



HAL
open science

Nouveaux dérivés lipophiles ou amphiphiles de composés phénoliques bio-sourcés à propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et/ ou anti-prolifératives

Georges Eid

► To cite this version:

Georges Eid. Nouveaux dérivés lipophiles ou amphiphiles de composés phénoliques bio-sourcés à propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et/ ou anti-prolifératives. Génie chimique. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0166 . tel-04089222

HAL Id: tel-04089222

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04089222>

Submitted on 4 May 2023

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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>



THÈSE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Génie des procédés, des produits et des molécules

Par **Georges EID**

Nouveaux dérivés lipophiles ou amphiphiles de composés phénoliques bio-sourcés à propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et/ou anti-prolifératives

Soutenance publique prévue le 21/09/2022

Membres du jury

Rapporteur	M. Jean-Hugues RENAULT	Professeur <i>Université de Reims Champagne- Ardennes</i>
Rapporteur	M. Grégory DURAND	Maitre de conférences, HDR <i>Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse</i>
Président du jury	M. Alain DURAND	Professeur <i>Université de Lorraine</i>
Examinatrice	Mme. Aude CORDIN FALCIMAIGNE	Maitre de conférences <i>Université de Technologie de Compiègne</i>
Directrice de thèse	Mme. Christine GERARDIN CHARBONNIER	Professeur <i>Université de Lorraine</i>
Co-directrice de thèse	Mme Catherine VIROT HUMEAU	Professeur <i>Université de Lorraine</i>
Invitée	Mme. Isabelle CHEVALOT	Professeur <i>Université de Lorraine</i>
Invitée	Mme. Latifa CHEBIL	Maitre de conférences, HDR <i>Université de Lorraine</i>

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été menés au Laboratoire d'Études et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMaB) et au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Je tiens donc à remercier **M. Philippe Gérardin**, directeur du LERMaB, et **M. Laurent Falk**, directeur du LRGP, de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je tiens à remercier les membres du jury que sont messieurs **Jean-Hugues Renault** et **Grégory Durand** pour l'évaluation du manuscrit, ainsi que **M. Alain Durand** et **Mme. Aude Cordin** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement mes directrices de thèse **Mme. Christine Gérardin** et **Mme. Catherine Virot-Humeau** et je leur exprime mon immense reconnaissance de m'avoir accueillie dans leur équipe avec gentillesse et bienveillance ainsi que la confiance qu'elles m'ont témoigné. Tout d'abord je vous remercie Christine pour le temps que vous m'avez consacré malgré vos emplois de temps chargés, vous étiez toujours à l'écoute et toujours prête à répondre à toutes mes questions, même les plus banales. Je vous remercie également de m'avoir aidé avec les analyses des spectres RMN et merci pour toutes les discussions scientifiques. Catherine, je vous remercie d'être toujours présente, même à distance, pour suivre mon travail et répondre à mes questions qui des fois ont réussi à vous énerver. Merci pour toutes nos discussions qui ont fortement contribué à mon épanouissement scientifique. Je repars riche des enseignements de vous deux et je suis très heureux de vous avoir rencontré et travaillé avec vous.

J'adresse mes remerciements à **Mme. Latifa Chebil** qui m'a énormément aidé dans la modélisation moléculaire. Je vous remercie pour nos conversations scientifiques et non scientifiques. J'aimerais également remercier **Mme. Isabelle Chevalot** qui s'est investie et qui m'a apporté une aide inestimable pour la réalisation des antiprolifératifs. Je tiens à remercier aussi **Mr. Stéphane Dumarçay** qui m'a consacré une petite partie de son temps pour passer mes échantillons en HPLC et je remercie **Mr. Firmin Obounou Akong** qui m'a aidé avec mes premières manips.

Je remercie **M. Cédric Paris** qui a passé et analysé une grande partie de mes échantillons en LC /MS et je remercie **Mme. Blandine Simard** qui m'a accompagné durant mes purifications sur la colonne semi-prep.

Durant ma thèse j'ai eu la chance de rencontrer des gens formidables avec qui j'ai partagé mon quotidien et qui sont devenus des amis. Merci à **Pauline Gérardin** avec qui on s'est partagé le bureau. Merci d'avoir supporté mon comportement de star pendant 2 ans, et de m'avoir aidé dans la mise en page de mon manuscrit. Je remercie **Mirabelle Zang Ondo** avec qui j'ai passé deux ans au labo, et qui était toujours présente pour me soulever le moral. Je remercie **Céleste Ruiz** et **João Vitor** pour les bons moments qu'on a passé ensemble, los amo mucho muchachos ! Un merci à **Celia Jager** qui travaillait sur la paillasse à côté de la mienne et avec qui je suis devenu ami.

Plus personnellement, je dédie ce travail à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenus et m'ont apporté beaucoup d'affection.

Tout d'abord je remercie mon amie **Catherine Al-Hachem** qui était avec moi durant tout ce parcours. Catherine tu savais toujours comment me remonter le moral et me focaliser sur les choses positives. Malgré la distance vers la fin, t'étais toujours présente avec moi.

Je remercie mes deux amis **Jacinthe Mekary** et **Christophe El Hage** qui malgré la distance également étaient toujours en train de me soutenir et de me divertir. Je remercie également **Alexy Bahnan** et **Maya Kallas** avec qui j'ai partagé une grande partie de mon quotidien.

Merci à mon ami **Victor Zibara** qui n'a pas cessé de m'encouragé et m'a énormément aide dans l'étude bibliographique.

Un grand merci à mon ami **Joe Chatrini** qui m'a tenu compagnie au téléphone pendant des heures toutes les nuits durant ma phase de rédaction. Gracias papi !

Enfin je tiens à remercier mes parents et mon frère **Joe**, qui m'ont énormément soutenus et étaient très patient avec moi malgré mes sautes d'humeur. Merci pour l'amour que vous m'avez apporté chaque jour. Vous étiez toujours avec moi et je suis la grâce à vous. Cette thèse est pour vous et j'espère que vous êtes fiers de moi.

Now that I have finished my PhD, I took Donatella's call and I'm on my way to Phresh Out The Runway!

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION GENERALE	10
Chapitre 1: État de l'art	16
1. Le bois.....	17
1.1 La cellulose.....	18
1.2. L'hémicellulose	19
1.3. La lignine.....	19
1.4. Les extractibles	20
1.4.1. Les composés terpéniques.....	20
1.5. Extractibles phénoliques.....	22
1.5.1. Les phénols simples, aldéhydes phénoliques et acides phénoliques.....	22
1.5.2. Les tannins.....	23
1.5.3. Les stilbenes	24
1.5.4. Les lignanes.....	25
1.5.5. Les flavonoïdes	25
2. Activités et domaine d'applications des différentes classes de flavonoïdes.....	28
2.1. Les flavanols.....	28
2.2. Les flavanones	29
2.3. Les flavonols.....	30
2.4. Les flavones	31
2.5. Les isoflavones	32
2.6. Les anthocyanidines	32
3. Fonctionnalisation des flavonoïdes.....	33
3.1. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie chimique.....	34
3.2. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie enzymatique	42
3.3. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie chimio-enzymatique.....	49
4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes	50
4.1.1. Piégeage direct des radicaux libres	50
4.1.2. Chelation des ions métalliques.....	51
4.1.3. Inhibition d'enzymes.....	51

4.2. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes	51
5. La modélisation moléculaire appliquée à la fonctionnalisation et aux relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes	52
6. Propriétés d'auto-assemblage	54
6.1. Les tensioactifs	54
6.2. La classification des tensioactifs	56
6.2.1. Classification basée sur la nature de la tête hydrophile	56
6.2.2. Classification basée sur la nature de la chaîne hydrophobe	57
6.3. Propriétés et applications des tensioactifs	59
6.3.1. Le pouvoir solubilisant.....	59
6.3.2. Le pouvoir moussant	59
6.3.3. Le pouvoir antimousse	59
6.3.4. Le pouvoir émulsionnant.....	60
6.3.5. Le pouvoir mouillant.....	60
6.3.6. Le pouvoir dispersant	60
6.3.7. Le pouvoir détergent	60
7. Références.....	61
Chapitre 2: Synthèse de dérivés de flavonoïdes par fonctionnalisation chimique et enzymatique	85
Partie 1: Fonctionnalisation par hemi-synthèse chimique.....	90
1. Rappel des structures des molécules cibles.....	92
2. Synthèse de composés bi-modulaires (composés du type I et II)	92
2.1. Synthèse de composés bi-modulaires (composés du type I)	93
2.1.1. Stratégie de synthèse.....	93
2.1.2. Synthèse	93
2.2. Synthèse des composés bi-modulaires (composés du type II)	100
2.2.1. Stratégie de synthèse.....	100
2.2.2. Synthèse	100
2.2.2.1. Benzylation.....	101
2.2.2.2. Estérification	103
2.2.2.3. Hydrogénation.....	104
3. Synthèse des composés tri-modulaires (composés du type III)	105
3.1. Stratégie de synthèse	107

3.2. Synthèse.....	108
3.2.1. Synthèse de N-acylaminoacide	109
3.2.1.1. Couplage acide gras – acide aminé	110
3.2.1.1.1. A base d’alanine et d’acide glutamique.....	110
3.2.1.1.2. A base de lysine	111
3.2.1.2. Saponification.....	112
3.2.2. Synthèse du composé tri-modulaire : greffage des N-acylaminoacides avec la catéchine	115
3.2.2.1. A base d’alanine	115
3.2.2.2. A base d’acide glutamique et de lysine	116
3.2.3. Deprotection des groupements benzyliques.....	119
4. Conclusion.....	121
Partie 2:Fonctionnalisation par biocatalyse enzymatique	125
1. Acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones	125
1.1. Conditions de départ issues de la littérature	125
1.2. Effet du solvant sur la réaction d’acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones ..	126
1.3. Effet du ratio molaire flavonoïde : donneur d’acyle sur la réaction d’acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones	127
1.4. Effet de l’origine de l’enzyme sur la réaction d’acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones	128
1.5. Effet de la nature du donneur d’acyle sur la réaction d’acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones.....	129
1.6. Conclusions	132
2. Acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés	134
2.1. Rappel des structures de la rutine et de la naringine et choix des conditions de départ	135
2.1.1. Structures de la naringine et de la rutine.....	135
2.2. Choix des conditions de départ des réactions d’acylation	135
2.2.1. Conclusion	137
2.3. Influence du rapport molaire flavonoïde : donneur d’acyle	137
2.3.1. Synthèse d’esters de flavonoïdes avec un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 5	137
2.3.2. Synthèse d’ester de flavonoïdes en mode fed-batch	140
2.3.3. Conclusions.....	142

2.4. Etude de l'effet de l'activité de l'eau du milieu réactionnel sur les performances des réactions d'acylation.....	143
2.4.1. Effet de l'élimination en continu de l'eau sur l'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés	144
2.4.2. Conclusion	145
2.5. Acylation de la rutine et naringine par des acides gras de différentes longueurs de chaîne.....	146
2.5.1. Effet de la longueur de chaîne du donneur d'acyle sur les performances de la réaction d'acylation de la rutine et de la naringine	146
2.5.2. Conclusions.....	151
2.6. Synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes en milieu fondu	152
2.6.1. Synthèse de laurate de rutine et de naringine en milieu fondu	152
2.6.2. Conclusions.....	157
2.7. Synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes et de diacides.....	157
2.7.1. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la nature et la distribution des produits d'acylation de la rutine et de la naringine.....	158
2.7.2. Conclusions.....	171
2.8. Régiosélectivité des réactions d'acylation.....	172
2.8.1. Conclusions.....	179
2.9. Conclusions	180
3. Références	181
Chapitre 3 : Propriétés physico-chimiques et biologiques	125
1. Etude des propriétés antioxydantes des flavonoïdes et leurs dérivés.....	201
1.1. Etude du potentiel anti-radicalaire des flavonoïdes et leurs dérivés	201
1.1.1. Activité anti-radicalaire des composés bi-modulaires	201
1.1.2. Activité anti-radicalaire des composés tri-modulaires	204
1.2. Etude de la capacité des flavonoïdes et leurs dérivés à inhiber l'oxydation lipidique 207	
1.2.1. Capacité des composés bi-modulaires à inhiber l'oxydation lipidique.....	207
1.2.2. Capacité des composés tri-modulaires à inhiber l'oxydation lipidique	209
1.3. Conclusions	212
1.4. Modélisation moléculaire	213
1.4.1. Calcul de l'énergie de dissociation homolytique	213
1.4.2. Calcul des descripteurs de réactivité chimique	215

1.5. Conclusions	222
2. Etude des propriétés physico-chimiques des composés synthétisés	224
2.1. Détermination de l'hydrophobie et de la solubilité maximale dans l'eau des composés synthétisés	224
2.1.1. Détermination de la solubilité maximale dans l'eau des composés tri-modulaire (dérivés d'acides aminés et de sucre).....	224
2.2. Etude des coefficients de partition des composés tri-modulaires à base d'alanine .	228
2.2.1. Principe.....	228
2.2.2. Détermination du coefficient de partition par HPLC	229
2.3. Propriétés tensioactives	231
2.3.1. Principe de la mesure de tension superficielle par la technique de Wilhelmy .	231
2.3.2. Mesure des tensions superficielles des composés synthétisés	234
2.3.2.1. Mesure des tensions superficielles des composés tri-modulaires à base d'acide aminé (composé de type III).....	235
2.3.2.1.1. Composés à base d'alanine	235
2.3.2.1.2. Composés à base de lysine	237
2.3.2.1.3. Composés à base d'acide glutamique	241
3.1.1.1. Mesure des tensions superficielles des composés tri-modulaires à base de sucre (composé de type IV).....	245
3.1.2. Conclusions	247
4. Propriétés antiprolifératives	249
5. Références.....	254
Conclusion générale et perspectives	266
Chapitre 4 : Matériels et méthodes.....	273
1. Généralités	274
2. Synthèse	275
2.1. Synthèse des composés bi-modulaires de type I	275
2.2. Synthèse des composés bi-modulaires de type II	279
2.3. Synthèse des composés bi-modulaires de type III.....	288
2.4. Synthèse des composés bi-modulaires de type IV et V.....	319
3. Propriétés physico-chimiques et biologiques.....	329
3.1. Détermination des coefficients de partage ($\log k'_w$) par HPLC.....	329
3.2. Détermination de la solubilité maximale dans l'eau	329

3.3. Détermination de la tension superficielle	330
3.4. Evaluation de la disparition du radical DPPH	330
3.5. Inhibition de l'oxydation induite du linoléate de méthyle.....	330
3.6. Propriétés antiprolifératives.....	331
Résumé.....	342
Abstract	343

Liste des abréviations

ABTS	acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline) -6- sulfonique
ACAT	cholestérol acyltransférase
ADH	alcool déshydrogénase humaine
ADN	acide désoxyribonucléique
ALDH-2	aldéhyde déshydrogénase mitochondriale humaine
BDE	bond dissociation energy
Boc	benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CMC	concentration micellaire critique
DFT	density-functional theory
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N, N-diméthylformamide
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
EGCG	epigallocatechine gallate
Et ₃ N	triéthyle amine
EtOH	éthanol
HCl	acide chlorhydrique
HLB	balance hydrophile lipophile
HMG-CoA	réductase hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
HMPT	hexaméthylphosphoramide
HOBT	hydroxybenzotriazole
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	concentration inhibitrice médiane
LC/MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LDL	lipoprotéines de basse densité
logP	coefficient de partage octanol/eau
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MCP-1	protéine chimiotactique des monocytes chimiokines 1
M2B2	2-méthyl-2-butanol
MeOH	méthanol
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
NFKB	nuclear factor-kappa B
NOS	oxyde nitrique synthétase
PCL	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PI	potentiel d'ionisation
ppm	partie par million
RMN	résonance magnétique nucléaire
rpm	rotation par minute
ROS	reactive oxygen species
THF	tétrahydrofurane
TNF- α	tumor necrosis factor α
UV	ultraviolet

Introduction générale

La diminution des ressources pétrochimiques facilement accessibles, suscite, depuis ces vingt dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation de matières premières d'origine renouvelable afin d'équilibrer la chaîne d'approvisionnement et d'améliorer la qualité de la vie. L'utilisation des ressources naturelles renouvelables date de l'antiquité puisque l'homme a toujours su exploiter les ressources de carbone dont il disposait afin de répondre à ses besoins vitaux. Cette utilisation fut caractérisée par l'emploi de la biomasse sans réelle modification, puis s'en sont suivi des procédés de transformation adossés au développement de la pétrochimie qui a connu un développement considérable depuis la seconde guerre mondiale lors de la seconde révolution industrielle. La pétrochimie est très dépendante des ressources fossiles, telles que le pétrole et le gaz naturel, et leur exploitation contribue aux émissions de gaz à effet de serre. Le développement de la chimie biosourcée pour remplacer les composés d'origine fossile par des molécules d'origine renouvelable s'est considérablement accéléré depuis ces cinq dernières années.

La chimie bio-sourcée s'est tout d'abord fortement développée autour des agro-ressources annuelles ; elle se tourne également de plus en plus vers l'utilisation de la biomasse ligno-cellulosique issue du bois car celle-ci constitue une source de carbone renouvelable particulièrement abondante sur terre et dont l'utilisation n'entre pas en compétition avec les ressources alimentaires. L'industrie de première transformation du bois génère chaque année des volumes importants de déchets qui sont à l'heure actuelle, soit recyclés vers d'autres filières comme la papeterie ou l'industrie des panneaux, soit utilisés comme source d'énergie, et donc vers des marchés de faible valeur ajoutée. Le projet se situe dans ce contexte d'économie circulaire et de développement durable et de valorisation des co-produits de l'industrie du bois par l'exploitation des métabolites secondaires présents dans le bois, comme les composés phénoliques, et plus précisément les flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus dans tout le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes ; ils sont également des composants incontournables de l'alimentation. Leurs propriétés biologiques *in vitro* se révèlent nombreuses. Les flavonoïdes ont un rôle à jouer en tant qu'additifs alimentaires ou cosmétiques. Ils peuvent être des agents conservateurs grâce à leurs activités anti-oxydantes et antibactériennes, des agents de saveur ou encore des colorants. L'importance des flavonoïdes va plus loin que leur présence dans l'alimentation. Certains flavonoïdes ont un potentiel en tant que matériel de départ pour le développement de nouveaux principes actifs. D'ailleurs, quelques médicaments et préparations cosmétiques

contenant un mélange de flavonoïdes ou de leurs dérivés sont actuellement commercialisés. Malgré leur fort potentiel applicatif, les flavonoïdes ont des limitations importantes en raison de leur faible biodisponibilité, qui pourrait être liée à leur faible stabilité dans des solutions neutres ou légèrement alcalines et à leur incapacité à traverser les membranes cellulaires, ce qui est un frein à leur utilisation. Les chercheurs ont été amenés à modifier ces molécules afin de pallier leur principal défaut, à savoir leur manque de solubilité dans les phases aqueuses ou lipophiles.

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour faciliter leur utilisation. Ces techniques reposent entre autres sur la fonctionnalisation des molécules. L'acylation des flavonoïdes est une voie intéressante et prometteuse pour remédier à leurs inconvénients. Elle permet le greffage d'une chaîne grasse qui devrait améliorer la solubilisation des flavonoïdes dans des milieux lipidiques. L'acylation par des acides aromatiques peut aussi conduire à une modification de leur solubilité et à l'amélioration de leur stabilité. Par ailleurs, cette fonctionnalisation peut conférer aussi de nouvelles propriétés biologiques et physico-chimiques à ces composés.

Ce travail s'inscrit dans les projets de deux laboratoires, le Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMaB) qui s'intéresse au matériau bois comme source de molécules et le Laboratoire Réactions et Génies des Procédés (LRGP) qui s'intéresse à la mise au point de nouveaux procédés, notamment par biocatalyse.

L'objectif de ce travail est de fonctionnaliser des composés accessibles et abondants dans les ressources végétales et forestières afin d'obtenir des composés polyfonctionnels associant les propriétés originelles et d'autres propriétés apportées *via* la fonctionnalisation et pouvoir ainsi par exemple, améliorer la biodisponibilité par la modulation de leur balance hydrophile / hydrophobe (HLB), ou exacerber les propriétés initiales ou encore simplifier les formulations cosmétiques en leur apportant des propriétés d'auto-assemblage par le biais de l'utilisation de composés 2 en 1.

Pour atteindre ces objectifs nous avons réalisé cette étude sur la base de flavonoïdes modèles tels que la catéchine, la rutine et la naringine, d'une part en raison de leur accessibilité et d'autre part en raison de leur structure aromatique permettant de penser que ces molécules ont une forte propension à l'auto-assemblage. Par la suite nous avons envisagé la fonctionnalisation par deux voies : l'hémisynthèse chimique et la catalyse enzymatique. Le choix des flavonoïdes modèles a été réfléchi en fonction du type de modification envisagée.

La voie chimique a été réalisée sur des flavonoïdes aglycones pour minimiser les étapes de protection / deprotection alors que la voie enzymatique a été utilisée pour modifier les flavonoïdes glycosylés en raison de la sélectivité des enzymes pour les glucides. L'objectif est d'obtenir deux types de composés, des composés bi- et tri-modulaires.

Par hémisynthèse chimique nous avons ainsi pu accéder à des composés bi-modulaires, par estérification classique entre un acide gras et les groupements hydroxyles de la catéchine. Nous avons synthétisé deux séries de composés :

- Les composés bi-modulaires de type I où des acides gras de différentes longueurs de chaînes sont greffées sur les OH phénoliques
- Les composés bi-modulaires de type II où des acides gras de différentes longueurs de chaînes sont greffés sur le OH aliphatique

Nous avons étudié également la réactivité des groupements hydroxyles des composés bi-modulaires de type I par modélisation moléculaire.

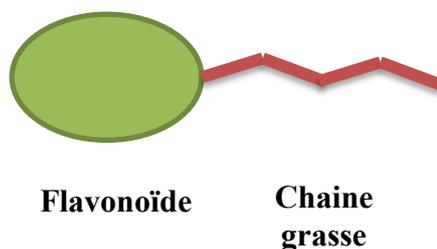


Figure 1. Représentation schématique de la structure des composés bi-modulaires (type I et II)

Nous avons également préparé des composés tri-modulaires, composés de type III, par hémisynthèse chimique en associant un module polaire correspondant à la catéchine, un module de jonction correspondant à l'acide aminé, l'alanine, la lysine ou l'acide glutamique, et un module hydrophobe apporté par un acide gras. Trois structures tri-modulaires de type III ont ainsi été synthétisées, afin d'obtenir différents types de composés amphiphiles, tels que des composés amphiphiles conventionnels, ou geminis, ou bicaténaires. Les aminoacides utilisés ont été choisis, soit en tant que modèles, soit en raison de leur accessibilité comme la lysine, sous-produit de l'industrie sucrière ou encore l'acide glutamique, présent dans de nombreuses protéines végétales et animales.

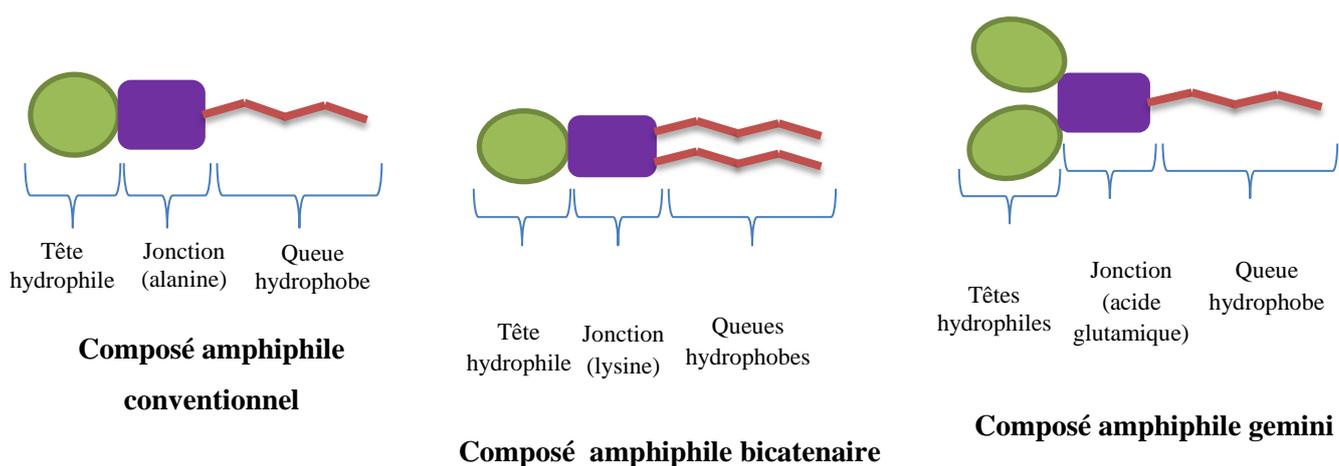


Figure 2. Représentation schématique des structures des composés tri-modulaires de type III

Par hémisynthèse enzymatique, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la synthèse de composés bi-modulaires à partir de flavonoïdes aglycones comme la catéchine, la quercétine et la naringénine. Les composés visés sont obtenus par greffage d'un acide gras ; la réaction est catalysée par lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) immobilisée sur support, qui est une enzyme disponible commercialement, et qui est connue pour sa stabilité, sa facilité de récupération et son recyclage. Des études portant sur la faisabilité de ces réactions d'acylation de flavonoïdes aglycones ont été menés en modifiant un certain nombre de facteurs, tel que le solvant, le ratio molaire flavonoïde / donneur d'acyle, la nature de l'enzyme et la nature du donneur d'acyle.

En deuxième lieu nous avons synthétisé des composés tri-modulaires, composés de type IV, à partir des flavonoïdes glycosylés, rutine et naringine. De même que précédemment, les réactions mises en œuvre visent le greffage d'acides gras de différentes longueurs de chaîne mais cette fois ci sur la partie glycosidique des flavonoïdes. Nous avons également entrepris des études cinétiques pour quantifier les effets de plusieurs paramètres importants comme la nature de la réaction, le ratio molaire flavonoïde / donneur d'acyle et l'activité de l'eau.

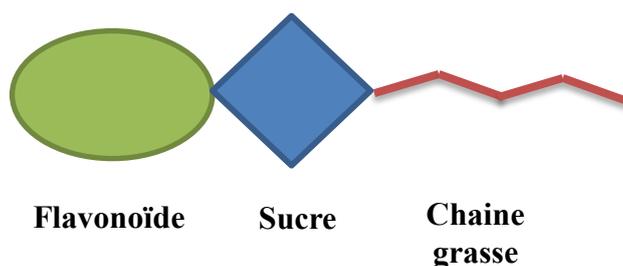


Figure 3. Représentation schématique des structure des composés tri-modulaires de type IV

Finally, we have synthesized pentamodular compounds, of type V, from the grafting of a dicarboxylic acid on naringin or rutin. These compounds consist of two flavonoid entities grafted on either side of the carbon chain of the diacid.

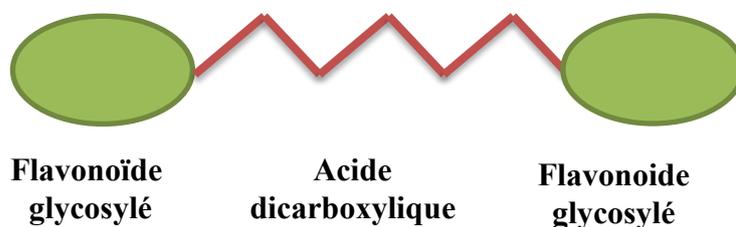


Figure 4. Représentation schématique des structure des composés penta-modulaires de type V

As a result of the syntheses, whether chemical or enzymatic, the physico-chemical properties of the different compounds have been studied, notably the solubility in water, the antioxidant and tensioactive properties. Certain biological activities have also been studied such as the antioxidant activity or the antiproliferative activity vis-à-vis of *CaCo2* cells. In order to understand the effect of the structure of the compounds on their antioxidant capacity, molecular modeling work has been carried out; correlations between the antioxidant activity of the compounds determined experimentally and chemical reactivity descriptors calculated *in silico* have been researched.

It is important in this work to be able to answer the following scientific questions :

What is the difference between the chemical synthesis route and the enzymatic synthesis route and which is the most performing? To obtain a product with several properties, which synthesis route should be chosen?

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres :

Le premier chapitre présente un état de l'art sur la ressource bois, mais également une étude bibliographique sur les polyphénols, la modification structurale des flavonoïdes par voie chimique, enzymatique et chimio-enzymatique. Les propriétés et activités des flavonoïdes et leurs dérivés sont donnés, ainsi que des exemples d'application de ces composés. Le but de ce travail étant de déterminer les voies de production de nouveaux tensioactifs, une partie de ce chapitre est consacrée aux propriétés d'auto-assemblage des molécules.

Le deuxième chapitre porte sur les travaux expérimentaux menés pour l'obtention de dérivés de flavonoïdes par fonctionnalisation soit par voie chimique, soit par catalyse enzymatique.

Le chapitre suivant rassemble la caractérisation des propriétés physico-chimiques et des activités biologiques des esters de flavonoïdes et des molécules natives. Une comparaison permet de mettre en évidence l'effet de l'acylation sur les activités existantes et/ou l'apparition de nouvelles activités. Ce chapitre présente également l'étude de l'effet de l'acylation sur les activités en les reliant à des paramètres moléculaires.

Le dernier chapitre décrit les matériels et les méthodes mises en œuvre pour mener les différentes investigations abordées dans cette thèse.

Chapitre 1: État de l'art

1. Le bois

Le bois est un matériau renouvelable, tout à fait adapté aux enjeux actuels dans le domaine de la construction « durable ». L'utilisation de ce matériau contribue au stockage du CO₂ puisqu'il agit comme un puit de carbone durant toute sa durée de vie. La qualité du bois est liée à sa structure macroscopique et microscopique mais aussi à la structure submicroscopique des parois cellulaires, qui est déterminée par ses constituants chimiques. Le bois est principalement composé de quatre parties principales : l'écorce, l'aubier, le duramen et la moelle respectivement de l'extérieur vers l'intérieur. Les différentes parties peuvent généralement être distinguées par la couleur, mais certaines espèces, en particulier les bois tropicaux, ne présentent pas de différence de couleur entre l'aubier et le bois de cœur, ce qui les rend indiscernables [1].

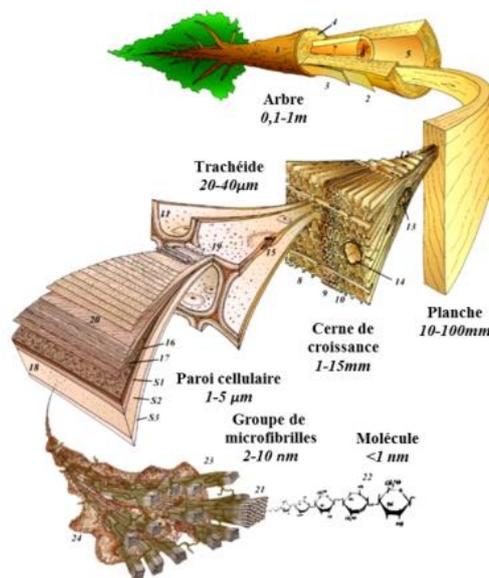


Figure 5. Schéma multi-échelles du bois (Harrington *et al.* 2002)

A l'intérieur d'un même genre, la variabilité observée entre les espèces est généralement confirmée par la variabilité au niveau moléculaire, c'est-à-dire par la composition chimique. Cette composition chimique du bois varie selon les espèces, les différentes parties de l'arbre, la situation géographique, le climat et les conditions du sol. Les constituants majeurs du bois sont le carbone (de 45 à 50% en masse), suivi par l'oxygène (40-50%), l'hydrogène (6%) et l'azote (moins de 1%) [2]. Les constituants chimiques des essences de bois sec sont des substances dites structurelles et des substances non structurelles. Les substances structurelles

à masse moléculaire élevée sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, et les substances à faible masse moléculaire constituent les extractibles.

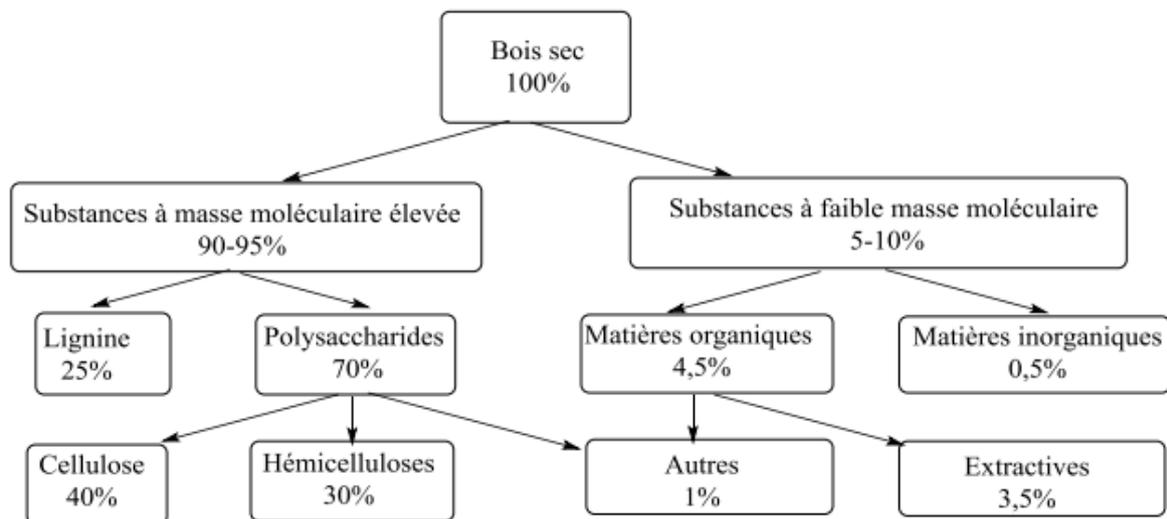


Figure 6. Classification générale et contenu des composants chimiques du bois

Il est intéressant de valoriser les coproduits de l'industrie du bois non pas par l'utilisation des polymères de la biomasse mais par l'exploitation des métabolites secondaires présents dans le bois. En effet, ces molécules de structure souvent complexe, difficilement synthétisables par des voies de synthèse organique classique, ne sont pas valorisées. Il s'agit donc de les extraire avant de transformer la biomasse ligno-cellulosique en chaleur ou en panneaux. Ces extractibles représentent souvent des quantités restreintes mais peuvent conduire, de par leur valeur ajoutée, à des marges de profit potentielles importantes. Tous les coproduits du bois ne contiennent pas forcément des biomolécules susceptibles d'être valorisables, la présence de ces dernières étant liée à la nature du « déchet » envisagé et à la nature de l'essence utilisée. C'est le cas notamment des nœuds qui sont rapportés pour contenir des quantités importantes de substances extractibles. L'intérêt principal de ces composés réside dans le fait qu'ils présentent de nombreuses propriétés biologiques pouvant conduire à différentes applications pharmaceutiques.

1.1 La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant et le plus important au monde. C'est un homopolysaccharide linéaire polydispersé constitué de fragments β -D-glucopyranose liés entre eux par des liaisons (1 \rightarrow 4)-glycosidiques. La structure fibreuse serrée créée par les liaisons hydrogène donne les propriétés matérielles typiques de la cellulose, telles que la

résistance à la traction élevée et l'insolubilité dans la plupart des solvants [3]. La cellulose est présente en pourcentage élevé d'environ 40 à 45 % du poids d'un morceau de bois [4], les résineux ayant un pourcentage plus élevé que les feuillus. C'est le composé qui donne de la résistance au bois car il est particulièrement fort en tension.

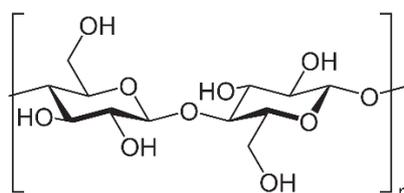


Figure 7. Structure de la cellulose

1.2. L'hémicellulose

Les hémicelluloses sont d'autres polymères naturels majeurs à base de glucides, qui sont des hétéropolysaccharides et sont clairement moins bien définis que la cellulose. Les unités de construction des hémicelluloses sont les hexoses, les pentoses ou les désoxyhexoses. Ces unités existent principalement sous forme de structures à six chaînons (pyranose) sous les formes α ou β . Les hémicelluloses varient entre les feuillus et les résineux selon le type et le contenu. Il est généralement composé d'environ 18 à 35 % de bois et est moins résistant que la cellulose et a une plus grande capacité d'absorption d'eau car il est hygroscopique [5].

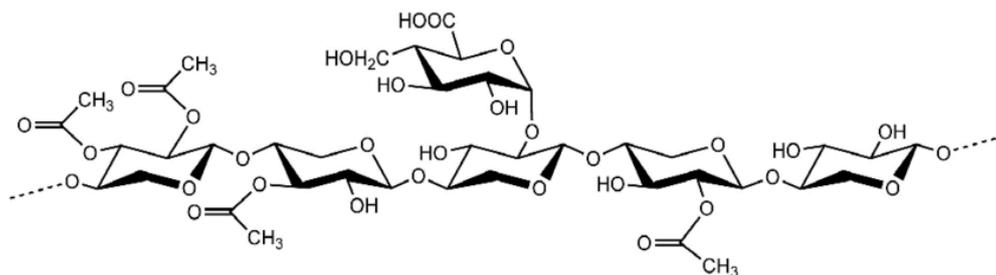


Figure 8. Structure de l'hémicellulose

1.3. La lignine

La lignine est un polymère amorphe composé de molécules phénoliques qui représente environ 20 à 35 % de la masse du bois. La lignine et l'hémicellulose sont toutes deux connues pour rigidifier les fibres de bois individuelles en agissant comme des adhésifs qui maintiennent les fibres ensemble. La lignine contient environ 40 % de l'énergie possible de la biomasse en raison de sa forte teneur en carbone [6].

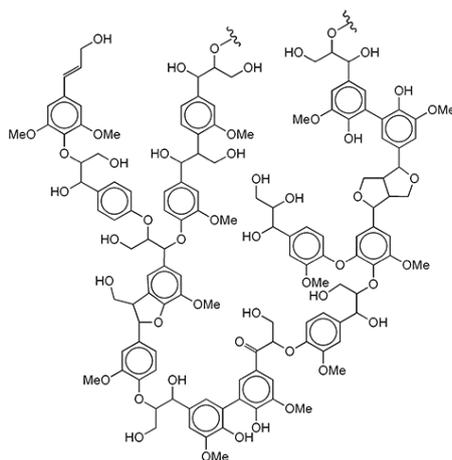


Figure 9. Structure de la lignine

1.4. Les extractibles

Les composés de faible poids moléculaire que l'on trouve dans la structure poreuse du bois sont nommés extractibles. Ils ne sont pas liés à la structure des parois cellulaires par des liaisons covalentes et sont par conséquent accessibles aux solvants et donc extractibles d'où leur nom. La majeure partie des extractibles se trouve dans le lumen des cellules du bois ou dans les tissus spécialisés. Ils se trouvent aussi dans les pores des parois des cellules du bois. Les teneurs en extractibles sont dépendants de nombreux facteurs, dont l'élément anatomique en question, la position dans l'arbre, la vitesse de croissance de l'arbre, l'origine géographique, la génétique et la saison. La teneur en extractibles augmente progressivement de la moelle vers la périphérie du bois de cœur, aussi bien pour les duramens foncés que pour les pales. Les taux d'extraits varient entre 0.5 – 1 % jusqu'à 15 – 20 % dans le meilleur des cas. Différentes familles, genres et espèces contiennent différents types d'extractibles. Les classes principales de composés organiques extractibles sont les composés terpéniques, les tannins hydrolysables et condensés, les stilbènes, les lignanes et les flavonoïdes.

1.4.1. Les composés terpéniques

Les terpènes sont synthétisés par les cellules épithéliales (tissu spécialisé du parenchyme) bordant les canaux résinifères. Elles sont catégoriquement considérées comme des produits de condensation des unités C5 d'isoprène (C₅H₈). Deux unités d'isoprène conduisent à la formation de monoterpènes en C₁₀, trois aux sesquiterpènes, en C₁₅, quatre aux diterpènes, en C₂₀, cinq aux sesterpènes, en C₂₅, six aux triterpènes, en C₃₀, huit aux tetraterpènes, en C₄₀ et au-delà aux polyterpènes.

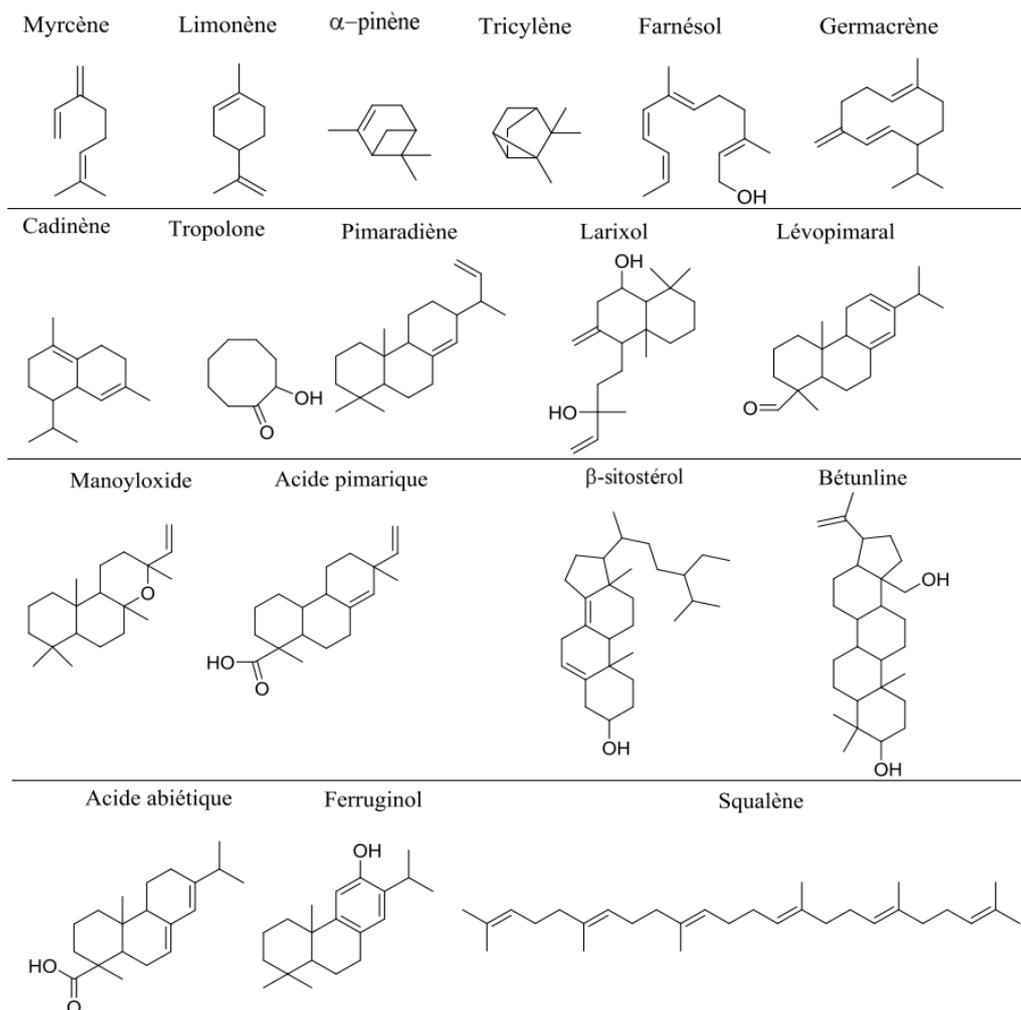


Figure 10. Exemples de structures des terpènes

Les terpènes protègent les plantes et le bois des agents pathogènes tel que les moisissures, les champignons et les bactéries, et peuvent attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les herbivores. A. Saniewska *et al.* [7] ont démontré que les hinokitiols (β -thujaplicin) peuvent fortement inhiber la croissance des champignons tel que le *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Poria placenta* et *Gloeophyllum trabeum* [8].

Les terpénoïdes sont des composés anticancéreux. Leurs mécanismes d'action sont divers tel que la neutralisation du stress oxydatif, la potentialisation des antioxydants endogènes et l'amélioration du potentiel de détoxification [9].

Les monoterpènes (Camphène, (R)-camphre, (R)-carvone, 1,8-cinéole, cuminaldéhyde, (S)-fenchone, géraniol, (R)-linalool, (1R, 2S, 5R)-menthol, myrcène et thymol) ont des activités antifongiques contre certaines champignons phytopathogènes comme la *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum*, qui provoquent la moisissure verte et noire [10]. Garcia *et al.* ont

démontré que la L-carvone de *P. sylvestris* inhibe considérablement la croissance des champignons [11]. Une autre étude qui a été menée par D.B Turley *et al.* a montré que ces composés peuvent détruire fermement *Escherichia coli* T. *Escherich* [12].

Les bétunlines sont des pentacyclique de triterpene présents dans l'écorce du bouleau. Ils ont des propriétés intéressantes comme les propriétés anti-moisissures et anti-bactériennes [13]. Le lupeol est un triterpene chimio préventifs, cytotoxiques et anti-oxydante.

1.5. Extractibles phénoliques

Les extractibles phénoliques du bois sont très variés. Leu structure peut correspondre à un phénol de structure simple, de squelette C6, C6-C1 et C6-C2 (noyau benzénique et une chaîne a deux atomes de carbonés), ou de structure plus complexe comme celle des tannins condensés.

1.5.1. Les phénols simples, aldéhydes phénoliques et acides phénoliques

L'acide gallique est un acide phénolique commun dans les plantes ligneuses où il est sous forme d'acide quinique ou encore sous forme de tanins hydrolysables, les tanins dits galliques. Les dimères de l'acide gallique, l'acide hexahydroxydiphenique et l'acide ellagique, sont à la base des tanins hydrolysables de type ellagique.

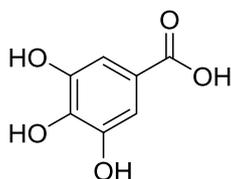


Figure 11. Structures de l'acide gallique

Les aldéhydes benzyliques sont distribués amplement dans la nature, et ont un squelette C6-C1. Le salicylaldehyde, le p-hydroxybenzaldehyde, le p-anisaldehyde et le protocatechualdehyde, sont les aldéhydes benzyliques les plus répandus. Le p-anisaldehyde se trouve dans l'huile essentielle de mimosa, de fenouil et de vanille.

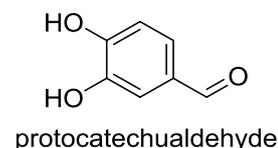
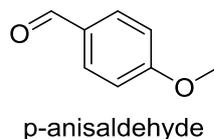
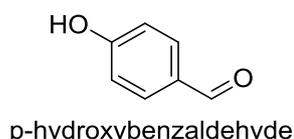


Figure 12. Exemples d'aldéhydes benzyliques

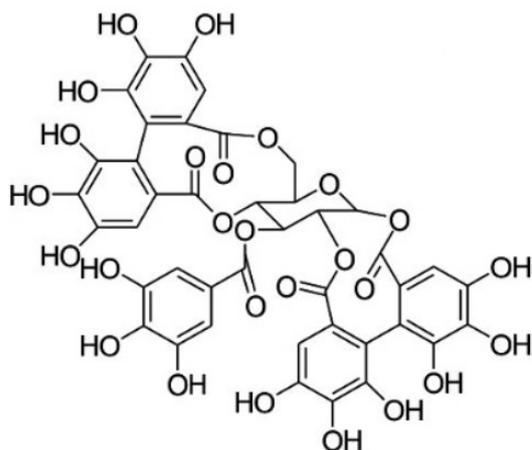
Purs, les phénols simples sont incolores mais très sensibles à l'oxydation et deviennent bruns ou foncés à l'exposition à l'air. Ils sont solubles dans les solvants basiques, mais leur oxydation est facilitée en milieu alcalin. La plupart des glycosides de ces phénols sont solubles dans l'eau, ce qui n'est pas le cas de leur aglycones. Les esters et les éthers de ces phénols sont encore moins solubles dans l'eau que les phénols correspondants. Ils absorbent fortement dans l'UV, en raison de leur structure aromatique ; En plus ils sont visibles en microscopie grâce aux noyaux benzéniques qui réagissent avec de nombreux réactifs chromogènes.

1.5.2. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau dont la masse molaire se situe entre 500 et 3000 g/mol ; ils peuvent être engagés dans les réactions caractéristiques des phénols en général, et sont de plus capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines.

Deux types de tanins se trouvent dans le bois : les tanins hydrolysables qui sont des esters des acides galliques et hexahydroxydiphenique et de leurs dérivés, et les tanins condensés qui sont des oligomères catéchiques.

A



B

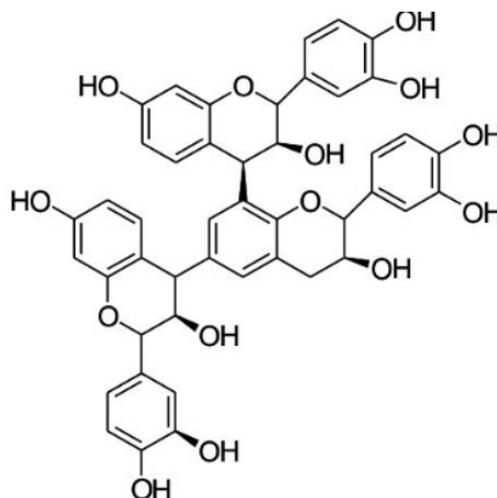


Figure 13. Tannin hydrolysable (A) et tannin condensé (B)

Les tannins hydrolysables sont synthétisés par une grande variété d'arbres. Ils peuvent se produire dans le bois, l'écorce, les feuilles, les fruits et les galles [14], [15]. Certaines espèces produisent des gallotannins ou des ellagitannins, tandis que d'autres produisent des mélanges

complexes contenant des tanins gallo, ellagi- et condensés. Certaines plantes possèdent à la fois des tanins condensés et hydrolysables comme par exemple les *Acacia*, *Acer* et *Fagaceae* [16], [17]. En revanche, d'autres espèces, comme le châtaignier et le chêne ont des tanins hydrolysables, par contre le quebracho et le mimosa ont du tanin condensé [18].

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères hétérogènes dont la structure est basée sur les flavan-3-ols. Ils sont formés comme sous-produits du processus par lequel les flavan-3-ols parents sont formés. Les tanins condensés sont présents de façon assidue dans les tissus épidermiques des plantes, dans les feuilles, l'écorce et le phloème de l'écorce et en sont absents du bois d'aubier et de cœur. Cependant, il y a plusieurs exceptions, comme dans le cas des genres d'*Acacia* et *Schinopsis* dont le bois de cœur est utilisé comme source de tanins condensés.

Les tanins peuvent précipiter les protéines, inhiber les enzymes digestives et réduire l'utilisation de vitamines et de minéraux. D'autre part, ils ont été considérés aussi comme composants «favorables à la santé» dans les aliments et les boissons à base de plantes. En autres, les tanins possèdent des potentiels anticancérogènes et antimutagènes, ainsi que des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antiradicalaires [19].

1.5.3. Les stilbenes

Les stilbènes sont synthétisés par l'addition de une à trois molécules de malonyl-CoA aux acides cinnamiques qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. Le stilbène se trouve dans les espèces du genre *Alnus*. C'est aussi un constituant de la peau des raisins rouges et se trouve dans les vins rouges également. Ils font également partie de la structure des tanins condensés de l'écorce de l'épicéa de Norvège.

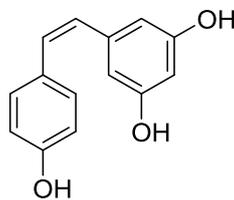


Figure 14. Structure des stilbènes

Les stilbènes sont bactéricides et insectifuges. Ils sont importants pour la résistance aux champignons de pourriture du bois, et des études ont été menées pour induire la biosynthèse

du stilbène en irradiant les semis pour rendre le bois plus résistant à la biodégradation. Ils affectent également les propriétés techniques du bois.

1.5.4. Les lignanes

Les lignanes sont des dimères constitués par deux unités phenylpropane (C6 – C3) reliées par une liaison $\beta - \beta$ au niveau du carbone C8 [21]. Ils sont classifiés dans huit sous-groupes suivants en fonction comment l'oxygène est incorporé dans le squelette et du schéma de cyclisation: furofurane, furane, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactone, aryltétraline, arylnaphtalène, dibenzocyclooctadiène et dibenzylbutyrolactol.

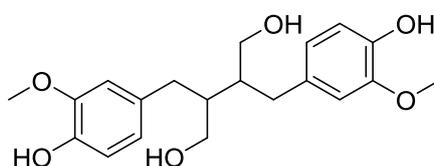


Figure 15. Structure des lignanes

Les lignanes apparaissent dans tout le règne végétal et possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes et insecticides. Ces composés servent dans les systèmes de défense des plantes et jouent également un rôle dans la régulation de la croissance des plantes [22]. Le syringol par exemple, est un produit de pyrolyse de lignine du bois de feuillus, et est un produit chimique principal responsable de l'arôme de fumée [23].

1.5.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des dérivés de diphenylpyrane polyhydroxylé naturels. Ils sont omniprésents dans les extraits des plantes [24]–[26] mais font également partie intégrante de l'alimentation humaine, où ils sont majoritairement trouvés dans les boissons, les fruits et les légumes [27]–[29]. Ils ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait présentent le même élément structural de base, un noyau benzopyrane ou chromane (cycle A et C), sur lequel est attaché un groupement phényle (cycle B) en position 2 ou 3. En fonction de la position de ce cycle, deux familles sont distinguées : les flavonoïdes qui sont substitués en position 2 et les isoflavonoïdes qui sont substitués en position 3.

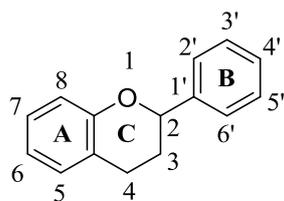
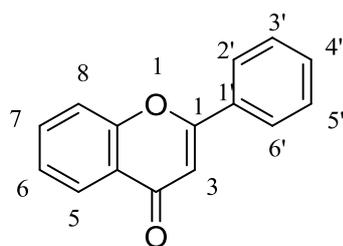
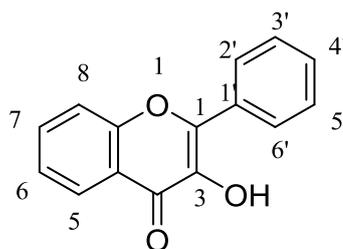


Figure 16. Squelette de base des flavonoïdes

Plus de 4000 molécules jusqu'à présent ont été classifiées en six familles différentes par le niveau d'oxydation et la configuration de substitution du noyau C. Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres). Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes on trouve les flavones, les flavanones, les isoflavones, les flavonols, les flavan-3-ols et les anthocyanidines (Figure)



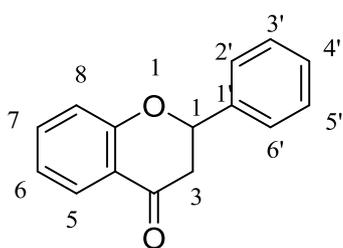
Flavone



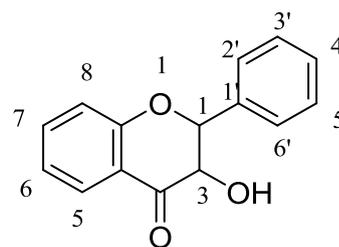
Flavonol

	5	6	7	4'
Apigénine	OH	-	OH	OH
Baicaléine	OH	OH	OH	-
Chrysin	OH	-	OH	-

	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH



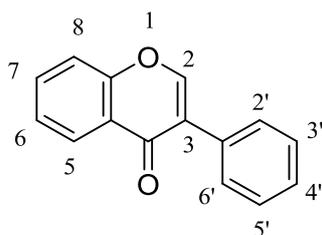
Flavanone



Flavanol

	5	7	4'
Naringénine	OH	OH	OH

	5	7	4'	3'
Catéchine	OH	OH	OH	OH



Isoflavone

	5	7	4'	3'
Génistéine	OH	OH	OH	OH

Figure 17. Les différentes classes des flavonoïdes

Pour chaque flavonoïde, les molécules diffèrent par le nombre et la position des groupes hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation.

Les flavonoïdes existent généralement sous une forme glycosylée. La présence de sucres modifie les propriétés de la molécule, notamment sa solubilité et son hydrophobicité, par rapport aux analogues non glycosylés. La liaison entre l'aglycone et le sucre se fait généralement par l'un des groupements hydroxyles phénoliques, notamment ceux en positions

3 pour les flavanols ou ceux en position 7 pour les flavonoïdes ; parfois si les positions 6 et 8 sont hydroxylées, la liaison se fait sur ces deux positions. De plus, les sucres peuvent se lier directement aux aglycones. Les fractions osidiques peuvent être des monosaccharides, des disaccharides, des trisaccharides ou même des tétrasaccharides

2. Activités et domaine d'applications des différentes classes de flavonoïdes

Les flavonoïdes possédant une activité biologique sont souvent appelés bioflavonoïdes. Ils possèdent la capacité de capter les radicaux superoxydes, hydroxyles et lipidiques [30]. Les flavonoïdes ont une longue histoire d'utilisation médicinale, principalement pour soutenir la fonction saine des capillaires et des vaisseaux sanguins. Ils sont commercialisés comme remèdes anti-inflammatoires et antispasmodiques [31]. De plus, les analogues de flavonoïdes et leurs complexes métalliques jouent un rôle important dans la chimie agricole, industrielle et pharmaceutique [32]. Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs sous-groupes, et il est important de mentionner que les propriétés biologiques et chimiques des flavonoïdes appartenant à différents sous-groupes peuvent être très différentes [33].

2.1. Les flavanols

Les flavanols constituent un groupe très complexe de polyphénols allant des flavan-3-ols monomères (par exemple catéchine, épicatechine, gallocatéchine) aux procyanidines polymères connues sous le nom de tanins condensés [34]. La catéchine est le représentant le plus important du groupe des flavanols. La catéchine empêche l'oxydation des protéines par sa capacité à piéger les radicaux libres. De plus, elle possède la capacité de réduire la modification covalente des protéines induite par les ROS ou les sous-produits issu du stress oxydatif [35]. De plus, la catéchine présente des propriétés anti-athérosclérotiques. Il a été démontré qu'elle provoque l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), la réduction de l'endothéline et le blocage de l'agrégation plaquettaire [36], [37]. Les catéchines ont également révélé une activité anti-cancérogène. Elles peuvent limiter la prolifération cellulaire et induire l'apoptose, ainsi que moduler et inhiber l'activité du NF κ B [38]. De même, le polyphénol catéchine semble être un promoteur efficace de la thermogénèse [39]. De plus, la catéchine et l'épicatechine jouent un rôle crucial dans la défense contre les agents pathogènes du thé [40]. À leur tour, les catéchines du thé vert ont été présentées comme possédant des effets antibiotiques en raison de leur fonction de

perturbation du processus de réplication de l'ADN bactérien [41]. Les catéchines du thé noir ont des propriétés antidiabétiques. Il est bien connu que le thé noir présente une activité inhibitrice la plus élevée de l' α -amylase et de l' α -glucosidase élevée [42]. Il a également été suggéré que la catéchine provoque l'augmentation de l'activité de l'insuline, mais il n'y a pas suffisamment de preuves pour confirmer cet état [43].

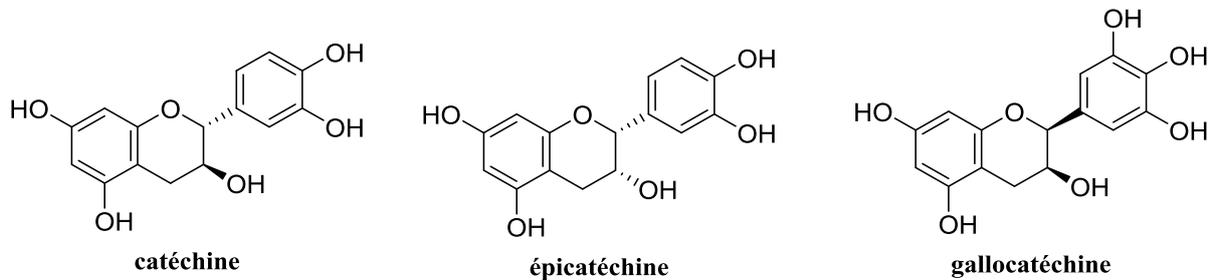


Figure 18. Structure de la catéchine, l'épicatechine et la gallocatéchine

2.2. Les flavanones

Les flavanones sont largement disséminées dans environ 42 grandes familles de plantes, en particulier chez les légumineuses et les rutacées. En raison de la forte diffusion des flavanones dans les aliments, les aglycones de la naringénine et de l'hespéridine semblent présenter un intérêt particulier [44]. Les principales activités pharmacologiques des flavanones sont les effets antiradicalaires, anti-inflammatoires, anticancéreux, cardiovasculaires et antiviraux [44]. Les flavanones de naringénine sont très efficaces pour inhiber les cytokines pro-inflammatoires induites par le lipopolysaccharide dans les macrophages et réduire la production de nitrate et de nitrite qui sont des indicateurs du processus inflammatoire pour contrôler la formation d'œdème intestinal [45], [46]. La naringénine, présente une activité antimutagène qui se manifeste par un effet protecteur de l'ADN par leur capacité à absorber la lumière UV [47]. On pense que les flavanones ont un potentiel anti-athérosclérose. Les études ont démontré la réduction de l'athérosclérose chez les souris nourries avec un régime riche en graisses et en cholestérol en utilisant une supplémentation en naringénine à un niveau nutritionnellement pertinent. Ce résultat pourrait être exploité pour améliorer la dyslipidémie et les biomarqueurs de la dysfonction endothéliale, ainsi que les modifications de l'expression des gènes. Ainsi, les flavanones peuvent prévenir les maladies cardiovasculaires [48].

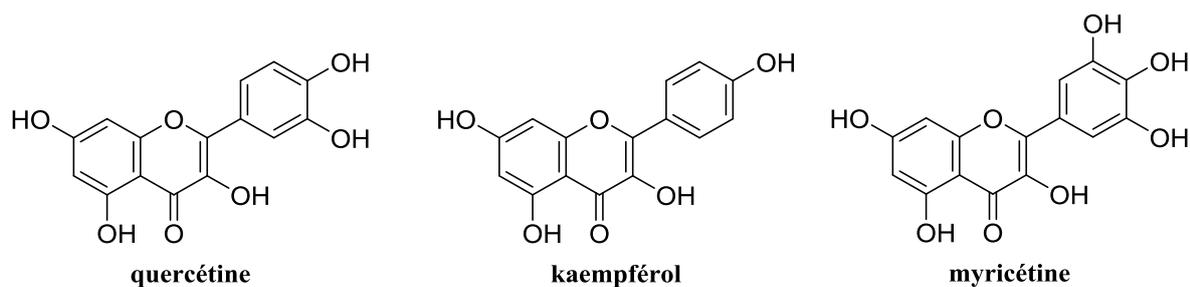


Figure 20. Structure de la quercétine, le kaempférol et la myricétine

2.4. Les flavones

Les flavones sont structurellement très similaires aux composés de type flavonol ; elles présentent un groupement hydroxyle supplémentaire en position 3 du carbone. Les principales flavones sont l'apigénine et la lutéoline. Il a été rapporté que l'apigénine possède des propriétés anti-inflammatoires, anticancérigènes et antioxydantes importantes. Il a été démontré que l'apigénine inhibe la mutagenèse bactérienne induite par le benzo[a]pyrène et le 2-aminoanthracène [53]. L'apigénine peut agir comme inhibiteur sévère de l'ornithine décarboxylase, une enzyme jouant un rôle essentiel dans la promotion tumorale. Les effets anti-cancérigènes de cette flavone sont indiqués dans un modèle de carcinogenèse cutanée [54]. La lutéoline possède de multiples effets biologiques tels que anticancéreux, antiallergique et anti-inflammatoire [55]. Ainsi, la lutéoline se comporte comme un antioxydant ou un prooxydant biochimiquement. La lutéoline peut montrer ses propriétés antioxydantes en protégeant ou en prolongeant les antioxydants endogènes tels que : la glutathion réductase, la glutathion-S-transférase, la superoxyde dismutase [56]. L'effet anti-inflammatoire de la lutéoline s'explique par une limitation de la production des cytokines et une inhibition des voies de transduction du signal [57].

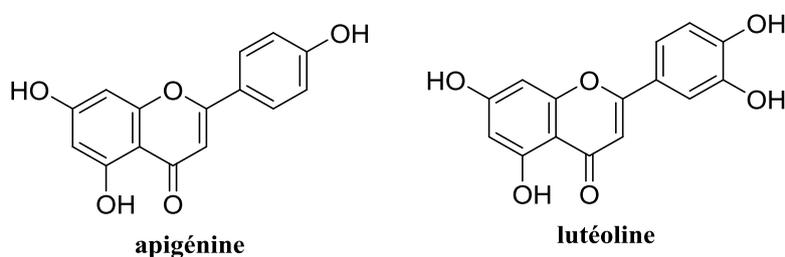


Figure 21. Structure de l'apigénine et la lutéoline

2.5. Les isoflavones

Les isoflavones sont une sous-classe distinctive et très importante des flavonoïdes. Les principales isoflavones présentes dans l'alimentation humaine sont la génistéine et la daidzéine, qui existent dans quatre structures chimiques apparentées, à savoir les aglycones, les 7-O-glucosides, les 6'-O-acétylglucosides et les 6'-O-malonylglucosides [58]. Les composés de type isoflavone semblent avoir des effets sur le système cardiovasculaire, sur la santé des femmes ménopausées, et seraient même capables de prévenir le cancer. Ils peuvent également avoir des effets antioxydants au niveau des vaisseaux sanguins [59]. L'une des principales isoflavones, la daidzéine inhibe les isoenzymes de classe I de l'alcool déshydrogénase humaine (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale humaine (ALDH-2), enzymes impliquées dans la transformation de l'alcool. De plus, la daidzéine présente un effet antioxydant [60]. Un autre isoflavone bien connue, la génistéine est un agent chimiopréventif potentiel dans le traitement ou la prévention de divers types de cancer. Certaines études montrent également que la génistéine possède un effet anabolisant sur l'os en agissant directement sur les ostéoblastes, et prévient ainsi la perte osseuse [61], [62].

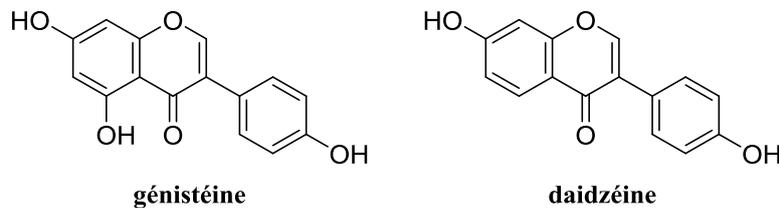


Figure 22. Structure de la génistéine et la daidzéine

2.6. Les anthocyanidines

Les anthocyanidines constituent un groupe de composés phytochimiques, comme les pigments naturels qui sont responsables des couleurs bleu, rouge, violet et orange présentes dans de nombreux fruits et légumes, ainsi que dans de nombreux produits alimentaires à base de fruits et légumes. Les anthocyanidines les plus courantes présentes dans les fruits et légumes sont : la cyanidine, la pélargonidine, la delphinidine, la malvidine, la pétunidine et la péonidine. Ces composés dépendent du nombre et de la position des groupes hydroxyle et méthoxyle présents dans leur structure[63]. Des travaux ont révélé que les anthocyanidines jouent un rôle essentiel dans la prévention des maladies cardiovasculaires, la décomposition du cholestérol, l'acuité visuelle, ainsi que l'efficacité antioxydante et la cytotoxicité [64]. Les anthocyanidines sont capables d'agir sur différentes cellules participant au développement de

l'athérosclérose. Il a été démontré que ces composés ont un effet protecteur contre l'excrétion de MCP-1 (protéine chimiotactique des monocytes chimiokines 1) induite par le TNF- α dans les cellules endothéliales humaines primaires. MCP-1 est l'une des causes directes de l'athérogenèse [65]. Il convient de mentionner que les anthocyanidines ont une influence sur la distribution du cholestérol en protégeant les cellules endothéliales de la signalisation pro-inflammatoire induite par le CD40 [66].

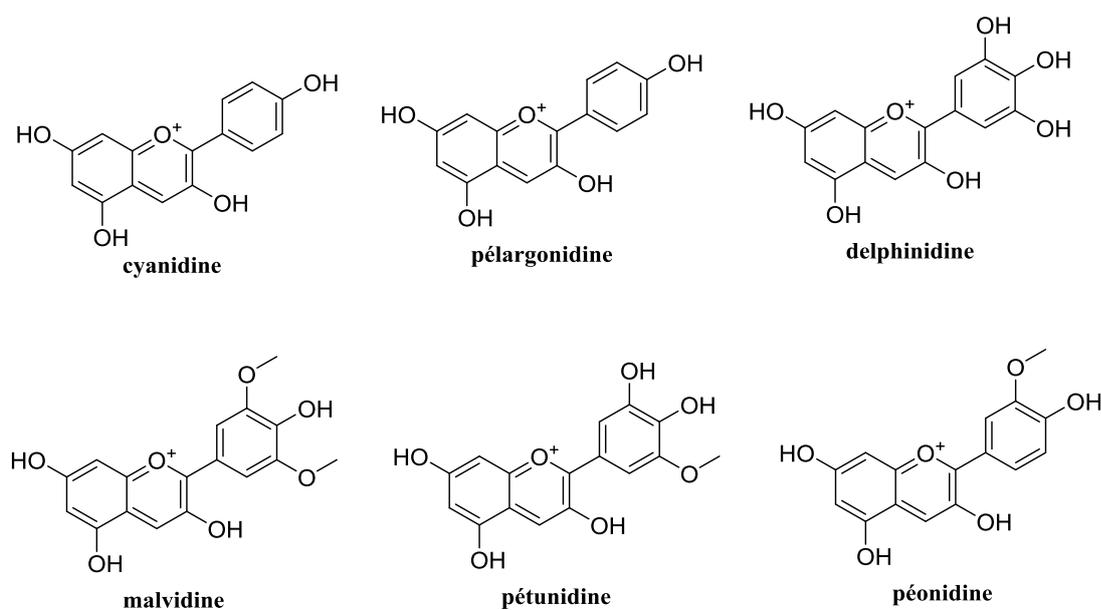


Figure 23. Structure de la cyanidine, la pélargonidine, la delphinidine, la malvidine, la pétunidine et la péonidine

3. Fonctionnalisation des flavonoïdes

L'utilisation pratique des flavonoïdes pour des applications cosmétiques, pharmaceutiques, diététiques et en agro-alimentaire fait face à un certain nombre de problèmes majeurs:

- La mise en solution des flavonoïdes et des hétérosides est extrêmement difficile. Ainsi, les génines sont plutôt liposolubles alors que les hétérosides sont plutôt hydrosolubles ; dans les deux cas la solubilité est très faible.
- Le caractère antioxydant des flavonoïdes ainsi que leur très grande réactivité vis-à-vis de l'oxygène ou de la lumière les rendent particulièrement instables. Cette instabilité est due à la présence de groupements hydroxyles phénoliques libres qui s'oxydent facilement en contact avec l'oxygène ou de la lumière. La stabilité de ses flavonoïdes peut aussi être affectée par d'autres facteurs tels que la température, le pH et la présence d'agents complexants.

- La concentration de ces molécules dans les extraits des plantes est généralement faible et les activités énoncées ne sont pas systématiquement retrouvées dans ces extraits.

La recherche de moyens permettant d'une part de conférer une stabilité satisfaisante aux dérivés phénoliques en général, et d'autre part de les rendre liposolubles ou hydrosolubles, a conduit les chercheurs à développer différentes approches reposant sur des modifications de leur structure chimique.

3.1. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie chimique

Malgré de nombreux rôles prometteurs des flavonoïdes, les attentes n'ont pas été remplies en raison de l'instabilité et de la très faible biodisponibilité orale des flavonoïdes alimentaires lorsque les études ont été étendues à la condition *in vivo*, et en particulier chez les humains [67]. Une modification structurale devient alors une nécessité pour les chercheurs afin de pallier leur défaut, et savoir leur manque de solubilité dans les phases lipophiles ou aqueuses.

- **Hydroxylation des flavonoïdes**

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'augmenter la solubilité des flavonoïdes dans les phases aqueuses, par hydroxylation, où on introduit un atome d'oxygène dans un mode de haute régio et stéréosélectivité. Par exemple, Chu *et al.* (2016) ont hydroxylé régiosélectivement la naringénine en position 3' ainsi que l'hespéretine afin d'obtenir des composés ayant une activité antibactérienne [68]

- **Glycosylation des flavonoïdes**

Les approches biologiques pour la glycosylation des aglycones en glycosides ont suscité un intérêt considérable car elles permettent la formation de nouveaux composés avec une stéréo- et régio-sélectivité élevée dans des conditions douces. Elle consiste à ajouter un sucre sur la structure de base des flavonoïdes. Santos *et al.* (2013) ont établi une méthodologie simple, régio- et stéréosélective en une étape pour la mono-C-glycosylation de la naringine avec du D-glucose par catalyse avec des triflates de métaux de terres rares dans de l'acétonitrile/eau.

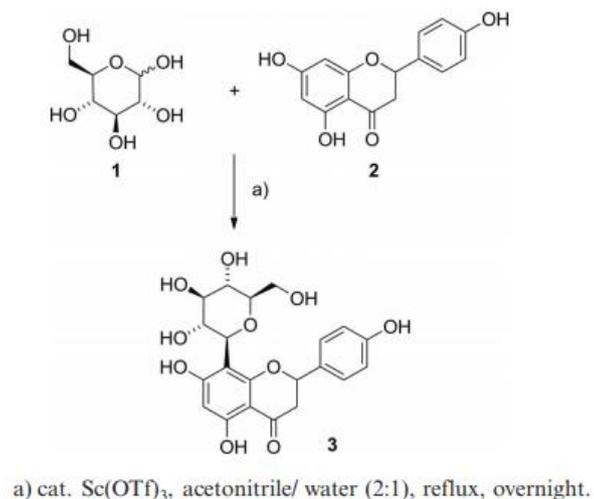


Schéma 1. Glycosylation de la naringénine (Santos *et al.* 2013)

- **Amination des flavonoïdes**

L'amination des flavonoïdes de fait *via* une substitution amino régiosélective de groupes hydroxyle phénoliques dans des conditions relativement douces sans catalyseur [72]. Hashida *et al.* (2009) ont synthétisé le 4'-C-amino-épigallocatechine en traitant l'épigallocatechine avec du NH₃ dans l'eau.

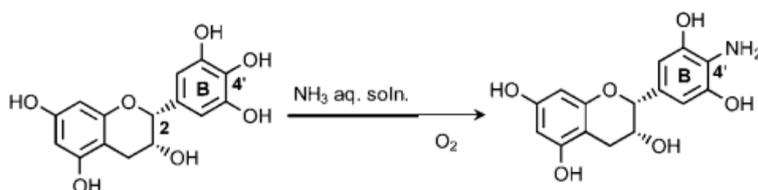


Schéma 2. Reaction de l'épigallocatechine durant un traitement au NH₃ (Hashida *et al.* 2009)

- **Acylation des flavonoïdes**

D'autre part, l'augmentation de solubilité des flavonoïdes en milieu hydrophobe est un défi aussi pour les chercheurs, actuellement il existe trois méthodes pour avoir des flavonoïdes acylés, soit par la synthèse des composés qui ont une chaîne grasse en utilisant des enzymes spécifiques [73] soit par extraction directe de composés phénoliques acylés [74] ou par l'acylation par voie chimique. Classiquement, la réaction d'acylation et ou estérification est réalisée toute en changeant plusieurs paramètres tel que en utilisant d'agent d'activation et à haute ou basse température [75]. Dans la plupart de cas, l'estérification est faite par des acides

gras ou par des chlorures d'acides, ces derniers sont généralement des chaînes aliphatiques qui peuvent avoir des ramifications et/ou des cycles d'hydrocarbures.

La structure de l'épigallocatechine gallate (EGCG) a été modifiée dans le but améliorer sa lipophilicité, et son absorption cellulaire *in vivo*. Les EGCG-3',5',3'',5''-O-tetraesters d'acide stéarique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque ont été obtenus par estérification de l'EGCG. Ces dérivés lipophiles d'EGCG ont montré une plus grande activité antioxydante dans le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) que l'EGCG lui-même. Ces résultats suggèrent que les dérivés d'EGCG peuvent être utilisés comme antioxydants lipophiles potentiels dans les industries alimentaires, cosmétiques et médicinales [76].

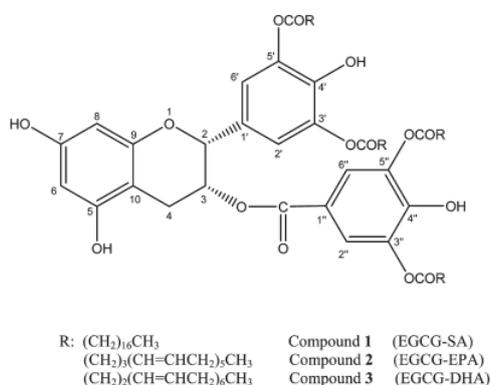


Figure 24. Structures des dérivés d'EGCG (Zhong *et al.* 2011)

Les activités antitumorales des 3-O-octanoyl- ou 3-O-(2-méthyl-octanoyl)-(-)-épigallocatechines synthétisés ont été évalués, inhibant nettement l'activation précoce de l'antigène du virus d'Epstein-Barr, dans un test de cancérogenèse cutanée en deux étapes chez la souris dans le but de rechercher des agents chimiopréventifs anticancéreux prometteurs. En conséquence, ces dérivés ont inhibé une formation de papillome 1,3 à 1,6 fois plus fortement que le (-)-épigallocatechine [77]. Les 3-O-acyl-(+)-catéchines de différentes longueurs de chaîne carbonée (C4 à C18) ont été évaluées pour leurs effets inhibiteurs sur l'activation de l'antigène précoce du virus d'Epstein-Barr. Comme les 3-O-acyl(-)-épigallocatechines, les dérivés de (+)-catéchine ont montré des effets prometteurs avec la chaîne acyle C-3 des atomes de carbone C8-C11 [78].

Une série de (-)-épigallocatechines 3-O-acylées a été synthétisée et leur inhibition de la stéroïde 5 α -réductase a été étudiée. Ils ont été préparés à partir de la réaction de l'EGCG avec le chlorure de tert-butyldiméthylsilyle suivie d'un clivage réducteur de la liaison ester. L'éther penta-O-tert-butyldiméthylsilylique de (-)-épigallocatechines résultant a été estérifié avec

différents acides gras puis désilylé pour l'obtention des produits correspondants. L'activité des (-)-épigallocatechines 3-O-acylées a augmenté avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse [79].

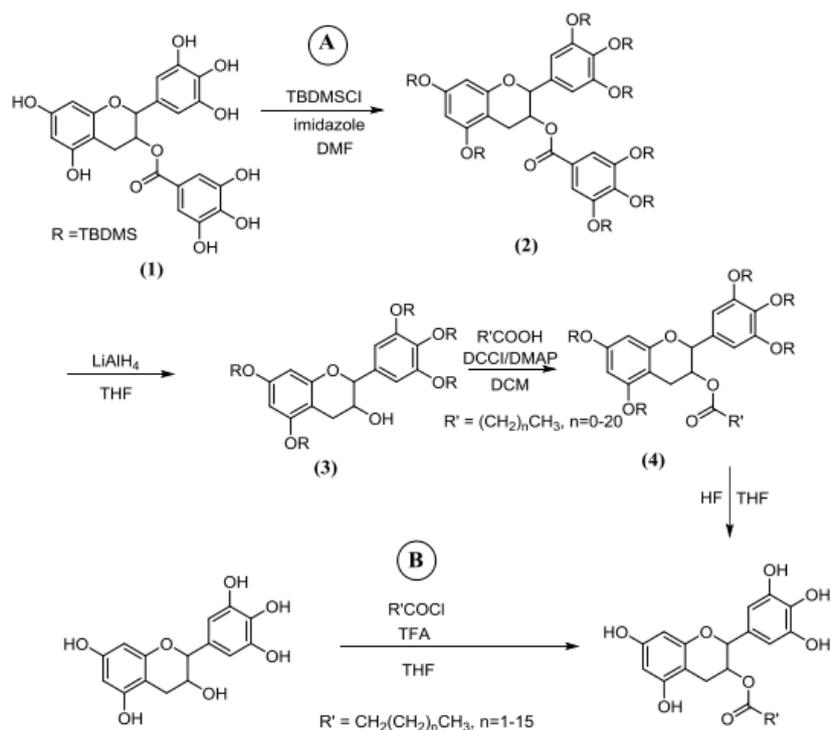


Schéma 3. Synthèse de 3-O-acyles (e)-épigallocatechines (Lin *et al.* 2010)

L'épicatéchine estérifiée avec un acide gras a fortement inhibé l'activité de l'ADN polymérase, la croissance des cellules cancéreuses HL-60 et l'angiogénèse. L'épicatéchine conjuguée à l'acide palmitique était l'inhibiteur le plus puissant dans les tests d'ADN polymérase α , β , λ et d'angiogénèse. Ces résultats suggèrent que l'acylation de l'épicatéchine est une modification chimique efficace pour améliorer l'activité anticancéreuse de celle-ci [82].

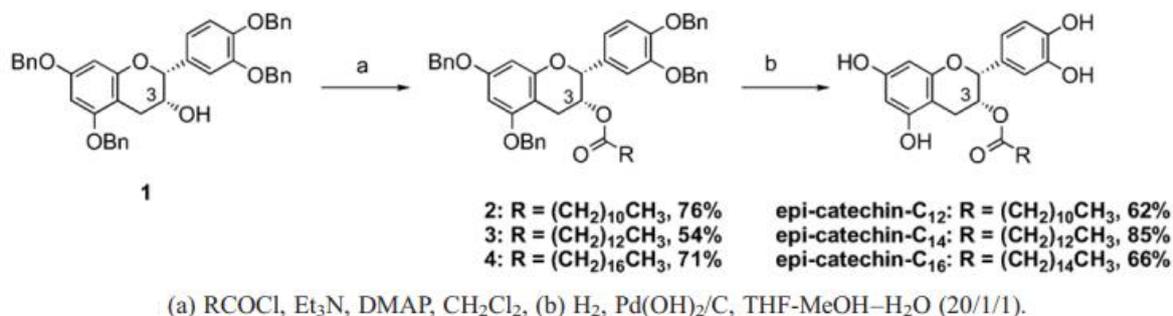


Schéma 4. Synthèse d'acyles épicatéchines (Matsubara *et al.* 2007)

Le profil de réactivité de tous les groupes hydroxyle de la (+)-catéchine vis-à-vis de l'acylation et leur contribution respective à l'activité de piégeage des radicaux ont été systématiquement explorés. L'acylation sélective des hydroxyles sur différents cycles a été réalisée en utilisant une stratégie d'activation basique ou acide. La monoacylation du cycle B a été réalisée efficacement à l'aide de dichlorure de diméthylétain. La monoacylation du cycle A a été réalisée par protection et déprotection séquentielle des cycles B et C. Sur la base de l'acylation spécifique de tous les hydroxyles individuels de (+)-catéchines, la relation d'activité de piégeage des radicaux de structure de chaque hydroxyle de (+)-catéchine a été établie. Il a été démontré que les hydroxyles phénoliques vicinaux sur le cycle B jouaient le rôle le plus important dans l'activité de piégeage des radicaux ABTS et que ceux sur les cycles A et C apportaient une contribution beaucoup plus faible. Cette étude a jeté des bases solides pour une modification ultérieure des catéchines et l'amélioration de leurs propriétés [87].

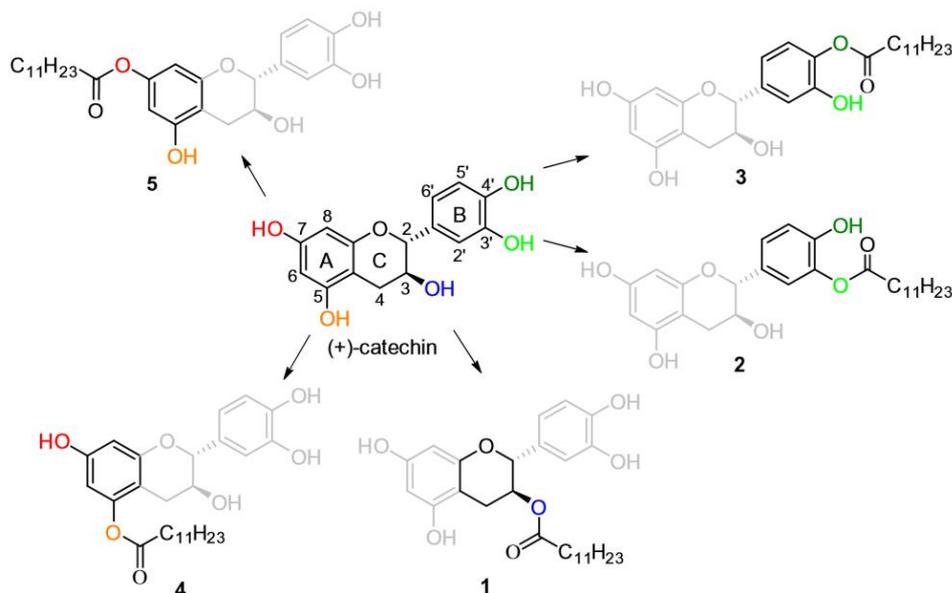


Figure 25. L'acylation sélective des hydroxyles sur différents cycles (Hong *et al.* 2016)

La modification chimique des procyanidines à des composés plus lipophiles a consisté en l'acylation en position 3 en utilisant un chlorure d'acyles, le chlorure de stearoyle, pour obtenir à la fin un rendement de 70% [91]. L'acylation de la génistéine et/ou de la daidzéine avec un chlorure d'acyle dans du DMF ont donné les esters d'isoflavone, 7-mono et 4'-mono avec des rendements de 76 et 95 % respectivement ainsi que de très faibles traces de diester en 7,4' [92]. Les dérivés d'ester d'hésperétine, l'hésperétine 7-O-ester et 3'-O-ester, ont été synthétisés par acylation avec des chlorures d'acide en présence de triéthylamine avec des rendements respectives de 82% et 78% [93].

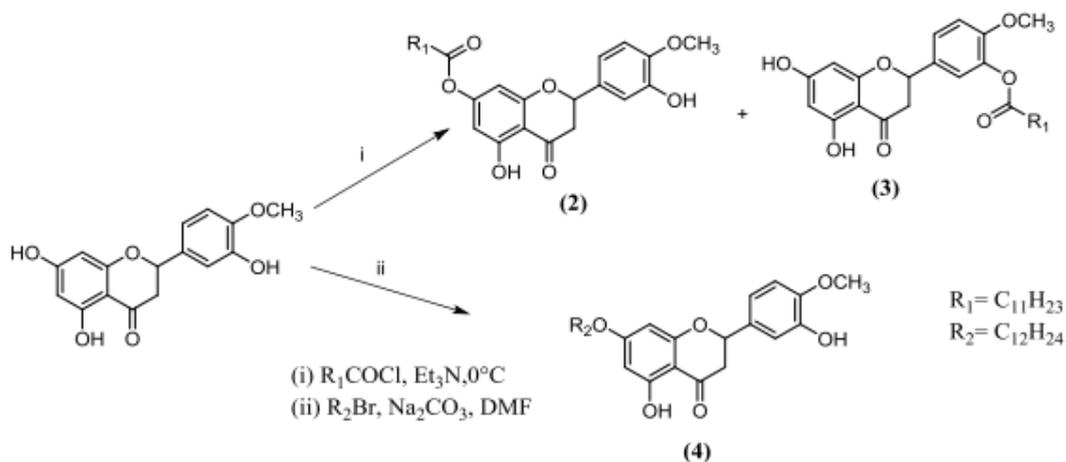


Schéma 6. Synthèse de dérivés d'ester ou d'éther d'hespérétine (Jeong *et al.* 2003)

De nouveaux dérivés semi-synthétiques de flavanone ont été synthétisés en modifiant partiellement le farrerol par des réactions d'estérification. Le 7-octanoylfarrerol et 4'-octanoylfarrerol ont été obtenus en utilisant des chlorures d'acyle (chlorure d'octanoyle), et le diparaméthylbenzoylfarrerol en utilisant le chlorure de p-méthylbenzoyle et la triméthylamine [94].

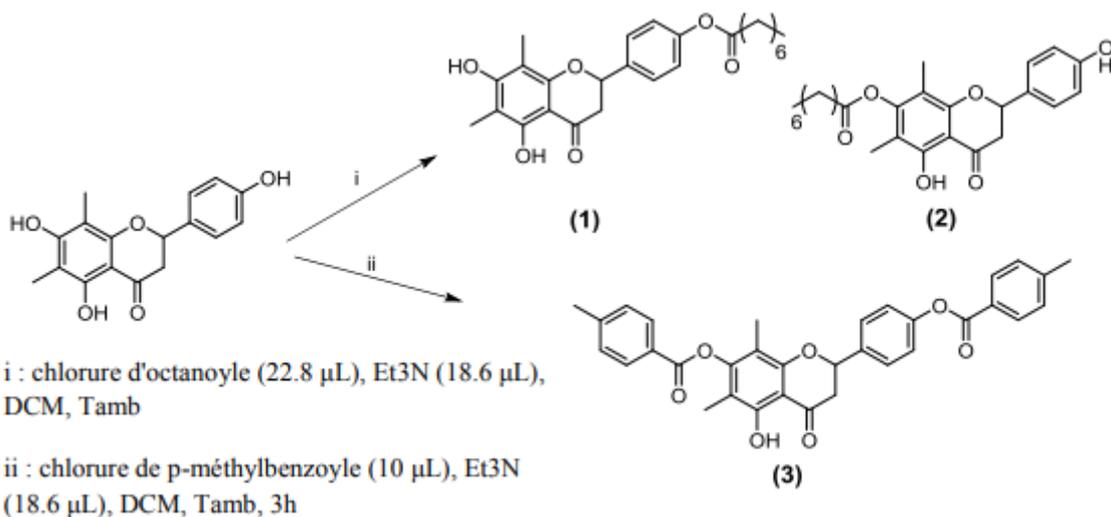
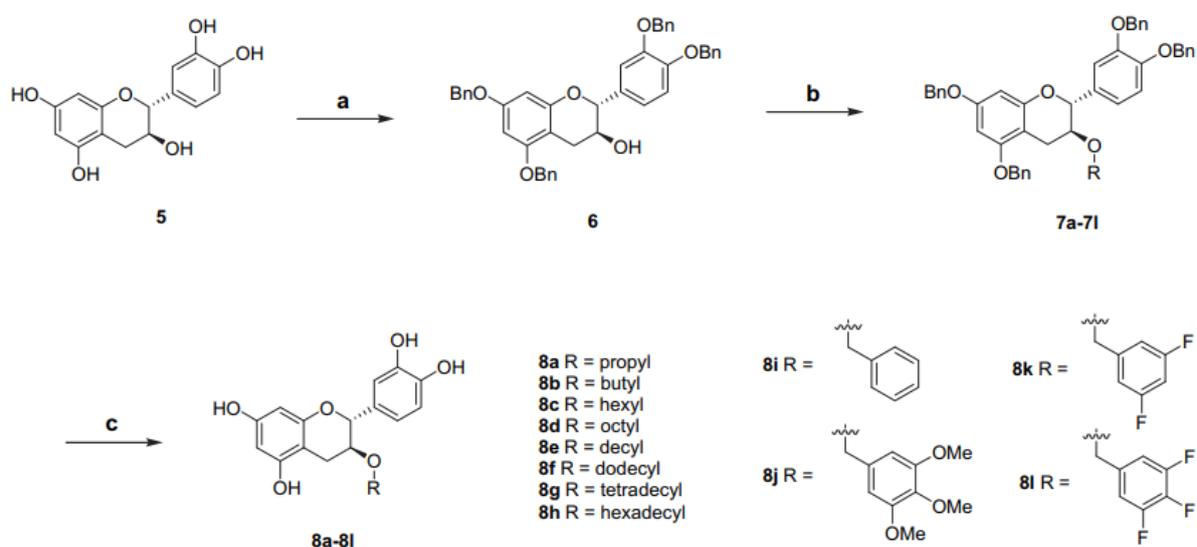


Schéma 7. Synthèse de dérivés d'ester de farrerol (Paging *et al.* 2016)

Le dérivé synthétisé par l'estérification de la naringénine, la naringénine 7-O-ceyl éther, a montré que la biosynthèse et l'estérification du cholestérol ont été simultanément réduites, comme indiqué par la diminution des activités de l'HMG-CoA réductase et de l'ACAT [88].

- **Méthylation et alkylation des flavonoïdes**

Une série de dérivés de 3-O-alkyl-(+)-catéchine ont été étudiés en tant qu'agents antimicrobiens puissants. La présence d'une chaîne alkyle plutôt qu'acycle sur 3-O- a montré une augmentation de l'activité antimicrobienne qui peut être due à la stabilité dans des conditions de culture standard. Le composé le plus prometteur est l'analogue 3-O-décyle. En ce qui concerne le mécanisme d'action, l'activité antimicrobienne est peut-être due à la lipophilie et à la capacité de perturbation des analogues de la membrane des liposomes [86].



(a) benzyl bromide, K_2CO_3 , DMF, rt, 20 h; (b) R-X, cesium hydroxide, tetrabutylammonium iodide, DMF, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 20 h; (c) Pd/C, H_2 , MeOH, rt, 5 h.

Schéma 8. Synthèse des analogues 3-O-alkyles de catéchine (Park *et al.* 2010)

Quatre isomères monométhylés de la (+)-catéchine en positions 3', 4', 5 et 7, deux dérivés diméthylés, la 5,7-diméthylcatéchine et la 3',4'-diméthylcatéchine et deux isomères triméthylés de la (+)-catéchine en positions 3', 5, 7 et 4', 5, 7 ont été synthétisés par une nouvelle méthode basée sur des protections successives et sélectives des différentes fonctions phénol présentes sur la (+)-catéchine. L'étape clé était la protection sélective du cycle catéchol avec du dichlorodiphénylméthane et du di-tert-butylchlorosilane [80].

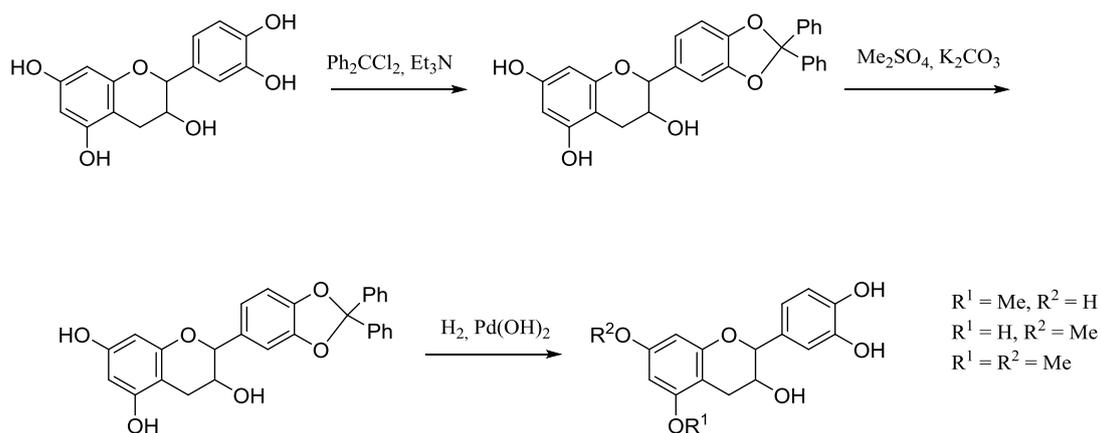


Schéma 9. Synthèse de catéchines méthylées (Cren-Olivé *et al.* 2002)

Ainsi l'hémisynthèse des cinq analogues O-monométhylés de la quercétine : 3'-O-méthylquercétine, 4'-O-méthylquercétine, 3-O-méthylquercétine, 5-O-méthylquercétine et 7-O-méthylquercétine par la protection séquentielle des différentes fonctions phénoliques de la quercétine a été rapportée [81].

- **Phosphorylation des flavonoïdes**

La phosphorylation des flavonoïdes donne une nouvelle classe de dérivés de flavonoïdes qui sont très solubles dans les solutions aqueuses et ont donc le potentiel d'être utilisés dans des études biologiques. La phosphorylation séquentielle de la quercétine conduisant à la synthèse du pentaphosphate de quercétine, du triphosphate d'apigénine, du diphosphate de 5,4'-quercétine et du monophosphate de 4'-quercétine a été reportée [90].

- **Autres type de modifications chimique des flavonoïdes**

Dans l'organisme humain, la catéchine est largement métabolisé en différents conjugués (sulfates, glucuronides et éthers méthyliques), qui se retrouvent également dans le plasma et contribueraient aux effets biologiques associés à l'ingestion des composés parents. Les éthers méthyliques d'épicatéchine ont été synthétisés sur la base du protocole décrit par Donovan *et al.* [83], la synthèse des glucuronides de catéchine était basée sur le Koenigs-Knorr précédemment employé par Tsushida *et al.* [84] et les sulfates d'épicatéchine étaient synthétisé par une modification de la méthode décrite par Jones *et al.*[85].

Plusieurs dérivés de naringénine modifiés en position 7 avec des substituants volumineux ont été conçus et synthétisés, et leurs effets inhibiteurs sur les cellules cancéreuses du côlon humain HCT116 ont été testés à l'aide d'un test clonogénique. Les concentrations inhibitrices

semi-maximales (CI50) de cinq dérivés de la naringénine variaient entre 1,20 μM et 20,01 μM , ce qui est bien meilleur que la naringénine utilisée comme contrôle. De plus, une nouvelle modification structurale en C-4 de la flavanone améliore à la fois l'effet anticancéreux et l'effet antioxydant [89].

