	1.21	-0.20	-0.33	-0.40	-0.40
Q ₁	-0.187	-0.186	-0.195	-0.192	-0.183	-0.161
QO ₆ -gluc	-0.198	-0.148	-0.199	-0.199	-0.180	-0.197
QO ₂	-0.287	-0.271	-0.249	-0.269	-0.277	-0.275
QO ₇	-0.236	-0.221	-0.234	-0.234	-0.230	-0.210
QC ₃	-0.244	-0.192	-0.126	-0.214	-0.218	-0.217
QC ₄	-0.013	-0.063	-0.052	0.0124	-0.023	-0.036
Excès de charge C ₄ -C ₃	0.231	0.129	0.074	0.2264	0.195	0.181
$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)		28.43	54.68	51.83	54.33	57.80

ΔH : enthalpie de formation (kcal/mol), E_{HOMO} : énergie de l'orbitale la plus haute occupée (eV), E_{LUMO} : énergie de l'orbitale la plus basse vacante (eV), Eg: différence d'énergie entre la LUMO et la HOMO, χ : électronégativité (eV), μ : moment dipolaire (D), A: aire (\AA^2), VOL: volume (\AA^3), POL: polarisabilité (\AA^3), Q: excès de charge, $\Delta\Delta H$ (BDE): variation d'enthalpie entre le radical et la molécule parent (kcal/mol)

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Selim KERMASHA, Professeur, Université McGill, Sainte Anne de Bellevue,
Québec, Canada**

Monsieur Sylvain LAMARE, Professeur, Université de La Rochelle, La Rochelle

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame Julie ANTHONI

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de
flavonoïdes"**

en vue de l'obtention du titre de :

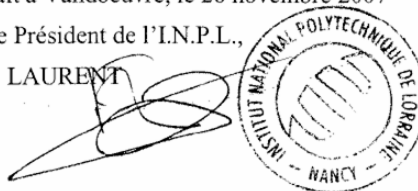
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 26 novembre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANCEUVRE CEDEX

Titre : Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes.

Résumé: Ce travail a pour objectif de mettre au point un procédé d'oligomérisation de rutine et d'esculine par la laccase de *Trametes versicolor*. Un procédé de synthèse en parallèle et d'analyse en ligne par SEC-UV et par MALDI-TOF a été mis au point. L'analyse par MALDI-TOF a révélé la formation d'un simple pontage, allant jusqu'au degré d'oligomérisation 6 pour la rutine et 9 pour l'esculine. Un pontage par liaison éther a été observé par FTIR dans le cas des oligorutines. L'analyse par RMN a démontré la mise en place de liaisons tant C-C que C-O localisées sur la partie phénolique et la partie sucre des monomères.

De faibles pH et températures favorisent l'allongement de la chaîne, alors que l'augmentation de la constante diélectrique du solvant ou de la température augmente la production des oligomères de rutine. La limitation de la masse de ces oligomères serait due à une inhibition de l'enzyme, provoquée par les capacités chélatantes des oligomères.

Une diminution du pouvoir antioxydant et une augmentation du pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase ont pu être observées lors de l'accroissement de la masse des oligomères de rutine. Ces deux activités sont améliorées lors de l'accroissement de la masse des oligomères d'esculine. Pour ces deux types d'oligomères, la solubilité dans l'eau est fortement accrue. Dans le cas des oligorutines, cette forte augmentation a été corrélée à la mise en place d'un réseau dense de liaisons hydrogène observé par modélisation moléculaire. Globalement, l'approche par modélisation moléculaire dans le vide et dans le solvant a permis de dégager des relations structure-activité, reliant notamment le nombre de liaisons hydrogène à la solubilité.

Mots clés: flavonoïde, coumarine, oligomérisation, laccase de *Trametes versicolor*, MALDI-TOF, RMN, pouvoir antioxydant, solubilité, modélisation moléculaire.

Abstract: The aim of this work is the elaboration of rutin and esculin oligomerization process by the laccase from *Trametes versicolor*. A parallel synthesis process and on-line analysis of reaction media by SEC-UV and MALDI-TOF have been elaborated. The MALDI-TOF analysis has revealed the formation of simple bridges between rutin and esculin units, up to degree of oligomerization of 6 and 9 respectively. An ether bond has been observed by FTIR spectrometry for the rutin oligomers. Finally, the NMR analysis has revealed the formation of C-C and C-O bridges both on phenolic and the sugar parts of the flavonoids.

At low pH and temperature, the elongation of the chain is favored, whereas increasing the dielectric constant of the solvent or the temperature favors the production of rutin oligomers. The limitation of oligomers mass is explained by the inhibition of the enzyme, probably due to the highest chelation properties of oligomers.

In the case of oligorutin, a decrease of antiradical activity and an increase of xanthine oxidase inhibitory activity have been observed when the oligomers molecular mass increases. In the case of esculin oligomers, these two activities increase with the increase of the oligomers mass. For these two types of oligomers, the water solubility is considerably increased. For the oligorutins, this augmentation has been correlated to a dense network of H-bonds, which has been demonstrated by molecular modeling. Globally, the molecular modeling approach in vacuum and in solvent has allowed to establish structure-activity relationship.

Key words: flavonoid, coumarin, oligomerization, laccase from *Trametes versicolor*, MALDI-TOF, NMR, antioxidant activity, solubility, molecular modeling