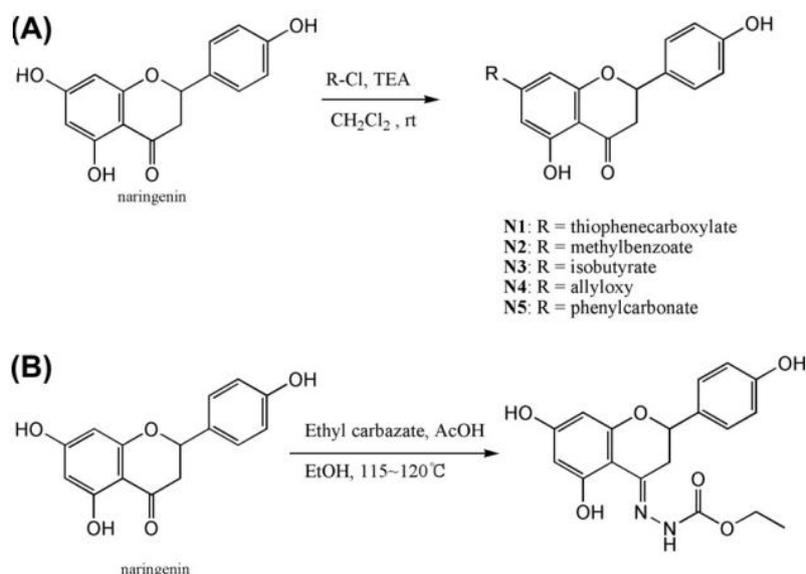


Schéma 10. Modifications structurales de la naringénine en position 7 (A) et en position 4 (B) (Yoon *et al.* 2013)

3.2. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie enzymatique

L'utilisation de procédés de synthèse enzymatique en complément ou à la place de procédés chimiques pour la production de molécules d'intérêt s'inscrit dans le cadre d'une législation plus stricte, d'un environnement technique et commercial favorable. La production de molécules dites "naturelles" répondant aux besoins du marché est en cours de développement. La sélectivité des enzymes, leur utilisation dans des conditions opératoires douces, et la disponibilité commerciale de certains biocatalyseurs constituent les principaux avantages de la voie enzymatique.

Par ailleurs, la découverte du maintien de l'activité des enzymes en milieu non aqueux contenant des traces d'eau, et leur stabilisation par des procédés d'immobilisation ont contribué au développement de l'utilisation de ces biocatalyseurs pour la production de molécules d'intérêt.

Les performances des réactions enzymatiques peuvent être affectées par de nombreux paramètres relatifs aux constituants du milieu et aux conditions opératoires appliquées

(catalyseur, substrats, solvant, eau, température ...). Dans cette partie de l'étude bibliographique réalisée, nous nous intéresserons à l'influence des paramètres les plus critiques pour l'acylation flavonoïdes par catalyse enzymatique en milieu non conventionnel.

- **Nature de la réaction**

L'acylation de flavonoïdes peut se faire selon deux réactions : l'estérification directe et la transestérification. Bien que ces deux réactions aient fait l'objet de plusieurs études, peu de travaux ont comparé leurs performances. Gayot *et al.* (2003), Kontogianni *et al.* (2001), Ardhaoui *et al.* (2004) et Milivojević *et al.* (2020) ont synthétisé des esters de flavonoïdes par estérification directe en utilisant des acides aromatiques et des acides aliphatiques substitués ou non, en présence de la lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) [96]–[100]. La transestérification a été utilisée pour l'acylation de flavonoïdes par des esters vinyliques en présence de différentes enzymes [101]–[106]. Certains travaux ont montré que les performances de la transestérification sont supérieures lorsque des acides aromatiques sont utilisés comme donneurs de groupements acyles, par rapport à d'autres types de donneurs d'acyle [107]–[110]. Outre la nature du substrat donneur d'acyle, les performances de la transestérification dépendent de la nature de l'enzyme.

- **Nature du solvant**

Contrairement aux milieux aqueux dans lesquels on trouve naturellement l'enzyme, les milieux organiques sont qualifiés de « non conventionnels ». Le choix du solvant repose généralement sur un compromis puisqu'il doit à la fois permettre une bonne activité de l'enzyme, une bonne solubilité du donneur et de l'accepteur d'acyle et enfin une extraction aisée des produits du système réactionnel. De plus, la toxicité du solvant est un critère déterminant dans la synthèse de molécules à usage pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire. En fonction de ces contraintes, certaines propriétés de solvants ont été déterminées afin de faciliter le choix du milieu pour une réaction donnée (toxicité, polarité).

Laane *et al.* (1985) ont étudié l'effet du caractère hydrophobe des solvants sur l'activité catalytique de différents biocatalyseurs. Une corrélation le log P (coefficient de partage octanol/eau) du solvant et l'activité de ces enzymes a été établie [111]. Plusieurs autres travaux ont étudié l'influence du logP des solvants et ont rapporté que ceux présentant une valeur de logP inférieure à 2 peuvent conduire à une déshydratation de l'enzyme, et par suite à des changements de sa conformation et à une perte de son activité catalytique ; les

conséquences sur les performances du procédé sont une diminution du taux de conversion des substrats et de la vitesse initiale de la réaction [112]. D'autre part, Valivety et al. (1991) ont montré que l'activité lipasique est favorisée dans des solvants caractérisés par un logP supérieur à 3,5 [113].

Plusieurs autres études ont mis en évidence l'effet des solvants sur la vitesse initiale et le rendement et réactionnels lors de la synthèse d'esters de flavonoïdes.

Il apparaît que, pour des substrats donnés, l'effet du solvant dépend de la nature de l'enzyme utilisée : subtilisine, lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) ou CAL-B. En effet, la synthèse d'esters de flavonoïdes catalysée par la subtilisine est généralement réalisées dans la pyridine [114], tandis que l'acétonitrile et l'acétone sont les solvants les plus adéquats pour l'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés catalysée par PCL. Quant à l'enzyme CALB, son activité est améliorée en présence d'acétone ou d'un mélange acétonitrile/pyridine [115]–[119]. Danieli *et al.* (1997) ont indiqué que le mélange THF/pyridine favorise l'activité catalytique de la CALB alors que ce même mélange a été décrit par Kontogianni *et al.* (2001) comme inhibiteur de cette enzyme. Cette contradiction peut être expliquée par la différence des substrats utilisés et des conditions expérimentales appliquées. Ardhaoui *et al.* (2004) ainsi que Gayot *et al.* (2003) ont mentionné le tert-amyle alcool comme le solvant le plus approprié pour obtenir un rendement et une vitesse initiale optimaux lors de la synthèse d'esters de flavonoïdes [96], [98].

- **Nature des flavonoïdes**

Les flavonoïdes glycosylés sont ceux dont l'acylation a été la plus étudiée. Parmi les quelques travaux qui se sont intéressés à l'acylation des flavonoïdes aglycones, on peut citer ceux de Chebil *et al.* (2007) qui ont montré que l'acylation de l'aglycone quercétine n'est pas faisable en présence de CAL-B [120]. En revanche, la quercétine a été acylée en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (rapport molaire donneur d'acyle /flavonoïde de 40) dans différents solvants comme l'acétone, l'acétonitrile ou le tert-amyl alcool. Trois esters de quercétine ont été synthétisés : la quercétine 4'-acétate, la quercétine 3',4'-diacétate et la quercétine 7,3',4'- triacétate, avec des rendements respectifs de 31, 46 et 23 %. Les rendements obtenus sont dépendants de la nature du solvant et des concentrations relatives des substrats. Zhou *et al.* (2021) ont acylé la catéchine avec l'acide stéarique, l'acide formique et l'acétate d'éthyle en position 3-OH, en présence de CAL-B [121]. Lumbusta et al. (1993) ont acylé la catéchine avec l'acétate de

vinyle, en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia*, dans l'acétone. Deux produits ont été obtenus : le 5-O-acyl-catéchine et le 7-O-acylcatéchine [122]. Saik *et al.* (2016) (2020) ont réussi à synthétiser des esters de quercétine en présence de CAL-B ; des groupements acyle ont ainsi été greffés au niveau des positions 3'-OH, 4'-OH et 7-OH [123], [124]. Kyriakou *et al.* (2018) ainsi que Xie *et al.* (2012) ont également réussi à synthétiser des esters de quercétine [125].

Contrairement aux flavonoïdes aglycones, l'acylation de flavonoïdes glycosylés a fait l'objet de nombreuses études. Pour ces composés, l'acylation est sélective vis-à-vis des hydroxyles glycosidiques, primaires de préférence, quand ils sont libres. Quant aux hydroxyles phénoliques, ils ne sont pas touchés. La régiosélectivité de cette réaction dépend de la nature de l'enzyme. En effet, Danieli *et al.* (1989) ont montré que l'acylation des flavonoïdes dont le groupement glycosylé est un rhamnose n'est pas possible en présence de la subtilisine. Ils ont montré que l'acylation des flavonoïdes, quercitrine, isoquercitrine et lutéoline glucoside, en présence de cette enzyme en solvant pyridine et d'esters de butanoate comme donneurs d'acyle, a été possible seulement sur le résidu sucre de l'isoquercitrine et de la lutéoline glucoside. Ces résultats s'expliquent par la différence dans la structure du résidu sucre, glucose pour l'isoquercitrine et la lutéoline-glucoside et rhamnose pour la quercitrine. En effet, le glucose et le rhamnose appartiennent à deux séries stériques différentes, et la configuration du L-rhamnose pourrait l'empêcher d'interagir avec le site actif de l'enzyme.

Pour les réactions catalysées par CAL-B, l'acylation des flavonoïdes glycosylés dépend de la composition du sucre et de sa position sur l'aglycone. Gao *et al.* (2001) ont indiqué que la réactivité de la catéchine glycosylée dépend de la nature du sucre : les flavonoïdes monoglycosylés possédant un OH primaire sur leur sucre sont plus réactifs que les flavonoïdes ne possédant pas de groupe OH primaire disponible [117].

Cependant, d'autres facteurs, comme l'encombrement stérique et la solubilité de la molécule dans le solvant, interviennent dans la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis du flavonoïde. Ces observations ont été confirmées lors d'une étude faite avec plusieurs autres flavonoïdes. Il a été constaté que l'acylation des flavonoïdes portant un disaccharide est moins efficace que celle d'un monoglycoside [114]. Une étude a montré que lors de l'acylation de différents flavonoïdes (esculine, rutine, hesperidine, quercétine) avec l'acide palmitique en présence de CAL-B, les meilleurs rendements ont été obtenus avec l'esculine en raison de son faible encombrement stérique et de la présence d'un OH primaire dans son résidu sucre. La faible

réactivité de l'hespéridine est due à sa faible solubilité dans le solvant utilisé qui est le tert-amyl alcool [98].

Pour les flavonoïdes monoglycosylés présentant un glucose dans leur structure, l'acylation se fait préférentiellement sur le OH primaire de ce groupe en présence de la CAL-B, de la PCL ou de la subtilisine. En l'absence de OH primaire, l'acylation peut se faire sur un OH secondaire (groupe rhamnose). En fonction de la nature des groupes sucres, l'acylation des flavonoïdes diglycosylés peut avoir lieu sur un seul sucre ou sur les deux sucres en présence de la CALB ou de la subtilisine.

- **Nature du substrat donneur du groupement acyle**

La nature du substrat donneur d'acyle est un facteur important dans l'acylation enzymatique des flavonoïdes. Elle a un effet sur les performances de la réaction ainsi que sur les propriétés de l'ester synthétisé. La spécificité des lipases vis-à-vis des substrats est à l'origine de travaux concernant l'effet des donneurs d'acyles sur l'activité de l'enzyme et sur les performances réactionnelles. Les meilleurs résultats, en termes de taux de conversion et de vitesse initiale de réaction, ont été obtenus en utilisant des acides gras ou des esters vinyliques comme donneurs d'acyle [126]. Pour les acides aromatiques, la performance de la réaction est dépendante de leur structure : nature de la substitution, nombre et la position des groupements hydroxyles (ortho, para etc.).

Kyriakou *et al.* (2012) ont synthétisé des ester de quercétine, 4'-O-acétyle quercétine et 3'-O-acétyle quercétine, en utilisant l'acétate de vinyle en présence de CAL-B [127]. Jiang *et al.* (2021) quant eux, ont synthétisé des esters d'épigallocatechine avec du laurate de vinyle [128]. Le cinnamate de vinyle est le plus efficace pour l'acylation de la catéchine, suivi du férulate de vinyle et du p-coumarate de vinyle [117].

L'effet de la structure des donneurs d'acyle aromatiques sur l'acylation catalysée par Novozym 435® a été décrit par Ardhaoui *et al.* (2004) : les meilleures performances réactionnelles sont obtenues en présence des acides aliphatiques et des acides aryl-aliphatiques. Aucune réaction ne se produit en présence de l'acide benzoïque. Pour les acides aromatiques ayant au moins un alkyle ou un alkényle entre le groupement carboxylique et le noyau aromatique, l'acylation est affectée par la présence d'une insaturation au niveau de la chaîne acyle et/ou d'une substitution (hydroxyles ou nitrogroupes) au niveau du noyau aromatique. Les variations de taux de conversion et de vitesses initiales obtenus avec ces

donneurs d'acyle sont expliquées par différents mécanismes comme des effets électrostatiques, stériques et de polarité [98].

Guo *et al.* (2022) ont réussi à obtenir des esters de naringine avec des acides gras en présence de CAL-B avec des rendements de 80% [129]. Quant à Couto *et al.* (2021), Vaisali *et al.* (2017) et Razak *et al.* (2015), ils rapportent la synthèse d'esters de rutine avec des acides gras de différentes longueurs de chaîne, en présence de CAL-B avec des rendements allant de 40 à 80 % [130]–[132].

En ce qui concerne l'effet de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras utilisés comme donneurs d'acyle sur les performances de l'acylation enzymatique de flavonoïdes, des résultats contradictoires ont été obtenus.

Kontogianni *et al.* (2001) et Guo *et al.* (2022) n'ont remarqué aucun effet de la longueur de la chaîne carbonée sur le rendement de conversion du flavonoïde lors de la synthèse d'esters de naringine et de rutine en utilisant divers acides gras (C8-C12) comme donneur d'acyle, en présence de CAL-B [129], [133]. Lors de l'acylation de la naringine par des acides gras, Melou *et al.* (2005) ont observé que la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle n'influence que légèrement le taux de conversion ainsi que la vitesse initiale de la réaction [119]. Katsoura *et al.* (2006) indiquent quant à eux que la nature du donneur d'acyle joue un rôle dans l'efficacité de la réaction d'acylation de la rutine et de la naringine par des acides gras libres, en présence de CAL-B. Pour la naringine, le meilleur taux de conversion (65 %), a été obtenu avec les donneurs d'acyle à courte chaîne carbonée. En utilisant des donneurs d'acyle à longue chaîne carbonée, le taux de conversion ne dépasse pas 23% [134]. Couto *et al.* (2021) ont montré que les esters de rutine présentant une chaîne grasse à 4 atome de carbone sont synthétisés avec le rendement le plus élevé (40%). Le rendement diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse et atteint 20% pour un donneur d'acyle à 18 atomes de carbone. Cependant, Ardhaoui *et al.* (2004) qui ont étudié l'acylation de la rutine en utilisant des acides gras libres comprenant de 6 à 18 atomes de carbone, ont démontré que pour les acides gras à chaîne carbonée comportant moins de 12 atomes de carbone, les performances réactionnelles augmentent avec la longueur de chaîne ; en revanche, pour les chaînes comportant plus de 12 atomes de carbone, aucun effet de la nature du donneur d'acyle sur le rendement de la réaction n'a été observé [98]. Ces différents résultats dépendent du type d'enzyme, de la composition du milieu réactionnel ainsi que des conditions expérimentales.

- **Influence des conditions opératoires**

- **Activité de l'eau dans le milieu réactionnel**

L'activité de l'eau dans le milieu réactionnel influence la stabilité et la structure des enzymes et par suite leur activité catalytique, indépendamment de la nature du solvant utilisé. Par ailleurs, l'eau produite lors de l'estérification directe influence l'équilibre thermodynamique de la réaction, donc le taux de conversion des substrats. Cependant, l'effet de l'eau varie d'une enzyme à une autre [135]. Pour une enzyme donnée, l'effet de l'eau dépend de la nature du solvant, de l'état de l'enzyme (immobilisée ou libre) ainsi que de la nature du support [136]. Une certaine quantité d'eau est nécessaire pour maintenir l'activité enzymatique. Un niveau optimum doit être maintenu tout au long de la réaction [135], [137], [138]. Dans le cas de CAL-B, l'étude de la courbe d'adsorption d'eau de l'enzyme [139] montre qu'une petite variation de la quantité d'eau dans le milieu provoque une grande variation de l'activité de l'eau. Ce comportement explique la forte sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de l'eau dans le milieu.

Gayot *et al.* (2003), Youn *et al.* (2007) ainsi que Guo *et al.* (2022) ont obtenu des esters de naringine avec des taux de conversion élevés quand l'activité de l'eau est inférieure à 0,11 [75], [140], [129]. Quant à Vaisali *et al.* (2017), le taux de conversion qu'ils ont obtenu en synthétisant des esters de rutine était supérieur à 60% lorsque l'activité de l'eau était 0,07 [131].

Mellou *et al.* (2005) ont observé qu'après l'ajout de tamis moléculaire dans le milieu réactionnel, le taux de conversion augmente passant de 15 - 20% à plus de 30 - 40% après 72 h de réaction [119]. Cependant, certains auteurs ont montré que l'utilisation de tamis moléculaires peut affecter la stabilité et l'activité de l'enzyme [141], [142].

- **Influence de la température**

La température est un facteur important dans les réactions biocatalysées.. Elle affecte la viscosité du milieu, la solubilité des substrats et des produits, l'activation ou la dénaturation de l'enzyme.

Puisque la réaction d'estérification est endothermique, la vitesse de réaction augmente avec l'augmentation de la température. Lee *et al.* (2022) ont démontré que lorsque la température augmente, la viscosité du solvant de réaction diminue de sorte que le transfert de masse entre

l'enzyme et les substrats peut se produire plus facilement. Ainsi, lors de la synthèse d'esters de naringine, les meilleurs taux de conversion du flavonoïde ont été obtenus à des températures comprises entre 40 °C et 60 °C [143]. Des résultats similaires ont été rapportés par Saik *et al.* (2016) lors de la synthèse d'esters de quercétine, ainsi que par Kumar *et al.* (2016) [123], [144]. Li *et al.* (2021), quant à eux, obtiennent un rendement de 76%, à 65 °C, lors de la synthèse d'esters de rutine avec le benzoate de vinyle comme donneur d'acyle, en présence de CAL-B. [145].

La température affecte également la stabilité de l'enzyme. Ainsi, Enaud *et al.* (2004) rapportent que l'activité enzymatique diminue de 30 % après un jour d'incubation à 80 °C, lors de la synthèse d'esters de phloridzine, en présence de CAL-B [146]. Cette désactivation a été attribuée à la dénaturation de l'enzyme et à une probable interaction avec le cinnamate d'éthyle. Les températures très élevées peuvent parfois dénaturer l'enzyme [147].

3.3. Fonctionnalisation des flavonoïdes par voie chimio-enzymatique

Pour améliorer la sélectivité des procédés chimiques précédemment décrits, tout en limitant le nombre d'étapes de synthèse et de purification des dérivés de flavonoïdes, plusieurs auteurs ont opté pour une stratégie chimio-enzymatique. Celle-ci combine des protocoles de la chimie classique et l'emploi de biocatalyseurs. Elle comprend le plus souvent deux étapes : une première acylation chimique du substrat polyfonctionnel est réalisée, puis les différents produits obtenus sont soumis à une hydrolyse enzymatique.

Montenegro *et al.* (2007) ont synthétisé des quercetin-3-O-acyl esters en tant que promédicaments topiques par voie chimio-enzymatique [148]. Gatto *et al.* (2002) ont réussi à synthétiser également des quercetin-3-O-acyl esters antimicrobien par voie chimio-enzymatique en utilisant la lipase de *Mucor miehei* [149]. Des résultats satisfaisants ont été obtenus par Sardone *et al.* (2004) avec la lipase immobilisée de *Mucor miehei* pour synthétiser la quercétine-3-O-palmitate afin d'étudier son interaction avec un modèle de membrane phospholipidique [150]. Trois analogues de la quercétine, la quercétine-3-O-propionate, la quercétine-3-O-butyrate et la quercétine-3-O-valérate présentant une activité antiplaquettaire améliorée ont été synthétisés par Duan *et al.* (2017). Kyriakou *et al.* (2018) ont synthétisé un mono-ester de quercétine en position 3, un di-ester de quercétine en position 3 et 5 et un tri-ester de quercétine en position 3, 5 et 7 par voie chimio-enzymatique en présence de la lipase B de *Candida antarctica* [125] (Schéma).

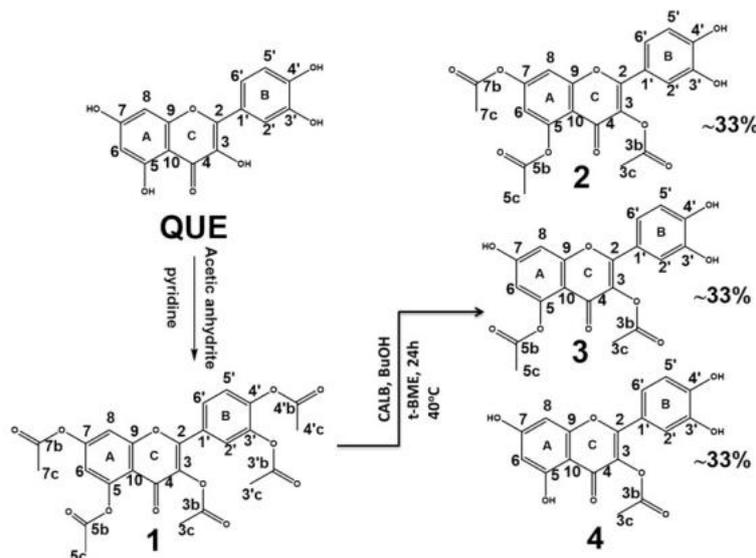


Schéma 9. Synthèse chimio-enzymatique d'esters de quercétine (Kyriakou *et al.* 2018)

Les procédés de synthèse chimio-enzymatique se révèlent donc plus sélectifs que les procédés chimiques. Toutefois, la démarche peut se révéler parfois laborieuse en raison du nombre d'étapes de synthèse et de purification nécessaires.

4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

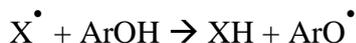
Les antioxydants naturels agissent pour piéger les espèces réactives contenant de l'oxygène afin de limiter les dommages qu'ils peuvent causer aux phospholipides membranaires, aux protéines et aux acides nucléiques. De nombreux flavonoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres comme d'autres dérivés phénoliques comme la vitamine E. Cette activité anti-radicalaire peut être évaluée par la radiolyse pulsée qui capte les radicaux colorés comme le DPPH ou l'ABTS par des études spectroscopiques [151].

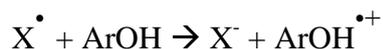
4.1. Mécanismes d'action

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

4.1.1. 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 :





Un radical aryloxy se forme et il est stabilisé par résonance. L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique, mais peut également continuer à évoluer selon plusieurs processus, comme par exemple la dimérisation, la dismutation, la recombinaison avec d'autres radicaux, soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules. Il existe une corrélation entre l'activité antiradicalaire et le potentiel d'oxydation des flavonoïdes [152].

4.1.2. Chelation des ions métalliques

La capacité antioxydante des flavonoïdes peut être exercée par la complexation des métaux de transition. En effet, ce dernier accélère la formation d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, la complexation des flavonoïdes avec des métaux de transition peut améliorer leur capacité antioxydante en réduisant leur potentiel d'oxydation. [153], [154].

4.1.3. Inhibition d'enzymes

Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de nombreuses enzymes dont certaines sont impliquées dans le stress oxydant : la glutathion S-transférase, les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la xanthine oxydase, et les oxyde nitrique synthétases (NOS). Certains flavonoïdes inhibent les kinases. C'est le cas par exemple de la quercétine et la myricétine qui inhibent la phosphoinositide 3-kinase, protéine intervenant dans la signalisation cellulaire. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavonoïde et l'enzyme étudiés [155]–[157].

4.2. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relations structure-activités (RSA) dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que les activités des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs [87], [158]–[162].

Ces éléments sont :

- La présence d'un groupement catéchol sur le cycle B

La configuration des hydroxyles au niveau du noyau B est le paramètre structural le plus déterminant pour l'activité antioxydante. Ces hydroxyles sont des donneurs d'hydrogène et d'électrons vis-à-vis des radicaux hydroxyles, peroxydes et peroxy-nitrite, conduisant à des espèces radicalaires beaucoup plus stables. La présence d'une fonction catéchol (motif orthodiphénol) sur le cycle B est étroitement corrélée à une activité antioxydante importante du fait de la stabilisation du radical phénoxy généré lors du piégeage par la fonction phénolique située en ortho.

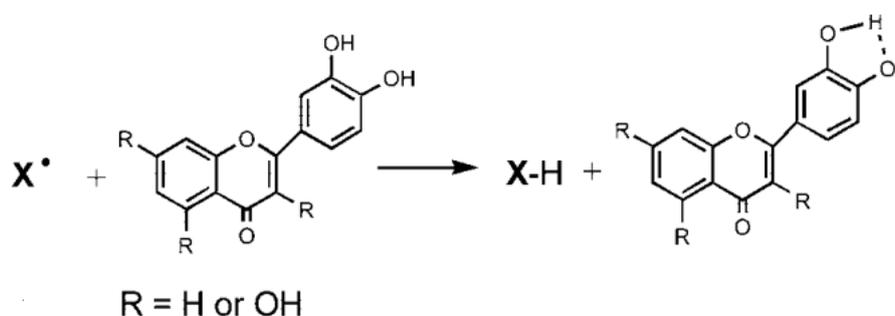


Figure 26. Rôle du groupement catéchol dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Musialik *et al.*, 2009)

- La présence d'un groupement hydroxyle en position 3

L'hétérocycle C des flavonoïdes contribue à leur activité antioxydante lorsqu'elle comporte un groupement hydroxyle en position 3. La capacité de ces molécules à piéger les radicaux dépend fortement de la présence de ce 3-OH libre. Dans le cas des flavonols, la glycosylation ou la méthylation de ce groupement conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante [163]–[165]. La présence d'un groupement hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'activité antioxydante dans le cas des isoflavones [166].

5. La modélisation moléculaire appliquée à la fonctionnalisation et aux relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes aux flavonoïdes

Pour corrélérer d'une manière plus précise les données expérimentales d'activité avec les structures moléculaires et quantifier ces relations, des études théoriques ont été menées par modélisation moléculaire. En effet, la modélisation moléculaire des flavonoïdes donne accès à de nombreuses propriétés moléculaires, notamment :

- les paramètres structuraux de la molécule comme les angles de valence, les angles de torsion, les longueurs de liaison et les liaisons hydrogènes,
- les paramètres énergétiques comme l'enthalpie de formation,
- les paramètres électroniques comme les charges, les densités de spin, les énergies et délocalisation des orbitales (HOMO, LUMO)
- les paramètres hydrophobiques comme le log P.

De nombreuses études ont été menées dans l'objectif de corréler et d'expliquer ces propriétés moléculaires d'ordre électronique, stérique, énergétique avec des activités ou des effets biologiques ou physico-chimiques observés lors d'expériences ; l'enjeu de ces travaux consiste à identifier les éléments structuraux déterminant l'activité ou la propriété étudiée. L'activité antioxydante des flavonoïdes et leurs dérivés ont été particulièrement étudiés

Il est connu l'activité antioxydante est plus importante lorsque la molécule possédait une fonction catéchol, une double liaison entre C2-C3 dans le cycle C. Ces éléments structuraux pourront probablement conduire en la formation d'un radical stable en raison de nombreux groupes phénoliques et d'une délocalisation électronique étendue.

Une molécule antioxydante peut effectuer son rôle soit par un mécanisme de transfert de proton, où il a une abstraction d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant par un radical libre, soit par un mécanisme de transfert mono-électronique [167].

Le mécanisme par transfert de proton est efficace lorsque le radical phénoxy formé est stable. L'efficacité de la molécule antioxydante dépend donc de la stabilité du radical phénoxy, qui elle-même dépend des effets de conjugaison et de résonance et du nombre de liaisons hydrogène. L'enthalpie de dissociation de liaison (BDE) de la liaison O-H est un paramètre important pour évaluer l'activité antioxydante. En effet, plus cette liaison est faible, plus la réaction avec le radical libre sera facilitée.

Le deuxième mécanisme est le transfert mono-électronique des antioxydants aux radicaux libres, qui va conduire à la formation de radicaux libres cationiques. Cette réaction n'est en fait que la première étape d'une série d'équilibres acido-basiques et de transferts d'électrons. Dans ce contexte, un paramètre énergétique important pour évaluer l'activité anti-radicalaire est le potentiel d'ionisation (PI).

Donc les paramètres les plus étudiés sont la stabilité du radical, les enthalpies de formation des radicaux par rapport à la molécule parents et le potentiel d'ionisation.

Des études concernant la stabilité des radicaux aryloxy qui sont générés par l'arrachement d'un atome d'hydrogène des groupement hydroxyle phénolique et la stabilité du radical cationique formé par l'abstraction d'un électron de la HOMO et les enthalpies de dissociation de liaison O-H et du potentiel d'ionisation ont été porté sur les flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine et la catéchine, par modélisation moléculaire en utilisant la mécanique quantique

De plus, des études ont relié l'activité antiradicalaire des flavonoïdes aux enthalpies de dissociation des OH phénoliques. En revanche, aucune corrélation n'a été démontrée entre le potentiel d'ionisation des structures étudiées et les données expérimentales d'activité antiradicalaire. Il paraît donc que même en milieu aqueux, le mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène est la voie qui a le plus de poids dans l'activité antioxydante des flavonoïdes [169]–[174].

6. Propriétés d'auto-assemblage

6.1. Les tensioactifs

D'une façon générale, les composés polaires se solubilisent préférentiellement dans des solvants polaires et sont qualifiés d' "hydrophiles" tandis que les dérivés apolaires ont une affinité supérieure pour les solvants apolaires et sont appelés "composés lipophiles ou hydrophobes" [175]. Ce comportement est favorisé par la réduction d'énergie accompagnant le système et rend ainsi l'interaction solvant-soluté maximum. Un tensioactif ou agent de surface est un composé qui a tendance à s'agréger à l'interface, plutôt que dans le volume de la solution, lorsqu'il est mélangé à un solvant polaire ou apolaire. Cette propriété tient au fait que les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile et apolaire, l'autre hydrophile et polaire.

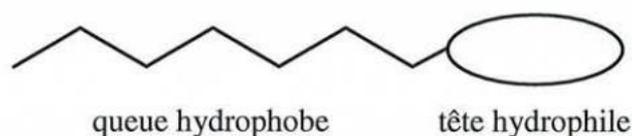


Figure 27. Représentation schématique d'un tensioactif

La tête polaire peut être de différentes natures (acides aminés, motifs pseudo-peptidiques, mono-, di-, polysaccharides, ionique ou non ionique, etc.). La partie hydrophobe est

généralement une longue chaîne hydrocarbonée ou un lipide [176]–[178], mais elle peut aussi être fluorocarbonée ou siliconée.

Cette dualité de structure est à l'origine de leur activité de surface, de leur micellisation et de leurs capacités de solubilisation qui rendent possibles leurs multiples applications (détergence, étalement, émulsification, dispersion, agent de moussage...) En effet, en présence d'eau et d'huile (le terme huile est utilisé pour désigner une phase non polaire de type hydrocarbure), les agents de surface s'adsorbent, en premier lieu, à l'interface avec une orientation telle que la partie polaire soit dirigée vers l'eau et la partie lipophile, vers l'huile. Cette disposition forme un film superficiel dont les caractéristiques mécaniques sont liées à la constitution du produit considéré et qui permet d'abaisser la tension interfaciale. Au-delà d'une certaine concentration appelée "concentration micellaire critique" ou CMC, des agrégats, qui sont le plus souvent des micelles, se forment. Dans l'eau, les micelles sont dites "directes" lorsque, au niveau de l'assemblage de tensioactifs, les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur au contact de l'eau et les chaînes hydrophobes sont rassemblées au cœur de la micelle. A l'inverse, dans une huile, des assemblages de micelles dites "inverses" se forment, avec les têtes polaires dirigées cette fois vers le cœur de la micelle et les chaînes baignant dans l'huile.

Pour la plupart des agents de surface, les propriétés n'atteignent leur valeur maximale qu'à partir de cette concentration et la connaissance de cette dernière permet d'assurer une utilisation correcte des produits. La Figure 2 illustre la cassure observée au niveau de la CMC dans l'évolution de certaines propriétés physiques.

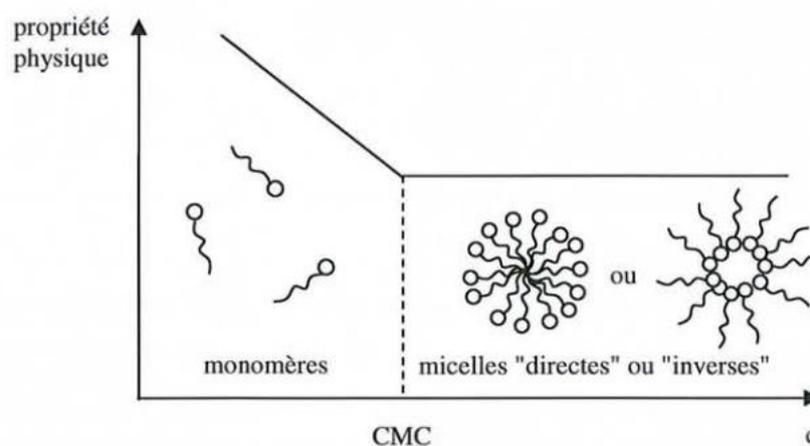


Figure 28. Evolution de certaines propriétés physiques en fonction de la concentration en tensioactif

Le degré d'activité des composés tensioactifs dépend à la fois de la partie polaire et de la partie apolaire, et en 1954, Griffin a proposé la notion de Balance Hydrophile Lipophile (HLB) pour caractériser les tensioactifs non ioniques à tête polaire éthylène glycol. La HLB varie de 0 à 20 ; 0 étant attribué à un produit totalement hydrophobe et 20 à un produit totalement hydrophile. Dans le cas des composés non ioniques, il est possible de calculer la HLB d'après la formule suivante :

$$\text{HLB} = \frac{\text{masse moléculaire de la partie hydrophile}}{\text{masse moléculaire totale}} \times 20$$

La HLB est une caractéristique des tensioactifs. Elle est étroitement liée à la structure de leur molécule. Elle est censée représenter l'équilibre hydrophile-lipophile et, en particulier, le pouvoir émulsionnant d'un tensioactif. Cependant, les propriétés des composés tensioactifs ne dépendent pas uniquement de la HLB. À HLB équivalente, deux composés peuvent présenter des comportements sensiblement différents. Par ailleurs, la HLB varie en fonction du système (solvants, mélange de tensioactifs, etc.).

6.2. La classification des tensioactifs

Les amphiphiles sont classés en fonction de la nature de leur tête hydrophile ou bien de leur chaîne hydrophobe.

6.2.1. Classification basée sur la nature de la tête hydrophile

C'est le classement le plus couramment utilisé et l'on y distingue quatre grandes classes selon la nature de leur groupe hydrophile: les dérivés anioniques, cationiques, amphotères et non ioniques.

- **Les agents de surfaces anioniques**

Ce sont les premiers à avoir été synthétisés et les plus utilisés dans le monde. Ce sont des molécules qui donnent des anions organiques dans l'eau (un groupement acide déprotoné qui peut être carboxylate, sulfate, sulfonate ...) associés à des cations (généralement un métal alcalin). Ils constituent de très bons agents moussants et détergents. De très nombreux savons sont des dérivés anioniques, les exemples les plus répandus étant les carboxylates dérivant de produits naturels comme la noix de coco, l'huile de palme ou d'amande. Les sulfonates constituent à eux seuls, plus de la moitié de la production en tensioactifs anioniques en raison

de leur utilisation dans le domaine de la détergence. On trouve principalement des alkylbenzènesulfonates et des lignosulfonates. Ces agents de surface sont aussi d'excellents dispersants utilisés dans les boues de forage ainsi que dans le secteur du bâtiment et des travaux publics. D'autre part, les tensioactifs anioniques sont les ingrédients de base des produits d'hygiène et des cosmétiques [179]–[183].

- **Les agents de surface cationiques**

Ces tensioactifs portent une charge positive sur la partie polaire, le plus souvent un ammonium. Ils sont plus chers car les réactifs et la mise en œuvre des procédés sont d'un coût plus élevé. Cela a freiné leur développement malgré des synthèses qui remontent au tout début du 20^{ème} siècle. Mais la découverte de leurs propriétés bactériostatiques les a rendus plus importants et désormais, leur domaine d'application s'est élargi, ils sont employés comme agents antistatiques, adoucissants, antimousses... [184], [185].

- **Les agents de surface amphotères**

Ces tensioactifs portent à la fois une charge positive et une charge négative, ce sont donc des molécules zwitterioniques, Ils sont analogues aux phospholipides naturels et constituent une famille de produits peu irritants et peu agressifs sur le plan biologique [186], [187].

- **Les agents de surface non ioniques**

Les tensioactifs non ioniques ne donnent pas d'ions dans l'eau, leur solubilité est due à la présence de groupements polaires. Ces tensioactifs sont compatibles avec les trois autres groupes et de ce fait sont souvent utilisés avec d'autres amphiphiles dans des formulations à usages spécifiques. La partie hydrophobe est greffée à la tête hydrophile par des liaisons de type éther, ester, amide... La tête polaire est constituée soit par des ponts oxygène, soit par des groupements hydroxyles. Le premier cas est celui des dérivés de l'oxyde d'éthylène, quant au second, il concerne les produits de condensation sur des polyols (glycérol, polyglycérol, sucres et leurs dérivés) [188]–[193].

6.2.2. Classification basée sur la nature de la chaîne hydrophobe

La partie hydrophobe d'un tensioactif est souvent constituée d'une chaîne hydrocarbonée, mais cette chaîne peut également être siliconée ou fluorocarbonée, ce qui permet de classer les tensioactifs également selon ces critères.

- **Les tensioactifs hydrocarbonés**

La partie hydrophobe peut se composer d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, linéaires ou ramifiées, ou encore condensées sur un cycle aromatique. Pour qu'une molécule possède des propriétés tensioactives marquées, il est nécessaire que sa partie hydrophobe soit assez importante, c'est à dire que la chaîne carbonée soit suffisamment longue mais cette longueur est aussi limitée par le pouvoir solubilisant des groupements hydrophiles. De ce fait, la chaîne carbonée d'un tensioactif a, en général, un nombre de carbones compris entre 6 et 18 (dans le cas de chaînes saturées). Toutes ces chaînes hydrophobes peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.

- **Les tensioactifs siliconés**

Les agents de surface "silicones" sont en général des copolymères de polysiloxane et une ou plusieurs chaînes polymères d'oxyalkylène. Les atomes de silicium apportent une hydrophobie supplémentaire par rapport aux composés hydrocarbonés. Ces tensioactifs "silicone" sont très intéressants pour l'obtention de mousse, ce qui donne des isolants de bonne densité [194], [195].

- **Les tensioactifs fluorocarbonés**

Les tensioactifs fluorocarbonés sont constitués d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe formée d'une chaîne perfluorocarbonée terminée par un groupement CF₃. L'hydrophobie des composés fluorés est plus importante. En effet, pour qu'un produit soit tensioactif, sa chaîne fluorée doit comporter au minimum quatre carbones contre un minimum de six carbones dans le cas d'un hydrogéné. Ces dérivés sont également doués de propriétés lipophobes vis-à-vis des solvants carbonés et des huiles, ce qui leur confère des propriétés très particulières.

- **Les tensioactifs hybrides**

Le terme de "tensioactif hybride" désigne des molécules amphiphiles qui comportent deux groupes hydrophobes de nature différente. L'un peut être, par exemple, une chaîne hydrocarbonée et l'autre, une chaîne perfluorocarbonée.

Théoriquement, dans un mélange contenant un tensioactif fluoré et un tensioactif hydrogéné approprié, le rôle du tensioactif fluoré est de réduire la tension superficielle tandis que celui du partenaire hydrogéné est de diminuer la tension inter-faciale. Le résultat obtenu peut être

un système mouillant, qui s'étale facilement sur des surfaces habituellement difficiles à mouiller. Mais, il n'est pas toujours réalisable d'effectuer ce mélange. En effet, pour des tensioactifs ioniques possédant la même charge au niveau de la tête polaire, l'avantage de cette association est limité à cause de la démixtion entre le tensioactif fluoré et l'hydrogéné. La solution pour remédier à ce problème est de synthétiser des tensioactifs hybrides. Cet exemple montre l'intérêt, d'une part, d'associer une chaîne fluorée et une chaîne hydrogénée, mais également celui de pouvoir les associer à une même tête polaire.

6.3. Propriétés et applications des tensioactifs

Les propriétés des tensioactifs, et donc leurs applications potentielles, sont dépendantes de leur structure. Cependant, il est difficile d'établir une relation directe entre la structure des composés et leurs propriétés. De nombreux paramètres entrent en jeu, ce qui rend la prédiction des propriétés complexe.

6.3.1. Le pouvoir solubilisant

Les solutions d'agents de surface, au-delà de leur CMC, ont la propriété d'augmenter la solubilité apparente des composés pas ou peu solubles dans l'eau, soit en incluant dans la micelle des molécules de produits, soit en formant des micelles mixtes avec le produit à solubiliser. Ce phénomène est mis à profit, par exemple, dans la teinture des fibres polyester ou pour la polymérisation en émulsion [196], [197].

6.3.2. Le pouvoir moussant

Il est lié aux caractéristiques mécaniques des films superficiels qui constituent les parois des bulles de la mousse. Certains tensioactifs ont la capacité de former rapidement des couches interfaciales et superficielles, assez résistantes pour ne pas céder à la pression interne de l'air emprisonné et à la pression externe des molécules d'eau mais également assez élastiques pour encaisser tous les petits chocs mécaniques au cours de leur déplacement sans éclater. Cette propriété est mise à profit principalement dans les shampooings, les produits douche et les boues de forage [198].

6.3.3. Le pouvoir antimousse

A l'opposé, les antimousses sont des produits susceptibles de se rassembler aux interfaces et de désorganiser les films superficiels en faisant chuter leurs propriétés mécaniques [199].

6.3.4. Le pouvoir émulsionnant

Il permet de disperser et de maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible. Les applications des émulsions sont très nombreuses, notamment en cosmétique, car elles permettent de présenter des principes actifs le plus souvent présents dans les corps gras sous des formes directement utilisables car dispersées dans suffisamment d'eau [200], [201].

6.3.5. Le pouvoir mouillant

Il favorise l'étalement d'un liquide sur une surface lisse et augmente la vitesse de pénétration dans les substances poreuses. Cette propriété est mise à profit quand une solution traitante doit agir sur une surface lisse (lavage des sols, traitement phytosanitaire des feuilles, ...) ou lorsque des corps poreux doivent être traités par une solution aqueuse (teinture et blanchiment des textiles...) [202].

6.3.6. Le pouvoir dispersant

Il augmente la stabilité des suspensions de petites particules solides dans un liquide en évitant leur agrégation. Cette caractéristique est utilisée pour des dispersions de boues de forage, de pigments dans les peintures,

6.3.7. Le pouvoir détergent

Il permet, aux agents de surface, de détacher d'un support les produits qui le souillent et de les maintenir en dispersion. Il résulte principalement de la conjugaison des pouvoirs mouillant, émulsionnant et dispersant.

7. Références

- [1] J. B. Saha Tchinda *et al.*, “Inhibition of fungi with wood extractives and natural durability of five Cameroonian wood species,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 123, pp. 183–191, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.INDCROP.2018.06.078.
- [2] S. R. Chandrasekaran, P. K. Hopke, L. Rector, G. Allen, and L. Lin, “Chemical composition of wood chips and wood pellets,” *Energy and Fuels*, vol. 26, no. 8, pp. 4932–4937, Aug. 2012, doi: 10.1021/EF300884K/SUPPL_FILE/EF300884K_SI_001.PDF.
- [3] Y. Ren, B. R. Linter, and T. J. Foster, “Cellulose fibrillation and interaction with psyllium seed husk heteroxylan,” *Food Hydrocoll.*, vol. 104, p. 105725, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2020.105725.
- [4] T. Conners, “UKnowledge Agriculture and Natural Resources Publications Cooperative Extension Service Introduction to Wood Structure and Characteristics,” 2015, Accessed: Jan. 05, 2022. [Online]. Available: https://uknowledge.uky.edu/anr_reports.
- [5] W. Farhat *et al.*, “Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 107, pp. 370–377, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.INDCROP.2017.05.055.
- [6] D. M. Alonso, S. G. Wettstein, and J. A. Dumesic, “Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 24, pp. 8075–8098, Nov. 2012, doi: 10.1039/C2CS35188A.
- [7] A. Saniewska and M. Saniewski, “The inhibitory effect of tropolone and hinokitiol on the mycelium growth of *Phoma narcissi* in vitro,” *Acta Agrobot.*, vol. 60, no. 1, pp. 107–112, 2012, doi: 10.5586/AA.2007.013.
- [8] T. Nuutinen, “Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 157, pp. 198–228, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.EJMECH.2018.07.076.
- [9] S. H. Sharma, S. Thulasingham, and S. Nagarajan, “Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives,” *Eur. J. Pharmacol.*,

vol. 795, pp. 169–178, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.EJP HAR.2016.12.008.

- [10] G. I. K. Marei, M. A. Abdel Rasoul, and S. A. M. Abdelgaleil, “Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 103, no. 1, pp. 56–61, May 2012, doi: 10.1016/J.PESTBP.2012.03.004.
- [11] R. Garcia *et al.*, “Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 39, no. 1, p. 163, Jan. 2008, doi: 10.1590/S1517-838220080001000032.
- [12] D. B. Turley, Q. Chaudhry, R. W. Watkins, J. H. Clark, and F. E. I. Deswarte, “Chemical products from temperate forest tree species—Developing strategies for exploitation,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 24, no. 3, pp. 238–243, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.INDCROP.2006.06.016.
- [13] L. Zhang, Z. Ma, R. Wang, and M. Zhu, “Synthesis and characterization of methacrylate-functionalized betulin derivatives as antibacterial comonomer for dental restorative resins,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, no. 7, pp. 3132–3140, Jul. 2021, doi: 10.1021/ACSBIMATERIALS.1C00563/SUPPL_FILE/AB1C00563_SI_001.PDF.
- [14] R. Naima *et al.*, “Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 70, pp. 245–252, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.INDCROP.2015.03.016.
- [15] R. Kumar and S. Vaithyanathan, “Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 30, no. 1–2, pp. 21–38, 1990, doi: 10.1016/0377-8401(90)90049-E.
- [16] I. Mueller-Harvey, R. D. Hartley, and J. D. Reed, “Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten ethiopian browse species by high performance liquid chromatography,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–14, 1987, doi: 10.1002/JSFA.2740390102.
- [17] E. C. Bate-Smith, “Astringent tannins of *Acer* species,” *Phytochemistry*, vol. 16, no. 9, pp. 1421–1426, 1977, doi: 10.1016/S0031-9422(00)88795-6.

- [18] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, A. Rooney, J. M. Hernández-Hierro, H. J. Byrne, and F. J. Heredia, “Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy,” *Food Chem.*, vol. 232, pp. 602–609, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.049.
- [19] R. Amarowicz, “Tannins: the new natural antioxidants?,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 109, no. 6, pp. 549–551, Jun. 2007, doi: 10.1002/EJLT.200700145.
- [20] C. Delgado-Sánchez, F. Santiago-Medina, V. Fierro, A. Pizzi, and A. Celzard, “Optimisation of ‘green’ tannin-furanic foams for thermal insulation by experimental design,” *Mater. Des.*, vol. 139, pp. 7–15, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.MATDES.2017.10.064.
- [21] T. J. Schmidt, M. Klaes, and J. Sendker, “Lignans in seeds of *Linum* species,” *Phytochemistry*, vol. 82, pp. 89–99, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2012.07.004.
- [22] K. Vander Mijnsbrugge, H. Beeckman, R. De Rycke, M. Van Montagu, G. Engler, and W. Boerjan, “Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells,” *Planta* 2000 2114, vol. 211, no. 4, pp. 502–509, 2000, doi: 10.1007/S004250000326.
- [23] M. A. Bari, G. Baumbach, B. Kuch, and G. Scheffknecht, “Wood smoke as a source of particle-phase organic compounds in residential areas,” *Atmos. Environ.*, vol. 43, no. 31, pp. 4722–4732, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.ATMOSENV.2008.09.006.
- [24] J. B. Harborne and C. A. Williams, “Advances in flavonoid research since 1992,” *Phytochemistry*, vol. 55, no. 6, pp. 481–504, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- [25] A. Hässig, W. X. Linag, H. Schwabl, and K. Stampfli, “Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character,” *Med. Hypotheses*, vol. 52, no. 5, pp. 479–481, May 1999, doi: 10.1054/MEHY.1997.0686.
- [26] C. W. Huck, M. R. Buchmeiser, and G. K. Bonn, “Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 943, no. 1, pp. 33–38, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0021-

9673(01)01428-5.

- [27] M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, and B. van de Putte, "Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 8, pp. 1242–1246, 1993, doi: 10.1021/JF00032A015/ASSET/JF00032A015.FP.PNG_V03.
- [28] S. A. Aherne and N. M. O'Brien, "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.*, vol. 29, no. 6, pp. 507–514, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00360-9.
- [29] H. Zhang and R. Tsao, "Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects," *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 8, pp. 33–42, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.COFS.2016.02.002.
- [30] R. F. M. Silva and L. Pogačnik, "Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety," *Antioxidants 2020, Vol. 9, Page 61*, vol. 9, no. 1, p. 61, Jan. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9010061.
- [31] P. L. Strissel and R. Strick, "Multiple effects of Bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: Natural compounds move into the lime light of cancer research," *Leuk. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 859–861, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.LEUKRES.2005.01.022.
- [32] M. K. Patil, V. H. Masand, and A. K. Maldhure, "Schiff Base Metal Complexes Precursor for Metal Oxide Nanomaterials: A Review," *Curr. Nanosci.*, vol. 17, no. 4, pp. 634–645, Nov. 2020, doi: 10.2174/1573413716999201127112204.
- [33] I. Erlund, "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology," *Nutr. Res.*, vol. 24, no. 10, pp. 851–874, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.nutres.2004.07.005.
- [34] S. De Pascual-Teresa, D. A. Moreno, and C. García-Viguera, "Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, p. 11, 2010, doi: 10.3390/ijms11041679.
- [35] J. A. Vinson, X. Su, L. Zubik, and P. Bose, "Phenol antioxidant quantity and quality in

- foods: Fruits,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5315–5321, 2001, doi: 10.1021/JF0009293.
- [36] D. Rein *et al.*, “Cocoa inhibits platelet activation and function,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 1, pp. 30–35, 2000, doi: 10.1093/AJCN/72.1.30.
- [37] K. J. Murphy *et al.*, “Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 77, no. 6, pp. 1466–1473, 2003, doi: 10.1093/AJCN/77.6.1466.
- [38] P. Liczbiński and B. Bukowska, “Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 175, p. 114265, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.INDCROP.2021.114265.
- [39] A. G. Dulloo *et al.*, “Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 70, no. 6, pp. 1040–1045, 1999, doi: 10.1093/AJCN/70.6.1040.
- [40] P. A. N. Punyasiri *et al.*, “Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways q,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 431, pp. 22–30, 2004, doi: 10.1016/j.abb.2004.08.003.
- [41] J. Wang, Q. Wei, and X. Wan, “Does Tea Drinking Promote Health of Older Adults: Evidence from the China Health and Nutrition Survey,” *J. Prev. Alzheimer’s Dis. 2020*, vol. 8, no. 2, pp. 194–198, Nov. 2020, doi: 10.14283/JPAD.2020.67.
- [42] Y. I. Kwon, E. Apostolidis, and K. Shetty, “INHIBITORY POTENTIAL OF WINE AND TEA AGAINST α -AMYLASE AND α -GLUCOSIDASE FOR MANAGEMENT OF HYPERGLYCEMIA LINKED TO TYPE 2 DIABETES,” *J. Food Biochem.*, vol. 32, no. 1, pp. 15–31, Feb. 2008, doi: 10.1111/J.1745-4514.2007.00165.X.
- [43] Q. Zhao, D. Hou, Y. Laraib, Y. Xue, and Q. Shen, “Comparison of the effects of raw and cooked adzuki bean on glucose/lipid metabolism and liver function in diabetic mice,” *Cereal Chem.*, vol. 98, no. 5, pp. 1081–1090, Sep. 2021, doi: 10.1002/CCHE.10456.
- [44] D. Barreca *et al.*, “Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties,” *BioFactors*, vol. 43, no. 4, pp. 495–506, Jul. 2017, doi:

10.1002/BIOF.1363.

- [45] X. Niu *et al.*, “Naringenin is an inhibitor of T cell effector functions,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 58, pp. 71–79, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2018.04.008.
- [46] M. Inês Amaro *et al.*, “Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 8, pp. 1010–1017, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.FOODRES.2009.04.016.
- [47] K. Gao *et al.*, “The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 2, pp. 89–95, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2005.05.009.
- [48] A. Chanet, D. Milenkovic, C. Manach, A. Mazur, and C. Morand, “Citrus flavanones: What is their role in cardiovascular protection?,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 36, pp. 8809–8822, Sep. 2012, doi: 10.1021/JF300669S.
- [49] D. Barreca *et al.*, “Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 117, pp. 194–204, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.TIFS.2021.03.030.
- [50] A. Y. Chen and Y. C. Chen, “A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 4, pp. 2099–2107, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.139.
- [51] Y. Li and Y. Ding, “Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 1, no. 1, pp. 19–25, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.FSHW.2012.08.002.
- [52] H. D. Woo and J. Kim, “Dietary Flavonoid Intake and Smoking-Related Cancer Risk: A Meta-Analysis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0075604.
- [53] A. Kowalczyk, A. Bodalska, M. Miranowicz, and K. Karłowicz-Bodalska, “Insights into novel anticancer applications for apigenin,” *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 26, no. 7, pp. 1143–1146, Oct. 2017, doi: 10.17219/ACEM/41978.
- [54] M. Horinaka, T. Yoshida, T. Shiraishi, S. Nakata, M. Wakada, and T. Sakai, “The

- dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 4, pp. 945–951, Apr. 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0431.
- [55] G. GALATI, “Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties,” *Free Radic. Biol. Med.*, May 2004, doi: 10.1016/S0891-5849(04)00380-6.
- [56] T. Lapidot, M. D. Walker, and J. Kanner, “Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells in vitro,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 25, pp. 7220–7225, Dec. 2002, doi: 10.1021/JF020615A.
- [57] M. Imran *et al.*, “Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 112, p. 108612, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2019.108612.
- [58] T. Clavel *et al.*, “Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women,” *J. Nutr.*, vol. 135, no. 12, pp. 2786–2792, 2005, doi: 10.1093/JN/135.12.2786.
- [59] B. Liu *et al.*, “Prevalence of the equol-producer phenotype and its relationship with dietary isoflavone and serum lipids in healthy Chinese adults,” *J. Epidemiol.*, vol. 20, no. 5, pp. 377–384, 2010, doi: 10.2188/JEA.JE20090185.
- [60] J. Koo, S. Cabarcas-Petroski, J. L. Petrie, N. Diette, R. J. White, and L. Schramm, “Induction of proto-oncogene BRF2 in breast cancer cells by the dietary soybean isoflavone daidzein,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, Nov. 2015, doi: 10.1186/S12885-015-1914-5/FIGURES/7.
- [61] S. Levis, N. Strickman-Stein, D. R. Doerge, and J. Krischer, “Design and baseline characteristics of the Soy Phytoestrogens As Replacement Estrogen (SPARE) study - A clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women,” *Contemp. Clin. Trials*, vol. 31, no. 4, pp. 293–302, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.CCT.2010.03.007.
- [62] N. Morabito *et al.*, “Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double-blind placebo-controlled study,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 17, no. 10, pp. 1904–1912, Oct. 2002, doi: 10.1359/JBMR.2002.17.10.1904.

- [63] S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, and J. G. Rivas-Gonzalo, "Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 11, pp. 5331–5337, 2000, doi: 10.1021/JF000549H.
- [64] J. Luo, Z. Fan, X. Yang, Y. H. Bao, M. Liang, and Y. Guo, "Anthocyanins and antioxidant activity of *Lonicera caerulea* berry wine during different processes," *Food Sci. Technol.*, vol. 42, Sep. 2021, doi: 10.1590/FST.25121.
- [65] M. Garcia-Alonso, A. M. Minihane, G. Rimbach, J. C. Rivas-Gonzalo, and S. de Pascual-Teresa, "Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, no. 7, pp. 521–529, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2008.05.011.
- [66] M. Xia *et al.*, "Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 3, pp. 519–524, Mar. 2007, doi: 10.1161/01.ATV.0000254672.04573.2D.
- [67] N. Koirala, N. H. Thuan, G. P. Ghimire, D. Van Thang, and J. K. Sohng, "Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 86, pp. 103–116, May 2016, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2016.02.003.
- [68] L. L. Chu, R. P. Pandey, N. Jung, H. J. Jung, E. H. Kim, and J. K. Sohng, "Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: Biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, Aug. 2016, doi: 10.1186/S12934-016-0533-4.
- [69] S. Yuan, Y. Yang, and J. Q. Kong, "Biosynthesis of 7,8-dihydroxyflavone glycosides via OcUGT1-catalyzed glycosylation and transglycosylation," *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 662–674, Jun. 2018, doi: 10.1080/10286020.2018.1481053.
- [70] R. P. Pandey, P. Parajuli, A. R. Pokhrel, and J. K. Sohng, "Biosynthesis of novel 7,8-dihydroxyflavone glycoside derivatives and in silico study of their effects on BACE1 inhibition," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 65, no. 2, pp. 128–137, Mar. 2018, doi: 10.1002/BAB.1570.

- [71] Z. Xia *et al.*, “Fire resistant polyphenols based on chemical modification of bio-derived tannic acid,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 153, pp. 227–243, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2018.04.020.
- [72] K. Hashida, R. Makino, and S. Ohara, “Amination of pyrogallol nucleus of condensed tannins and related polyphenols by ammonia water treatment,” *Holzforschung*, vol. 63, no. 3, pp. 319–326, May 2009, doi: 10.1515/HF.2009.043/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [73] G. Céliz, R. Díaz, and M. Daz, “Obtaining hesperetin 7-O-glucosyl 6''-O-laurate, a high lipophilic flavonoid ester, from Citrus waste,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 13, pp. 25–30, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.BCAB.2017.10.015.
- [74] B. Olas *et al.*, “Comparative chemical composition, antioxidant and anticoagulant properties of phenolic fraction (a rich in non-acylated and acylated flavonoids and non-polar compounds) and non-polar fraction from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson fruits,” *Food Chem.*, vol. 247, pp. 39–45, May 2018, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.010.
- [75] S. Gayot, X. Santarelli, and D. Coulon, “Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content,” *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 1, pp. 29–36, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0168-1656(02)00286-9.
- [76] Y. Zhong and F. Shahidi, “Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 12, pp. 6526–6533, Jun. 2011, doi: 10.1021/JF201050J.
- [77] A. Kumagai *et al.*, “Tumor chemopreventive activity of 3-O-acylated (-)-epigallocatechins,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 11, no. 23, pp. 5143–5148, Nov. 2003, doi: 10.1016/J.BMC.2003.08.016.
- [78] S. Uesato *et al.*, “Inhibitory effects of 3-O-acyl-(+)-catechins on Epstein-Barr virus activation,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 51, no. 12, pp. 1448–1450, Dec. 2003, doi: 10.1248/CPB.51.1448.
- [79] S. F. Lin *et al.*, “Synthesis and structure-activity relationship of 3-O-acylated (-)-epigallocatechins as 5 α -reductase inhibitors,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 12, pp. 6068–6076, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.EJMECH.2010.10.011.

- [80] C. Cren-Olivé, S. Lebrun, and C. Rolando, "An efficient synthesis of the four mono methylated isomers of (+)-catechin including the major metabolites and of some dimethylated and trimethylated analogues through selective protection of the catechol ring," *J. Chem. Soc. Perkin 1*, vol. 2, no. 6, pp. 821–830, Mar. 2002, doi: 10.1039/B107340K.
- [81] M. Bouktaib, S. Lebrun, A. Atmani, and C. Rolando, "Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 50, pp. 10001–10009, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0040-4020(02)01306-6.
- [82] K. Matsubara *et al.*, "Epicatechin conjugated with fatty acid is a potent inhibitor of DNA polymerase and angiogenesis," *Life Sci.*, vol. 80, no. 17, pp. 1578–1585, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.LFS.2007.01.049.
- [83] J. L. Donovan, D. L. Luthria, P. Stremple, and A. L. Waterhouse, "Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs. A comparison of sensitive methods," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 726, no. 1–2, pp. 277–283, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00019-5.
- [84] T. Tsushida and M. Suzuki, "Isolation of flavonoid-glycosides in onion and identification by chemical synthesis of the glycosides," *J. Japanese Soc. Food Sci. Eng.*, vol. 42, no. 2, pp. 100–108, Feb. 1995, doi: 10.3136/NSKKK.42.100.
- [85] D. J. L. Jones, R. Jukes-Jones, R. D. Verschoyle, P. B. Farmer, and A. Gescher, "A synthetic approach to the generation of quercetin sulfates and the detection of quercetin 3'-O-sulfate as a urinary metabolite in the rat," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 13, no. 24, pp. 6727–6731, Dec. 2005, doi: 10.1016/J.BMC.2005.07.021.
- [86] K. D. Park and S. J. Cho, "Synthesis and antimicrobial activities of 3-O-alkyl analogues of (+)-catechin: Improvement of stability and proposed action mechanism," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 3, pp. 1028–1033, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.EJMECH.2009.11.045.
- [87] S. Hong and S. Liu, "Targeted acylation for all the hydroxyls of (+)-catechin and evaluation of their individual contribution to radical scavenging activity," *Food Chem.*, vol. 197, pp. 415–421, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.134.

- [88] M. K. Lee *et al.*, “Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 11, no. 3, pp. 393–398, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0968-0896(02)00441-8.
- [89] H. Yoon *et al.*, “Design, synthesis and inhibitory activities of naringenin derivatives on human colon cancer cells,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 1, pp. 232–238, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.BMCL.2012.10.130.
- [90] F. J. Osonga *et al.*, “Synthesis and characterization of novel flavonoid derivatives via sequential phosphorylation of quercetin,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 58, no. 15, pp. 1474–1479, 2017, doi: 10.1016/J.TETLET.2017.02.085.
- [91] M. Cruz-Acuña, S. Bailón-Ruiz, C. R. Marti-Figueroa, R. Cruz-Acuña, and O. J. Perales-Pérez, “Synthesis, Characterization and Evaluation of the Cytotoxicity of Ni-Doped Zn(Se,S) Quantum Dots,” *J. Nanomater.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/702391.
- [92] P. T. Lewis *et al.*, “Synthesis of antioxidant isoflavone fatty acid esters,” *Tetrahedron*, vol. 56, no. 39, pp. 7805–7810, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0040-4020(00)00698-0.
- [93] T.-S. Jeong *et al.*, “Hypocholesterolemic Activity of Hesperetin Derivatives,” *ChemInform*, vol. 34, no. 50, Dec. 2003, doi: 10.1002/CHIN.200350135.
- [94] A. L. N. Pagning *et al.*, “Antimicrobial, antioxidant and butyrylcholinesterase inhibition activities of extracts and isolated compounds from *Scadoxus pseudocaulis* and semi-synthetic farrerol derivatives,” *South African J. Bot.*, vol. 102, pp. 166–174, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.SAJB.2015.06.009.
- [95] S. Hari Krishna, “Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 20, no. 3–4, pp. 239–267, 2002, doi: 10.1016/S0734-9750(02)00019-8.
- [96] S. Gayot, X. Santarelli, and D. Coulon, “Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: Effect of the water content,” *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 1, pp. 29–36, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0168-1656(02)00286-9.
- [97] E. Passicos, X. Santarelli, and D. Coulon, “Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure,”

Biotechnol. Lett., vol. 26, pp. 1073–1076, 2004.

- [98] M. Ardhaoui *et al.*, “Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids,” *J. Biotechnol.*, vol. 110, no. 3, pp. 265–272, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2004.03.003.
- [99] M. Ardhaoui, A. Falcimaigne, J. M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, “Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 29, no. 1–6, pp. 63–67, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2004.02.013.
- [100] A. Milivojević, M. Ćorović, M. Simović, K. Banjanac, and D. Bezbradica, “Flavonoid esters synthesis using novel biocatalytic systems - CAL B immobilized onto LifeTech™ ECR supports,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 163, p. 107748, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.BEJ.2020.107748.
- [101] Y. Baek *et al.*, “Efficient Production of Naringin Acetate with Different Acyl Donors via Enzymatic Transesterification by Lipases,” *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2022, Vol. 19, Page 2972, vol. 19, no. 5, p. 2972, Mar. 2022, doi: 10.3390/IJERPH19052972.
- [102] X. Li, Y. Zhao, X. Lai, J. Nong, G. Zhao, and X. Xiao, “One-pot biocatalytic synthesis and antioxidant activities of highly lipophilic naringin derivatives by using bi-functional whole-cells,” *Food Res. Int.*, vol. 136, p. 109291, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.FOODRES.2020.109291.
- [103] M. H. Katsoura, A. C. Polydera, L. Tsironis, A. D. Tselepis, and H. Stamatis, “Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency,” *J. Biotechnol.*, vol. 123, no. 4, pp. 491–503, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2005.12.022.
- [104] G. Céliz and M. Daz, “Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 1, pp. 94–100, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2010.07.022.
- [105] C. Jiang, L. Wang, X. Huang, S. Zhu, C. Ma, and H. Wang, “Identification and Antioxidant Abilities of Enzymatic-Transesterification (–)-Epigallocatechin-3-O-gallate Stearyl Derivatives in Non-Aqueous Systems,” *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 1282, vol. 10, no. 8, p. 1282, Aug. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10081282.

- [106] C. Jiang, L. Wang, X. Huang, S. Zhu, C. Ma, and H. Wang, "Structural characterization and antioxidant property of enzymatic-transesterification derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate and vinyl laurate," *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 10, pp. 4717–4729, Oct. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15894.
- [107] G. J. H. Buisman, C. T. W. Van Helteren, G. F. H. Kramer, J. W. Veldsink, J. T. P. Derksen, and F. P. Cuperus, "Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants," *Biotechnol. Lett.* 1998 202, vol. 20, no. 2, pp. 131–136, 1998, doi: 10.1023/A:1005368222340.
- [108] B. Guyot, B. Bosquette, M. Pina, and J. Graille, "Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium," *Biotechnol. Lett.* 1997 196, vol. 19, no. 6, pp. 529–532, 1997, doi: 10.1023/A:1018381102466.
- [109] R. T. Otto, H. Scheib, U. T. Bornscheuer, J. Pleiss, C. Syldatk, and R. D. Schmid, "Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids," *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 8, no. 4–6, pp. 201–211, Feb. 2000, doi: 10.1016/S1381-1177(99)00058-2.
- [110] H. Stamatis, V. Sereti, and F. N. Kolisis, "Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media," *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 323–328, Jan. 2001, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00016-3.
- [111] C. Laane, S. Boeren, and K. Vos, "On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis," *Trends Biotechnol.*, vol. 3, no. 10, pp. 251–252, 1985, doi: 10.1016/0167-7799(85)90023-X.
- [112] S. Hari Krishna, S. Divakar, S. G. Prapulla, and N. G. Karanth, "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*," *J. Biotechnol.*, vol. 87, no. 3, pp. 193–201, May 2001, doi: 10.1016/S0168-1656(00)00432-6.
- [113] R. H. Valivety, G. A. Johnston, C. J. Suckling, and P. J. Halling, "Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 38, no. 10, pp. 1137–1143, 1991, doi: 10.1002/BIT.260381004.

- [114] B. Danieli, P. De Bellis, G. Carrea, and S. Riva, "Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Flavonoid Disaccharide Monoglycosides," *Helv. Chim. Acta*, vol. 73, no. 7, pp. 1837–1844, 1990, doi: 10.1002/HLCA.19900730705.
- [115] S. Riva, B. Danieli, and M. Luisetti, "A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates," *J. Nat. Prod.*, vol. 59, no. 6, pp. 618–621, Jun. 1996, doi: 10.1021/NP960239M.
- [116] N. Nakajima, K. Ishihara, T. Itoh, T. Furuya, and H. Hamada, "Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 87, no. 1, pp. 105–107, 1999, doi: 10.1016/S1389-1723(99)80017-6.
- [117] C. Gao, P. Mayon, D. A. Macmanus, E. N. Vulfson, and B. Bioeng, "Novel Enzymatic Approach to the Synthesis of Flavonoid Glycosides and Their Esters," 2001, doi: 10.1002/1097-0290.
- [118] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F. N. Kolisis, "Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 59–62, Jan. 2003, doi: 10.1016/S1381-1177(02)00139-X.
- [119] F. Mellou, H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, and F. N. Kolisis, "Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells," *Process Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 2029–2034, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2006.05.002.
- [120] L. Chebil, J. Anthoni, C. Humeau, C. Gerardin, J. M. Engasser, and M. Ghoul, "Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 23, pp. 9496–9502, Nov. 2007, doi: 10.1021/JF071943J/SUPPL_FILE/JF071943JSI20070828_121949.PDF.
- [121] J. Zhou, Q. Tian, Y. Ma, Y. Wang, and Q. Huo, "Lipase-catalyzed selective esterification of catechin," *Mater. Express*, vol. 11, no. 6, pp. 995–1000, Jun. 2021, doi: 10.1166/MEX.2021.1971.
- [122] D. Lambusta, G. Nicolosi, A. Patti, and C. Sanfilippo, "Application of lipase catalysis

- in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 22, pp. 271–277, 2003, doi: 10.1016/S1381-1177(03)00042-0.
- [123] A. Y. H. Saik, Y. Y. Lim, J. Stanslas, and W. S. Choo, “Enzymatic synthesis of quercetin oleate esters using *Candida antarctica* lipase B,” *Biotechnol. Lett.* 2016 392, vol. 39, no. 2, pp. 297–304, Nov. 2016, doi: 10.1007/S10529-016-2246-5.
- [124] A. Y. H. Saik, Y. Y. Lim, J. Stanslas, and W. S. Choo, “Biosynthesis of Quercetin Palmitate Esters and Evaluation of their Physico-Chemical Properties and Stability,” *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 97, no. 9, pp. 977–988, Sep. 2020, doi: 10.1002/aocs.12404.
- [125] E. Kyriakou *et al.*, “Three Regioselectively Acylated Flavonoid Aglycone Derivatives in Equimolar Yield at One Blow,” *ChemistrySelect*, vol. 3, no. 18, pp. 5207–5211, May 2018, doi: 10.1002/SLCT.201703002.
- [126] L. Chebil, C. Humeau, A. Falcimaigne, J. M. Engasser, and M. Ghoul, “Enzymatic acylation of flavonoids,” *Process Biochem.*, vol. 41, no. 11, pp. 2237–2251, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2006.05.027.
- [127] E. Kyriakou *et al.*, “Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, no. 9, pp. 1739–1742, Feb. 2012, doi: 10.1039/C2OB06784F.
- [128] C. Jiang, L. Wang, X. Huang, S. Zhu, C. Ma, and H. Wang, “Structural characterization and antioxidant property of enzymatic-transesterification derivatives of (–)-epigallocatechin-3-O-gallate and vinyl laurate,” *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 10, pp. 4717–4729, Oct. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15894.
- [129] H. Guo *et al.*, “T enzymatic esterification of naringin and the properties of naringin esterified derivatization,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 176, p. 114372, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.INDCROP.2021.114372.
- [130] J. F. O. Couto *et al.*, “HSCCC Separations of Rutin Esters Obtained by Enzymatic Reaction Catalyzed by Lipase,” *Artic. J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 32, no. 3, pp. 523–533, 2021, doi: 10.21577/0103-5053.20200206.

- [131] C. Vaisali, P. D. Belur, and I. Regupathi, "Lipase mediated synthesis of rutin fatty ester: Study of its process parameters and solvent polarity," *Food Chem.*, vol. 232, pp. 278–285, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.168.
- [132] N. N. A. Razak and M. S. M. Annuar, "Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 54, no. 21, pp. 5604–5612, Jun. 2015, doi: 10.1021/ACS.IECR.5B00996/ASSET/IMAGES/ACS.IECR.5B00996.SOCIAL.JPEG_V03.
- [133] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F. N. Kolisis, "Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 21, pp. 59–62, 2003.
- [134] M. H. Katsoura, A. C. Polydera, L. Tsironis, A. D. Tselepis, and H. Stamatis, "Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency," *J. Biotechnol.*, vol. 123, pp. 491–503, 2006, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.022.
- [135] E. Wehtje and P. Adlercreutz, "Water Activity and Substrate Concentration Effects on Lipase Activity," *Bio-technol Bioeng*, vol. 55, pp. 798–806, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5.
- [136] M. Arroyo, R. Torres, I. De La Mata, M. Pilar Castellón, and C. Acebal, "Interaction of penicillin V acylase with organic solvents: Catalytic activity modulation on the hydrolysis of penicillin v," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 25, no. 3–5, pp. 378–383, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00057-5.
- [137] P. J. Halling, "Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 16, no. 3, pp. 178–206, 1994, doi: 10.1016/0141-0229(94)90043-4.
- [138] E. Wehtje, I. Svensson, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson, "Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media," *Biotechnol. Tech.*, vol. 7, no. 12, pp. 873–878, Dec. 1993, doi: 10.1007/BF00156365.
- [139] F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, and M. Ghoul, "Influence of water activity

- and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media,” *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 949–954, Jan. 2001, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00166-1.
- [140] S. H. Youn, H. J. Kim, T. H. Kim, and C. S. Shin, “Lipase-catalyzed acylation of naringin with palmitic acid in highly concentrated homogeneous solutions,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 46, no. 1–4, pp. 26–31, May 2007, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2007.02.002.
- [141] F. Ergan, M. Trani, and G. André, “Solvent free triglyceride synthesis using lipozymeTM IM-20,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 10, no. 9, pp. 629–634, Sep. 1988, doi: 10.1007/BF01024714.
- [142] S. Bloomer, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson, “Facile synthesis of fatty acid esters in high yields,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 14, no. 7, pp. 546–552, 1992, doi: 10.1016/0141-0229(92)90125-8.
- [143] J. Lee *et al.*, “Improved Productivity of Naringin Oleate with Flavonoid and Fatty Acid by Efficient Enzymatic Esterification,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/ANTIOX11020242.
- [144] V. Kumar, F. Jahan, R. V. Mahajan, and R. K. Saxena, “Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant,” *Bioresour. Technol.*, vol. 218, pp. 1246–1248, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2016.06.057.
- [145] H. M. Li *et al.*, “Enzymatic acylation of rutin with benzoic acid ester and lipophilic, antiradical, and antiproliferative properties of the acylated derivatives,” *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 1714–1725, May 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15703.
- [146] E. Enaud, C. Humeau, B. Piffaut, and M. Girardin, “Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2004, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2003.08.002.
- [147] L. N. Mutua and C. C. Akoh, “Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp.* lipase,” *J. Am. Oil Chem. Soc. 1993 701*, vol. 70, no. 1, pp. 43–46, Jan. 1993, doi: 10.1007/BF02545365.

- [148] L. Montenegro *et al.*, “In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs,” *Int. J. Pharm.*, vol. 336, no. 2, pp. 257–262, May 2007, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2006.12.003.
- [149] M. T. Gatto *et al.*, “Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 269–272, 2002, doi: 10.1016/S0968-0896(01)00275-9.
- [150] L. Sardone, B. Pignataro, F. Castelli, M. G. Sarpietro, G. Nicolosi, and G. Marletta, “Temperature and pressure dependence of quercetin-3-O-palmitate interaction with a model phospholipid membrane: Film balance and scanning probe microscopy study,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 271, no. 2, pp. 329–335, Mar. 2004, doi: 10.1016/J.JCIS.2003.11.037.
- [151] S. Burda and W. Oleszek, “Antioxidant and antiradical activities of flavonoids,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 6, pp. 2774–2779, 2001, doi: 10.1021/JF001413M.
- [152] S. A. B. E. Van Acker *et al.*, “Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 331–342, Jan. 1996, doi: 10.1016/0891-5849(95)02047-0.
- [153] Í. Gulcin and S. H. Alwasel, “Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method,” *Process. 2022, Vol. 10, Page 132*, vol. 10, no. 1, p. 132, Jan. 2022, doi: 10.3390/PR10010132.
- [154] S. A. Cherrak *et al.*, “In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation,” *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0165575, Oct. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0165575.
- [155] M. M. A. El-Sukkar, N. A. Syed, I. Aiad, S. M. Helmy, and W. I. M. El-Azab, “Aqueous solution properties, biodegradability, and antimicrobial activity of some alkylpolyglycosides surfactants,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 46, no. 5, pp. 311–316, 2009, doi: 10.3139/113.110037.
- [156] D.-S. Ág and de LA la Rosa, “Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR),” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 206, pp. 437–447, 2018, doi: 10.1016/j.saa.2018.08.057.

- [157] D. X. Hou and T. Kumamoto, "Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: Direct binding and molecular modeling," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 13, no. 5, pp. 691–719, Sep. 2010, doi: 10.1089/ARS.2009.2816.
- [158] C.-Z. Lin, C.-C. Zhu, M. Hu, A.-Z. Wu, Z.-D. Bairu, and S.-Q. Kangsa, "Structure-activity relationships of antioxidant activity in vitro about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*," *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, vol. 3, no. 3, p. 123, 2014, doi: 10.5455/JICE.20140619030232.
- [159] D. Amic, D. Davidovic-Amic, D. Beslo, V. Rastija, B. Lucic, and N. Trinajstic, "SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 7, pp. 827–845, Mar. 2007, doi: 10.2174/092986707780090954.
- [160] S. Kumar and A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview," *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/162750.
- [161] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
- [162] Z. H. Shi *et al.*, "Synthesis, biological evaluation and SAR analysis of O-alkylated analogs of quercetin for anticancer," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 18, pp. 4424–4427, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.BMCL.2014.08.006.
- [163] S. D. S. Banjarnahor and N. Artanti, "Antioxidant properties of flavonoids," *Med. J. Indones.*, vol. 23, no. 4, pp. 239–44, Nov. 2014, doi: 10.13181/MJI.V23I4.1015.
- [164] M. Musialik, R. Kuzmicz, T. S. Pawlowski, and G. Litwinienko, "Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids," *J. Org. Chem.*, vol. 74, no. 7, pp. 2699–2709, Apr. 2009, doi: 10.1021/JO802716V.
- [165] M. Dueñas, S. González-Manzano, A. González-Paramás, and C. Santos-Buelga, "Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 51, no. 2, pp. 443–449, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.JPBA.2009.04.007.
- [166] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 10, pp.

572–584, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.

- [167] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. DiLabio, “Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 6, pp. 1173–1183, Feb. 2001, doi: 10.1021/JA002455U.
- [168] M. Leopoldini, I. Prieto Pitarch, N. Russo, and M. Toscano, “Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 108, no. 1, pp. 92–96, Jan. 2004, doi: 10.1021/JP035901J.
- [169] L. Zhu, J. Chen, J. Tan, X. Liu, and B. Wang, “Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free Radical Scavenging and DNA Oxidative Damage Protection Activities and Analysis of Bioactivity-Structure Relationship Based on Molecular and Electronic Structures,” *Mol. 2017, Vol. 22, Page 195*, vol. 22, no. 3, p. 195, Feb. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22030195.
- [170] A. G. Veiko, E. A. Lapshina, and I. B. Zavodnik, “Comparative analysis of molecular properties and reactions with oxidants for quercetin, catechin, and naringenin,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 476, no. 12, pp. 4287–4299, Dec. 2021, doi: 10.1007/S11010-021-04243-W.
- [171] S. Anitha, S. Krishnan, K. Senthilkumar, and V. Sasirekha, “Theoretical investigation on the structure and antioxidant activity of (+) catechin and (–) epicatechin—a comparative study,” *Mol. Phys.*, vol. 118, no. 17, p. 1745917, Sep. 2020, doi: 10.1080/00268976.2020.1745917/SUPPL_FILE/TMPH_A_1745917_SM7648.DOCX.
- [172] M. Ghiasi and M. M. Heravi, “Quantum mechanical study of antioxidative ability and antioxidative mechanism of rutin (vitamin P) in solution,” *Carbohydr. Res.*, vol. 346, no. 6, pp. 739–744, May 2011, doi: 10.1016/J.CARRES.2011.01.021.
- [173] W. Cai, Y. Chen, L. Xie, H. Zhang, and C. Hou, “Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues,” *Eur Food Res Technol*, vol. 238, pp. 121–128, 2014, doi: 10.1007/s00217-013-2091-x.
- [174] L. A. Tavadyan and S. H. Minasyan, “Synergistic and antagonistic co-antioxidant

- effects of flavonoids with trolox or ascorbic acid in a binary mixture,” *J. Chem. Sci.*, vol. 131, p. 40, 2019, doi: 10.1007/s12039-019-1618-5.
- [175] “Principles of solution and solubility by Kozo Shinoda | Goodreads.” <https://www.goodreads.com/book/show/3807746-principles-of-solution-and-solubility> (accessed Mar. 28, 2022).
- [176] M. Deleu, C. Damez, S. Gatard, K. Nott, M. Paquot, and S. Bouquillon, “Synthesis and physico-chemical characterization of bolaamphiphiles derived from alkenyl D-xylosides,” *New J. Chem.*, vol. 35, no. 10, pp. 2258–2266, Sep. 2011, doi: 10.1039/C1NJ20158A.
- [177] M. J. Clemente, J. Fitremann, M. Mauzac, J. L. Serrano, and L. Oriol, “Synthesis and characterization of maltose-based amphiphiles as supramolecular hydrogelators,” *Langmuir*, vol. 27, no. 24, pp. 15236–15247, Dec. 2011, doi: 10.1021/LA203447E/SUPPL_FILE/LA203447E_SI_001.PDF.
- [178] J. Rubio, I. Alfonso, M. I. Burguete, and S. V. Luis, “Stimulus responsive self-assembly of Gemini Amphiphilic Pseudopeptides,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 22, pp. 10737–10748, Nov. 2011, doi: 10.1039/C1SM06435E.
- [179] N. Kumar and R. Tyagi, “Characteristic and application of anionic dimeric surfactants: A review,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 56, no. 3, pp. 172–179, May 2019, doi: 10.3139/113.110614/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [180] E. Klimaszewska, A. Seweryn, M. Ogorzałek, Z. Nizioł-Łukaszewska, and T. Wasilewski, “Reduction of irritation potential caused by anionic surfactants in the use of various forms of collagen derived from marine sources in cosmetics for children,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 56, no. 3, pp. 180–187, 2019, doi: 10.3139/113.110616.
- [181] T. Bujak, Z. Nizioł-Łukaszewska, and T. Wasilewski, “Sodium lauryl sulfate vs. Sodium coco sulfate. Study of the safety of use anionic surfactants with respect to their interaction with the skin,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 56, no. 2, pp. 126–133, Mar. 2019, doi: 10.3139/113.110599/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [182] S. Ghosh and J. Dey, “Interaction of bovine serum albumin with N-acyl amino acid based anionic surfactants: Effect of head-group hydrophobicity,” *J. Colloid Interface*

- Sci.*, vol. 458, pp. 284–292, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.JCIS.2015.07.064.
- [183] S. Ghosh, A. Ray, and N. Pramanik, “Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles,” *Biophys. Chem.*, vol. 265, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.BPC.2020.106429.
- [184] J. Liu, M. Hu, Y. Xie, and H. Xu, “Study on a class of cationic gemini surfactants,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 56, no. 4, pp. 316–326, Jul. 2019, doi: 10.3139/113.110628/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [185] Y. Sun, C. Wang, W. Wang, X. Yang, M. Di Serio, and L. Zhi, “Micellar Properties for Propoxylated Surfactants in Water/Alcohol Solvent Mixtures and Their Antibacterial and Polyester Fabric Antistatic Performances,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 19, no. 3, pp. 543–552, May 2016, doi: 10.1007/S11743-016-1801-3.
- [186] M. Zhou, S. Li, Z. Zhang, C. Wang, G. Luo, and J. Zhao, “Progress in the Synthesis of Zwitterionic Gemini Surfactants,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 20, no. 6, pp. 1243–1254, Nov. 2017, doi: 10.1007/S11743-017-2014-0.
- [187] M. Zieba, D. Wieczorek, E. Klimaszewska, A. Malysa, and D. Kwasniewska, “Application of new synthesized zwitterionic surfactants as hair shampoo components,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 8, pp. 1189–1196, Aug. 2019, doi: 10.1080/01932691.2018.1503545.
- [188] E. M. Kandeel, “Synthesis and Performance of Glycerol Ester-Based Nonionic Surfactants,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 7, pp. 949–954, Jul. 2012, doi: 10.1080/01932691.2011.590418.
- [189] D. Bajpai and V. K. Tyagi, “Nonionic surfactants: An overview,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 47, no. 3, pp. 190–196, May 2010, doi: 10.3139/113.110062/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [190] S. Brica, M. Klavins, and A. Zicmanis, “Cogent Chemistry A route to simple nonionic surfactants under a Creative Commons Attribution (CC-BY) 4.0 license ORGANIC CHEMISTRY | SHORT COMMUNICATION A route to simple nonionic surfactants,” *Cogent Chem.*, vol. 2, p. 1178830, 2016, doi: 10.1080/23312009.2016.1178830.
- [191] F. Alam, M. Khan, and M. Ateeq, “Synthesis of Triazole-Based Nonionic Surfactants

- for Nanostructured Drug Delivery: Investigation of Their Physicochemical and Biological Aspects,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 22, no. 6, pp. 1419–1427, Nov. 2019, doi: 10.1002/JSDE.12326.
- [192] A. M. Hussein and M. M. Khowdiary, “Synthesis, quantum chemical calculations and properties of nonionic and nonionic-anionic surfactants based on fatty alkyl succinate,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 17, no. 4, pp. 615–627, 2014, doi: 10.1007/S11743-014-1568-3.
- [193] I. Ali, M. R. Shah, M. Imran, and Shafiullah, “Synthesis of Sulfur-Based Biocompatible Nonionic Surfactants and Their Nano-Vesicle Drug Delivery,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 20, no. 6, pp. 1367–1375, Nov. 2017, doi: 10.1007/S11743-017-2023-Z.
- [194] L. H. Lin, C. C. Wang, K. M. Chen, and P. C. Lin, “Synthesis and physicochemical properties of silicon-based gemini surfactants,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 881–889, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.COLSURFA.2013.08.036.
- [195] R. Wagner *et al.*, “Silicon-modified Surfactants and Wetting: I. Synthesis of the Single Components of Silwet L77 and Their Spreading Performance on a Low-energy Solid Surface †,” doi: 10.1002/(SICI)1099-0739(199909)13:9.
- [196] N. A. Malik, “Solubilization and Interaction Studies of Bile Salts with Surfactants and Drugs: a Review Spectroscopic investigation of biomolecule Interactions in aqueous medium View project,” *Artic. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2016, doi: 10.1007/s12010-016-1987-x.
- [197] J. L. Li and B. H. Chen, “Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 57, no. 14, pp. 2825–2835, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0009-2509(02)00169-0.
- [198] D. Beneventi, B. Carre, and A. Gandini, “Role of surfactant structure on surface and foaming properties,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 189, no. 1–3, pp. 65–73, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0927-7757(01)00602-1.
- [199] N. Kamlangmak, U. Eiamprasert, P. Chaiyasat, and A. Chaiyasat, “Multifunctional Polymer Particles Containing Quaternary Ammonium for Antimicrobial Particulate Surfactants and Defoaming,” *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 3, no. 7, pp. 3549–3559,

Jul. 2021, doi: 10.1021/ACSAPM.1C00444.

- [200] C. L. Reichert, H. Salminen, G. Badolato Bönisch, C. Schäfer, and J. Weiss, “Concentration effect of Quillaja saponin – Co-surfactant mixtures on emulsifying properties,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 519, pp. 71–80, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.JCIS.2018.01.105.
- [201] L. Zhang, X. Zhang, P. Zhang, Z. Zhang, S. Liu, and B. Han, “Efficient emulsifying properties of glycerol-based surfactant,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 553, pp. 225–229, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.COLSURFA.2018.05.055.
- [202] A. Zdziennicka and B. Jańczuk, “Modification of adsorption, aggregation and wetting properties of surfactants by short chain alcohols,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 284, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.CIS.2020.102249.

Chapitre 2: Synthèse de dérivés de flavonoïdes par fonctionnalisation chimique et enzymatique

Partie 1: Fonctionnalisation par hémisynthèse chimique

Nous avons choisi d'utiliser un flavonoïde aglycone pour faciliter dans un premier temps le greffage et limiter les étapes de protection / deprotection qui seraient indispensables en présence d'un motif glucidique. Le flavonoïde choisi correspond à la catéchine car c'est un produit commercial, et donc facilement accessible pour faire preuve de concept en partant d'une molécule modèle, et parce que c'est un polyphénol abondant dans de nombreuses plantes ainsi que dans certaines essences de bois. La catéchine possède cinq groupements hydroxyles, dont quatre de type phénolique et un aliphatique [1]. De nombreuses études sur la modification de la catéchine ont été relevées dans la littérature. Par contre l'acylation spécifique de chaque hydroxyle de cette molécule n'a pas été systématiquement étudié, ce qui est essentiel pour la mise en place d'une relation structure moléculaire et optimisation des propriétés. En conséquence, une stratégie comprenant une différenciation des hydroxyles des différents cycles a été appliquée pour réaliser l'acylation spécifique de chaque hydroxyle de la molécule de la catéchine. Ces modifications consistent à réaliser un greffage sélectif d'une chaîne hydrophobe sur l'une des fonctions phénoliques et/ou aliphatique en ajoutant des chaînes grasses, ou des acides aminés couplés à des chaînes grasses pour rendre la catéchine plus lipophile ou en modulant sa balance hydrophile / hydrophobe afin d'augmenter sa biodisponibilité.

1. Rappel des structures des molécules cibles

Nous avons envisagé trois types de molécules. Trois séries de molécules ont ainsi été synthétisées par hémisynthèse chimique :

- Des composés bi-modulaires associant la catéchine à une chaîne grasse:

- au niveau des hydroxyles phénoliques: composés de type I
- au niveau du OH aliphatique: composé de type II

- Des composés tri-modulaires associant de différentes manières la catéchine à un acide gras et à un acide gras: composés de type III.

2. Synthèse de composés bi-modulaires (composés du type I et II)

Les composés bi-modulaires comme leur nom l'indiquent, sont des molécules formées de deux modules. Le premier correspond au flavonoïde et en l'occurrence la catéchine, et le deuxième correspond à un module hydrophobe constitué d'un acide gras (Figure 29).

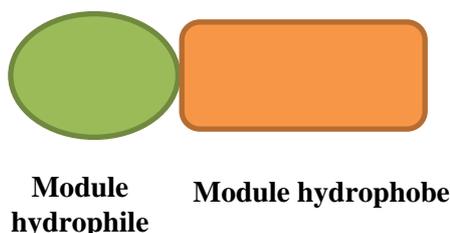


Figure 29. Structure d'un composé bi-modulaire

Nous avons envisagé de greffer une chaîne hydrophobe sur la catéchine par un lien de type ester puisque c'est un lien facile à former. Dans un premier temps, nous avons greffé cette chaîne hydrophobe sur les OH phénoliques afin d'obtenir des composés bi-modulaires de type I. Dans un second temps, nous avons greffé cette chaîne hydrophobe sur le OH aliphatique de la catéchine pour obtenir des composés bi-modulaires de type II.

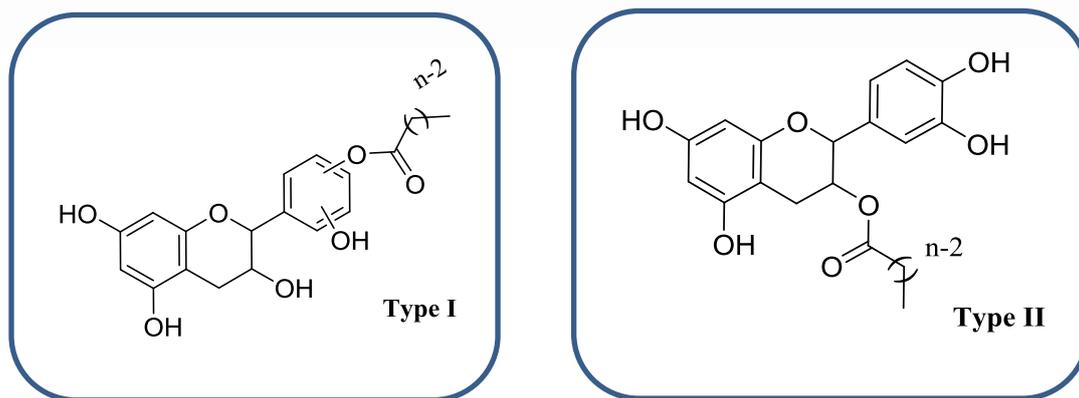


Figure 30. Composés cibles bi-modulaire de type I et de type II

2.1. Synthèse de composés bi-modulaires (composés du type I)

2.1.1. Stratégie de synthèse

L'objectif de cette synthèse est de greffer des chaînes grasses sur les groupements hydroxyles phénoliques de la catéchine. Nous avons opté pour acyler par une voie directe les hydroxyles phénoliques en mettant en œuvre les conditions d'estérification de Steglich en utilisant le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) comme agent basique. Les hydroxyles phénoliques de la catéchine sont en effet plus acides que l'hydroxyle aliphatique ce qui va entraîner leur déprotonation sélective et aussi favoriser leur estérification sans passer par des étapes de protection et de deprotections. La synthèse des composés bi-modulaires de type I est une synthèse très simple qui s'effectue en une seule étape.

2.1.2. Synthèse

L'estérification de Steglich est une réaction qui utilise le (DCCI) en tant qu'agent de couplage et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP).

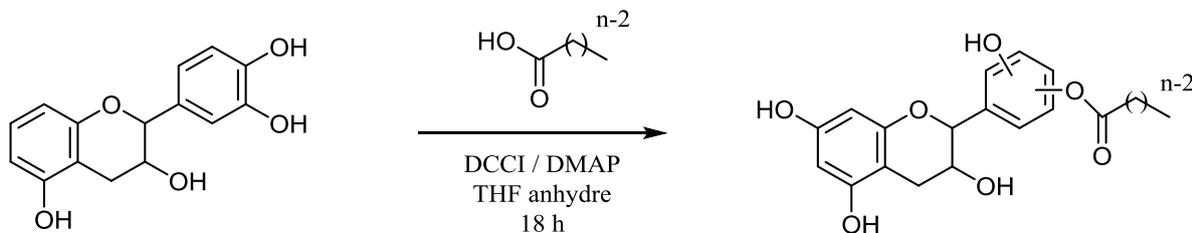


Schéma 11. Estérification de la catéchine

Tout d'abord la DMAP déprotonne l'acide carboxylique. Le carboxylate attaque le DCCI pour former un carbonyle activé (ester actif). Par la suite, le phénole attaque l'ester actif (Schéma 12). Le DMAP permet de catalyser la réaction en tant qu'agent de transfert d'acyle très efficace, et il est plus basique que la pyridine en raison de l'effet donneur mésomère du groupe diméthylamino [2]. Six longueurs de chaîne différentes ont été choisies dans cette réaction : l'acide octanoïque (C8), l'acide laurique (C12), l'acide myristique (C14), l'acide palmitique (C16), l'acide stéarique (C18), et un acide gras insaturé, l'acide oléique (C18 :1).

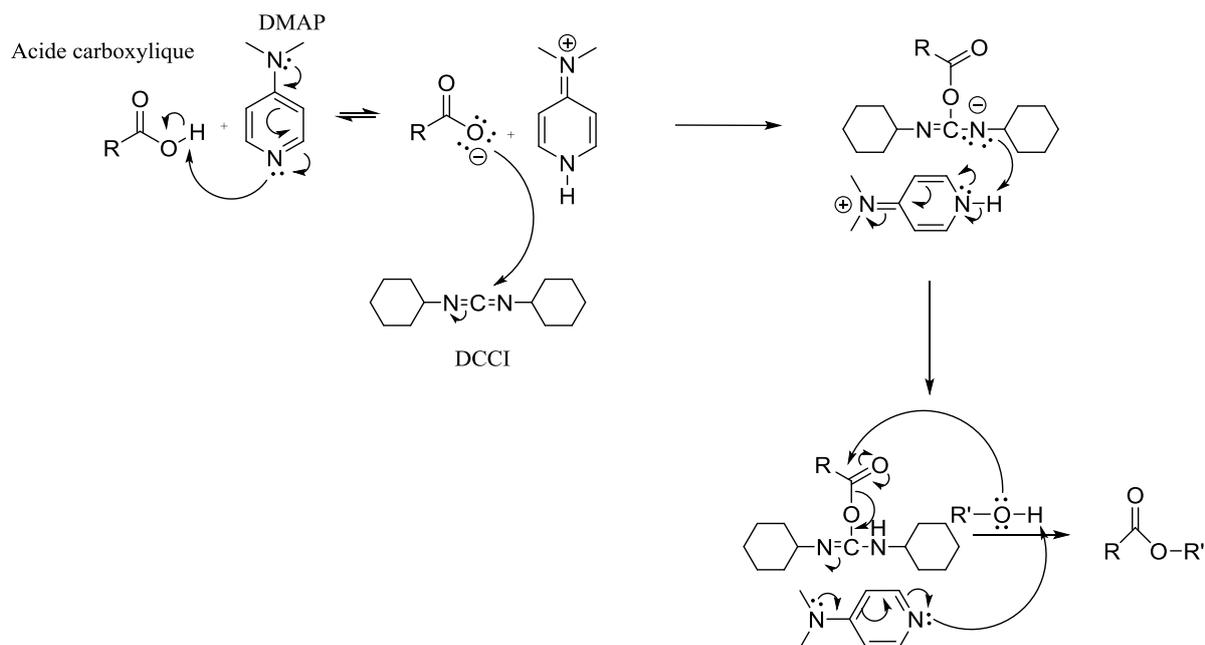


Schéma 12. Mécanisme de l'estérification de Steglich

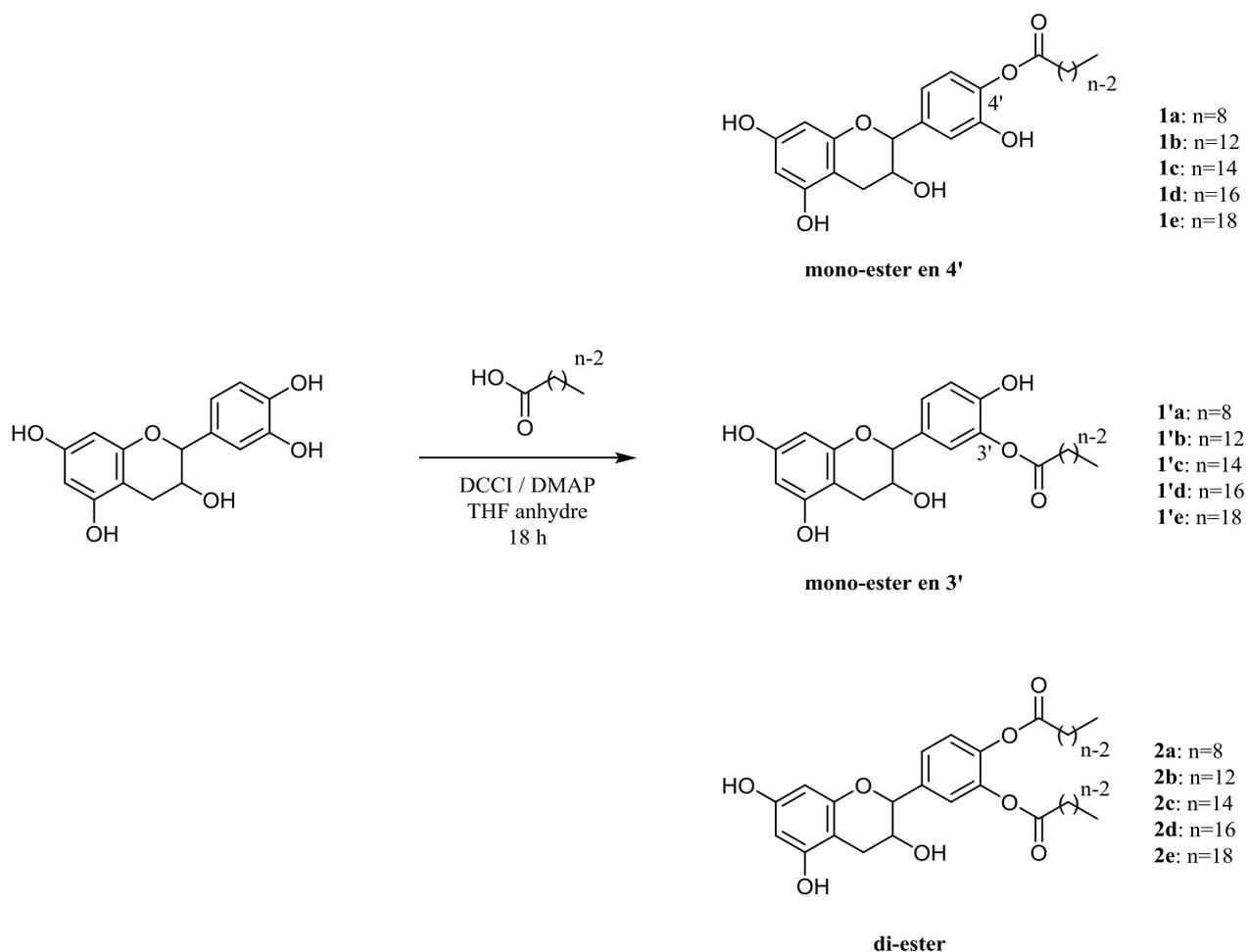


Schéma 13. Synthèse des mono-esters en 3', 4' et des di-esters

Le schéma 3 montre l'estérification directe de la catéchine par les différents acides gras saturés. L'ajout du DCCI a été réalisé goutte à goutte à froid sur une durée de 45 minutes. Durant la réaction un précipité se forme correspondant à la dicyclohexylurée, un sous-produit du DCCI qui a été éliminé par plusieurs filtrations.

Le schéma 14 montre la même estérification mais avec un acide gras ayant une insaturation qui est l'acide oléique (C18:1).

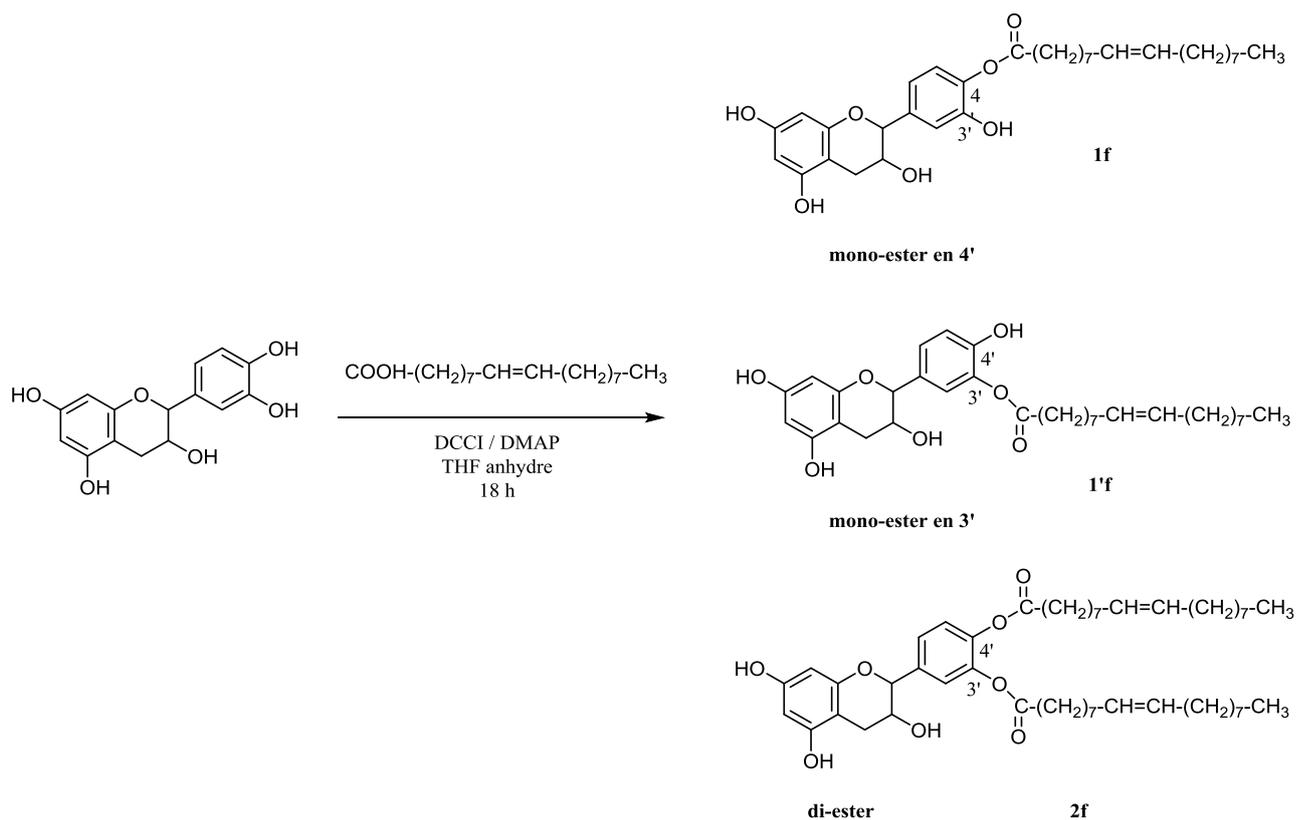


Schéma 14. Synthèse des mono-esters en 3', 4' et des di-esters

Tableau 1. Rendement de mono- et di-esters en fonction de la longueur de la chaîne grasse

Séries	n	Rendements de monoesters (%) 1+1'	Rendements de diester (%) 2
1a	8	64	2
1b	12	72	3
1c	14	71	3
1d	16	66	2
1e	18	61	1
1f	-	64	2

Après purification par colonne chromatographique, les composés mono-esters sont obtenus en tant que produits majoritaires avec des rendements entre 61 % et 72 %, et des di-esters comme

produits minoritaires avec des rendements très faibles (1 à 3 %). Les rendements les plus élevés de mono-esters sont observés avec l'acide laurique (C12) et l'acide myristique (C14). Ces résultats sont identiques à ceux obtenus dans la littérature [3].

Les spectres de RMN ^1H révèlent la présence de deux mono-esters différents. En effet entre 8,5 ppm et 9 ppm, le spectre RMN de la catéchine montre la présence de quatre singulets correspondant aux hydroxyles (a), (b), (c) et (d) (Figure 31 A). Après acylation et dans la même zone de déplacements, le spectre indique la présence de 3 massifs intégrant chacun pour un proton, au lieu de quatre singulets (Figure 31 B), ce qui confirme que l'estérification a bien eu lieu sur un OH phénolique du groupement catéchol. Chacun de ces massifs correspond à deux singulets ce qui permet de conclure que deux régioisomères ont été obtenus avec une proportion non identique de 70/30.

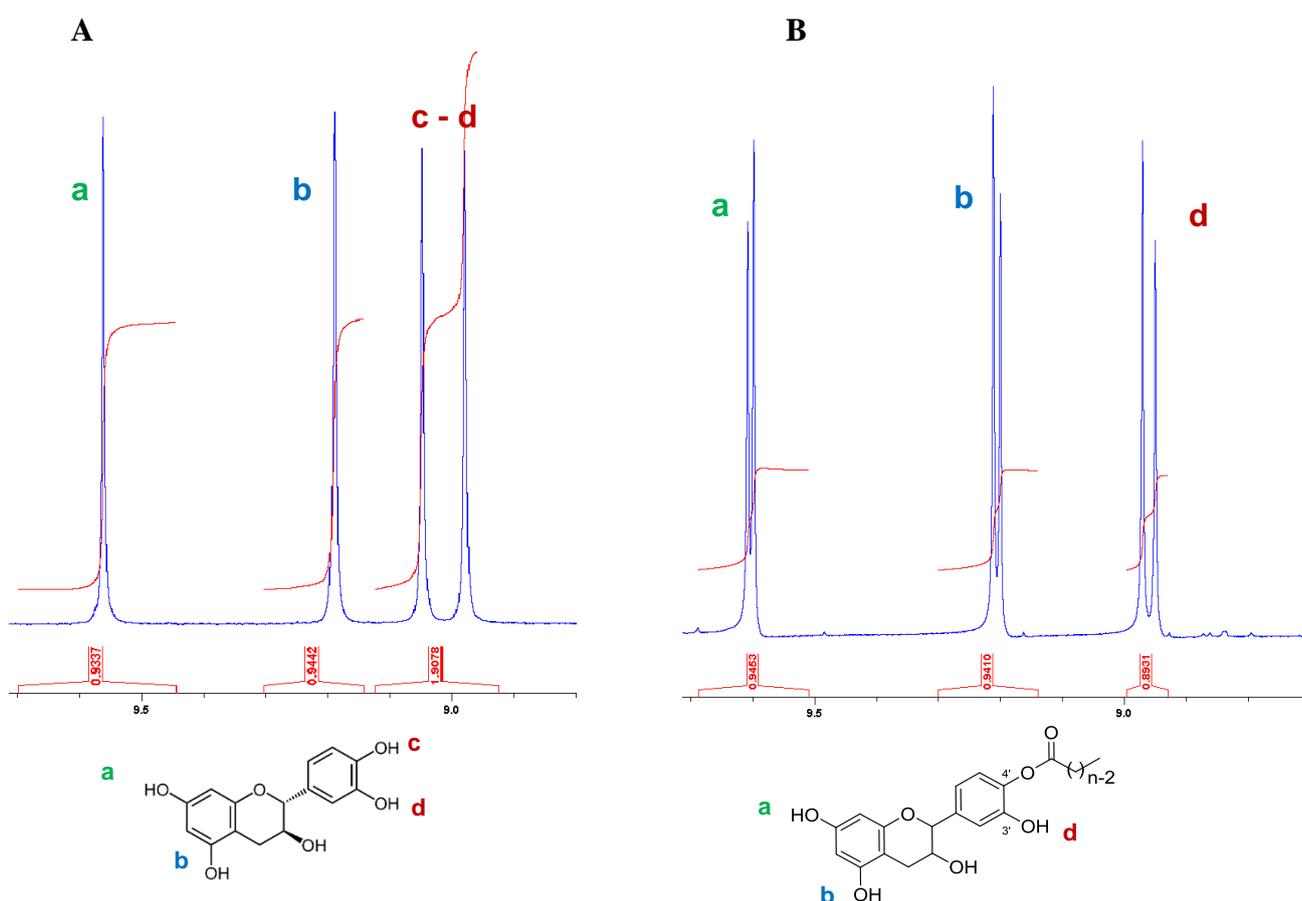


Figure 31. A. Spectre RMN ^1H de la catéchine B. Spectre RMN ^1H de la catéchine monoacylée

La régiosélectivité de cette réaction peut être expliquée en se basant sur l'acidité des différents groupements hydroxyles. Les hydroxyles du groupement catéchol du cycle B sont plus acide que ceux du cycle A à cause de leur proximité de deux oxygènes électronégatifs.

Ensuite, on pense que le phénol en position 4' présente une acidité plus élevée que le phénol en position 3' en raison de sa distance par rapport au groupe alkyle inductif donneur d'électrons en position 1'. Par conséquent, la réaction a lieu principalement en 4' position en raison de la déprotonation plus facile du groupe hydroxyle. Une fois formé, le mono-ester peut être stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire avec un groupe hydroxyle en position 3' limitant sa réactivité. La formation du diester s'est produite en tant que sous-produit dans les conditions réactionnelles utilisées dans cette étude. Une telle réactivité a déjà été décrite dans la littérature [4]–[8].

L'examen de la littérature montre que de nombreuses investigations informatiques par modélisation moléculaire ont été faites citant les succès de différentes méthodes de théorie fonctionnelle de la densité (DFT) par rapport aux méthodes expérimentales dans le calcul de la structure moléculaire et de la réactivité intrinsèque des composés phénoliques [9], [10]. Les flavonoïdes sont des molécules qui répondent facilement aux stimuli polaires et magnétiques et c'est la raison d'étudier la distribution de charge sur les orbitales, l'HOMO (highest occupied molecular orbital) et la LUMO (lowest unoccupied molecular orbital). La différence de niveaux d'énergie entre l'HOMO (highest occupied molecular orbital) et la LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), ΔE , peut servir à mesurer l'excitabilité de la molécule : plus la différence d'énergie est faible, plus la molécule peut être excitée facilement, et donc plus réactive [11], [12].

Une telle étude par modélisation moléculaire, à l'aide de la fonctionnelle B3Lyp, pourra bien nous aider à confirmer les résultats de régiosélectivité obtenus, en éliminant un proton de chaque groupements hydroxyles de la catéchine et en calculant la différence d'énergie, ΔE , entre l'HOMO et la LUMO.

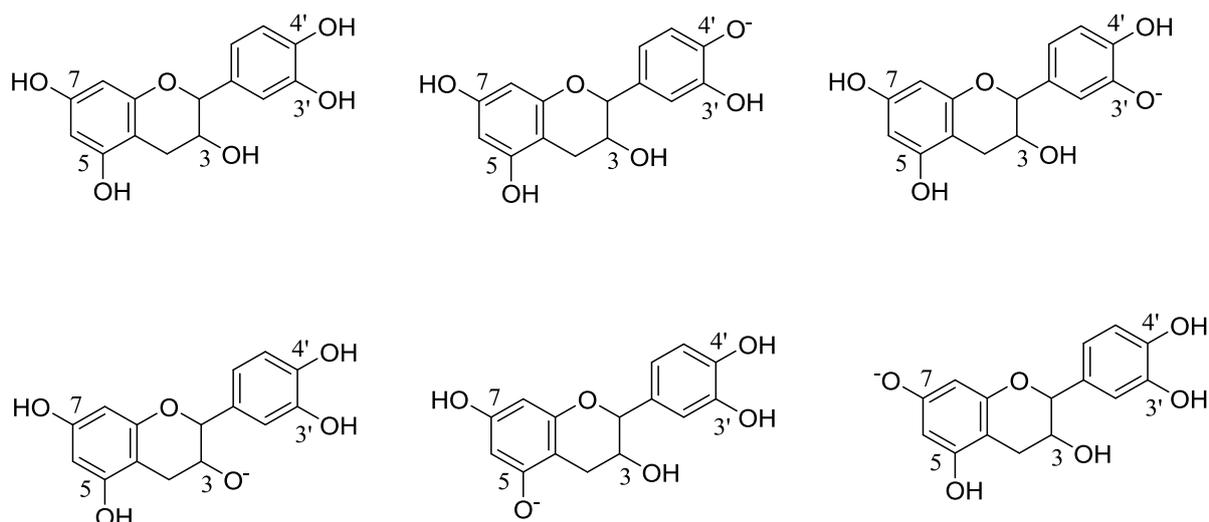


Figure 32. Structures de la catéchine après arrachement de protons dans les positions 3', 4', 3, 5, 7.

Tableau 2. Valeurs des énergies des orbitales de la LUMO et HOMO de la catéchine, et de la catéchine après arrachement de protons dans les positions, 3', 4', 3, 5 et 7.

	E_{HOMO} (Ha)	E_{LUMO} (Ha)	ΔE (Ha) $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$
Catéchine	-0,188	-0,036	0,152
Catéchine 3'-OH	-0,193	-0,175	0,018
Catéchine 4'-OH	-0,191	-0,177	0,014
Catéchine 3-OH	-0,192	-0,173	0,019
Catéchine 5-OH	-0,196	-0,166	0,030
Catéchine 7-OH	-0,194	-0,163	0,031

Les valeurs du tableau ci-dessus montrent que le groupement OH en position 4' est le plus réactif, suivi des positions 3', 3, 5 et enfin 7. Ce qui explique et confirme l'acylation directe sur les OH du groupement catéchol, majoritairement en position 4'.

2.2. Synthèse des composés bi-modulaires (composés du type II)

2.2.1. Stratégie de synthèse

L'objectif est ici d'acyler l'hydroxyle aliphatique de la catéchine. Une étape de protection préalable des hydroxyles aliphatiques est donc nécessaire afin de cibler l'acylation sur cet hydroxyle. Cette protection des hydroxyles phénoliques peut être réalisée aisément du fait de leur acidité plus prononcée que celle de l'hydroxyle aliphatique. Le schéma de retrosynthèse ci-dessous permet de visualiser les différentes étapes.

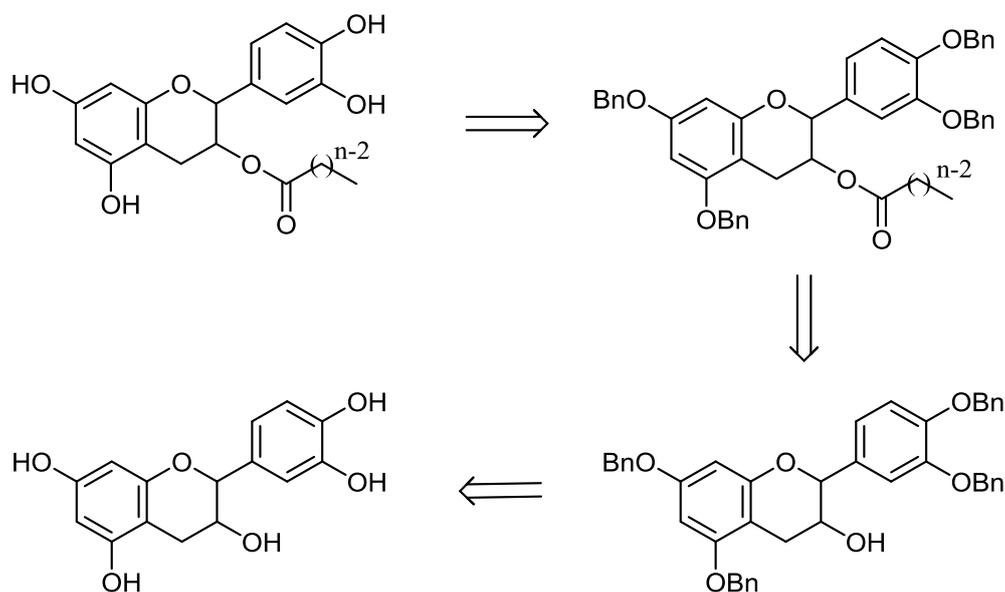


Schéma 15. Retro-synthèse des composés bi-modulaire de type II

2.2.2. Synthèse

La synthèse de ces composés bi-modulaires a donc été réalisée en trois étapes. La première étape est une protection des hydroxyles phénoliques, suivie par une estérification de la catéchine au niveau de l'hydroxyle aliphatique et finalement une déprotection des hydroxyles phénoliques.

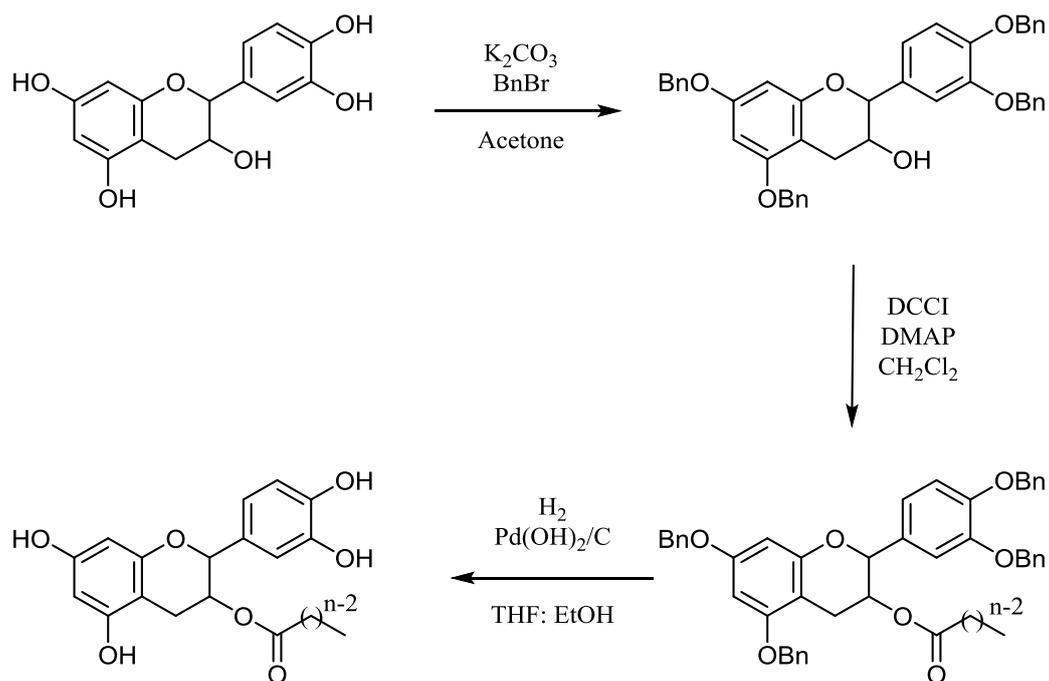


Schéma 16. Acylation de la catéchine au niveau de l'hydroxyle aliphatique

2.2.2.1. Benzylation

Différents modes de protection sont possibles pour la protection des hydroxyles phénoliques. Des essais de protection par des motifs de type Boc ou acétylation ont déjà été testés au laboratoire mais c'est finalement sur la benzoylation que s'est porté notre choix en raison de l'orthogonalité de cette protection par rapport à l'acylation où à d'autres groupes protecteurs potentiels au niveau des modules de jonction potentiels tels que les amino acides (composés de types III).

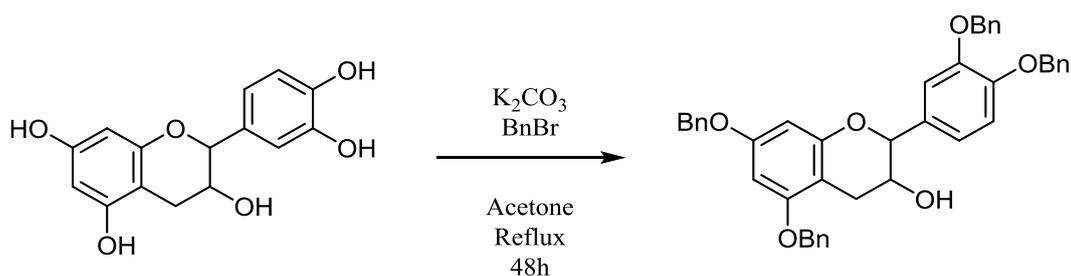


Schéma 17. Benzoylation de la catéchine

La benzoylation peut être réalisée après déprotonation des hydroxyles phénoliques par une base faible telle que le carbonate de potassium sans toucher l'hydroxyle aliphatique moins acide. L'acidité est de plus augmentée par la liaison hydrogène intramoléculaire dans la structure catéchol des groupes hydroxyles phénoliques qui améliore leur nucléophilie dans des conditions basiques et augmente donc la capacité de celui-ci à s'ioniser en présence d'une base

donnant son ion phénoxyde sans déprotonner l'hydroxyle aliphatique. Le bromure de benzyle réagit ensuite avec les anions phénoxyde de la catéchine dans une réaction SN2 formant un composé benzylé [13].

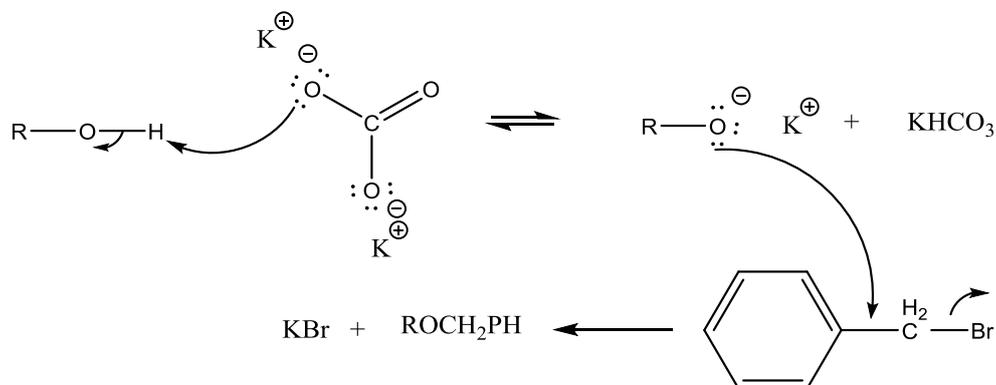


Schéma 18. Mécanisme de la benzylation

Dans un premier temps, nous avons testé différentes conditions réactionnelles afin d'optimiser la réaction pour obtenir la catéchine tetrabenzylée avec des rendements élevés. Nous avons fait varier la quantité de carbonate de potassium ainsi que celle de bromure de benzyle. Quatre produits ont été obtenus: la catéchine mono-benzylée, di-benzylée, tri-benzylée et tetrabenzylée. Les conditions réactionnelles sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Conditions réactionnelles lors de la benzylation de la catéchine

Catéchine (eq)	C ₆ H ₅ CH ₂ Br (eq)	K ₂ CO ₃ (eq)	Température (°C)	Rendement (%)
1	4,5	6	Reflux	41
1	6,5	8	Reflux	45
1	8	8	Reflux	52
1	4,5	7,5	Reflux	62

En partant de 4,5 équivalents de bromure de benzyle (C₆H₅CH₂Br) et 6 équivalents de carbonate de potassium (K₂CO₃) le rendement obtenu après purification sur colonne de silice (9 :1 cyclohexane / AcOEt) et recristallisation (2 :1 cyclohexane / AcOEt) est de 41%. Plus on augmente le nombre d'équivalent de réactifs plus le rendement augmente, en revanche, avec 8 équivalents de bromure de benzyle n'améliorent pas le rendement (52 %). 4,5 équivalents de

C₆H₅CH₂Br et 7,5 équivalents de K₂CO₃ permettent d'obtenir le produit désiré avec un rendement acceptable de 62% après purification.

2.2.2.2. Estérification

Cette étape est la même que la synthèse des composés bi-modulaire de type 1. Une estérification de Steglich en présence de DCCI et DMAP permet l'acylation de l'hydroxyle aliphatique. Des acides gras de longueurs variable ont été greffés: l'acide octanoïque (C8), l'acide laurique (C12), l'acide myristique (C14), l'acide palmitique (C16) et l'acide stéarique (C18).

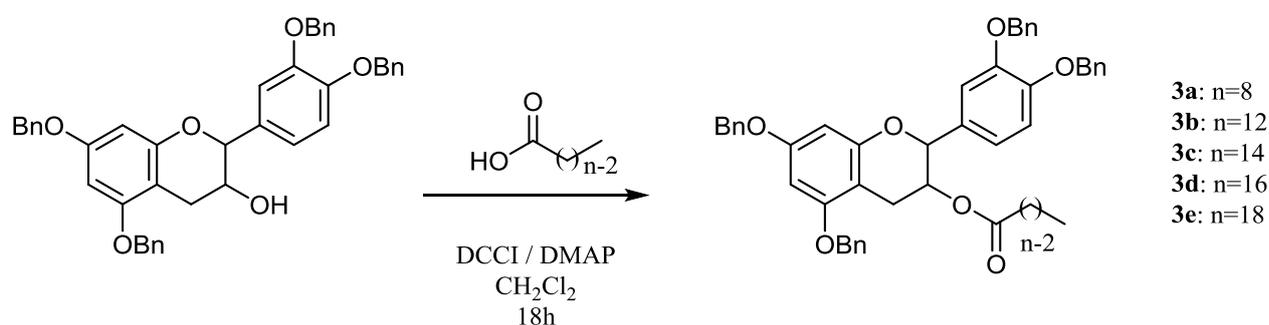


Schéma 19. Estérification de la catéchine tétra-benzylée

Tableau 4. Acylation de la catéchine tétra-benzylée

Composés	n	Rendement (%)
3a	8	80
3b	12	84
3c	14	83
3d	16	81
3e	18	78

Au cours de la réaction un précipité blanc se forme, c'est la dicyclohexylurée, un sous-produit du DCCI. Son élimination est difficile et en reste quelques traces dans le milieu même après sa filtration. Les produits ont été purifiés par chromatographie sur gel silice avec un gradient d'éluion à base de cyclohexane et d'acétate d'éthyle. L'estérification sur le OH aliphatique donne des rendements élevés quel que soit la longueur de la chaîne.

2.2.2.3. Hydrogénation

La réaction d'estérification a ensuite été suivie d'une étape de déprotection impliquant l'élimination des groupes benzyles.

La déprotection des groupements hydroxyles phénoliques a pu être réalisée par hydrogénation catalytique sous 50 bar d'hydrogène dans un mélange THF/éthanol, et en utilisant de l'hydroxyde de palladium sur charbon comme catalyseur.

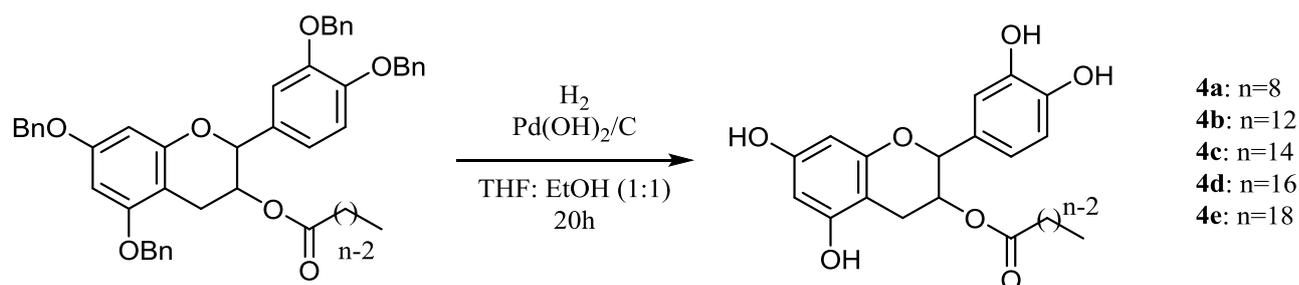


Schéma 20. Deprotection de la catéchine tétra-benzylée estérifiée

Tableau 5. Réaction de deprotection de la catéchine tetrabenzylée et estérifiée

Composés	n	Rendement (%)
4a	8	89
4b	12	92
4c	14	96
4d	16	90
4e	18	88

Les rendements de cette réaction de debenzylation sont excellents quel que soit la longueur de chaîne. Une simple filtration sur célite permet d'isoler les composés. Cependant le rendement de cette réaction de deprotection est dépendant de la longueur de chaîne de l'acide gras utilisé. Plus le nombre de carbone augmente, plus le rendement augmente comme indiqué dans le tableau 5. Au-delà de 14 carbones, le rendement diminue légèrement mais reste important. Les composés sont utilisés tels quels sans purification, leur pureté est suffisante pour déterminer leurs propriétés physicochimiques.

3. Synthèse des composés tri-modulaires (composés du type III)

Les composés tri-modulaires sont formés de trois modules : un module hydrophile et un module hydrophobe qui sont la catéchine et un acide gras respectivement, et entre ces deux modules se trouve un module de jonction correspondant à un acide aminé relié à la catéchine par une liaison ester et à l'acide gras par une liaison amide.

Nous avons envisagé trois types de composés tri-modulaires. Ces composés sont classés en trois groupes en fonction du type d'acide aminé utilisé (composés de type III).

- Composés monocaténaire où l'acide amine est l'alanine, liant une catéchine du côté carboxylique et une chaîne grasse du côté du groupe amine (composés type IIIa).

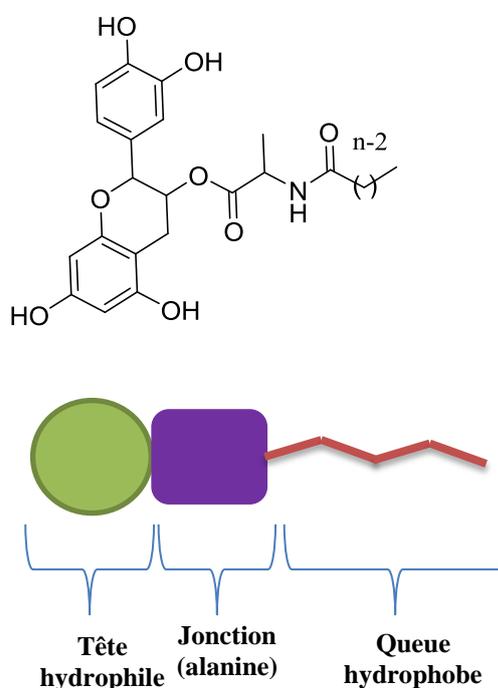


Figure 33. Composé tri-modulaire de type IIIa

- Composés bicaténaires où l'acide aminé est la lysine, liant une catéchine du côté carboxylique et deux chaînes grasses au niveau de l'amine α et de l'amine ϵ (composés type IIIb).

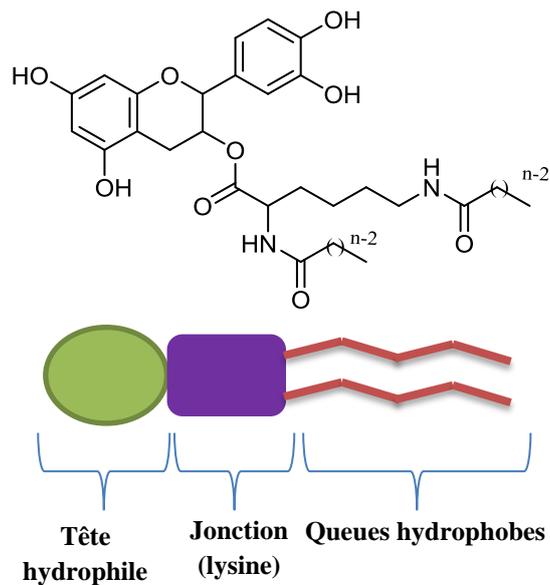


Figure 34. Structure d'un composé bicatenaire (composé tri-modulaire de type IIIb)

- Composés à deux têtes polaires polyphénoliques qui correspondent à des structures de type « gemini », où l'acide aminé est l'acide glutamique liant deux catéchine d'un côté et une seule chaîne grasse de l'autre (composés type IIIc).

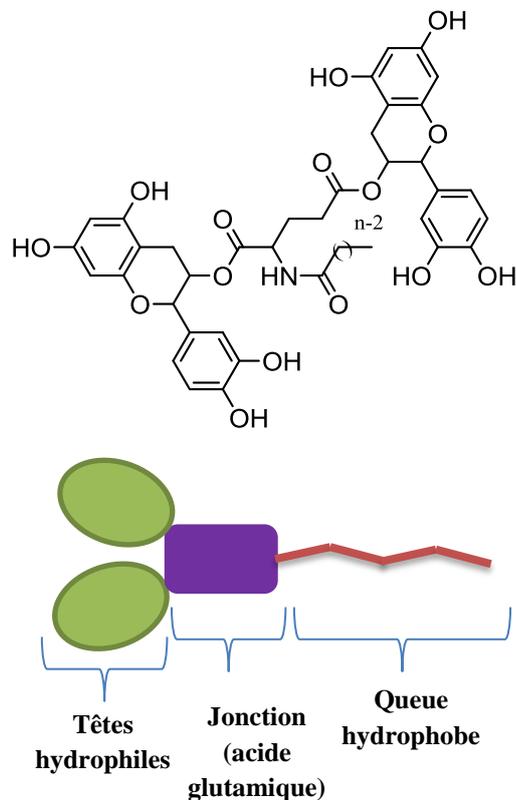


Figure 35. Structure d'un composé gemini (composé tri-modulaire de type IIIc)

3.1. Stratégie de synthèse

La stratégie suivie est celle dite « synthèse modulaire » introduite par Lattes en 1986 [14]–[16]. Elle consiste à préparer indépendamment les modules hydrophiles et hydrophobes et les assembler ensuite comme un jeu de lego. Dans notre cas, les modules ont été imbriqués par l'intermédiaire d'acides aminés qui jouent le rôle de pivot central (module de jonction). La stratégie que nous avons adoptée a consisté à réaliser dans un premier temps un bi-module hydrophobe en associant un acide aminé à un acide gras par une liaison amide. La tête polaire, qui est la catéchine, a ensuite été greffée dans un deuxième temps sur ce bi-module par une liaison ester.

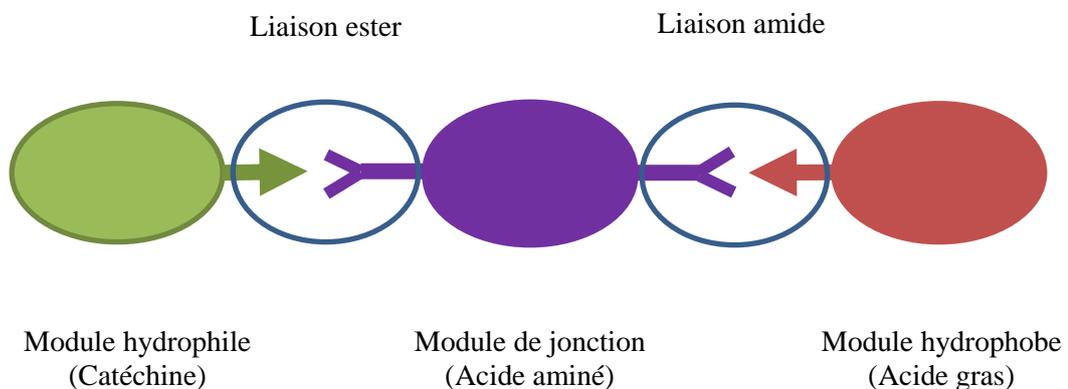


Figure 36. Détails de la structure d'un composé tri-modulaire

Les aminoacides utilisés ont été choisis, soit en tant que modèles comme l'alanine, soit en raison de leur accessibilité comme la lysine, sous-produit de l'industrie sucrière [17], qui permet d'introduire deux chaînes grasses, ou encore l'acide glutamique, présent dans de nombreuses protéines végétales et animales [18], qui permet d'introduire deux groupements phénoliques.

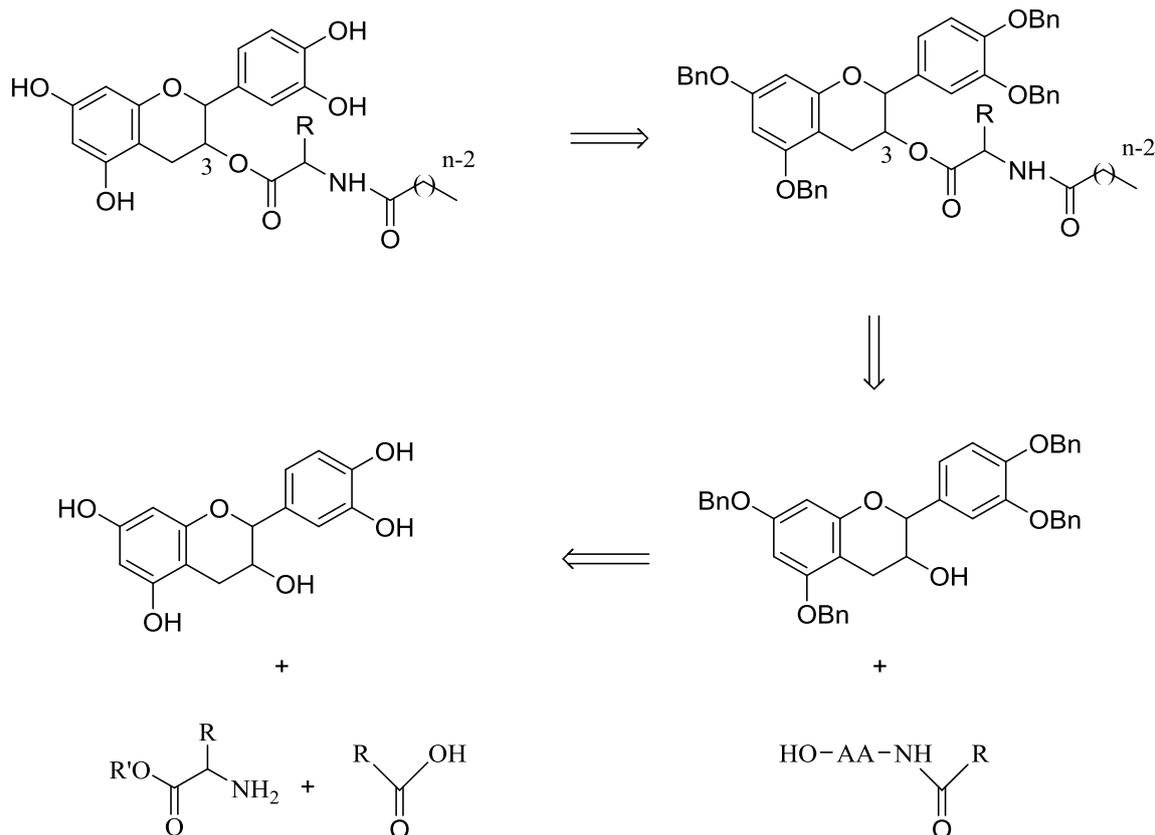


Schéma 21. Retro-synthèse des composés tri-modulaires

Nous avons envisagé un greffage au niveau de l'hydroxyle aliphatique de la catéchine. De la même façon que précédemment, une étape de protection des hydroxyles phénoliques a été nécessaire.

3.2. Synthèse

C'est une synthèse multi-étape également, comportant cinq étapes :

- benzoylation de la catéchine afin de protéger les OH phénolique,
- couplage de l'ester d'acide aminé avec l'acide gras, transformation du groupe ester de ce couple en acide carboxylique,
- estérification de la catéchine tetra-benzylée avec le couple acide aminé – acide gras,
- deprotection de la catéchine tetra-benzylée estérifiée par hydrogénation catalytique.

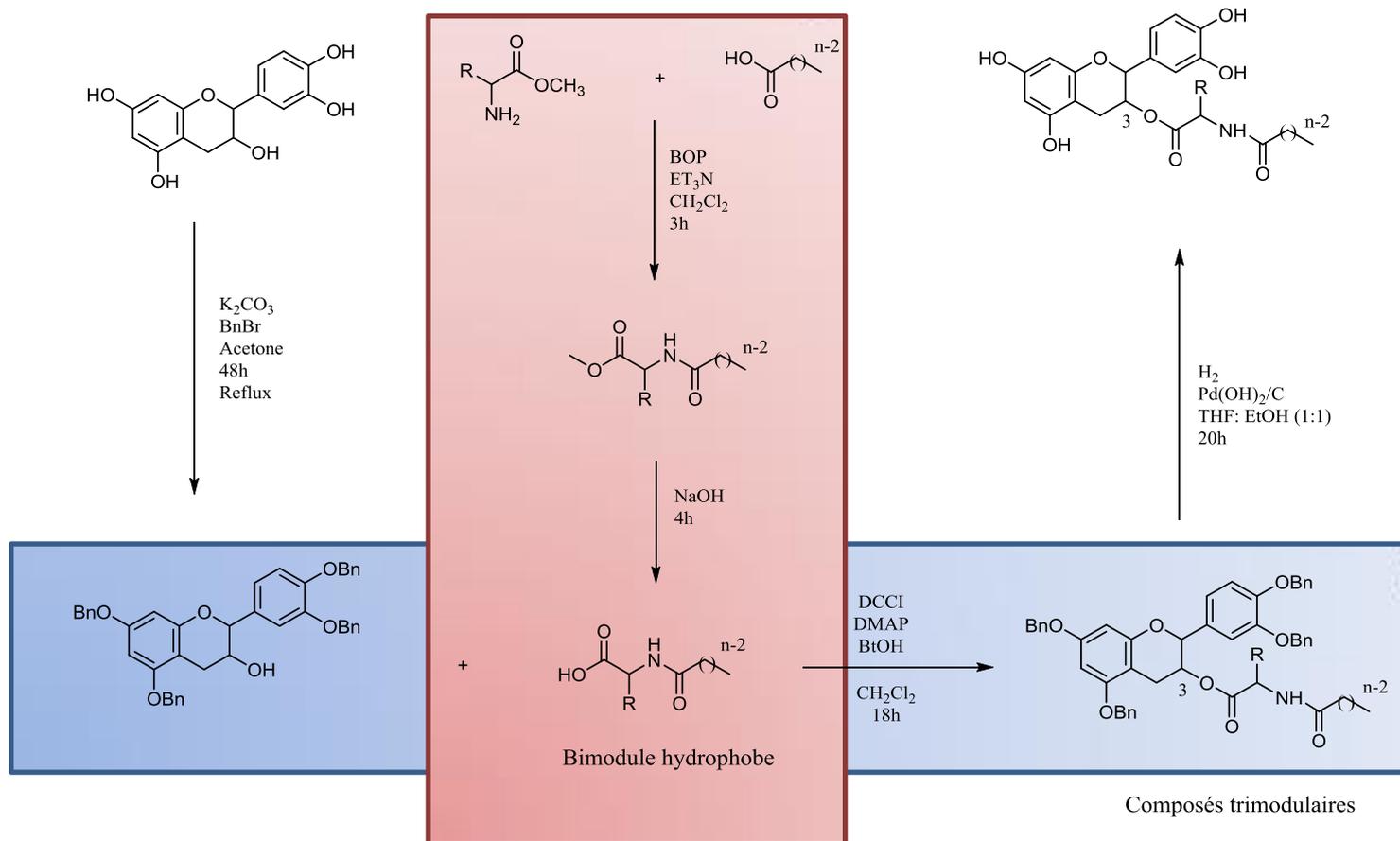


Schéma 22. Les étapes de la synthèse des composés tri-modulaires

3.2.1. Synthèse de N-acétyl-α-aminoacide

Les acides aminés sont bifonctionnels par définitions et peuvent se coupler entre eux [19], pour coupler l'acide aminé avec l'acide gras il est nécessaire que la fonction amine de l'acide aminé soit protégée. Des acides aminés commerciaux protégés sur la fonction acide carboxylique ont été utilisés: l'alanine éthyle ester, l'acide glutamique diméthyle ester et la lysine éthyle ester. Les acides carboxyliques utilisés sont les suivants : acide octanoïque, acide laurique, acide myristique, acide palmitique. Le benzotriazol-1-yl-oxo-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) bien connu en synthèse peptidique a été utilisé comme agent de couplage. Ne faisant pas partie des composés « verts », et son utilisation génère du HMPT, le BOP permet d'obtenir les produits rapidement. De plus, c'est un réactif qui est facile à utiliser ; il conduit également la plupart du temps à d'excellents rendements et les sous-produits sont facilement éliminés.

3.2.1.1. Couplage acide gras – acide aminé

3.2.1.1.1. A base d'alanine et d'acide glutamique

Comme l'alanine et l'acide glutamique possèdent chacun une seule fonction amine, un seul acide gras a été greffé (Schémas 23 et 24). Ce couplage ayant lieu entre l'acide aminé et l'acide gras nous a permis d'obtenir une fonction amide.

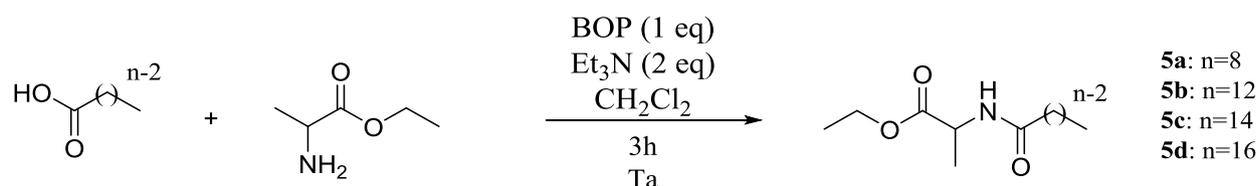


Schéma 23. Synthèse de N-acyl alaninate d'éthyle

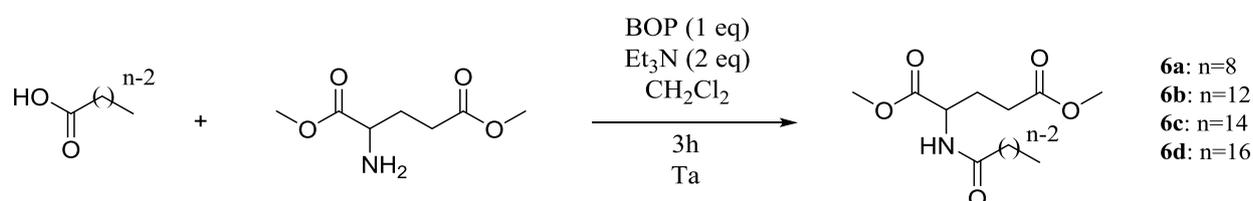


Schéma 24. Synthèse de N-acyl glutamate de diméthyle

Le couplage de l'alanine éthyle ester avec l'acide octanoïque (C8) conduit à la formation d'un produit visqueux de couleur jaune. En revanche avec les autres longueurs de chaînes, ainsi que le couplage entre l'acide glutamique diméthyle ester et les différents acides gras, les produits obtenus sont sous forme de poudre blanche.

Le tableau 6 montre les rendements obtenus des couplages réalisés. Ces rendements avec l'alanine et l'acide glutamique sont très bons quelle que soit la longueur de chaîne de l'acide gras. Aucune étape de purification n'a été réalisée après ces synthèses en raison de la pureté suffisante des produits obtenus, mais plusieurs lavages ont été réalisés afin d'éliminer le HMPT, un sous-produit du BOP qui se forme durant la réaction.

Tableau 6. Rendements du N-acyl alaninate d'éthyle et du N-acyl glutamate de diméthyle avec les différents la longueur de chaines grasses

Composés	n	Rendement (%)
5a	8	93
5b	12	92
5c	14	95
5d	16	94
6a	8	91
6b	12	91
6c	14	93
6d	16	94

3.2.1.1.2. A base de lysine

La lysine est un acide aminé possédant deux fonctions amines, et donc pour greffer deux chaîne grasses, deux équivalent d'acide gras et de BOP et quatre équivalents de triéthyle amine ont été utilisés.

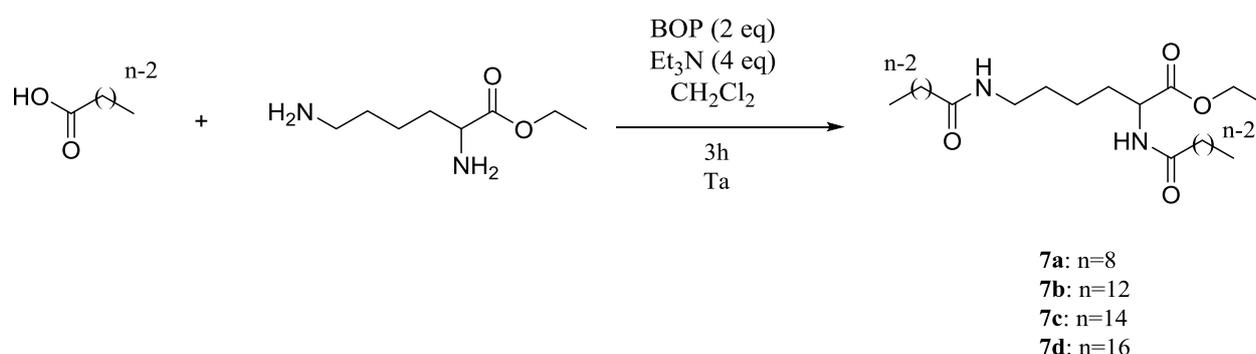


Schéma 25. Synthèse de N, N'-diacyl lysinate de diéthyle

Lors de la réaction, un phénomène de précipitation a été observé avec toutes les longueurs de chaîne. Après une filtration et une étude de RMN, il a été constaté que c'est le produit désiré qui précipite. Des petites traces de produits solubilisés sont restées dans le milieu et ont été difficilement récupéré par extraction. Plus la longueur de chaîne augmente et plus c'est difficile de récupérer cette fraction, ce qui explique la légère diminution des rendements

lorsque la longueur de la chaîne grasse augmente. Mais de manière générale, les rendements de cette réaction de couplage de la lysine avec des acides gras restent élevés.

Tableau 7. Rendements du N, N'-diacyl lysinate de diéthyle avec les différents la longueur de chaînes grasses

Composés	n	Rendement (%)
7a	8	95
7b	12	92
7c	14	87
7d	16	85

3.2.1.2. Saponification

Après couplage de ces acides aminés avec les acides gras de différentes longueurs de chaîne par amidation, les produits obtenus ont été déprotégés par saponification pour obtenir une fonction acide carboxylique utile pour réaliser le greffage du troisième module qui est la catéchine tetrabenzylée.

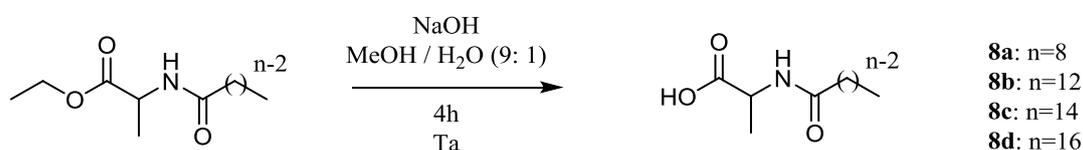


Schéma 26. Saponification de N-acyl alaninate d'éthyle

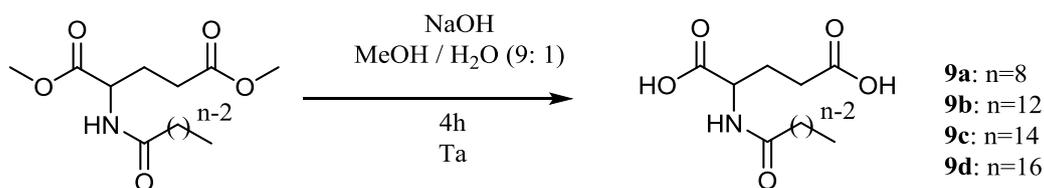


Schéma 27. Saponification de N-acyl glutamate de diméthyle

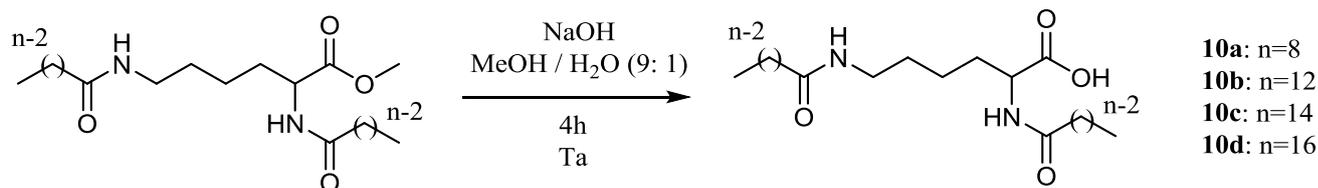


Schéma 28. Saponification de N, N'-diacyl lysinate de diéthyle

Cette saponification se fait en présence d'un excès de NaOH (5 eq.) à température ambiante dans un mélange méthanol / eau 9 :1. Les produits sont obtenus par acidification par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1M). Des précipités se forment après 4 heures de réaction et après acidification pour tous les composés sauf pour le composé **8a** qui a été extrait 2 fois avec l'acétate d'éthyle après son acidification.

Les rendements de la réaction de saponification sont très élevés quels que soient l'acide aminé et l'acide gras.

Tableau 8. Rendements des réactions de saponification

Composés	n	Rendement (%)
8a	8	93
8b	12	92
8c	14	95
8d	16	94
9a	8	91
9b	12	91
9c	14	93
9d	16	94
10a	8	95
10b	12	92
10c	14	87
10d	16	85

La saponification de groupements esters est bien visible sur les spectres RMN ¹H puisqu'en effet les deux signaux correspondant à un ester d'éthyle, en l'occurrence un quadruplet à 4.13 ppm et un triplet à 1.23 ppm disparaissent dans le spectre des produits finals. La figure ci-dessous présente les spectres correspondants, dans le cas de la saponification du N-hexadecanoyl alaninate d'éthyle.

Ce même profil est observé pour les autres acides aminés également avec toutes les longueurs de chaînes.

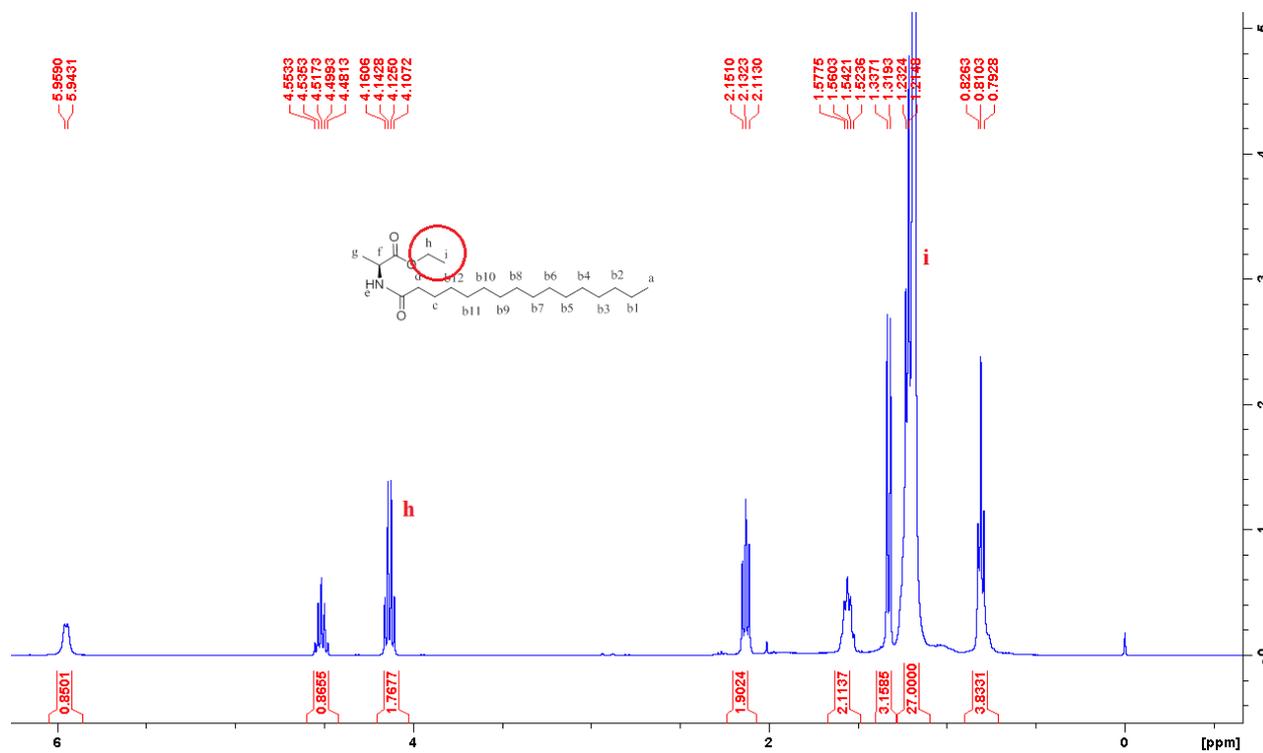


Figure 37. RMN ^1H du N-hexadecanoyl alaninate d'éthyle

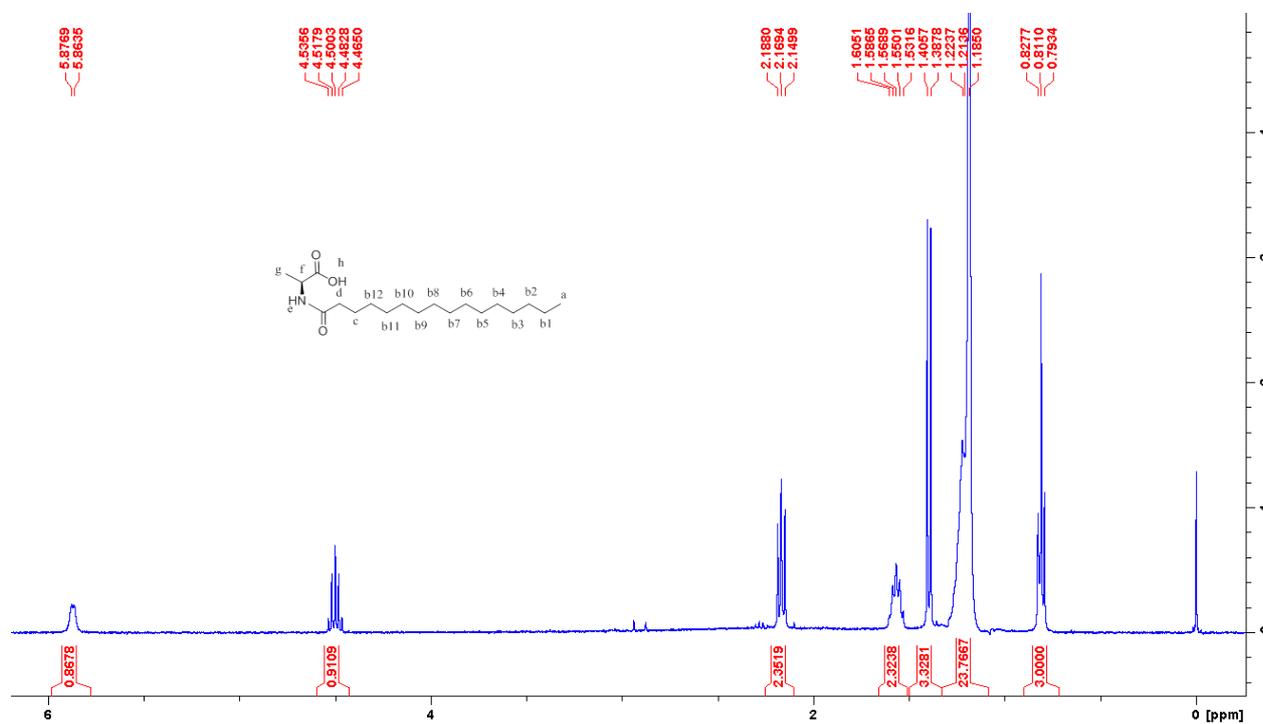


Figure 38. RMN ^1H du produit issu de la saponification du N-hexadecanoyl alaninate d'éthyle

3.2.2. Synthèse du composé tri-modulaire : greffage des N-acylaminoacides avec la catéchine

Nous nous sommes intéressés ensuite au couplage des bi-modules hydrophobes, (acide aminé – acide gras), à la catéchine tetra-benzylée. Il s'agit en l'occurrence de réaliser une estérification entre la fonction acide carboxylique du bi-module et l'hydroxyle de la catéchine. C'est la même réaction utilisée pour la synthèse des composés bi-modulaires de type I et de type II.

3.2.2.1. A base d'alanine

Tout d'abord, nous avons essayé de coupler le bi-module hydrophobe synthétisé à base d'alanine avec la catéchine tetra-benzylée en présence du BOP. En revanche aucun couplage n'a eu lieu. Pour cela l'estérification de Steglich en présence de DCCI et de DMAP a été réalisée.

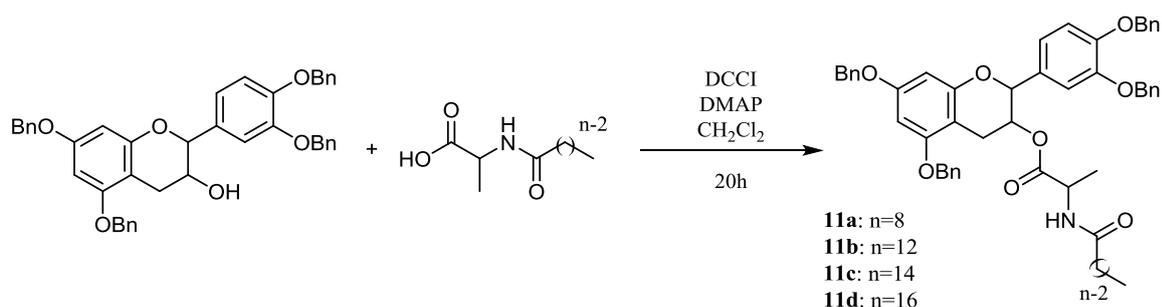


Schéma 29. Estérification de la catéchine tetra-benzylée avec le module hydrophobe alanine -acide gras

Les rendements de la réaction sont présents dans le tableau suivant.

Tableau 9. Rendements des réactions d'estérification des composés à base d'alanine

Composés	n	Rendements (%)
11a	8	72
11b	12	79
11c	14	81
11d	16	77

Les rendements de cette estérification varient en fonction de la longueur de chaîne de l'acide gras. Plus on augmente cette longueur de chaîne, plus le rendement augmente pour atteindre 81% avec l'acide myristique (C14).

3.2.2.2. A base d'acide glutamique et de lysine

Comme le montre le tableau ci-dessous, pour les composés à base de lysine et d'acide glutamique, leur estérification a été réalisée en premier lieu comme les composés à base d'alanine et les composés bi-modulaires en présence de DCCI et DMAP. Les rendements ont été trop faibles avec toutes les longueurs de chaînes d'acide gras. Ces faibles rendements peuvent être expliqués par la non transformation et la non consommation totale du produit de départ durant la réaction ce qui induit à la formation de petite trace de produits.

Tableau 10. Rendements des réactions d'estérification des composés à base d'acide glutamique et de lysine en présence de DCCI et DMAP

Composés	n	Rendements (%)
12a	8	32
12b	12	30
12c	14	31
12d	16	28
13a	8	19
13b	12	23
13c	14	17
13d	16	15

Les composés à base de lysine possèdent deux chaînes grasses et ceux à base d'acide glutamique possèdent deux catéchines tetra-benzylées. La présence de ces deux groupements peut créer durant la réaction d'estérification des microenvironnements qui empêchent celle-ci d'avoir lieu d'une façon efficace. Pour améliorer les rendements d'estérification dans le cas de ces molécules encombrées, nous avons choisis d'ajouter de l'hydroxybenzotriazole (HOBT), bien connu en synthèse peptidique pour obtenir un ester actif [20] et améliorer la réaction.

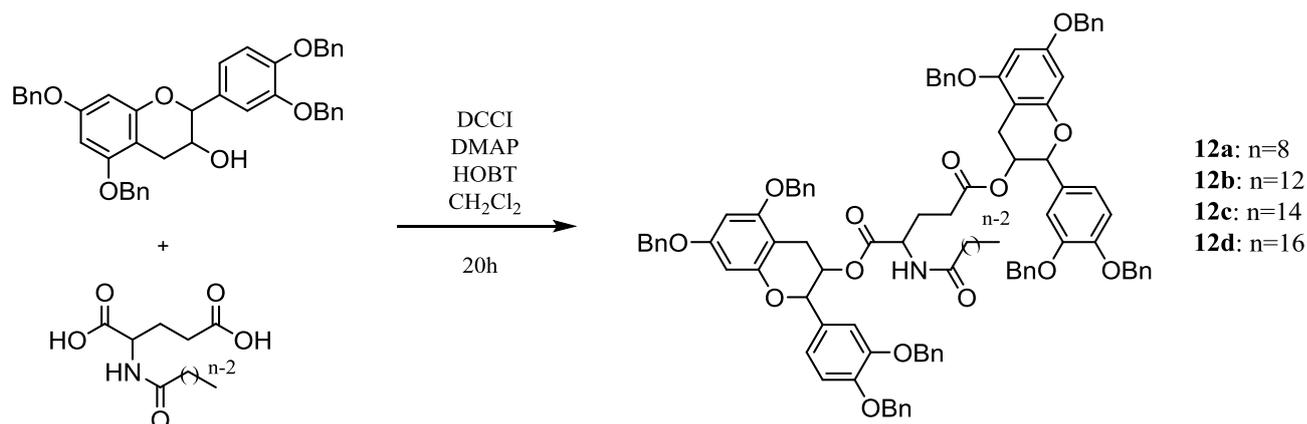


Schéma 30. Estérification de la catéchine tétra-benzylée avec le module hydrophobe acide glutamique -acide gras

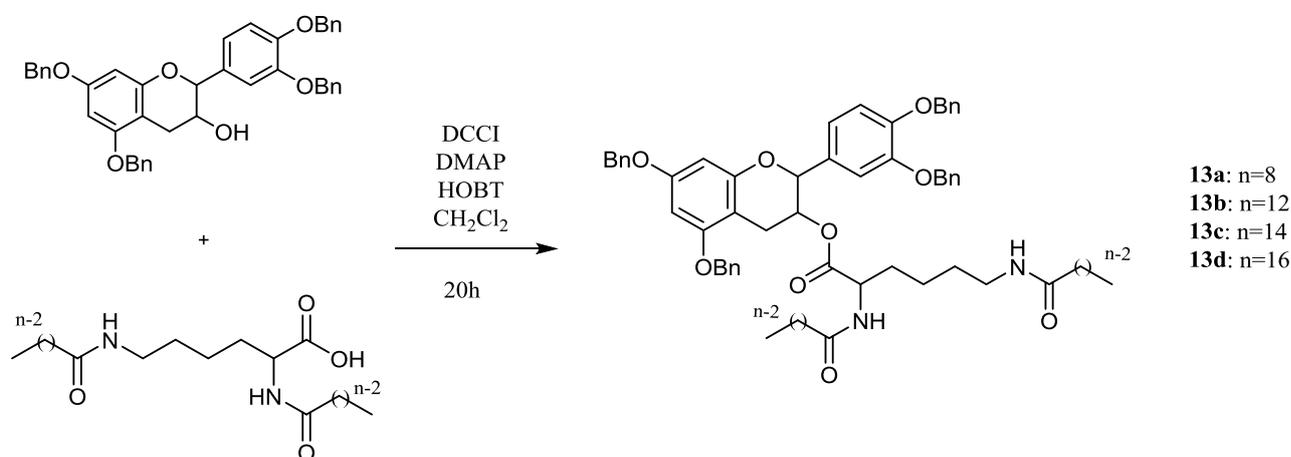


Schéma 31. Estérification de la catéchine tétra-benzylée avec le module hydrophobe lysine -acide gras

A la fin de la réaction un précipité a été observé, il s'agit de la dicyclohexylurée, un sous-produit du DCCI qui a été filtré par la suite. A ce stade de la synthèse des composés trimodulaires, une purification par chromatographie sur gel de silice est nécessaire pour enlever toute les traces du dicyclohexylurée et éviter les purifications dans l'étape suivante.

Tableau 11. Rendements des réactions d'estérification des composés à base d'acide glutamique et de lysine en présence de DCCI, DMAP et HOBT

Composés	n	Rendements (%)
12a	8	78
12b	12	82
12c	14	88

12d	16	79
13a	8	80
13b	12	85
13c	14	85
13d	16	82

Le tableau ci-dessus montre les rendements des estérifications avec la lysine et l'acide glutamique. L'ajout du HOBt permet d'obtenir des meilleurs rendements en comparaison aux estérifications où ce produit n'était pas utilisé.

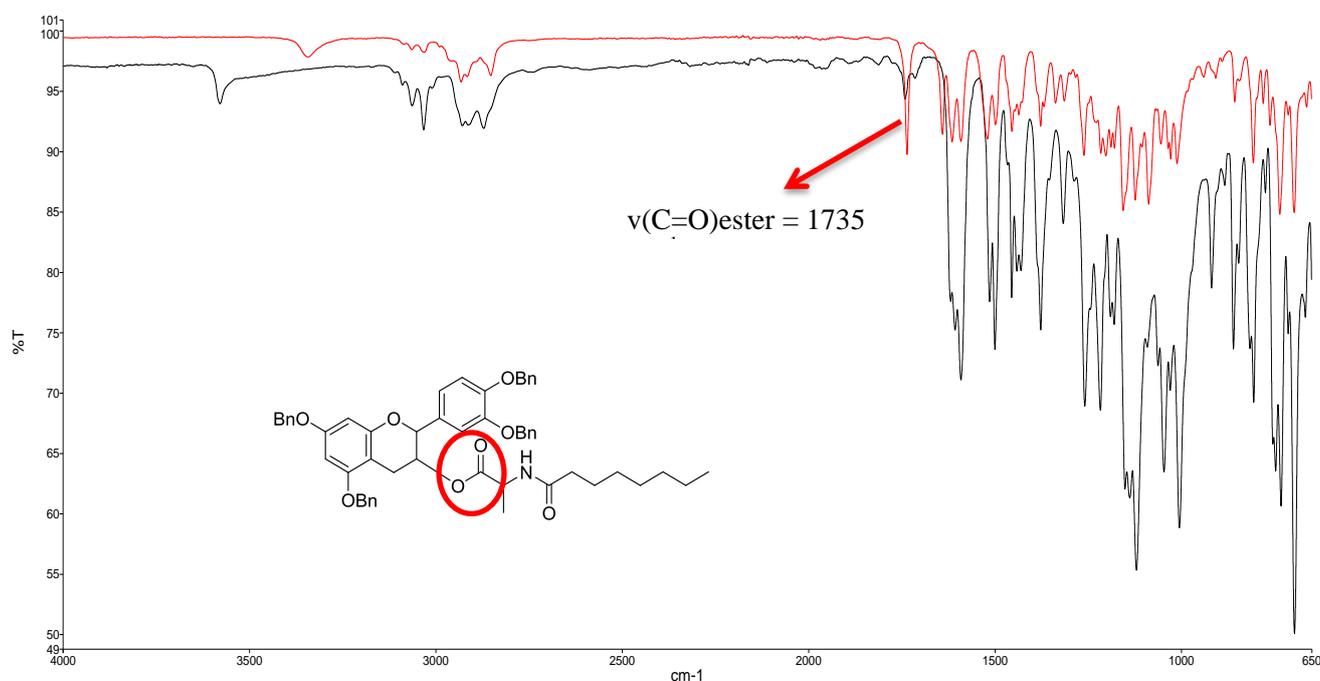


Figure 39. Spectres infrarouge de la catéchine tetrabenzylée (en noir) et la catéchine tetrabenzylée acylée (en rouge)

Le spectre infrarouge montre l'apparition d'une bande ester vers 1725 cm⁻¹ pour la catéchine benzylée acylée. En revanche cette bande n'existe pas pour la catéchine benzylée. Cela peut montrer que l'estérification a bien eu lieu. Ces résultats ont été confirmés également par la suite par RMN.

3.2.3. Deprotection des groupements benzyliques

Nous avons choisi de déprotéger les groupements benzyliques par hydrogénation afin d'obtenir des composés monocaténaire (schéma 32), bicaténaire (schéma 33) et des composés à deux têtes polaires (schéma 34).

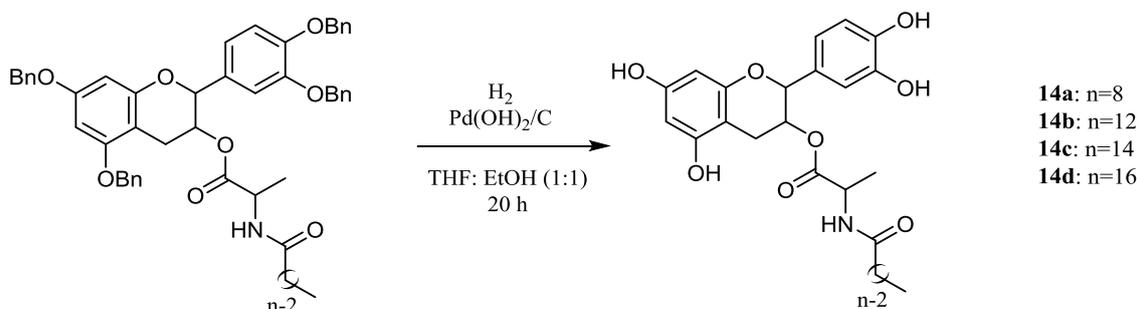


Schéma 32. Hydrogénation pour l'obtention du composé monocaténaire

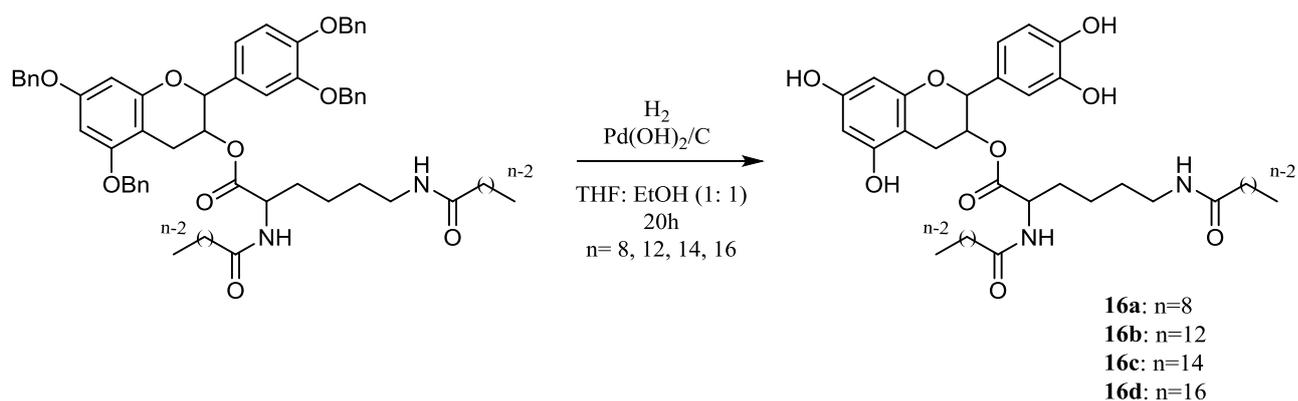


Schéma 33. Hydrogénation pour l'obtention du composé bicaténaire

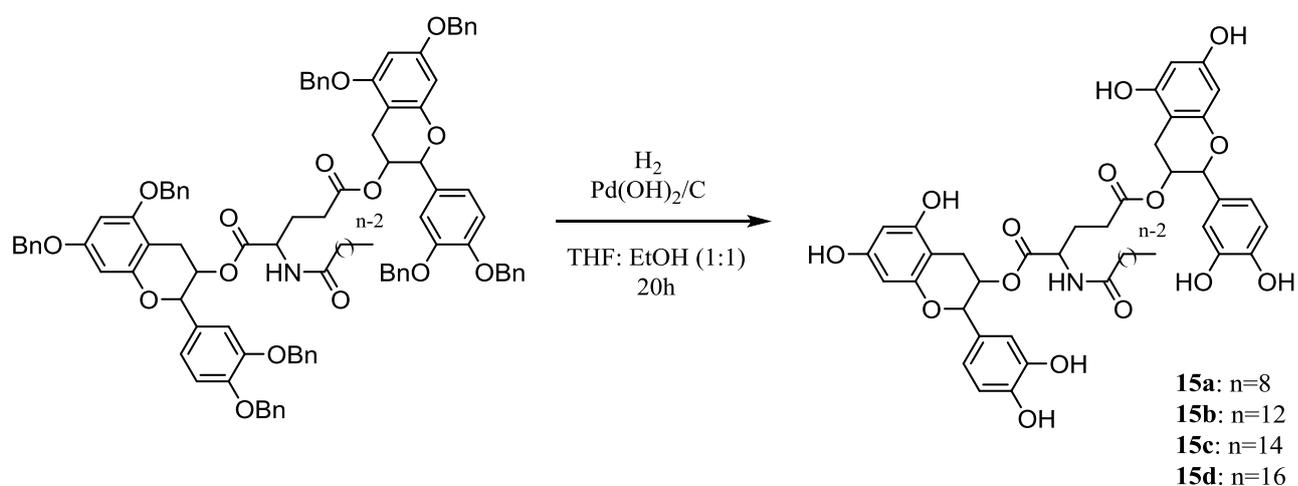


Schéma 34. Hydrogénation pour l'obtention du composé à deux têtes polaires

Tableau 12. Rendements des réactions d'hydrogénation des composés à base d'alanine, acide glutamique et lysine

Composés	n	Rendements (%)
14a	8	92
14b	12	92
14c	14	95
14d	16	93
15a	8	90
15b	12	93
15c	14	95
15d	16	93
16a	8	92
16b	12	93
16c	14	97
16d	16	94

Les composés obtenus ont été isolés par filtration sur célite. Les rendements de la dernière étape de cette synthèse multi-étapes varient entre 90 et 97% pour les trois acides aminés avec les différents acides gras sans purification par chromatographie. Le spectre IR montre qu'après hydrogénation une bande large vers 3300 cm^{-1} apparaît correspondant aux OH phénolique, indiquant que la deprotection des groupements benzyle a bien lieu. On observe ce même profil de spectre infrarouge chez tous les autres composés tri-modulaires.

La pureté des composés obtenus est suffisante pour tester leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

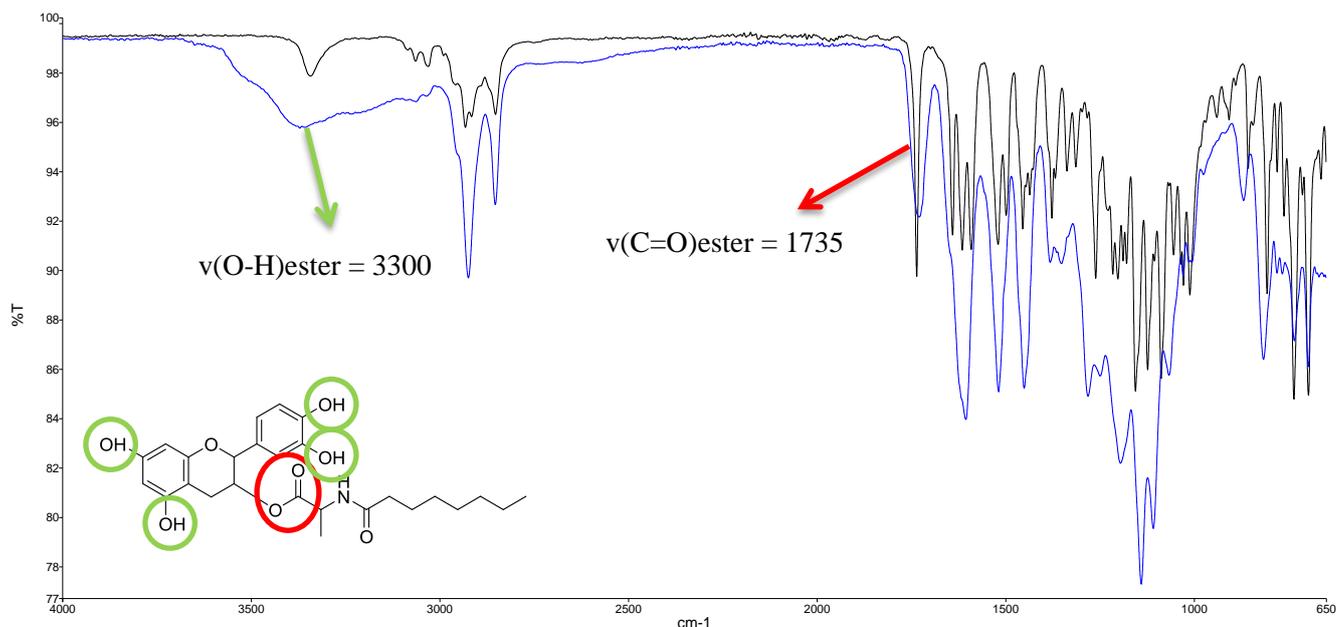


Figure 40. Spectres infrarouge de la catéchine tetrabenzylée acylée (en noir rouge) et la catéchine acylée et déprotégée (en bleu)

4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la valorisation de la biomasse en synthétisant des composés bi- et tri-modulaires amphiphiles biosourcés.

Trois séries de molécules ont été synthétisés:

- des composés bi-modulaires comportant une chaîne grasse sur l'un des hydroxyles phénoliques de la catéchine (type I).
- des composés bi-modulaires comportant une chaîne grasse sur l'hydroxyle aliphatique de la catéchine (type II)
- des composés tri-modulaires comportant un acide aminé et une chaîne grasse sur l'hydroxyle aliphatique de la catéchine (type III).

Pour les composés bi-modulaires de type 2, les groupements hydroxyles phénoliques ont été protégés par benzylation afin de cibler le greffage du module hydrophobe qui est l'acide gras sur le OH aliphatique, OH en position 3. Finalement une étape de deprotection a été réalisée.

La synthèse des composés tri-modulaires consistait à préparer indépendamment le module hydrophobe avant de le relier par un module de jonction ici les acides aminés (alanine, lysine

et acide glutamique) au module hydrophile. Trois types de composés tri-modulaires ont été obtenus :

- les composés monocaténaire ayant une seule tête polaire liée à une seule chaîne grasse par l'alanine,
- les composés bicaténaires où on a une seule tête hydrophobe liée à deux chaînes grasses par la lysine qui possède deux groupements amines,
- les composés à deux têtes polaires, aussi appelés structures gémeaux car deux têtes polaires, deux catéchines, sont liées à une chaîne grasse par le module de jonction, l'acide glutamique.

Les résultats obtenus pour la synthèse des composés bi- et tri-modulaires étaient très satisfaisants dans l'ensemble car les ayant tous obtenus avec des rendements supérieurs à 70% avec une pureté nécessaire pour pouvoir étudier leurs propriétés physicochimiques. L'étude sur les propriétés physicochimiques et biologiques des composés synthétisés fera l'objet du chapitre suivant.

Partie 2:Fonctionnalisation par biocatalyse enzymatique

Bien que les procédés de synthèse chimique d'esters de flavonoïdes permettent souvent d'obtenir de bons rendements, il y a quelques inconvénients comme l'utilisation de réactifs chimiques qui diminuent l'indice de naturalité des produits, et le manque de sélectivité qui aboutit à des purifications qui peuvent être difficiles. Beaucoup de chercheurs s'intéressent à l'acylation par voie enzymatique catalysée par des lipases, qui est plus régiosélective, utilise peu ou pas de réactifs chimiques, et se déroule dans des conditions réactionnelles douces.

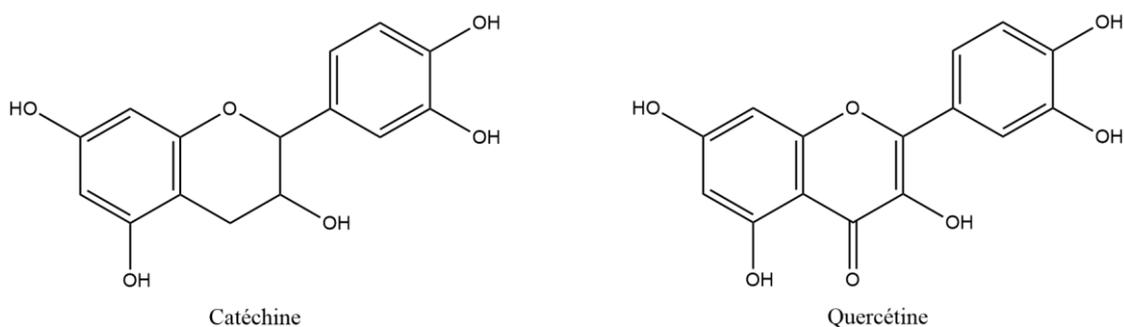
Les performances de la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes dépendent de plusieurs facteurs tels que la teneur en eau du milieu réactionnel, les structures des donneurs et receveurs d'acyle, l'origine du biocatalyseur et la nature du solvant. Ce chapitre porte sur la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes et d'acides gras catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) en milieu organique pauvre en eau.

L'objectif de ce chapitre est de synthétiser des composés bi- et tri-modulaires par voie enzymatique en partant de flavonoïdes aglycones et de flavonoïdes glycosylés afin de générer une diversité de produits et de déterminer l'effet de la structure de ces derniers sur leurs propriétés. L'effet de la structure des substrats sur les performances réactionnelles sera également étudié.

1. Acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones

1.1. Conditions de départ issues de la littérature

Comme il a été mentionné précédemment, différents facteurs peuvent jouer sur la synthèse des esters de flavonoïdes. Il nous a donc paru nécessaire d'effectuer une synthèse d'ester de flavonoïdes dans les mêmes conditions que celles citées dans la littérature afin d'avoir un point de départ. Trois flavonoïdes ont été choisis en raison de leurs structures intéressantes : la catéchine qui possède quatre groupements hydroxyles phénoliques et un groupement hydroxyle secondaire porté par l'hétérocycle central, la quercétine qui présente également quatre groupements phénoliques et une fonction hydroxyle tertiaire et la naringénine dont la structure comporte trois groupements phénoliques (figure 1). L'objectif est de synthétiser des composés bi-modulaires par héli-synthèse et de comparer le potentiel de la voie chimique et de la voie enzymatique pour leur obtention. Les conditions expérimentales choisies initialement pour les réactions d'acylation enzymatique de ces flavonoïdes aglycones sont issues de la publication de Saik *et al.* (2016) [21]: l'acide oléique est utilisé comme donneur d'acyle, un ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle de 1 : 20 est fixé, la réaction est menée à une température de 60 °C dans l'acétonitrile comme solvant ; elle est catalysée par la lipase CAL-B et poursuivie pendant 7 jours. Dans ces travaux, trois esters de quercétine avaient pu être synthétisés : un 4'-monoester, un 3',4'-diester et un 7,3',4'-triester. Les auteurs indiquent un taux de conversion de la quercétine de 25%. Dans notre étude, aucune acylation ne semble avoir eu lieu. L'observation du milieu réactionnel a révélé une solubilisation limitée des flavonoïdes, pouvant expliquer l'absence de réaction. Pour contourner cette difficulté, d'autres solvants ont été utilisés pour mener les réactions.



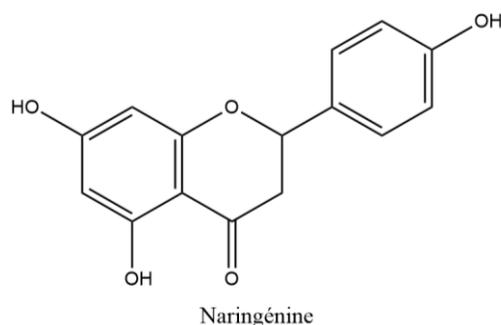


Figure 41. Structure chimique de la catéchine, de la quercétine et de la naringénine

1.2. Effet du solvant sur la réaction d'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones

La solubilité des substrats et leur vitesse de dissolution peuvent affecter les performances des réactions dans lesquelles ils sont engagés en limitant la quantité de substrat disponible dans le milieu. Ces éléments sont d'autant plus importants que les flavonoïdes sont connus pour leur faible solubilité dans de nombreux milieux. Trois solvants ont été choisis comme milieu pour les réactions d'acylation : le 2-méthyle 2-butanol (M2B2), l'acétone et l'acétonitrile. Ces trois solvants ont été séchés pendant cinq jours sur du tamis moléculaire.

Malgré l'utilisation de trois solvants différents, aucune acylation n'a eu lieu, quelle que soit la nature du flavonoïde et quel que soit le solvant. Comme précédemment, la solubilité incomplète des flavonoïdes a été observée dans l'acétonitrile ; une concentration importante du milieu par évaporation du solvant a été constatée avec l'acétone malgré la solubilisation totale des substrats dans ce solvant ; en revanche avec le M2B2 une solubilisation totale des substrats est observée. Ce dernier solvant a donc été choisi pour poursuivre les travaux relatifs à l'acylation des flavonoïdes aglycones.

Tableau 13. Résultats obtenus lors de l'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones menée dans différents solvants

Flavonoïdes	Donneur d'acyle	Ratio molaire	Solvant	Température (°C)	Enzyme	Acylation
Catéchine	Acide oléique	1:20	Acétonitrile	60	CAL-B	Pas d'acylation
Quercétine			Acétone			
Naringénine			M2B2			

1.3. Effet du ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle sur la réaction d'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones

En raison du mécanisme réactionnel des lipases, il est généralement admis qu'il est préférable de travailler en présence d'un excès de donneur d'acyle par rapport aux substrats accepteurs d'acyle. En effet, l'étape cinétiquement limitante est la formation du complexe enzyme-donneur d'acyle. D'un autre côté, un excès de donneur d'acyle peut rendre la purification de l'ester plus complexe. Dans la littérature, la plupart des travaux sur l'acylation de flavonoïde par des lipases ou des protéases a été effectuée en présence d'un excès d'au moins trois équivalents de donneur d'acyle (Kontogianni *et al.*, 2001 ; Riva *et al.*, 1996) [22], [23]. Kontogianni *et al.* ont utilisé des ratios molaires flavonoïde : donneur d'acyle allant de 1 :3 jusqu'à 1 :18 pour synthétiser des esters de naringine avec des taux de conversion de 65%, alors que Riva *et al.* ont utilisé un ratio 1 :15 pour synthétiser des esters de l'acide malonique. Cet excès peut monter jusqu'à 600 équivalents lorsque la synthèse se déroule en milieu fondu (Enaud *et al.*, 2003) [24]. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre la concentration résiduelle en acide compatible avec la purification des esters produits et une vitesse de réaction suffisamment élevée. Pour chercher ce compromis quatre ratios molaires flavonoïde : donneur d'acyle différents ont été testés : 1 : 5, 1 :10, 1 : 20 et 1 :100. Le tableau 14 montre les conditions expérimentales ainsi que les résultats obtenus pour l'acylation de la catéchine, la quercétine et la naringénine avec l'acide octanoïque ou l'acide laurique, en présence de différents ratios molaires de substrats.

Tableau 14. Résultats obtenus lors de l'acylation de la catéchine, quercétine et naringénine en présence de différents ratios molaires flavonoïde : acide gras

Flavonoïdes	Donneur d'acyle	Ratio molaire	Solvant	Température (°C)	Enzyme	Acylation
Catéchine Querétine Naringénine	Acide oléique et acide octanoïque	1:5, 1:10, 1:20, 1:100	M2B2	60	CAL-B	Pas d'acylation

De même que précédemment, malgré une solubilisation totale des flavonoïdes et différents excès de substrat donneur d'acyle, aucune réaction n'a été observée. Ceci nous a poussés à modifier un facteur essentiel dans cette synthèse qui est l'enzyme.

1.4. Effet de l'origine de l'enzyme sur la réaction d'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones

Les enzymes doivent tout d'abord se lier à leurs substrats avant de pouvoir catalyser toute réaction chimique. Les enzymes sont plus ou moins spécifiques en ce qui concerne à la fois les substrats auxquels elles peuvent se lier et les réactions qu'elles sont susceptibles de catalyser. Cette spécificité résulte de la configuration de leurs sites de liaison, qui sont des poches présentant une complémentarité de forme avec les substrats. La distribution spatiale des charges et des résidus hydrophiles ou hydrophobes dans la structure protéique entre en jeu également. Les enzymes peuvent ainsi faire la différence entre des molécules très semblables, ce qui assure leur chimiosélectivité, leur régiosélectivité et leur stéréosélectivité. Six enzymes ont été choisies pour catalyser l'acylation de la quercétine par l'acide oléique. Les enzymes testées sont les lipases produites par *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa* et *Thermomyces lanuginosus*.

Tableau 15. Résultats obtenus lors de l'acylation de la quercétine par l'acide oléique, en présence de différentes lipases

Flavonoïdes	Donneur d'acyle	Ratio molaire	Solvant	Température (°C)	Enzymes	Acylation
Quercétine	Acide octanoïque	1:20	M2B2	60	<i>Candida antarctica</i>	Pas d'acylation
					<i>Burkholderia cepacia</i>	Acylation 59%
					<i>Rhizomucor miehei</i>	Pas d'acylation
					<i>Aspergillus oryzae</i>	
					<i>Candida rugosa</i>	
					<i>Thermomyces lanuginosus</i>	

Le tableau 14 montre qu'en présence de la lipase de *Burkholderia cepacia* (PSL-C) la quercétine est convertie en dérivé acylé à hauteur de 59%, ce qui est en accord avec la littérature. En effet, Chebil *et al.* (2007) ont montré que des esters de quercétine ont été synthétisés en présence de cette enzyme, au niveau du groupement hydroxyle en position 4' du cycle B [25]. En contrepartie aucune acylation n'a été observée avec les autres enzymes. Ces résultats sont en contradiction à ceux de la littérature. Saik *et al.* (2016) (2020) ont réussi à synthétiser des esters de quercétine avec CAL-B au niveau des positions 3'-OH, 4'-OH et 7-

OH [26] [27]. Kyriakou *et al.* (2018) avec la CAL-B ainsi que Xie *et al.* (2012) avec une estérase thermophile (APE1547) ont également réussi à synthétiser des esters de quercétine avec des taux de conversion respectifs de 33% et 74% [28]. Patti *et al.* (2000) ont réussi à synthétiser avec *Mucor miehei* des esters de catéchine avec un taux de conversion de 90% [29]. Zhou *et al.* (2021), quant à eux, ont montré que la lipase de *Candida antarctica* permet de synthétiser des esters de catéchine avec un rendement de conversion du flavonoïde de 60% [30]. Par contre, des travaux ultérieurs réalisés au Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP) par Ardhaoui *et al.* (2004), Chebil *et al.* (2006, 2007), De Oliveira *et al.* (2010), et Bidouil *et al.* (2011) ont montré l'absence d'acylation de la quercétine en présence de CAL-B [31]–[35]. Les résultats portant sur l'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones sont donc contradictoires et semblent dépendre des conditions réactionnelles appliquées. En particulier, l'hypothèse d'un effet de l'activité de l'eau dans les milieux réactionnels peut être formulée même si l' a_w mesurée dans nos milieux réactionnels (0,13) est similaire à celle indiquée par les auteurs des publications mentionnées.

1.5. Effet de la nature du donneur d'acyle sur la réaction d'acylation enzymatique de flavonoïdes aglycones

La nature du donneur d'acyle est un élément important dans les réactions d'acylation enzymatique des flavonoïdes. Elle peut jouer sur les performances de la réaction ainsi que sur les propriétés de l'ester synthétisé. L'étude de la spécificité de substrat des lipases est à l'origine de travaux concernant l'effet des donneurs d'acyle sur l'activité de l'enzyme et sur les performances réactionnelles.

Au vu des résultats peu encourageants obtenus lors de l'acylation des flavonoïdes aglycones par les acides gras simples en présence de CAL-B, la transestérification de la quercétine par des esters vinyliques a été étudiée. La transestérification nommée aussi alcoololyse est une réaction entre un ester et un alcool conduisant à la formation d'un nouvel ester [36]. Les esters de vinyle constituent des substrats donneurs d'acyle intéressants pour les réactions de transestérification. En effet, cette réaction étant réversible, elle nécessite d'éliminer continuellement l'alcool produit, afin de déplacer l'équilibre réactionnel en faveur de l'ester d'intérêt. Or, dans le cas des esters de vinyle, l'alcool vinylique produit au cours de la réaction, se tautomérise en acétaldéhyde qui ne peut intervenir en tant que substrat de cette réaction. Ceci confère un caractère irréversible à la réaction de transestérification. De plus l'acylation à partir des esters de vinyle permet d'utiliser des conditions de réaction plus

douces (catalyse par des bases faibles comme K_2CO_3), et de greffer une grande variété de fonctions esters avec un taux de conversion élevé [37]–[39]. Kyriakou *et al.* (2012) ont étudié l'acylation de la quercétine par l'acétate de vinyle. Des esters de quercétine ont été obtenus : 4'-O-acétyl quercétine et 3'-O-acétyl quercétine [40]. Jiang *et al.* (2021), quant à eux, ont réussi à obtenir des esters d'epigallocatechine en présence de laurate de vinyle [41].

Dans notre étude, l'acylation de la quercétine en présence d'acétate de vinyle, de propionate de vinyle, de butyrate de vinyle ou de cinnamate de vinyle a été mise en oeuvre (Figure 42).

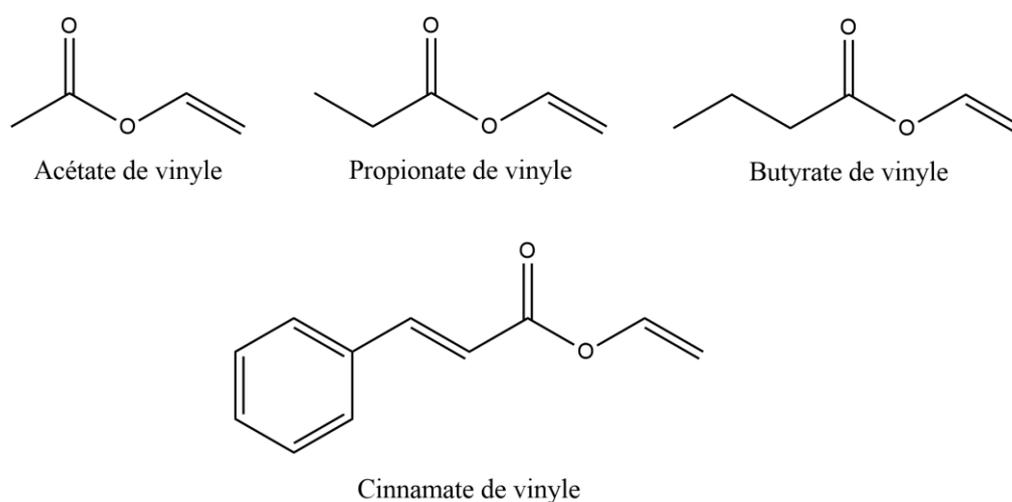


Figure 42. Structures chimiques de l'acétate de vinyle, du propionate de vinyle, du butyrate de vinyle et du cinnamate de vinyle

Ces réactions de transestérification ont été menées avec les ratios molaires flavonoïdes : donneur d'acyle suivant : 1 :5, 1 :10, 1 :20, 1 :50, 1 :100 et 1 :333 à 60°C, pendant 7 jours, dans du M2B2, en présence de CAL-B.

L'analyse des milieux réactionnels montre que le pourcentage de conversion de la quercétine varie en fonction du ratio molaire pour tous les donneurs d'acyle. Plus ce ratio est élevé, plus le taux de conversion augmente. Pour l'acétate de vinyle par exemple, en variant le ratio molaire quercétine : acétate de vinyle de 1 :5 à 1 :10, 1 :20, 1 :50, 1 :100 ou 1 :333, des taux de conversion du flavonoïde de 57%, 68%, 77%, 89%, 92% et 96% sont obtenus respectivement, après 72 heures de réaction. Une tendance similaire est observée avec le butyrate de vinyle, le propionate de vinyle, ainsi que le cinnamate de vinyle (Figure 43). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Chebil *et al.* (2007).

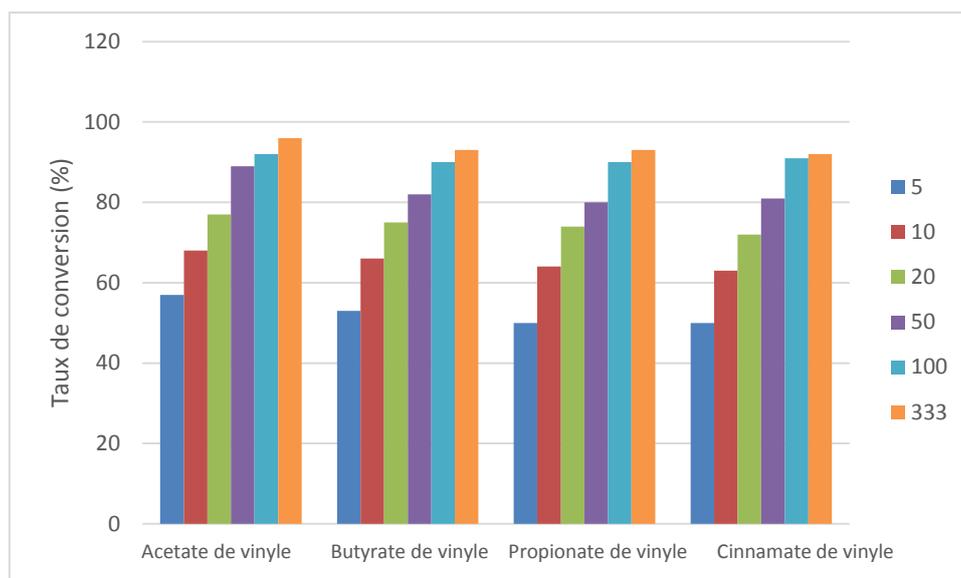


Figure 43. Variation du taux de conversion de la quercétine en présence d'acétate de vinyle, butyrate de vinyle, propionate de vinyle ou cinnamate de vinyle, selon les ratios molaires quercétine : donneur d'acyle 1 :5, 1 :10, 1 :20, 1 :50, 1 :100 ou 1 :333, en présence de CAL-B. Les réactions sont menées à 60°C, dans le M2B2, sous agitation magnétique.

Les esters vinyliques étant très réactifs, il convient de vérifier l'avancement réactionnel en absence d'enzyme. Des réactions témoins ont été menées sans enzyme, dans les mêmes conditions que celles appliquées précédemment.

Dans cette étude expérimentale, le potentiel catalytique de CAL-B dans la réaction d'acétylation de la quercétine a été éclairci. La réaction menée pendant 7 jours dans le M2B2, à 60°C, en absence d'enzyme et avec des différents ratios molaires des substrats, a permis de montrer qu'un large excès de donneur d'acyle (ratio 1 :333) conduit à un taux de conversion similaire à celui obtenu en présence d'enzyme. Pour des excès plus modérés d'accepteur d'acyle, les taux de conversion observés sont toutefois moins élevés en l'absence d'enzyme. Pour exemple, des taux de conversion de 35%, 40%, 44%, 52%, 64% et 92% ont été atteints pour les ratios 1 :5, 1 :10, 1 :20, 1 :50, 1 :100 et 1 :333 respectivement, lors de l'acylation de la quercétine par l'acétate de vinyle, en l'absence d'enzyme (Figure 44). Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés par Bidouil *et al.* (2011), qui ont montré un taux de conversion de la quercétine de 90 %, en absence de CAL-B, avec un ratio molaire quercétine : acétate de vinyle de 1 : 333.

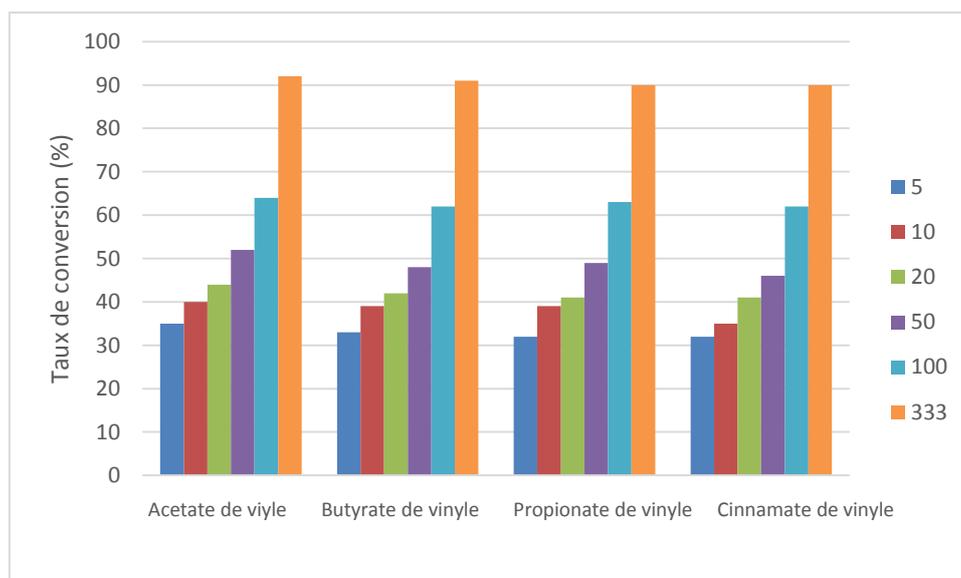


Figure 44. Variation des taux de conversion de la quercétine en présence d'acétate de vinyle, butyrate de vinyle, propionate de vinyle ou cinnamate de vinyle, selon les ratios molaires quercétine : donneur d'acyle 1 : 5, 1 :10, 1 :20, 1 :50, 1 :100 ou 1 :333, en absence de CAL-B. Les réactions sont menées à 60°C, dans le M2B2, sous agitation magnétique.

Certaines études citées ci-dessus ayant montré que l'acylation enzymatique des flavonoïdes aglycones avec les esters vinyliques est performante ne rapportent pas la mise en œuvre de réactions témoin, menées sans biocatalyseur. Or notre étude met bien en évidence la possibilité d'acyler la quercétine par un donneur d'acyle vinylique, sans enzyme. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature doit donc se faire avec prudence.

1.6. Conclusions

Ces résultats expérimentaux sur l'acylation des flavonoïdes aglycones nous permet de parvenir aux conclusions suivantes :

- Dans nos travaux, l'enzyme CAL-B n'a pas permis de catalyser l'acétylation des flavonoïdes aglycones avec des acides gras simples, quel que soit le ratio molaire des substrats. Certaines études de la littérature rapportent la possibilité d'effectuer cette réaction, ce qui est contradictoire avec nos résultats. Toutefois la plupart des rendements restent inférieurs à 40%. D'autres travaux réalisés au laboratoire avaient au contraire permis de conclure à une absence de réaction ; ceci avait d'ailleurs été justifié par une faible réactivité des hydroxyles phénoliques de la quercétine au niveau de la machinerie catalytique de l'enzyme (Bidouil *et al.* 2011). Ceci semble cohérent avec le fait que les lipases catalysent préférentiellement l'acylation de groupements

hydroxyle primaires [42]. Ces résultats contradictoires demeurent inexpliqués et pourraient résulter de conditions opératoires comme l' a_w des milieux légèrement différente d'une étude à l'autre.

- Parmi toutes les enzymes utilisées dans cette partie, la lipase de *Burkholderia cepacia* est la seule enzyme capable de catalyser l'acylation de la quercétine avec l'acide octanoïque. Le rendement de conversion du flavonoïde est de 59 %.
- Des taux de conversions élevés ont été obtenus avec les donneurs d'acyle de type esters de vinyles, en présence de CAL-B ; des esters ont également été produits en l'absence d'enzyme, avec des rendements généralement inférieurs. Une corrélation positive a été observée entre le taux de conversion du flavonoïde et l'excès de donneur d'acyle. Nous pouvons conclure que cette réaction d'acétylation menée en présence d'un large excès d'esters de vinyle est essentiellement de nature chimique. Bien que l'acylation ait lieu avec de tels substrats donneurs d'acyle, cette voie d'obtention de dérivés acylés de flavonoïdes ne nous paraît toutefois pas pertinente dans une optique de procédé vert.

En résumé, la synthèse de composés bi-modulaires à partir de flavonoïdes aglycones par voie enzymatique ne semble pas la voie idéale, comparativement à la voie chimique. Même si d'autres études menées par des chercheurs montrent que l'acylation des flavonoïdes aglycones par CAL-B fonctionne, les rendements restent faibles dans la plupart des cas ou font appel à des donneurs d'acyle dont l'origine synthétique nous éloigne de notre objectif de développement d'un procédé vert. Dans la partie suivante il s'agit d'étudier le potentiel de la biocatalyse pour la synthèse de composés tri-modulaires par hémisynthèse, à partir de flavonoïdes glycosylés.

2. Acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés

Dans la partie précédente l'acylation des flavonoïdes aglycones, catéchine, quercétine et naringénine en présence de CAL-B a été étudiée afin de synthétiser des composés bi-modulaires par voie enzymatique. Plusieurs paramètres comme le solvant, l'enzyme, la nature du donneur d'acyle ainsi que le ratio molaire flavonoïde / donneur d'acyle ont été modifiés pour obtenir des esters de flavonoïdes. Malgré ces différents essais, les performances réactionnelles sont limitées ou les substrats permettant l'obtention des produits d'intérêt sont des esters vinyliques peu pertinents dans le cadre du développement d'un procédé vert. L'étude a été poursuivie avec des flavonoïdes glycosylés, dont l'acylation a fait l'objet de nombreux travaux. Etant donné que les flavonoïdes glycosylés possèdent des groupements sucre, leur acylation permet d'envisager l'obtention de composés tri-modulaires constitués d'un aglycone phénolique, d'une ou deux entités sucre (glucose et rhamnose ou mannose) et d'une chaîne grasse.

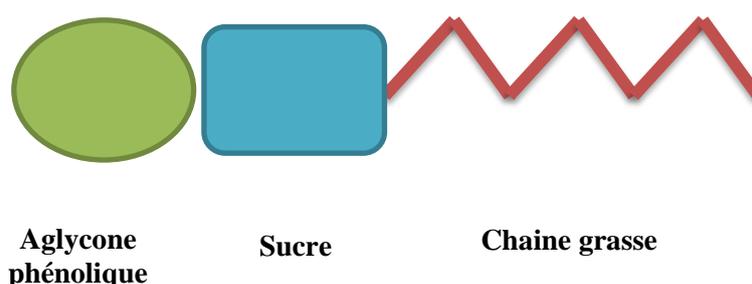


Figure 45. Représentation schématique de la structure d'un composé tri-modulaire synthétisé par biocatalyse enzymatique

Ces molécules présentent une structure porteuse de nombreuses fonctions hydroxyles de différentes natures (des OH primaires, des OH secondaires et des OH phénoliques), et leur acylation sélective par voie chimique nécessite des étapes de protection et déprotection. La voie enzymatique apparaît donc comme une voie particulièrement pertinente en raison des propriétés de régiosélectivité des biocatalyseurs.

Pour ces synthèses, deux flavonoïdes modèles ont été choisis, la rutine qui appartient à la famille des flavonols et la naringine qui est une flavanone, en raison de leur accessibilité d'une part, et d'autre part en raison de leur structure aromatique permettant de penser que ces molécules ont une forte propension à l'auto-assemblage.

2.1. Rappel des structures de la rutine et de la naringine et choix des conditions de départ

2.1.1. Structures de la naringine et de la rutine

La rutine (aussi appelée rutoside) est une molécule de type flavonol. C'est un hétéroside dérivé de la quercétine. La quercétine est donc l'aglycone de la rutine ; elle est liée au rutinose (diholoside) en position 3. Le rutinose est constitué d'une unité rhamnose liée à une unité glucose [43]. La partie glycosidique de la rutine comporte uniquement des groupements hydroxyles secondaires.

La naringine est une flavanone-7-O-glycoside résultant de l'association entre la flavanone naringénine et le disaccharide néohespéridose. Elle possède la structure flavanone de base sur laquelle une unité rhamnose suivie d'une unité glucose est liée en position 7. La partie glycosidique de la naringine comporte un hydroxyle primaire et plusieurs hydroxyles secondaires. [44].

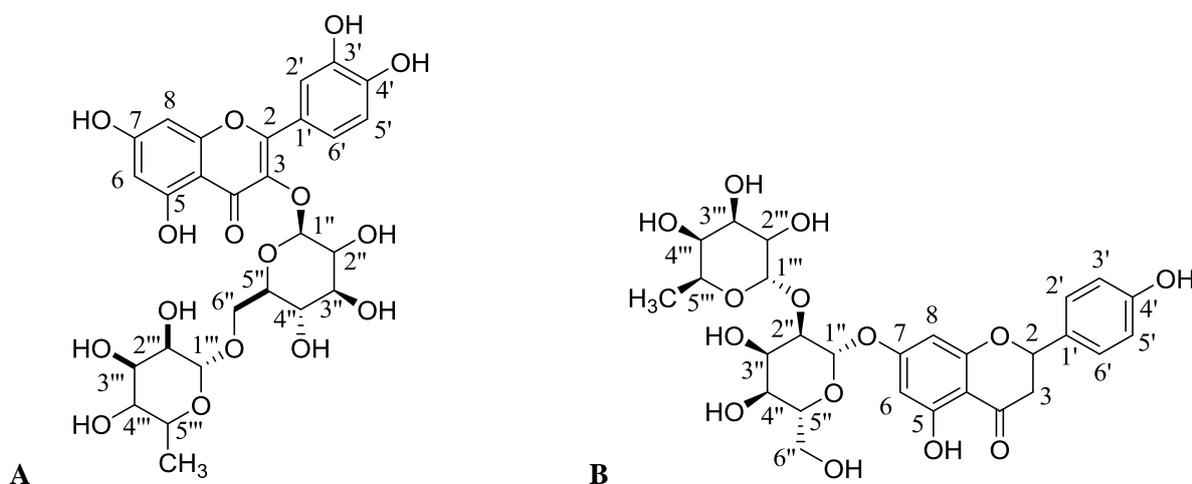


Figure 46. A. Structure de la rutine. B. Structure de la naringine

2.2. Choix des conditions de départ des réactions d'acylation

Les premières réactions d'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés ont été menées dans du M2B2 à 60°C, pendant 7 jours, en présence de 5 g/L de rutine ou de naringine, d'acide laurique en tant qu'agent donneur d'acyle et de CAL-B. Un ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle de 1 : 2 a été fixé. Un suivi cinétique des réactions a été réalisé.

Les cinétiques obtenues montrent que dans le cas des deux flavonoïdes une réaction a lieu. La concentration de flavonoïde diminue progressivement avec le temps pour atteindre une concentration de 3,03 g/L pour la naringine et 3,21 g/L pour la rutine au bout de 144 heures. Pour chaque synthèse, un produit plus hydrophobe que le flavonoïde de départ se forme dès l'introduction du catalyseur dans le milieu et sa concentration augmente progressivement également avec le temps pour atteindre 2,57 g/L dans le cas de la naringine et 2,32 g/L dans le cas de la rutine. Ces deux produits sont supposés être des monoesters de naringine et de rutine. Après 7 jours de réaction, les substrats limitant de la réaction ne sont pas totalement consommés.

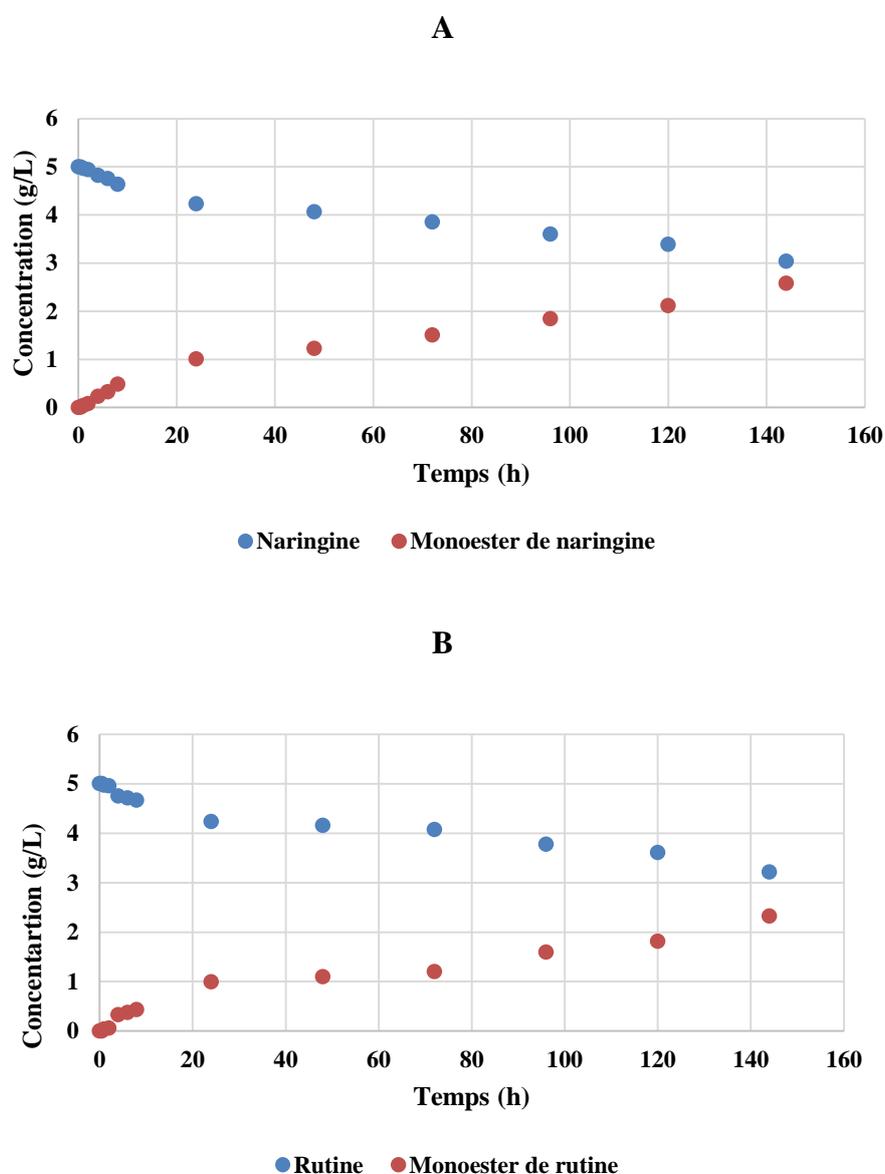


Figure 47. A. suivi cinétique des réactions d'acylation de la naringine (A) et de la rutine (B), en présence de CAL-B et d'un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 2.

Les taux de conversion dans ces conditions expérimentales sont de 36% pour la rutine et 39% pour la naringine.

2.2.1. Conclusion

Cette toute première série de synthèses a montré qu'avec les flavonoïdes glycosylés, contrairement aux flavonoïdes aglycones, des produits se forment. Les taux de conversion des substrats obtenus pour les deux flavonoïdes sont faibles. Pour améliorer ces résultats, plusieurs paramètres ont été identifiés dans la littérature comme étant de potentiels leviers d'amélioration des performances réactionnelles.

2.3. Influence du rapport molaire flavonoïde : donneur d'acyle

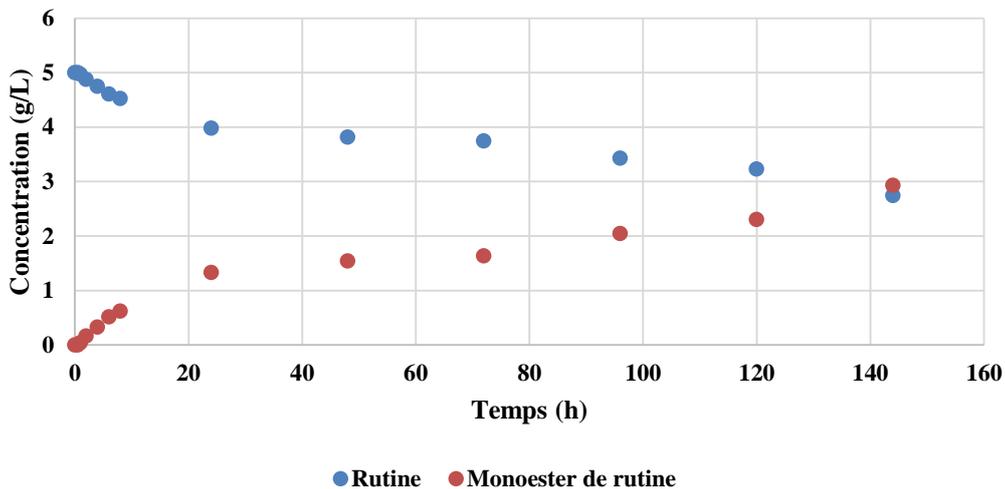
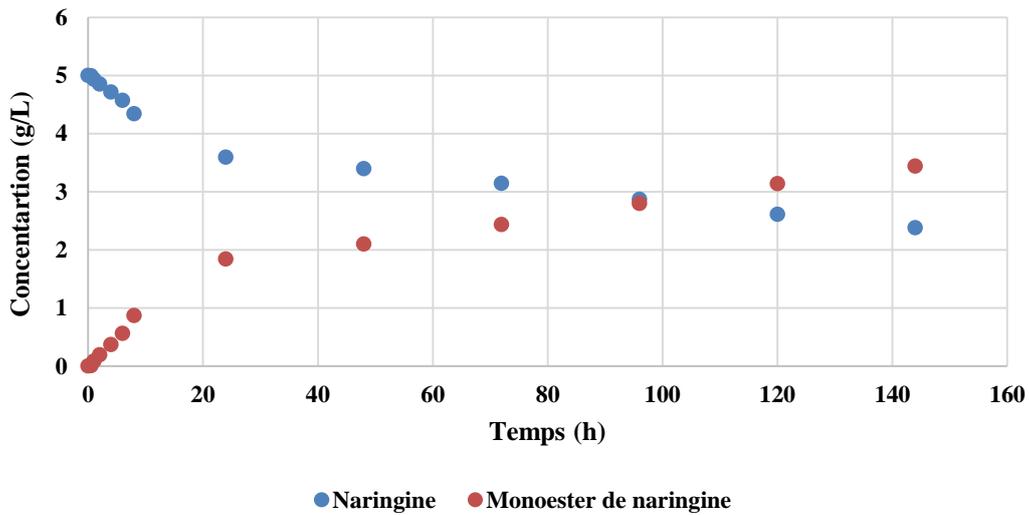
La concentration du donneur d'acyle est un facteur important dans la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïde. Elle influence la sélectivité de la réaction, l'activité de l'enzyme et l'équilibre réactionnel. Dans la plupart des études concernant la synthèse d'esters de flavonoïde, un excès de donneur d'acyle est utilisé pour améliorer les vitesses réactionnelles ainsi que les taux de conversion des substrats.

2.3.1. Synthèse d'esters de flavonoïdes avec un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 5

Le ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle a été augmenté en vue de déplacer l'équilibre réactionnel en faveur de la synthèse des esters de flavonoïdes, tous les autres paramètres étant maintenus par ailleurs : le donneur d'acyle est l'acide laurique, le solvant est le M2B2, l'enzyme est la CAL-B, l'acylation est menée pendant 7 jours à 60°C, et un suivi cinétique a été réalisé.

Les cinétiques réactionnelles ont montré la formation de produits présentant les mêmes temps de rétention que les produits obtenus en présence d'un ratio molaire 1 : 2. Dans le cas de la naringine, après 7 jours de réaction, la concentration de substrat diminue de 5 g/L jusqu'à 2,38 g/L et on obtient 3,44 g/L de produit. On observe le même cas de figure avec la rutine dont la concentration diminue également de 5g/L jusqu'à 2,74 g/L après 144 heures et on observe la formation de 2,93 g/L de produit. Ces résultats correspondent à des taux de conversion de 52% de la naringine et de 45% de la rutine.

A



B

Figure 48. A. Suivi cinétique des réactions d'acylation de la naringine (A) et de la rutine (B), en présence de CAL-B et d'un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 5.

Des résultats similaires ont été rapportés par Couto *et al.* (2021) et Vaisali *et al.* (2017) lors de la synthèse d'ester de rutine avec des acides gras en présence de CAL-B avec un ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle de 1 :5 [45] [46] et Gayot *et al.* (2003) lors de la synthèse d'ester de naringine [47].

Afin de mettre en évidence l'effet du ratio molaire des substrats sur les performances réactionnelles, les résultats obtenus en présence des ratios 1 : 2 et 1 : 5 sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16. Performances des réactions d'acylation de la naringine et de la rutine par l'acide laurique pour des ratios molaires flavonoïde : donneur d'acyle de 1 :2 et 1 :5.

Ratio molaire (Flavonoïde :Donneur d'acyle)	Naringine		Rutine	
	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g/L/h)	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g /L/h)
1 :2	39	0.0342	35	0.0333
1 :5	52	0.0611	45	0.0472

Ce tableau montre qu'avec le ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 :5 on a des taux de conversion du flavonoïde supérieurs à ceux obtenus avec le ratio 1 :2. Ce taux passe de 39% à 52% dans le cas de la naringine, et de 35% à 45% dans le cas de la rutine. On remarque également que l'augmentation du ratio molaire entraîne une augmentation de la vitesse initiale qui passe de 0.0342 à 0.0611 g/L/h pour la naringine et de 0.0333 à 0.0472 g/L/h pour la rutine.

Nos résultats sont cohérents avec la littérature où des chercheurs ont montré que les performances des réactions d'estérification par biocatalyse augmente avec l'augmentation de l'excès de donneur d'acyle [48]. Des auteurs ont rapporté que le ratio flavonoïde : donneur d'acyle de 1 :5 est le ratio le plus efficace pour les réactions d'acylation des flavonoïdes [47], [49]–[51].

Par ailleurs, les performances réactionnelles obtenues lors de l'acylation de la naringine sont supérieures à celles observées lors de l'acylation de la rutine, quel que soit le ratio molaire appliqué. Généralement l'acylation avec des acides gras en présence de CAL-B se produit sur le groupe hydroxyle primaire de la partie glycosidique de la naringine [22]. L'absence de ce groupement hydroxyle primaire chez la rutine explique la plus importante spécificité envers la naringine et donc ces taux de conversion plus élevés [42].

Au vu de ces résultats, des expériences ont été entreprises pour mettre en évidence l'effet de très forts excès de l'un des deux substrats sur les performances réactionnelles et tenter d'améliorer la production des produits d'intérêt. Pour cela, une stratégie consistant à conduire

a réaction en mode fed-batch, en alimentant progressivement et de façon discontinue le réacteur avec l'un des substrats de la réaction a été mise en œuvre.

2.3.2. Synthèse d'ester de flavonoïdes en mode fed-batch

Les réactions d'acylation de la naringine et de la rutine par l'acide laurique ont été menées en mode fed-batch, soit en présence d'un fort excès de donneur d'acyle grâce à une alimentation progressive du réacteur en flavonoïde, soit en présence d'un fort excès de flavonoïde grâce à une alimentation progressive du réacteur en acide gras. Les quantités totales de réactifs mises en jeu ont été fixées de manière à avoir un ratio flavonoïde total : acide laurique total de 1 :5.

Ce mode de conduite du procédé peut aboutir à des excellents résultats et des bonnes performances. Ainsi, Roby *et al.* (2015) ont synthétisé des esters phénoliques d'acides gras en présence de CAL-B avec un rendement de 91% par ce mode fed-batch où ils ont alimenté le réacteur en alcool vanillique [52].

Deux systèmes d'alimentation différents ont été réalisés :

- Le premier consiste à placer dans le réacteur 0.95 g/L^{-1} de flavonoïde solubilisé dans 10 mL de solvant et à effectuer une alimentation en acide gras solubilisé également dans 10 mL de solvant, pendant 8 heures, en présence d'enzyme (Figure 49).

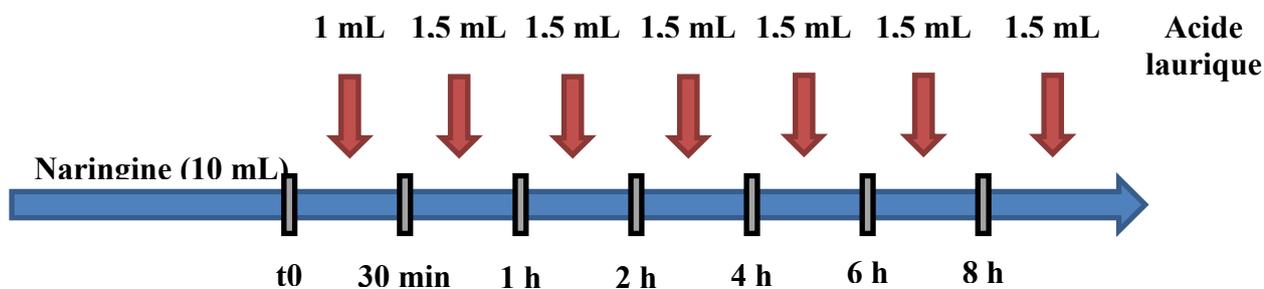


Figure 49. Représentation schématique du processus d'alimentation du réacteur en acide gras.

- Le deuxième est l'inverse du premier ; une solution de flavonoïde est ajoutée progressivement à une solution d'acide gras, en présence d'enzyme (Figure 50).

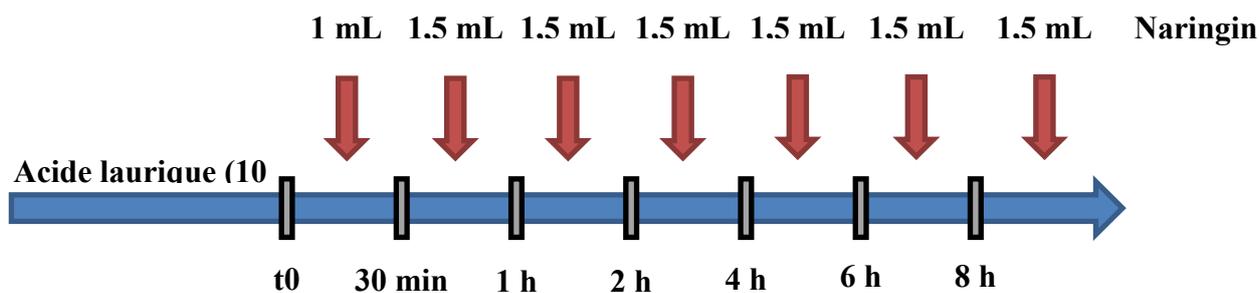


Figure 50. Représentation schématique du processus d'alimentation du réacteur en naringine.

Les conditions expérimentales étaient les suivantes : on a choisi la naringine comme flavonoïde (5 g/L dans le volume total), l'acide laurique (C12) comme donneur d'acyle, l'enzyme était la CAL-B, le M2B2 comme solvant, la température était de 60°C, et comme on a déjà mentionné, le ratio molaire flavonoïde : acide gras était de 1 :5. Un suivi cinétique a été réalisé pendant 7 jours.

Les deux synthèses mises en œuvre ont conduit à la formation d'un produit selon les cinétiques présentées sur les figures 51 et 52.

Quel que soit le mode d'alimentation du réacteur, des résultats similaires sont obtenus : des taux de conversion de la naringine proches de 50 % sont obtenus (52% et 51% pour les synthèses avec alimentation en acide laurique et en naringine, respectivement).

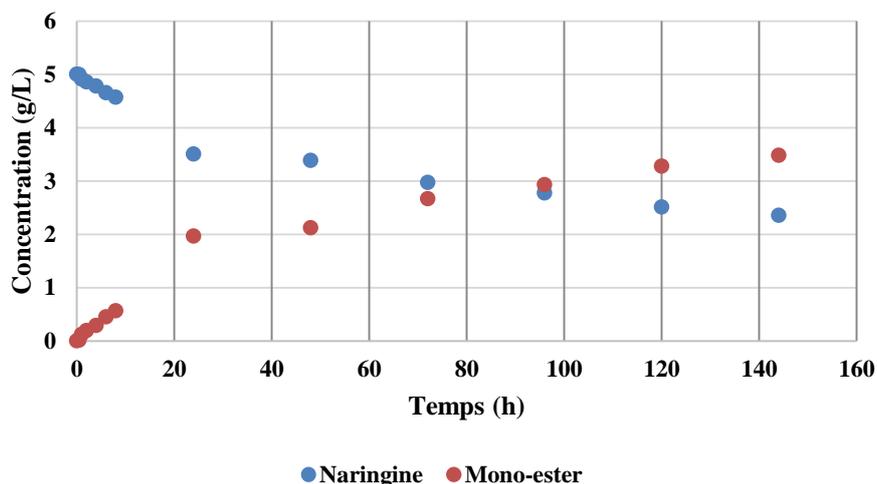


Figure 51. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine, en présence de CAL-B, avec une alimentation discontinue en acide laurique.

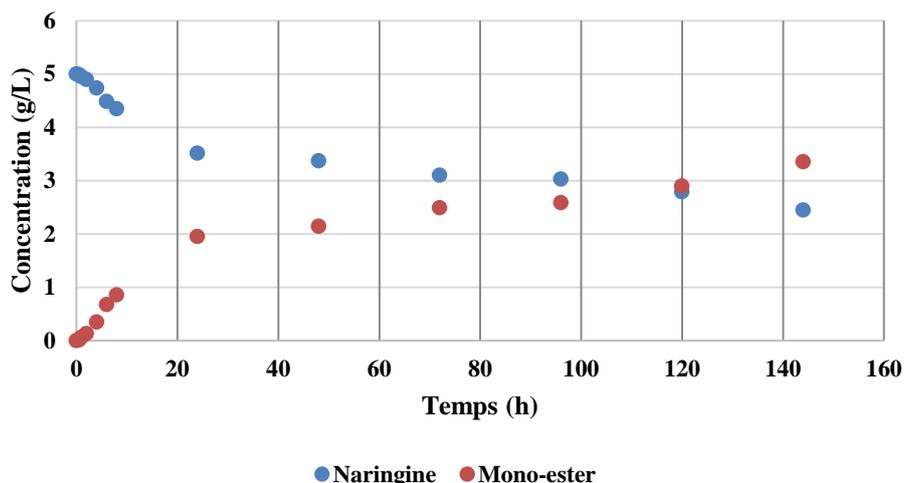


Figure 52. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine, en présence de CAL-B, avec une alimentation discontinue en naringine.

Ces résultats sont également similaires à ceux obtenus précédemment en réacteur agité. Quant aux vitesses initiales, le même cas de figure se présente. Les vitesses initiales de consommation de la naringine sont de 0.0616 g/L/h pour l'alimentation en acide gras et 0.0695 g/L/h pour l'alimentation en naringine. Ces valeurs sont similaires à celle obtenue en réacteur agité (0.0611 g/L/h).

Tableau 17. Performances de la réaction d'acylation de la naringine en fonction du mode de conduite du procédé

Ratio molaire 1 : 5	Naringine	
	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g/L/h)
Mode batch	52	0.0611
Mode fed-batch avec alimentation en acide laurique	52	0.0616
Mode fed-batch avec alimentation en naringine	51	0.0695

2.3.3. Conclusions

Cette partie de l'étude a permis de vérifier la faisabilité de la réaction d'acylation des flavonoïdes glycosylés rutine et naringine, en présence de CAL-B comme biocatalyseur.

Quels que soient les ratios molaires flavonoïde : donneur d'acyle et le mode de conduite du procédé (batch ou fed-batch), un produit unique est obtenu, correspondant à un mono-ester de flavonoïde. Des taux de conversion du flavonoïde proches de 50 % ont été obtenus à l'équilibre avec un ratio molaire de 1 : 5. L'alimentation du réacteur en flavonoïde ou en acide gras n'a pas permis d'améliorer ces résultats.

Cette limitation des rendements à l'équilibre pourrait s'expliquer par la présence d'eau dans les milieux, susceptible de favoriser les réactions hydrolytiques et de limiter la formation d'ester. En effet des mesures de l' a_w des milieux ont indiqué des valeurs de 0.195, ce qui est élevé. Ce phénomène est largement décrit dans la littérature et mérite qu'on lui porte une attention particulière.

2.4. Etude de l'effet de l'activité de l'eau du milieu réactionnel sur les performances des réactions d'acylation

L'activité de l'eau du milieu réactionnel est un paramètre crucial dans la synthèse d'ester par voie enzymatique en milieu non conventionnel. Elle modifie l'équilibre thermodynamique de la réaction et l'activité catalytique. En fonction de sa valeur, elle peut favoriser les phénomènes hydrolytiques et limiter la synthèse d'ester ; elle peut également affecter l'activité de l'enzyme. L'activité de l'eau d'un milieu réactionnel a deux origines : elle peut soit provenir de l'hydratation initiale des différents composants du milieu (substrat, solvant, support du biocatalyseur), soit être produite au cours de la synthèse comme c'est le cas dans les réactions d'estérification directe. La réaction d'estérification étant une réaction équilibrée, selon le principe de Le Chatelier, il peut y avoir une augmentation de l'hydrolyse du complexe acyl-enzyme à forte activité de l'eau, ce qui entraîne une limitation de la synthèse d'esters [53]. Au niveau de l'enzyme, Banik *et al.* (2017) ont montré que les molécules d'eau se lient à certaines régions qualifiées de "points chauds" sur la surface de CAL-B et forment des amas. La taille de ces amas d'eau augmente progressivement et s'étend avec l'augmentation de l'activité de l'eau. Par conséquent, la surface de la protéine recouverte par des molécules d'eau augmente également [54]. Ainsi, Mora-pale *et al.* (2007) ont mis en évidence un phénomène d'hydrolyse des diesters de lutéine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) et la lipase de *Rhizomucor miehei* favorisée même à faible activité de l'eau ($<0,2$) en raison de l'accumulation de molécules d'eau à la surface de l'enzyme qui est indépendante de la nature du solvant considéré dans l'étude (isooctane, toluène ou CO_2 supercritique) [55].

Afin d'évaluer l'effet de l'eau sur la réaction d'acylation des flavonoïdes glycosylés, des synthèses ont été menées en éliminant l'eau en continu, au cours de la réaction.

2.4.1. Effet de l'élimination en continu de l'eau sur l'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés

Afin d'effectuer ces synthèses, un nouveau dispositif a été conçu en utilisant un tube à reflux contenant du tamis moléculaire de manière à dessécher le solvant au cours de la réaction. Razak *et al.* (2015) en synthétisant des esters de rutine avec l'acide laurique en présence de CAL-B ont montré que la présence de tamis moléculaire dans le milieu de synthèse améliore les performances réactionnelles mais le risque de détériorer l'enzyme par frottement avec les billes de tamis est réel. Le système conçu dans notre étude permet de contourner cette difficulté. Les systèmes réactionnels demeurent inchangés par rapport aux travaux précédents : acide laurique comme donneur d'acyle, naringine et rutine comme accepteurs d'acyle, ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 : 5, en présence de CAL-B, dans le M2B2. Le M2B2 ayant un point d'ébullition de 102 °C, la température des milieux réactionnels a été portée à 100 °C afin de travailler à reflux. Ceci est possible car la CAL-B est très stable et ne sera pas dénaturée à cette température [56], [57]. Comme précédemment, les substrats, l'enzyme ainsi que le solvant ont été séchés préalablement. Les substrats ont été mis à solubiliser pendant 24 heures en mettant en place le reflux ce qui permet de bien sécher le milieu réactionnel avant de démarrer la réaction, puis ce reflux est maintenu pendant toute la réaction pour éliminer l'eau produite.

Le suivi cinétique des réactions montre qu'en l'absence de tamis moléculaire, la vitesse initiale de conversion de la naringine est de 0.0611 g/L/h ; un taux de conversion du flavonoïde de 52% est obtenu. La conduite de la réaction à reflux, en présence de tamis permet d'atteindre une vitesse initiale de 0.1384 g/L/h et un taux de conversion de 87%. L'activité de l'eau mesurée à la fin des deux synthèses est de 0,0234 et 0,112 avec et sans tamis respectivement.

Dans le cas de la réaction d'acylation de la rutine, une tendance similaire est observée. Les performances réactionnelles en présence de tamis moléculaire sont largement améliorées par rapport à celles obtenues en absence de tamis. La rutine est convertie à hauteur de 77% en présence de tamis, contre 45 % en l'absence de tamis. La vitesse initiale de la réaction est également améliorée puisqu'elle passe de 0.0472 g/L/h à 0.0801 g/L/h. Les mesures de l'activité de l'eau dans les milieux en fin de réaction montrent l'efficacité du dispositif

puisque l' a_w passe de 0,134 à 0,0245 grâce à l'ajout de tamis dans le dispositif de condensation du solvant.

La présence de tamis moléculaire permet de pré-sécher le milieu réactionnel et d'éliminer l'eau produite au cours de la réaction. Dans notre cas, la conduite de la réaction à reflux implique d'augmenter la température ce qui peut également avoir un effet sur les performances réactionnelles. L'amélioration des performances observée est donc certainement due à un effet combiné de diminution de l' a_w et d'augmentation de la température. L'effet bénéfique de l'élimination de l'eau sur le rendement de la réaction d'acylation de flavonoïdes par des acides gras a également été observé dans d'autres travaux [18] [19]. Gayot *et al.* (2003) ainsi que Youn *et al.* (2007) ont réussi à augmenter le taux de conversion de la naringine pour synthétiser des esters de naringine de 17 à 41 % et de 24 à 43 % respectivement en ajoutant du tamis moléculaire directement dans le réacteur pour diminuer l'activité de l'eau (a_w inférieure à 0,11) [59]. Guo *et al.* (2022) ont obtenu un taux d'estérification enzymatique de la naringine élevé (> 80%) en présence d'une a_w de 0,11 [60]. Concernant la réaction d'acylation de la rutine, Vaisali *et al.* (2017) ont obtenu un taux de conversion de 60% en présence d'une a_w de 0,07. Cet effet bénéfique de la diminution de l' a_w sur les performances réactionnelles a également été observé dans d'autres réactions d'acylation comme démontré par Chamouveau *et al.* (2001) et Watanabe *et al.* (2001) lors de la synthèse d'esters de sucre [61].

2.4.2. Conclusion

Ces séries des synthèses nous ont permis de mettre en évidence l'importance de maîtriser l' a_w dans les réactions d'acylation enzymatique de flavonoïdes. La conduite de la réaction à reflux, en présence de tamis moléculaire dans le dispositif de condensation du solvant, permet d'obtenir des performances significativement plus élevées que dans les synthèses précédées d'un simple séchage des réactifs et du solvant. L'élimination de l'eau du milieu réactionnel tout au long de la réaction apparaît comme un levier d'amélioration des performances des réactions d'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosylés. A notre connaissance ce type de dispositif permettant l'élimination continue de l'eau durant la réaction d'estérification n'a pas été réalisé avant.

2.5. Acylation de la rutine et naringine par des acides gras de différentes longueurs de chaîne

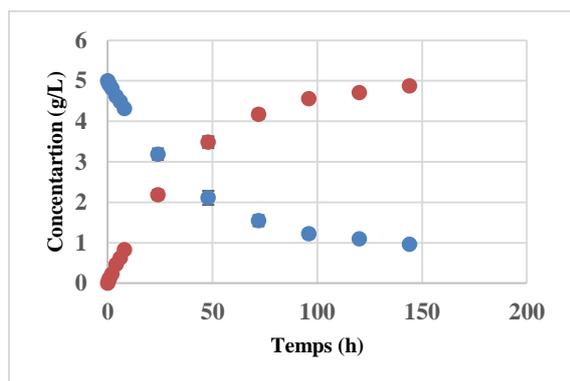
Dans la littérature, les meilleurs résultats, en terme de taux de conversion et de vitesse initiale de réaction, ont été obtenus en utilisant des acides gras ou des esters vinyliques comme donneurs d'acyle (Chebil *et al.*, 2006). La nature du donneur d'acyle est un facteur important dans l'acylation enzymatique des flavonoïdes. Elle influe sur les performances de la réaction ainsi que sur les propriétés de l'ester synthétisé. L'un des objectifs de cette thèse étant de définir l'effet de la structure des produits issus de la voie chimique ou de la voie enzymatique sur leurs propriétés, il paraissait intéressant de générer une diversité d'esters de flavonoïdes glycosylés en faisant varier la longueur de la chaîne acyle. Le chapitre qui suit présente les résultats obtenus lors de l'acylation des flavonoïdes rutine et naringine par des acides gras de différentes longueurs de chaîne.

2.5.1. Effet de la longueur de chaîne du donneur d'acyle sur les performances de la réaction d'acylation de la rutine et de la naringine

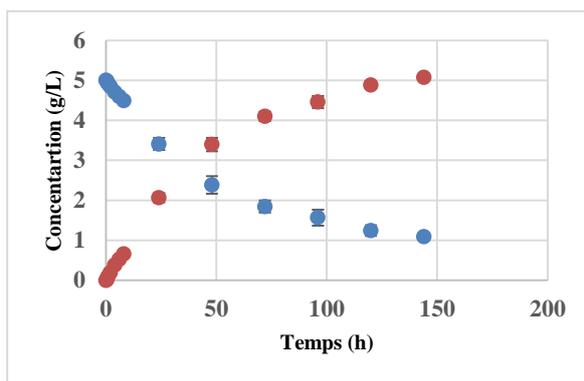
Deux séries de synthèses ont été réalisées, l'une avec la rutine, l'autre avec la naringine. Ces deux flavonoïdes ont été acylés par des acides gras de différentes longueurs de chaîne notamment l'acide octanoïque (C8 :0), l'acide laurique (C12 :0), l'acide myristique (C14 :0), l'acide palmitique (C16 :0), l'acide stéarique (C18 :0) et finalement l'acide oléique (C18 :1) en présence de CAL-B dans du M2B2. En se basant sur les résultats obtenus dans les synthèses précédentes, le ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle a été maintenu à 1 : 5, les réactions ont été menées à reflux à 100 °C pour permettre l'élimination en continu de l'eau par piégeage sur tamis moléculaire.

Les figures 53 et 54 présentent les cinétiques obtenues pour les différentes synthèses. Quel que soit le flavonoïde et quel que soit l'acide gras, le flavonoïde est consommé au cours du temps. Un produit unique est formé dans le cas de la rutine tandis qu'un produit majoritaire est synthétisé avec la naringine, suivi d'un second produit plus hydrophobe après 48h de réaction. L'équilibre réactionnel semble atteint après 6 jours et 2 jours pour la rutine et la naringine, respectivement.

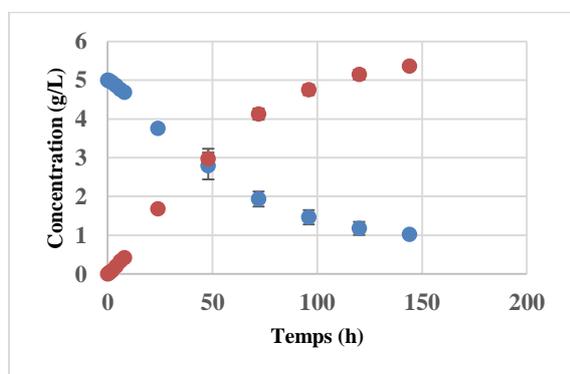
A



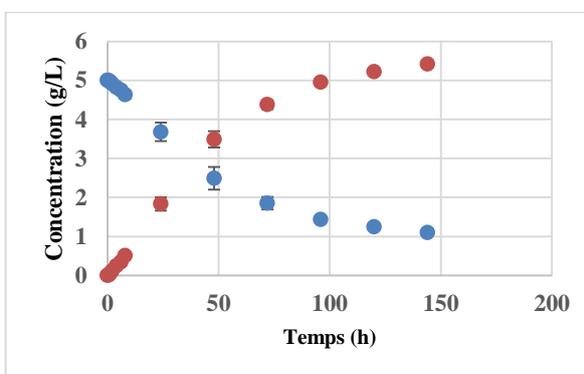
B



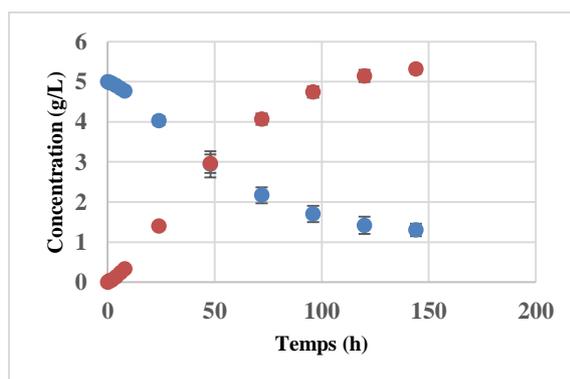
C



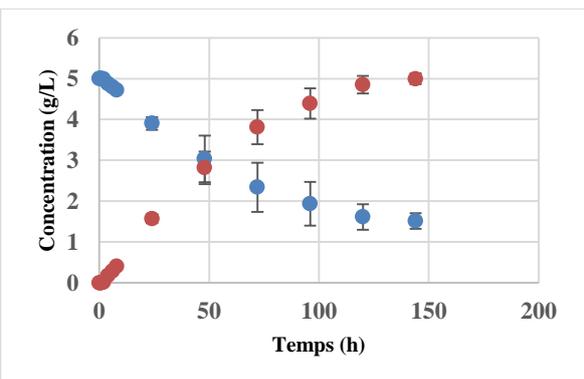
D



E



F



—●— Rutine —●— Mono-ester de rutine

Figure 53. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par différents acides gras : A : acide octanoïque (C8), B : acide laurique (C12), C : acide myristique (C14), D : acide palmitique (C16), E : acide stéarique (C18), F : acide oléique (C18 :1). Les réactions sont menées en présence d'un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 5, de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau.

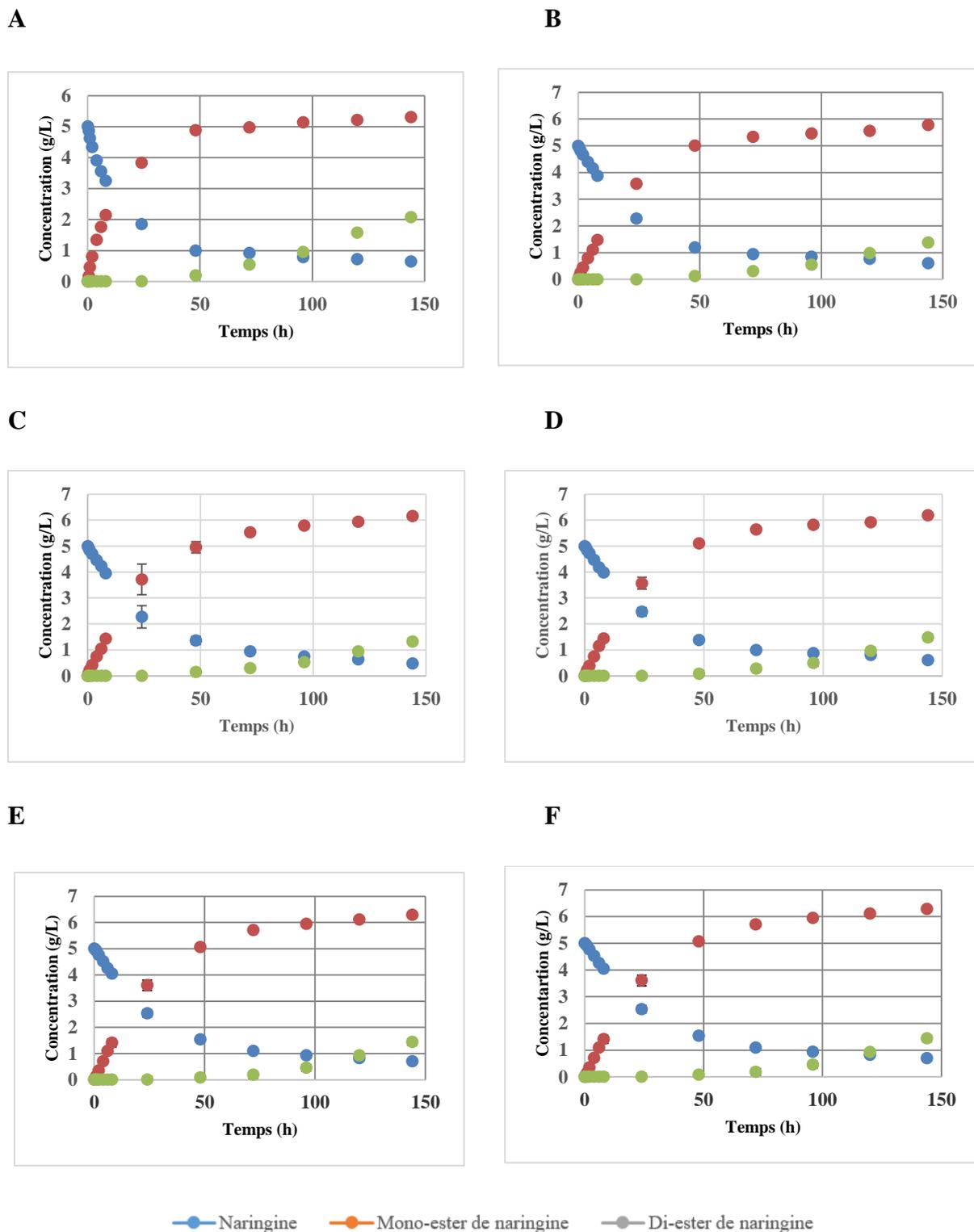


Figure 54. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par différents acides gras : A : acide octanoïque (C8), B : acide laurique (C12), C : acide myristique (C14), D : acide palmitique (C16), E : acide stéarique (C18), F : acide oléique (C18 :1). Les réactions sont menées en présence d'un ratio molaire flavonoïde : acide gras de 1 : 5, de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau.

Comme indiqué sur les figure 55 et 55, ces séries de réactions enzymatiques donnent des taux de conversion élevés avec les six acides gras utilisés, compris entre 70 et 81% pour la rutine et entre 80 et 90% pour la naringine. Les taux de de conversion les plus élevés sont obtenus avec les donneurs d'acyle à courte et moyenne chaîne carbonée. Aucune différence significative n'est observée au niveau des taux de conversion de la rutine en présence des acides octanoïque, laurique et myristique. Ceux-ci sont proches 80 %. En revanche, pour les acides gras de plus de 14 atomes de carbone, une augmentation de la longueur de chaîne conduit à une diminution du rendement de conversion.

Dans le cas de la naringine, le taux de conversion le plus élevé est obtenu avec l'acide myristique (C14) mais globalement la longueur de chaîne du donneur d'acyle a peu d'effet sur les performances de la réaction. Quel que soit le flavonoïde, les taux de conversion observés avec l'acide oléique sont plus faibles qu'avec les acides gras saturés. Ils sont ainsi de 69% pour la rutine et 80% pour la naringine. Des résultats similaires concernant les acides gras insaturés ont été obtenus par Ardhaoui *et al.* (2004), Couto *et al.* (2021) ainsi que par Viskupicova *et al.* (2010) qui ont synthétisé des esters de flavonoïdes avec des acides gras saturés et insaturés, où les rendements des esters avec les acides gras insaturés (une et deux insaturation), sont inférieurs à ceux obtenus avec les acides gras saturés [31], [45], [62].

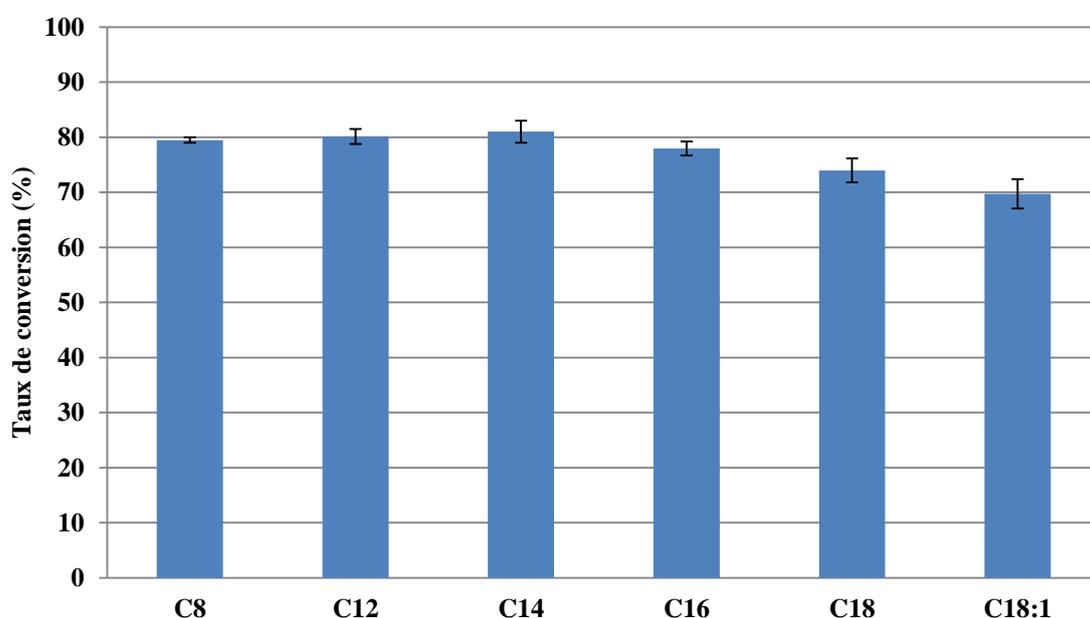


Figure 55. Variation du taux de conversion de la rutine (en %) à l'équilibre lors de son acylation par des acides gras de différentes longueurs de chaîne

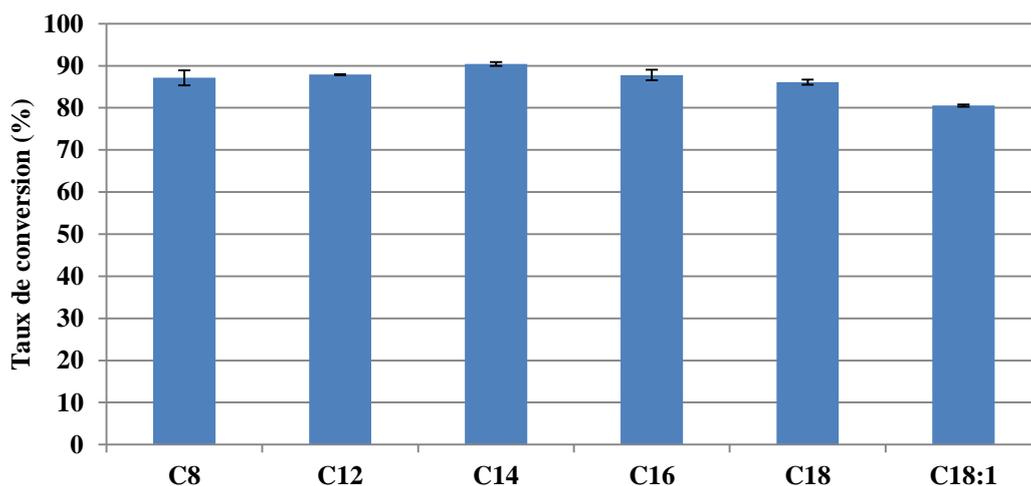


Figure 56. Variation du taux de conversion de la naringine (en %) à l'équilibre lors de son acylation par des acides gras de différentes longueurs de chaîne

En termes de vitesse initiale, celle-ci augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée pour les deux flavonoïdes (tableau 18). L'estérification de la naringine et de la rutine avec l'acide myristique (C14) est la plus rapide avec des vitesses initiales de 0.159 et 0.09 g/L/h respectivement. Au-delà de 14 atomes de carbones, cette vitesse diminue légèrement. On observe par ailleurs que l'acylation de la naringine est plus rapide que celle de la rutine.

Tableau 18. Valeurs des vitesses initiales des réactions d'acylation de la rutine et la naringine en fonction de la longueur de chaîne des substrats donneurs d'acyle.

Longueur de chaîne	Vitesse initiale (g/L/h)	
	Rutine	Naringine
C8	0.069 ± 0.012	0.131 ± 0.004
C12	0.080 ± 0.007	0.138 ± 0.007
C14	0.090 ± 0.005	0.159 ± 0.005
C16	0.058 ± 0.011	0.129 ± 0.002
C18	0.052 ± 0.006	0.123 ± 0.014
C18 :1	0.048 ± 0.01	0.095 ± 0.003

Concernant l'effet de la longueur de la chaîne carbonée des donneurs d'acyle sur le rendement de la réaction d'acylation de flavonoïdes, des tendances diverses sont rapportées dans la littérature. En effet, Kontogianni *et al.* (2001) et Guo *et al.* (2022) n'ont remarqué aucun effet de la longueur de la chaîne carbonée sur le rendement de conversion de la rutine et de la naringine lors de leur acylation par des acides gras à 8 et 12 atomes de carbone, en présence de CAL-B. Melou *et al.* (2005) rapportent que lors de l'acylation de la naringine la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle n'influence que très légèrement le rendement et la vitesse initiale de la réaction [49]. Katsoura *et al.* (2006) ont indiqué que la nature du donneur d'acyle a un effet sur l'efficacité de la réaction d'acylation de la rutine et de la naringine, en présence de CAL-B. Pour la naringine, le meilleur taux de conversion (65 %) a été obtenu avec les donneurs d'acyle à courte chaîne carbonée. En utilisant des donneurs d'acyle à longue chaîne carbonée, le taux de conversion ne dépasse pas 23% [63]. Couto *et al.* (2021) ont déterminé qu'un donneur d'acyle à 4 atomes de carbone conduit à une conversion maximale de la rutine (40 %) et que l'allongement de la chaîne acyle s'accompagne d'une diminution du rendement réactionnel (20 % pour une chaîne à 18 atomes de carbone). Cependant, d'autres tendances sont rapportées. Ainsi, Ardhaoui *et al.* (2004) qui ont étudié l'acylation de la rutine en utilisant des acides gras libres dont la longueur de chaîne varie entre 6 et 18 atomes de carbone, ont trouvé que pour les acides gras à chaîne inférieure à 12 atomes de carbone la performance de la réaction augmente avec la longueur de chaîne. En revanche, pour les chaînes comportant plus de 12 atomes de carbone, aucun effet de l'allongement de la chaîne sur le rendement de conversion n'a été observé [64]. Ces différents résultats dépendent du type d'enzyme, de la composition du milieu réactionnel ainsi que des conditions expérimentales. Les rendements rapportés dans la littérature sont proches de ceux que nous avons obtenus lorsque ces réactions sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires que les nôtres [64].

2.5.2. Conclusions

L'objectif de ces séries de synthèses était d'étudier l'effet de la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle sur les performances réactionnelles. Globalement, les résultats obtenus montrent que la nature du donneur d'acyle a peu d'effet dans le cas des acides gras saturés. En revanche la présence d'une insaturation sur la chaîne acyle conduit à une diminution significative du rendement réactionnel.

2.6. Synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes en milieu fondu

Un milieu fondu consiste à substituer un solvant organique classiquement utilisé pour solubiliser les substrats de la réaction d'acylation par un excès de donneur d'acyle jouant à la fois le rôle de substrat et de solvant pour l'accepteur d'acyle. De tels procédés permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvant organique ce qui limite leur impact environnemental ; cela limite également le volume du milieu réactionnel et permet de travailler à haute concentration en substrats. Par ailleurs, un fort excès de donneur d'acyle permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction en faveur de la synthèse d'esters. La majorité des études concernant les réactions enzymatiques en milieu fondu décrivent des bioconversions de type estérification et amidification [65].

2.6.1. Synthèse de laurate de rutine et de naringine en milieu fondu

Les synthèses menées en milieu fondu reposent sur la réaction d'acylation de la naringine et de la rutine par l'acide laurique, en présence de CAL-B. Dans ces conditions, le solvant M2B2 utilisé dans les synthèses précédentes, a été substitué par un large excès d'acide laurique à l'état fondu. L'objectif était de déterminer l'effet de telles conditions réactionnelles sur les performances et la sélectivité de l'acylation.

L'importance d'une faible a_w dans le milieu ayant été mise en évidence au cours des synthèses précédentes et l'effet bénéfique de l'élimination en continu de l'eau produite en cours de réaction ayant été démontré, les synthèses ont été menées à haute température de manière à éliminer l'eau produite, par distillation et piégeage dans du tamis moléculaire.

L'acylation de la rutine par l'acide laurique en milieu fondu a conduit à la synthèse de quatre produits. L'analyse par LC-MS des milieux réactionnels a permis de montrer que ces produits sont un mono-, un di-, un tri- et finalement un tetra-ester de rutine. En chromatographie en phase inverse, ces différents produits apparaissent à des temps de rétention d'autant plus élevés que le nombre de chaînes grasses greffées est important (Figure 57).

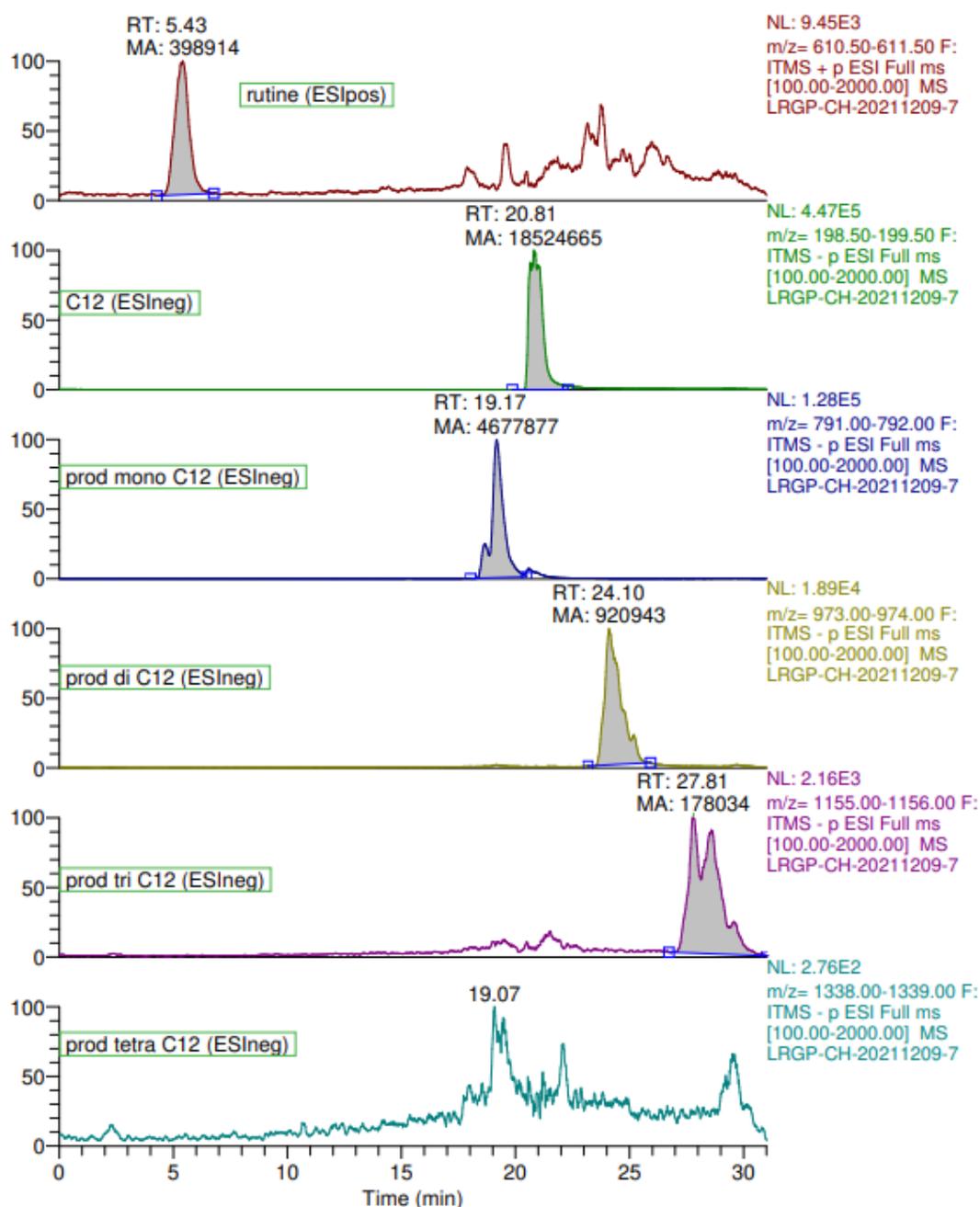


Figure 57. Analyse par LC-MS des milieux réactionnels relatifs à l'acylation enzymatique de la rutine par l'acide laurique en milieu fondu, en présence de CAL-B.

Le suivi cinétique des réactions montre une consommation importante de la rutine dès les premières heures de réaction, ainsi que l'apparition rapide de mono- et de di-ester de rutine. La quantité de mono-ester atteint son maximum (4,17 g/L) après 8 heures de réaction puis diminue en faveur de la formation d'un di-ester qui atteint sa concentration maximale (5,7 g/L) après 24 heures de réaction et d'un tri-ester dont la concentration augmente jusqu'à la fin de la réaction (6,5 g/L après 72h). Au-delà de 24h, la concentration du di-ester diminue légèrement tandis qu'un quatrième produit identifié comme un tetra-ester de rutine apparaît.

A l'arrêt de la réaction (72h), le produit majoritaire est le tri-ester (6,5 g/L), suivi du di-ester (5,0 g/L), du tetra-ester (1,5 g/L) et finalement du mono-ester (0,3 g/L). Quant à la rutine, sa concentration semble se stabiliser à 0,9 g/L après 24h de réaction, ce qui représente un taux de conversion de 82 %. Les points expérimentaux présentés dans la figure 58 ont été reliés pour en faciliter la lecture.

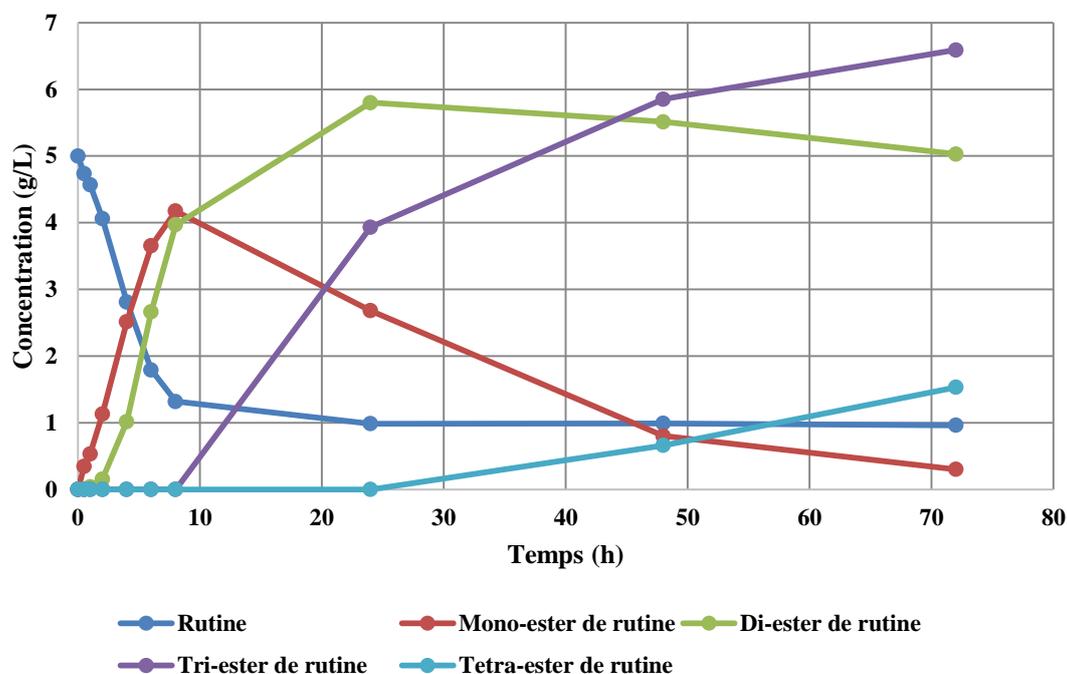


Figure 58. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide laurique en large excès (milieu fondu), en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau.

En termes de performances, la réaction menée en milieu fondu conduit à un taux de conversion de la rutine de 82% et une vitesse initiale de 0.4305 g/L/h. Pour rappel, un taux de conversion de 77% et une vitesse initiale de 0.0801 g/L/h avaient été obtenus en milieu solvant avec un rapport molaire flavonoïde : acide laurique de 1 :5.

Tableau 19. Performances de la réaction d'acylation de la rutine en milieu solvant (rapport molaire rutine : acide laurique de 1 :5) et dans un milieu fondu, après 72 heures de réaction, avec élimination en continu de l'eau produite.

	Rutine	
	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g/L/h)
Milieu fondu	81	0.4305
Milieu solvant	77	0.0801

Concernant la naringine, la réaction d'acylation en milieu fondu a conduit à l'obtention de quatre produits identifiés par LC-MS comme étant un mono-, un di-, un tri- et un tetra-ester. (Figure 59)

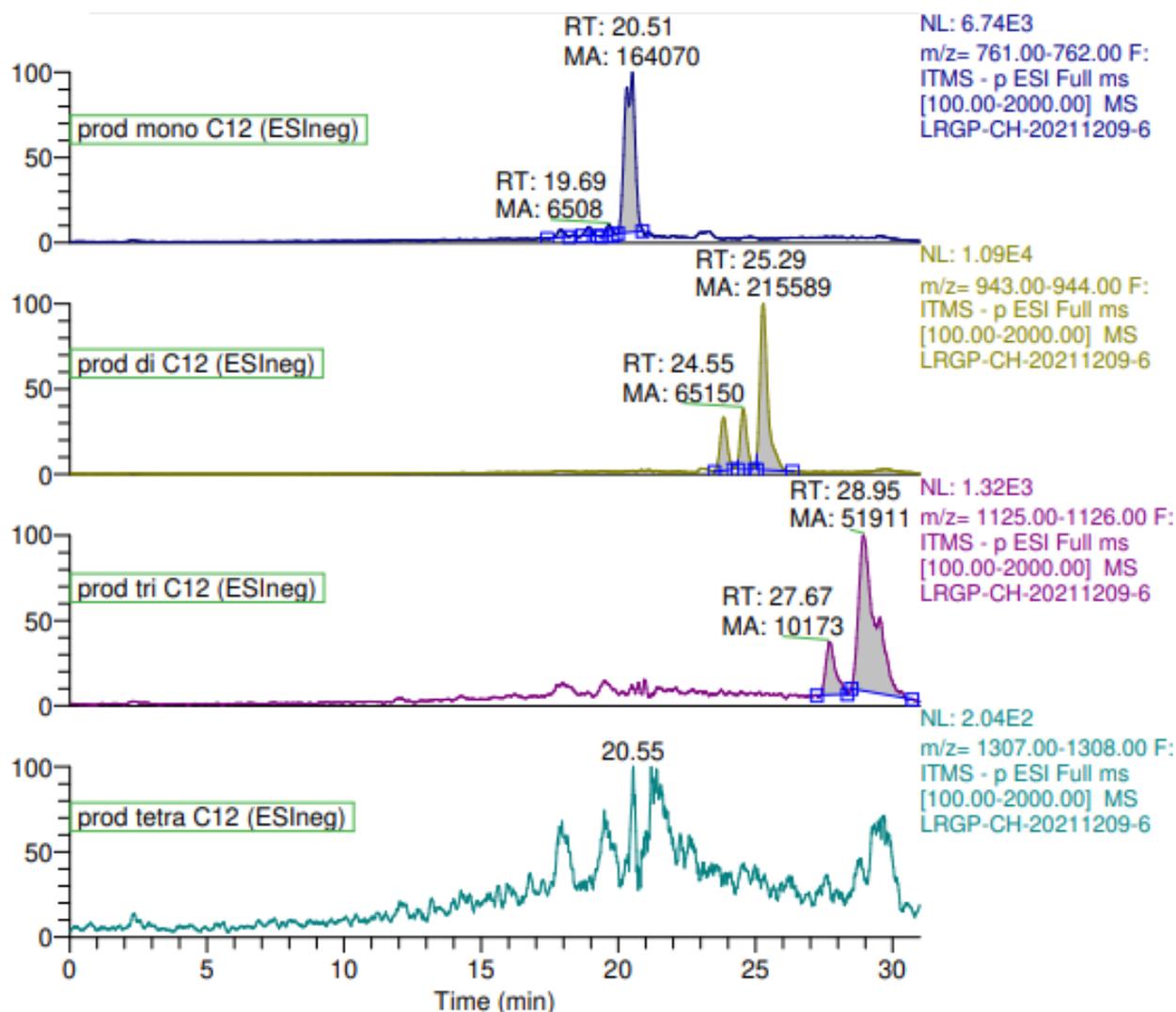


Figure 59. Analyse par LC-MS des milieux réactionnels relatifs à l'acylation enzymatique de la naringine par l'acide laurique en milieu fondu, en présence de CAL-B. Mise en évidence de la présence de quatre produits d'acylation.

Le suivi cinétique de l'acylation de la naringine indique des tendances similaires à celles observées lors de l'acylation de la rutine. Après 72 heures de réaction, le produit majoritaire est le tri-ester (7,1 g/L), suivi du di-ester (5,5 g/L), du tetra-ester (1,8 g/L) et finalement du mono-ester (0,3 g/L). A l'arrêt de la réaction (72h) la consommation de la naringine n'est pas totale ; la consommation du flavonoïde se stabilise aux alentours de 85 % après 8 h de réaction (Figure 60). La vitesse initiale de consommation du flavonoïde est de 0,4579 g/L/h.

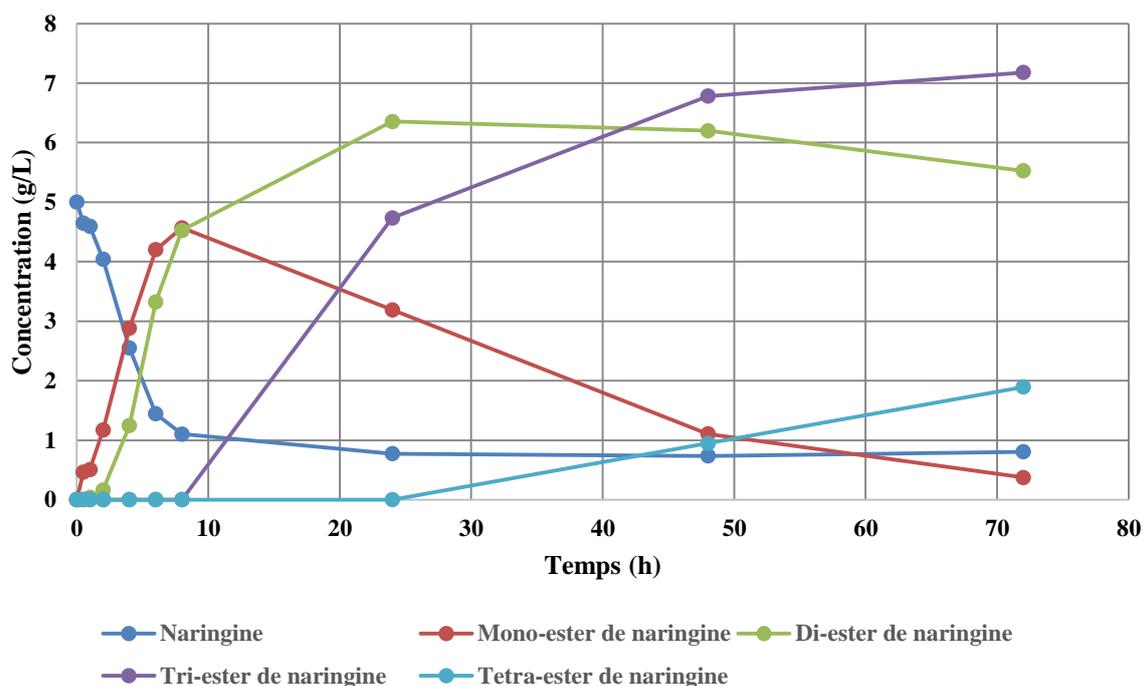


Figure 60. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide laurique en large excès (milieu fondu), en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau.

Après 72 heures de réaction le taux de conversion de l'acylation de la naringine dans un milieu fondu est légèrement supérieur à celui de l'acylation classique (87%). Par contre la vitesse initiale de consommation de naringine augmente de 0.1384 g/L/h à 0.4579 g/L/h lorsqu'on passe en milieu fondu.

Tableau 20. Performance de l'acylation de la naringine en milieu solvant (rapport molaire naringine : acide laurique de 1:5) et dans un milieu fondu, après 72 heures de réaction, avec élimination en continu de l'eau produite.

	Naringine	
	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g/L/h)
Milieu fondu	85	0.4579
Milieu classique	87	0.1384

Les données rapportées dans les tableaux 19 et 20 montrent que les performances de l'acylation de la naringine et de la rutine sont très proches lorsque le procédé est conduit en milieu fondu.

Tableau 21. Comparaison des performances de la réaction d'acylation de la naringine et de la rutine en milieu fondu, après 72 heures de réaction

Flavonoïdes	Performances	
	Taux de conversion (%)	Vitesse initiale (g/L/h)
Rutine	81	0.4305
Naringine	85	0.4579

Sorour *et al.* (2012) ont synthétisé en milieu fondu des lipides phénoliques par transestérification de l'huile de lin, en présence d'une lipase. Des rendements compris entre 62% et 77% ont été obtenus avec l'acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique comme donneur d'acyle [66], [67]. Des résultats similaires ont été obtenus par Aziz *et al.* (2014) en estérifiant des acides phénoliques avec des huiles essentielles en présence de CAL-B [68]. Des mono- et di-acylglycérols féruloylés ont été synthétisés par biocatalyse en milieu fondu avec des rendements de 96% et 66% par Sun *et al.* (2007) et Feltes *et al.* (2012) respectivement [69], [70]. Sun *et al.* (2012) ont également utilisé des milieux fondus pour synthétiser des dérivés féruloylés lipophiles avec un taux de conversion de 98% et Chaibakhsh *et al.* (2009) des esters d'acide adipique avec un rendement de 96% [71], [72].

2.6.2. Conclusions

L'acylation de la rutine et de la naringine catalysée par la lipase CAL-B, en milieu fondu et avec élimination en continu de l'eau nous a permis d'obtenir quatre types de produits : mono-ester, di-ester, tri-ester et tetra-ester. La concentration de ces produits varie au cours du temps, les produits présentant le plus bas degré d'acylation étant eux-mêmes acylés pour générer les produits multi-acylés ; la conversion du flavonoïde se stabilise quant à elle après 8 h de réaction. Au vu des cinétiques obtenues, il paraît envisageable d'arrêter la réaction au moment où le produit désiré est majoritaire dans le milieu : 8 h pour le mono-ester, 24 h pour le di-ester, 72 h pour le tri-ester. Le tetra-ester reste minoritaire dans ces conditions.

2.7. Synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes et de diacides

Dans l'optique de générer des composés multi-fonctionnels de différentes structures, la synthèse d'esters de flavonoïdes et de diacides a été entreprise. Les diacides présentent l'avantage de posséder deux groupements fonctionnels pouvant être exploités soit pour greffer

deux entités flavonoïdes sur une même chaîne grasse, soit pour greffer deux accepteurs d'acyle de natures différentes (par exemple un flavonoïde et un acide aminé).

En dehors de ces aspects structuraux, les diacides présentent des avantages par rapport aux acides monocarboxyliques. D'une part, ils présentent plus de flexibilité en raison de leur deuxième groupe carboxyle. D'autre part, selon leur structure, ils ont des propriétés bactériostatiques et bactéricides contre une variété de bactéries aérobies et anaérobies [73]. Cependant, peu de données sont disponibles concernant leur utilisation comme donneurs d'acyle avec des flavonoïdes. Seuls Theodosiou *et al.* (2011) [74], Ardhaoui *et al.* (2004) et Vavříková *et al.* (2016) [75] ont rapporté la modification enzymatique de flavonoïdes par des diacides sans aucune optimisation des conditions opératoires de cette réaction.

Notre objectif est de synthétiser des esters de rutine et de naringine avec l'acide dodécanedioïque, établir la cinétique réactionnelle et notamment déterminer le potentiel de cette réaction pour générer une diversité de produits. Un produit particulièrement intéressant dans le cadre de cette étude est le composé penta-modulaire issu du greffage de deux entités flavonoïdes glycosylées sur une chaîne grasse. Pour atteindre ces objectifs, le principal paramètre étudié est le rapport molaire flavonoïde : diacide.

2.7.1. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la nature et la distribution des produits d'acylation de la rutine et de la naringine

Etant donné que les diacides possèdent deux groupements carboxyliques aux extrémités opposées de la chaîne hydrocarbonée, le greffage de deux entités flavonoïde peut être envisagé. Par ailleurs, ainsi que nous l'avons vu précédemment, les flavonoïdes étant des composés polyhydroxylés le greffage d'une ou plusieurs chaînes grasses est possible selon les conditions réactionnelles. Les questions scientifiques posées ici portent donc sur l'effet du ratio molaire des substrats sur la stœchiométrie de la réaction et par suite, l'effet de cette stœchiométrie sur la structure et les propriétés des produits.

La rutine et la naringine ont été mises en présence de l'acide dodécanedioïque, de CAL-B, dans du M2B2. La réaction d'acylation a été menée à reflux, avec élimination en continu de l'eau produite au cours de la réaction. Cinq ratios molaires flavonoïde : acide dicarboxylique ont été testés : 1 :1, 1 :5, 1 :20, 5 :1 et 20 :1. Le suivi cinétique des réactions a été réalisé pendant 7 jours.

Quel que soit le ratio molaire et le flavonoïde utilisé, trois produits ont été obtenus. Des analyses LC-MS ont permis de recueillir des informations relatives à leur structure. Le premier produit (P1) est un mono-ester résultant du greffage d'une chaîne diacide sur une entité flavonoïde. Le deuxième produit (P2) qui est légèrement plus lipophile que le premier est un composé penta-modulaire dans lequel deux entités flavonoïdes sont liées de part et d'autre de la chaîne diacide. Enfin, le troisième produit (P3) est un di-ester plus lipophile que les deux premiers produits, résultant du greffage de deux chaînes diacide sur une entité flavonoïde (Figure 61).

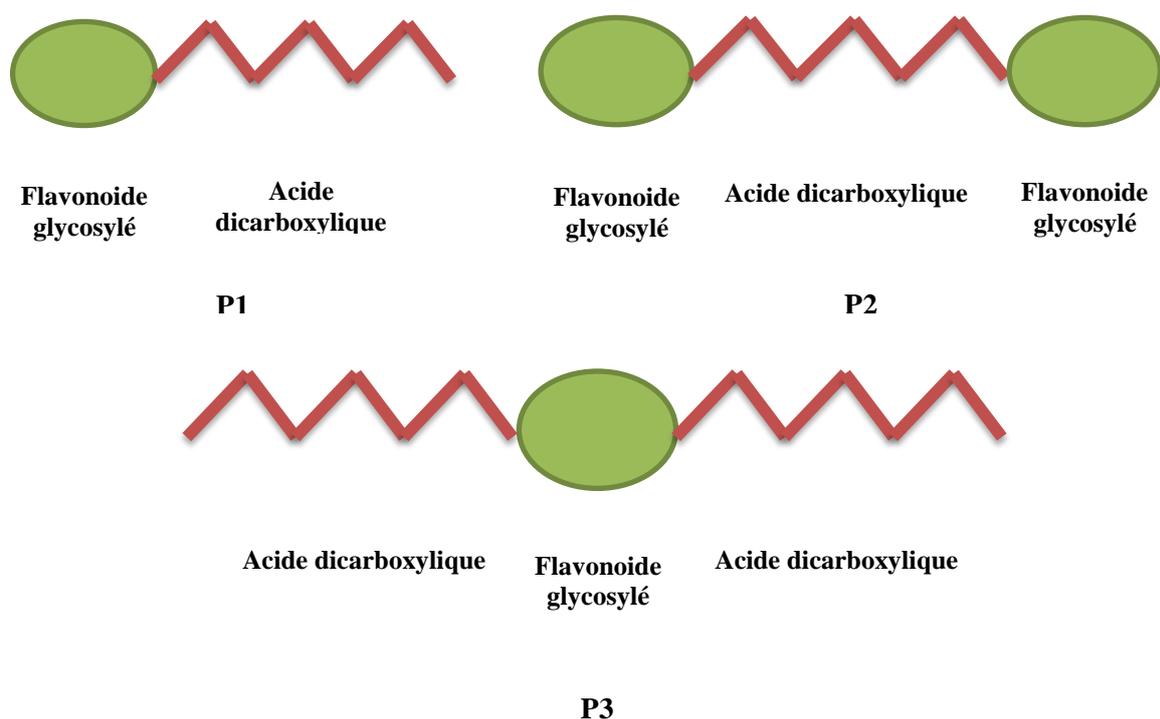


Figure 61. Représentation schématique des structures des produits attendus de l'acylation de la naringine et de la rutine par l'acide dodécanedioïque catalysée par CAL-B

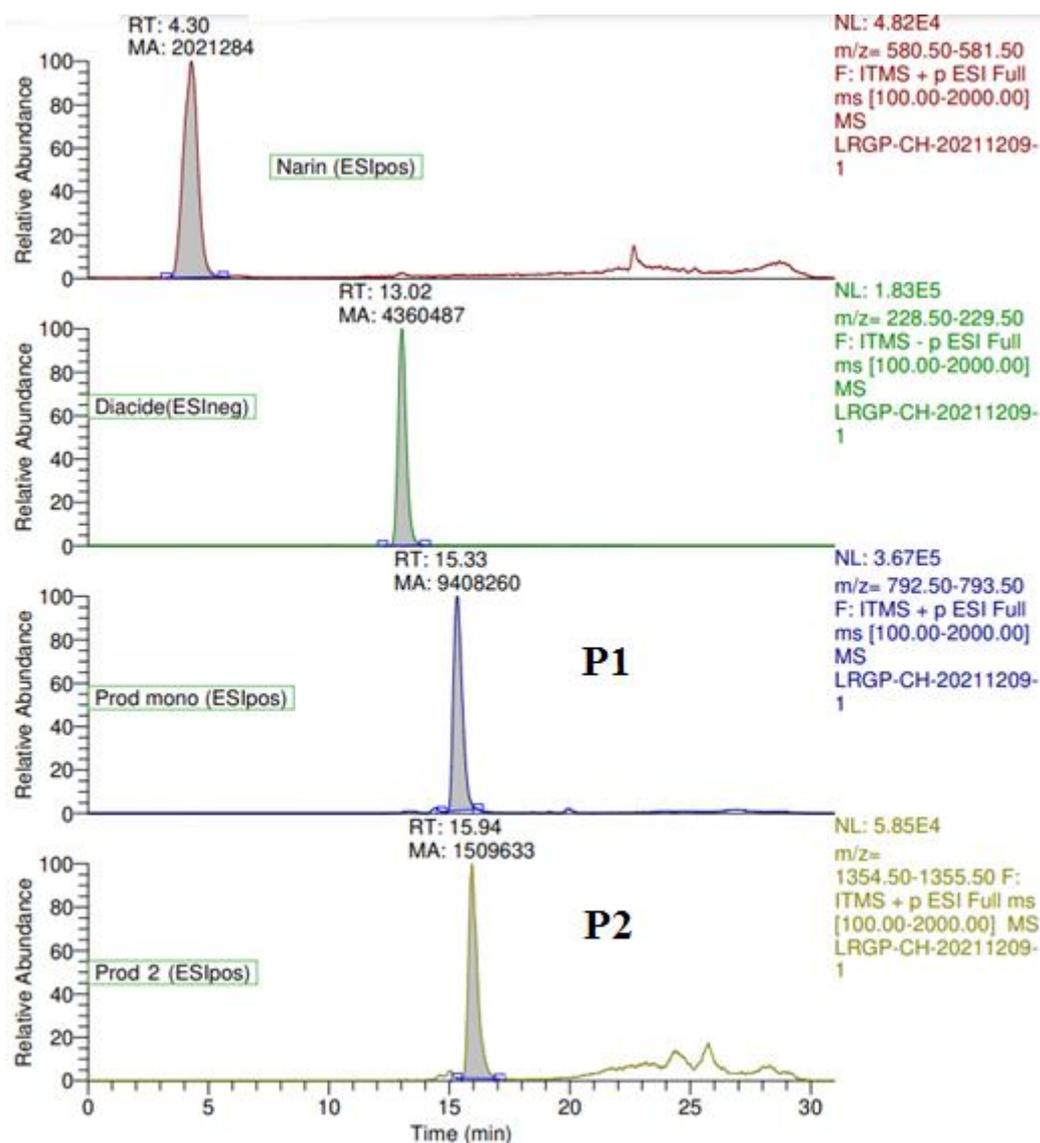


Figure 62. Analyse par LC-MS des milieux réactionnels relatifs à l'acylation enzymatique de la naringine par l'acide dodécanedioïque, en milieu solvant, en présence de CAL-B. Mise en évidence de la présence des produits P1, P2.

Même si des produits identiques sont obtenus avec les cinq ratios molaires étudiés, leurs proportions et les quantités produites varient en fonction du ratio molaire appliqué.

Prenons l'exemple de la cinétique d'acylation de la naringine en présence d'un ratio molaire flavonoïde : acide dicarboxylique 1 :1 (Figure 63). La concentration de naringine diminue progressivement tout au long de la réaction et on observe la formation du produit P1 (mono-ester) dès les premières heures. Après 8 heures de réaction, les produits P2 et P3 apparaissent dans le milieu. A la fin de la réaction, on remarque que la concentration massique du composé P2 (penta-module) (5,4 g/L) est plus importante que celle des deux autres produits, 3,8 et 2

g/L pour P1 et P3 respectivement. En termes de concentrations molaires, il y a dans le milieu 4.10^{-3} mol/L de P2, $4,8.10^{-3}$ mol/L de P1 et 2.10^{-3} mol/L de P3.

La naringine n'est pas consommée totalement et on évalue à 71% son taux de conversion. La vitesse initiale de la réaction est de 0.08 g/L/h ; elle est inférieure à celle de l'acylation de la naringine avec l'acide laurique avec élimination en continu de l'eau (0,14 g/L/h)

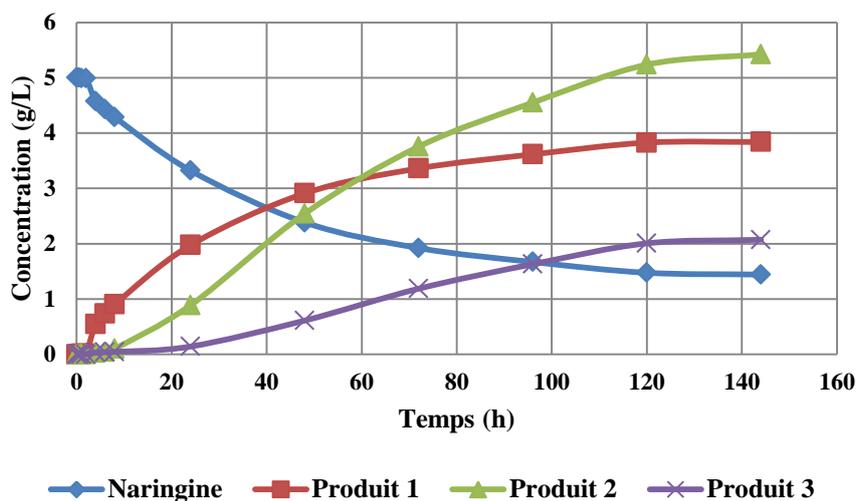


Figure 63. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque en quantité équimolaire, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

En présence d'un ratio molaire de 1 :5, le diacide est en excès par rapport à la naringine (figure 64). La cinétique réactionnelle montre qu'à la fin de la réaction le produit P1 (5,1 g/L) est majoritaire en masse, suivi du produit P3 (3,5 g/L) et du produit P2 (3,1 g/L). En terme de concentration molaire le milieu réactionnel contient $6,4.10^{-3}$ mol/L de P1, $2,3.10^{-3}$ mol/L de P2 et $3,5.10^{-3}$ de P3. La concentration de naringine se stabilise après 48 heures de réaction autour de 0,7 g/L ce qui représente un taux de conversion de 85%. La vitesse initiale réactionnelle est de 0.15 g/L/h, elle est similaire à celle de l'acylation de la naringine avec l'acide laurique avec élimination en continu de l'eau (0,14 g/L/h).

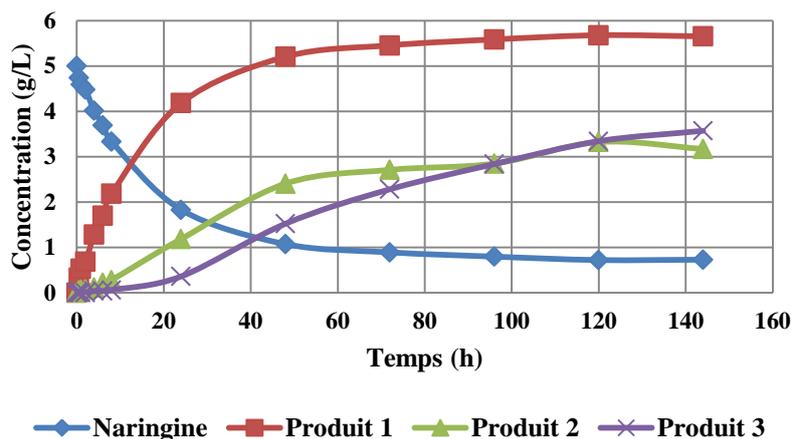


Figure 64. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque en excès, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 : 5

En augmentant encore l'excès de diacide dans le milieu (ratio molaire 1 : 20) (figure 65), on obtient des quantités encore plus élevées de P1 (5,8 g/L). En revanche ces conditions ne semblent pas favoriser la formation des produits P3 (3,4 g/L) et P2 (1,2 g/L) comparativement au ratio molaire 1 : 5. Ce milieu contient $7,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L de P1, $3,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L de P3 et $8,9 \cdot 10^{-4}$ mol/L de P2. Le taux de conversion de la naringine se stabilise après 48h de réaction à 87%. La vitesse initiale dans ces conditions réactionnelles est de 0.16 g/L/h.

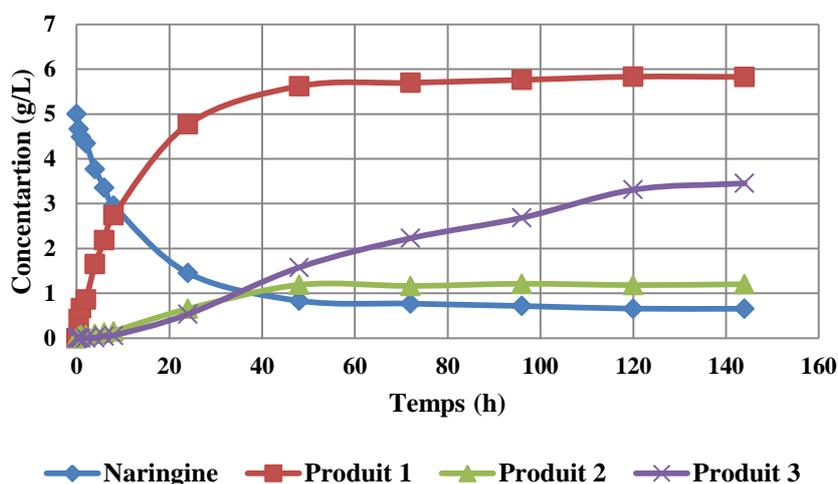


Figure 65. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque en excès, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 : 20

En comparant les performances obtenues avec les ratios molaires 1 : 1, 1 : 5 et 1 : 20, il apparaît que le taux de conversion de la naringine est d'autant plus élevé que l'excès de diacide est important. Au niveau des produits formés, le mono-ester P1 est majoritaire en masse, suivi du

di-ester P3 et du composé penta-modulaire P2 qui est minoritaire. Le taux de conversion le plus faible (71%) est obtenu lorsque les substrats sont présents en quantités équimolaires ; dans ce cas, le produit majoritaire en masse est le composé penta-modulaire P2, suivi du mono-ester P1 puis du di-ester P3.

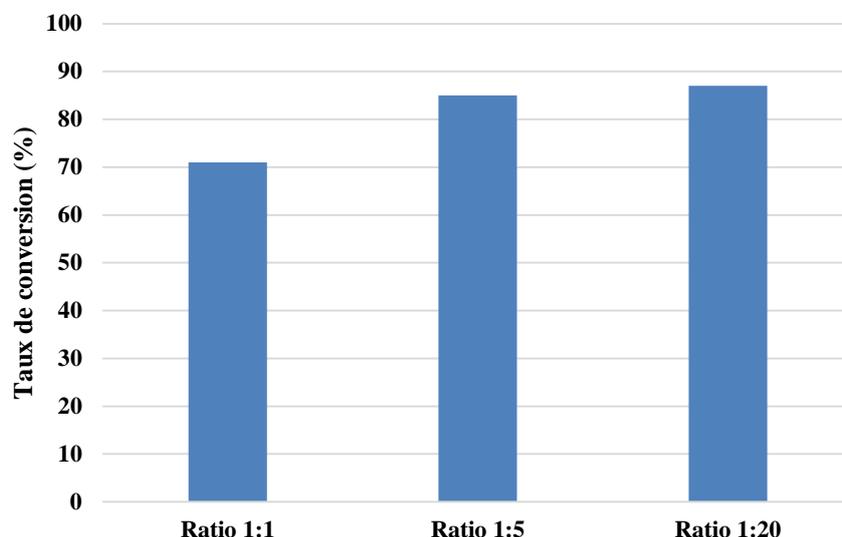


Figure 66. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur le taux de conversion de la naringine lors de son acylation par l'acide dodécandioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

Une tendance similaire est observée pour la vitesse réactionnelle qui augmente avec l'excès de donneur d'acyle.

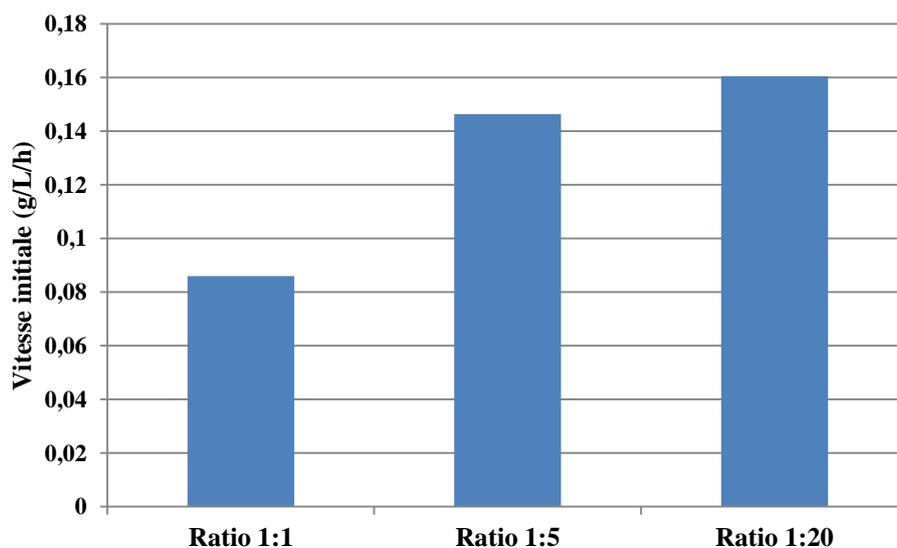


Figure 67. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la vitesse initiale d'acylation de la naringine par l'acide dodécandioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

Des réactions ont également été menées en présence d'un excès de flavonoïde (ratio molaire flavonoïde : diacide 5 :1). Dans ces conditions, c'est le composé penta-modulaire P2 qui est majoritaire en masse dans le milieu (2 g/L), tandis que les produits P1 et P3 restent minoritaires (0,7 et 0,1 g/L respectivement). Ce milieu contient $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol/L de P2, $8,8 \cdot 10^{-4}$ mol/L de P1 et $8 \cdot 10^{-4}$ mol/L de P3.

Ces résultats sont conformes à nos attentes. En effet, l'excès de naringine dans le milieu favorise le greffage du flavonoïde sur chacune des extrémités du diacide, conduisant ainsi au produit penta-modulaire. La naringine n'est pas consommée totalement dans cette réaction ; son taux de conversion est estimé à 26%. La vitesse initiale réactionnelle est de 0.04 g/L/h qui est de loin inférieure aux vitesses initiales obtenues en présence d'un excès de diacide.

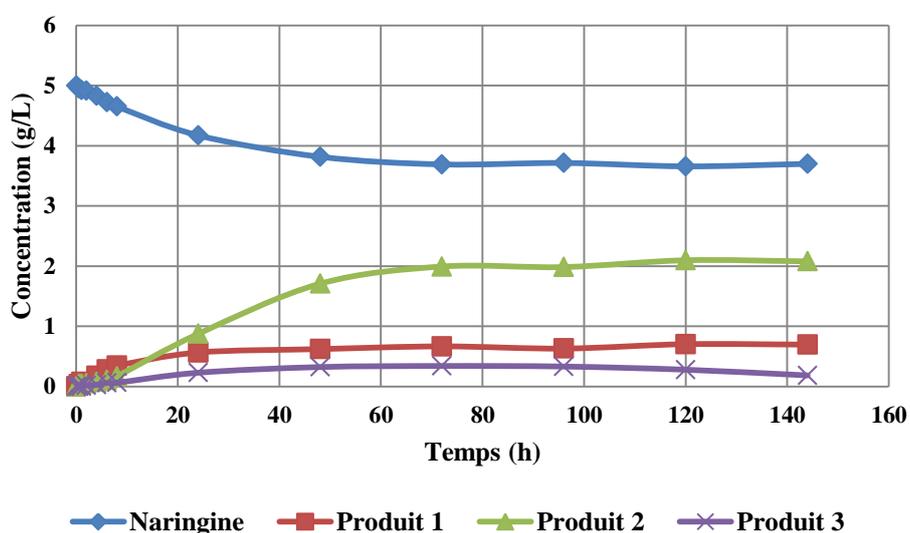


Figure 68. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 5 :1.

En augmentant encore l'excès de naringine dans le milieu pour atteindre un ratio molaire naringine : acide dodécanedioïque de 20 :1, on remarque que le composé penta-modulaire P2 est toujours majoritaire en masse (4,1 g/L) ($3 \cdot 10^{-3}$ mol/L) par rapport aux produits P1 (2,6 g/L) ($3,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L) et P3 (1 g/L) ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). La production de P2 est deux fois plus élevée qu'avec le ratio molaire 5 :1. En termes de performances réactionnelles, la naringine est convertie à hauteur de 57% avec une vitesse initiale de conversion de 0.07 g/L/h.

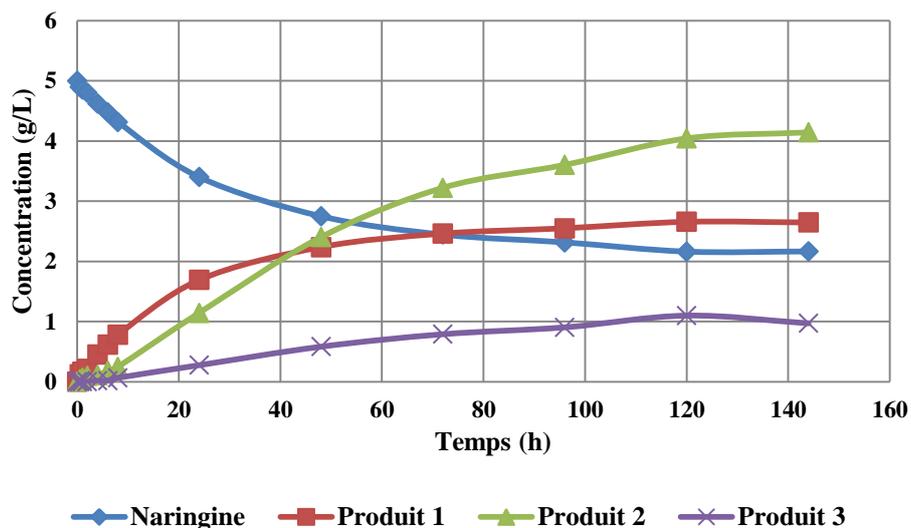


Figure 69. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 20 :1.

En comparant les performances des réactions menées avec les ratios molaires flavonoïde : diacide 1 :1, 5 :1 et 20 :1, on conclut que des quantités équimolaires de substrats ou un excès de substrat accepteur d'acyle favorisent la formation du composé penta-modulaire P2. Le ratio molaire 1 : 1 conduit au meilleur taux de conversion de la naringine (71%), suivi du ratio 20 :1 (57%) puis 5 :1 (26%).

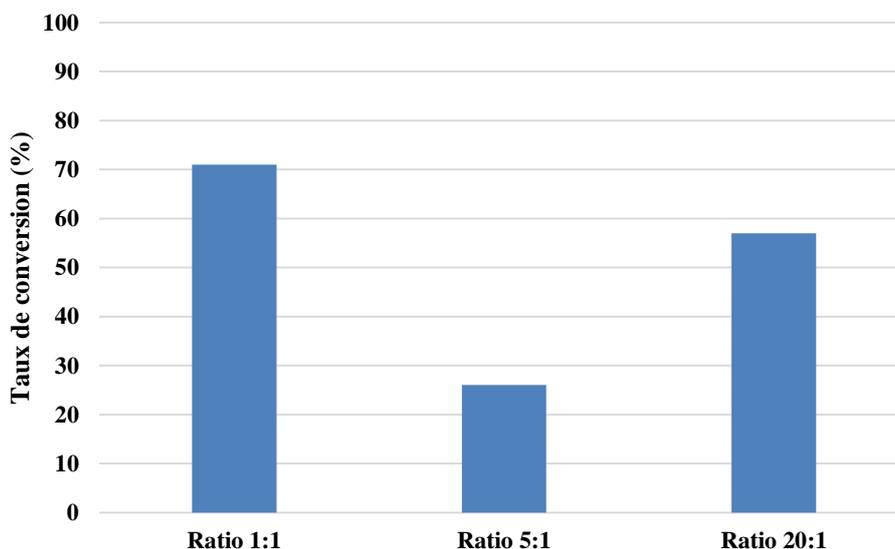


Figure 70. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur le taux de conversion de la naringine lors de son acylation par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

La vitesse réactionnelle la plus élevée est observée avec le ratio molaire 1 :1 (0.08 g/L/h). Un excès de flavonoïde dans le milieu tend à ralentir la réaction (0.04 g/L/h pour le ratio 5 : 1).

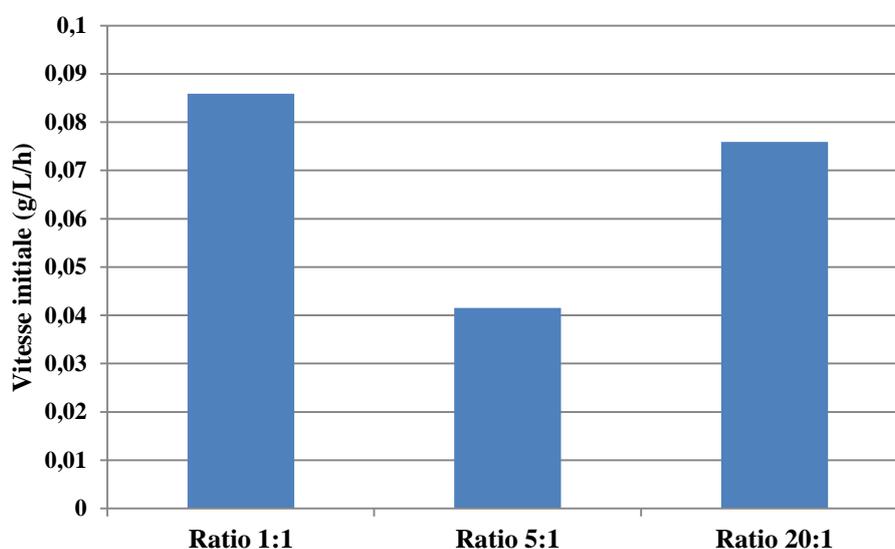


Figure 71. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la vitesse initiale d'acylation de la naringine lors de son acylation par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

L'acylation de la naringine par l'acide dodécanedioïque en présence de CAL-B avec différents ratios molaires permet d'obtenir plusieurs produits. En comparant les résultats obtenus, il apparaît qu'un excès de diacide favorise la production des produits P1 et P3. En revanche, un excès de flavonoïde dans le milieu ou un ratio 1 :1 favorise l'obtention du produit P2.

Concernant l'estérification de la rutine par l'acide dodécanedioïque en présence de CAL-B avec les ratios molaires 1 :1, 1 :5, 1 :20, 5 :1 et 20 :1, des cinétiques similaires à celles observées pour la naringine ont été obtenues. Dans des conditions équimolaires de substrats, les produits P1, P2 et P3 sont obtenus à hauteur de 3,28 g/L ($4 \cdot 10^{-3}$ mol/L), 4,5 g/L ($3,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L), et 1,55 g/L ($1,5 \cdot 10^{-3}$ mol/L), respectivement. Comme pour la naringine, le produit pentamodulaire P2 est majoritaire. Le taux de conversion de la rutine se stabilise à 62%.

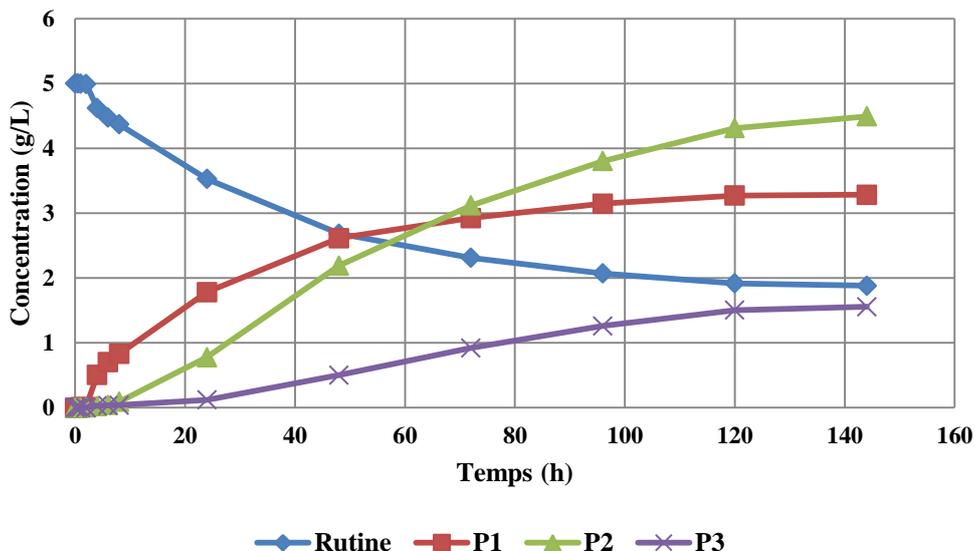


Figure 72. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide dodécanedioïque en quantité équimolaire, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

Avec un ratio molaire de 1 :5, la cinétique réactionnelle montre qu'en fin de réaction le produit P1 (5,07 g/L) est majoritaire en masse et en moles ($6,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L), suivi du produit P3 (2,39 g/L) ($2,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L) et du produit P2 (2 g/L) ($1,40 \cdot 10^{-3}$ mol/L). La concentration de rutine se stabilise après 48 heures de réaction autour de 1.22 g/L, correspondant à un rendement de conversion de 75%.

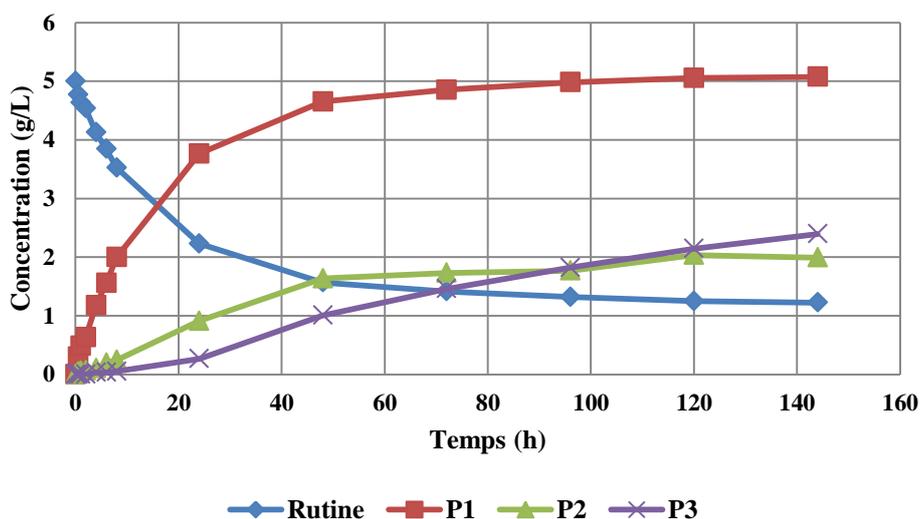


Figure 73. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide dodécanedioïque en excès, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 :5

En augmentant encore l'excès de diacide dans le milieu (ratio molaire 1 :20), on obtient des quantités encore plus élevées de P1 (5,39 g/L) ($6,7 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Le taux de conversion de la rutine passe à 78%. Par contre ces conditions ne semblent pas favoriser la formation des produits P3 (2,37 g/L) ($2,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L) et P2 (0,72 g/L) ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/L), comparativement au ratio molaire 1 :5.

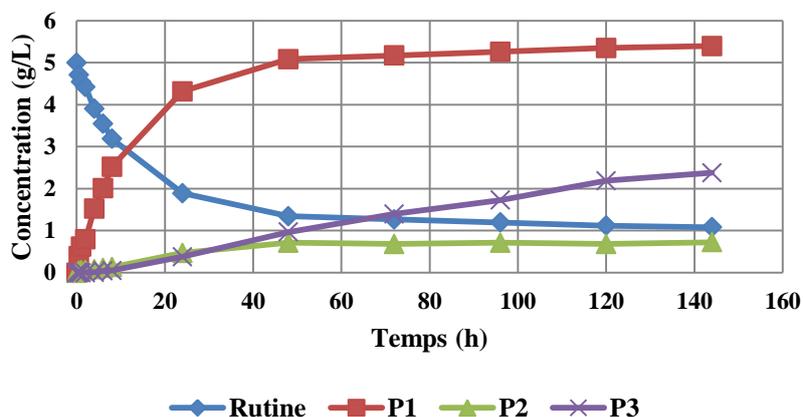


Figure 74. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide dodécanedioïque en excès, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 1 :20.

En termes de performances réactionnelles, il apparaît que le taux de conversion de la rutine est d'autant plus élevé que l'excès de diacide est important. En effet, des taux de conversion de 76% et 78% ont été obtenus pour les ratios molaires 1 :5 et 1 :20, respectivement.

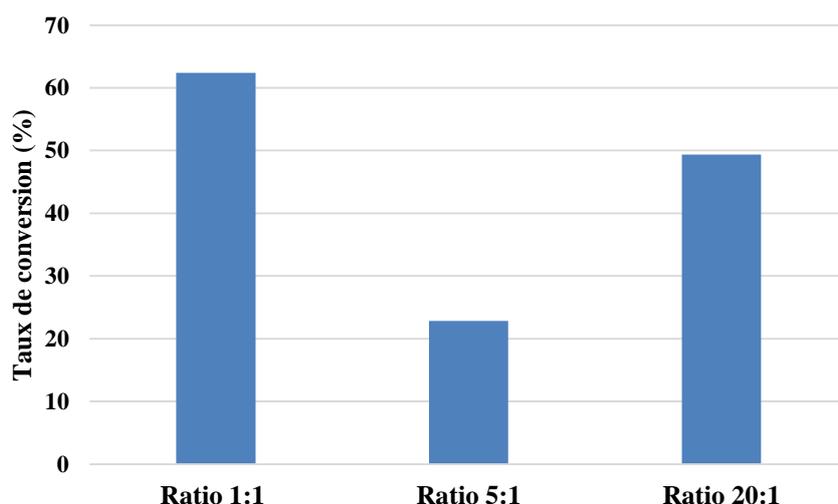


Figure 75. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur le taux de conversion de la rutine lors de son acylation par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

Une tendance similaire est observée pour la vitesse réactionnelle qui augmente avec l'excès de donneur d'acyle.

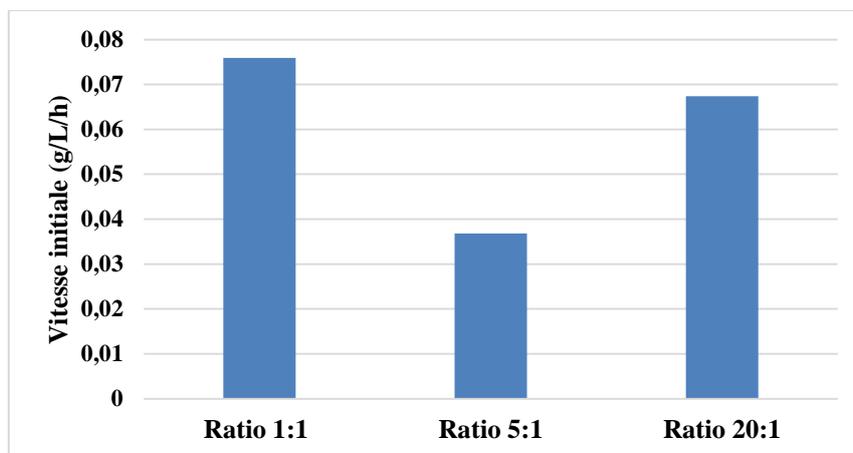


Figure 76. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la vitesse initiale d'acylation de la rutine par l'acide dodécandioïque

Des réactions ont également été menées en présence d'un excès de flavonoïde (ratios molaires flavonoïde : diacide 5 : 1 et 20 : 1). Un ratio molaire de 5 : 1 conduit à la formation majoritaire du composé penta-modulaire P2 (1,88 g/L) ($1,3 \cdot 10^{-3}$ mol/L), tandis que les produits P1 (0,61 g/L ; $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) et P3 (0,15 g/L ; $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) restent minoritaires.

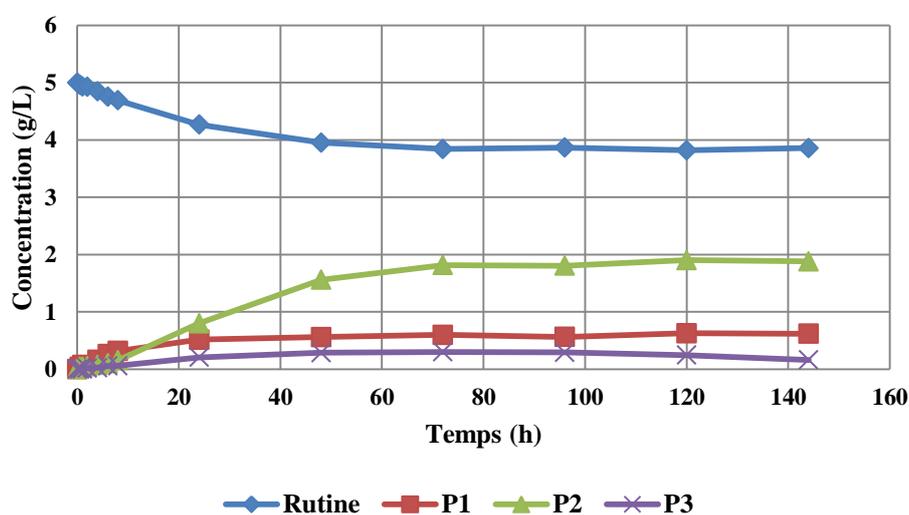


Figure 77. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide dodécandioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 5 : 1

En augmentant encore l'excès de rutine pour atteindre un ratio de 20 : 1, on remarque que le composé penta-modulaire P2 est toujours majoritaire (3,54 g/L) ($2,50 \cdot 10^{-3}$ mol/L) par rapport aux produits P1 (2,26 g/L) ($2,7 \cdot 10^{-3}$ mol/L) et P3 (0,76 g/L) ($7,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Dans ces

conditions la production de P2 est deux fois plus élevée que celle obtenue avec un ratio molaire 5 :1.

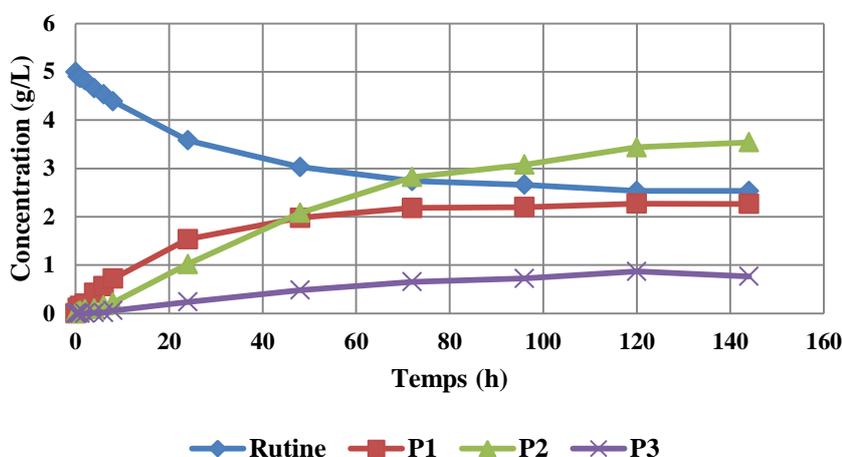


Figure 78. Suivi cinétique de la réaction d'acylation de la rutine par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau. Ratio molaire flavonoïde : donneur d'acyle 20 :1

En comparant les performances des réactions menées avec les ratios molaires flavonoïde : diacide 1 :1, 5 :1 et 20 :1, on conclut que des quantités équimolaires de substrats ou un excès de substrat accepteur d'acyle favorisent la formation du composé penta-modulaire P2. Le ratio molaire 1 : 1 conduit au meilleur taux de conversion de la rutine (62%), suivi du ratio 20 :1 (49%) puis 5 :1 (22%).

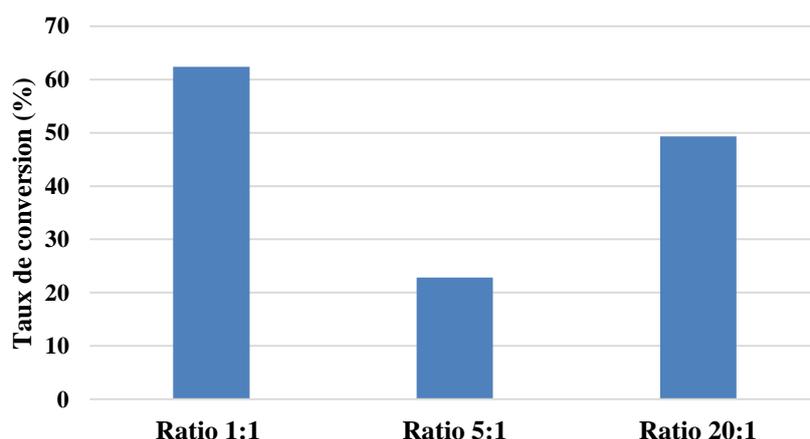


Figure 79. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur le taux de conversion de la rutine lors de son acylation par l'acide dodécanedioïque, en présence de CAL-B, avec élimination en continu de l'eau

La vitesse réactionnelle la plus élevée est observée avec le ratio molaire 1 :1 (0.07 g/L/h). Un excès de flavonoïde dans le milieu tend à ralentir la réaction.

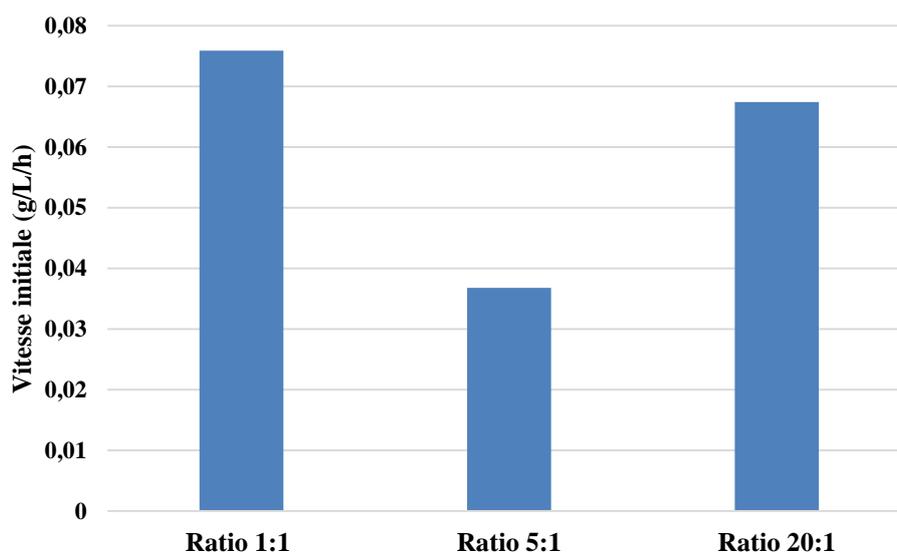


Figure 80. Effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la vitesse initiale d'acylation de la rutine par l'acide dodécanedioïque

Les résultats obtenus avec la rutine sont donc similaires à ceux relevés pour la naringine. Il apparaît de cette étude que l'ajustement du ratio molaire flavonoïde : diacide constitue un moyen efficace d'orienter la réaction vers la synthèse de produits spécifiques. La production des composés P1 et P3 est favorisée par un excès de diacide tandis que des conditions équimolaires ou un excès de flavonoïde favorise la synthèse du composé P2.

2.7.2. Conclusions

L'estérification de la naringine et de la rutine avec l'acide dodécanedioïque en présence de CAL-B nous a permis d'obtenir trois types de produits : un mono-ester résultant du greffage d'une chaîne grasse sur une entité flavonoïde, un di-ester correspondant au greffage de deux chaînes grasses sur une entité flavonoïde et un composé penta-modulaire comportant une chaîne grasse et deux entités flavonoïde glycosylées. Un excès de diacide dans le milieu favorise la formation du mono- et du di-ester avec des performances réactionnelles importantes à un ratio molaire flavonoïde : diacide de 1 :20. Par ailleurs, des quantités équimolaires de flavonoïde et de diacide ou dans une moindre mesure un excès de flavonoïde dans le milieu favorise la synthèse du composé penta-modulaire majoritairement. L'ensemble de ces résultats montre que l'ajustement du ratio molaire flavonoïde : diacide constitue un moyen efficace d'orienter la réaction vers la synthèse de produits spécifiques.

2.8. Régiosélectivité des réactions d'acylation

Les lipases présentent des propriétés de chimio- et régio-sélectivité particulièrement intéressantes dans le cadre de l'acylation de composés polyfonctionnels. Ces enzymes permettent de catalyser l'acylation sélective de groupements hydroxyle spécifiques des molécules de flavonoïde. Ces propriétés de sélectivité varient d'une lipase à l'autre, mais pour une enzyme donnée, le nombre de produits d'acylation est limité ; la plupart du temps un produit unique est obtenu, dont la structure est « contrôlée » *via* la sélectivité de l'enzyme et conduit à des propriétés physico-chimiques et biologiques bien déterminées. La position des chaînes acyle dans la structure des esters de flavonoïdes est déterminante pour ces propriétés dans la mesure où des groupements fonctionnels spécifiques sont impliqués. Il est donc très important de déterminer la position exacte de la chaîne grasse ou des chaînes grasses dans la structure des produits issus de l'acylation de la rutine et de la naringine.

L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) des composés tri-modulaires synthétisés à partir de rutine et de divers acides gras, en présence de CAL-B, a montré que seule la position 4''-OH de l'entité rhamnose du flavonoïde est acylée (Figure 81).

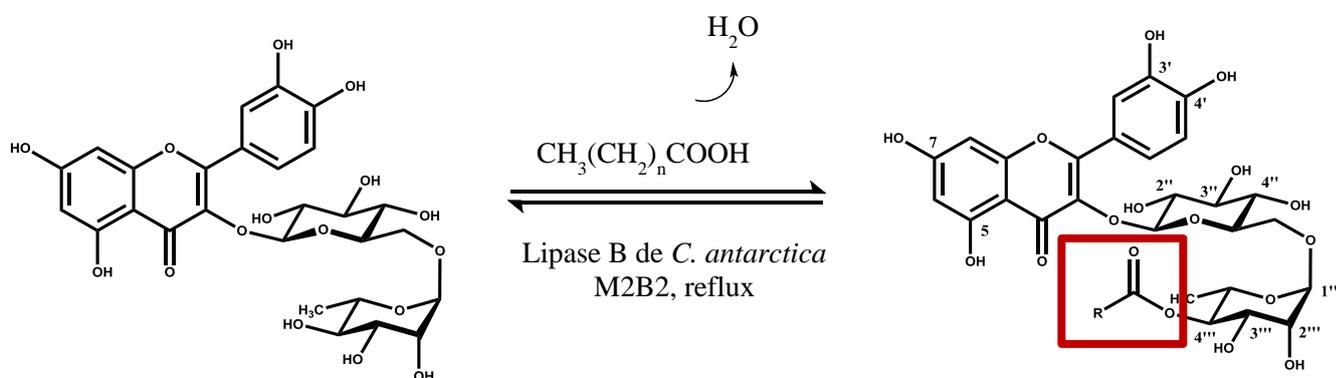


Figure 81. Schéma réactionnel de l'acylation sélective de la rutine en position 4''- OH quelle que soit la longueur de chaîne de l'acide gras donneur d'acyle

La position du greffage de la chaîne grasse sur la rutine a été déterminée par comparaison des spectres RMN ¹H de la rutine et de l'ester. Pour les protons aromatiques aucune modification de déplacement chimique n'a été observée. En revanche, un décalage est observé au niveau des pics relatifs à la partie glycosidique du flavonoïde : plus précisément, le triplet du proton en position 4'''' bouge de 3.07 ppm à 4.7 ppm (Figure 83). Donc l'acylation a eu lieu précisément sur le 4''''-OH secondaire du fragment rhamnose.

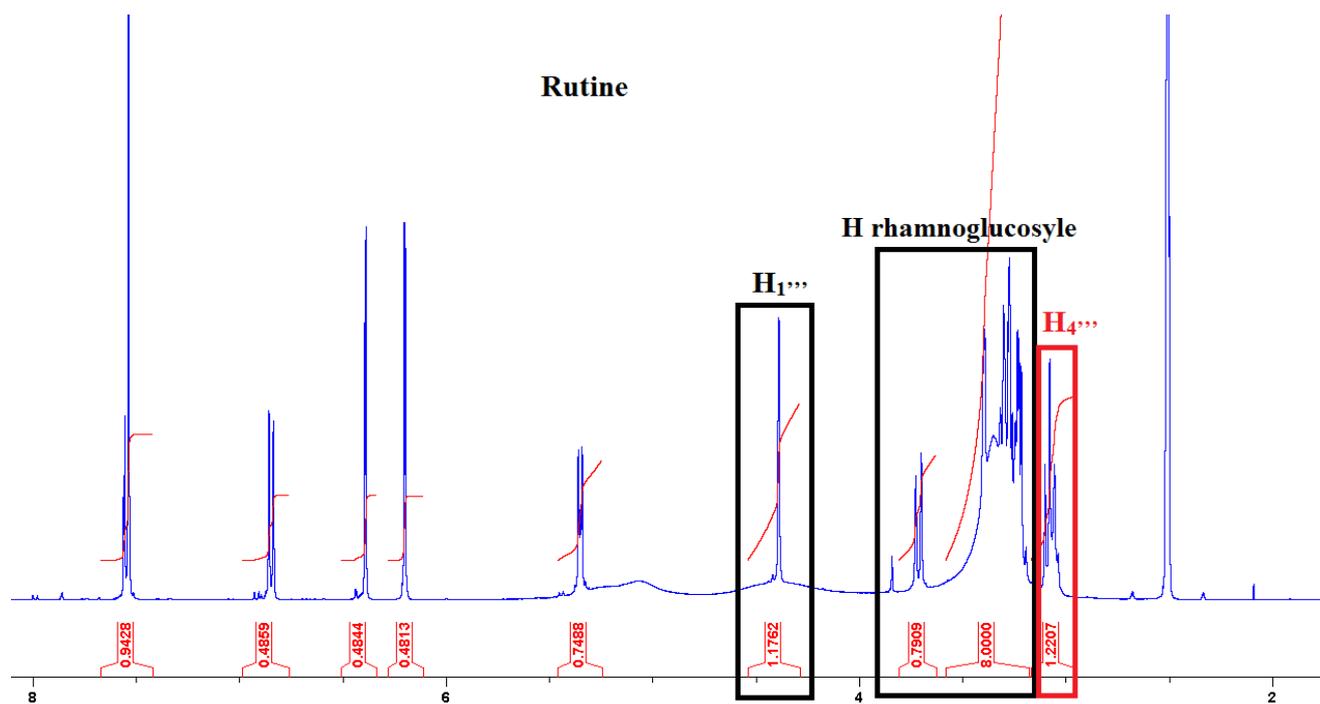


Figure 82. Spectre RMN ¹H de la rutine

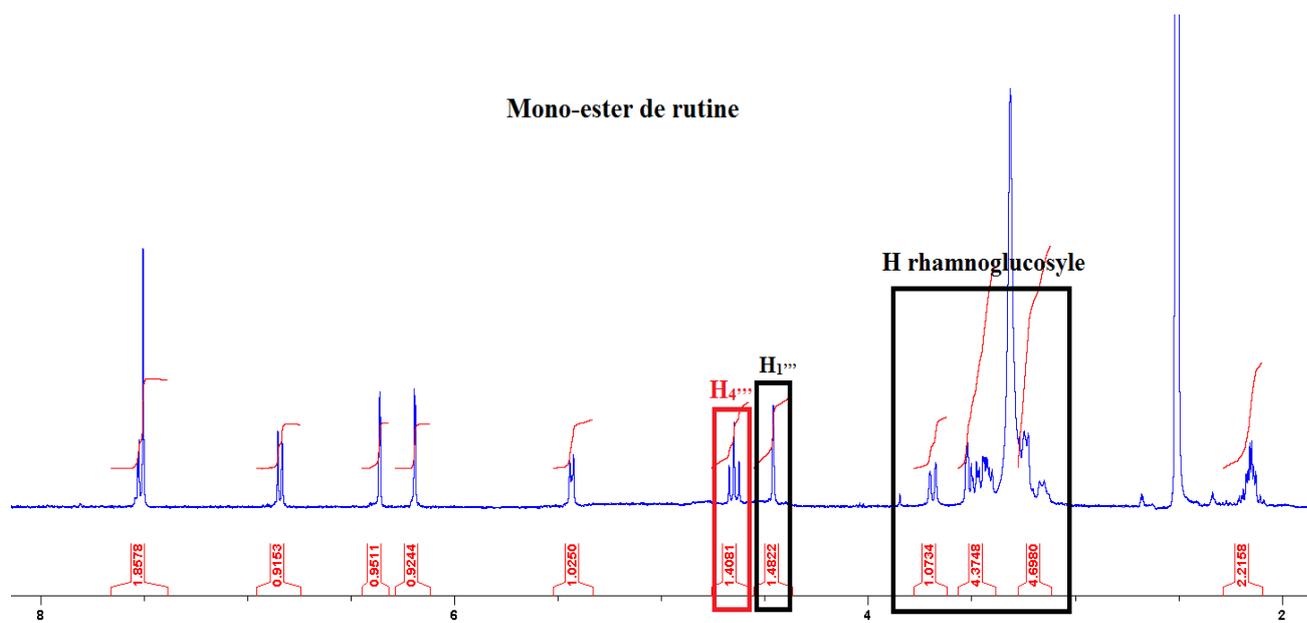


Figure 83. Spectre RMN ¹H du mono-ester de rutine

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Mellou *et al.* (2005, 2006) [49], Razak *et al.* (2015) [76], Katsoura *et al.* (2006) et par Ardhaoui *et al.* (2004). D'autres groupes de recherche ont montré que l'acylation de la rutine pouvait également avoir lieu en position 3'-OH du fragment glucose avec des acides gras simples et l'acide cinnamique en présence de CAL-B [51], [77]. Danieli *et al.* (1997) ont rapporté que l'acylation de la rutine avec un excès

d'acétate de vinyle, en utilisant la même lipase, se produisait à la fois sur le 4''-OH du rhamnose et sur le 3''-OH du glucose, ce qui donne la rutine 3'',4''-O-diester [78]. Une étude récente de Li *et al.* (2021) a montré qu'avec un excès de benzoate de vinyle, l'acylation de la rutine se fait sur les positions 2''-OH et 4''-OH du rhamnose et sur le 2''-OH du glucose avec la lipase de *Thermomyces lanuginosus* [79]. La nature de l'enzyme et du donneur d'acyle sont certainement à l'origine des différences observées lorsqu'on compare ces travaux.

Concernant la naringine, la RMN a montré que le greffage des chaînes grasses s'effectue sur l'hydroxyle primaire de l'entité glycosidique en position 6''.

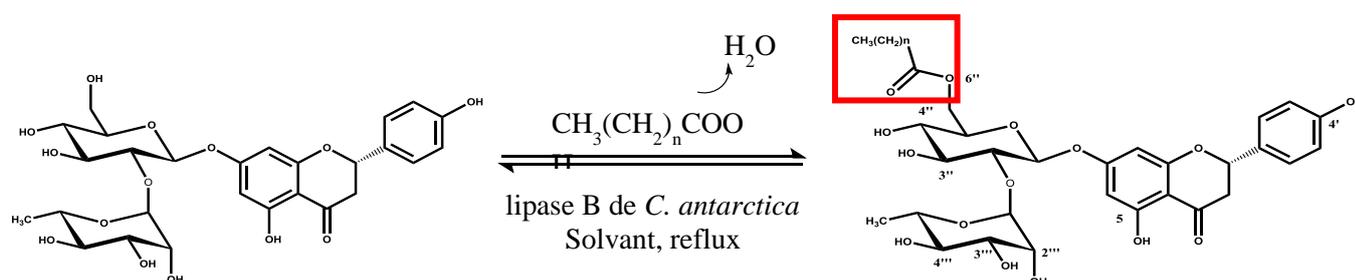


Figure 84. Schéma réactionnel de l'acylation sélective de la naringine en position 6''- OH quelle que soit la longueur de chaîne de l'acide gras

La position du greffage de la chaîne grasse sur la naringine a été déterminée par comparaison des spectres RMN ^1H de la naringine et de son ester. Comme pour la rutine, aucune modification de déplacement chimique n'a été observée pour les protons aromatiques. Par contre un décalage a été observé au niveau des signaux relatifs à la fraction glycosidique du flavonoïde : le signal du proton en position 6'' bouge de 3.21 ppm à 4.02 ppm ; le proton du 6''- OH qui apparaît entre 3.04 et 3.81 ppm dans le spectre de la naringine disparaît dans le spectre de l'ester (Figure 86). Par ailleurs, les données RMN ^{13}C indiquent que deux signaux relatifs à la partie glycosidique de la naringine diffèrent lorsque le spectre de l'ester est comparé à celui du flavonoïde: les signaux du C''-6 et du C''-5 se décalent respectivement de 2,75 ppm et 3,4 ppm vers les plus hauts déplacements chimiques, suggérant la présence d'une liaison ester au niveau de l'hydroxyle primaire de la naringine, en position 6''.

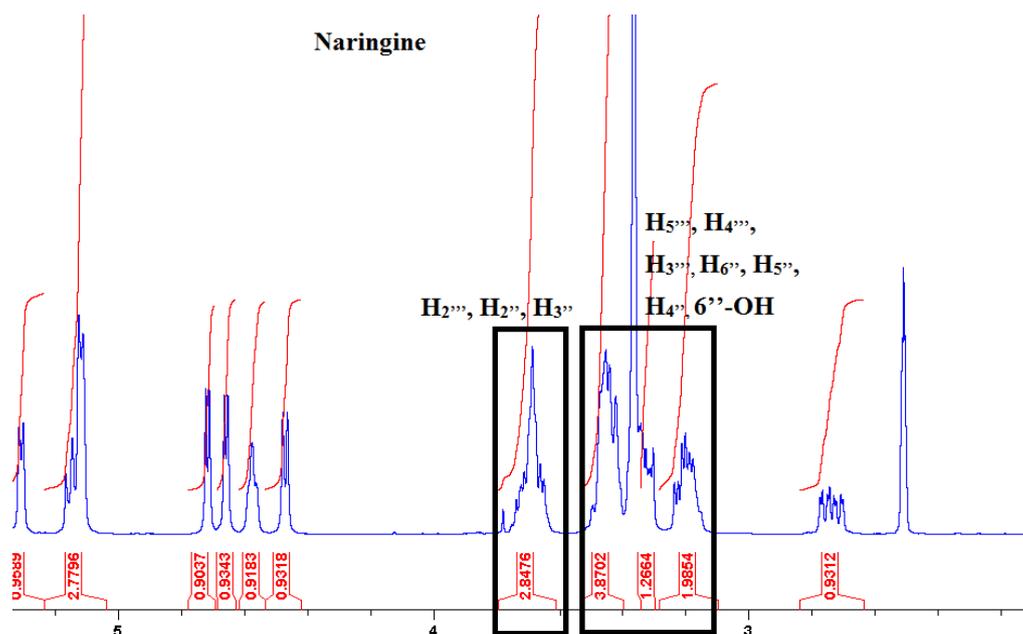


Figure 85. Spectre RMN ^1H de la naringine

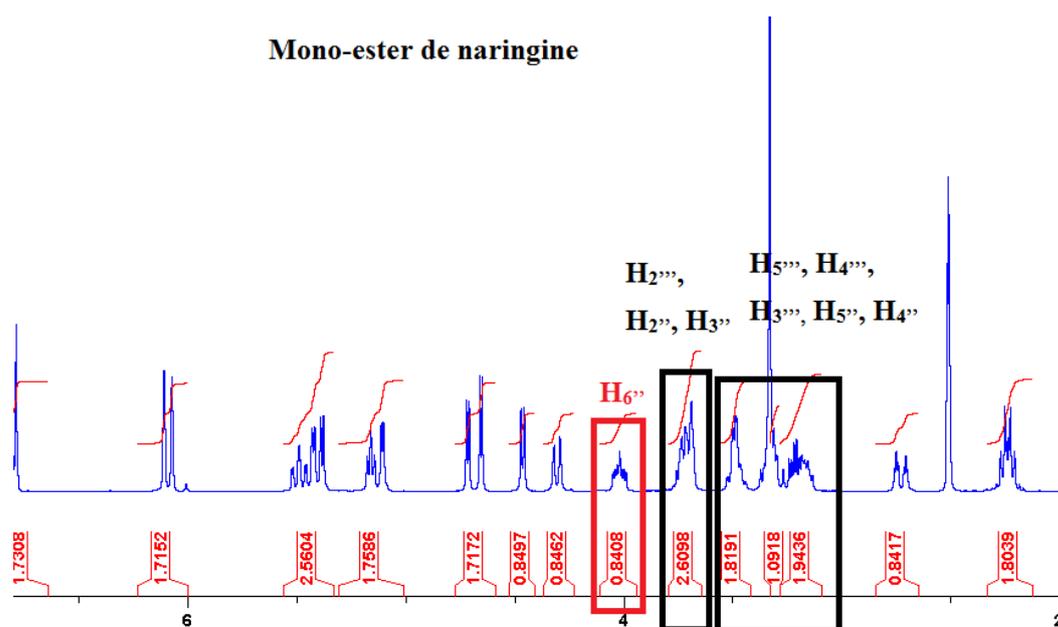


Figure 86. Spectre RMN ^1H du mono-ester de naringine

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Kontogianni *et al.* (2001), Watanabe *et al.* (2009), Li *et al.* (2020) ainsi que Sun *et al.* (2017) [22], [80]–[82].

Cette haute régio-sélectivité de la lipase CAL-B vis-à-vis de l'acylation de composés polyhydroxylés tels que la rutine et la naringine est l'un des atouts majeurs de la voie enzymatique pour l'obtention de structures ciblées d'esters de flavonoïdes, dans lesquelles les groupements phénoliques responsables de l'activité antioxydante sont préservés.

Différents facteurs peuvent expliquer cette sélectivité. Le premier repose sur les modes d'interaction préférentiels entre les substrats flavonoïdes et le site actif du biocatalyseur.

De Oliveira *et al.* (2009) ont établi un protocole de docking pour étudier les positions, les orientations et les interactions de l'isoquercitrine et de la rutine dans la cavité du site actif de la lipase CAL-B, en choisissant la réaction d'acétylation comme réaction modèle. L'analyse des résultats des simulations a montré que les deux flavonoïdes sont stabilisés dans la cavité catalytique de la CAL-B avec leur partie aglycone ancrée à l'entrée de la cavité. Des liaisons hydrogène formées entre les fonctions phénol des flavonoïdes et les carbonyles peptidiques de résidus localisés à l'entrée du site catalytique contribuent à stabiliser les complexes. Les parties glycosidiques des flavonoïdes s'orientent vers le fond de la cavité, plaçant les hydroxyles 6''-OH de l'isoquercitrine et 4'''-OH de la rutine à proximité des résidus catalytiques [83].

Le deuxième critère susceptible d'intervenir est la réactivité chimique intrinsèque des différents groupements hydroxyles présents dans la structure des flavonoïdes. Afin d'évaluer celle-ci, des calculs de modélisation moléculaire ont été menés en appliquant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Plus spécifiquement, la différence d'énergie ΔE entre les orbitales HOMO et LUMO a été calculée d'une part pour la rutine et d'autre part pour chaque alcoolate/phénolate pouvant être généré à partir de la rutine, par élimination d'un proton. Nous sommes partis du postulat que plus la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO est faible, plus la molécule est susceptible de perdre un proton et d'effectuer une attaque nucléophile [11], [12].

Les valeurs des énergies des orbitales HOMO et LUMO de la rutine avant et après arrachement des protons des différents groupements hydroxyle sont résumées dans le tableau ci-dessous. L'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 4''' conduit à la valeur de ΔE la plus faible. Les autres hydroxyles classés en ordre croissant selon leur valeur de ΔE sont ceux des positions 3'', 4'', 2'', 2''', 3''', 4', 3', 5 et 7. Ces calculs suggèrent une plus grande réactivité des groupements hydroxyle glycosidiques comparativement aux groupements phénoliques. Par ailleurs, ils suggèrent une plus grande réactivité du groupement hydroxyle en position 4''', ce qui est cohérent avec la sélectivité observée expérimentalement.

Tableau 22. Valeurs des énergies des orbitales HOMO et LUMO de la rutine, et de ses différents alcoolates/phénolates

	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV) $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$
Rutine	-6,108	-1,907	4,201
Rutine 2''-OH	-5,135	-3,024	2,111
Rutine 2'''-OH	-5,132	-3,012	2,119
Rutine 3'-OH	-5,318	-3,130	2,187
Rutine 3''-OH	-5,005	-3,026	1,978
Rutine 3'''-OH	-5,214	-3,070	2,144
Rutine 4'-OH	-5,274	-3,089	2,184
Rutine 4''-OH	-5,090	-3,017	2,073
Rutine 4'''-OH	-4,235	-3,053	1,182
Rutine 5-OH	-5,228	-2,768	2,459
Rutine 7-OH	-5,409	-3,015	2,303

Des calculs similaires ont été entrepris avec la naringine ; les valeurs d'énergie sont données dans le tableau ci-dessous.

Les valeurs de ΔE calculées suggèrent une plus grande réactivité de l'hydroxyle primaire en position 6'' ainsi qu'une réactivité décroissante pour les hydroxyles au niveau des positions 3''', 4''', 2''', 4'', 3'', 4' et finalement 5. Cela est cohérent avec l'acylation majoritaire de la position 6'' de la naringine observée expérimentalement. Ces calculs sont également en accord avec l'observation d'un deuxième site d'acylation au niveau de la position 3'''.

Tableau 23. Valeurs des énergies des orbitales HOMO et LUMO de la naringine, et de ses différents alcoolates/phénolates

	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV) $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$
Naringine	-6,546	-1,919	4,626
Naringine 2'''-OH	-5,175	-2,334	2,840
Naringine 3''-OH	-5,185	-2,314	2,870
Naringine 3'''-OH	-5,055	-2,302	2,752
Naringine 4'-OH	-5,229	-2,290	2,938
Naringine 4''-OH	-5,244	-2,400	2,844
Naringine 4'''-OH	-5,143	-2,319	2,824
Naringine 6''-OH	-4,914	-2,308	2,606
Naringine 5-OH	-5.287	-2.235	3.052

Concernant les produits mono-, di-, tri-, et tetra-esters issus de l'acylation de la rutine et de la naringine en milieu fondu, à défaut de pouvoir purifier et caractériser chacun d'entre eux, les résultats des simulations moléculaires peuvent aider à formuler des hypothèses quant à la position des chaînes grasses greffées. Les groupements hydroxyle classés selon leurs valeurs de ΔE croissantes conduisent à l'ordre suivant : 4''', 3'', 4'', 2'', 2''', 3''', 4', 3', 5 et 7. Ces résultats suggèrent la position 4''' comme premier site d'acylation (mono-ester en 4''') et la position 3'' comme second site d'acylation (di-ester en 4''' et 3''), ce qui est cohérent avec les résultats expérimentaux. En suivant le même raisonnement, l'hypothèse d'un troisième site d'acylation en 4'' (tri-ester en 4''', 3'' et 4'') et d'un quatrième site en 2'' (tetra-ester en 4''', 3'', 4'' et 2'') peut être formulée. Dans le cas de la naringine, les groupements hydroxyle classés selon leurs valeurs de ΔE croissantes sont 6'', 3''', 4''', 2''', 4'', 3'', 4' et 5. Ceci

suggère l'acylation séquentielle des positions 6'', 3''', 4''' et 2''' conduisant à un mono- (en 6''), un di- (en 6'' et 3'''), un tri- (en 6'', 3'''' et 4''') et un tetra-ester (en 6'', 3''', 4''', 2''').

Concernant les produits issus de l'acylation de la naringine et de la rutine par l'acide dodecanedioïque, seules des hypothèses peuvent être formulées dans la mesure où tous les produits n'ont pas été purifiés. Dans le cas du produit P1 dérivé de la naringine et résultant du greffage d'une seule chaîne grasse, les résultats expérimentaux et de modélisation obtenus précédemment suggèrent une acylation en position 6''. En suivant le même raisonnement, on peut supposer que le produit P3 résulte de l'acylation des positions 6'' et 3'''' de la naringine. Pour le produit P2 porteur de deux entités flavonoïde reliées entre elles par une chaîne grasse, il est logique de penser que la position 6'' de chaque entité naringine est impliquée. Concernant la rutine, les calculs de modélisation suggèrent l'implication de la position 4''' dans le produit P1, des positions 4''' et 3'' pour le produit P3 et enfin de la position 4''' de chaque entité rutine pour le produit P2.

2.8.1. Conclusions

Les analyses par RMN des produits purifiés ont montré que l'acylation de la naringine et de la rutine par des acides gras est régiosélective lorsque la réaction est catalysée par la lipase CAL-B, conduisant à des mono-esters de flavonoïde. Quel que soit l'acide gras utilisé en tant que donneur d'acyle, l'acylation de la naringine se fait préférentiellement sur la position 6'' porteuse d'un hydroxyle primaire, tandis que la position 4''' de la rutine est acylée. Les résultats de modélisation moléculaire sont cohérents avec cette sélectivité observée expérimentalement laquelle paraît logique si l'on considère l'encombrement, la localisation et donc l'accessibilité de chacun de ces deux groupements hydroxyle. Dans le cas des di-, tri- et tetra-esters synthétisés, la modélisation suggère l'acylation de groupements hydroxyles glycosidiques spécifiques des flavonoïdes. On souligne ici que les hypothèses relatives à la structure des di-, tri- et tetra-esters s'appuient uniquement sur des calculs de la réaction chimique des différents groupements fonctionnels des flavonoïdes susceptibles d'être acylés. Dans l'idéal, ces résultats devraient être complétés par des simulations de docking moléculaire afin de déterminer les modes d'interaction préférentiels entre l'enzyme et ses substrats pour évaluer la contribution du biocatalyseur dans la régiosélectivité observée.

2.9. Conclusions

La synthèse enzymatique d'esters de naringine et de rutine catalysée par la lipase B de *C. antarctica* permet l'obtention d'une diversité d'esters de flavonoïdes selon la nature du donneur d'acyle impliqué. Des taux de conversion du flavonoïde élevés sont obtenus en présence d'un excès de donneur d'acyle. Les performances réactionnelles ont été significativement améliorées par l'élimination en continu de l'eau produite au cours de la réaction. Un mono-ester est obtenu dans le cas de la rutine tandis que l'acylation de la naringine conduit à un mono- et un di-ester.

Ces réactions sont régiosélectives. Le greffage de la chaîne grasse s'effectue sur l'hydroxyle en position 4'' de la rutine ; dans le cas de la naringine, l'acylation a lieu majoritairement au niveau de l'hydroxyle primaire en position 6''.

Des réactions ont été menées en mode fed-batch avec une alimentation discontinue soit en flavonoïde, soit en acide gras. Toutefois, ce mode de conduite du procédé d'acylation n'a pas permis d'améliorer les performances comparativement aux réactions menées en mode batch.

La conduite des réactions en milieu fondu a permis l'obtention d'une plus grande diversité de produits ; des mono-, di-, tri- et tetra-esters ont en effet été obtenus pour les deux flavonoïdes naringine et rutine. Ces différents produits apparaissent séquentiellement dans le milieu ce qui permet d'envisager des temps spécifiques d'arrêt de la réaction en fonction du produit recherché prioritairement. Les taux de conversion sont élevés.

L'acylation de la rutine et de la naringine par un diacide a permis de générer une nouvelle famille de composés. En particulier, cette réaction mène à un composé penta-modulaire présentant deux entités flavonoïdes glycosylées reliées par une chaîne grasse. Deux autres produits d'intérêt peuvent également être obtenus par cette voie de synthèse, un mono- et di-ester. L'intérêt de ces composés réside dans la présence d'une ou deux fonctions carboxyliques libres permettant d'envisager le greffage ultérieur d'entités complémentaires comme des acides aminés. Une contribution importante de cette étude est la mise en évidence de l'effet du ratio molaire flavonoïde : diacide sur la distribution des différents produits dans le milieu réactionnel.

3. Références

- [1] Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, and S. Kobayashi, “Regioselective Synthesis and Structures of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 204, no. 15, pp. 1863–1868, 2003, doi: 10.1002/macp.200350041.
- [2] L. Bouzidi, S. Li, S. Di Biase, S. Q. Rizvi, and S. S. Narine, “Lubricating and waxy esters, I. Synthesis, crystallization, and melt behavior of linear monoesters,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 165, no. 1, pp. 38–50, 2012, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.11.003.
- [3] W. Sahmim, G. Eid, F. Dellarose Boer, H. Chapuis, P. G開ardin, and C. G開ardin-Charbonnier, “One Step Regioselective Acylation of Polyphenolic Wood Extractive and Its Application for Wood Treatment,” *J. Renew. Mater.*, vol. 10, no. 6, pp. 1491–1503, 2022, doi: 10.32604/JRM.2022.016364.
- [4] G. Jin and H. Yoshioka, “Synthesis of lipophilic poly-lauroyl-(+)-catechins and radical-scavenging activity,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 69, no. 3, pp. 440–447, 2005, doi: 10.1271/bbb.69.440.
- [5] S. Hong and S. Liu, “Targeted acylation for all the hydroxyls of (+)-catechin and evaluation of their individual contribution to radical scavenging activity,” *Food Chem.*, vol. 197, pp. 415–421, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.134.
- [6] S. Hong, S. Wang, H. Cai, and S. Liu, “Regiospecific methylation of all the hydroxyls in (+)-catechin by a stepwise differentiation strategy,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 99, no. 8, pp. 3785–3791, 2019, doi: 10.1002/jsfa.9594.
- [7] C. Cren-Olivé, J. M. Wieruszski, E. Maes, and C. Rolando, “Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, no. 25, pp. 4545–4549, 2002, doi: 10.1016/S0040-4039(02)00745-1.
- [8] U. Salma *et al.*, “Amphiphilic core/shell nanoparticles to reduce biocide leaching from treated wood, 1 - leaching and biological efficacy,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 295, no. 5, pp. 442–450, 2010, doi: 10.1002/mame.200900250.
- [9] S. A. Payán-Gómez, N. Flores-Holguín, A. Pérez-Hernández, M. Piñón-Miramontes,

- and D. Glossman-Mitnik, "Computational molecular characterization of the flavonoid rutin," *Chem. Cent. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, 2010, doi: 10.1186/1752-153X-4-12.
- [10] A. M. Mendoza-Wilson and D. Glossman-Mitnik, "Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (–)-epicatechin related to their antioxidant ability," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 761, no. 1–3, pp. 97–106, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.THEOCHEM.2006.01.001.
- [11] J. Wang *et al.*, "Synthesis, antioxidant activity, and density functional theory study of catechin derivatives," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 85, pp. 54136–54141, Nov. 2017, doi: 10.1039/C7RA11496F.
- [12] R. D. Vargas-Sánchez, A. M. Mendoza-Wilson, R. R. Balandrán-Quintana, G. R. Torrescano-Urrutia, and A. Sánchez-Escalante, "Study of the molecular structure and chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations," *Comput. Theor. Chem.*, vol. Complete, no. 1058, pp. 21–27, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.COMPTC.2015.01.014.
- [13] M. Selva, C. A. Marques, and P. Tundo, "Selective mono-benylation of methylene active compounds with dibenzyl carbonate: Benzylation of phenol," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, no. 15, pp. 1889–1893, 1995, doi: 10.1039/p19950001889.
- [14] J. Simons, *Fluorine chemistry*. New York: Academic Press, 1950.
- [15] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 1869–1879, Jul. 2001, doi: 10.1021/CR000108X.
- [16] P. B. Associates, "ENCYCLOPEDIA OF EMULSION TECHNOLOGY VOLUME 3 Basic Theory Measurement Applications Edited by PAUL BECHER."
- [17] J. L. Emmert, M. W. Douglas, S. D. Boling, C. M. Parsons, and D. H. Baker, "Bioavailability of lysine from a liquid lysine source in chicks," *Poult. Sci.*, vol. 78, no. 3, pp. 383–386, Mar. 1999, doi: 10.1093/PS/78.3.383.
- [18] F. F. Dos Santos, N. M. Dantas, N. K. Simoni, L. S. Pontes, and M. E. M. Pinto-E-silva, "Are foods naturally rich in glutamic acid an alternative to sodium reduction?," *Food Sci. Technol.*, vol. 40, pp. 190–196, Nov. 2019, doi: 10.1590/FST.08819.
- [19] T. Willemse, W. Schepens, H. W. T. Van Vlijmen, B. U. W. Maes, and S. Ballet, "The Suzuki-Miyaura cross-coupling as a versatile tool for peptide diversification and

- cyclization,” *Catalysts*, vol. 7, no. 3, 2017, doi: 10.3390/catal7030074.
- [20] M. F. Fathalla and S. N. Khattab, “Spectrophotometric determination of pKa’s of 1-Hydroxybenzotriazole and oxime derivatives in 95% acetonitrile-water,” *J. Chem. Soc. Pakistan*, vol. 33, no. 3, pp. 324–332, 2011.
- [21] A. Y. H. Saik, Y. Y. Lim, J. Stanslas, and W. S. Choo, “Enzymatic synthesis of quercetin oleate esters using *Candida antarctica* lipase B,” *Biotechnol. Lett.* 2016 392, vol. 39, no. 2, pp. 297–304, Nov. 2016, doi: 10.1007/S10529-016-2246-5.
- [22] “Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media - Kontogianni - 2001 - European Journal of Lipid Science and Technology - Wiley Online Library.” <https://onlinelibrary-wiley-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/doi/10.1002/1438-9312%28200110%29103%3A10%3C655%3A%3AAID-EJLT655%3E3.0.CO%3B2-X> (accessed Mar. 13, 2022).
- [23] S. Riva, B. Danieli, and M. Luisetti, “A Two-Step Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Flavonoid Glycoside Malonates,” *J. Nat. Prod.*, vol. 59, no. 6, pp. 618–621, Jun. 1996, doi: 10.1021/NP960239M.
- [24] E. Enaud, C. Humeau, B. Piffaut, and M. Girardin, “Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2004, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2003.08.002.
- [25] L. Chebil, J. Anthoni, C. Humeau, C. Gerardin, J. M. Engasser, and M. Ghoul, “Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 23, pp. 9496–9502, Nov. 2007, doi: 10.1021/JF071943J/SUPPL_FILE/JF071943JSI20070828_121949.PDF.
- [26] A. Yi Hsan Saik, Y. Yan Lim, J. Stanslas, W. Sim Choo, and A. Y. Hsan Saik, “Biocatalysis and Biotransformation Lipase-catalyzed acylation of quercetin with cinnamic acid Lipase-catalyzed acylation of quercetin with cinnamic acid,” *Biocatal. Biotransformation*, vol. 34, no. 1, pp. 33–43, 2016, doi: 10.1080/10242422.2016.1212844.
- [27] A. Y. H. Saik, Y. Y. Lim, J. Stanslas, and W. S. Choo, “Biosynthesis of Quercetin Palmitate Esters and Evaluation of their Physico-Chemical Properties and Stability,”

- JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 97, no. 9, pp. 977–988, Sep. 2020, doi: 10.1002/aocs.12404.
- [28] E. Kyriakou *et al.*, “Three Regioselectively Acylated Flavonoid Aglycone Derivatives in Equimolar Yield at One Blow,” *ChemistrySelect*, vol. 3, no. 18, pp. 5207–5211, May 2018, doi: 10.1002/SLCT.201703002.
- [29] A. Patti, M. Piattelli, and G. Nicolosi, “Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 10, no. 6, pp. 577–582, Nov. 2000, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00140-5.
- [30] J. Zhou, Q. Tian, Y. Ma, Y. Wang, and Q. Huo, “Lipase-catalyzed selective esterification of catechin,” *Mater. Express*, vol. 11, no. 6, pp. 995–1000, Jun. 2021, doi: 10.1166/MEX.2021.1971.
- [31] M. Ardhaoui, A. Falcimaigne, J. M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, “Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 29, no. 1–6, pp. 63–67, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2004.02.013.
- [32] L. Chebil, C. Humeau, A. Falcimaigne, J. M. Engasser, and M. Ghoul, “Enzymatic acylation of flavonoids,” *Process Biochem.*, vol. 41, no. 11, pp. 2237–2251, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2006.05.027.
- [33] L. Chebil, J. Anthoni, C. Humeau, C. Gerardin, J. M. Engasser, and M. Ghoul, “Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 23, pp. 9496–9502, Nov. 2007, doi: 10.1021/JF071943J/SUPPL_FILE/JF071943JSI20070828_121949.PDF.
- [34] E. B. De Oliveira *et al.*, “An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the *Candida antarctica* lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 66, no. 3–4, pp. 325–331, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2010.06.009.
- [35] B. Christelle *et al.*, “Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation,” *J. Biotechnol.*, vol. 156, no. 3, pp. 203–210, Dec. 2011,

doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2011.09.007.

- [36] P. B. Tchounwou *et al.*, “Efficient Production of Naringin Acetate with Different Acyl Donors via Enzymatic Transesterification by Lipases,” *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2022, Vol. 19, Page 2972, vol. 19, no. 5, p. 2972, Mar. 2022, doi: 10.3390/IJERPH19052972.
- [37] M. Jebrane, G. Sèbe, I. Cullis, and P. D. Evans, “Photostabilisation of wood using aromatic vinyl esters,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 94, no. 2, pp. 151–157, Feb. 2009, doi: 10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2008.11.013.
- [38] M. Jebrane and G. Sebe, “A novel simple route to wood acetylation by transesterification with vinyl acetate,” *Holzforschung*, vol. 61, no. 2, pp. 143–147, Mar. 2007, doi: 10.1515/HF.2007.026/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [39] J. Brand, G. Pecastaings, and G. Sèbe, “A versatile method for the surface tailoring of cellulose nanocrystal building blocks by acylation with functional vinyl esters,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 169, pp. 189–197, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.03.077.
- [40] E. Kyriakou *et al.*, “Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, no. 9, pp. 1739–1742, Feb. 2012, doi: 10.1039/C2OB06784F.
- [41] C. Jiang, L. Wang, X. Huang, S. Zhu, C. Ma, and H. Wang, “Structural characterization and antioxidant property of enzymatic-transesterification derivatives of (–)-epigallocatechin-3-O-gallate and vinyl laurate,” *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 10, pp. 4717–4729, Oct. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15894.
- [42] E. Passicos, X. Santarelli, and D. Coulon, “Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, pp. 1073–1076, 2004.
- [43] R. Negahdari *et al.*, “Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations,” *Phyther. Res.*, vol. 35, no. 4, pp. 1719–1738, Apr. 2021, doi: 10.1002/PTR.6904.
- [44] M. A. Alam, N. Subhan, M. M. Rahman, S. J. Uddin, H. M. Reza, and S. D. Sarker, “Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and

- Their Mechanisms of Action,” *Adv. Nutr.*, vol. 5, no. 4, pp. 404–417, Jul. 2014, doi: 10.3945/AN.113.005603.
- [45] J. F. O. Couto *et al.*, “HSCCC Separations of Rutin Esters Obtained by Enzymatic Reaction Catalyzed by Lipase,” *Artic. J. Braz. Chem. Soc*, vol. 32, no. 3, pp. 523–533, 2021, doi: 10.21577/0103-5053.20200206.
- [46] C. Vaisali, P. D. Belur, and I. Regupathi, “Lipase mediated synthesis of rutin fatty ester: Study of its process parameters and solvent polarity,” *Food Chem.*, vol. 232, pp. 278–285, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.168.
- [47] S. Gayot, X. Santarelli, and D. Coulon, “Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content,” *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 1, pp. 29–36, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0168-1656(02)00286-9.
- [48] J. Lee *et al.*, “Improved Productivity of Naringin Oleate with Flavonoid and Fatty Acid by Efficient Enzymatic Esterification,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/ANTIOX11020242.
- [49] F. Mellou, H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, and F. N. Kolisis, “Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells,” *Process Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 2029–2034, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2006.05.002.
- [50] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F. N. Kolisis, “Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 21, pp. 59–62, 2003.
- [51] K. ISHIHARA, Y. NISHIMURA, T. KUBO, C. OKADA, H. HAMADA, and N. NAKAJIMA, “Enzyme-catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of Their Functions,” *Plant Biotechnol.*, vol. 19, no. 3, pp. 211–214, 2002, doi: 10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.19.211.
- [52] M. H. Roby *et al.*, “Enzymatic production of bioactive docosahexaenoic acid phenolic ester,” *Food Chem.*, vol. 171, pp. 397–404, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2014.09.028.
- [53] Y. Watanabe, Y. Miyawaki, S. Adachi, K. Nakanishi, and R. Matsuno, “Equilibrium

- constant for lipase-catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water-miscible organic solvents,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 29, no. 8–9, pp. 494–498, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0141-0229(01)00426-4.
- [54] S. D. Banik, M. Nordblad, J. M. Woodley, and G. H. Peters, “Effect of Water Clustering on the Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Medium,” *Catal. 2017, Vol. 7, Page 227*, vol. 7, no. 8, p. 227, Jul. 2017, doi: 10.3390/CATAL7080227.
- [55] J. M. Mora-Pale, S. Pérez-Munguía, J. C. González-Mejía, J. S. Dordick, and E. Bárzana, “The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non-aqueous media is favored at extremely low water activities,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 3, pp. 535–542, Oct. 2007, doi: 10.1002/BIT.21417.
- [56] J. Zdarta, L. Klapiszewski, A. Jedrzak, M. Nowicki, D. Moszynski, and T. Jesionowski, “Lipase B from *Candida antarctica* Immobilized on a Silica-Lignin Matrix as a Stable and Reusable Biocatalytic System,” *Catal. 2017, Vol. 7, Page 14*, vol. 7, no. 1, p. 14, Dec. 2016, doi: 10.3390/CATAL7010014.
- [57] N. Zhang, W. C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, and A. Zaks, “Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution,” *Protein Eng.*, vol. 16, no. 8, pp. 599–605, Aug. 2003, doi: 10.1093/PROTEIN/GZG074.
- [58] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F. N. Kolisis, “Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 59–62, Jan. 2003, doi: 10.1016/S1381-1177(02)00139-X.
- [59] S. H. Youn, H. J. Kim, T. H. Kim, and C. S. Shin, “Lipase-catalyzed acylation of naringin with palmitic acid in highly concentrated homogeneous solutions,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 46, no. 1–4, pp. 26–31, May 2007, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2007.02.002.
- [60] H. Guo *et al.*, “T enzymatic esterification of naringin and the properties of naringin esterified derivatization,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 176, p. 114372, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.INDCROP.2021.114372.
- [61] F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, and M. Ghou, “Influence of water activity

- and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 949–954, Jan. 2001, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00166-1.
- [62] J. Viskupicova, M. Danihelova, M. Ondrejovic, T. Liptaj, and E. Sturdik, “Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods,” *Food Chem.*, vol. 123, pp. 45–50, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.125.
- [63] M. H. Katsoura, A. C. Polydera, L. Tsironis, A. D. Tselepis, and H. Stamatis, “Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency,” *J. Biotechnol.*, vol. 123, pp. 491–503, 2006, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.022.
- [64] M. Ardhaoui *et al.*, “Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids,” *J. Biotechnol.*, vol. 110, no. 3, pp. 265–272, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.JBIOTECH.2004.03.003.
- [65] T. Kobayashi, “Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media,” *Biotechnol. Lett.* 2011 3310, vol. 33, no. 10, pp. 1911–1919, Jun. 2011, doi: 10.1007/S10529-011-0663-Z.
- [66] N. Sorour, S. Karboune, R. Saint-Louis, and S. Kermasha, “Lipase-catalyzed synthesis of structured phenolic lipids in solvent-free system using flaxseed oil and selected phenolic acids as substrates,” *J. Biotechnol.*, vol. 158, pp. 128–136, 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.12.002.
- [67] N. Sorour, S. Karboune, R. Saint-Louis, and S. Kermasha, “Enzymatic synthesis of phenolic lipids in solvent-free medium using flaxseed oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid,” *Process Biochem.*, vol. 47, pp. 1813–1819, 2012, doi: 10.1016/j.procbio.2012.06.020.
- [68] S. Aziz and S. Kermasha, “Assessment of the Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Esterified Phenolic Lipids in Selected Edible Oils,” *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 4, pp. H730–H737, Apr. 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12377.
- [69] S. Sun, L. Shan, Y. Liu, Q. Jin, X. Wang, and Z. Wang, “A novel, two consecutive enzyme synthesis of feruloylated monoacyl- and diacyl-glycerols in a solvent-free system,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 12, pp. 1947–1950, Dec. 2007, doi:

10.1007/S10529-007-9486-3/FIGURES/4.

- [70] M. M. Camino Feltes *et al.*, “Enzymatic production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from fish oil in a solvent-free system,” *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 6, pp. 1057–1065, Jun. 2012, doi: 10.1007/S11746-011-1998-2/FIGURES/2.
- [71] S. Sun, F. Song, Y. Bi, G. Yang, and W. Liu, “Solvent-free enzymatic transesterification of ethyl ferulate and monostearin: Optimized by response surface methodology,” *J. Biotechnol.*, vol. 164, pp. 340–345, 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.01.013.
- [72] N. Chaibakhsh, M. B. Abdul Rahman, S. Abd-Aziz, M. Basri, A. B. Salleh, and R. N. Z. R. A. Rahman, “Optimized lipase-catalyzed synthesis of adipate ester in a solvent-free system,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 9, pp. 1149–1155, Sep. 2009, doi: 10.1007/S10295-009-0596-X/FIGURES/4.
- [73] H. Won Jung, T. J. Tschaplinski, L. Wang, J. Glazebrook, and J. T. Greenberg, “Priming in Systemic Plant Immunity,” *New Ser.*, vol. 324, no. 5923, pp. 89–91, 2009, doi: 10.1126/science.1165620.
- [74] E. Theodosiou, H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, and F. N. Kolisis, “Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel silybin acylated derivatives with dicarboxylic acids,” *N. Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, 2011, doi: 10.1016/j.nbt.2011.01.006.
- [75] E. Vavříková *et al.*, “Isoquercitrin Esters with Mono- or Dicarboxylic Acids: Enzymatic Preparation and Properties,” *Int. J. Mol. Sci. 2016, Vol. 17, Page 899*, vol. 17, no. 6, p. 899, Jun. 2016, doi: 10.3390/IJMS17060899.
- [76] N. N. A. Razak and M. S. M. Annuar, “Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 54, no. 21, pp. 5604–5612, Jun. 2015, doi: 10.1021/ACS.IECR.5B00996/ASSET/IMAGES/ACS.IECR.5B00996.SOCIAL.JPEG_V03.
- [77] B. Danieli and S. Riva, “Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no. 10–11, pp. 2215–

2218, Jan. 1994, doi:
10.1351/PAC199466102215/MACHINEREADABLECITATION/RIS.

- [78] B. Danieli, M. Luisetti, G. Sampognaro, G. Carrea, and S. Riva, "Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 3, no. 1–4, pp. 193–201, Jun. 1997, doi: 10.1016/S1381-1177(96)00055-0.
- [79] H. M. Li *et al.*, "Enzymatic acylation of rutin with benzoic acid ester and lipophilic, antiradical, and antiproliferative properties of the acylated derivatives," *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 1714–1725, May 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15703.
- [80] Y. Watanabe, M. Nagai, K. Yamanaka, K. Jose, and M. Nomura, "Synthesis of lauroyl phenolic glycoside by immobilized lipase in organic solvent and its antioxidative activity," *Biochem. Eng. J.*, vol. 43, no. 3, pp. 261–265, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.BEJ.2008.10.008.
- [81] X. Li, Y. Zhao, X. Lai, J. Nong, G. Zhao, and X. Xiao, "One-pot biocatalytic synthesis and antioxidant activities of highly lipophilic naringin derivatives by using bi-functional whole-cells," *Food Res. Int.*, vol. 136, p. 109291, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.FOODRES.2020.109291.
- [82] C. Q. Sun, K. D. Johnson, H. Wong, and L. Y. Foo, "Biotransformation of flavonoid conjugates with fatty acids and evaluations of their functionalities," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. NOV, p. 759, Nov. 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00759/BIBTEX.
- [83] E. B. De Oliveira *et al.*, "A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 96–105, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2009.01.011.

Chapitre 3 : Propriétés physico-chimiques et biologiques

1. Etude des propriétés antioxydantes des flavonoïdes et leurs dérivés

La fonctionnalisation enzymatique ou chimique des flavonoïdes est susceptible d'affecter leurs propriétés biologiques.

L'effet du greffage chimique ou enzymatique de divers motifs carbonés sur des molécules modèles (catéchine, rutine et naringine) sur leurs propriétés antioxydantes a été étudié selon deux méthodes : i) l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH et l'inhibition de l'oxydation induite du linoléate de méthyle.

1.1. Etude du potentiel anti-radicalaire des flavonoïdes et leurs dérivés

Il est bien connu que la principale caractéristique responsable de l'activité antioxydante d'un composé phénolique est sa capacité à piéger les radicaux libres. Afin d'évaluer cette capacité, l'une des méthodes les plus répandues et les plus faciles à utiliser consiste à mesurer la capacité d'une molécule à réduire le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) [1]. Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm [1]

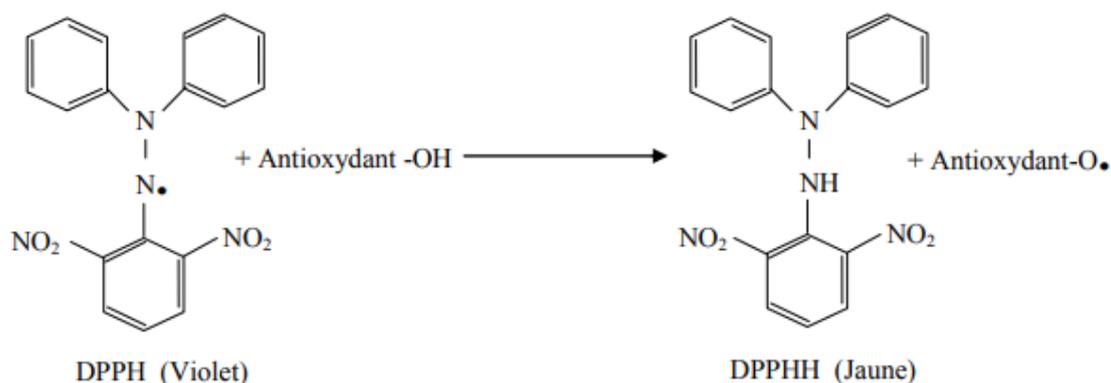


Figure 87. Réaction entre un antioxydant et le radical DPPH

1.1.1. Activité anti-radicalaire des composés bi-modulaires

Des mesures du pouvoir antioxydant de la catéchine et de ses dérivés bi-modulaires issus de son acylation chimique par les acides octanoïque, laurique, myristique, palmitique, stéarique et oléique au niveau de l'hydroxyle phénolique en position 4' ou 3' (composés bi-modulaires

de type I) ou au niveau de l'hydroxyle aliphatique en position 3 (composés bi-modulaires type II), ont été effectuées.

La concentration inhibitrice médiane (notée IC₅₀) de la catéchine est de 16 µM. Kumar *et al.* ont obtenu une valeur similaire [2]. Cette valeur montre le caractère antioxydant de ce composé. Les antioxydants catéchiques se lient de manière covalente aux chaînes de protéines [3]. Concernant les esters de catéchine les valeurs des IC₅₀ obtenues sont résumées dans le tableau 23.

Tableau 24. Capacité à inhiber le radical DPPH (exprimée en IC₅₀) de la catéchine et de ses dérivés bi-modulaires, selon la fonction hydroxyle acylée

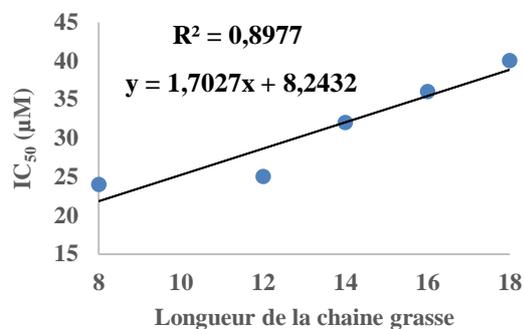
Composés	IC ₅₀ (µM)	
	Composés bi-modulaires de type I	Composés bi-modulaires de type II
Catéchine	16 ± 0.35	
Catéchine – C8	24 ± 0.22	22 ± 0.15
Catéchine – C12	25 ± 0.16	23 ± 0.09
Catéchine – C14	32 ± 0.08	24 ± 0.21
Catéchine – C16	36 ± 0.11	26 ± 0.19
Catéchine – C18	40 ± 0.21	34 ± 0.12
Catéchine – C18 : 1	33 ± 0.24	-

On remarque que tous les composés bi-modulaires synthétisés possèdent une activité antioxydante et sont capables de piéger le radical DPPH. La valeur d'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, puisqu'elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50% la concentration du radical. Plus l'IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée [4].

Comme le montre le tableau 23, tous les dérivés de catéchine synthétisés présentent une activité anti-radicalaire inférieure à celle de la catéchine. Quelle que soit la position de l'acylation, la valeur d'IC₅₀ augmente faiblement avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée ce qui suggère qu'une augmentation de la longueur de la chaîne acyle greffée provoque une diminution du pouvoir antioxydant des esters de flavonoïdes. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature [5], [6]. Le composé bi-modulaire avec la chaîne grasse

la plus courte (C8) est l'ester ayant le pouvoir antioxydant le plus fort ; en revanche l'ester portant la chaîne grasse la plus longue (C18) présente l'activité antioxydante la plus faible.

A



B

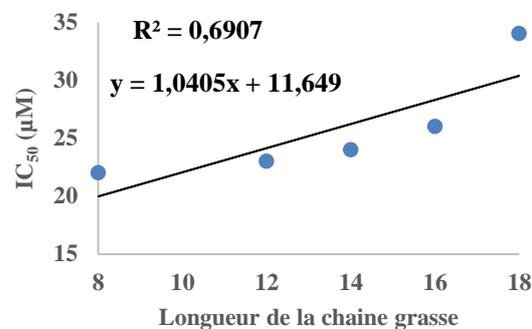


Figure 88. Effet de la longueur de la chaîne acyle sur l'activité anti-radicalaire des composés bi-modulaires de type I (A) et de type II (B)

Par ailleurs, pour une même longueur de chaîne acyle, la présence d'une insaturation améliore l'activité anti-radicalaire de l'ester de flavonoïde. Ainsi, l'oléate de catéchine (C18:1) a un pouvoir antioxydant plus élevé que celui du stéarate de catéchine (C18: 0). Des résultats similaires ont été obtenus par Hadj Salem *et al.* avec l'isoquercitrine ainsi que Rao *et al* avec le mesquitol. [7].

Une autre observation est que les valeurs d'IC₅₀ des composés bi-modulaires de type I sont légèrement supérieures à celles obtenues pour les des composés bi-modulaires de type II.

En effet, la structure d'une molécule a un impact important sur son activité antioxydante. Van Acker *et al.* (1996) ont montré qu'un des critères structuraux pour obtenir une activité antioxydante est 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 [8], [9]. L'estérification de l'hydroxyle en position 3 de la catéchine conduit à une diminution de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques ne sont pas substitués.

1.1.2. Activité anti-radicalaire des composés tri-modulaires

Concernant les composés tri-modulaires résultant du greffage de l'acide aminé couplé à l'acide gras au niveau du groupement hydroxyle en position 3 de la catéchine, les valeurs d'IC₅₀ sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 25. Capacité à inhiber le radical DPPH (exprimée en IC₅₀) de la catéchine et de ses dérivés tri-modulaires

Composés	IC ₅₀ (µM)
Catéchine	16 ± 0.35
Catéchine – Alanine – C8	19 ± 0.12
Catéchine – Alanine – C12	20 ± 0.07
Catéchine – Alanine – C14	23 ± 0.26
Catéchine – Alanine – C16	24 ± 0.19
Catéchine – Lysine – (C8) ₂	26 ± 0.30
Catéchine – Lysine – (C12) ₂	30 ± 0.26
Catéchine – Lysine – (C14) ₂	33 ± 0.15
Catéchine – Lysine – (C16) ₂	37 ± 0.28
(Catéchine) ₂ – Acide glutamique – C8	37 ± 0.16
(Catéchine) ₂ – Acide glutamique – C12	39 ± 0.14
(Catéchine) ₂ – Acide glutamique – C14	42 ± 0.25
(Catéchine) ₂ – Acide glutamique – C16	45 ± 0.09

Tous les composés tri-modulaires synthétisés possèdent une activité antioxydante. Toutefois, quel que soit le dérivé, son activité anti-radicalaire est inférieure à celle de la catéchine. Les composés à base d'alanine présentent la plus grande capacité à inhiber le radical DPPH, suivis par les dérivés à base de lysine, eux-mêmes suivis par les dérivés à base d'acide glutamique. Une étude a été menée par Xu *et al.* (2017) pour étudier l'effet antioxydant des différents acides aminés [10]. Il a été démontré que la lysine fait partie des sept acides aminés les plus antioxydants ($9,9.10^{-4}$ µM) [11], [12], suivie de l'alanine (20 µM) [13] ; l'acide glutamique quant à lui ne possède pas d'activité antioxydante. Malgré le pouvoir antioxydant de la lysine, la capacité des tri-modules incluant cet acide aminé à piéger les radicaux DPPH• est plus faible que celle de la catéchine en raison de la présence de deux chaînes grasses dans la structure. Les dérivés à base d'acide glutamique présentent l'activité anti-radicalaire la plus faible malgré la présence de deux entités catéchine. Quel que soit le type de composé tri-

modulaire, comme précédemment, un allongement de la chaîne acyle s'accompagne d'une diminution de l'activité antioxydante (Figure 89).

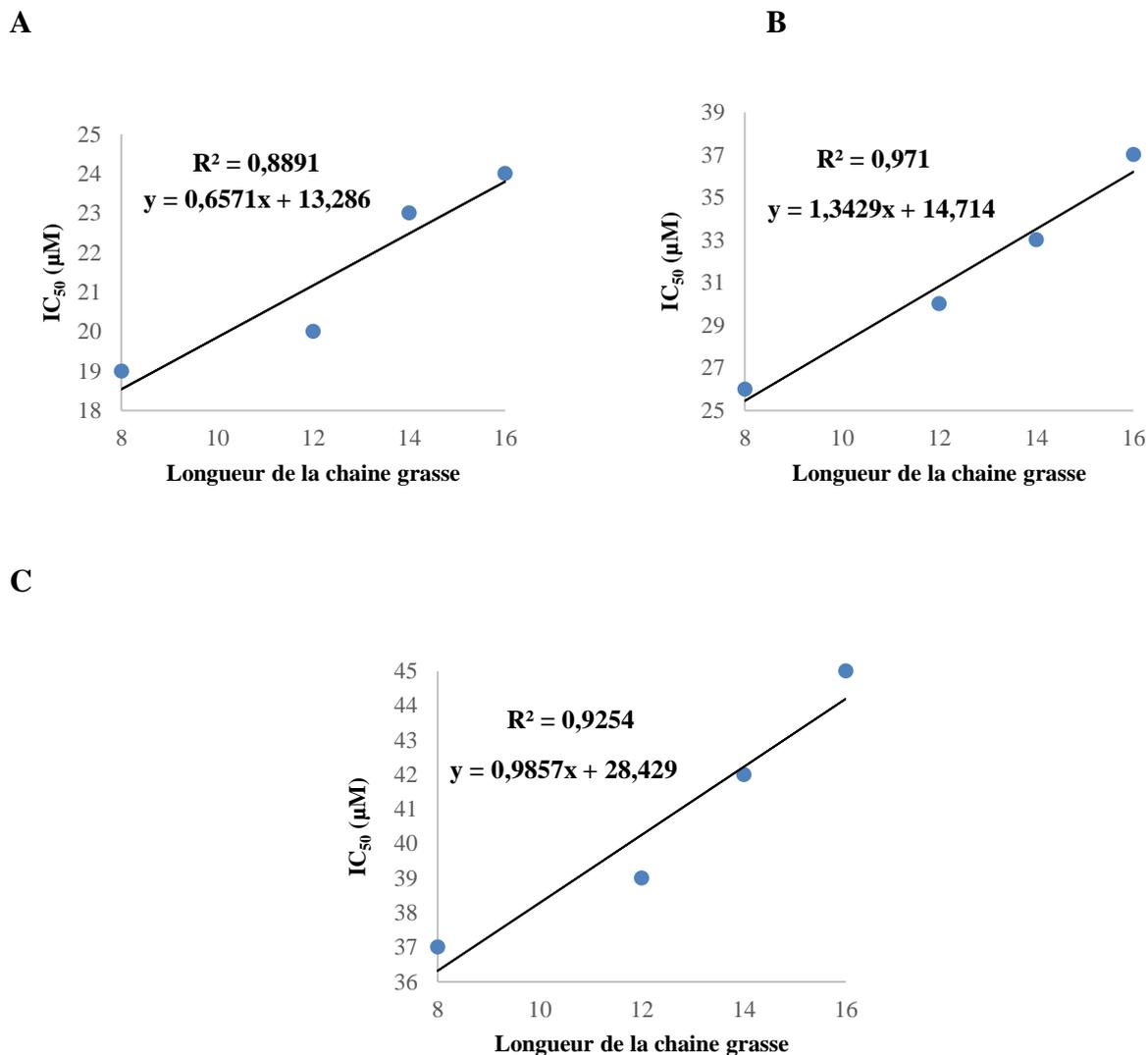


Figure 89. Effet de la longueur de la chaîne acyle sur l'activité anti-radicalaire des composés tri-modulaires à base d'alanine (A), de lysine (B) ou d'acide glutamique (C)

Concernant la rutine et la naringine, les valeurs IC₅₀ de ces flavonoïdes et de leurs esters synthétisés par voie enzymatique sont résumées dans le tableau 25. Tous les esters de rutine synthétisés présentent une capacité à inhiber le radical DPPH inférieure à celle de la rutine. De plus, plus la longueur de la chaîne grasse augmente, moins le produit est antioxydant. Lu *et al.* (2010) ont déterminé l'activité antioxydante de la rutine et de certains de ses esters, et ont obtenu des résultats comparables. Ainsi ils rapportent que le lauréate de rutine ainsi que le palmitate de rutine ont une activité anti-radicalaire moins importante que la rutine. Ces résultats peuvent être expliqués en fonction de l'accessibilité de l'antioxydant au radical DPPH

combiné à la stabilité du radical libre antioxydant après l'abstraction d'hydrogène par le DPPH. La rutine et ses esters possèdent 4 groupes hydroxyle phénol qui sont disponibles en tant que donneurs H. En tant que tels, les radicaux libres produits via l'abstraction d'hydrogène de ces groupes peuvent être stabilisés en résonance dans une large mesure par leur grande structure cyclique conjuguée, selon la théorie de l'hybridation par résonance. La capacité de piégeage des radicaux de la rutine n'a pas été améliorée suite à la fixation de groupes acyle de longueur de chaîne croissante au cycle sucre de la rutine (c'est-à-dire le rutinose). Cela est probablement dû à une diminution des effets inducteurs d'électrons des groupes acyle via le rutinose vers le fragment 2-phénylchromène-4-one de la rutine. De plus, l'incorporation de groupes acyle à chaîne plus longue peut interférer avec l'accès au DPPH en raison de l'encombrement stérique résultant de la rotation des liaisons et de la torsion des groupes à chaîne acyle. Cela pourrait expliquer la diminution de l'activité de piégeage des radicaux des esters de rutine par rapport à la rutine à de faibles concentrations. [14].

D'après les résultats obtenus, la naringine présente une activité anti-radicalaire inférieure à celle de la rutine, elle-même moins antioxydante que la catéchine.

Tableau 26. Capacité à inhiber le radical DPPH (exprimée en IC₅₀) de la rutine, de la naringine et de leurs dérivés tri-modulaires

Composés	IC₅₀ (µM)
Rutine	22 ± 0.12
Rutine – C8	26 ± 0.07
Rutine – C12	27 ± 0.26
Rutine – C14	31 ± 0.19
Rutine – C16	35 ± 0.16
Rutine – C18	39 ± 0.14
Rutine – C18 :1	33 ± 0.25
Naringine	138 ± 0.12
Naringine – C8	145 ± 0.07
Naringine – C12	149 ± 0.26
Naringine – C14	154 ± 0.19
Naringine – C16	158 ± 0.16
Naringine – C18	162 ± 0.14
Naringine – C18 :1	155 ± 0.25

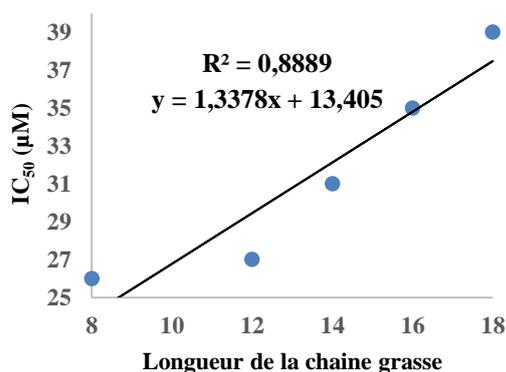
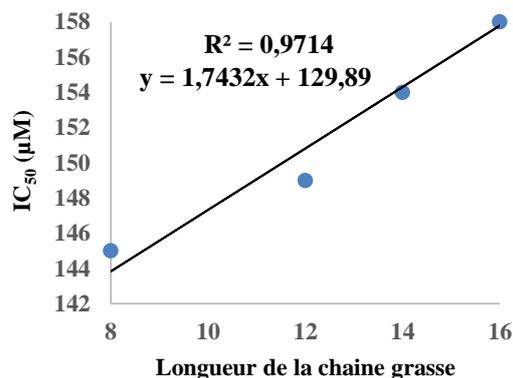
A**B**

Figure 90. Effet de la longueur de la chaîne acyle sur l'activité anti-radicalaire des composés tri-modulaires à base de rutine (A) et de naringine (B)

1.2. Etude de la capacité des flavonoïdes et leurs dérivés à inhiber l'oxydation lipidique

Dans cette étude, l'activité antioxydante a été définie en comparant la consommation d'oxygène en un temps donné en présence des composés bi- et tri-modulaires synthétisés et la consommation d'oxygène en absence de ces composés. Le linoléate de méthyle (LH) est choisi pour cette étude, en raison de sa sensibilité à l'oxydation. L'activité antioxydante des composés est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'oxydation au bout de 2,5 heures.

La cinétique de l'oxydation est décrite en deux étapes :

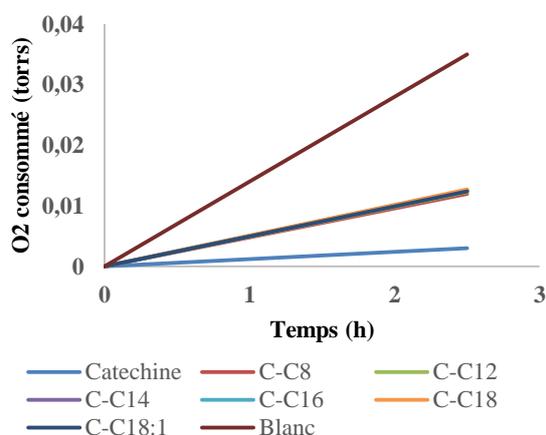
- Oxydation de LH avec consommation d'O₂
- Rupture de la chaîne d'oxydation de LH en présence de l'antioxydant (ΦH) et formation de radical (Φ•) qui est stable et inhibe la réaction globale d'oxydation.

Plus la stabilité de ce radical est élevée, plus l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle sera importante [15], [16].

1.2.1. Capacité des composés bi-modulaires à inhiber l'oxydation lipidique

Le suivi de l'oxygène consommé au cours du temps a permis de déterminer le pourcentage d'inhibition du linoléate de méthyle en présence de la catéchine ou ses dérivés bi-modulaires (Figure 91).

A



B

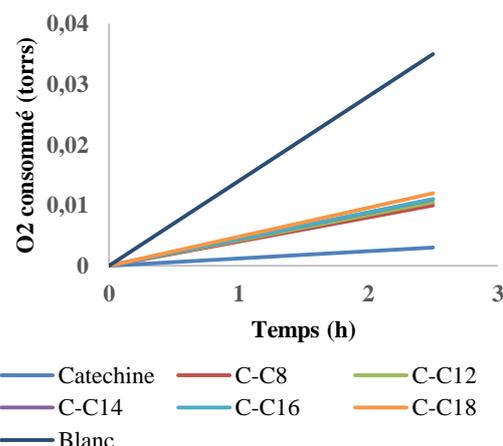


Figure 91. Consommation d'oxygène exprimée en torrs lors de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence de la catéchine ou de ses esters bi-modulaires de type I (A) et de type II (B)

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 26. Quel que soit le dérivé, sa capacité à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle est inférieure à celle de la catéchine, démontrant une fois de plus que le greffage d'une chaîne acyle diminue le potentiel antioxydant du flavonoïde. Pour une même chaîne acyle, le greffage de la chaîne sur un hydroxyle phénolique affecte davantage le potentiel antioxydant du dérivé comparativement à un greffage sur l'hydroxyle aliphatique.

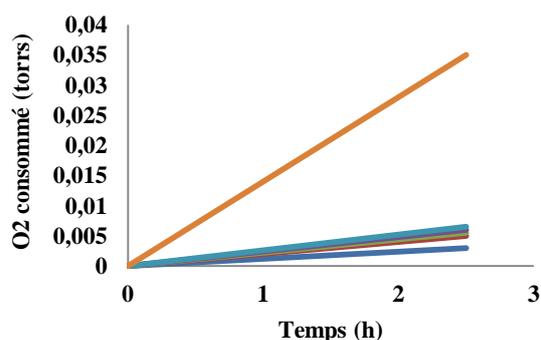
Tableau 27. Capacité de la catéchine et ses dérivés bi-modulaires à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle

Composés	Pourcentage d'inhibition (%)	
	Composés bi-modulaires de type I	Composés bi-modulaires de type II
Catéchine	91 ± 0.53	
Catéchine – C8	66 ± 0.34	71 ± 0.57
Catéchine – C12	65 ± 0.20	70 ± 0.32
Catéchine – C14	64 ± 0.43	69 ± 0.53
Catéchine – C16	64 ± 0.12	68,5 ± 0.15
Catéchine – C18	63 ± 0.32	66 ± 0.43
Catéchine – C18 : 1	64 ± 0.42	-

1.2.2. Capacité des composés tri-modulaires à inhiber l'oxydation lipidique

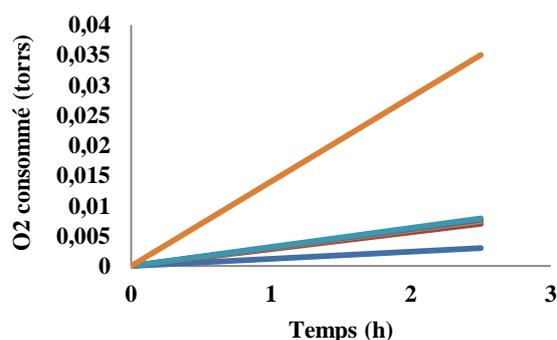
L'oxygène consommé au cours de l'oxydation induite du linoléate de méthyle en présence et en absence des composés tri-modulaires est illustrée dans la figure 92. Les pourcentages d'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle sont résumés dans le tableau 27.

A



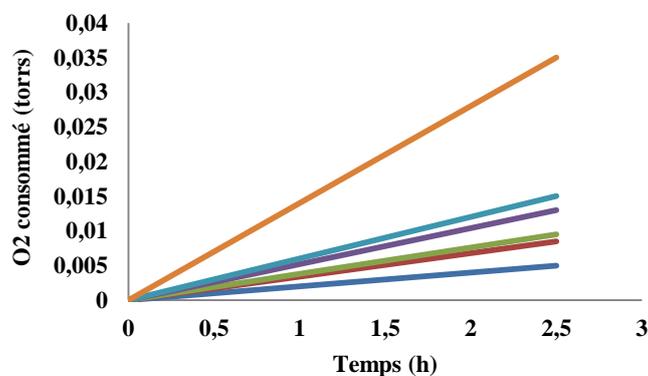
— Catechine — C-Ala-C8 — C-Ala-C12
— C-Ala-C14 — C-Ala-C16 — Blanc

B



— Catechine — C-Lys-C8 — C-Lys-C12
— C-Lys-C14 — C-Lys-C16 — Blanc

C



— Catechine — C-Glu-C8 — C-Glu-C12
— C-Glu-C14 — C-Glu-C16 — Blanc

Figure 92. Consommation d'oxygène exprimée en torrs lors de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence de la catéchine ou de ses dérivés tri-modulaires à base d'alanine (A), de lysine (B) et d'acide glutamique (C)

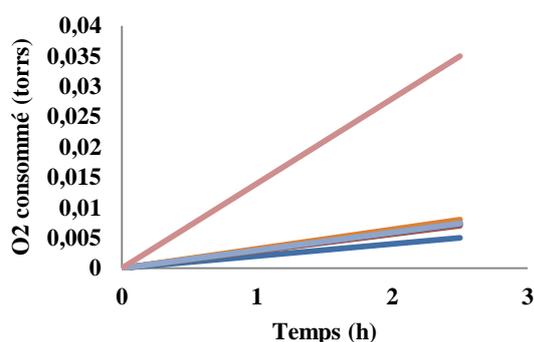
Tableau 28. Capacité de la catéchine et ses dérivés tri-modulaires à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle.

Composés	Pourcentage d'inhibition (%)
Catéchine	91 ± 0.32
Catéchine – Alanine – C8	86 ± 0.45
Catéchine – Alanine – C12	84 ± 0.24
Catéchine – Alanine – C14	83 ± 0.25
Catéchine – Alanine – C16	81 ± 0.25
Catéchine – Lysine – (C8)₂	80 ± 0.32
Catéchine – Lysine – (C12)₂	78,5 ± 0.84
Catéchine – Lysine – (C14)₂	78 ± 0.34
Catéchine – Lysine – (C16)₂	77 ± 0.37
(Catéchine)₂ – Acide glutamique – C8	72 ± 0.63
(Catéchine)₂ – Acide glutamique – C12	68 ± 0.24
(Catéchine)₂ – Acide glutamique – C14	64 ± 0.05
(Catéchine)₂ – Acide glutamique – C16	57 ± 0.12

Les composés tri-modulaires à base d'alanine possèdent les pourcentages d'inhibition les plus élevés, suivis par les composés tri-modulaires à base de lysine et finalement par les composés à base d'acide glutamique. Quel que soit le dérivé, sa capacité antioxydante est inférieure à celle de la catéchine. L'allongement de la chaîne acyle a peu d'effet sur le potentiel antioxydant des dérivés à base d'alanine ou de lysine, mais fait chuter le pouvoir antioxydant des dérivés à base d'acide glutamique.

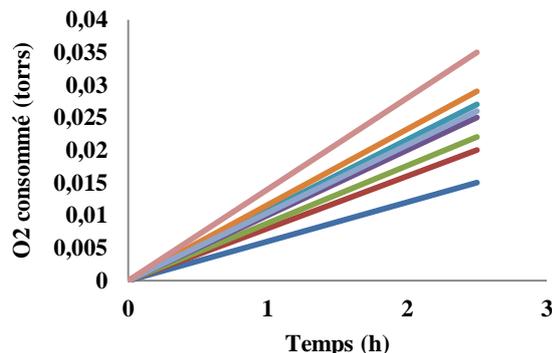
Les pourcentages d'inhibition du linoléate de méthyle par la rutine (86 %) et la naringine (57 %), sont supérieurs à ceux de leurs esters. L'augmentation de la longueur de la chaîne grasse diminue légèrement le pourcentage d'inhibition.

A



Rutine R-C8 R-C12
 R-C14 R-C16 R-C18
 R-C18:1 Blanc

B



Naringine N-C8 N-C12
 N-C14 N-C16 N-C18
 N-C18:1 Blanc

Figure 93. Consommation d'oxygène exprimée en torrs au cours de l'oxydation induite du linoléate de méthyle en présence de la rutine ou de ses esters (A), et de la naringine ou de ses esters (B)

Tableau 29. Capacité de la rutine, de la naringine et de leurs esters tri-modulaires à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle.

Composés	Pourcentage d'inhibition (%)
Rutine	86 ± 0.46
Rutine – C8	80 ± 0.28
Rutine – C12	79 ± 0.63
Rutine – C14	79 ± 0.27
Rutine – C16	78,5 ± 0.47
Rutine – C18	77 ± 0.32
Rutine – C18 :1	78,5 ± 0.55
Naringine	57 ± 0.12
Naringine – C8	43 ± 0.24
Naringine – C12	37 ± 0.34
Naringine – C14	29 ± 0.22
Naringine – C16	23 ± 0.42
Naringine – C18	17 ± 0.12
Naringine – C18 :1	26 ± 0.11

Quel que soit l'ester de flavonoïde synthétisé, sa capacité à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle est inférieure à celle de la rutine et la naringine, démontrant une fois de plus que le greffage d'une chaîne acyle diminue le potentiel antioxydant du flavonoïde.

1.3. Conclusions

L'activité antioxydante des flavonoïdes aglycones ou glycosylés a été déterminée et comparée à celles de leurs dérivés bi- ou tri-modulaires synthétisés par voie chimique ou enzymatique. Plus précisément, le potentiel de ces composés à inhiber le radical DPPH et l'oxydation induite du linoléate de méthyle a été évalué. Les résultats montrent que tous les composés synthétisés possèdent un pouvoir antioxydant. Les composés tri-modulaires à base d'alanine présentent l'activité antioxydante la plus élevée tandis que les composés tri-modulaires à base de naringine sont les moins antioxydants. Concernant les composés bi-modulaires, la position du greffage de la chaîne acyle a un effet sur le pouvoir antioxydant des dérivés. Ainsi, nous avons montré que le greffage d'une chaîne grasse sur un hydroxyle phénolique de la catéchine conduit à un pouvoir antioxydant inférieur à celui des composés issus de l'acylation d'un hydroxyle aliphatique. Ceci s'explique par une participation des groupements phénoliques à l'activité antioxydante. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) confère la stabilité au radical flavonoxy, participe à la délocalisation des électrons et augmente la capacité du flavonoïde à piéger les radicaux libres. Une autre tendance importante est la diminution du pouvoir antioxydant avec l'allongement de la chaîne acyle, quelle que soit l'entité flavonoïde. De plus, le pouvoir antioxydant de la catéchine est supérieur à celui de la rutine et de la naringine.

Il apparaît que pour un flavonoïde donné, le potentiel antioxydant de la molécule naturelle est supérieur à celui de ses dérivés, quels qu'ils soient. Cette baisse du pouvoir antioxydant des flavonoïdes provoquée par leur fonctionnalisation peut sembler diminuer l'intérêt des composés synthétisés si l'on considère la capacité antioxydante en tant que telle. Toutefois, n'oublions pas que ces dérivés conservent des propriétés antioxydantes et présentent par ailleurs des propriétés tensioactives intéressantes pour certains d'entre eux. La conception de composés multifonctionnels appelle à faire consensus au regard de l'ensemble des propriétés recherchées.

1.4. Modélisation moléculaire

La stabilité, la réactivité et les effets physiologiques des flavonoïdes sont couramment reliés à leur famille, la nature de leurs substituants et à leur structure moléculaire [8], [9], [17].

Afin d'expliquer les données expérimentales obtenues précédemment, une recherche de corrélation entre ces données et les propriétés structurales et électroniques des flavonoïdes et leurs dérivés a été entreprise, en mettant en œuvre des études théoriques réalisées par modélisation moléculaire. L'objectif de la modélisation moléculaire entreprise dans ce travail est de tenter d'expliquer les différences de propriétés observées, en particulier la réactivité chimique des groupements hydroxyles portés par les flavonoïdes, l'activité antioxydante et la stabilité des flavonoïdes naturels et de leurs dérivés. Les composés étudiés sont la catéchine, la rutine et la naringine, ainsi que tous leurs dérivés bi- et tri-modulaires synthétisés par voie chimique ou enzymatique.

1.4.1. Calcul de l'énergie de dissociation homolytique

Les composés phénoliques sont des inhibiteurs reconnus des radicaux libres. L'activité de ces molécules est reliée à leur structure. Ainsi, elle dépend de la capacité du phénol à céder un atome d'hydrogène qui peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (bond dissociation energy, BDE), de la délocalisation électronique du radical phénol et de l'encombrement stérique des substituants des cycles aromatiques [18]–[20]. Cette BDE réfère à l'une des mesures de l'énergie d'une liaison chimique. Elle correspond au changement d'enthalpie lors d'un clivage homolytique avec des réactifs et des produits de la réaction d'homolyse. D'ailleurs, l'énergie de dissociation d'une liaison est parfois appelée l'enthalpie de dissociation d'une liaison.

La BDE est égal à $H_r + H_h - H_p$ où H_r est l'enthalpie du radical généré par abstraction d'un proton, H_h est l'enthalpie de l'atome H et H_p est l'enthalpie de la molécule parent. Plus la BDE d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'hydrogène est élevé. En d'autres termes, des BDE plus faibles sont associées à une activité antioxydante plus élevée [21].

Les valeurs de BDE calculées pour la catéchine sont répertoriées dans le tableau 29 et suivent l'ordre suivant : 4'-OH (71,7 kcal/mol) < 3'-OH (74 kcal/mol) < 5-OH (77,9 kcal/mol) < 7-OH (79,9 kcal/mol) < 3-OH (94,1 kcal/mol), ce qui signifie que le groupement 4'-OH présente la plus faible valeur de BDE, suivi du groupement 3'-OH. On en déduit que les groupements hydroxyle phénoliques du cycle B sont principalement à l'origine de l'activité

anti-radicalaire de la catéchine. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, Zhu *et al.* (2017), Veiko *et al.* (2021), Anitha *et al.* (2020) ainsi que Wang *et al.* (2020) ont montré que les groupements hydroxyles du cycle B possèdent les valeurs de BDE les plus faibles. Selon Zhu *et al.*, Anitha *et al.* et Veiko *et al.*, l'hydroxyle de plus faible BDE est le 4'-OH tandis que pour Wang *et al.* Il s'agit de l'hydroxyle 3'-OH [22]–[24][25]. Les différentes conditions opératoires ainsi que la méthode utilisée, comme la B3LYp / 6-31 (d), la AM1, la LSA, la B3LYp / 6-311++G peuvent expliquer cette différence.

Tabelau 30. Valeurs calculées de l'énergie de dissociation homolytique des liaisons O-H de la catéchine

	BDE (kcal/mol)
3-OH	94,1
5-OH	77,9
7-OH	79,9
3'-OH	74
4'-OH	71,7

L'énergie de dissociation homolytique de chacune des liaisons O-H de la rutine a été également calculée. Le tableau 30 montre les valeurs de BDE calculées pour les quatre radicaux formés par abstraction d'un atome d'hydrogène sur la rutine. Les résultats montrent la séquence BDE suivante pour les différents groupements OH : 3'-OH (72,8 Kcal/mol) < 4'-OH (74,3 Kcal/mol) < 7-OH (82,3 Kcal/mol) < 5-OH (93,5 Kcal/mol).

Comme prévu, la valeur de BDE pour le groupement 5-OH a la valeur la plus élevée. Ceci s'explique par l'implication de cet hydroxyle dans une liaison hydrogène interne ce qui rend l'arrachement du proton défavorable sur le plan thermodynamique. Ces résultats confirment clairement que le transfert d'hydrogène est énergétiquement plus favorable à partir du cycle B, en particulier à partir de l'hydroxyle 3'-OH. Ainsi, le cycle B est le site le plus important pour la formation d'un radical par arrachement d'un atome d'hydrogène et par conséquent pour la capacité antioxydante du flavonoïde.

Ces résultats sont également en accord avec la littérature. Ghiasi *et al.* (2011) et Cai *et al.* (2014) ont calculé les BDE des différents hydroxyles de la rutine et ont montré que le 3'-OH possède la BDE la plus faible tandis que le 5-OH présente la BDE la plus élevée [18], [26].

Tableau 31. Valeurs calculées de l'énergie de dissociation homolytique des liaisons O-H de la rutine

	BDE (kcal/mol)
5-OH	93,5
7-OH	82,3
4'-OH	74,3
3'-OH	72,8

Quant à la naringine, qui ne possède que deux fonctions hydroxyle phénoliques, le groupement 4'-OH possède la plus faible BDE (79,4 kcal/mol) tandis que celle de l'hydroxyle 7-OH est de 83,8 kcal/mol (Tableau 31). Des résultats similaires ont été obtenus par Tavadyan *et al.* (2019) [27]. La naringine ne possède qu'un seul hydroxyle sur son cycle B ; ceci explique sa faible activité antioxydante comparativement à la rutine et la catéchine qui présentent un motif ortho-diphénol au niveau de ce cycle.

Tableau 32. Valeurs calculées de l'énergie de dissociation homolytique des liaisons O-H de la naringine

	BDE (Kcal/mol)
4'-OH	79,4
7-OH	83,8

1.4.2. Calcul des descripteurs de réactivité chimique

Les descripteurs de réactivité chimique tels que la dureté chimique (η), le potentiel chimique électronique (μ) et le potentiel d'ionisation (PI) sont d'excellents outils pour décrire la dureté, la réactivité et la stabilité des composés. La dureté chimique (η) est associée à la stabilité et à la réactivité d'un système chimique. Dans une molécule, elle mesure la résistance au changement dans la distribution des électrons ou le transfert de charge. Sur la base des orbitales moléculaires frontières, la dureté chimique correspond à l'écart entre la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) et la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO). η est associée à la stabilité et à la réactivité d'un système chimique. La dureté chimique peut être évaluée en utilisant l'équation suivante :

$$\eta = (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}) / 2$$

où E_{LUMO} et E_{HOMO} sont les énergies de la LUMO et de la HOMO.

Plus l'écart d'énergie entre la HOMO et la LUMO est grand, plus la molécule est dure et stable, et donc moins elle est réactive [28]–[33].

Le potentiel chimique électronique est défini comme le négatif de l'électronégativité d'une molécule et déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$\mu = (E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}) / 2$$

μ décrit la tendance des électrons à s'échapper d'un système à l'équilibre. Plus le potentiel chimique électronique est élevé, moins la molécule est stable et donc plus elle est réactive [28].

Le potentiel d'ionisation est défini comme la quantité d'énergie nécessaire pour éliminer un électron d'une molécule. Par conséquent, des valeurs élevées de PI indiquent que le système ne perd pas facilement d'électrons [34], [35]. Il est calculé selon la relation suivante :

$$\text{PI} = - E_{\text{HOMO}}$$

Mebi a calculé les descripteurs de réactivité chimique globale DFT (dureté chimique, différence d'énergie et potentiel chimique électronique) pour trois *cis*-isomères de $[(\text{NC}_5\text{H}_4\text{S})_2\text{Fe}(\text{CO})_2]$ afin de prédire leurs stabilités relatives et leur réactivité [36]. Wang *et al.* (2017) ont mesuré la capacité de la catéchine, de l'epigallocatechine et de leurs dérivés à inhiber le radical DPPH ; les descripteurs de réactivité chimique ont par ailleurs été calculés. Ils ont montré que le composé ayant l'activité antioxydante la plus élevée, possède la valeur de μ la plus élevée et la valeur d' η la plus faible [37].

Les descripteurs de réactivité décrits précédemment ont été calculés pour la catéchine, la rutine, la naringine ainsi que leurs dérivés bi- et tri-modulaires. Les valeurs des indices de réactivité de la catéchine et de ses dérivés bi-modulaires résultant du greffage de la chaîne grasse sur un hydroxyle phénolique (type I) ou sur l'hydroxyle aliphatique (type II) sont résumées dans le tableau 32. Les valeurs d'IC50 relatives à l'inhibition du radical DPPH sont rappelées.

La catéchine possède le potentiel chimique électronique (μ) le plus élevé (-3,171 eV), la dureté chimique (η) la plus faible (2,043 eV), le plus faible écart d'énergie entre la HOMO et la LUMO (4,086) et le PI le plus faible (5,215 eV) comparativement à ses dérivés bi-modulaires. Ceci suggère que la catéchine peut facilement céder un électron ; elle est moins

stable et plus réactive que ses dérivés, ce qui peut expliquer sa forte capacité à inhiber le radical DPPH• comparativement à ses dérivés bi- et tri-modulaires.

Les composés bi-modulaires résultant du greffage de la chaîne grasse sur l'hydroxyle aliphatique, ont un pouvoir antioxydant plus élevé que ceux obtenus par acylation d'un hydroxyle phénolique (cycle B). Comme évoqué précédemment, le groupement catéchol du cycle B confère cette activité. Les descripteurs de la réactivité chimique confirment cette constatation. Enfin, on note que la réactivité des dérivés diminue avec l'allongement de la chaîne acyle, ce qui est cohérent avec les résultats d'activité antioxydante obtenus.

En ce qui concerne les composés tri-modulaires, les descripteurs calculés confirment que les dérivés synthétisés à base d'alanine ont un potentiel antioxydant plus élevé que ceux à base de lysine et d'acide glutamique.

Tableau 33. Valeurs calculées des descripteurs de réactivité chimique et capacité à inhiber le radical DPPH (exprimée en IC₅₀) de la catéchine et de ses dérivés bi- et tri-modulaires.

Composé	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (eV) ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$)	μ (eV)	η (eV)	PI (eV)	IC ₅₀ (μM)
Catéchine	-5,215	-1,128	4,086	-3,171	2,043	5,215	16
Cat-C8 (type I)	-6,183	-1,980	4,202	-4,082	2,101	6,183	24
Cat-C12 (type I)	-6,192	-1,967	4,224	-4,079	2,112	6,192	25
Cat-C14 (type I)	-6,217	-1,969	4,247	-4,093	2,123	6,217	32
Cat-C16 (type I)	-6,330	-1,998	4,332	-4,164	2,166	6,330	36
Cat-C18 (type I)	-6,580	-1,769	4,811	-4,175	2,405	6,580	40
Cat-C18:1 (type I)	-6,263	-1,932	4,330	-4,097	2,165	6,263	33
Cat-C8 (type II)	-5,292	-1,100	4,192	-3,196	2,096	5,292	22

Cat-C12 (type II)	-5,299	-1,099	4,199	-3,199	2,099	5,299	23
Cat-C14 (type II)	-5,323	-1,105	4,217	-3,214	2,108	5,323	24
Cat-C16 (type II)	-5,332	-1,100	4,231	-3,216	2,115	5,332	26
Cat-C18 (type II)	-5,440	-1,128	4,311	-3,284	2,155	5,440	34
Cat-Ala-C8	-5,498	-1,355	4,142	-3,427	2,071	5,498	19
Cat-Ala-C12	-5,521	-1,342	4,178	-3,432	2,089	5,521	20
Cat-Ala-C14	-5,583	-1,389	4,193	-3,486	2,096	5,583	23
Cat-Ala-C16	-5,592	-1,379	4,212	-3,485	2,106	5,592	24
Cat-Lys- (C8) ₂	-5,893	-1,659	4,234	-3,776	2,117	5,893	26
Cat-Lys- (C12) ₂	-5,928	-1,664	4,263	-3,796	2,131	5,928	30
Cat-Lys- (C14) ₂	-5,992	-1,677	4,315	-3,834	2,157	5,992	33
Cat-Lys- (C16) ₂	-5,999	-1,679	4,320	-3,839	2,157	5,999	37
(Cat) ₂ -Glu- C8	-5,391	-1,054	4,337	-3,223	2,168	5,391	37
(Cat) ₂ -Glu- C12	-5,477	-1,083	4,394	-3,280	2,197	5,477	39
(Cat) ₂ -Glu- C14	-5,520	-1,073	4,447	-3,296	2,223	5,520	42
(Cat) ₂ -Glu- C16	-5,645	-1,085	4,560	-3,365	2,280	5,645	45

Une recherche de corrélation entre la capacité d'inhibition du radical DPPH• et l'écart d'énergie entre les orbitales LUMO et HOMO, la dureté chimique (η) le potentiel chimique électronique (μ), et le potentiel d'ionisation (PI) a été menée (figure 94).

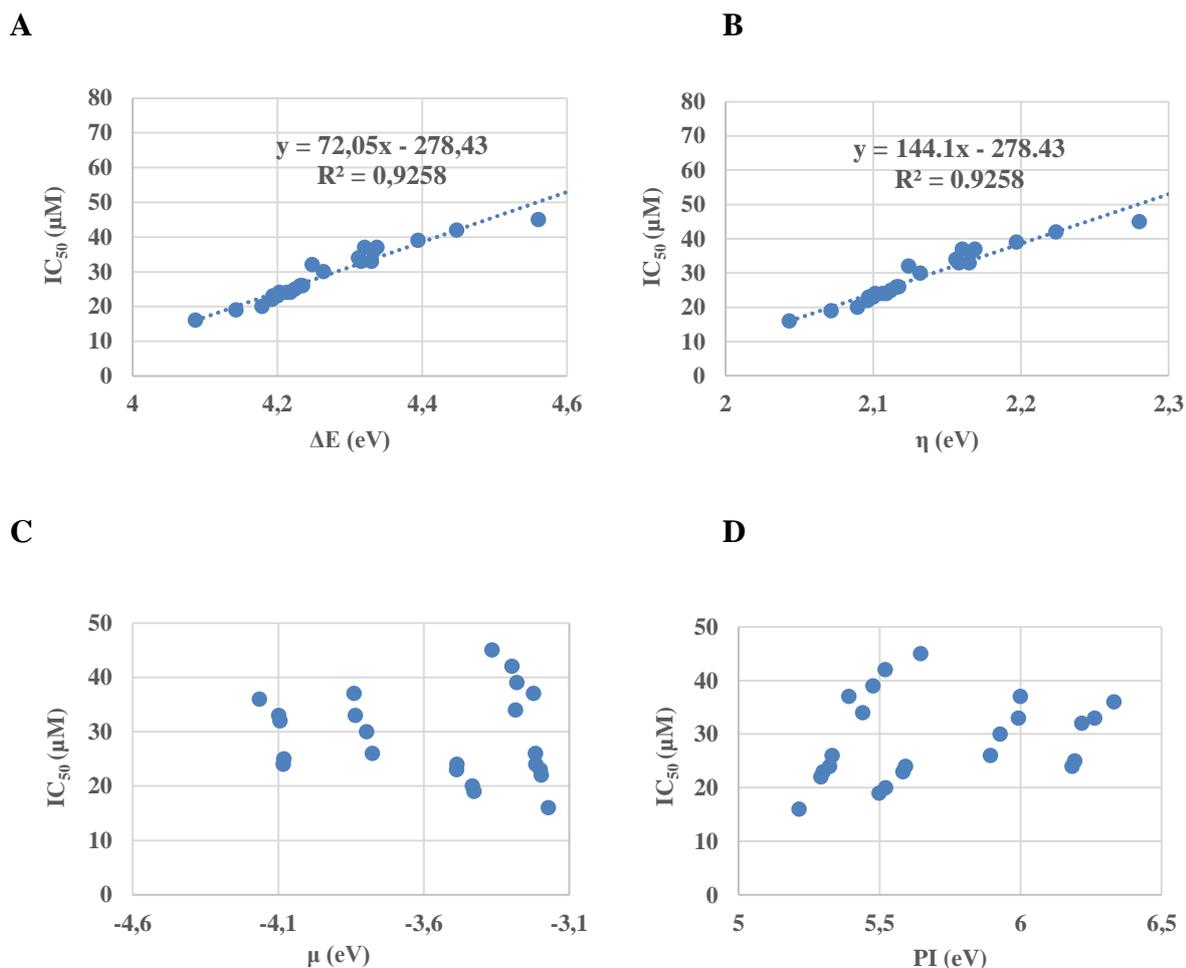


Figure 94. Recherche de corrélation entre les descripteurs chimiques ΔE (A), η (B), μ (C) et PI (D) et les valeurs d'IC₅₀ relatives à l'inhibition du radical DPPH pour la catéchine et ses dérivés.

Ces différents graphes montrent une corrélation positive entre ΔE , η et les valeurs d'IC₅₀. En revanche aucune corrélation n'a été observée entre μ , PI et l'IC₅₀. Des résultats similaires ont été observés par Rahmani *et al.* (2015) ou aucune corrélation n'a été établie entre le PI et l'IC₅₀ pour les flavonoïdes aglycones qui ont été testés.

Une démarche similaire a été menée pour la rutine, la naringine et leurs dérivés trimodulaires. Les valeurs calculées des descripteurs de réactivité et un rappel de la capacité des molécules à inhiber le radical DPPH sont présentés dans le tableau 33.

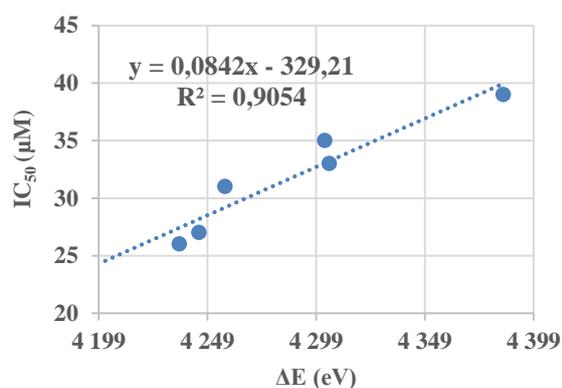
En comparant les valeurs des descripteurs obtenues pour la rutine et ses dérivés, les valeurs de ΔE , η , μ et PI suggèrent que la rutine présente une activité antioxydante plus élevée que ses dérivés, ce qui est cohérent avec les données expérimentales. Ce même cas de figure se présente pour la naringine et ses dérivés.

Comme précédemment, une recherche de corrélation entre les descripteurs moléculaires calculés et la capacité à inhiber le radical DPPH a été recherchée pour la rutine et ses esters.

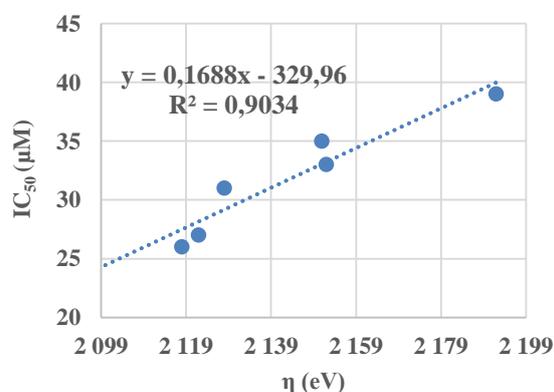
Tableau 34. Valeurs calculées des descripteurs de réactivité chimique et capacité à inhiber le radical DPPH (exprimée en IC₅₀) de la rutine, la naringine et leurs composés tri-modulaires.

Composé	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (eV) ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$)	μ (eV)	η (eV)	PI (eV)	IC ₅₀ (μM)
Rutine	-6,108	-1,907	4,202	-4,007	2,100	6,108	22
R-C8	-6,340	-1,103	5,136	-3,222	2,568	6,340	26
R-C12	-6,362	-1,117	5,245	-3,240	2,622	6,362	27
R-C14	-6,447	-1,189	5,257	-3,318	2,628	6,447	31
R-C16	-6,489	-1,186	5,303	-3,337	2,651	6,489	35
R-C18	-6,581	-1,195	5,385	-3,388	2,692	6,581	39
R-C18 :1	-6,495	-1,189	5,305	-3,342	2,652	6,495	33
Naringine	-6,546	-1,919	4,626	-4,233	2,313	6,546	138
N-C8	-6,536	-1,846	4,689	-4,191	2,344	6,536	145
N-C12	-6,636	-1,801	4,834	-4,218	2,417	6,636	149
N-C14	-6,725	-1,865	4,859	-4,295	2,429	6,725	154
N-C16	-6,805	-1,763	5,042	-4,284	2,251	6,805	158
N-C18	-6,859	-1,783	5,075	-4,321	2,537	6,859	162
N-C18:1	-6,838	-1,800	5,037	-4,319	2,518	6,838	155

A



B



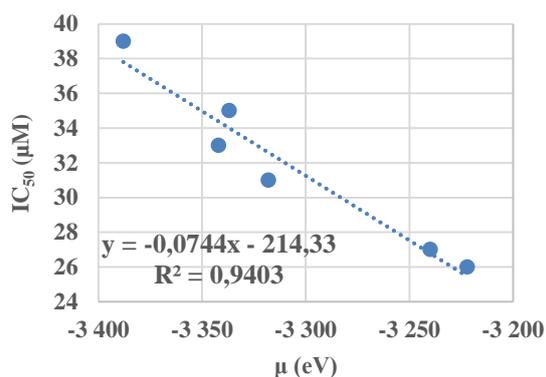
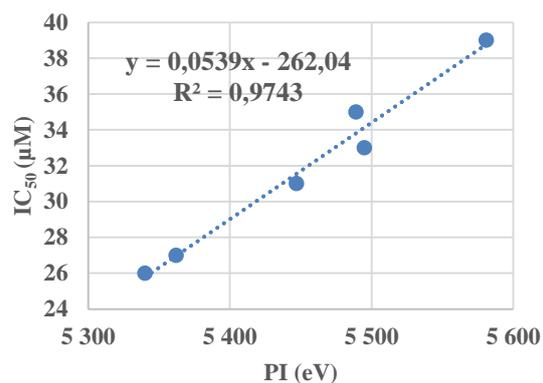
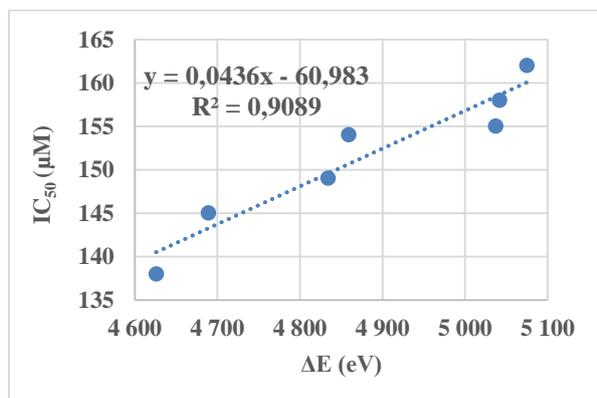
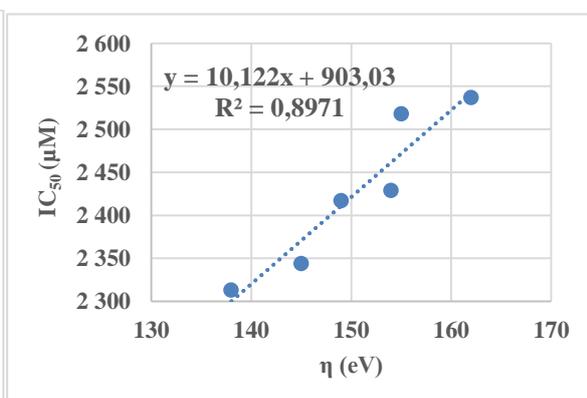
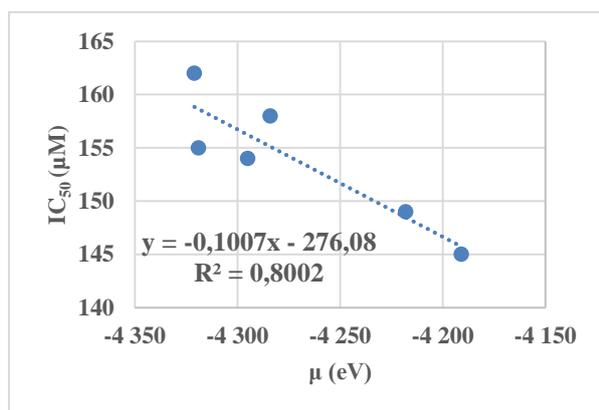
C**D**

Figure 95. Recherche de corrélation entre les descripteurs chimiques ΔE (A), η (B), μ (C) et PI (D) et les valeurs d'IC₅₀ relatives à l'inhibition du radical DPPH pour la rutine et ses dérivés.

Les figures 94 montrent qu'il existe une corrélation positive entre la capacité de la rutine et ses esters à inhiber le radical DPPH et la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO (ΔE) et la dureté chimique (η). Contrairement à la catéchine et ses dérivés, il existe une corrélation entre le potentiel chimique électronique (μ), le potentiel d'ionisation (PI) et les valeurs d'IC₅₀ obtenus pour la rutine et ses esters.

A**B**

C



D

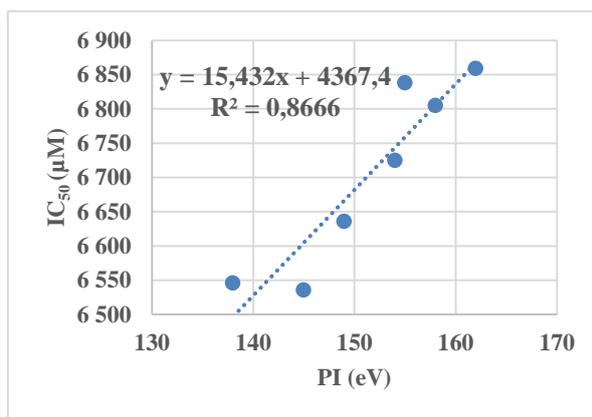


Figure 96. Recherche de corrélation entre les descripteurs chimiques ΔE (A), η (B), μ (C) et PI (D) et les valeurs d'IC₅₀ relatives à l'inhibition du radical DPPH pour la naringine et ses dérivés.

Pareil comme la rutine, il existe une corrélation positive également entre la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO (ΔE), les descripteurs chimiques, et la capacité de la naringine et de ses dérivés synthétisés à inhiber le radical DPPH.

1.5. Conclusions

Les descripteurs de réactivité chimique, calculés pour les flavonoïdes et leurs dérivés, montrent qu'il existe une corrélation entre la capacité des molécules à inhiber le radical DPPH et la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO (ΔE) ; de même, une corrélation est observée entre l'activité anti-radicalaire de la catéchine et ses esters et les valeurs calculées de dureté chimique (η), et une corrélation positive entre l'activité anti-radicalaire de la rutine, la naringine et leurs esters et les valeurs calculées de dureté chimique (η) du potentiel chimique électronique (μ), et du potentiel d'ionisation (PI) pour la rutine, la naringine et leurs esters. L'existence de telles corrélations permet d'envisager la prédiction du potentiel anti-radicalaire de nouveaux dérivés de flavonoïdes à partir du calcul des descripteurs moléculaires ; cela permet également d'envisager l'optimisation des structures *in silico* afin de maximiser l'activité anti-radicalaire des dérivés (démarche d'ingénierie réverse). Au regard de ces deux descripteurs, la catéchine, la rutine et la naringine ont une activité anti-radicalaire supérieure à celle de leurs esters. L'allongement de la chaîne acyle s'accompagne d'une diminution du pouvoir anti-radicalaire. Par ailleurs, les valeurs de BDE calculées par modélisation moléculaire ont confirmé que l'entité catéchol portant des groupements hydroxyle en position 4' et /ou 3', contribue majoritairement à l'activité

antioxydante des flavonoïdes, qu'ils soient glycosylés ou non. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature : le motif catéchol des flavonoïdes est majoritairement responsable de leur activité antioxydante ; on en déduit que les voies de synthèse à privilégier pour obtenir des dérivés à fort potentiel antioxydant sont celles maintenant ce motif inchangé. Les dérivés de flavonoïdes synthétisés dans cette étude présentent une capacité antioxydante plus faible que les molécules naturelles ; toutefois, ces molécules demeurent des antioxydants, susceptibles de présenter par ailleurs d'autres propriétés d'intérêt dans l'optique d'obtenir des composés multi-fonctionnels.

2. Etude des propriétés physico-chimiques des composés synthétisés

2.1. Détermination de l'hydrophobie et de la solubilité maximale dans l'eau des composés synthétisés

2.1.1. Détermination de la solubilité maximale dans l'eau des composés tri-modulaire (dérivés d'acides aminés et de sucre)

Avant la mesure de la tension superficielle des produits synthétisés, leur solubilité dans l'eau a été déterminée.

Nous avons dans un premier temps évalué la solubilité maximale dans l'eau des composés tri-modulaires à base d'alanine (composés de type **III a**) dans l'eau dont la structure est rappelée dans la figure 97.

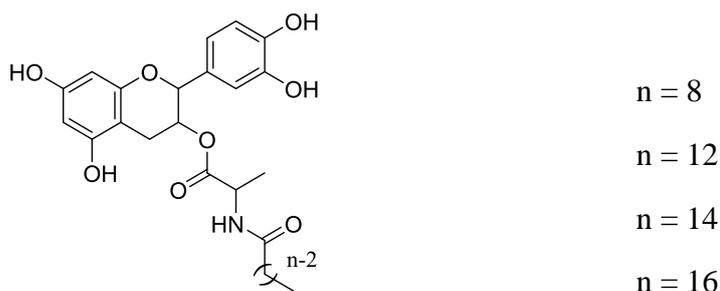


Figure 97. Structure des composés tri-modulaires de type **III a**

Les tests de solubilité maximale ont été réalisés en saturant l'eau avec les composés à tester, puis prélever un volume précis, lyophiliser et peser afin de déterminer la masse du produit solubilisé dans le volume exact d'eau prélevé. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 35. Solubilité des composés tri-modulaires **III a** dans l'eau

Produits	Solubilité (M)
Catéchine-Alanine-C8	10^{-3}
Catéchine-Alanine-C12	$2,5 \cdot 10^{-4}$

Catéchine-Alanine-C14	$7,5 \cdot 10^{-5}$
Catéchine-Alanine-C16	$2,5 \cdot 10^{-5}$

Les composés à base d'alanine sont bien solubles dans l'eau avec toutes les longueurs de chaînes. En revanche cette solubilité devient de plus en plus difficile plus la chaîne grasse est longue.

La solubilité dans l'eau des composés tri-modulaires à base de lysine (composés de type **III b**), dont la structure est rappelée dans la figure 98, sont résumés dans le tableau 35.

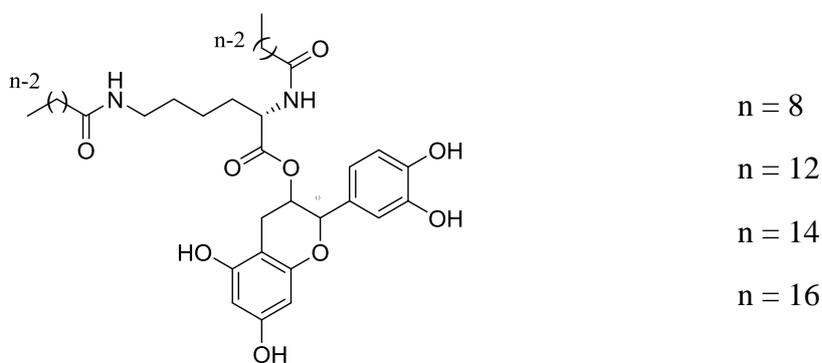


Figure 98. Structure des composés tri-modulaires de type III b

Tableau 36. Solubilité des composés tri-modulaires III b dans l'eau

Produits	Solubilité (M)
Catéchine-Lysine-(C8)₂	10^{-5}
Catéchine-Lysine-(C12)₂	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Catéchine-Lysine-(C14)₂	$7,5 \cdot 10^{-7}$
Catéchine-Lysine-(C16)₂	$2,5 \cdot 10^{-7}$

Ces composés sont moins solubles dans l'eau en comparaison aux composés à base d'alanine en raison de la présence de deux chaînes grasse greffées sur les deux fonctions amine de la lysine.

La solubilité dans l'eau des composés tri-modulaires à base d'acide glutamique (composés de type **III c**), dont la structure est rappelée dans la figure 99, sont résumés dans le tableau 36.

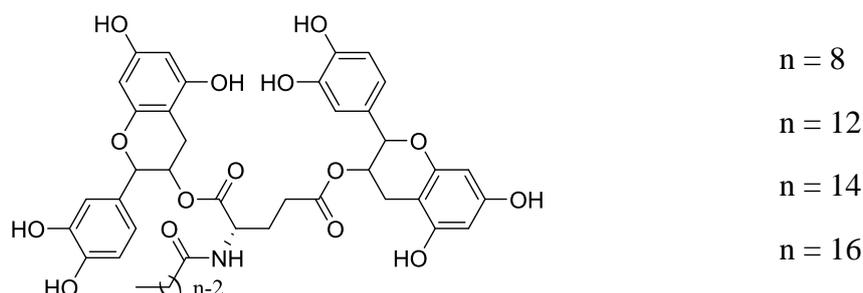


Figure 99. Structure des composés tri-modulaires de type III c

Tableau 37. Solubilité des composés tri-modulaires III b dans l'eau

Produits	Solubilité (M)
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C8	10^{-2}
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C12	$7,5 \cdot 10^{-3}$
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C14	$7,5 \cdot 10^{-4}$
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C16	$2,5 \cdot 10^{-4}$

Les composés tri-modulaires à base d'acide glutamique (composés de type **III c**) possèdent deux têtes polaires et sont donc plus solubles que les composés à base de lysine et d'alanine.

La solubilité maximale dans l'eau des composés tri-modulaire à base de sucre (composés de type **IV**) a été étudiée également. La structure des composés à base de rutine et les composés à base de naringine sont rappelés dans les figures 100 et 101 respectivement et les valeurs de solubilités obtenues sont résumées dans le tableau 37.

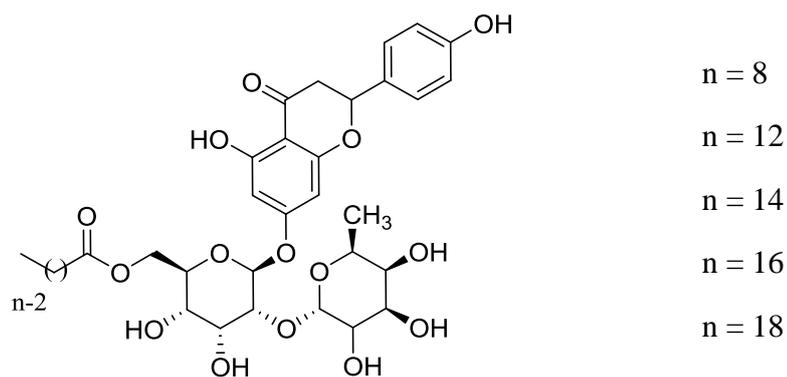


Figure 100. Structure des composés tri-modulaires de type IV de la naringine

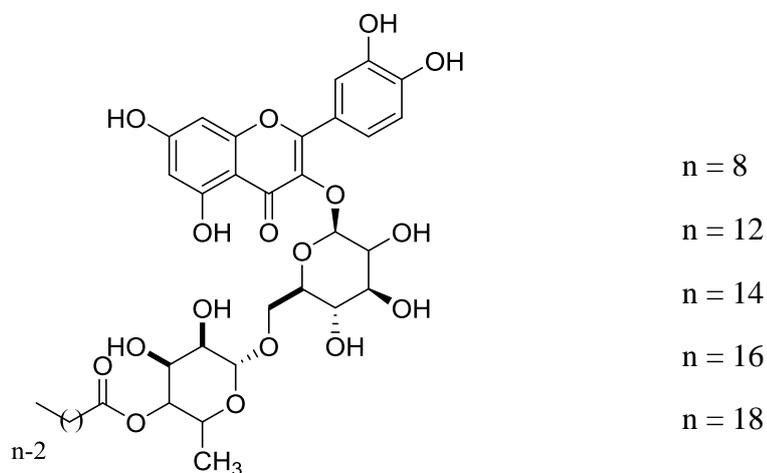


Figure 101. Structure des composés tri-modulaires de type IV de la rutine

Tableau 38. Solubilité des composés tri-modulaires de type IV dans l'eau

Produits	Solubilité (M)
Rutine-C8	$2,5 \cdot 10^{-4}$
Rutine-C12	$5 \cdot 10^{-4}$
Rutine-C14	$2,5 \cdot 10^{-5}$
Rutine-C16	$7,5 \cdot 10^{-5}$
Rutine-C18	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Rutine-C18 :1	$5 \cdot 10^{-5}$
Naringine-C8	$2,5 \cdot 10^{-2}$

Naringine-C12	5.10^{-3}
Naringine-C14	10^{-3}
Naringine-C16	5.10^{-4}
Naringine-C18	10^{-4}
Naringine-C18 :1	$2,5.10^{-4}$

Ces composés sont plus solubles dans l'eau que les composés tri-modulaires à base d'acide aminé et cela est à cause de la présence des groupements sucres qui facilitent la solubilité de ces composés dans les milieux aqueux

2.2. Etude des coefficients de partition des composés tri-modulaires à base d'alanine

2.2.1. Principe

Le coefficient de partage (**P**) est le rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases composé de deux solvants largement non miscibles. Dans le cas du n-octanol et de l'eau. L'octanol constitué d'une chaîne alkyle hydrophobe et d'un groupement hydroxyle susceptible de former des liaisons hydrogène, va mimer la membrane lipidique. Ce coefficient est calculé par la formule suivante qui a été défini par Hansch *et al.* [38], [39].

$$P = \frac{[\text{composé}]_{\text{oct}}}{[\text{composé}]_{\text{aq}}(1-\alpha)}$$

avec α : degré de dissociation du composé dans l'eau

En mesurant la concentration du composé dans des volumes variables d'octanol et d'eau, **P** est expérimentalement déterminé par décantation.

De plus, Collander a également étudié l'hydrophobicité et a pu montrer que le mouvement des composés organiques au travers est à peu près proportionnel au logarithme du coefficient de

partage **P** [40]. A partir de ces observations, Hansch *et al.* [41] ont pu établir de nouvelles relations

$$\log 1/C = -k (\log P)^2 + k' (\log P) + k''$$

avec **C** : concentration molaire produisant une réponse biologique standard

k, k', k'' : constantes déterminées par la méthode des moindres carrés

De cette relation, il a été conclu que plus la valeur de log P est élevée, plus l'hydrophobicité du composé est élevée, et inversement, plus la valeur de log P est proche de 0, plus l'hydrophilie du composé est élevée.

2.2.2. Détermination du coefficient de partition par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance en phase inversée est une autre méthode de mesure du coefficient de partage, qui est représenté par $\log k'_w$. Cette méthode présente les avantages d'être applicable à une très large gamme de composés organiques, nécessitant très peu de volume de produit, et d'être simple et rapide à mettre en œuvre. Les composés injectés dans de telles colonnes se répartissent entre la phase mobile du solvant et la phase stationnaire hydrocarbonée et sont transportés le long de la colonne par la phase mobile. Ces composés sont retenus proportionnellement au coefficient de partage hydrocarboné-eau, les substances hydrophiles étant éluées en premier et les substances lipophiles en dernier. Le temps de rétention est décrit par le facteur de capacité k , donné par l'expression suivante :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Avec t_R : le temps de rétention de la substance d'essai

t_0 : le temps mort, c'est-à-dire le temps moyen nécessaire à une molécule du solvant pour passer la colonne.

Le tableau 38 résume les valeurs de t_0 , $\log k'$ ainsi que $\log k'_w$ pour les composés tri-modulaires à base d'alanine.

Tableau 39. Temps de retentions, $\log k'$ et $\log k'_w$ pour les composés tri-modulaires à base d'alanine.

Composés	t_R				$\log k'$				R^2	$\log k'_w$
	MeOH / H ₂ O				MeOH / H ₂ O					
	70/30	75/25	80/20	85/15	70/30	75/25	80/20	85/15		
Cat-Ala-C8	2.13	1.68	1.41	-	-0.11	-0.39	-0.75	-	0.995	4.42
Cat-Ala-C12	7.60	4.23	2.00	1.87	0.72	0.40	-0.17		0.999	5.22
Cat-Ala-C14	7.60	4.25	2.60	1.90	0.72	0.40	0.06	-0.23	0.932	5.63
Cat-Ala-C16	-	17.34	7.71	3.93	-	1.12	0.73	0.35	0.999	6.91

Les valeurs des coefficients de partition des quatre composés étudiés sont représentées dans l'histogramme suivant (Figure 102).

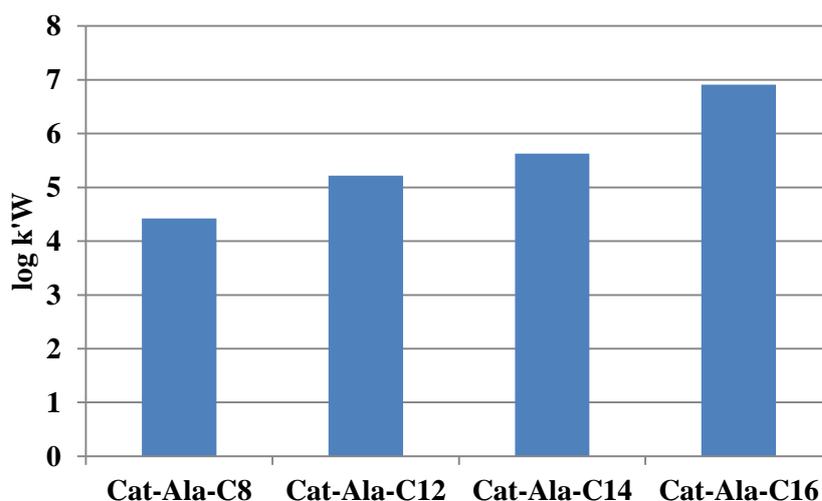


Figure 102. Variation de l'hydrophobie des composés tri-modulaires à base d'alanine

Les valeurs obtenues pour les quatre composés tri-modulaires à base d'alanine montrent que le greffage du bi-module hydrophobe, alanine – acide gras, sur la catéchine augmente fortement son hydrophobie. Cette hydrophobie augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse. En effet avec l'acide octanoïque (C8) la valeur de $\log k'_w$ est de 4.42. Cette valeur augmente avec le greffage de l'acide laurique (C12) (5.22) et l'acide myristique (C14) (5.63). En revanche pour ces deux acides gras, les valeurs de $\log k'_w$ sont proches et donc ces deux composés ont une hydrophobie à peu près semblable mais supérieure à celle

avec la chaîne à 8 atomes de carbones. Finalement le composé le plus hydrophobe de la série est logiquement celui issu de l'acide palmitique (C16) avec une valeur de $\log k'_w$ de 6.91.

Rosselin *et al.* ont synthétisés des composés amphiphiles à base d'acide aminé ayant des coefficients de partition entre 4.92 et 6.37 [42] (Figure 103).

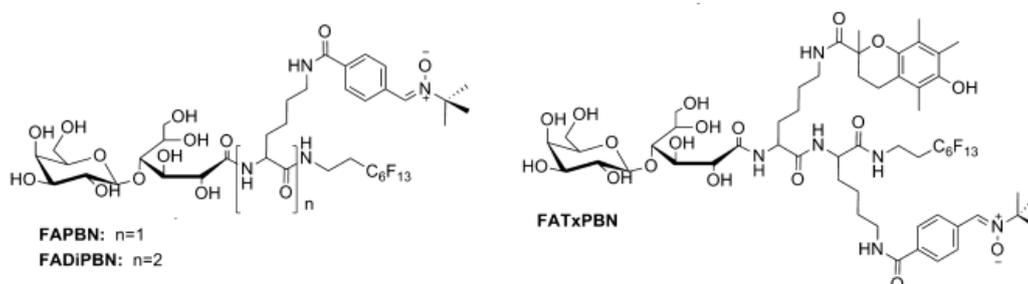


Figure 103. Composés amphiphiles à base d'acide aminé (Rosselin *et al.* 2016)

2.3. Propriétés tensioactives

2.3.1. Principe de la mesure de tension superficielle par la technique de Wilhelmy

Nous avons ensuite caractérisé les propriétés tensioactives des différents composés synthétisés, afin de connaître le domaine d'éventuelles applications. Nous avons ainsi déterminé la concentration d'agrégation critique (CAC) qui correspond à la concentration où des agrégats se forment. Ces agrégats sont le plus souvent des micelles donc cette concentration est aussi appelée concentration micellaire critique (CMC). La technique de la tensiométrie a été utilisée tout au long de cette étude.

Cette technique permet de déterminer la CMC par mesure de la tension superficielle γ . Nous avons utilisé la méthode de la lame de Wilhelmy [45].

Le dispositif est constitué d'une lame de platine dépolie suspendue à une balance électromagnétique. Elle est plongée dans la solution puis remontée jusqu'à ce que le bord inférieur affleure la surface et provoque la formation d'un ménisque. A ce moment, la force mesurée par la balance pour compenser le poids du ménisque est:

$$F = 2.l.\gamma.\cos \theta$$

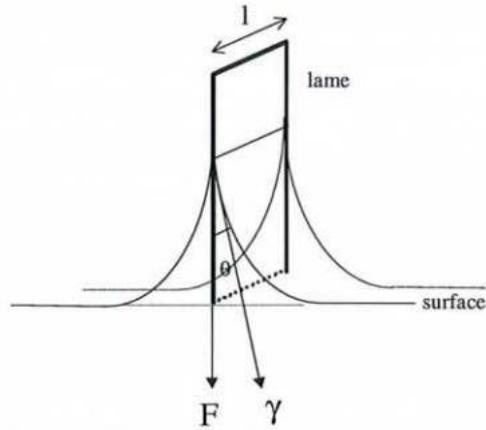


Figure 104. Illustration de la méthode de la lame de Wilhelmy

L'équation précédente permettant la détermination de la tension superficielle ne peut être utilisée en réalité que si est nul, car on ne peut pas le mesurer. Le mouillage de la lame doit donc être total. On a alors $\gamma = F / (2.l)$.

Gibbs a étudié les variations de tension superficielle causées par des faibles ajouts de tensioactifs [46]. Il a établi une relation à partir de l'expression de l'énergie libre de surface qui, après simplification, conduit à l'**Equation 1**.

$$A.d\gamma + \sum_i n_i.d\mu_i = 0 \quad \text{Equation 1}$$

avec **A**: aire de la surface

n_i : nombre de moles de l'espèce i à la surface

$\mu_i = \mu_i^0 + 2,303.R.T.\log C$: potentiel chimique de l'espèce i

γ : tension superficielle

L'équation de Gibbs (Equation 2) permet de relier la quantité de tensioactif adsorbé à la surface et l'effet produit sur la tension superficielle.

$$\Gamma = \frac{-1}{2,3.R.T} \frac{d\gamma}{d \log C} \quad \text{Equation 2}$$

avec **C** : concentration totale en tensioactif en mol/l

R: constante des gaz parfaits =8.314 J.K⁻¹.mol⁻¹

T : température en Kelvin

Γ = **n/A**: concentration d'excès de surface du tensioactif

Cette relation démontre que l'augmentation de la concentration en tensioactifs provoque une saturation progressive de la surface. Ceci se traduit par un abaissement linéaire de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration.

Selon que le tensioactif soit ionique ou non, il faut ajouter un facteur (z+1) dans le membre de droite de l'équation de Gibbs, z étant égal à la charge du tensioactif.

Lorsque le tensioactif est non-ionique, z =0 (Equation 2).

Lorsque le tensioactif porte une charge, z = 1, il faut alors ajouter un facteur 2 et ainsi de suite.

En effet, lorsqu'un tensioactif est ionique, il est accompagné d'un ou plusieurs contre-ions dont il faut tenir compte dans l'Equation 1.

L'inverse de la concentration d'excès de surface Γ est égal à la surface occupée par une mole de tensioactif. On en déduit ainsi la surface par tête polaire minimum (σ) en divisant par le nombre d'Avogadro *N*.

$$\sigma = \frac{10^{20}}{N \Gamma} \quad \text{Equation 3}$$

avec σ : en Å²/molecule

Les variations de la tension superficielle d'une solution aqueuse de tensioactif obéissent à l'équation de Gibbs jusqu'à la concentration micellaire critique. Au-delà de cette concentration, il y a une rupture de pente (Figure 2).

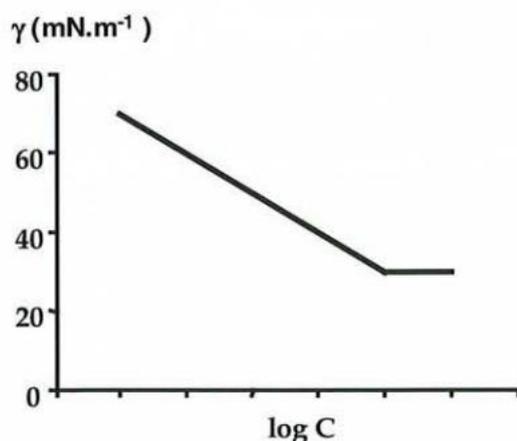


Figure 105. Représentation d'une courbe de tensiométrie $\gamma = f(\log C)$

En effet, à faible concentration en tensioactif, les molécules forment une vraie solution et sont ainsi entourées par le liquide. Lorsque la concentration augmente, certaines molécules sont repoussées vers la surface : celles-ci cherchent alors à trouver le maximum de surface libre. La tension superficielle diminue alors et par conséquent le travail nécessaire pour augmenter la surface diminue avec l'augmentation de la concentration en tensioactif. Lorsque la surface est saturée, et toujours pour minimiser l'énergie du système, les queues hydrophobes s'agrègent entre elles pour former différents agrégats suivant le type de molécules. La tension superficielle γ est alors stabilisée à un palier : au-delà de la CAC, aucun effet de surface n'est observé. Expérimentalement, la CAC est déterminé par le point d'inflexion de la courbe.

Ce phénomène d'agrégation peut donc être considéré comme un mécanisme permettant d'abaisser l'énergie interfaciale du surfactant lorsque toutes les interfaces sont saturées en molécules adsorbées.

2.3.2. Mesure des tensions superficielles des composés synthétisés

Les composés bi-modulaires ayant une très faible solubilité dans l'eau, leur tension de surface n'a pas été mesurée. La tension superficielle a donc été mesuré pour les composés tri-modulaires à base d'acide aminés (composés de type III) et les composés tri-modulaires à base de sucre (composés de type IV). Les mesures de tensiométrie ont été effectuées, à partir de solutions aqueuses à différentes concentration à partir d'eau déminéralisée ($\text{pH} \approx 6-7$) à 25°C .

2.3.2.1. Mesure des tensions superficielles des composés tri-modulaires à base d'acide aminé (composé de type III)

2.3.2.1.1. Composés à base d'alanine

Tout d'abord nous avons mesuré la tension superficielle des composés tri-modulaires à base d'alanine.

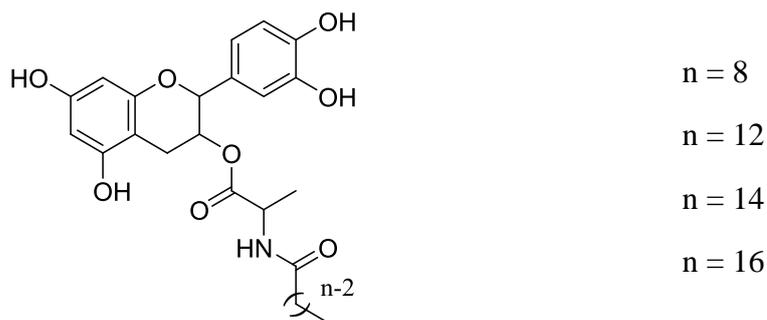


Figure 106. Structure des composés tri-modulaires de type III a

Les courbes d'évolution de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration des composés tri-modulaires **III a** en solution aqueuse à 25°C, sont présentées sur la figure 107.

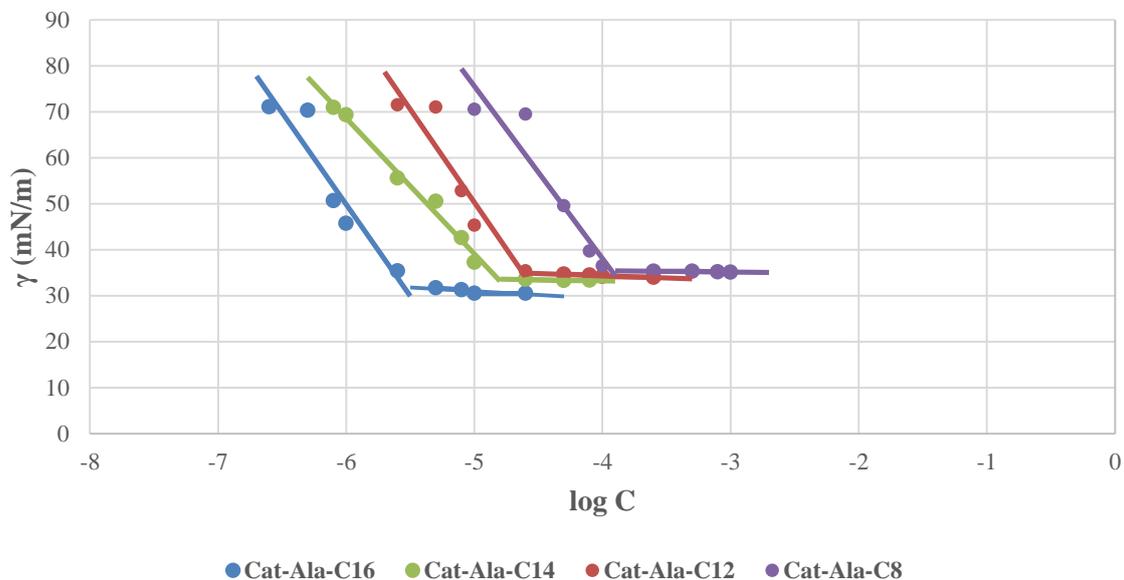


Figure 107. Tension superficielle des composés tri-modulaires de type III a en solution aqueuse à 25°C

Le tableau 39 rassemble les valeurs des CAC et des γ (CAC) ainsi que les valeurs de la surface par tête polaire, pour ces composés tri-modulaires. Tous les composés testés permettent d'abaisser la tension de surface de 71 mN/m à des valeurs entre 30 et 35 mN/m, donc les produits ont des propriétés tensioactives ; la plus forte diminution étant observée pour le composé Catéchine-Alanine-C16 ($\gamma = 30$ mN/m).

Tableau 40. CAC, tensions superficielles à la CAC (γ) et surface par tête polaire des composés tri-modulaires de type III a en solution aqueuse à 25°C

Composé	CAC (mol/L)	γ (mN/m)	σ (Å ² /molécule)
Catéchine-Alanine-C8	10^{-4}	35	0,14
Catéchine-Alanine-C12	$2,5 \cdot 10^{-5}$	34	0,14
Catéchine-Alanine-C14	$1,5 \cdot 10^{-5}$	33	0,15
Catéchine-Alanine-C16	$2,5 \cdot 10^{-6}$	30	0,19

Les valeurs de la tension de surface, notées γ , sont relativement similaires (Figure 107).

Plus la CAC est faible, plus l'effet hydrophobe se fait sentir et plus les molécules s'organisent facilement entre elles à faible concentration. Les résultats montrent que la longueur de chaîne influence le profil de décroissance de la tension de surface en fonction de la concentration. Le palier de tension de surface, et donc la CAC, sont atteints d'autant plus rapidement que le nombre de carbones de la chaîne grasse est élevé.

Le composé **14d** (Cat-Ala-C16), est le composé de la gamme possédant le plus important pouvoir tensioactif, ayant à la fois la CAC ($2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) et la valeur de la tension à la CAC (30 mN/m) les plus faibles. C'est donc le composé le plus puissant de la gamme, ne nécessitant qu'une faible quantité de produit pour abaisser la tension de surface aux alentours de 30 mN/m. Tous les autres composés semblent eux aussi prometteurs, permettant d'abaisser la tension de surface vers 35 mN/m avec une valeur de CAC de $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour le composé **14a** (Cat-Ala-C8), 34 mN/m avec une CAC de $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour le composé **14b** (Cat-Ala-C12) et 33 mN/m avec une CAC de $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour le composé **14c** (Cat-Ala-C14). Les surfaces par tête polaire calculés augmentent avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse, ce qui explique la saturation rapide à la surface [47]–[50].

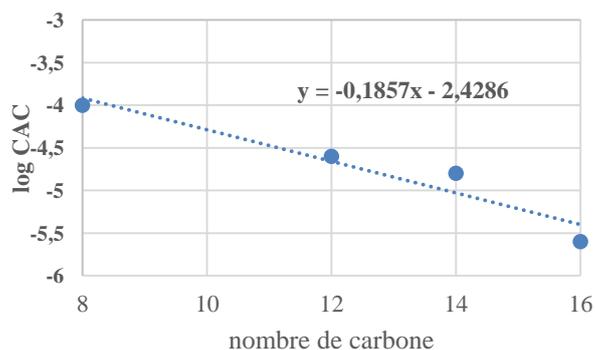


Figure 108. A. CAC en fonction du nombre de carbone des composés de type III a

Bougueroua *et al.* (2016) ont synthétisé des et testés la tension superficielle des tensioactifs à base d'alanine. Les sels de sodiums de n-alkanesulfonamido-2-proapnoïque acide (C12-Ala, C14-Ala, C16- Ala et C18-Ala) ont montré de propriétés tensioactives avec des valeurs de γ entre 31 et 33 mN/m. Ainsi les surfaces par tête polaire calculés augmentent avec l'augmentation de la chaine hydrocarbonée [48].

2.3.2.1.2. Composés à base de lysine

Nous avons mesuré la tension superficielle des composés tri-modulaires à base de lysine.

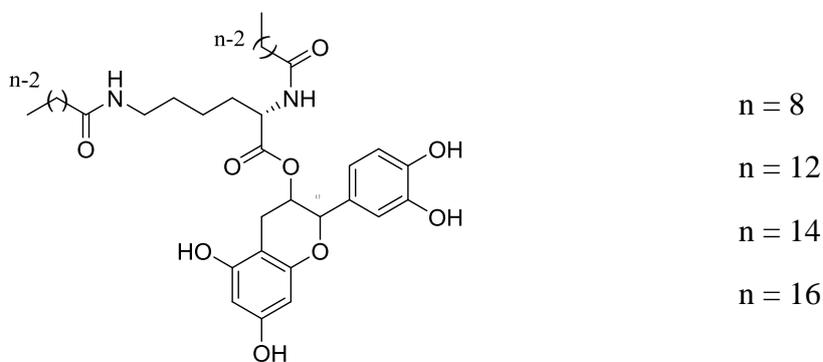


Figure 109. Structure des composés tri-modulaires de type III b

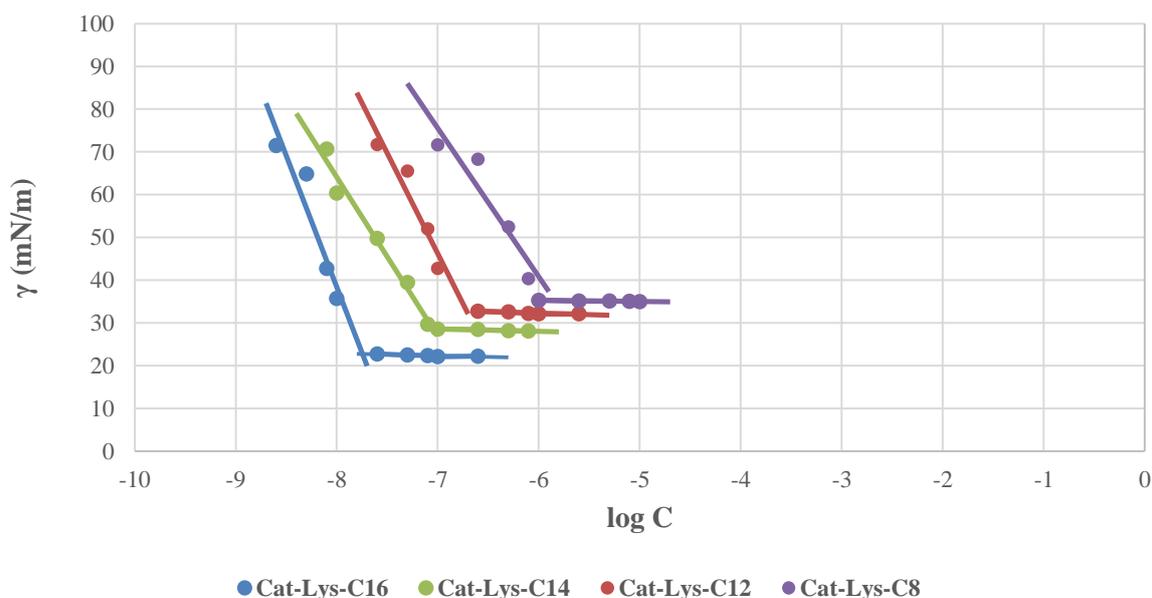


Figure 110. Tension superficielle des composés tri-modulaires de type III b en solution aqueuse à 25°C

Tous les composés de type **III b** testés permettent d'abaisser la tension de surface de 71 mN/m à des valeurs entre 35 et 22 mN/m, avec une forte diminution pour le composé **16d** (Cat-Lys-(C16)₂) ($\gamma = 22$ mN/m).

Le tableau 40 rassemble les valeurs des CAC et des γ (CAC) ainsi que les valeurs de la surface par tête polaire, pour ces composés tri-modulaires.

Tableau 41. CAC, tensions superficielles à la CAC (γ) et surface par tête polaire des composés tri-modulaires de type III b en solution aqueuse à 25°C

Composé	CAC (mol/L)	γ (mN/m)	σ (Å ² /molécule)
Catéchine-Lysine-(C8) ₂	10^{-6}	35	0,16
Catéchine-Lysine-(C12) ₂	$2,5 \cdot 10^{-7}$	32	0,12
Catéchine-Lysine-(C14) ₂	$1 \cdot 10^{-7}$	28	0,15
Catéchine-Lysine-(C16) ₂	$1,6 \cdot 10^{-8}$	22	0,09

A 10^{-6} M, la catéchine-lysine-(C8)₂ possède une valeur de tension superficielle de 35 mN/m. Les valeurs de la tension de surface à la CAC pour ces composés à base de lysine (composés de type **III b**) sont inférieures qu'à celles des composés à base d'alanine (composés de type **III**

a), et donc les composés de type **III b** sont plus tensioactifs que les composés de type **III a**. Le fait que deux chaînes grasses sont greffées sur les deux fonctions amine de la lysine peut expliquer le pouvoir tensioactif de ces produits.

En augmentant la longueur de la chaîne grasse, la concentration d'agrégation critique diminue ainsi que les valeurs de tension de surface (γ). Avec le C12, la CAC est de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M et γ est de 32 mN/m. Ces valeurs diminuent encore avec le C14 dont le produit forme des agrégats à $1 \cdot 10^{-7}$ M avec une tension superficielle de 28 mN/m. Et finalement seulement avec une concentration de $1,6 \cdot 10^{-8}$ M les composés avec le C16 forment des agrégats avec une tension superficielle de 22 mN/m. Avec les composés à base de lysine, composés de type **III b**, les surfaces par tête polaire calculées diminuent avec la longueur de chaîne, reflétant la croissance de l'hydrophobicité des molécules, ce qui favorise une forte adsorption à l'interface eau/air. Ces résultats sont identiques à ceux de la littérature [51], [52].

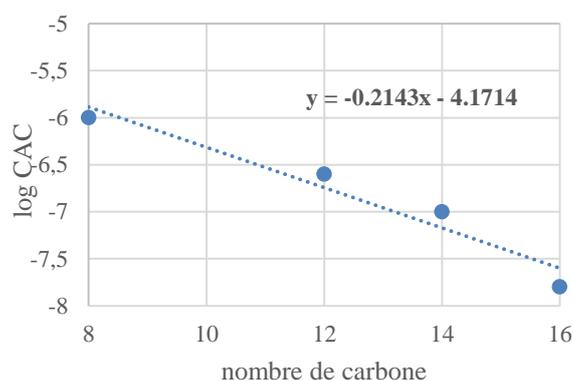


Figure 111. B. CAC en fonction du nombre de carbone des composés de type III b

Brito *et al.* (2013) ont synthétisé des tensioactifs à deux chaînes grasses à base de lysine avec le C8, le C10 et le C12. Les valeurs de tension superficielle (γ) sont entre 35,1 et 24,8 mN/m. Plus la longueur de la chaîne grasse augmente, plus la tension superficielle diminue et donc plus le produit synthétisé est tensioactif. En plus, les surfaces par tête polaire calculées diminuent avec la longueur de chaîne [52].

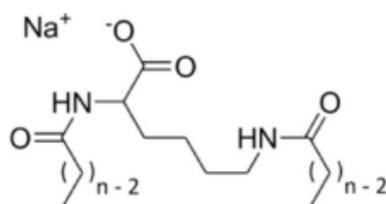


Figure 112. Structure moléculaire des tensioactifs à base de lysine (Brito *et al.* 2013)

Des études pareilles ont été menées par Shi *et al.* (2019) avec des composés à base de lysine, et ont montré que les produits sont plus tensioactifs quand la chaîne grasse possède plus que douze carbones. Ainsi les surfaces par tête polaire calculés diminuent avec la longueur de chaîne [51].

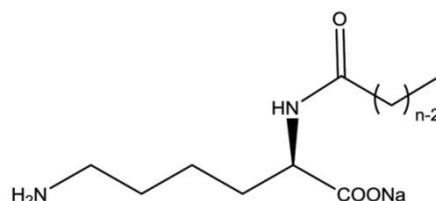


Figure 113. Structure moléculaire des tensioactifs à base de lysine (Shi *et al.* 2019)

Infante *et al.* (1990) et Oliveira *et al.* (2021) ont synthétisé des tensioactifs à base de lysine avec deux chaînes grasses différentes. Les valeurs de tension superficielle (γ) étaient relativement faibles, et les valeurs de surface par tête polaire étaient plus faibles que prévus, ce qui implique que les tensioactifs à chaînes plus longues peuvent former des monocouches nettement plus compactes à l'interface [53], [54].

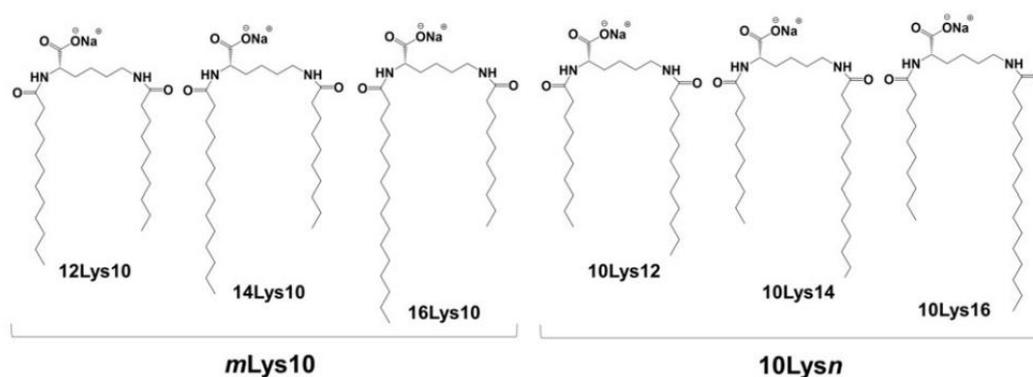


Figure 114. Structure moléculaire des tensioactifs à base de lysine avec deux chaînes grasses de longueurs différentes (Oliveira *et al.* 2021)

2.3.2.1.3. Composés à base d'acide glutamique

Nous avons mesuré la tension superficielle des composés tri-modulaires à base d'acide glutamique.

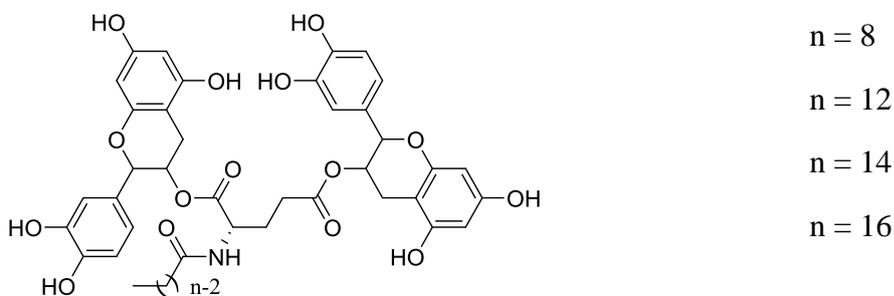


Figure 115. Structure des composés tri-modulaires de type III c

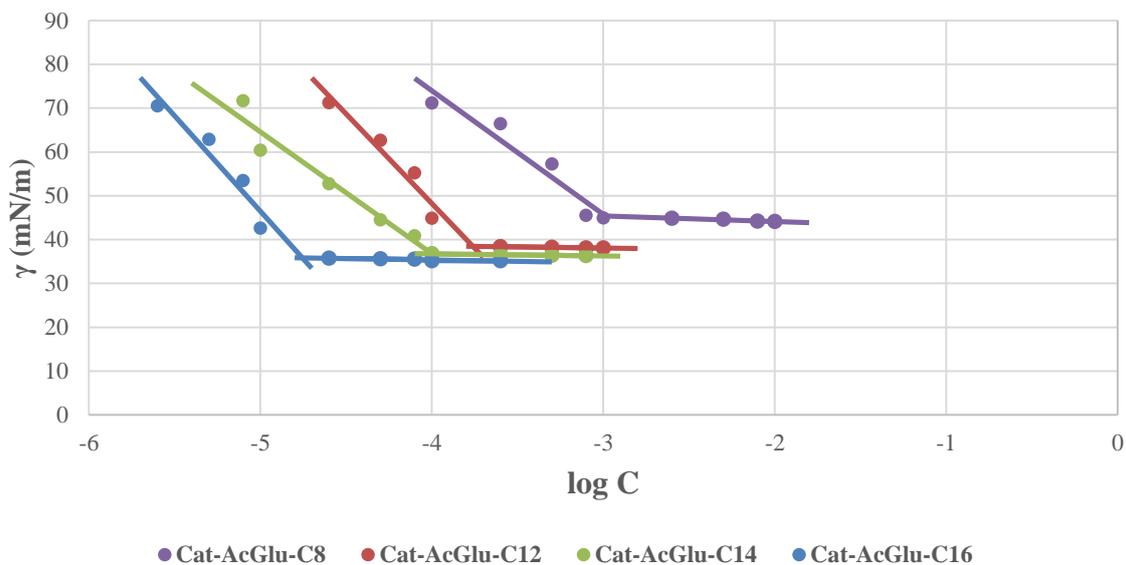


Figure 116. Tension superficielle des composés tri-modulaires de type III c en solution aqueuse à 25°C

Les valeurs de tension superficielle (γ) des composés de type III c sont entre 45 et 35 mN/m (Figure 114).

Tableau 42. CAC, tensions superficielles à la CAC (γ) et surface par tête polaire des composés tri-modulaires de type III c en solution aqueuse à 25°C

Composé	CAC (mol/L)	γ (mN/m)	σ (Å ² /molécule)
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C8	10 ⁻³	44,5	0,18
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C12	1,5.10 ⁻⁴	38	0,13
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C14	1.10 ⁻⁴	36,5	0,19
(Catéchine) ₂ -Acide glutamique-C16	1,9.10 ⁻⁵	35	0,11

Ces valeurs sont inférieures à celle des composés à base de lysine, mais également inférieures à celle des composés à base d'alanine. Les composés de type **III c** possèdent deux têtes polaires, deux catéchines, et une seule chaîne grasse. Ces deux têtes polaires augmentent la solubilité de ces composés dans l'eau ce qui les rend moins tensioactifs que les autres produits. Les composés **15b** ((Cat)₂-AcGlu-C12), **15c** ((Cat)₂-AcGlu-C14) et **15d** ((Cat)₂-AcGlu-C16) sont les trois composés tensioactifs de cette gamme avec des valeurs de tension de surface respectives de 38 mN/m, 36,5 mN/m et 35 mN/m.

Pareil que les composés de type **III a** et **III b**, plus la longueur de la chaîne carbonée augmente, les composés s'auto-assemblent à de faibles concentrations. (Tableau 41).

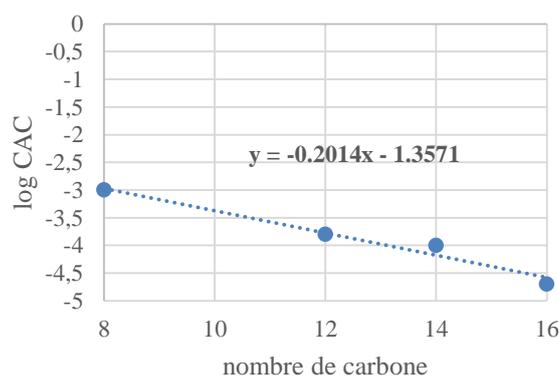


Figure 117. C. CAC en fonction du nombre de carbone des composés de type III c

Qiao *et al.* (2012) ont synthétisé des tensioactifs à base d'acide glutamique avec des acides gras de différentes longueurs de chaîne. Les valeurs de γ sont entre 35 et 28 mN/m [55].

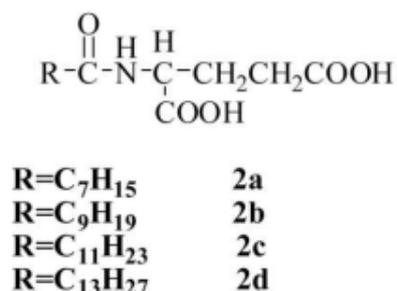


Figure 118. Structure moléculaire des tensioactifs à base d'acide glutamique (Qiao *et al.* 2012)

Tous les composés de type **III** sont tensioactifs et ce pouvoir augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse. L'évolution de la CMC en fonction de la longueur de la chaîne grasse a été tracée pour les composés tri-modulaires à base d'alanine, de lysine et d'acide glutamique. La figure 116 montre que les valeurs de CAC diminuent linéairement avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone des composés de type **III**.

Différents chercheurs ont synthétisés des tensioactifs non-ioniques tels que les dérivés de sucre. El-Sukkary *et al.* ont synthétisé des alkylpolyglucosides (APGC_n) avec différentes longueurs de chaîne grasse. Pour la petite longueur de chaîne (C8, C9, C10) les CMC obtenus sont $1,7 \cdot 10^{-3}$, $1,2 \cdot 10^{-3}$ et $7,8 \cdot 10^{-4}$ M respectivement. Quant aux chaînes plus longues, C12 et C14, les CMC sont moins élevés, $2,9 \cdot 10^{-4}$ M pour le C12 et $2,6 \cdot 10^{-5}$ M pour le C14 [56], [57]. Ces valeurs de CMC ressemblent aux composés tri-modulaires à base d'alanine, par contre les composés à base de lysine possèdent des CAC inférieurs à ceux des APGC_n et donc ils sont plus tensioactifs.

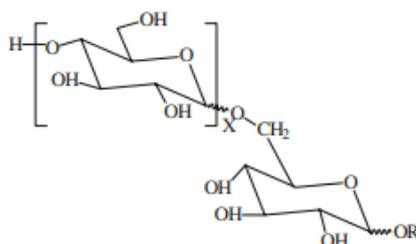


Figure 119. Structure moléculaire des tensioactifs APGC_n (El-sukkary *et al.* 2008, 2009)

Par contre les tensioactifs à base de xylose (AXC_n) ayant des faibles longueurs de chaînes (C6, C8 et C10) synthétisés par Klai *et al.*, les CMC de ses composés ressemblent à celle des composés tri-modulaires à base d'acide glutamique (10^{-4} et 10^{-3} M). Pour les composés avec des chaînes carbonées plus longues, (C12, C16 et C18) la CMC diminue fortement, $2 \cdot 10^{-5}$ M

pour le C12, 3.10^{-8} M pour le C16 et 5.10^{-8} M pour le C18 [58]. Ces valeurs de CMC sont plus faibles que celles de composés tri-modulaires à base d'acide glutamique. En revanche la CMC des AXC_n avec le C12 ressemble à celle des composés à base d'alanine avec le C12 et le C14 mais reste supérieure à celles de tous les composés à base de lysine. C'est les CMC des AXC_n avec le C16 et le C18 qui ressemble à celles des composés tri-modulaires à base de lysine avec l'acide palmitique (C16).

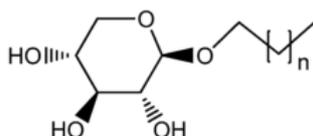


Figure 120. Structure moléculaire des tensioactifs à base de xylose (AXC_n) (Klai *et al.* 2015)

Goddard *et al.* ont synthétisé des esters de polyols avec des acides gras de différentes longueurs de chaîne allant de C6 jusqu'à C18. Les CMC obtenus sont de loin supérieurs que celles de nos composés. Ils ont démontré également que les CMC diminuent plus la longueur de chaîne carbonée augmente, ainsi l'ester de polyols avec l'acide stéarique (C18) possède la CMC la plus faible [59].

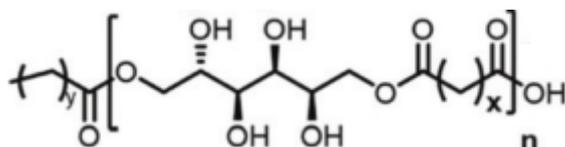


Figure 121. Structure moléculaire des tensioactifs à base de polyols (Goddard *et al.* 2021)

Agach *et al.* ont également synthétisé des esters de polyols tensioactifs et ont démontré que les valeurs de CMC évoluent en fonction de la longueur de la chaîne acyle, plus la longueur de chaîne augmente, plus la CMC est faible [60]. Ce profil est identique à celui que nous avons obtenu.

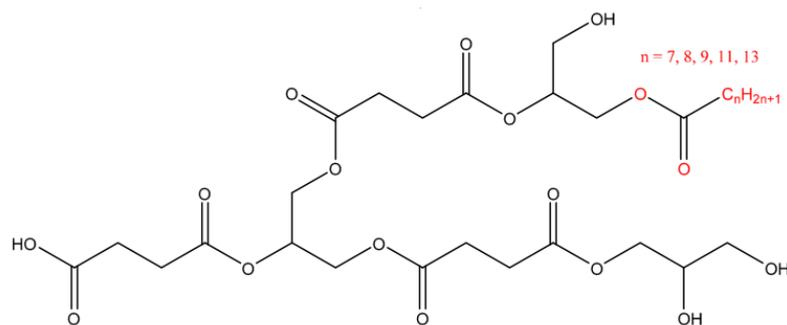


Figure 122. Structure moléculaire des tensioactifs d'acyl poly(glycerol-succinate) (Agach *et al.* 2016)

3.1.1.1. Mesure des tensions superficielles des composés tri-modulaires à base de sucre (composé de type IV)

La tension superficielle des composés tri-modulaires à base de sucre a été mesurée également.

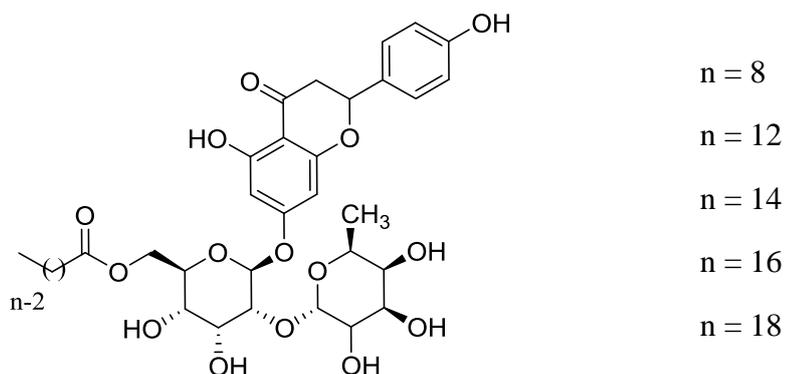


Figure 123. Structure des composés tri-modulaires de type IV de la naringine

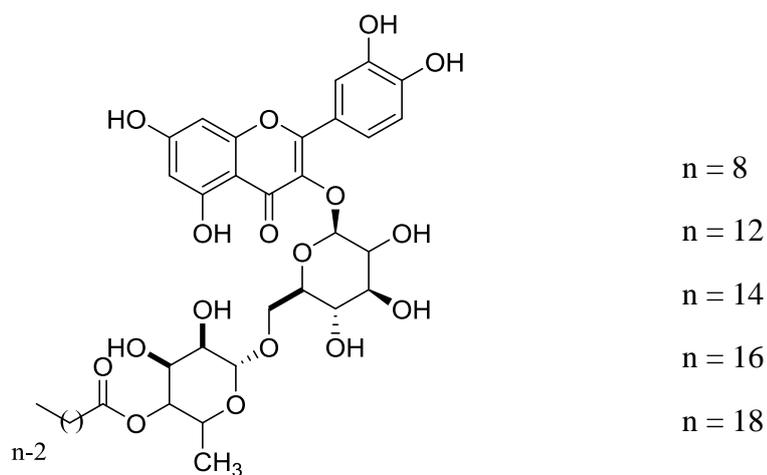


Figure 124. Structure des composés tri-modulaires de type IV de la rutine

Les mesures de tension superficielle des esters de naringine et de rutine ont montré des valeurs tensions superficielles à la CAC (γ) supérieures à 40 mN/m pour la plupart des produits. Les courbes d'évolution de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration des composés tri-modulaires **IV** possédant des valeurs de γ inférieur a 40 N/m en solution aqueuse à 25°C, sont présentées sur la figure 123.

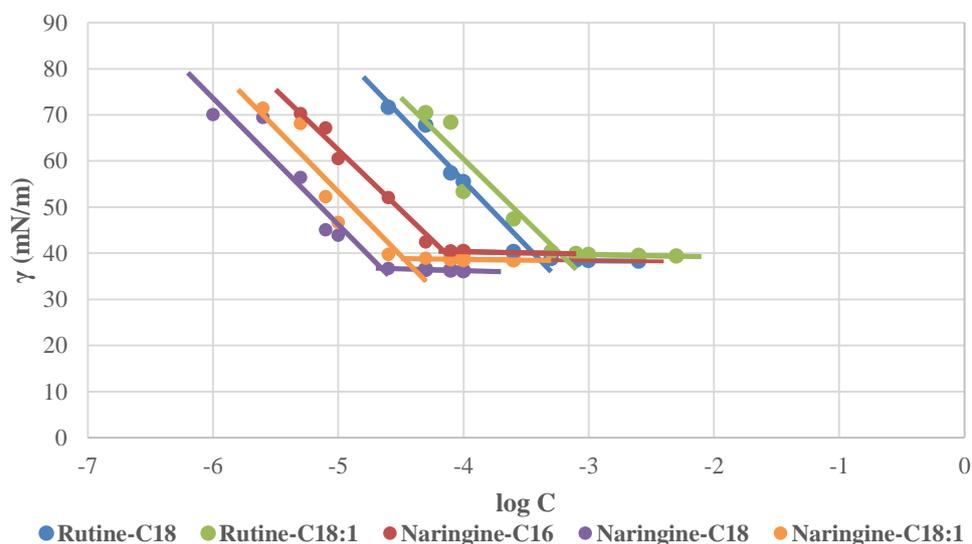


Figure 125. Tension superficielle des composés tri-modulaires de type IV en solution aqueuse à 25°C

Les esters de rutine avec les chaînes grasses de longueur allant de 8 jusqu'à 16 ne confère pas des propriétés tensioactif. La valeur de la tension superficielle est trop élevée, entre 60 et 48 mN/m. En revanche la rutine-C18 semble être le composé le plus tensioactif de cette gamme, 38,5 mN/m, suivi de la rutine avec l'acide oléique, rutine-C18 :1, avec une valeur de tension superficielle de 39 mN/m (tableau 42).

Tableau 43. CAC, tensions superficielles à la CAC (γ) et surface par tête polaire des composés tri-modulaires de type IV en solution aqueuse à 25°C

Composé	CAC (mol/L)	γ (mN/m)	σ (Å^2 /molécule)
Rutine-C18	$5 \cdot 10^{-4}$	38,5	0,175
Rutine-C18 :1	$6 \cdot 10^{-4}$	39	0,20
Naringine-C16	$7,5 \cdot 10^{-5}$	40	0,22
Naringine-C18	$2,5 \cdot 10^{-5}$	36	1,93

Naringine-C18 :1	3.10^{-5}	38	1,91
-------------------------	-------------	----	------

En ce qui concerne la naringine, ses esters ayant des chaînes grasses de longueur inférieure à 16 carbones ne présentent pas des propriétés tensioactives. Pareil comme la rutine, l'ester de naringine avec l'acide stéarique (C18) possède la γ la plus faible (36 mN/m) suivie par la naringine-C18 :1 et la naringine-C16 avec des valeurs de tension superficielle de 38 et 40 mN/m respectives.

Les esters de naringine sont légèrement plus tensioactifs que ceux de la rutine. En revanche les composés tri-modulaire à base de sucre sont de loin moins tensioactifs que les composés tri-modulaire à base d'acide aminé qui avec des longue chaîne grasse, leurs valeurs de tension superficielle à la CAC sont inférieures à 30 mN/m. Cela peut être expliqué par la présence de deux groupement sucre chez la rutine et la naringine en plus des groupements hydroxyles de ses deux flavonoïdes, qui rendent les esters synthétisés plus hydrophiles et donc moins tensioactifs.

3.1.2. Conclusions

Les composés tri-modulaires à base d'acide aminé ainsi qu'à base de sucre ont une certaine solubilité dans l'eau, avec une solubilité plus importante pour les composés à base de sucre que celle des composés à base d'acide aminé.

La détermination du coefficient de partition par HPLC des composés tri-modulaires à base d'alanine a montré que le greffage du bi-module hydrophobe (acide aminé – acide gras) sur la catéchine augmente l'hydrophobie de cette dernière, et cette hydrophobie augmente l'allongement de la chaîne hydrocarbonée.

Tous les composés tri-modulaires à base d'acide aminé (composés de type III), sont tensioactifs. Dans chaque série de ces composés, le produit avec la plus longue chaîne grasse possède le pouvoir tensioactif le plus grand. La CAC dépend de la longueur de la chaîne, plus celle-ci est importante, plus l'effet hydrophobe se fait sentir et plus les molécules s'organisent à faible concentration.

Les composés à base de lysine, sont les plus tensioactifs, suivi des composés à base d'alanine et finalement les composés à base d'acide glutamique. Cela s'explique par la présence de deux chaînes grasses greffées sur la lysine. Les dérivés à base de lysine forment

potentiellement des vésicules. Ces propriétés seront à caractériser par d'autres techniques, telles que la microscopie. Dans le cas des composés dérivés de l'acide glutamique, la présence de deux têtes polaires, deux catéchines, diminuent légèrement le pouvoir tensioactifs.

Les composés à base de sucres, ne sont pas tous tensioactifs. Les produits avec des chaînes grasses inférieures à 18 pour la rutine et inférieure à 16 pour la naringine possèdent des valeurs de tension superficielle très élevée. C'est avec l'acide stéarique, C18, que les esters de naringine et rutine possèdent un pouvoir tensioactif acceptable. Ces valeurs de γ trop élevées peuvent s'expliquer par le fait de la présence de deux sucres sur la naringine et la rutine et donc rendent ces molécules très hydrophiles.

4. Propriétés antiprolifératives

In vitro, les flavonoïdes sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Ainsi des études ont montré que les esters de flavonoïdes peuvent être également des agents antiprolifératifs [61]–[63].

Nous avons choisi les molécules suivantes que nous avons synthétisées : catéchine-alanine-C8, catéchine-alanine-C12, catéchine-alanine-C14, catéchine-lysine-C8, catéchine-lysine-C12, catéchine-lysine-C14, catéchine-lysine-C16, catéchine-acide glutamique-C14, rutine-C12, rutine-C14, rutine-C16, rutine-C18, naringine-C12, naringine-C14, naringine-C16, naringine-C18, naringine-C18 :1, ainsi que la catéchine, la rutine et la naringine. Après purification, leurs activités antiprolifératives, après 72h d'incubation, ont été évaluées par test MTT sur des cellules Caco-2, qui est une lignée cellulaire immortalisée de cellules d'adénocarcinome colorectal humain.

En premier lieu tous les composés cités ci-dessus ont été testés à une concentration de 50 μM , une concentration choisie en se basant sur des travaux rapportés dans la littérature [5].

Tout d'abord la catéchine et les composés tri-modulaires de type III (composés tri-modulaire à base d'acide aminés) ont été testés. A une concentration de 50 μM , le pourcentage de viabilité des cellules Caco 2 est de 79% se référant à la croissance des cellules Caco2 sans catéchine. A cette même concentration, ce pourcentage de viabilité cellulaire varie entre 20 et 70 % pour les composés tri-modulaires à base de lysine et d'acide glutamique. Quant aux composés à base de lysine, le pourcentage de viabilité des cellules Caco 2 est similaire à celui de la catéchine (Figure 124). Ainsi, à une concentration de 50 μM , les composés tri-modulaires à base de lysine et d'acide glutamique testés semblent présenter une activité antiproliférative supérieure à celle de la catéchine.

Pour la rutine, à une concentration de 50 μM , le pourcentage de viabilité des cellules Caco2 est de 76%. Donc à cette concentration, son activité antiproliférative est faible. En ce qui concerne ses esters (composés tri-modulaires à base de sucre), à cette même concentration, le pourcentage de viabilité des cellules est supérieur à 50%, mais c'est avec les longueurs de chaîne C12 et C14 que ce pourcentage atteint 50%. Ainsi l' IC_{50} pour la rutine et ses esters doit être supérieure à 50 μM (Figure 125).

En ce qui concerne la naringine, 71 % des cellules Caco 2 restent vivantes à 50 μM , après 72h de culture. En revanche ce pourcentage diminue avec ses esters surtout avec la longueur de

chaîne C14, suivie par C16 et C18 où le pourcentage de viabilité des cellules cancéreuses est de 25, 46 et 47 % respectivement. Ainsi, les esters de naringine semblent avoir une activité antiproliférative supérieure à celle de la naringine (Figure 125).

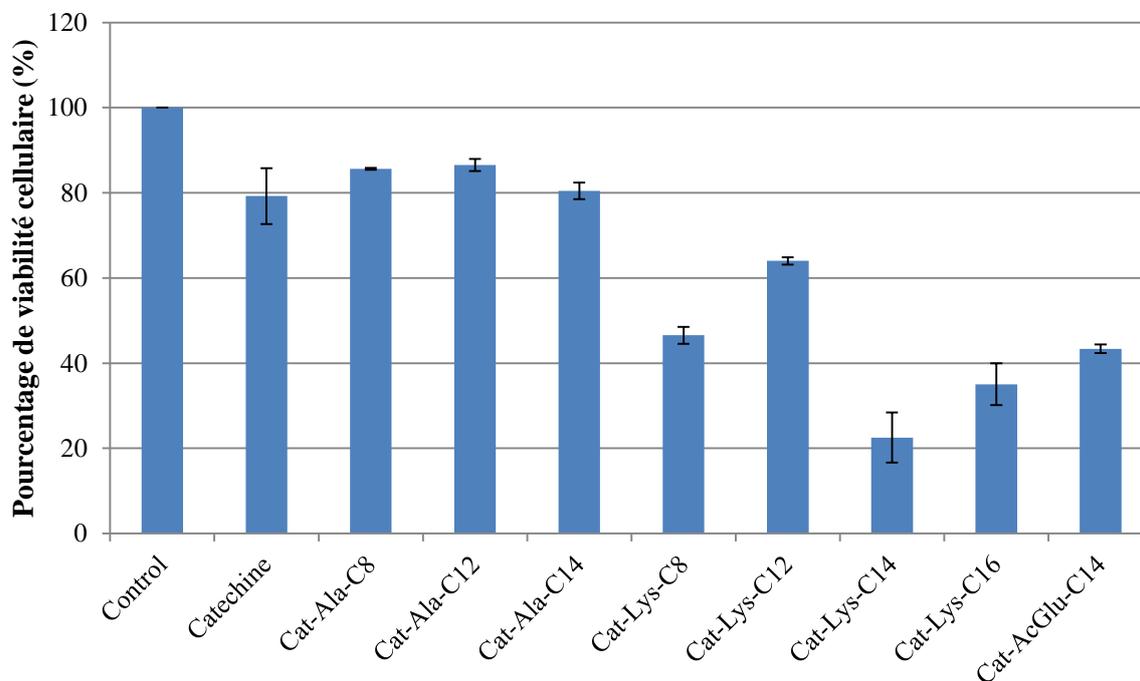


Figure 126. Pourcentage de viabilité des cellules CaCo2 en présence de la catéchine et des composés tri-modulaires à base d'acide-amino à 50 µM

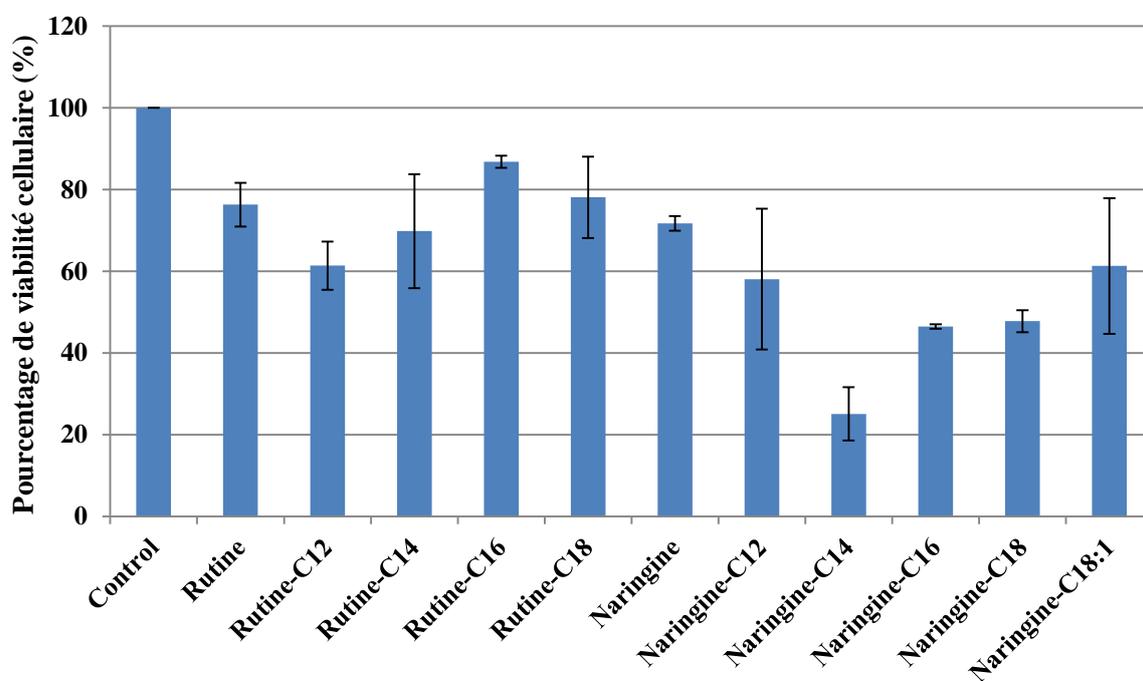


Figure 127. Pourcentage de viabilité des cellules CaCo2 en présence de la rutine, de la naringine ainsi que de leurs esters (composés tri-modulaires à base de sucre) à 50 µM

Après les premiers tests nous avons choisi les molécules pour lesquelles le pourcentage de viabilité était inférieur à 50%, afin de préciser leur activité antiproliférative avec les concentrations suivantes, 10, 25, 50 et 70 μM afin de pouvoir déterminer leur IC_{50} . Les molécules choisies étaient les suivantes : catéchine-lysine-C8, catéchine-lysine-C12, catéchine-lysine-C14, catéchine-lysine-C16, catéchine-acide glutamique-C14, naringine-C14, naringine-C16 et naringine-C18, ainsi que la catéchine et la naringine.

Pour la catéchine et la naringine, leurs IC_{50} sont supérieures à 75 μM puisqu'à cette concentration le pourcentage de viabilité cellulaire est supérieur à 50%, elle est de 70% pour la catéchine et 67% pour la naringine. Quant aux composés suivants, catechine-lysine-C8, catechine-lysine-C14, catechine-lysine-C16, naringine-C14, naringine-C16 et naringine-C18, l' IC_{50} est comprise entre 25 et 50 μM puisqu'entre ces deux concentrations 50% des cellules cancéreuses Caco2 restent vivantes. En ce qui concerne la catéchine-lysine-C12 sa valeur d' IC_{50} se trouve entre 50 et 75 μM .

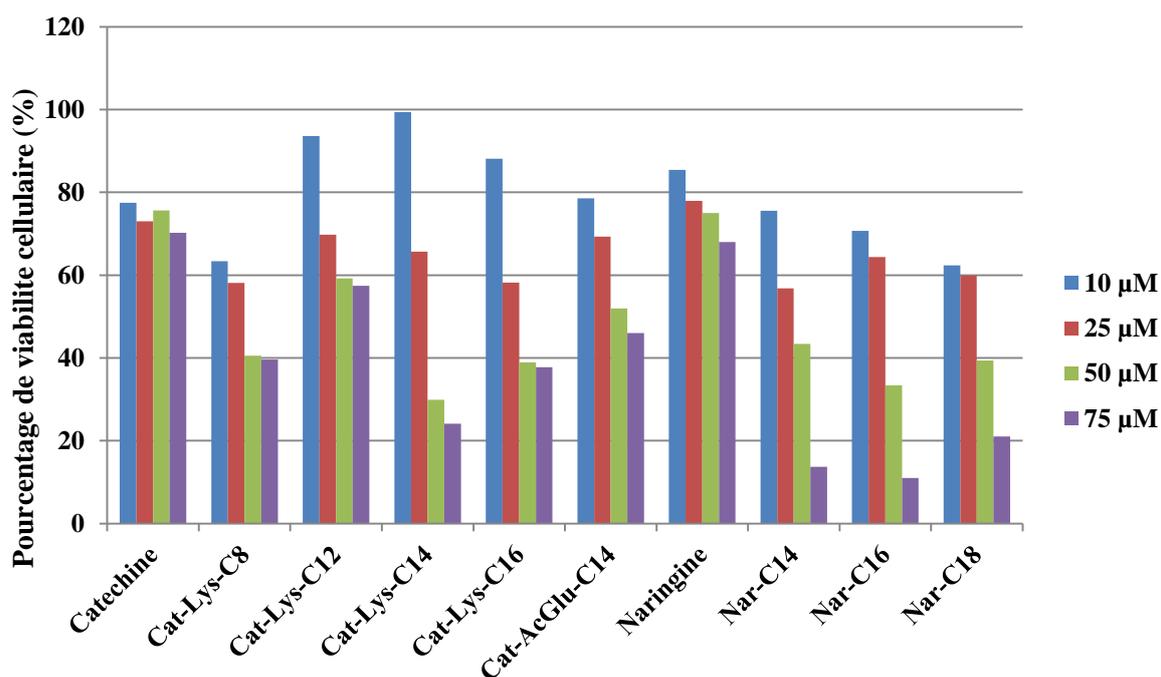


Figure 128. Pourcentage de viabilité des cellules CaCo2 en présence de la catechine, la naringine ainsi que leurs esters (composés tri-modulaires à base d'acide-amino et de sucre) à 10, 25, 50 et 75 μM

Afin de bien cibler l' IC_{50} des composés testés précédemment, une gamme plus élargie de concentrations a été réalisée. Des concentrations de 75, 80, 85 et 90 μM ont été réalisées pour la catéchine et la naringine, des concentrations de 40, 50, 75 et 80 μM pour la catéchine-

lysine-C12 et des concentrations de 25, 30, 40 et 50 μM pour les autres composés (Figure 127).

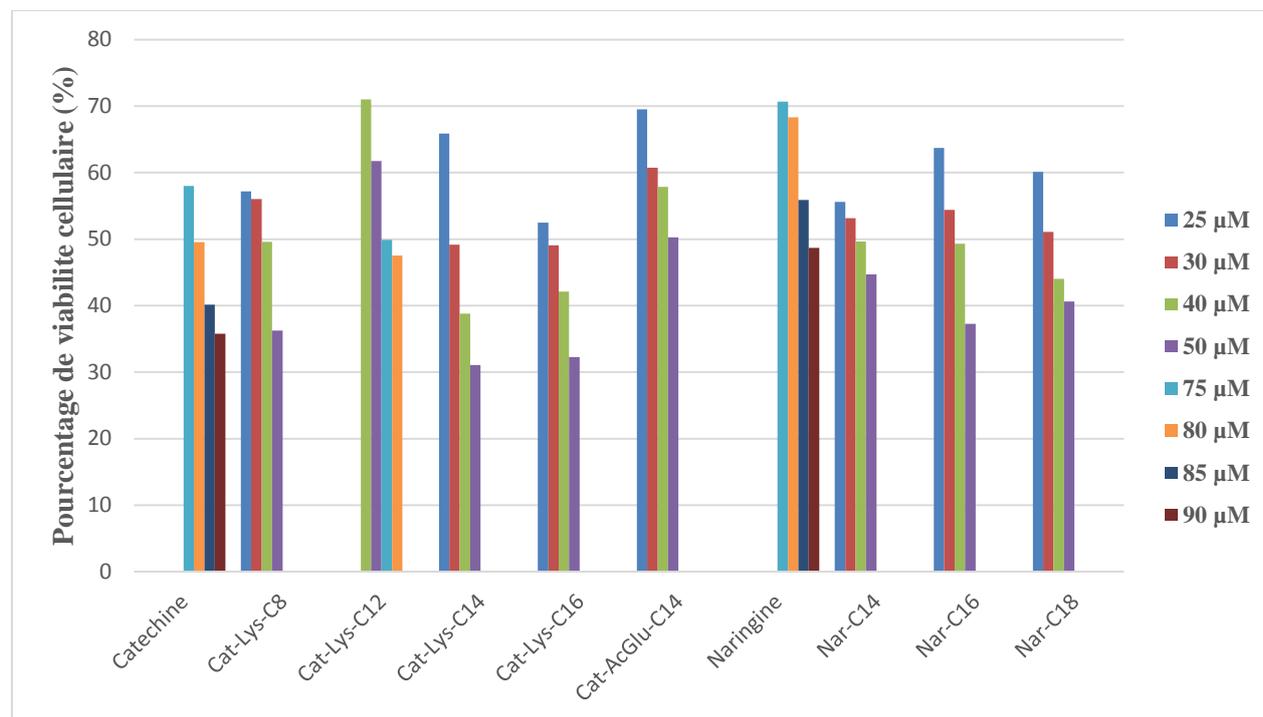


Figure 129. Pourcentage de viabilité des cellules CaCo2 en présence de la catéchine, de la naringine ainsi que de leurs esters (composés tri-modulaires à base d'acide aminé et de sucre) à 10, 25, 30, 40, 50, 75, 80, 85 et 90 μM

Tableau 44. Valeurs des IC₅₀ de la catéchine, la naringine et leurs esters (composés tri-modulaires à base d'acide-amino et de sucre)

Composés	IC ₅₀ (μM)
Catéchine	81
Catéchine-Lysine-C8	40
Catéchine-Lysine-C12	75
Catéchine-Lysine-C14	32
Catéchine-Lysine-C16	33
Catéchine-Acide Glutamique-C14	49
Naringine	92

Naringine-C14	41
Naringine-C16	42
Naringine-C18	48

Les résultats de l'activité antiproliférative de la catéchine, de la naringine et de leurs esters ont montré que l'acylation de ces molécules accroît d'une façon significative l'activité de ces deux flavonoïdes, quel que soit l'acide aminé ou le nombre de carbone de la chaîne grasse (Tableau 43). Aucune relation n'a pu toutefois être établie entre la structure des esters et leur activité. Cette absence de corrélation peut s'expliquer par le fait que la lipophilie d'une molécule et donc sa capacité à être transférée à travers les membranes cellulaires, n'est pas un critère suffisant pour justifier son activité antiproliférative. D'autres facteurs doivent être pris en compte tels que l'affinité de la molécule avec les récepteurs membranaires. Hadj Salem *et al.* (2010) ont obtenu des résultats similaires pour l'activité antiproliférative de l'isoquercitrine et de ses esters.

5. Références

- [1] T. Anggraini, Neswati, R. F. Nanda, and D. Syukri, "Effect of Processing on Green and Black Tea DPPH Radical Scavenging Activity, IC50 Value, Total Polyphenols, Catechin and Epigallocatechin Gallate content," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 709, no. 1, p. 012017, Mar. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/709/1/012017.
- [2] D. Kumar, R. Kumar, R. Ramajayam, K. Woo Lee, and D.-S. Shin, "Synthesis, Antioxidant and Molecular Docking Studies of (-)-Catechin Derivatives," *J. Korean Chem. Soc.*, vol. 65, no. 2, 2021, doi: 10.5012/jkcs.2021.65.2.106.
- [3] U. G. Spizzirri *et al.*, "Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1923–1930, Jul. 2009, doi: 10.1021/BM900325T/ASSET/IMAGES/BM900325T.SOCIAL.JPEG_V03.
- [4] M. M. Camino Feltes *et al.*, "Enzymatic production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from fish oil in a solvent-free system," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 6, pp. 1057–1065, Jun. 2012, doi: 10.1007/S11746-011-1998-2/FIGURES/2.
- [5] J. H. Salem *et al.*, "Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 3, pp. 382–389, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2009.10.012.
- [6] M. C. Figueroa-Espinoza and P. Villeneuve, "Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 8, pp. 2779–2787, Apr. 2005, doi: 10.1021/JF0484273.
- [7] R. Jagadeeshwar Rao, A. K. Tiwari, U. S. Kumar, S. V. Reddy, A. Z. Ali, and J. M. Rao, "Novel 3-O-acyl mesquitol analogues as free-Radical scavengers and enzyme inhibitors: synthesis, biological evaluation and structure–activity relationship," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 13, no. 16, pp. 2777–2780, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0960-894X(03)00494-3.
- [8] S. A. B. E. Van Acker *et al.*, "A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 9, no. 8, pp. 1305–1312, 1996, doi: 10.1021/TX9600964/SUPPL_FILE/TX1305.PDF.

- [9] S. A. B. E. Van Acker *et al.*, “Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 331–342, Jan. 1996, doi: 10.1016/0891-5849(95)02047-0.
- [10] N. Xu, G. Chen, and H. Liu, “Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation,” *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.*, vol. 22, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22122066.
- [11] H. Guo, Y. Kouzuma, and M. Yonekura, “Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein,” *Food Chem.*, vol. 113, no. 1, pp. 238–245, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2008.06.081.
- [12] P. Xu, Y. Zheng, X. Zhu, S. Li, and C. Zhou, “L-lysine and L-arginine inhibit the oxidation of lipids and proteins of emulsion sausage by chelating iron ion and scavenging radical,” *Asian-Australas J Anim Sci*, vol. 31, no. 6, pp. 905–913, 2018, doi: 10.5713/ajas.17.0617.
- [13] N. Grosser, S. Oberle, G. Berndt, K. Erdmann, A. Hemmerle, and H. Schröder, “Antioxidant action of L-alanine: Heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 314, no. 2, pp. 351–355, Feb. 2004, doi: 10.1016/J.BBRC.2003.12.089.
- [14] B.-M. Lue, N. S. Nielsen, C. Jacobsen, L. Hellgren, Z. Guo, and X. Xu, “Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays,” *Food Chem.*, vol. 123, pp. 221–230, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.009.
- [15] M. Palma, P. Robert, F. Holgado, J. Velasco, and G. Márquez-Ruiz, “Antioxidant Activity and Kinetics Studies of Quercetin, Epicatechin and Naringenin in Bulk Methyl Linoleate,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 94, no. 9, pp. 1189–1196, Sep. 2017, doi: 10.1007/S11746-017-3017-8.
- [16] Y. Hanasaki, S. Ogawa, and S. Fukui, “The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 16, no. 6, pp. 845–850, Jun. 1994, doi: 10.1016/0891-5849(94)90202-X.
- [17] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, “STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS,” *Free*

Radic. Biol. Med., vol. 20, no. 7, pp. 933–956, 1996.

- [18] W. Cai, Y. Chen, L. Xie, H. Zhang, and C. Hou, “Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 238, no. 1, pp. 121–128, Jan. 2014, doi: 10.1007/S00217-013-2091-X/TABLES/4.
- [19] P. Trouillas, C. Fagnère, R. Lazzaroni, C. Calliste, A. Marfak, and J. L. Duroux, “A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity,” *Food Chem.*, vol. 88, no. 4, pp. 571–582, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2004.02.009.
- [20] H. Y. Zhang and H. F. Ji, “How vitamin E scavenges DPPH radicals in polar protic media,” *New J. Chem.*, vol. 30, no. 4, pp. 503–504, Apr. 2006, doi: 10.1039/B600025H.
- [21] M. Lucarini, P. Pedrielli, G. F. Pedulli, S. Cabiddu, and C. Fattuoni, “Bond dissociation energies of O-H bonds in substituted phenols from equilibration studies,” *J. Org. Chem.*, vol. 61, no. 26, pp. 9259–9263, Dec. 1996, doi: 10.1021/JO961039I/ASSET/IMAGES/JO961039I.SOCIAL.JPEG_V03.
- [22] L. Zhu, J. Chen, J. Tan, X. Liu, and B. Wang, “Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free Radical Scavenging and DNA Oxidative Damage Protection Activities and Analysis of Bioactivity-Structure Relationship Based on Molecular and Electronic Structures,” *Mol. 2017, Vol. 22, Page 195*, vol. 22, no. 3, p. 195, Feb. 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22030195.
- [23] A. G. Veiko, E. A. Lapshina, and I. B. Zavodnik, “Comparative analysis of molecular properties and reactions with oxidants for quercetin, catechin, and naringenin,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 476, no. 12, pp. 4287–4299, Dec. 2021, doi: 10.1007/S11010-021-04243-W.
- [24] L. Wang, Q. Yang, Y. Li, S. Wang, F. Yang, and X. Zhao, “How the functional group substitution and solvent effects affect the antioxidant activity of (+)-catechin?,” *J. Mol. Liq.*, vol. 327, p. 114818, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2020.114818.
- [25] S. Anitha, S. Krishnan, K. Senthilkumar, and V. Sasirekha, “Theoretical investigation on the structure and antioxidant activity of (+) catechin and (–) epicatechin—a

- comparative study,” *Mol. Phys.*, vol. 118, no. 17, p. 1745917, Sep. 2020, doi: 10.1080/00268976.2020.1745917/SUPPL_FILE/TMPH_A_1745917_SM7648.DOCX.
- [26] M. Ghiasi and M. M. Heravi, “Quantum mechanical study of antioxidative ability and antioxidative mechanism of rutin (vitamin P) in solution,” *Carbohydr. Res.*, vol. 346, no. 6, pp. 739–744, May 2011, doi: 10.1016/J.CARRES.2011.01.021.
- [27] L. A. Tavadyan and S. H. Minasyan, “Synergistic and antagonistic co-antioxidant effects of flavonoids with trolox or ascorbic acid in a binary mixture,” *J. Chem. Sci.*, vol. 131, p. 40, 2019, doi: 10.1007/s12039-019-1618-5.
- [28] P. K. Chattaraj and B. Maiti, “HSAB principle applied to the time evolution of chemical reactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 9, pp. 2705–2710, Mar. 2003, doi: 10.1021/JA0276063/SUPPL_FILE/JA0276063SI20021212_125242.PDF.
- [29] R. G. Pearson, “Chemical Hardness: Applications from Molecules to Solids,” *Wiley–VHC*, 1997.
- [30] R. G. Parr and R. G. Pearson, “Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, no. 26, pp. 7512–7516, 2002, doi: 10.1021/JA00364A005.
- [31] “Chemical Hardness,” *Chem. Hardness*, 1993, doi: 10.1007/BFB0036795.
- [32] R. G. Parr and Y. Weitao, “Density-Functional Theory of Atoms and Molecules,” *Density-Functional Theory Atoms Mol.*, Jan. 1995, doi: 10.1093/OSO/9780195092769.001.0001.
- [33] A. Vektariene, G. Vektaris, and J. Svoboda, “A theoretical approach to the nucleophilic behavior of benzofused thieno[3,2-b]furans using DFT and HF based reactivity descriptors,” *Arkivoc*, vol. 2009, no. 7, pp. 311–329, May 2009, doi: 10.3998/ARK.5550190.0010.730.
- [34] J. Foresman, “Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods,” Accessed: Apr. 13, 2022. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/243763573>.
- [35] R. D. Vargas-Sánchez, A. M. Mendoza-Wilson, R. R. Balandrán-Quintana, G. R. Torrescano-Urrutia, and A. Sánchez-Escalante, “Study of the molecular structure and

- chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations,” *Comput. Theor. Chem.*, vol. 1058, pp. 21–27, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.COMPTC.2015.01.014.
- [36] C. A. Mebi, “DFT study on structure, electronic properties, and reactivity of cis-isomers of [(NC₅H₄-S)₂Fe(CO)₂],” *J. Chem. Sci.* 2011 1235, vol. 123, no. 5, pp. 727–731, Oct. 2011, doi: 10.1007/S12039-011-0131-2.
- [37] J. Wang *et al.*, “Synthesis, antioxidant activity, and density functional theory study of catechin derivatives,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 85, pp. 54136–54141, Nov. 2017, doi: 10.1039/C7RA11496F.
- [38] C. Hansch and T. Fujita, “ ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 86, no. 8, pp. 1616–1626, Apr. 1964, doi: 10.1021/JA01062A035/ASSET/JA01062A035.FP.PNG_V03.
- [39] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, and R. M. Muir, “Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients,” *Nat.* 1962 1944824, vol. 194, no. 4824, pp. 178–180, 1962, doi: 10.1038/194178b0.
- [40] R. Collander, “The Permeability of Nitella Cells to Non- Electrolytes,” *Physiol. Plant.*, vol. 7, no. 3, pp. 420–445, 1954, doi: 10.1111/J.1399-3054.1954.TB07589.X.
- [41] C. Hansch, A. R. Steward, S. M. Anderson, and D. Bentley, “The parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics,” *J. Med. Chem.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Jan. 1968, doi: 10.1021/JM00307A001.
- [42] M. Rosselin *et al.*, “Divalent Amino-Acid-Based Amphiphilic Antioxidants: Synthesis, Self-Assembling Properties, and Biological Evaluation,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 3, pp. 772–781, Mar. 2016, doi: 10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.6B00002/ASSET/IMAGES/LARGE/BC-2016-00002U_0003.JPEG.
- [43] G. Durand *et al.*, “Spin trapping and cytoprotective properties of fluorinated amphiphilic carrier conjugates of cyclic versus linear nitrones,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 22, no. 9, pp. 1570–1581, Sep. 2009, doi: 10.1021/TX900114V.
- [44] G. Durand, F. Choteau, R. A. Proszak, A. Rockenbauer, F. A. Villamena, and B. Pucci,

- “Synthesis, physical-chemical and biological properties of amphiphilic amino acid conjugates of nitroxides,” *New J. Chem.*, vol. 34, no. 9, pp. 1909–1920, Sep. 2010, doi: 10.1039/C0NJ00024H.
- [45] L. Wilhelmy, “Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers,” *Ann. Phys.*, vol. 195, no. 6, pp. 177–217, Jan. 1863, doi: 10.1002/ANDP.18631950602.
- [46] “The collected works / of J. W. Gibbs,... | Gallica.” <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k95192s.image> (accessed Mar. 27, 2022).
- [47] S. A. Mahmoud, D. A. Ismail, and E. A. Ghazy, “Surface Properties and Biological Activity of Select Cationic Surfactants,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 10, no. 4, pp. 191–194, Dec. 2007, doi: 10.1007/S11743-007-1018-6.
- [48] M. Bougueroua, R. Mousli, and A. Tazerouti, “Synthesis and Physicochemical Properties of Alanine-Based Surfactants,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 19, no. 6, pp. 1121–1131, Nov. 2016, doi: 10.1007/S11743-016-1878-8.
- [49] R. Mousli and A. Tazerouti, “Synthesis and some surface properties of glycine-based surfactants,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 14, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2011, doi: 10.1007/S11743-010-1210-Y.
- [50] M. R. Infante *et al.*, “Amino acid-based surfactants,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 7, no. 6–7, pp. 583–592, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.CRCL.2004.02.009.
- [51] T.-T. Shi, Z. Fang, W.-B. Zeng, Z. Yang, W. He, and K. Guo, “Design, synthesis and properties investigation of N a-acylation lysine based derivatives †,” *RSC Adv.*, 2019, doi: 10.1039/c9ra00213h.
- [52] R. O. Brito, I. S. Oliveira, M. J. Araújo, and E. F. Marques, “Morphology, thermal behavior, and stability of self-assembled supramolecular tubules from lysine-based surfactants,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 32, pp. 9400–9411, Aug. 2013, doi: 10.1021/JP400127K/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP-2013-00127K_0014.GIF.
- [53] I. S. Oliveira, R. L. Machado, M. J. Araújo, A. C. Gomes, and E. F. Marques, “Stimuli-Sensitive Self-Assembled Tubules Based on Lysine-Derived Surfactants for Delivery of Antimicrobial Proteins,” *Chem. – A Eur. J.*, vol. 27, no. 2, pp. 692–704, Jan. 2021,

doi: 10.1002/CHEM.202003320.

- [54] R. Infante, J. Seguer, A. Pinazo, M. P. Vinardell, and P. Vinardell, "Synthesis and properties of asymmetrical nonionic double chain surfactants from lysine," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 2, pp. 621–642, 1999, doi: 10.1080/01932699908943811.
- [55] W. Qiao, Z. Zheng, H. Peng, and L. Shi, "Synthesis and properties of three series amino acid surfactants," *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 49, no. 2, pp. 161–166, 2012, doi: 10.3139/113.110179.
- [56] M. M. A. El-Sukkar, N. A. Syed, I. Aiad, S. M. Helmy, and W. I. M. El-Azab, "Aqueous solution properties, biodegradability, and antimicrobial activity of some alkylpolyglycosides surfactants," *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 46, no. 5, pp. 311–316, 2009, doi: 10.3139/113.110037.
- [57] M. M. A. El-Sukkary, N. A. Syed, I. Aiad, and W. I. M. El-Azab, "Synthesis and characterization of some alkyl polyglycosides surfactants," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 11, no. 2, pp. 129–137, Jul. 2008, doi: 10.1007/S11743-008-1063-9.
- [58] N. Klai, C. Bidjou-Haiour, and S. Bouquillon, "D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 18, no. 6, pp. 599–606, 2015, doi: 10.1016/J.CRCL.2014.11.007.
- [59] A. R. Goddard *et al.*, "Synthesis of water-soluble surfactants using catalysed condensation polymerisation in green reaction media," *Polym. Chem.*, vol. 12, no. 20, pp. 2992–3003, May 2021, doi: 10.1039/D1PY00415H.
- [60] M. Agach, S. Marinkovic, B. Estrine, and V. Nardello-Rataj, "Acyl Poly(Glycerol-Succinic Acid) Oligoesters: Synthesis, Physicochemical and Functional Properties, and Biodegradability," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 19, no. 5, pp. 933–941, Sep. 2016, doi: 10.1007/S11743-016-1853-4.
- [61] H. Liu, W. Jiang, and M. Xie, "Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs," *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, vol. 5, no. 2, pp. 152–164, Mar. 2010, doi: 10.2174/157489210790936261.
- [62] S. V. G. Nair, Ziaullah, and H. P. Vasantha Rupasinghe, "Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene

expression,” *PLoS One*, vol. 9, no. 9, Sep. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0107149.

- [63] M. E. M. B. De Araújo, Y. E. M. Franco, M. C. F. Messias, G. B. Longato, J. A. Pamphile, and P. D. O. Carvalho, “Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits,” *Planta Med.*, vol. 83, no. 1–2, pp. 7–22, Jan. 2017, doi: 10.1055/S-0042-118883.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la conception de nouveaux composés multifonctionnels de type poly phénolique biosourcés amphiphiles à partir de molécules naturelles provenant des extractibles de l'industrie de première transformation du bois pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques. Notre choix s'est porté sur les flavonoïdes, plus précisément la catéchine, la rutine et la naringine, qui sont des molécules intéressantes en raison de leurs nombreuses propriétés et activités biologiques. Cependant, leur utilisation reste limitée par leur faible solubilité dans de nombreux milieux, et leur stabilité et biodisponibilité insuffisantes. Ces limitations peuvent être contournées par la modification de leur structure, et notamment le greffage d'entités de différentes natures. Cette approche vise en outre l'introduction de nouvelles fonctionnalités dans l'optique de générer de la multifonctionnalité.

Les travaux ont porté sur la fonctionnalisation de composés accessibles et abondants dans le but d'obtenir des composés multifonctionnels très recherchés à l'échelle industrielle. La fonctionnalisation d'un flavonoïde aglycone, la catéchine, et de deux flavonoïdes glycosylés, la rutine et la naringine, a été étudiée. Ces composés ont été choisis d'une part en raison de leur accessibilité et d'autre part en raison de leurs propriétés antioxydantes et de leur structure aromatique permettant de penser que ces molécules ont une forte propension à l'auto-assemblage. Les modifications structurales envisagées présentent plusieurs intérêts. Il s'agit en effet, d'une part, d'exacerber leurs activités biologiques par la modulation de leur balance hydrophile / hydrophobe, notamment pour faciliter leur passage à travers les barrières biologiques et d'autre part, de faciliter leur formulation en leur apportant des propriétés d'auto-assemblage.

La fonctionnalisation a été envisagée selon deux voies : l'hémisynthèse chimique et l'hémisynthèse enzymatique. Les produits visés sont des composés multimodulaires aux fonctionnalités multiples.

La voie chimique nous a permis d'accéder à des composés bi-modulaires de type I et de type II, obtenus par estérification classique entre un acide gras et un groupement hydroxyle aliphatique ou un groupement phénolique de la catéchine, respectivement. L'estérification d'une fonction phénolique de la catéchine a pu être réalisée en une seule étape grâce à la régiosélectivité de la réaction qui favorise l'acylation des hydroxyles phénoliques qui sont plus acides que l'hydroxyle aliphatique. L'estérification des groupements phénoliques conduit à un mélange de deux mono-esters, qui constituent des régioisomères dont les proportions sont de 70/30 pour l'ester en position 4' et l'ester en position 3', respectivement. Ces

résultats expérimentaux sont cohérents avec ceux issus des calculs de modélisation moléculaire qui montrent une réactivité importante des groupements hydroxyles portés par le noyau catéchol, et plus précisément une réactivité de l'hydroxyle en position 4' supérieure à celle de l'hydroxyle en position 3'. L'acylation de l'hydroxyle aliphatique nécessite en revanche des étapes de protection / déprotection antérieures et postérieures à l'étape d'estérification à proprement parlé.

Par ailleurs, des composés tri-modulaires ont été produits par hémisynthèse chimique en associant la catéchine à différents acides aminés, ainsi que des acides gras de longueur de chaîne variable. Trois structures tri-modulaires ont ainsi été synthétisées, afin d'obtenir différents types de composés amphiphiles, tels que des composés amphiphiles conventionnels, ou geminis, ou encore bicaténaires. Les acides aminés ont été choisis, soit en tant que modèles, soit en raison de leur accessibilité comme la lysine, sous-produit de l'industrie sucrière ou encore l'acide glutamique, présent dans de nombreuses protéines végétales et animales.

Nous avons synthétisé par voie enzymatique des composés tri-modulaires associant une entité phénolique, une entité glycosidique et une chaîne grasse, en menant des réactions d'acylation de la rutine et de la naringine en présence de la lipase B de *Candida antarctica*. Des synthèses analogues ont également été envisagées avec des flavonoïdes aglycones dans le but d'obtenir des dérivés bi-modulaires associant une entité phénolique et une chaîne grasse. Les études cinétiques menées dans le cadre de ces synthèses nous ont permis de formuler les conclusions suivantes :

- Les flavonoïdes aglycones comme la quercétine peuvent être acylés en présence de la lipase de *Burkholderia cepacia* ; aucun produit n'est obtenu en présence de la lipase B de *Candida antarctica*.
- Des taux de conversions élevés ont été obtenus lors de l'acylation de la quercétine avec les donneurs d'acyle de type esters de vinyle, en présence de la lipase B de *Candida antarctica*. Ces résultats s'expliquent en grande partie par la réactivité élevée de ces donneurs d'acyle ; en effet, l'acylation par ces substrats a lieu même en l'absence d'enzyme, avec des rendements toutefois inférieurs à ceux obtenus en présence d'enzyme.
- Dans le cas des flavonoïdes glycosylés, quels que soient les ratios molaires flavonoïde : donneur d'acyle et le mode de conduite du procédé (batch ou fed-batch),

un produit unique est obtenu avec la rutine et la naringine, correspondant à un mono-ester de flavonoïde. Des taux de conversion du flavonoïde proches de 50 % ont été obtenus à l'équilibre avec un ratio molaire de 1 : 5. L'alimentation du réacteur en flavonoïde ou en acide gras n'a pas permis d'améliorer ces résultats.

- La conduite de la réaction à reflux avec piégeage en continu de l'eau produite sur tamis moléculaire a permis d'améliorer les performances. Dans ces conditions, des rendements de 87 % et 77 % pour la naringine et la rutine respectivement, ce qui constitue une amélioration significative par rapport aux rendements obtenus à l'issue d'un simple séchage des réactifs et du solvant avant synthèse. L'élimination de l'eau du milieu réactionnel apparaît donc comme un levier très intéressant d'amélioration des performances de ces réactions d'estérification.
- Les taux de conversion de la naringine et de la rutine lors de leur acylation augmentent avec l'augmentation de la longueur de chaîne du donneur d'acyle. Toutefois, pour des longueurs de chaînes supérieures à 14 atomes de carbones, ces taux de conversion diminuent légèrement. De plus, l'utilisation d'un acide gras insaturé en tant que donneur d'acyle conduit à une baisse des rendements.
- L'acylation de la rutine et la naringine catalysée par CALB, en milieu fondu et avec élimination en continu de l'eau nous a permis d'obtenir des produits de type mono-ester, di-ester, tri-ester et tetra-ester. Les proportions relatives de ces différents produits varient au cours du temps, tandis que le taux de conversion du flavonoïde se stabilise quant à lui après 8 h de réaction. Au vu des cinétiques obtenues, il paraît envisageable d'arrêter la réaction au moment où le produit désiré est majoritaire dans le milieu : 8 h pour le mono-ester, 24 h pour le di-ester, 72 h pour le tri-ester. Le tetra-ester reste minoritaire dans ces conditions, quel que soit le temps réactionnel.
- L'acylation de la rutine et de la naringine catalysée par CALB est régiosélective. Le greffage de l'entité acyle s'effectue sur l'hydroxyle en position 4''' de la rutine et majoritairement au niveau de l'hydroxyle primaire en position 6'' de la naringine. Aucune acylation des fonctions phénoliques n'est observée.
- Trois produits différents ont été obtenus lors de l'acylation de la naringine et de la rutine par un diacide tel que l'acide dodecanedioïque, en présence de CAL-B : un mono-ester correspondant au greffage d'une chaîne grasse sur une entité flavonoïde, un di-ester correspondant au greffage de deux chaînes grasses sur une entité flavonoïde et un composé penta-modulaire comportant une chaîne grasse et deux

entités flavonoïde glycosylées. L'ajustement du ratio molaire flavonoïde : diacide constitue un moyen efficace d'orienter la réaction vers la synthèse de produits spécifiques. Les produits obtenus possèdent des structures intéressantes et innovantes, mais malheureusement leurs propriétés n'ont pu être déterminées.

L'ensemble de ce travail montre que la voie chimique et la voie enzymatique présentent un intérêt certain pour fonctionnaliser les flavonoïdes et l'obtention de dérivés multifonctionnels. Dans le cas des flavonoïdes aglycones comme la catéchine qui comportent uniquement des groupements hydroxyles phénoliques, la voie chimique conduit à des esters avec des rendements élevés. Elle semble toutefois moins adaptée pour l'acylation de flavonoïdes glycosylés comportant non seulement des fonctions phénol mais également des groupements hydroxyles primaires et secondaires. Associé à un manque de sélectivité de la voie chimique, ce nombre important de groupements potentiellement acylables laisse supposer la nécessité de mettre en place une stratégie de protection/déprotection/purification complexe en vue d'obtenir des structures bien définies. Pour de tels substrats polyhydroxylés, la voie enzymatique semble adaptée du fait de sa haute régiosélectivité. En vue d'obtenir des dérivés dotés de propriétés antioxydantes, l'acylation catalysée par CALB conduisant à l'acylation sélective des groupements hydroxyle glycosidiques et préservant les fonctions phénoliques est particulièrement intéressante.

Une étude comparative des propriétés physico-chimiques et biologiques a été menée sur les composés synthétisés et les flavonoïdes parents afin de déterminer si l'acylation permet d'apporter de nouvelles propriétés.

Tous les composés tri-modulaires sont solubles dans l'eau, avec une solubilité plus importante pour les composés à base de sucre et cela à cause de l'entité sucre qui se trouve sur ces flavonoïdes.

La détermination du coefficient de partition par HPLC pour le composé tri-modulaire à base d'alanine montre que ce produit est hydrophobe et que sa hydrophobie augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse.

Tous les composés tri-modulaires à base d'acides aminés possèdent des propriétés tensioactives et s'auto-assemblent. Les dérivés présentant les propriétés tensioactives les plus élevées sont ceux à base de lysine, suivis de ceux à base d'alanine et finalement les composés à base d'acide glutamique. Quant aux esters de rutine et naringine produits par voie

enzymatique, seuls les produits incluant les chaînes grasses en C16, C18 et C18 :1 possèdent des propriétés tensioactives. Les composés bi-modulaires résultant de l'acylation de flavonoïdes aglycones et d'acides gras n'ont pas été testés à cause de leur insolubilité dans l'eau.

Du point de vue de l'activité antioxydante, qu'il s'agisse de l'inhibition du radical DPPH ou de l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle, les composés bi-modulaires de type I et II, ainsi que les composés tri-modulaires de type III et IV sont antioxydants, toutefois dans une moindre mesure que les flavonoïdes parents. Une corrélation négative entre la longueur de la chaîne acyle greffée et l'activité antioxydante a été observée ; ainsi, plus la longueur de la chaîne acyle greffée augmente, moins l'activité antioxydante de l'ester est élevée. Les études de modélisation moléculaire suggèrent que le groupement catéchol des flavonoïdes est principalement responsable de l'activité antioxydante. Par ailleurs, nous avons pu corréler certains descripteurs de réactivité chimique avec des grandeurs mesurées pour les propriétés antioxydantes. Pour la rutine, la naringine et leurs esters, il existe une corrélation entre la capacité de ces molécules à inhiber le radical DPPH et la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO (ΔE) ; et une corrélation positive entre l'activité anti-radicalaire de ces composés et les valeurs calculées de dureté chimique (η) du potentiel chimique électronique (μ), et du potentiel d'ionisation (PI) pour la rutine, la naringine et leurs esters. Quant à la catéchine et ses dérivés, la corrélation observée est seulement entre l'activité anti-radicalaire et les valeurs calculées de dureté chimique (η),

Concernant l'activité antiproliférative des produits synthétisés, les résultats obtenus montrent que ces derniers possèdent un effet cytotoxique vis-à-vis des cellules Caco 2, notamment les composés tri-modulaires à base de lysine. L'activité antiproliférative de ces composés est supérieure à celle des flavonoïdes parents. Aucune corrélation n'a été observée entre la longueur de la chaîne acyle des esters et leur activité antiproliférative.

A partir de ces résultats, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées.

Concernant l'hémisynthèse chimique, il serait intéressant de synthétiser des composés bi- et tri-modulaires en utilisant des technologies comme la synthèse assistée par micro-ondes afin d'améliorer les rendements comparativement aux modes de synthèse chimique classiques. La fonctionnalisation d'autres flavonoïdes aglycones comme la quercétine, la naringénine et le mesquitol constitue une autre piste d'investigation à étudier. En effet, la quercétine et la naringénine sont les aglycones de la rutine et de la naringine sur lesquelles les réactions de

bioconversion enzymatique ont été menées. La comparaison des propriétés de composés possédant une même entité phénolique permettrait de mieux comprendre l'effet de chaque élément structural sur une propriété donnée. Les composés tri-modulaires synthétisés, notamment ceux à base de lysine, possèdent des propriétés tensioactives ; celles-ci pourraient être mises à profit pour former des structures telles que les liposomes / vésicules.

En ce qui concerne la production de dérivés de flavonoïdes par biocatalyse, l'acylation en milieu fondu semble prometteuse pour l'obtention de produits présentant des niveaux variables d'acylation et donc une balance hydrophile/hydrophobe variable, selon la durée de la réaction appliquée. Afin de déterminer l'effet du niveau d'acylation sur les propriétés des composés, ces derniers doivent être produits dans des quantités permettant leur purification et leur caractérisation. Des simulations de docking pourraient permettre de déterminer les modes d'interaction préférentiels entre les substrats et le site actif du biocatalyseur pour comprendre la sélectivité réactionnelle observée expérimentalement.

Les produits présentant un flavonoïde et une entité diacide sont particulièrement intéressants puisqu'il est possible d'envisager de greffer ensuite un acide aminé, comme la lysine, sur la fonction acide libre. Cette réaction pourrait être catalysée par les aminoacylases produites au LRGP, en milieu aqueux.

Le LERMaB s'intéresse également à la synthèse de produits biosourcés ayant des propriétés gélifiantes, donc il sera intéressant de voir la capacité de nos molécules synthétisées à gélifier, afin d'obtenir des composés tensioactifs ayant des propriétés biologiques et gélifiantes intéressantes pour l'industrie cosmétique.

Chapitre 4 : Matériels et méthodes

Généralités

Les spectres infrarouges (IR) ont été réalisés sur un spectromètre PERKIN-ELMER FTIR Spectrum en mode ATR.

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 400. Les déplacements chimiques sont les suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, mu = multiplet, ma = massif, J = constante de couplage en Hertz (Hz). Les spectres RMN ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 400 avec découplage des protons. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS comme référence interne. Sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les abréviations utilisées pour décrire la multiplicité des signaux.

Les solvants utilisés pour réaliser les analyses RMN étaient le chloroforme deutéré (CDCl_3) (99,9% D), le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d) (99,8% D), l'acétone deutéré (CD_3OD) (99,9% D), le méthanol deutéré (MeOD) (99,8% D), et l'eau deutérée (D_2O) (99,9% D).

Les analyses élémentaires ont été réalisées au service d'analyse élémentaire de l'UMR 7565 de l'UHP à Nancy sur un appareil Thermofinnigan Flash EA 1112.

L'évolution des réactions a été suivie qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) réalisée sur plaque de silice KIESELGEL 60F 254 MERCK, et par UV-Visible ou spectrométrie InfraRouge (spectromètre PERKIN-ELMER FTIR en ATR).

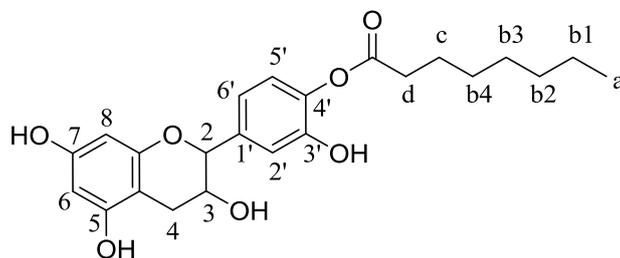
Les réactions d'acylation ont été suivies par HPLC. La chaîne CLHP utilisée est une Shimadzu LC 10 AD-VP (Shimadzu®, France) équipée d'une colonne Alltima HP C18 « amide » (125 x 2,1 mm, 5 μm , Alltech Grace®) maintenue à 30°C dans un four colonne (CTO-10 AS VP ; Shimadzu®), et d'un injecteur automatique d'échantillons (SIL-10 AD VP ; Shimadzu®), d'un détecteur UV à barrette de diode (SPD-M10A VP 190 – 290 nm ; Shimadzu®) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière à faible température (ELSD – LT ; Shimadzu®).

1. Synthèse

1.1. Synthèse des composés bi-modulaires de type I

Dans un ballon de 250 mL muni d'un système d'agitation magnétique sont dissout 1.5 eq d'acide gras dans 10 mL de dichlorométhane sous azote. 6.89 mmoles (2 g) de catéchine séchée au préalable par flux azéotropique dissout dans 10 mL du dichlorométhane sont ajouté au milieu. Après 10 minutes d'agitation, 10.33 mmoles (2.1 g) de DCCI solubilisés dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés gouttes à gouttes à 0°C. La réaction est laissée sous agitation durant 18 heures. Une fois la réaction terminée, un précipité, la dicycloexylurée, est filtré sur Buchner. Le solvant du filtrat est évaporé, repris dans 150 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé successivement par avec 2*25 mL de NH₄Cl, 25 mL de NaCl saturé, 2*25 mL de NaHCO₃ et finalement 25 mL de NaCl saturé. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation de la phase organique on obtient un solide brun. Le produit est purifié sur une colonne chromatographique (6 :4 cyclohexane / acétate d'éthyle). Le produit final est un cristal brun.

Composé 1a :



¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) du regioisomère 4' [regioisomère 3'] = 0.83 (t, 3H, J = 7 Hz, Ha); 1.18–1.32 (m, 8 H, H-b); 1.57–1.65 (m, 2 H, H-c), 2.50–2.58 (m, 2 H, H-f) 2.35 [2.32] (dd, 1 H, J = 8, 4 Hz, J = 19 Hz, H-4 α); 2.68 [2.70] (dd, 1 H, J = 5.6 Hz, J = 19 Hz, H-4 β); 3.81–3.87 (m, 1 H, H-3); 4.57 [4.51] (d, 1H, J = 7.6 Hz, 2-H); 5.03 [4.95] (d, 1H, J = 5.5 Hz, 3-OH); 5.71 [5.68] (d, 1H, J = 2.3 Hz, 6-H); 5.92 [5.85] (d, 1H, J = 2.3 Hz, 8); 6.77 [6.75] (dd, 1H, J = 2 Hz, J = 8.2 Hz, 6'); 6.93 [6.96] (d, 1H, J = 8.2 Hz, 5'); 7.03[7.06] (d, 1H, J = 2.1 Hz, J = 8.2 Hz, 2'); 8.95 [8.80] (s, 1H, 4'-OH); 9.22 [9.19] (s, 1H, 5-OH); 9.61 [9.59] (s, 1H, 7-OH).

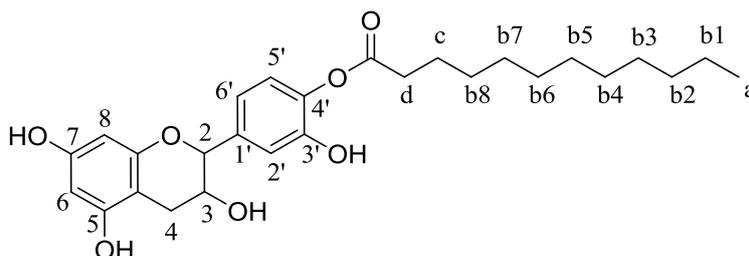
¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14.6 (C-a); 22.7 (C-b1); 25 (C-c); 29.1 (C-d); 31.8 (C-b3,4); 33.8 (C-b2); 66.3 (C-3); 80.7 (C-2); 93.9 (C-8); 95.4 (C-6); 98.9 (C-10); 115.9

(C-2'); 125.7 (C-5'); 122.2 (C-6'); 130.6 (C-1'); 138.1 (C-3'); 148.7 (C-4'); 155.3 (C-5); 156.14 (C-9); 156.5 (C-7); 171.2 (C-g).

IR: 1735 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3367 cm⁻¹ (OH phénolique)

P_f = 100 °C

Composé 1b :



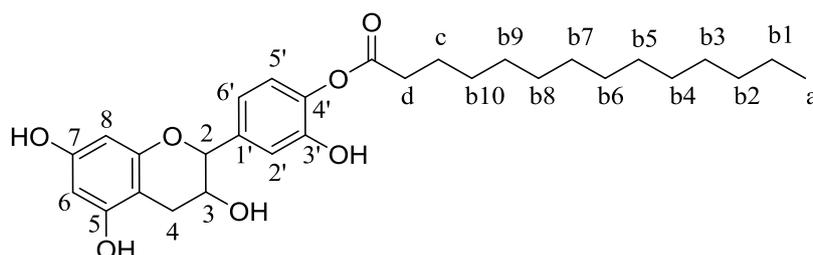
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 0.85 [0.90] (t, 3H, J = 7 Hz, H-a); 1.16–1.30 (m, 16 H, H-b); 1.64–1.57 (m, 2 H, H-c); 2.37 [2.30] (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 19 Hz, H-4 α); 2.50 (m, 2 H, H-d); 2.68 [2.65] (dd, 1 H, J = 5, 6 Hz, J = 19 Hz, H-4 β); 3.81–3.83 (m, 1 H, 3-H); 4.57 [4.45] (d, 1 H, J = 7.6 Hz, 2-H); 5.05 [5.10] (d, 1 H, J = 1, 5 Hz, 3-OH); 5.72 [5.68] (d, 1 H, J = 2, 3 Hz, 6-H); 5.92 [5.88] (d, 1 H, J = 2, 3 Hz, 8-H); 6.76 [6.85] (dd, 1 H, J = 2 Hz, J = 8, 2 Hz, 6'-H); 6.95 (d, 1H, J = 8, 2 Hz, 5'-H); 7.10 [7.05] (d, 1 H, J = 2.1 Hz, J = 8.2 Hz, 2'-H); 8.85 [8.81] (s, 1 H, 4'-OH); 9.30 [9.22] (s, 1 H, 5-OH); 9.65 [9.66] (s, 1 H, 7-OH).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a); 22 (C-b1); 24.8 (C-c); 28.6 (C-4); 29 (C-b8), 29.3 (C-b3,7), 29.6 (C-b4,5,6), 31.4 (C-b2); 33.1 (C-d); 66.3 (C-3); 80.6 (C-2); 93.8 (C-8); 95.4 (C-6); 98.9 (C-4a); 115.9 (C2'); 120.2 (C-6'); 125.5 (C-5'); 130.7 (C-1'); 141(C-4'); 148.6 (C-3'); 155 (C-5); 157.3 (C-8a); 156.5 (C-7) 171.6 (C-COO).

IR: 1735 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3367 cm⁻¹ (OH phénolique)

P_f = 110 °C

Composé 1c :



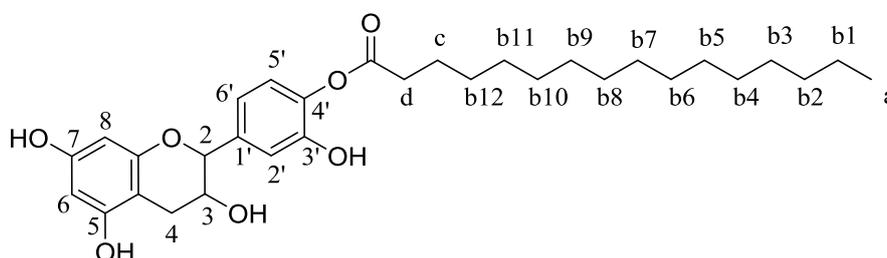
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.83 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H-a); 1.18–1.32 (m, 20 H, H-b); 1.57–1.65 (m, 2H, H-c), 2.50–2.58 (m, 2H, H-d) 2.35 [2.32] (dd, 1H, $J = 8, 4$ Hz, $J = 19$ Hz, H-4 α); 2.68 [2.70] (dd, 1H, $J = 5.6$ Hz, $J = 19$ Hz, H-4 β); 3.81–3.87 (m, 1 H, H-3); 4.57 [4.51] (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, H-2); 5.03 [4.95] (d, 1 H, $J = 5.5$ Hz, 3-OH); 5.71 [5.68] (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz, H-6); 5.92 [5.89] (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz, H-8); 6.77 [6.74] (dd, 1 H, $J = 2$ Hz, $J = 8.2$ Hz, H-6'); 6.93 [6.97] (d, 1 H, $J = 8.2$ Hz, H-5'); 7.03 [7.07] (d, 1 H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.2$ Hz, H-2'); 8.95 [8.82] (s, 1 H, 4'-OH); 9.22 [9.19] (s, 1 H, 5-OH); 9.61 [9.59] (s, 1 H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a); 22.7 (C-b1); 25 (C-c); 28.1 (C-4); 29 (C-b10); 29.3 (C-b3,10); 29.6 (C-b4,5,6,7,8); 31.9 (C-b2); 33.8 (C-d); 67.7 (C-3); 85.7 (C-2); 94.8 (C-8); 95.4 (C-6); 99.8 (C-4a); 114.2 (C-2'); 122.2 (C-6'); 125.7 (C-5'); 135.7 (C-1'); 138.1 (C-3'); 150.2 (C-4'); 154.5 (C-5); 156.4 (C-8a); 156.9 (C-7); 171.2 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique)

$P_f = 135$ °C

Composé 1d :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, H-a), 1.18–1.34 (m, 24 H, H-b), 1.55–1.65 (m, 2 H, H-c), 2.51–2.58 (m, 2 H, H-d), 2.37 [2.33] (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 19$ Hz, H-4 α), 2.67 [2.69] (dd, 1H, $J = 5.6$ Hz, $J = 19$ Hz, H-4 β), 3.81–3.89 (m, 1 H, H-3), 4.57 [4.51] (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, H-2), 5.03 [4.95] (d, 1 H, $J = 5.5$ Hz, 3-OH), 5.71 [5.68] (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.92 [5.85] (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.77 [6.75] (dd, 1 H, $J = 2$ Hz, $J =$

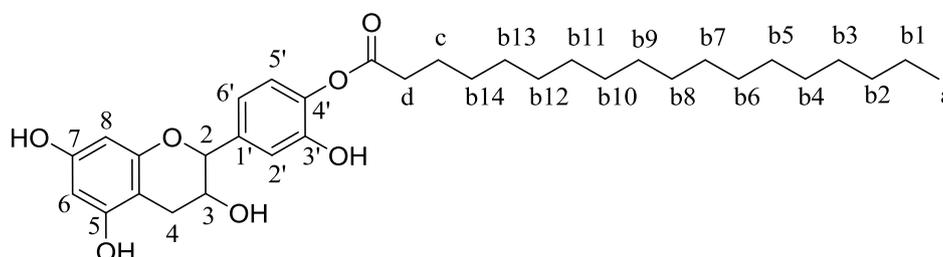
8.2 Hz, H-6'), 6.93 [6.96] (d, 1 H, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.03 [7.07] (d, 1 H, J = 2.1 Hz, J = 8.2 Hz, H-2'), 8.95 [8.82] (s, 1 H, 4'-OH), 9.23 [9.19] (s, 1 H, 5-OH), 9.62 [9.59] (s, 1 H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a); 22.9 (C-b1); 25.3 (C-c); 28.4 (C-4); 29.2 (C-b12); 29.4 (C-b3,11); 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10); 32 (C-b2); 33.9 (C-d); 67.7 (C-3); 85.7 (C-2); 95 (C-8); 95.4 (C-6); 100.1 (C-4a); 114.2 (C-2'); 122.2 (C-6'); 125.9 (C-5'); 136.1 (C-1'); 138.1 (C-3'); 149.9 (C-4'); 154.5 (C-5); 156.4 (C-8a); 157.1 (C-7); 171.2 (COO).

IR: 1735 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3367 cm⁻¹ (OH phénolique).

P_f = 150 °C

Composé 1e :



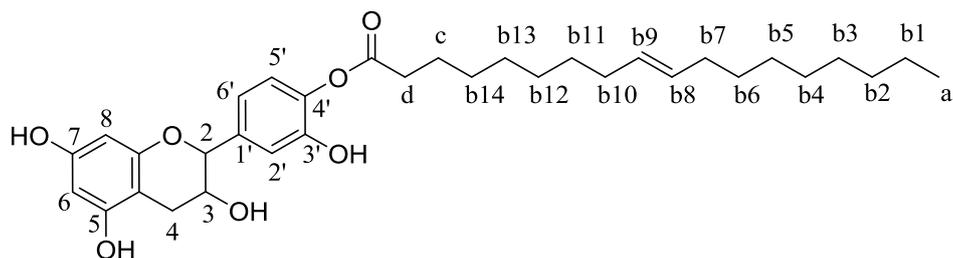
^1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, 3 H, J = 7.2 Hz, H-a), 1.17–1.34 (m, 28 H, H-b), 1.55–1.67 (m, 2 H, H-c), 2.5–2.58 (m, 2 H, H-d), 2.39 [2.34] (dd, 1 H, J = 8.4 Hz, J = 19 Hz, H-4 α), 2.67 [2.7] (dd, 1 H, J = 5.6 Hz, J = 19 Hz, H-4 β), 3.82–3.89 (m, 1 H, H-3), 4.55 [4.52] (d, 1 H, J = 7.6 Hz, H-2), 5.02 [4.92] (d, 1 H, J = 5.5 Hz, 3-OH), 5.71 [5.67] (d, 1 H, J = 2.3 Hz, H-6), 5.91 [5.84] (d, 1 H, J = 2.3 Hz, H-8), 6.78 [6.75] (dd, 1 H, J = 2 Hz, J = 8.2 Hz, H-6'), 6.94 [6.97] (d, 1 H, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.03 [7.06] (d, 1 H, J = 2.1 Hz, J = 8.2 Hz, H-2'), 8.95 [8.80] (s, 1 H, 4'-OH), 9.22 [9.19] (s, 1 H, 5-OH), 9.61 [9.59] (s, 1 H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a); 22.9 (C-b1); 25.3 (C-c); 28.4 (C-4); 29.2 (C-b14); 29.4 (C-b3,13); 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10,11,12); 32 (C-b2); 33.9 (C-d); 67.7 (C-3); 85.7 (C-2); 95 (C-8); 95.4 (C-6); 100.1 (C-4a); 114.2 (C-2'); 122.2 (C-6'); 125.9 (C-5'); 136.1 (C-1'); 138.1 (C-3'); 149.9 (C-4'); 154.5 (C-5); 156.4 (C-8a); 157.1 (C-7); 171.2 (COO).

IR: 1735 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3367 cm⁻¹ (OH phénolique).

P_f = 170 °C

Composé 1f :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, 3 H, J = 7.4 Hz, H-a), 1.14–1.30 (m, 20 H, H-b1,2,3,4,5,6,11,12,13,14), 1.50–1.63 (m, 2 H, H-c), 2.15–2.20 (m, 4 H, H-b7,10), 2.52–2.57 (m, 2 H, H-d), 2.4 [2.37] (dd, 1 H, J = 8,5 Hz, J = 19,1 Hz, H-4 α), 2.65 [2.68] (dd, 1 H, J = 5.6 Hz, J = 19,2 Hz, H-4 β), 3.8–3.89 (m, 1 H, H-3), 4.55 [4.54] (d, 1 H, J = 7.5 Hz, H-2), 5 [4.95] (d, 1 H, J = 5.5 Hz, 3-OH), 5.49–5.54 (ma, 2 H, H-b8,9), 5.71 [5.68] (d, 1 H, J = 2.5 Hz, H-6), 5.9 [5.87] (d, 1 H, J = 2.3 Hz, H-8), 6.8 [6.77] (dd, 1 H, J = 2 Hz, J = 8.2 Hz, H-6'), 6.94 [7.01] (d, 1 H, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.05 [7.08] (d, 1 H, J = 2.1 Hz, J = 8.2 Hz, H-2'), 8.97 [8.81] (s, 1 H, 4'-OH), 9.23 [9.20] (s, 1 H, 5-OH), 9.61 [9.6] (s, 1 H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a); 22.7 (C-b1); 25 (C-c); 28.1 (C-4); 29 (C-b14); 29.3 (C-b3); 29.4 (C-b13); 29.7 (C-b4,5,6,12); 29.9 (C-b11); 31.9 (C-b2); 33.5 (C-d); 33.7 (C-b7,10), 67.7 (C-3); 85.2 (C-2); 94.8 (C-8); 95.5 (C-6); 99.4 (C-4a); 114.2 (C-2'); 121.3 (C-5'); 124.7 (C-6'); 130.6 (C-b8,9), 135.7 (C-1'); 135.2 (C-3'); 147.2 (C-4'); 157.2 (C-5); 157.3 (C-8a); 157.8 (C-7); 172.3 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852–2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique).

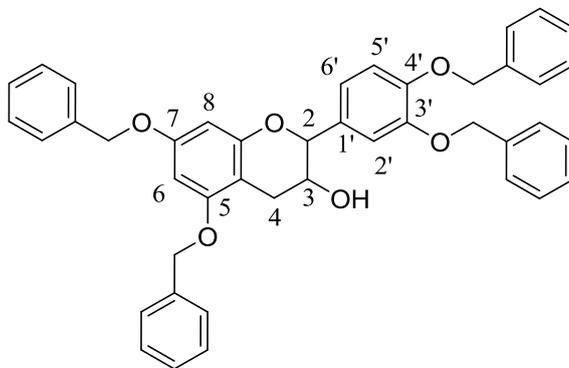
P_f = 180 °C

1.2. Synthèse des composés bi-modulaires de type II

Benzylation de la catéchine :

Dans un ballon de 500 mL, 13 mmoles (4 g) de catéchine séchée au préalable sont dissout dans 25 mL d'acétone anhydre. 58.5 mmoles (10 g) de bromure de benzyle et 97 mmoles (13.47 g) de carbonate de potassium dissout chacun dans 20 mL d'acétone anhydre sont ajoutés dans le milieu. Après agitation pendant 48h sous reflux, un précipité blanc est filtré et lavé 2 fois avec de l'acétone. Le solvant du filtrat est évaporé, repris dans 150 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé successivement par avec 25 mL de HCl (1M), 25 mL de NaCl saturé, 25 mL de NaHCO_3 et finalement 25 mL de NaCl saturé. Après séchage sur MgSO_4 et

évaporation de la phase organique on obtient un solide brun. Le produit est purifié sur une colonne chromatographique (9 :1 cyclohexane / acétate d'éthyle) puis recristallisé (2 :1 cyclohexane / acétate d'éthyle).



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.53-2.60 (dd, J = 16.4, 8.7 Hz, 1 H, 4-H- α), 3.00-3.05 (dd, J = 16.4, 5.8 Hz, 1 H, 4-H- β), 3.91 (m, 1 H, 3-H), 4.54-4.56 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, 2-H), 4.91 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.08 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.10 (s, 2 H, OCH₂Ph), 6.13-6.14 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, 6-H), 6.19-6.20 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, 8-H), 6.87 (s, 2' H, 5'-H, 6'-H), 6.95 (s, 1 H, 2'-H), 7.21–7.33 (m, 20 H, Ar-H).

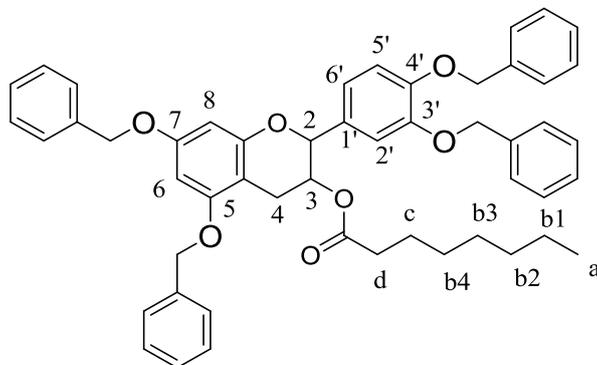
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 27.6 (C-4), 68.2 (C-3), 69.9 (OCH₂Ph), 70.1 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂Ph), 81.5 (C-2), 93.85 (C-6), 94.4 (C-8), 102.3 (C-4a), 113.9 (C-2'), 115.0 (C-5'), 120.6 (C-6'), 127.1, 127.2, 127.4, 127.5, 127.8, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.5 (C-Ar), 130.9 (C-1'), 136.8, 136.9, 137.0, 137.1 (C-Ar) 149.1 (C-4'), 149.3 (C-3'), 155.2 (C-8a), 157.7 (C-5), 157.8 (C-7) ppm.

Estérification :

Dans un ballon de 250 mL muni d'un système d'agitation magnétique sont dissout 1 eq d'acide gras dans 10 mL de dichlorométhane sous azote. 4.07 mmoles (2.65 g) de catéchine tetrabenzylée et 0.11 g de DMAP chacun dissout dans 10 mL du dichlorométhane sont ajouté dans milieu. Après 10 minutes d'agitation, 4.07 mmol (0.83 g) de DCCI solubilisé dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés gouttes à gouttes à 0°C. La réaction est laissée sous agitation durant 18 heures. Une fois la réaction terminée, un précipité, la dicycloexylurée, est filtré sur Buchner. Le solvant du filtrat est évaporé, repris dans 150 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé successivement par avec 2*25 mL de HCl (1M), 25 mL de NaCl saturé, 2*25 mL de NaHCO₃ et finalement 25 mL de NaCl saturé. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation de la

phase organique on obtient un solide brun. Le produit est purifié sur une colonne chromatographique (8 :2 cyclohexane / acétate d'éthyle). Le produit final est un solide blanc.

Composé 3a :

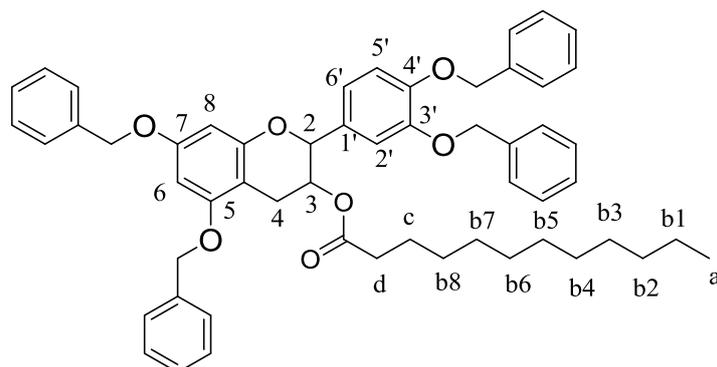


$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.78-0.82 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, Ha), 1.05-1.22 (m, 8 H, Hb1-4), 1.33-1.42 (m, 2 H, Hc), 2.06-2.11 (m, 2 H, Hd), 2.60-2.65 (dd, J = 16.6, 8.4 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.75-2.88 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H- β), 4.88 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.91 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.96 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.01-5.10 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 2-H), 5.12-5.31 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.15-6.17 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 6.18-6.20 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.81 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.90 (s, 1 H, 2'-H), 7.21–7.38 (m, 20 H, Ar-H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1), 25 (C-c), 25.1 (C-4), 29 (C-b3,4), 31.8 (C-b2), 34.2 (C-d), 69 (C-3), 70.8 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂PH), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂PH), 82.4 (C-2), 92.1 (C-6), 92.9 (C-8), 101.1 (C-4a), 110.4 (C-2'), 112.5 (C-5'), 120.3 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.8 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-Ar) 147.1 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.8 (C-8a), 156.5 (C-5), 197.3 (C-7), 173.1 (COO).

IR: 1736 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 3b :

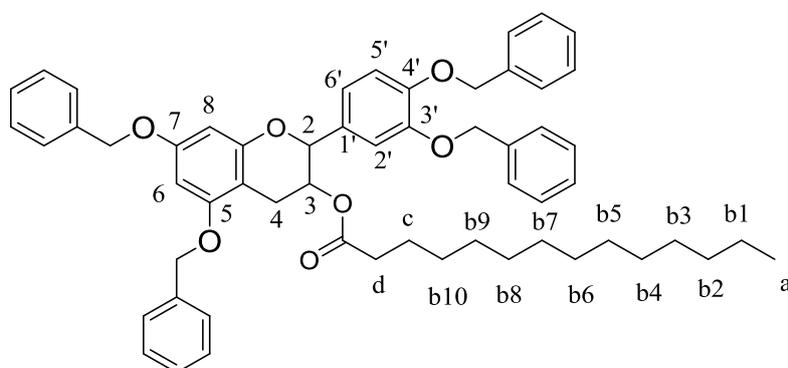


^1H NMR (CDCl_3): δ = 0.79-0.82 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, Ha), 1.04-1.22 (m, 16 H, Hb1-8), 1.33-1.43 (m, 2 H, Hc), 2.07-2.10 (m, 2 H, Hd), 2.60-2.65 (dd, J = 16.4, 8.5 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.75-2.87 (dd, J = 16.4, 5.3 Hz, 1 H, 4-H- β), 4.87 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.97 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.02-5.11 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 2-H), 5.12-5.31 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.16-6.18 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 6.19-6.20 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.82 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.89 (s, 1 H, 2'-H), 7.20–7.37 (m, 20 H, Ar-H) ppm.

^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 14.2 (C-a), 22.7 (C-b1), 25 (C-c), 25.1 (C-4), 29 (C-b8), 29.3 (C-b3,7), 29.6 (C-b4,5,6), 31.9 (C-b2), 34.2 (C-d), 69 (C-3), 70.8 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂PH), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂PH), 82.4 (C-2), 92.1 (C-6), 92.9 (C-8), 101.1 (C-4a), 110.4 (C-2'), 112.5 (C-5'), 120.3 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.8 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-Ar) 147.1 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.8 (C-8a), 156.5 (C-5), 197.3 (C-7), 173.1 (COO) ppm.

IR: 1736 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 3c :

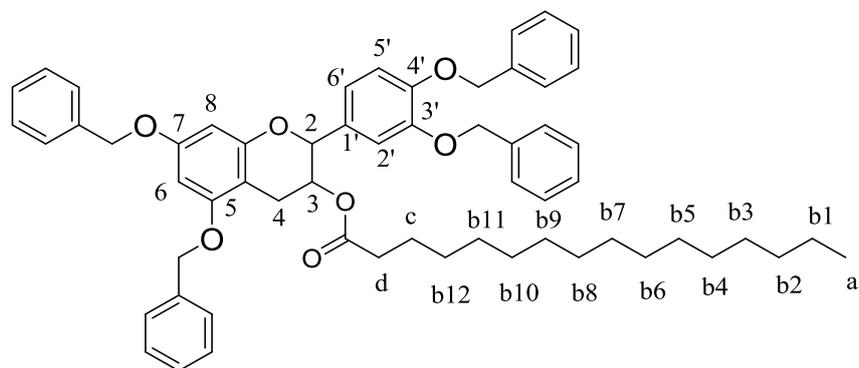


^1H NMR (CDCl_3): δ = 0.80-0.82 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, Ha), 1.04-1.25 (m, 20 H, Hb1-4), 1.32-1.44 (m, 2 H, Hc), 2.06-2.10 (m, 2 H, Hd), 2.61-2.66 (dd, J = 16.4, 8.5 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.77-2.88 (dd, J = 16.4, 5.3 Hz, 1 H, 4-H- β), 4.85 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.97 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.03-5.11 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 2-H), 5.11-5.30 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.17-6.20 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 6.20-6.21 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.81 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.90 (s, 1 H, 2'-H), 7.19–7.36 (m, 20 H, Ar-H) ppm.

^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 14.2 (C-a), 22.6 (C-b1), 24.9 (C-c), 25 (C-4), 29 (C-b10), 29.3 (C-b3,9), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 31.8 (C-b2), 34.3 (C-d), 69.1 (C-3), 70.9 (OCH₂Ph), 71.0 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂Ph), 82.5 (C-2), 92 (C-6), 93 (C-8), 101.2 (C-4a), 110.6 (C-2'), 112.8 (C-5'), 120.1 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.5 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.2 (C-Ar) 147.3 (C-4'), 150 (C-3'), 155.6 (C-8a), 156.4 (C-5), 197.2 (C-7), 173 (COO).

IR: 1736 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 3d :



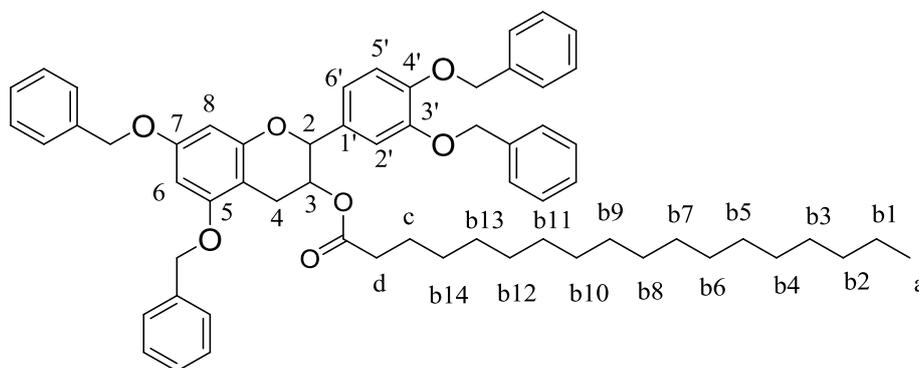
^1H NMR (CDCl_3): δ = 0.78-0.82 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, Ha), 1.04-1.26 (m, 24 H, Hb1-4), 1.31-1.44 (m, 2 H, Hc), 2.06-2.11 (m, 2 H, Hd), 2.59-2.65 (dd, J = 16.6, 8.4 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.74-2.87 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H- β), 4.9 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.92 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.96 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.99-5.11 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 2-H), 5.12-5.31 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.15-6.17 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 6.19-6.21 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.82 (s, 2' H, 5'-H, 6'-H), 6.91 (s, 1 H, 2'-H), 7.22–7.39 (m, 20 H, Ar-H).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 14 (C-a), 22.7 (C-b1), 25 (C-c), 25.2 (C-4), 29 (C-b12), 29.3 (C-b3,11), 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 31.9 (C-b2), 34.2 (C-d), 69 (C-3), 70.9 (OCH₂Ph), 71.0 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂Ph), 82.8 (C-2), 92.2 (C-6), 93.3 (C-8), 101.2 (C-4a), 110.6 (C-2'), 113 (C-5'), 121 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9,

128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.5 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.2 (C-Ar) 147.3 (C-4'), 150 (C-3'), 155.4 (C-8a), 156.2 (C-5), 197.2 (C-7), 173 (COO).

IR: 1736 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

Composé 3e :



¹H NMR (CDCl₃): δ =0.78-0.84 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, Ha), 1.03-1.28 (m, 28 H, Hb1-4), 1.30-1.42 (m, 2 H, Hc), 2.06-2.11 (m, 2 H, Hd), 2.57-2.66 (dd, J = 16.6, 8.4 Hz, 1 H, 4-H-α), 2.73-2.88 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H-β), 4.88 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.90 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5-5.10 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 2-H), 5.11-5.31 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.15-6.18 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 6-H), 6.19-6.22 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.81 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.91 (s, 1 H, 2'-H), 7.22-7.37 (m, 20 H, Ar-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1), 24.9 (C-c), 25.2 (C-4), 29.1 (C-b14), 29.3 (C-b3,13), 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10,11,12), 32 (C-b2), 34.2 (C-d), 69.1 (C-3), 70.9 (OCH₂Ph), 71.0 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂Ph), 82.5 (C-2), 92.1 (C-6), 93.4 (C-8), 101.2 (C-4a), 110.6 (C-2'), 113.2 (C-5'), 121.5 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.4 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.2 (C-Ar) 147.3 (C-4'), 150 (C-3'), 155.4 (C-8a), 156.2 (C-5), 197.3 (C-7), 173 (COO).

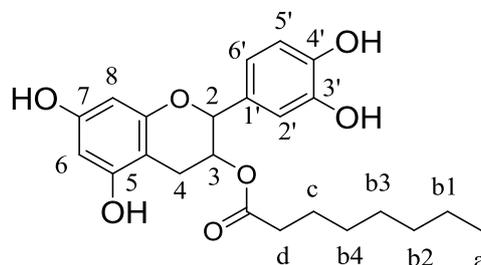
IR: 1736 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

Hydrogénation :

L'ester de catéchine benzylé est dissout dans un mélange d'éthanol absolu et acétate d'éthyle 1 :1 puis hydrogéné dans un réacteur avec du palladium sur charbon (Pd(OH)₂/C) à 10% pendant 20h à température ambiante à la pression de 50 bars. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur verre fritte comportant une couche de plusieurs centimètres d'épaisseur de célite. La célite est lavée abondamment par de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Après évaporation, une

cire verdâtre est obtenue. Cette cire lavée avec 2* 25 mL de HCl (1 M) et 25 mL de NaCl saturé. Le produit final est un solide brun.

Composé 4a :



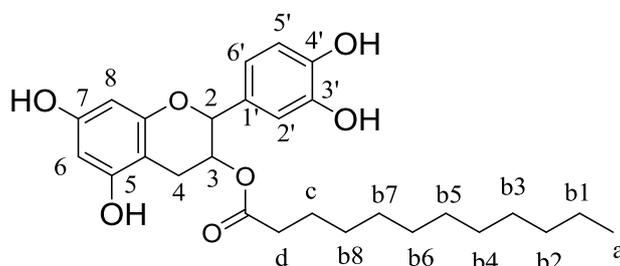
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80-0.84 (t, $J = 7$ Hz, 3 H, Ha), 1.03-1.20 (m, 8 H, Hb1-4), 1.33-1.50 (m, 2 H, Hc), 2.15-2.26 (m, 2 H, Hd), 2.59-2.65 (dd, $J = 16, 8.4$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.84-2.90 (dd, $J = 15.8, 5.2$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.99-5.11 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 2-H), 5.87-5.9 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 6-H), 5.91-5.92 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 5.93-5.95 (m, 1 H, 3-H), 6.55-6.6 (dd, $J = 2.1, 8$ Hz, 1H, 6'-H), 6.65-6.68 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 5'-H), 6.69-6.72 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.79 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.83 (s, 1H, 5-OH), 8.92 (s, 1H, 7-OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.7 (C-b1), 24.8 (C-c), 25 (C-4), 29 (C-b3,4), 31.9 (C-b2), 34.2 (C-d), 69 (C-3), 82.4 (C-2), 94.8 (C-8), 95.3 (C-6), 99.4 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.1 (C-5'), 121 (C-6'), 131.5 (C-1'), 144.6 (C-4'), 145.8 (C-3'), 157.2 (C-5), 157.3 (C-8a), 157.8 (C-7), 173 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique).

$P_f = 105$ °C

Composé 4b :



$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81-0.85 (t, $J = 7$ Hz, 3 H, Ha), 1.16-1.30 (m, 16 H, Hb1-8), 1.33-1.47 (m, 2 H, Hc), 2.13-2.24 (m, 2 H, Hd), 2.58-2.64 (dd, $J = 16, 8.2$ Hz, 1 H,

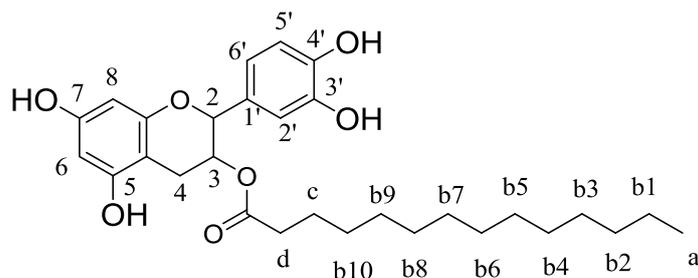
4-H- α), 2.80-2.91 (dd, $J = 16.1, 5.2$ Hz, 1 H, 4-H- β), 5-5.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, 2-H), 5.86-5.9 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 6-H), 5.91-5.93 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 5.94-5.96 (m, 1 H, 3-H), 6.57-6.62 (dd, $J = 2.1, 8$ Hz, 1H, 6'-H), 6.66-6.69 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 5'-H), 6.70-6.72 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.78 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.8 (s, 1H, 5-OH), 8.93 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.6 (C-b1), 24.9 (C-4), 25 (C-c), 29 (C-b8), 29.3 (C-b3,7), 29.6 (C-b4,5,6), 32 (C-b2), 34.3 (C-d), 69.1 (C-3), 83 (C-2), 95.1 (C-8), 95.4 (C-6), 100.2 (C-4a), 115.2 (C-2'), 117.2 (C-5'), 122 (C-6'), 132.5 (C-1'), 145.3 (C-4'), 145.9 (C-3'), 157.1 (C-5), 157.4 (C-8a), 158.3 (C-7), 173 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique).

$P_f = 120$ °C

Composé 4c :



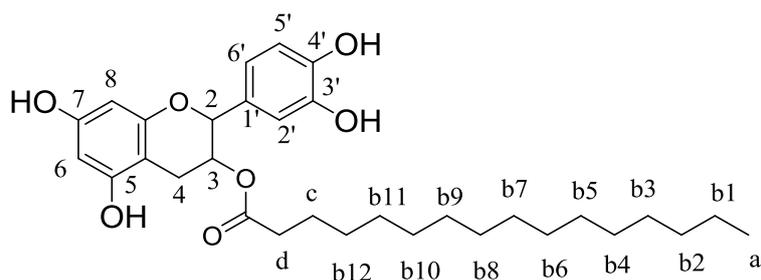
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.22-0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3 H, Ha), 1.12-1.30 (m, 20 H, Hb1-10), 1.31-1.51 (m, 2 H, Hc), 2.10-2.20 (m, 2 H, Hd), 2.57-2.66 (dd, $J = 16.2, 8.1$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, $J = 16.1, 5$ Hz, 1 H, 4-H- β), 5.05-5.21 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, 2-H), 5.82-5.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 6-H), 5.89-5.92 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 8-H), 5.94-5.97 (m, 1 H, 3-H), 6.52-6.61 (dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.65-6.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.71-6.73 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.75 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.78 (s, 1H, 5-OH), 8.90 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.8 (C-b1), 24.7 (C-4), 24.9 (C-c), 29.1 (C-b10), 29.4 (C-b3,9), 29.7 (C-b4, 5, 6, 7, 8), 31.8 (C-b2), 34.1 (C-d), 69.2 (C-3), 82.5 (C-2), 94.9 (C-8), 95.2 (C-6), 94.4 (C-4a), 115 (C-2'), 117.2 (C-5'), 121.5 (C-6'), 130.9 (C-1'), 145.5 (C-4'), 145.8 (C-3'), 156.8 (C-5), 157.1 (C-8a), 157.5 (C-7), 174 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique).

$P_f = 130$ °C

Composé 4d :



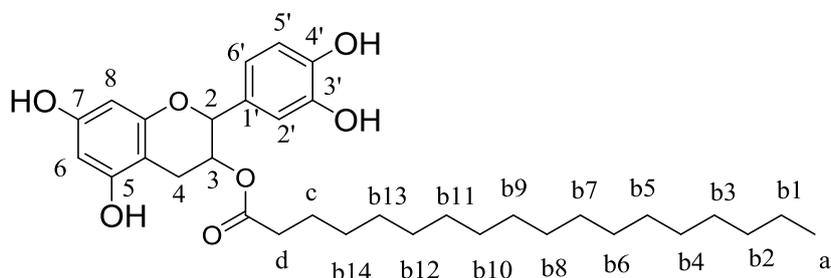
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.35-0.88 (t, $J = 7$ Hz, 3 H, H_a), 1.11-1.32 (m, 24 H, H_{b1-12}), 1.29-1.48 (m, 2 H, H_c), 2.12-2.19 (m, 2 H, H_d), 2.55-2.67 (dd, $J = 16.1, 7.9$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.78-2.91 (dd, $J = 15.9, 5.3$ Hz, 1 H, 4-H- β), 5.10-5.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, 2-H), 5.80-5.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 5.86-5.91 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 5.93-5.95 (m, 1 H, 3-H), 6.50-6.59 (dd, $J = 2.3, 8$ Hz, 1H, 6'-H), 6.61-6.65 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 5'-H), 6.72-6.75 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.80 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.82 (s, 1H, 5-OH), 8.92 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 22.6 (C-b1), 24.8 (C-4), 25.1 (C-c), 29 (C-b12), 29.2 (C-b3,11), 29.6 (C-b4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), 32.1 (C-b2), 34.3 (C-d), 68.8 (C-3), 83.1 (C-2), 94.8 (C-8), 95.3 (C-6), 99.5 (C-4a), 114.8 (C-2'), 116.2 (C-5'), 120.3 (C-6'), 129.8 (C-1'), 144.8 (C-4'), 145.8 (C-3'), 155.7 (C-5), 157.2 (C-8a), 157.6 (C-7), 173.7 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique).

$P_f = 150$ °C

Composé 4e :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.30-0.87 (t, $J = 7$ Hz, 3 H, H_a), 1.09-1.34 (m, 28 H, H_{b1-14}), 1.28-1.45 (m, 2 H, H_c), 2.12-2.19 (m, 2 H, H_d), 2.50-2.67 (dd, $J = 16.3, 8$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, $J = 16.2, 5.2$ Hz, 1 H, 4-H- β), 5.11-5.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 2-H), 5.80-5.84 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 6-H), 5.86-5.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 8-H), 5.94-5.96 (m, 1 H, 3-

H), 6.48-6.58 (dd, $J = 2.5, 8$ Hz, 1H, 6'-H), 6.62-6.67 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 5'-H), 6.73-6.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.78 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.80 (s, 1H, 5-OH), 8.90 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.5 (C-b1), 24.9 (C-4), 25.1 (C-c), 29.1 (C-b14), 29.3 (C-b3,13), 29.7 (C-b4,5,6,7,8,9,10,11,12), 32.2 (C-b2), 34.3 (C-d), 68.9 (C-3), 83.5 (C-2), 94.9 (C-8), 95.3 (C-6), 99.4 (C-4a), 115 (C-2'), 116.1 (C-5'), 121.4 (C-6'), 130.2 (C-1'), 144.5 (C-4'), 145.7 (C-3'), 155.5 (C-5), 157 (C-8a), 158.2 (C-7), 173.5 (COO).

IR: 1735 cm^{-1} (O-CO), $2852\text{-}2922\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phenolique).

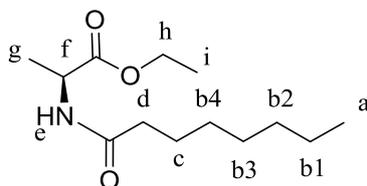
$P_f = 175\text{ }^\circ\text{C}$

1.3. Synthèse des composés bi-modulaires de type III

Couplage alanine et acide aminé :

Dans un bicol de 250 mL surmonté d'une garde de CaCl_2 , 1eq d'acide gras est dissout dans 20 ml de dichlorométhane anhydre. 13 mmoles (2 g) d'hydrochlorure de L-alanine éthyle ester et 13 mmoles (5.7 g) de BOP sont dissout également dans 20 mL de dichlorométhane anhydre et ajoutés dans le bicol. Et finalement 26 mmoles (2.6 g) de triéthylamine sont dissouts dans 10 mL de dichlorométhane anhydre et ajoutés dans le milieu. Après 15 minutes, le pH du milieu est de 6. De petits volumes de triéthylamine sont ajoutés jusqu'à obtenir un ph de 7-8. Après 3h30min, la réaction est arrêtée et le solvant est évaporé. Le liquide trouble obtenu est repris dans 150 mL d'acétate d'éthyle puis lavé successivement par 2*30 mL d'HCl (1M), 20 mL de NaCl saturé, 2*30 mL de NaHCO_3 et 20 mL de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. Le produit final est une huile jaune pour l'acide octanoïque et un solide blanc pour les autres acides gras.

Composé 5a :

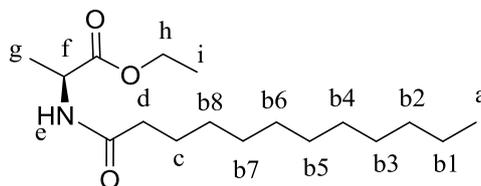


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, $J = 7$, 3H, H-a), 1.11-1.29 (ma, 11 H, H-b, H-i), 1.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-g), 1.48-1.63 (ma, 2 H, H-c), 2.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-d), 4.13 (q, $J = 7.16$, 2 H H-h), 4.51 (ma, $J = 7.28$ Hz, 1H, H-f), 6.03 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a, C-i), 17.3 (C-g), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d), 52.1 (C-f), 61.3 (C-h), 171.5 (C-fa), 173.9 (C-da).

IR: 1649 cm^{-1} (CO amide), 1738 cm^{-1} (CO-O), 2850-2920 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 5b :

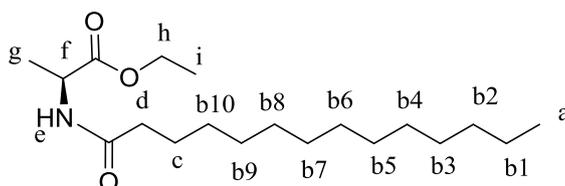


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.74 (t, J = 6.9, 3H, H-a), 1.05-1.17 (ma, 19 H, H-b, H-i), 1.19 (d, J = 7 Hz, 3H, H-g), 1.38-1.51 (ma, 2 H, H-c), 2.05 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-d), 3.98 (q, J = 7.2, 2 H, H-h), 4.26 (ma, J = 7.5 Hz, 1H, H-f), 7.13 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.3 (C-a, C-i), 17.5 (C-g), 23.1 (C-b1), 25.2 (C-c), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 52 (C-f), 61.3 (C-h), 172 (C-fa), 173.9 (C-da).

IR: 1647 cm^{-1} (CO amide), 1738 cm^{-1} (CO-O), 2850-2921 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 5c :

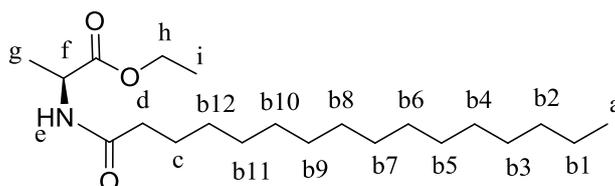


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7.1, 3H, H-a), 1.12-1.29 (ma, 23 H, H-b, H-i), 1.32 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-g), 1.49-1.64 (ma, 2 H, H-c), 2.13 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-d), 4.13 (q, J = 7.1, 2 H, H-h), 4.51 (ma, J = 7.2 Hz, 1H, H-f), 5.96 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a, C-i), 17.1 (C-g), 22.5 (C-b1), 25.9 (C-c), 28.6 (C-b10), 28.9 (C-b9), 29.5 (C-b3), 29.9 (C-b4,5,6,7,8), 32.5 (C-b2), 37.5 (C-d), 52.2 (C-f), 62.7 (C-h), 170.2 (C-fa), 174.2 (C-da).

IR: 1648 cm^{-1} (CO amide), 1738 cm^{-1} (CO-O), 2850-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 5d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.83 (t, $J= 7.2$, 3 H, H-a), 1.10-1.34 (ma, 27 H, H-b, H-i), 1.35 (d, $J= 7.1$ Hz, 3 H, H-g), 1.35-1.49 (ma, 2 H, H-c), 2.09 (t, $J= 7.4$ Hz, 2 H, H-d), 4.25 (q, $J= 7.1$, 2 H, H-h), 4.43 (ma, $J= 7.2$ Hz, 1 H, H-f), 6.54 (s, 1 H, H-e).

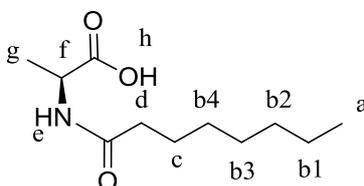
^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a, C-i), 17.5 (C-g), 23.1 (C-b1), 25.2 (C-c), 28.8 (C-b12), 29.3 (C-b11), 29.5 (C-b3), 29.8 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 31.5 (C-b2), 36.7 (C-d), 53.6 (C-f), 61.7 (C-h), 171.2 (C-fa), 173.7 (C-da).

IR: 1644 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (CO-O), $2851\text{-}2922\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Saponification :

1 g du couple acide gras-acide amine et du NaOH (5 eq) en solution 2M dans un mélange MeOH :H₂O (9 :1) sont mis dans un ballon sous agitation. Après 4h un précipité est formé. 7 mL d'HCl (1M) sont introduits dans le ballon, le trouble disparaît. Après 5 minutes d'agitation, le méthanol est évaporé. Le milieu est placé dans un bain de glace et 9 mL d'HCl (1M) sont ajoutés. Un précipité blanc se forme. Après filtration sur Buchner, une cire blanche est récupérée. Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu.

Composé 8a :

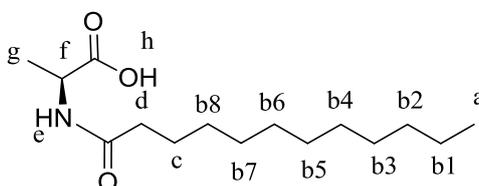


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J= 7$, 3 H, H-a), 1.11-1.33 (ma, 8 H, H-b), 1.39 (d, $J= 7.2$ Hz, 3 H, H-g), 1.51-1.62 (ma, 2 H, H-c), 2.17 (t, $J= 7.6$ Hz, 2 H, H-d), 4.51 (ma, $J= 7.4$ Hz, 1 H, H-f), 6.01 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17 (C-g), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 31.9 (C-b2), 36.5 (C-d), 51.3 (C-f), 173.9 (C-da), 174.7 (C-fa).

IR: 1644 cm^{-1} (CO amide), 1703 cm^{-1} (COOH), 2850-2920 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 8b :

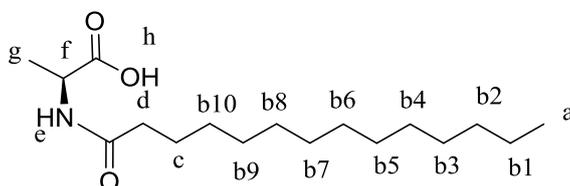


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J=7$, 3 H, H-a), 1.12-1.33 (ma, 16 H, H-b), 1.40 (d, $J=7.2$ Hz, 3 H, H-g), 1.51-1.62 (ma, 2 H, H-c), 2.16 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H, H-d), 4.50 (ma, $J=7.4$ Hz, 1 H, H-f), 6.25 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17 (C-g), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.6 (C-b4,5,6), 29.3 (C-b3), 31.9 (C-b2), 36.5 (C-d), 51.3 (C-f), 173.9 (C-da), 174.7 (C-fa).

IR: 1643 cm^{-1} (CO amide), 1702 cm^{-1} (COOH), 2851-2920 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 8c :

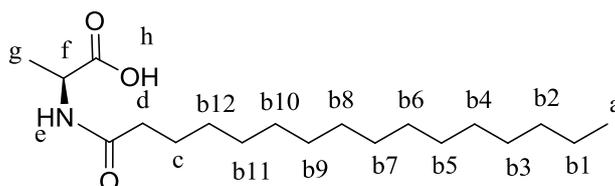


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, $J=6.8$, 3 H, H-a), 1.1-1.33 (ma, 20 H, H-b), 1.39 (d, $J=7.5$ Hz, 3 H, H-g), 1.52-1.62 (ma, 2 H, H-c), 2.17 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H, H-d), 4.49 (ma, $J=7.4$ Hz, 1 H, H-f), 6.12 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 17.2 (C-g), 22.5 (C-b1), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b10), 28.9 (C-b9), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 29.3 (C-b3), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 51.3 (C-f), 174 (C-da), 174.7 (C-fa).

IR: 1644 cm^{-1} (CO amide), 1705 cm^{-1} (COOH), 2851-2923 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 8d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J = 6.8, 3 H, H-a), 1.12-1.31 (ma, 24 H, H-b), 1.41 (d, J = 7.5 Hz, 3 H, H-g), 1.52-1.62 (ma, 2 H, H-c), 2.15 (t, J = 7.6 Hz, 2 H, H-d), 4.51 (ma, J = 7.4 Hz, 1 H, H-f), 6.07 (s, 1H, H-e).

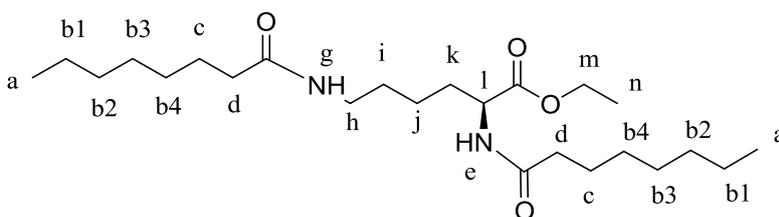
^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 17.1 (C-g), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b12), 28.9 (C-b11), 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 29.4 (C-b3), 32 (C-b2), 36.2 (C-d), 51.4 (C-f), 174 (C-da), 174.7 (C-fa).

IR: 1644 cm^{-1} (CO amide), 1703 cm^{-1} (COOH), $2850\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Couplage lysine et acide aminé :

Dans un bicol de 250 mL surmontée d'une garde de CaCl_2 , 2eq d'acide gras ($n= 8,12, 14, 16, 18$) sont dissouts dans 20 ml de dichlorométhane anhydre. 4 mmoles (2 g) de dihydrochlorure de L-lysine ethylester et 8 mmoles (7 g) de BOP sont dissout également dans 20 mL de dichlorométhane anhydre et ajoutés dans le bicol. Et finalement 32 mmoles (3,2 g) de triéthylamine est dissoute dans 10 mL de dichlorométhane anhydre et ajoutée dans le milieu. Après 15 minutes, le pH du milieu est de 6. De petits volumes de triméthylamine sont ajoutés jusqu'à obtenir un ph de 7-8. Après 3h30min, un précipité blanc se forme. Ce précipité est filtré. Le solvant du milieu est évaporé. Le liquide trouble obtenu est repris dans 150 mL de dichlorométhane puis lavé successivement par 2*30 mL d'HCl (1M), 20 mL de NaCl saturé, 2*30 mL de NaHCO_3 et 20 mL de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. Le produit final est un solide blanc.

Composé 7a :

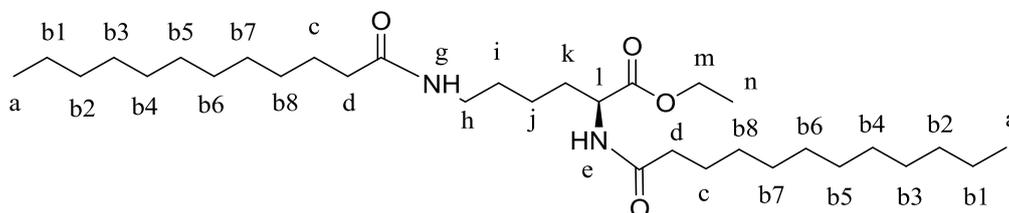


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, J = 6.9, 6 H, H-a), 1.15-1.36 (ma, 21 H, H-b,j,n), 1.39-1.69 (ma, 6 H, H-c,i), 2.03-2.24 (ma, 6 H, H-d,k), 3,16 (q, J = 6.6 Hz, 2 H, H-h), 4.12 (q, J = 7.3 Hz, 2 H, H-m), 4.48 (ma, J = 4.2 Hz, 1 H, H-l), 5.6 (s, 1H, H-g), 6.12 (s, 1 H, H-f).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a,n), 22.7 (C-b1,j), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 29.7 (C-i), 30.9 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.5 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 61.3 (C-m), 171.5 (C-kb), 172.6 (C-ca), 173.9 (C-cb).

IR: 1642 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (CO-O), $2851\text{-}2922\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 7b :

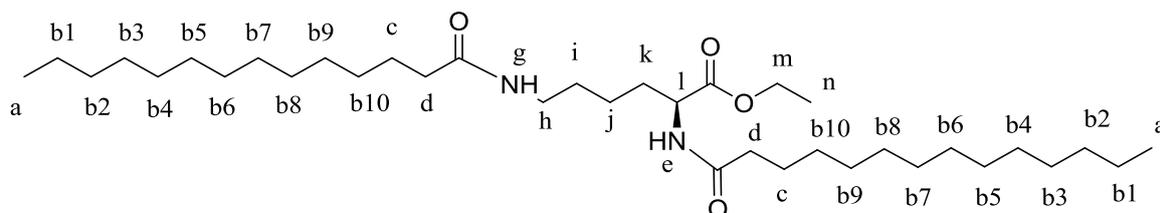


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, J = 7.1, 6 H, H-a), 1.16-1.38 (ma, 37 H, H-b,j,n), 1.41-1.70 (ma, 6 H, H-c,i), 2.12-2.35 (ma, 6 H, H-d,k), 3,17 (q, J = 6.6 Hz, 2 H, H-h), 4.15 (q, J = 7.3 Hz, 2 H, H-m), 4.49 (ma, J = 4.2 Hz, 1 H, H-l), 5.6 (s, 1H, H-g), 6.12 (s, 1 H, H-f).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a,n), 22.7 (C-b1,j), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 29.7 (C-i), 30.9 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.5 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 61.3 (C-m), 171.5 (C-kb), 172.6 (C-ca), 173.9 (C-cb).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1729 cm^{-1} (CO-O), $2850\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 7c :



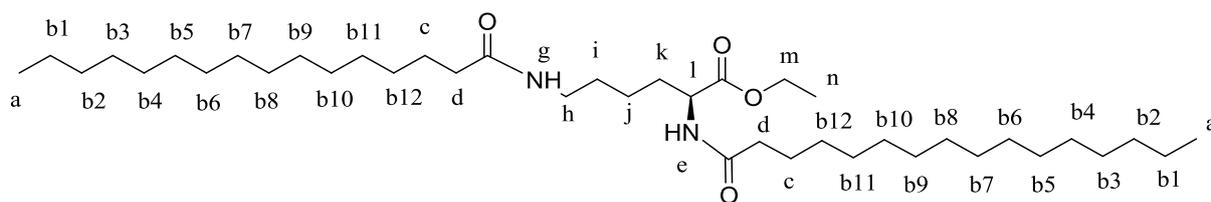
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, J = 7, 6 H, H-a), 1.15-1.36 (ma, 45 H, H-b,j,n), 1.38-1.71 (ma, 6 H, H-c,i), 2.05-2.24 (ma, 6 H, H-d,k), 3,19 (q, J = 6.6 Hz, 2 H, H-h),

4.12 (q, J= 7.3 Hz, 2 H, H-m), 4.48 (ma, J= 4.2 Hz, 1 H, H-l), 5.6 (s, 1H, H-g), 6.12 (s, 1 H, H-f).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a,n), 22.8 (C-b1,j), 25.7 (C-c), 28.6 (C-b10), 28.9 (C-b9), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 29.7 (C-i), 30.8 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.7 (C-d), 39.1 (C-h), 56.5 (C-ka), 61.4 (C-m), 171.4 (C-kb), 172.8 (C-ca), 174 (C-cb).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (CO-O), 2852-2923 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 7d :



^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, J= 7, 6 H, H-a), 1.14-1.36 (ma, 53 H, H-b,j,n), 1.40-1.81 (ma, 6 H, H-c,i), 2.05-2.24 (ma, 6 H, H-d,k), 3,20 (q, J= 6.6 Hz, 2 H, H-h), 4.14 (q, J= 7.3 Hz, 2 H, H-m), 4.48 (ma, J= 4.2 Hz, 1 H, H-l), 5.62 (s, 1H, H-g), 6.14 (s, 1 H, H-f).

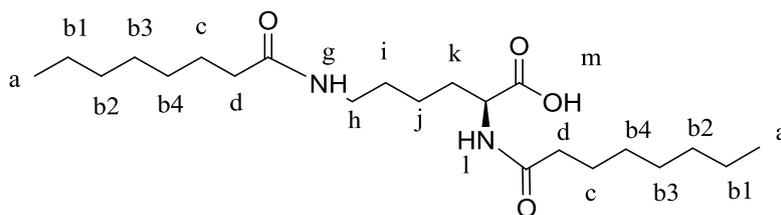
^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a,n), 22.6 (C-b1,j), 25.5 (C-c), 28.7 (C-b12), 28.9 (C-b11), 29.4 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 29.7 (C-i), 31.1 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.4 (C-d), 39.3 (C-h), 56.7 (C-ka), 61.9 (C-m), 171.6 (C-kb), 172.7 (C-ca), 175.1 (C-cb).

IR: 1639 cm^{-1} (CO amide), 1731 cm^{-1} (CO-O), 2855-2927 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Saponification :

1 g du couple acide gras-acide amine et du NaOH (5 eq) en solution 2M dans un mélange MeOH : H₂O (9 :1) sont mis dans un ballon sous agitation. Après 4h un précipité est formé. 7 mL d'HCl (1M) sont introduits dans le ballon, le trouble disparaît. Après 5 minutes d'agitation, le méthanol est évaporé. Le milieu est placé dans un bain de glace et 9 mL d'HCl (1M) sont ajoutés. Un précipité blanc se forme. Après filtration sur Buchner, une cire blanche est récupérée. Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu.

Composé 10a :

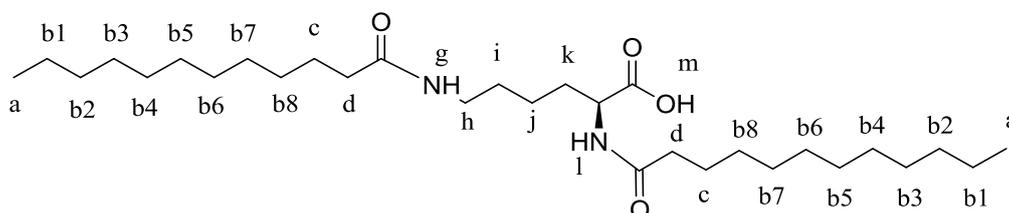


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J = 7.1, 6 H, H-a), 1.08-1.35 (ma, 18 H, H-b,j), 1.42-1.56 (ma, 6 H, H-c,i), 1.57-1.81 (ma, 2 H, H-k), 2.01-2.22 (ma, 4 H, H-d), 3.07 (t, J = 6.8, 2 H, H-h), 3,16 (q, J = 6.6 Hz, 2 H, H-h), 4,25 (q, J = 4.4 Hz, 1 H, H-l).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.6 (C-b1,j), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 29.7 (C-i), 30.6 (C-k), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 172.6 (C-ca), 173.9 (C-cb), 174.7 (C-kb).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1702 cm^{-1} (COOH), $2851\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 10b :

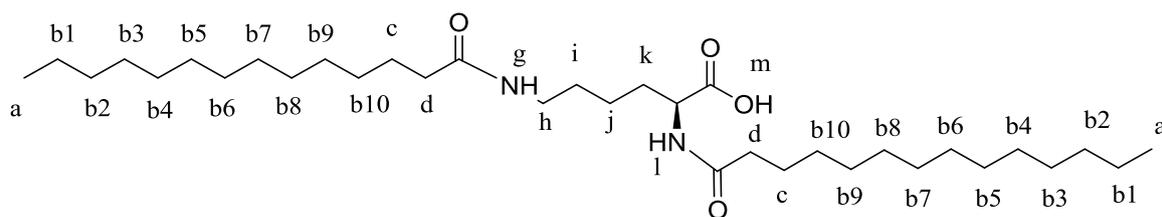


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7.1, 6 H, H-a), 1.07-1.32 (ma, 34 H, H-b,j), 1.40-1.55 (ma, 6 H, H-c,i), 1.56-1.82 (ma, 2 H, H-k), 2.02-2.24 (ma, 4 H, H-d), 3.08 (t, J = 6.9, 2 H, H-h), 3,15 (q, J = 6.6 Hz, 2 H, H-h), 4,24 (q, J = 4.4 Hz, 1 H, H-l).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1,j), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 29.7 (C-i), 30.6 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 172.6 (C-ca), 173.9 (C-cb), 174.7 (C-kb).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1700 cm^{-1} (COOH), $2852\text{-}2919\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 10c :

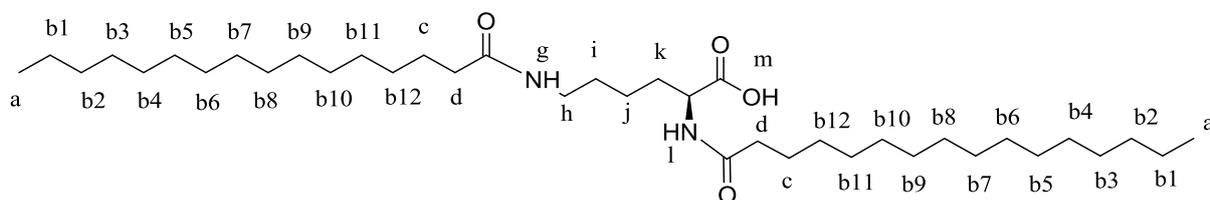


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J = 7.1$, 6 H, H-a), 1.09-1.33 (ma, 42 H, H-b,j), 1.39-1.54 (ma, 6 H, H-c,i), 1.56-1.82 (ma, 2 H, H-k), 2.01-2.24 (ma, 4 H, H-d), 3.10 (t, $J = 7.1$, 2 H, H-h), 3,11 (q, $J = 6.6$ Hz, 2 H, H-h), 4,26 (q, $J = 4.4$ Hz, 1 H, H-l).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.5 (C-b1,j), 25.7 (C-c), 28.7 (C-b10), 29 (C-b9), 29.4 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 29.9 (C-i), 30.7 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 172.6 (C-ca), 173.9 (C-cb), 174.7 (C-kb).

IR: 1643 cm^{-1} (CO amide), 1702 cm^{-1} (COOH), $2851\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 10d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.78 (t, $J = 6.9$, 6 H, H-a), 1.10-1.33 (ma, 50 H, H-b,j), 1.40-1.54 (ma, 6 H, H-c,i), 1.56-1.81 (ma, 2 H, H-k), 2.01-2.25 (ma, 4 H, H-d), 3.11 (t, $J = 6.9$, 2 H, H-h), 3,11 (q, $J = 6.6$ Hz, 2 H, H-h), 4,23 (q, $J = 4.4$ Hz, 1 H, H-l).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.5 (C-b1,j), 25.7 (C-c), 28.7 (C-b12), 29 (C-b11), 29.4 (C-b3), 29.7 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 29.8 (C-i), 30.7 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 39.2 (C-h), 56.6 (C-ka), 172.6 (C-ca), 173.8 (C-cb), 174.7 (C-kb).

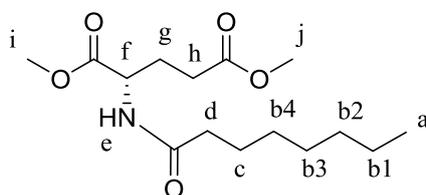
IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1703 cm^{-1} (COOH), $2854\text{-}2921\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Couplage acide glutamique et acide aminé :

Dans un bicol de 250 mL surmonté d'une garde de CaCl_2 , 1 eq d'acide gras ($n = 8, 12, 14, 16, 18$) est dissout dans 20 ml de dichlorométhane anhydre. 9 mmoles (2 g) d'hydrochlorure de L-acide glutamique diméthylester et 9 mmoles (4 g) de BOP sont dissout également dans 20 mL

de dichlorométhane anhydre et ajoutés dans le bicol. Et finalement 18 mmoles (1,8 g) de triéthylamine sont dissouts dans 10 mL de dichlorométhane anhydre et ajoutés dans le milieu. Après 15 minutes, le pH du milieu est de 6. De petits volumes de triéthylamine sont ajoutés jusqu'à obtenir un ph de 7-8. Après 3h30min, un précipité se forme. Ce précipité est évaporé et le solvant du milieu est évaporé. Le liquide trouble obtenu est repris dans 150 mL de dichlorométhane puis lavées successivement par 2*30 mL d'HCl (1M), 20 mL de NaCl saturé, 2*30 mL de NaHCO3 et 20 mL de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO4 puis évaporée. Le produit final est un solide blanc.

Composé 6a :

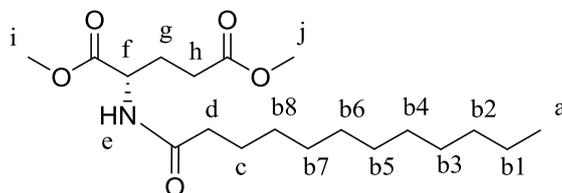


$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J= 6.5$, 3 H, H-a), 1.11-1.34 (ma, 8 H, H-b), 1.47-1.67 (ma, 2 H, H-c), 1.71-2.02 (ma, 2 H, H-f), 2.08 (t, $J= 7.3$ Hz, 2 H, H-d), 2.35 (t, $J= 7.5$ Hz, 2 H, H-h), 3.61 (s, 3 H, H-i), 3.69 (s, 3 H, H-j), 4.47-4.65 (ma, 1 H, H-g), 6.25 (s, 1 H, H-e).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 26.3 (C-h), 26.6 (C-g), 28.6 (C-b3,4), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d), 51.9 (C-i,j), 55.6 (C-f), 172.9 (C-fa), 173.1 (C-ha), 173.9 (C-da).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (CO-O), $2852\text{-}2923\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 6b :

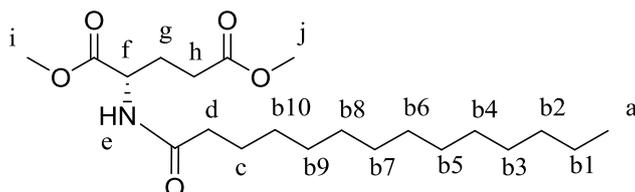


$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J= 6.5$, 3 H, H-a), 1.12-1.34 (ma, 16 H, H-b), 1.47-1.65 (ma, 2 H, H-c), , 1.69-2.05 (ma, 2 H, H-f), 2.10 (t, $J= 7.2$ Hz, 2 H, H-d), 2.36 (t, $J= 7.5$ Hz, 2 H, H-h), 3.66 (s, 3 H, H-i), 3.70 (s, 3 H, H-j), 4.48-4.65 (ma, 1 H, H-g), 6.20 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.6 (C-b1), 25.7 (C-c), 26.4 (C-h), 26.7 (C-g), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 31.9 (C-b2), 36.6 (C-d), 52.1 (C-i,j), 55.7 (C-f), 173.1 (C-fa), 173.3 (C-ha), 173.4 (C-da).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1731 cm^{-1} (CO-O), $2850\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 6c :

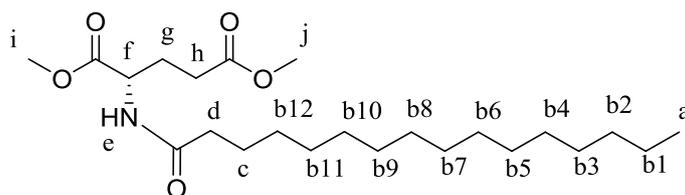


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, $J= 6.5$, 3 H, H-a), 1.14-1.34 (ma, 20 H, H-b), 1.45-1.64 (ma, 2 H, H-c), , 1.75-2.07 (ma, 2 H, H-f), 2.11 (t, $J= 7.3$ Hz, 2 H, H-d), 2.32 (t, $J= 7.8$ Hz, 2 H, H-h), 3.67 (s, 3 H, H-i), 3.69 (s, 3 H, H-j), 4.47-4.65 (ma, 1 H, H-g), 6.20 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.6 (C-b1), 25.7 (C-c), 26.4 (C-h), 26.7 (C-g), 28.6 (C-b10), 28.9 (C-b9), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 32.1 (C-b2), 36.3 (C-d), 52.5 (C-i,j), 55.7 (C-f), 173.1 (C-fa), 173.3 (C-ha), 173.4 (C-da).

IR: 1642 cm^{-1} (CO amide), 1729 cm^{-1} (CO-O), $2851\text{-}2923\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 6d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, $J= 6.5$, 3 H, H-a), 1.14-1.34 (ma, 24 H, H-b), 1.42-1.63 (ma, 2 H, H-c), , 1.75-2.03 (ma, 2 H, H-f), 2.14 (t, $J= 7.3$ Hz, 2 H, H-d), 2.45 (t, $J= 7.2$ Hz, 2 H, H-h), 3.60 (s, 3 H, H-i), 3.64 (s, 3 H, H-j), 4.47-4.64 (ma, 1 H, H-g), 6.20 (s, 1 H, H-e).

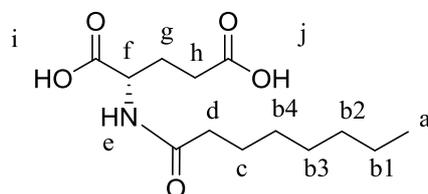
^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.6 (C-b1), 25.7 (C-c), 26.4 (C-h), 26.7 (C-g), 28.2 (C-b12), 28.9 (C-b11), 29.3 (C-b3), 29.5 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 31.7 (C-b2), 36.3 (C-d), 52.5 (C-i,j), 55.8 (C-f), 173.1 (C-fa), 173.5 (C-ha), 173.4 (C-da).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (CO-O), 2852-2923 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Saponification :

1 g du couple acide gras-acide amine et du NaOH (5 eq) en solution 2M dans un mélange MeOH :H₂O (9 :1) sont mis dans un ballon sous agitation. Après 4h un précipité est formé. 7 mL d'HCl (1M) sont introduits dans le ballon, le trouble disparaît. Après 5 minutes d'agitation, le méthanol est évaporé. Le milieu est placé dans un bain de glace et 9 mL d'HCl (1M) sont ajoutés. Un précipité blanc se forme. Après filtration sur Buchner, une cire blanche est récupérée. Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu.

Composé 9a :

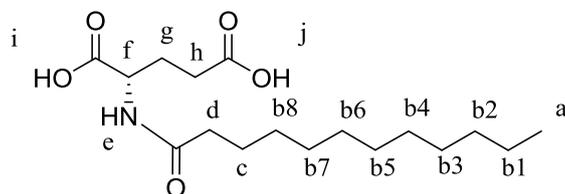


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.78 (t, J= 6.9, 6 H, H-a), 1.06-1.26 (ma, 8 H, H-b), 1.31-1.52 (ma, 2 H, H-c), , 1.72-2.01 (ma, 2 H, H-f), 2.10 (t, J= 7.3 Hz, 2 H, H-d), 2.33 (t, J= 7.2 Hz, 2 H, H-h), 4.01-4.23 (ma, 1 H, H-g), 7.95 (s, 1 H, H-e).

¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1), 25.6 (C-c), 26.5 (C-g), 28.6 (C-b3,4), 30.4 (C-h), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d) , 55.5 (C-f), 173.9 (C-da), 174.7 (C-fa), 178.4 (C-ha).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1703 cm^{-1} (COOH), 2854-2921 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 9b :

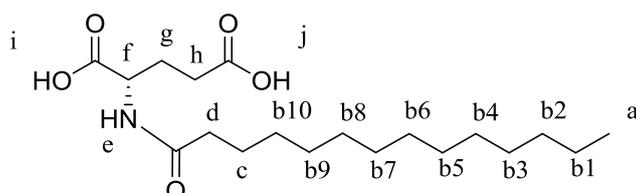


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J= 7.1, 6 H, H-a), 1.10-1.30 (ma, 16 H, H-b), 1.33-1.54 (ma, 2 H, H-c), , 1.72-2.01 (ma, 2 H, H-f), 2.11 (t, J= 7.5 Hz, 2 H, H-d), 2.33 (t, J= 7.2 Hz, 2 H, H-h), 4.03-4.25 (ma, 1 H, H-g), 7.94 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.6 (C-b1), 25.6 (C-c), 26 (C-g), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 30.8 (C-h), 31.9 (C-b2), 36.9 (C-d), 55.8 (C-f), 172.4 (C-da), 172.7 (C-fa), 179.6 (C-ha).

IR: 1638 cm^{-1} (CO amide), 1702 cm^{-1} (COOH), $2852\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 9c :

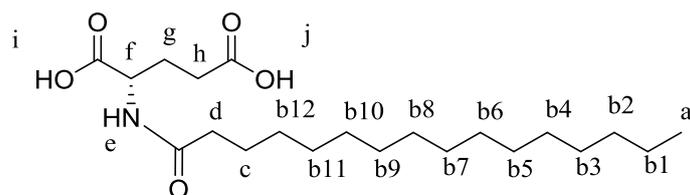


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J=7.1$, 6 H, H-a), 1.04-1.26 (ma, 20 H, H-b), 1.29-1.50 (ma, 2 H, H-c), 1.70-2 (ma, 2 H, H-f), 2.09 (t, $J=7.5$ Hz, 2 H, H-d), 2.35 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H, H-h), 4-4.22 (ma, 1 H, H-g), 7.97 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 22.5 (C-b1), 25.7 (C-c), 26.4 (C-g), 28.6 (C-b10), 28.9 (C-b9), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 31.4 (C-h), 31.9 (C-b2), 37.4 (C-d), 55.8 (C-f), 173.9 (C-da), 174.7 (C-fa), 178.4 (C-ha).

IR: 1642 cm^{-1} (CO amide), 1705 cm^{-1} (COOH), $2850\text{-}2921\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

Composé 9d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.78 (t, $J=6.9$, 6 H, H-a), 1.10-1.29 (ma, 24 H, H-b), 1.32-1.53 (ma, 2 H, H-c), 1.72-2.01 (ma, 2 H, H-f), 2.15 (t, $J=7.5$ Hz, 2 H, H-d), 2.30 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H, H-h), 4.01-4.25 (ma, 1 H, H-g), 7.99 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.6 (C-b1), 25.4 (C-c), 26.3 (C-g), 28.5 (C-b12), 29 (C-b11), 29.4 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 31.2 (C-h), 32.1 (C-b2), 37.5 (C-d), 55.8 (C-f), 173.9 (C-da), 174.7 (C-fa), 178.4 (C-ha).

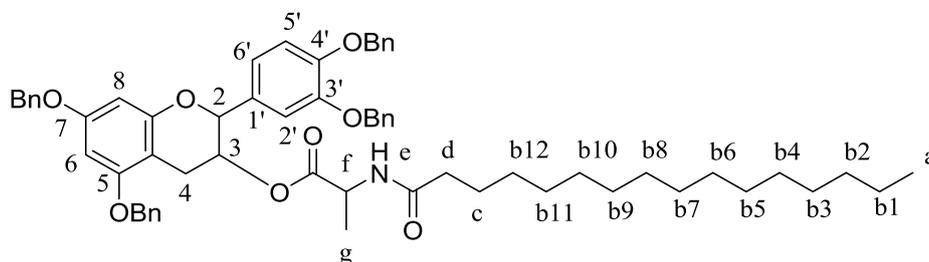
IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1702 cm^{-1} (COOH), $2854\text{-}2921\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-a), 1.17 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-g), 1.20-1.32 (ma, 20 H, H-b1-10), 1.34-1.45 (ma, 2 H, H-c), 2.10-2.17 (ma, 2 H, H-d), 2.64-2.67 (dd, $J = 16.6, 8.4$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.74-2.87 (dd, $J = 16.1, 5.1$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.3 (mu, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-f), 4.92 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.97 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.12 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, 2-H), 5.23 (q, $J = 5.6$ Hz, 1 H, 3-H), 6.18 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H, 6-H), 6.34 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 8-H), 6.84 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.90 (s, 1 H, 2'-H), 7.21–7.40 (ma, 20 H, Ar-H), 9.57 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.5 (C-a), 17.2 (C-g), 22.4 (C-b1), 25 (C-4), 25.4 (C-c), 28.4 (C-b10), 28.7 (C-b9), 29.5 (C-b3,4,5,6,7,8), 32.2 (C-b2), 36.7 (C-d), 52.5 (C-f), 69.2 (C-3), 70.5 (OCH₂Ph), 71 (OCH₂PH), 71.3 (OCH₂Ph), 71.4 (OCH₂PH), 82.4 (C-2), 93 (C-6), 93.5 (C-8), 101.3 (C-4a), 111 (C-2'), 112.2 (C-5'), 120.4 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 131 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph) 147.5 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.7 (C-7), 156.1 (C-8a), 159.8 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1639 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 11d :



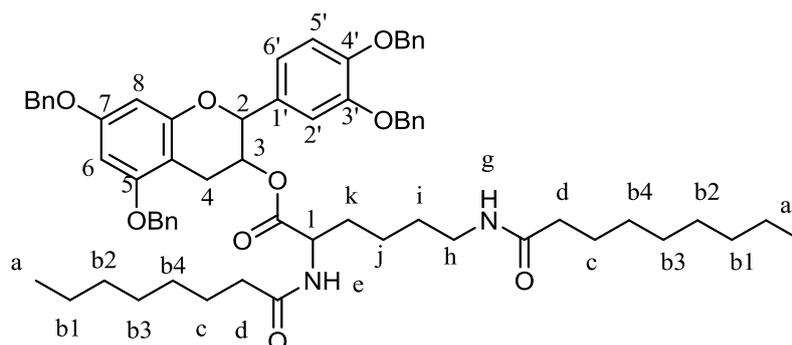
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-a), 1.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-g), 1.24-1.33 (ma, 24 H, H-b1-12), 1.35-1.45 (ma, 2 H, H-c), 2.10-2.18 (ma, 2 H, H-d), 2.64-2.67 (dd, $J = 16.4, 8.4$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.75-2.87 (dd, $J = 16.1, 5.1$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.5 (mu, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-f), 4.90 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.96 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.97 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.13 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 2-H), 5.25 (q, $J = 5.7$ Hz, 1 H, 3-H), 6.20 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.34 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 8-H), 6.85 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.91 (s, 1 H, 2'-H), 7.21–7.39 (ma, 20 H, Ar-H), 9.67 (s, 1H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 17.3 (C-g), 22.5 (C-b1), 25.2 (C-4), 25.4 (C-c), 28.2 (C-b12), 28.7 (C-b11), 29.4 (C-b3,4,5,6,7,8,9,10), 32.4 (C-b2), 36.2 (C-d), 52.4 (C-f), 69.3 (C-3), 70.6 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂PH), 71.3 (OCH₂Ph), 71.4 (OCH₂PH), 82.4

(C-2), 93 (C-6), 93.5 (C-8), 101.3 (C-4a), 111.1 (C-2'), 112.2 (C-5'), 120.5 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 131 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph) 147.4 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.5 (C-7), 156.2 (C-8a), 159.8 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1642 cm⁻¹ (CO amide), 1730 cm⁻¹ (O-CO), 2851-2925 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

Composé 13a :

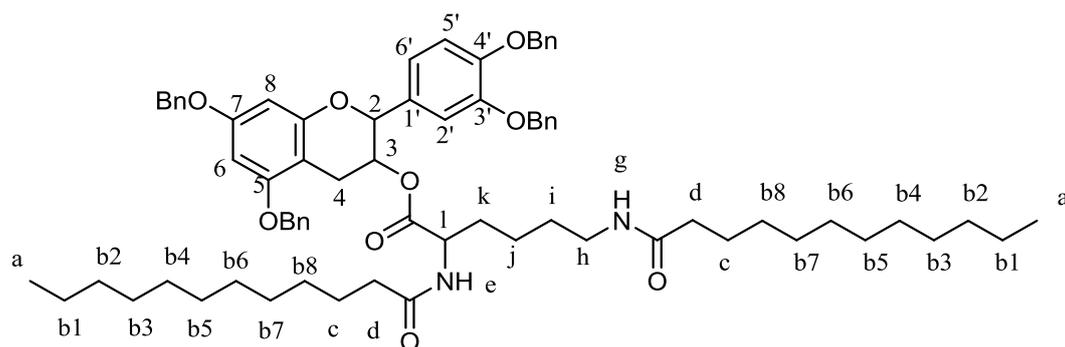


¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J = 7.1 Hz, 6 H, H-a), 1.08-1.35 (ma, 18H, H-b,j), 1.42-1.56 (ma, 6H, H-c,i), 1.57-1.81 (ma, 2 H, H-k), 2.06-2.11 (ma, 2 H, H-d), 2.58-2.62 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 1 H, 4-H-α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H-β), 3.07 (t, J = 6.8, 2 H, H-h), 4.25 (q, J = 4.4 Hz, 1 H, H-l), 4.88 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.91 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.98 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.08 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, 2-H), 5.25 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.26 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.28 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.87 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 1 H, 2'-H), 7.32–7.48 (ma, 20 H, Ar-H), 7.70 (s, 1H, H-g), 8.32 (s, 1 H, H-e).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.6 (C-b1,j), 25.1 (C-4), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 29.7 (C-i), 30.9 (C-k), 31.8 (C-b2), 37.2 (C-d), 39.2 (C-h), 56.8 (C-l), 68.4 (C-3), 71 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂PH), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂PH), 81.3 (C-2), 92.1 (C-6), 92.9 (C-8), 101 (C-4a), 110.8 (C-2'), 112.9 (C-5'), 121.5 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.8 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 144.9 (C-4'), 148.6 (C-3'), 156.1 (C-7), 156.6 (C-8a), 159.3 (C-7), 172.6 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1642 cm⁻¹ (CO amide), 1729 cm⁻¹ (O-CO), 2851-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

Composé 13b :

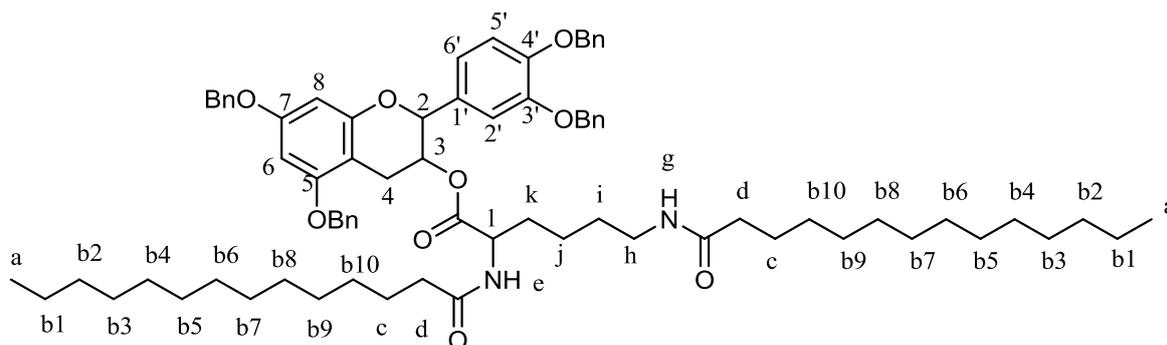


$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J = 6.9$ Hz, 6 H, H-a), 1.10-1.34 (ma, 34H, H-b,j), 1.45-1.55 (ma, 6H, H-c,i), 1.58-1.86 (ma, 2 H, H-k), 2.08-2.15 (ma, 2 H, H-d), 2.59-2.66 (dd, $J = 16.5, 8.5$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.79-2.95 (dd, $J = 16.4, 5.4$ Hz, 1 H, 4-H- β), 3.09 (t, $J = 7.1$, 2 H, H-h), 4.26 (q, $J = 4.4$ Hz, 1 H, H-l), 4.82 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.90 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.92 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5.10 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 2-H), 5.24 (q, $J = 5.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.23 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.28 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 8-H), 6.88 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.99 (s, 1 H, 2'-H), 7.30–7.46 (ma, 20 H, Ar-H), 7.71 (s, 1H, H-g), 8.30 (s, 1 H, H-e).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.7 (C-b1,j), 25.5 (C-4), 25.7 (C-c), 28.6 (C-b8,7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 29.7 (C-i), 31.3 (C-k), 31.9 (C-b2), 36.2 (C-d), 38.6 (C-h), 56.4 (C-l), 69 (C-3), 71.2 (OCH₂Ph), 71.3 (OCH₂Ph), 82.4 (C-2), 92.5 (C-6), 93 (C-8), 101.3 (C-4a), 110.4 (C-2'), 112.5 (C-5'), 120.3 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.6 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 147.1 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.8 (C-7), 156.5 (C-8a), 160.1 (C-7), 172.6 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1730 cm^{-1} (O-CO), 2849-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

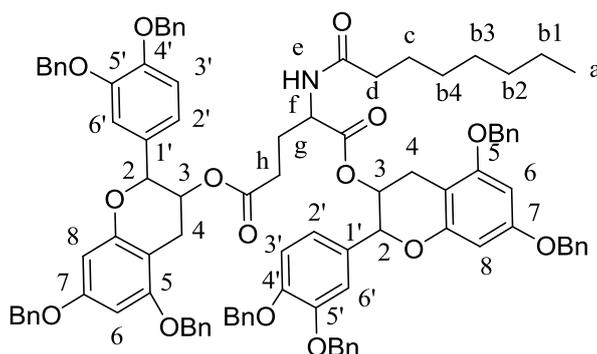
Composé 13c :



(C-d), 39.5 (C-h), 56.5 (C-1), 68.7 (C-3), 71 (OCH₂Ph), 71.2 (OCH₂Ph), 71.4 (OCH₂PH), 82.4 (C-2), 92.9 (C-6), 93.3 (C-8), 101.6 (C-4a), 110.2 (C-2'), 113.5 (C-5'), 122.1 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.9 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 147.5 (C-4'), 150 (C-3'), 155.8 (C-7), 156.5 (C-8a), 161.2 (C-7), 172.9 (COO), 174 (COO), 174.5 (COO).

IR: 1640 cm⁻¹ (CO amide), 1727 cm⁻¹ (O-CO), 2852-2923 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

Composé 12a :



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.78 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, H-a), 1.06-1.26 (ma, 8H, H-b), 1.31-1.52 (ma, 2 H, H-c), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-d), 2.25-2.37 (ma, 4 H, H-g,h), 2.58-2.62 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 2 H, 4-H-α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 2 H, 4-H-β), 4.50-4.53 (ma, 1 H, H-f), 4.88 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.91 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.98 (s, 4 H, OCH₂Ph), 5.10 (d, J = 8 Hz, 2 H, 2-H), 5.34 (q, J = 5.5 Hz, 2 H, 3-H), 6.27 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 6-H), 6.28 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 8-H), 6.87 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 2 H, 2'-H), 7.32-7.48 (ma, 40 H, Ar-H), 8.84 (s, 1 H, H-e).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 22.7 (C-b1), 25.1 (C-4), 25.6 (C-c), 26.6 (C-g), 28.6 (C-b3,4), 30.8 (C-h), 31.8 (C-b2), 36.6 (C-d), 56.2 (C-f), 69 (C-3), 70.8 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂PH), 82.4 (C-2), 92.1 (C-6), 92.9 (C-8), 101.1 (C-4a), 110.4 (C-2'), 112.5 (C-5'), 120.3 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 130.9 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 147.1 (C-4'), 149.9 (C-3'), 155.8 (C-5), 156.6 (C-8a), 159.3 (C-7), 173.1 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

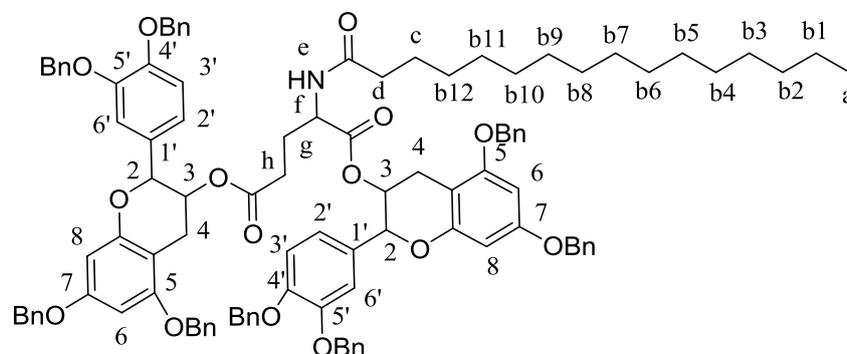
IR: 1644 cm⁻¹ (CO amide), 1735 cm⁻¹ (O-CO), 2854-2923 cm⁻¹ (chaîne aliphatique).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.78 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H, H-a), 1.07-1.29 (ma, 20H, H-b), 1.33-1.52 (ma, 6H, H-c), 2.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, H-d), 2.26-2.38 (ma, 4 H, H-g,h), 2.58-2.63 (dd, $J = 16.5, 8.5$ Hz, 2 H, 4-H- α), 2.81-2.90 (dd, $J = 16.5, 5.5$ Hz, 2 H, 4-H- β), 4.51-4.54 (ma, 1 H, H-f), 4.85 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.91 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 4 H, OCH₂Ph), 5.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, 2-H), 5.34 (q, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 3-H), 6.32 (d, $J = 2.4$ Hz, 2 H, 6-H), 6.36 (d, $J = 2.6$ Hz, 2 H, 8-H), 6.87 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.95 (s, 2 H, 2'-H), 7.32–7.46 (ma, 40 H, Ar-H), 9.5 (s, 1 H, H-e).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.8 (C-b1), 25.4 (C-4), 26 (C-c), 26.9 (C-g), 28.5 (C-b10,9), 29.2 (C-b3), 29.8 (C-b4,5,6,7,8), 31.2 (C-h), 31.7 (C-b2), 36.1 (C-d), 57.2 (C-f), 69 (C-3), 70.8 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂Ph), 82.7 (C-2), 92.2 (C-6), 92.5 (C-8), 102.4 (C-4a), 111.1 (C-2'), 113.4 (C-5'), 124.1 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 132.1 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 147.2 (C-4'), 149.8 (C-3'), 155.6 (C-5), 156.1 (C-8a), 160.2 (C-7), 173.1 (COO), 174.3 (COO), 174.5 (COO).

IR: 1642 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (O-CO), 2849-2921 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Composé 12d :



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H, H-a), 1.010-1.29 (ma, 24 H, H-b), 1.33-1.55 (ma, 6H, H-c), 2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, H-d), 2.26-2.40 (ma, 4 H, H-g,h), 2.59-2.65 (dd, $J = 16.5, 8.5$ Hz, 2 H, 4-H- α), 2.81-2.90 (dd, $J = 16.5, 5.5$ Hz, 2 H, 4-H- β), 4.51-4.55 (ma, 1 H, H-f), 4.89 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.91 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.93 (s, 4 H, OCH₂Ph), 4.94 (s, 4 H, OCH₂Ph), 5.15 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, 2-H), 5.30 (q, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 3-H), 6.32 (d, $J = 2.4$ Hz, 2 H, 6-H), 6.37 (d, $J = 2.6$ Hz, 2 H, 8-H), 6.89 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.94 (s, 2 H, 2'-H), 7.32–7.46 (ma, 40 H, Ar-H), 10.1 (s, 1 H, H-e).

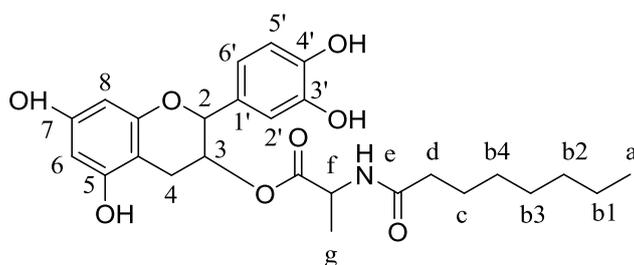
^{13}C NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 23.2 (C-b1), 25.4 (C-4), 25.7 (C-c), 26.9 (C-g), 28.2 (C-b10,9), 29.1 (C-b3), 29.8 (C-b4,5,6,7,8), 30.4 (C-h), 31.8 (C-b2), 36.4 (C-d), 57.4 (C-f), 68.7 (C-3), 70.4 (OCH₂Ph), 71.1 (OCH₂PH), 82.9 (C-2), 92.4 (C-6), 93.1 (C-8), 102.4 (C-4a), 111.9 (C-2'), 113.1 (C-5'), 124.5 (C-6'), 127.1, 127.1, 127.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.9, 128.9, 128.9, 128.9 (C-Ar), 132.1 (C-1'), 136.7, 136.7, 137.0, 137.1 (C-OCH₂Ph), 147.8 (C-4'), 150.1 (C-3'), 155.1 (C-5), 156.5 (C-8a), 159.7 (C-7), 173.1 (COO), 174 (COO), 174.5 (COO).

IR: 1639 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique).

Hydrogénation :

L'ester de catéchine benzylé est dissout dans un mélange d'éthanol absolu et acétate d'éthyle 1 :1 puis hydrogéné dans un réacteur avec du palladium sur charbon ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) a 10% pendant 20h a température ambiante a la pression de 50 bars. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur verre fritte comportant une couche de plusieurs centimetre d'épaisseur de celite. La celite est lavée abondamment par de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Après évaporation, une cire verdâtre est obtenue. Cette cire lavée avec 2* 25 mL de HCl (1 M) et 25 mL de NaCl saturé. Le produit final est un solide brun.

Composé 14a :



^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.73 (t, $J = 7$ Hz, 3 H, H-a), 1.07 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-g), 1.09-1.25 (ma, 8 H, H-b1-4), 1.37-1.51 (ma, 2 H, H-c), 1.96-2.06 (ma, 2 H, H-d), 2.47-2.58 (dd, $J = 16.6, 8.4$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.76-2.86 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.19 (μ , $J = 7.15$ Hz, 1H, H-f), 4.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5-5.1 (ma, 1 H, 3-H), 5.81 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.75 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.90 (s, 1 H, 2'-H), 8.5 (s, 1 H, H-e), 8.78 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.80 (s, 1H, 5-OH), 8.90 (s, 1H, 7-OH).

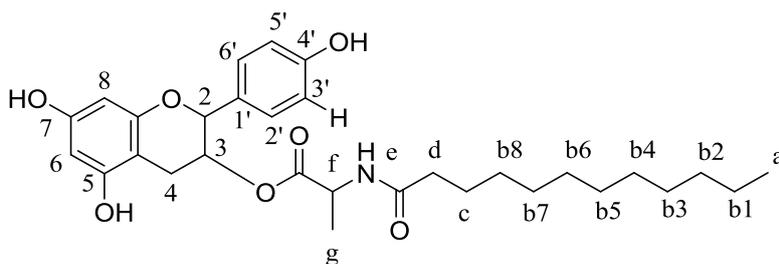
^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 17.3 (C-g), 22.7 (C-b1), 24.8 (C-4), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d), 52.4 (C-f), 69.1 (C-3), 82.4 (C-2), 94.8 (C-

8), 95 (C-6), 99 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.1 (C-5'), 121.3 (C-6'), 131.5 (C-1'), 144.6 (C-4'), 145.8 (C-3'), 157.2 (C-7), 157.3 (C-8a), 157.3 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3367 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : 120 °C

Composé 14b :



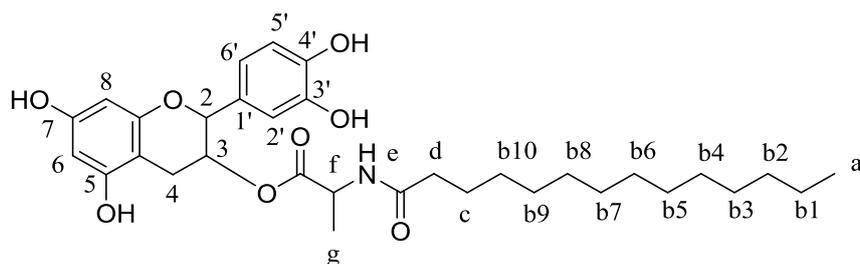
¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J = 7.2 Hz, 3 H, H-a), 1.10 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-g), 1.10-1.27 (ma, 16 H, H-b1-8), 1.37-1.21 (ma, 2 H, H-c), 1.99-2.10 (ma, 2 H, H-d), 2.49-2.60 (dd, J = 16.6, 8.3 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.76-2.88 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H- β), 4.25 (mu, J = 7.15 Hz, 1H, H-f), 4.88 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 2-H), 5.1-5.3 (ma, 1 H, 3-H), 5.84 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.67 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.75 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.92 (s, 1 H, 2'-H), 8.57 (s, 1 H, H-e), 8.79 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.85 (s, 1H, 5-OH), 8.94 (s, 1H, 7-OH) ppm.

¹³C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.3 (C-a), 17.4 (C-g), 22.7 (C-b1), 25.2 (C-4), 25.9 (C-c), 28.6 (C-b8), 28.9 (C-b7), 29.6 (C-b3,4,5,6), 32.2 (C-b2), 36.8 (C-d), 52.8 (C-f), 70.1 (C-3), 82.6 (C-2), 94.9 (C-8), 96.4 (C-6), 99.2 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.4 (C-5'), 120.9 (C-6'), 131.5 (C-1'), 144.6 (C-4'), 145.4 (C-3'), 157 (C-7), 157.3 (C-8a), 157.7 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1636 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (O-CO), 2852-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3368 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : 140 °C

Composé 14c :



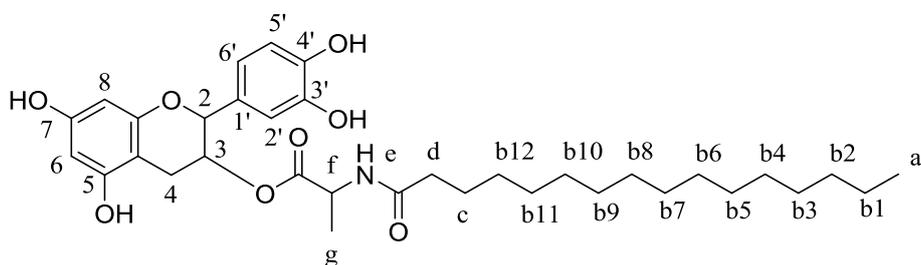
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, H-a), 1.11 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-g), 1.12-1.30 (ma, 20 H, H-b1-10), 1.37-1.21 (ma, 2 H, H-c), 2-2.10 (ma, 2 H, H-d), 2.50-2.60 (dd, $J = 16.6, 8.3$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.74-2.88 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.26 (μ , $J = 7.15$ Hz, 1H, H-f), 4.92 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5.12-5.36 (ma, 1 H, 3-H), 5.87 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.72 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.96 (s, 1 H, 2'-H), 8.61 (s, 1 H, H-e), 8.72 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.81 (s, 1H, 5-OH), 9.12 (s, 1H, 7-OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17.2 (C-g), 22 (C-b1), 25.1 (C-4), 26.2 (C-c), 28.8 (C-b10), 29 (C-b9), 29.3 (C-b3,4,5,6,7,8), 32.2 (C-b2), 37 (C-d), 52.3 (C-f), 69.7 (C-3), 82.3 (C-2), 95 (C-8), 96.2 (C-6), 100.4 (C-4a), 115.5 (C-2'), 116.2 (C-5'), 121.1 (C-6'), 131.2 (C-1'), 144.7 (C-4'), 145.9 (C-3'), 157.4 (C-7), 157.3 (C-8a), 157.3 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1642 cm^{-1} (CO amide), 1734 cm^{-1} (O-CO), $2849\text{-}2923\text{ cm}^{-1}$ (chaîne aliphatique), 3370 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : $135\text{ }^\circ\text{C}$

Composé 14d :



$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, H-a), 1.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-g), 1.1-1.34 (ma, 24 H, H-b1-12), 1.37-1.21 (ma, 2 H, H-c), 2-2.10 (ma, 2 H, H-d), 2.50-2.60 (dd, $J = 16.6, 8.3$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.74-2.88 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 1 H, 4-H- β), 4.27 (μ , $J = 7.15$ Hz, 1H, H-f), 4.9 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5.12-5.33 (ma, 1 H, 3-H), 5.8 (d, $J =$

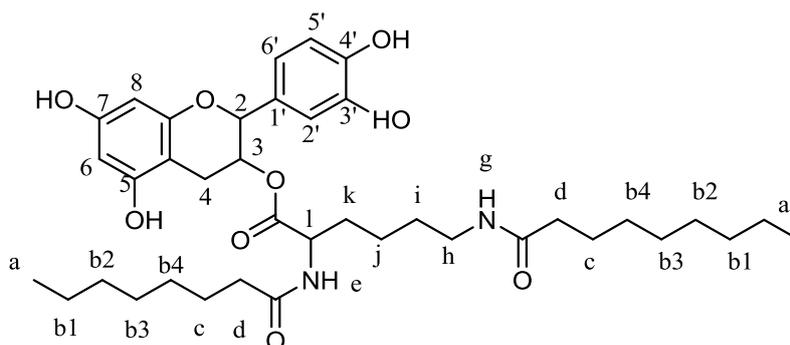
2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.9 (s, 1 H, 2'-H), 8.62 (s, 1 H, H-e), 8.71 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 8.8 (s, 1H, 5-OH), 8.94 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17.2 (C-g), 22 (C-b1), 25.1 (C-4), 26.2 (C-c), 28.8 (C-b12), 29 (C-b11), 29.3 (C-b3,4,5,6,7,8,9,10), 32 (C-b2), 37.4 (C-d), 52.4 (C-f), 69.56 (C-3), 82.3 (C-2), 95.2 (C-8), 96.3 (C-6), 99.3 (C-4a), 115.3 (C-2'), 116.1 (C-5'), 121.7 (C-6'), 131.2 (C-1'), 144.2 (C-4'), 146 (C-3'), 157.4 (C-7), 157.3 (C-8a), 157.3 (C-7), 173.9 (COO).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1737 cm^{-1} (O-CO), 2850-2927 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3366 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : 150 °C

Composé 16a :



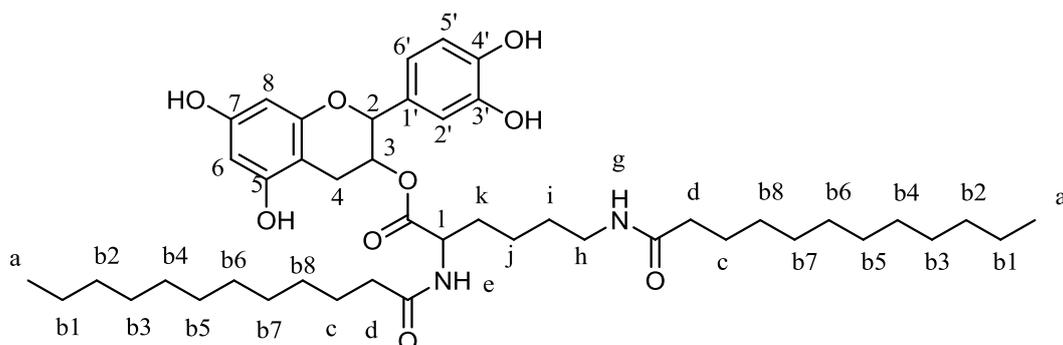
^1H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J = 7.1$ Hz, 6 H, H-a), 1.08-1.35 (ma, 18 H, H-b,j), 1.42-1.56 (ma, 6H, H-c,i), 1.57-1.81 (ma, 2 H, H-k), 2.06-2.13 (ma, 2 H, H-d), 2.58-2.62 (dd, $J = 16.7, 8.5$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 1 H, 4-H- β), 3.10 (t, $J = 7, 2$ H, H-h), 4.25 (q, $J = 4.4$ Hz, 1 H, H-l), 5.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 2-H), 5.91 (q, $J = 5.3$ Hz, 1 H, 3-H), 5.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.28 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.87 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 1 H, 2'-H), 7.75 (s, 1H, H-g), 8.32 (s, 1 H, H-e), 8.80 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1,j), 24.8 (C-4), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b3,4), 29.3 (C-b2), 29.7 (C-i), 30.9 (C-k), 31.8 (C-b2), 36.5 (C-d), 39.2 (C-h), 56.8 (C-l), 69 (C-3), 82.4 (C-2), 94.8 (C-6), 95.3 (C-8), 99.4 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.1 (C-5'), 121.5 (C-6'), 131.5 (C-1'), 144.6 (C-4'), 145.8 (C-3'), 157.2 (C-5), 157.3 (C-8a), 157.8 (C-7), 172.6 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1638 cm⁻¹ (CO amide), 1727 cm⁻¹ (O-CO), 2851-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3375 cm⁻¹ (OH phénolique)

P_f : 145 °C

Composé 16b :



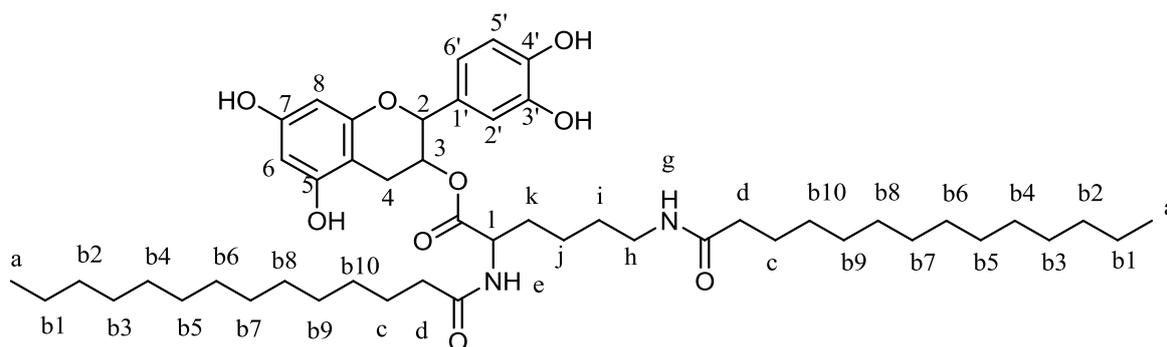
¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.8 (t, J = 7.3 Hz, 6 H, H-a), 1.08-1.37 (ma, 34 H, H-b,j), 1.42-1.56 (ma, 6H, H-c,i), 1.57-1.81 (ma, 2 H, H-k), 2.06-2.13 (ma, 2 H, H-d), 2.58-2.62 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 1 H, 4-H-α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 1 H, 4-H-β), 3.10 (t, J = 7, 2 H, H-h), 4.25 (q, J = 4.4 Hz, 1 H, H-l), 5.35 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 2-H), 5.9 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 5.97 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.23 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.8 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 1 H, 2'-H), 7.72 (s, 1H, H-g), 8.36 (s, 1 H, H-e), 8.82 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 22.7 (C-b1,j), 25.5 (C-4), 25.7 (C-c), 28.6 (C-b8,7), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 29.7 (C-i), 31.4 (C-k), 32 (C-b2), 36.5 (C-d), 39.6 (C-h), 56.7 (C-l), 69.5 (C-3), 82.5 (C-2), 95 (C-6), 95.7 (C-8), 100.5 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.2 (C-5'), 121.7 (C-6'), 131.9 (C-1'), 144.2 (C-4'), 146 (C-3'), 157.2 (C-5), 157.3 (C-8a), 157.8 (C-7), 172.6 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1640 cm⁻¹ (CO amide), 1725 cm⁻¹ (O-CO), 2851-2922 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), 3371 cm⁻¹ (OH phénolique)

P_f : 160 °C

Composé 16c :



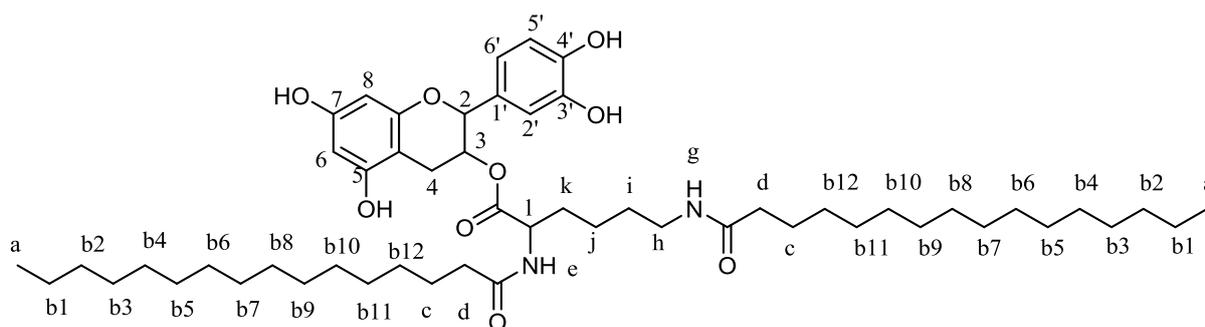
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, $J = 7.5$ Hz, 6 H, H-a), 1.06-1.37 (ma, 42 H, H-b,j), 1.42-1.52 (ma, 6H, H-c,i), 1.57-1.85 (ma, 2 H, H-k), 2.07-2.13 (ma, 2 H, H-d), 2.59-2.63 (dd, $J = 16.5, 8.5$ Hz, 1 H, 4-H- α), 2.75-2.92 (dd, $J = 16.5, 5.2$ Hz, 1 H, 4-H- β), 3.12 (t, $J = 7, 2$ H, H-h), 4.27 (q, $J = 4.4$ Hz, 1 H, H-l), 5.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 2-H), 6 (q, $J = 5.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.12 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.23 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.82 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 7.1 (s, 1 H, 2'-H), 7.73 (s, 1H, H-g), 8.37 (s, 1 H, H-e), 8.97 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.7 (C-b1,j), 25.1 (C-4), 25.6 (C-c), 28.6 (C-b10), 28,9 (C-b9), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 30.6 (C-i), 31.3 (C-k), 32.1 (C-b2), 36.7 (C-d), 39.6 (C-h), 56.3 (C-l), 70.1 (C-3), 82.3 (C-2), 94.89 (C-6), 95.68 (C-8), 101.4 (C-4a), 115.2 (C-2'), 116.2 (C-5'), 121.7 (C-6'), 132.4 (C-1'), 144.1 (C-4'), 146.1 (C-3'), 157.4 (C-5), 157.5 (C-8a), 158.1 (C-7), 172.6 (COO), 174 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1728 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3365 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : 170 $^{\circ}\text{C}$

Composé 16d :



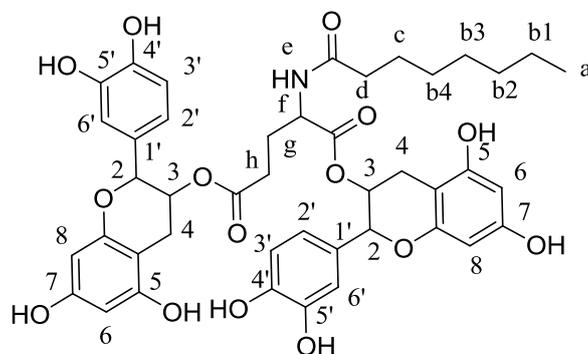
^1H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.79 (t, J = 7.2 Hz, 6 H, H-a), 1.08-1.40 (ma, 50 H, H-b,j), 1.42-1.52 (ma, 6H, H-c,i), 1.55-1.85 (ma, 2 H, H-k), 2.1-2.15 (ma, 2 H, H-d), 2.6-2.65 (dd, J = 16.5, 8.5 Hz, 1 H, 4-H- α), 2.75-2.92 (dd, J = 16.5, 5.2 Hz, 1 H, 4-H- β), 3.13 (t, J = 7, 2 H, H-h), 4.28 (q, J = 4.4 Hz, 1 H, H-l), 5.31 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 2-H), 5.97 (q, J = 5.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.13 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.25 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.84 (s, 2 H, 5'-H, 6'-H), 7.13 (s, 1 H, 2'-H), 7.74 (s, 1H, H-g), 8.39 (s, 1 H, H-e), 8.99 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.8 (C-b1,j), 25.3 (C-4), 25.6 (C-c), 28.7 (C-b12), 28,9 (C-b11), 29.3 (C-b3), 29.7 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 30.7 (C-i), 31.8 (C-k), 32.1 (C-b2), 36.9 (C-d), 40.1 (C-h), 56.4 (C-l), 70.1 (C-3), 82.5 (C-2), 94.5 (C-6), 95.7 (C-8), 101.7 (C-4a), 115.4 (C-2'), 116.6 (C-5'), 121.3 (C-6'), 132.4 (C-1'), 144 (C-4'), 146.1 (C-3'), 157.4 (C-5), 157.5 (C-8a), 158.1 (C-7), 172.8 (COO), 174 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1639 cm^{-1} (CO amide), 1727 cm^{-1} (O-CO), 2854-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3365 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f: 180 °C

Composé 15a :



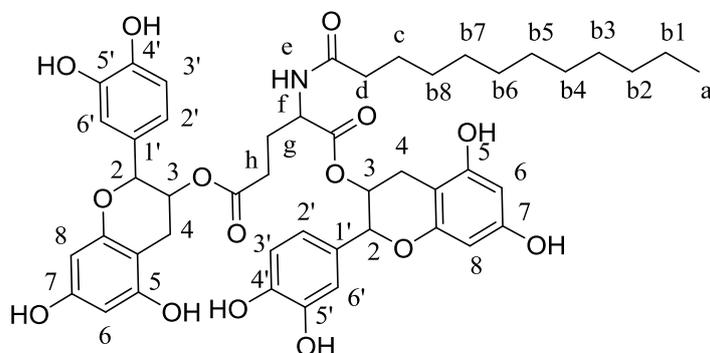
^1H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.07-1.28 (ma, 8H, H-b,), 1.31-1.53 (ma, 2 H, H-c), 2.05 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-d), 2.24-2.37 (ma, 4 H, H-g,h), 2.58-2.62 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 2 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 2 H, 4-H- β), 4.51-4.53 (ma, 1 H, H-f), 5.10 (d, J = 8 Hz, 2 H, 2-H), 5.34 (q, J = 5.5 Hz, 2 H, 3-H), 6.27 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 6-H), 6.28 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 8-H), 6.87 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 2 H, 2'-H), 8.32 (s, 1 H, H-e), 8.80 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 22.7 (C-b1), 24.8 (C-4), 25.6 (C-c), 26.6 (C-g), 28.6 (C-b3,4), 30.8 (C-h), 31.8 (C-b2), 36.6 (C-d), 56.6 (C-f), 69 (C-3), 82.4 (C-2), 94.8 (C-8), 95.3 (C-6), 99.4 (C-4a), 115.2 (C-6'), 116.3 (C-3'), 121 (C-2'), 136.1 (C-1'), 144.6 (C-4'), 145.9 (C-5'), 155.8 (C-5), 156.6 (C-8a), 159.3 (C-7), 173.1 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1638 cm^{-1} (CO amide), 1730 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3370 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f: 140 °C

Composé 15b :



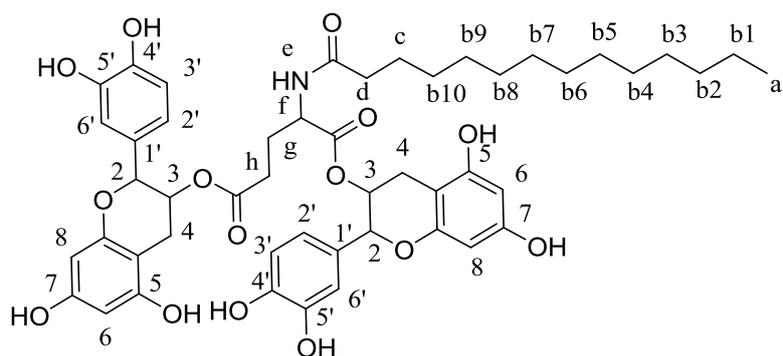
^1H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.1-1.28 (ma, 16 H, H-b), 1.31-1.56 (ma, 2 H, H-c), 2.08 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-d), 2.24-2.37 (ma, 4 H, H-g,h), 2.6-2.68 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 2 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 2 H, 4-H- β), 4.51-4.53 (ma, 1 H, H-f), 5.16 (d, J = 8 Hz, 2 H, 2-H), 5.36 (q, J = 5.5 Hz, 2 H, 3-H), 6.28 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 6-H), 6.39 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 8-H), 6.89 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.97 (s, 2 H, 2'-H), 8.32 (s, 1 H, H-e), 8.80 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 22.8 (C-b1), 25.3 (C-4), 25.9 (C-c), 26.9 (C-g), 28.5 (C-b7,8), 29.3 (C-b3), 29.6 (C-b4,5,6), 30.8 (C-h), 31.9 (C-b2), 36.7 (C-d), 56.6 (C-f), 69.4 (C-3), 82.4 (C-2), 94.8 (C-8), 95.3 (C-6), 100.5 (C-4a), 115.2 (C-6'), 116.7 (C-3'), 121.4 (C-2'), 136.1 (C-1'), 144.7 (C-4'), 145.9 (C-5'), 155.8 (C-5), 156.2 (C-8a), 159.3 (C-7), 173.1 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1640 cm^{-1} (CO amide), 1734 cm^{-1} (O-CO), 2850-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3375 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f: 166 °C

Composé 15c :



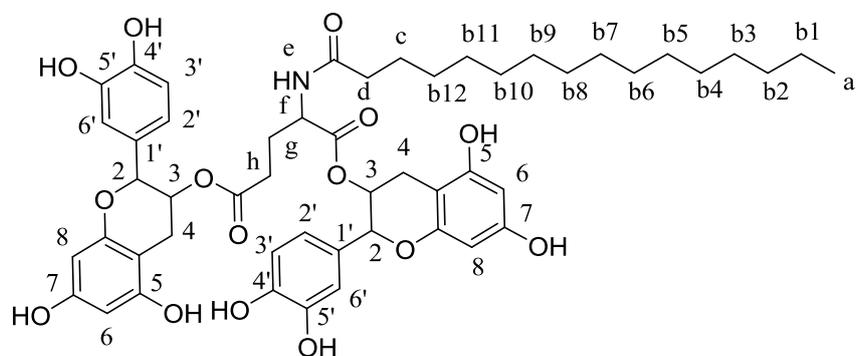
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.15-1.28 (ma, 20 H, H-b), 1.31-1.59 (ma, 2 H, H-c), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-d), 2.24-2.38 (ma, 4 H, H-g,h), 2.6-2.68 (dd, J = 16.7, 8.5 Hz, 2 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, J = 16.5, 5.4 Hz, 2 H, 4-H- β), 4.36-4.53 (ma, 1 H, H-f), 5.18 (d, J = 8 Hz, 2 H, 2-H), 5.40 (q, J = 5.5 Hz, 2 H, 3-H), 6.32 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 6-H), 6.41 (d, J = 2.5 Hz, 2 H, 8-H), 6.87 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.98 (s, 2 H, 2'-H), 8.32 (s, 1 H, H-e), 8.96 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 22.8 (C-b1), 25.4 (C-4), 26 (C-c), 26.9 (C-g), 28.5 (C-b10,9), 29.2 (C-b3), 29.8 (C-b4,5,6,7,8), 31.2 (C-h), 31.7 (C-b2), 36.1 (C-d), 57.2 (C-f), 69 (C-3), 82.6 (C-2), 94.8 (C-8), 95.3 (C-6), 100.9 (C-4a), 115.2 (C-6'), 116.7 (C-3'), 121.4 (C-2'), 136.1 (C-1'), 144.7 (C-4'), 145.9 (C-5'), 155.8 (C-5), 156.4 (C-8a), 159.3 (C-7), 173.1 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1638 cm^{-1} (CO amide), 1728 cm^{-1} (O-CO), 2851-2925 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3372 cm^{-1} (OH phénolique)

P_f : 175 °C

Composé 15d :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-a), 1.15-1.28 (ma, 24 H, H-b), 1.31-1.59 (ma, 2 H, H-c), 2.06 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H-d), 2.23-2.38 (ma, 4 H, H-g,h), 2.62-2.68 (dd, $J = 16.7, 8.5$ Hz, 2 H, 4-H- α), 2.77-2.90 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 2 H, 4-H- β), 4.35-4.53 (ma, 1 H, H-f), 5.12 (d, $J = 8$ Hz, 2 H, 2-H), 5.37 (q, $J = 5.5$ Hz, 2 H, 3-H), 6.30 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H, 6-H), 6.41 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H, 8-H), 6.85 (s, 4 H, 5'-H, 6'-H), 6.9 (s, 2 H, 2'-H), 8.32 (s, 1 H, H-e), 8.98 (s, 2H, 3'-OH, 4'-OH), 9.02 (s, 1H, 5-OH), 9.09 (s, 1H, 7-OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) = 14.2 (C-a), 22.9 (C-b1), 25.7 (C-4), 26.3 (C-c), 26.9 (C-g), 28.6 (C-b12,11), 29.2 (C-b3), 29.8 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 31.3 (C-h), 31.8 (C-b2), 36.8 (C-d), 57 (C-f), 69.5 (C-3), 82.7 (C-2), 94.9 (C-8), 96 (C-6), 101.6 (C-4a), 115.3 (C-6'), 116.8 (C-3'), 121.2 (C-2'), 136.3 (C-1'), 144.9 (C-4'), 146 (C-5'), 155 (C-), 156.4 (C-8a), 159.3 (C-7), 173.1 (COO), 173.9 (COO), 174.1 (COO).

IR: 1641 cm^{-1} (CO amide), 1735 cm^{-1} (O-CO), 2851-2922 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 3369 cm^{-1} (OH phénolique)

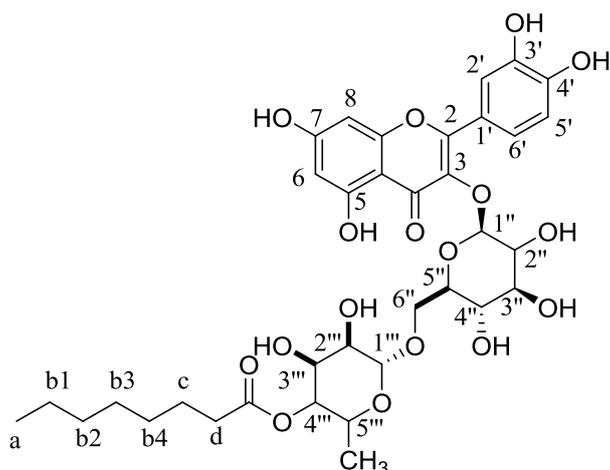
P_f : 190 °C

1.4. Synthèse des composés bi-modulaires de type IV et V

Tous les flavonoïdes ont été séchés au préalable, ainsi que le solvant avec du tamis moléculaire 4 Å.

La synthèse a été réalisée dans un carrousel radley's tech muni d'un thermostat. 5g/L de flavonoïdes sont solubilisé dans 75 mL de 2-methyl 2-butanol préalablement séché avec du tamis moléculaire 4Å, et les acides gras sont ajoutés dans le ballon. Le mélange est agité pendant 24 heures en présence de tamis moléculaires présent dans un petit sachet. Les enzymes sont ajoutés. Des échantillons sont prélevés toutes les demie heures, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24 h, 48h, 72h, 96 h, 120h et 144h puis dilués 30 fois avec du méthanol, et filtrés afin d'éliminer CALB puis analysés en HPLC. Les réactions ont été répétées 3 fois. A la fin de la réaction, le milieu réactionnelle a été filtré sur Buchner afin d'éliminer l'enzyme, une partie du solvant a été évaporée avant de passer à la purification par chromatographie semi-préparative.

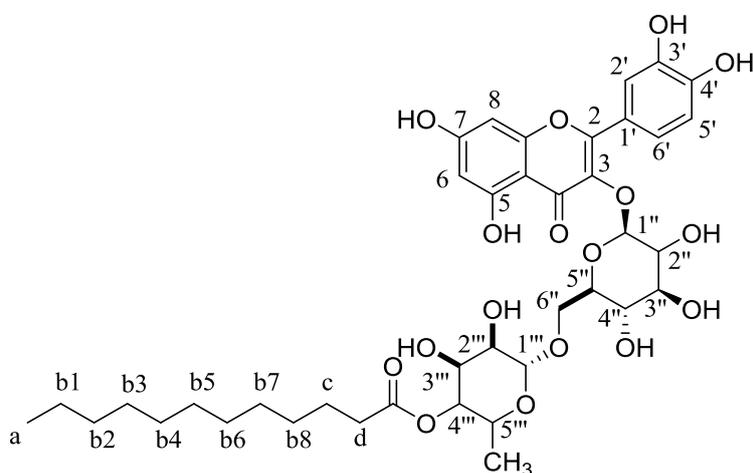
Composé 17a :



¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 0.76 (d, J = 6.18 Hz, 3 H, CH₃ rhamnose), 0.85 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.12-1.34 (ma, 8 H, H-b), 1.38-1.54 (ma, 2 H, H-c), 2.11, 2.18 (ma, 2 H, H-d), 3.11-3.56 (ma, 8 H, H sucre), 3.68 (d, J = 10.6 Hz, 1 H, H sucre), 4.45 (s, 1 H, H-1'''), 4.46 (t, J = 9.8 Hz, 1 H, H-4'''), 5.43 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H-1''), 6.18 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-6), 6.36 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-8), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-5), 7.5 (s, 1 H, H-6'), 7.52 (s, 1 H, H-2').

¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 14.8 (C-a), 17.9 (C-rhamnose), 23 (C-b1), 25.3 (C-c), 30 (C-b3,4), 32 (C-b2), 34.2 (C-d), 66.5 (C-6''), 67.6 (C-5'''), 68.9 (C-4''), 70.3 (C-3'''), 71.2 (C-2'''), 74.1 (C-4'''), 74.9 (C-2''), 76.3 (C-5''), 77.3 (C-3''), 94.3 (C-8), 99.5 (C-6), 101.3 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 104.7 (C-5a), 116 (C-2''), 117.1 (C-5'), 122 (C-6'), 122.4 (C-1'), 134.1 (C-3), 145.5 (C-3'), 149.2 (C-4'), 157.2 (C-2), 157.46 (C-5), 162, (C-8a), 165 (C-7), 173.5 (CO ester), 178.2 (C-4).

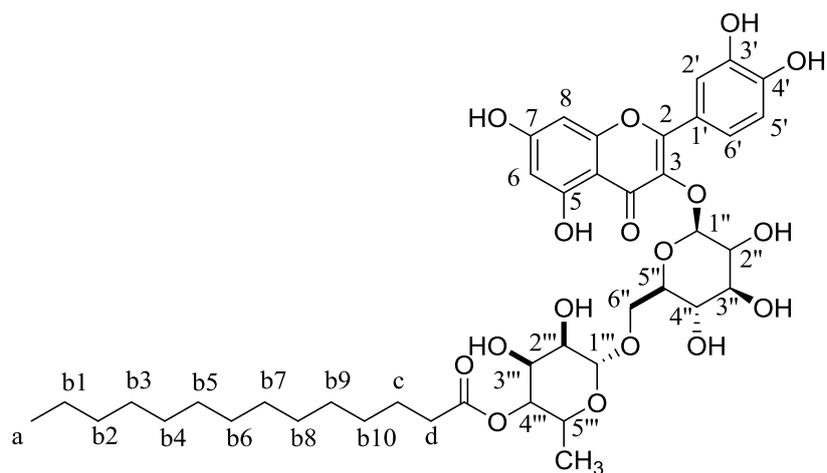
Composé 17b :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.76 (d, J = 6.18 Hz, 3 H, CH_3 rhamnose), 0.85 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.12-1.34 (ma, 16 H, H-b), 1.37-1.57 (ma, 2 H, H-c), 2.11-2.20 (ma, 2 H, H-d), 3.15-3.56 (ma, 8 H, H sucre), 3.70 (d, J = 10.4 Hz, 1 H, H sucre), 4.48 (s, 1 H, H-1'''), 4.48 (t, J = 10 Hz, 1 H, H-4'''), 5.43 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H-1''), 6.18 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-6), 6.42 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-8), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-5), 7.51 (s, 1 H, H-6'), 7.53 (s, 1 H, H-2').

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 14.1 (C-a), 17.9 (C-rhamnose), 23.1 (C-b1), 25.5 (C-c), 29.1 (C-b8), 29.3 (C-b3,7), 29.6 (C-b4,5,6), 32.2 (C-b2), 34.2 (C-d), 66.9 (C-6''), 67.6 (C-5'''), 69.1 (C-4''), 70.7 (C-3'''), 71.2 (C-2'''), 74.2 (C-4'''), 74.9 (C2''), 76.7 (C-5''), 77.8 (C-3''), 94.7 (C-8), 100 (C-6), 101.4 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 104.7 (C-5a), 116.4 (C-2''), 117.5 (C-5'), 122.1 (C-6'), 122.4 (C-1'), 134.5 (C-3), 145.7 (C-3'), 149.5 (C-4'), 157.8 (C-2), 157.9 (C-5), 162, (C-8a), 165.8 (C-7), 173.5 (CO ester), 178.2 (C-4).

Composé 17c :

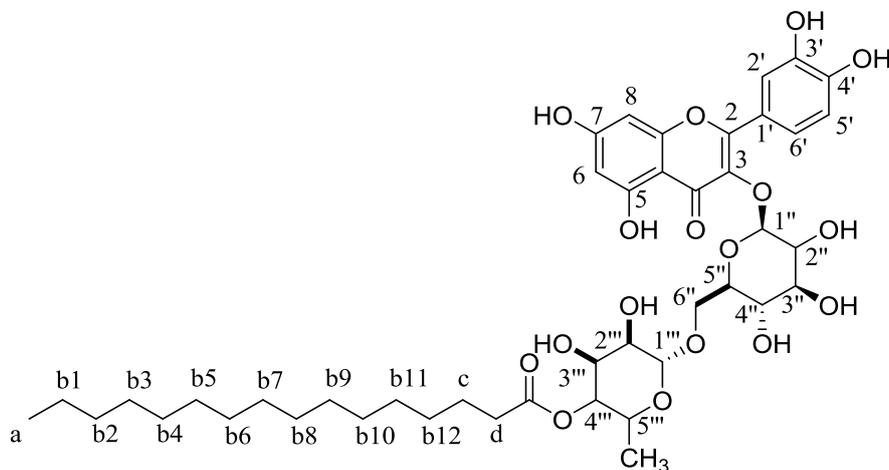


^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.77 (d, J = 6.18 Hz, 3 H, CH_3 rhamnose), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.12-1.33 (ma, 20 H, H-b), 1.38-1.57 (ma, 2 H, H-c), 2.11-2.18 (ma, 2 H, H-d), 3.13-3.56 (ma, 8 H, H sucre), 3.71 (d, J = 10.6 Hz, 1 H, H sucre), 4.47 (s, 1 H, H-1'''), 4.48 (t, J = 9.8 Hz, 1 H, H-4'''), 5.45 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H-1''), 6.19 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-6), 6.36 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-8), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-5), 7.51 (s, 1 H, H-6'), 7.53 (s, 1 H, H-2').

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 14.8 (C-a), 17.9 (C-rhamnose), 23 (C-b1), 25.3 (C-c), 29 (C-b10), 29.3 (C-b3,9), 29.6 (C-b4,5,6,7,8), 32 (C-b2), 34.2 (C-d), 66.5 (C-6''), 67.6 (C-5'''), 68.9 (C-4''), 70.3 (C-3'''), 71.2 (C-2'''), 74.1 (C-4'''), 74.9 (C2''), 76.3 (C-5''), 77.3 (C-3''), 94.3 (C-8), 99.5 (C-6), 101.3 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 104.7 (C-5a), 116 (C-2''), 117.1 (C-5'),

122 (C-6'), 122.4 (C-1'), 134.1 (C-3), 145.5 (C-3'), 149.2 (C-4'), 157.2 (C-2), 157.46 (C-5), 162 (C-8a), 165 (C-7), 173.5 (CO ester), 178.2 (C-4).

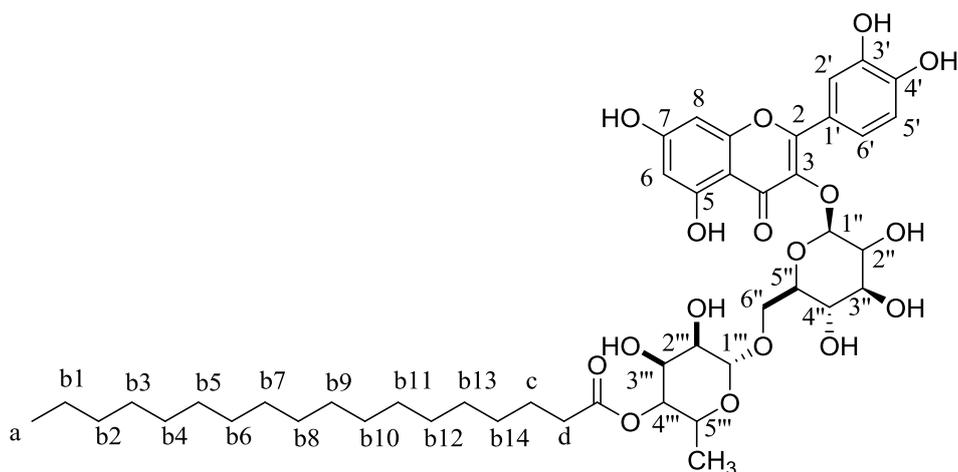
Composé 17d :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.75 (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H, CH_3 rhamnose), 0.87 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-a), 1.10-1.33 (ma, 24 H, H-b), 1.38-1.6 (ma, 2 H, H-c), 2.11-2.18 (ma, 2 H, H-d), 3.13-3.59 (ma, 8 H, H sucre), 3.72 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H sucre), 4.5 (s, 1 H, H-1'''), 4.53 (t, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-4'''), 5.47 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 6.21 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, H-6), 6.34 (d, $J = 1.9$ Hz, 1 H, H-8), 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-5), 7.5 (s, 1 H, H-6'), 7.53 (s, 1 H, H-2') ppm.

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 14.1$ (C-a), 18.1 (C-rhamnose), 23.5 (C-b1), 25.3 (C-c), 29.2 (C-b12), 29.4 (C-b3,11), 29.8 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 32.7 (C-b2), 34.3 (C-d), 66.7 (C-6''), 67.6 (C-5'''), 69.6 (C-4''), 70.1 (C-3'''), 71.2 (C-2'''), 74.5 (C-4'''), 75.1 (C-2''), 76.3 (C-5'), 77.3 (C-3''), 94.3 (C-8), 100.6 (C-6), 101.3 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 104.9 (C-5a), 116 (C-2''), 117.1 (C-5'), 122.5 (C-6'), 125.84 (C-1'), 134.1 (C-3), 145.6 (C-3'), 149.2 (C-4'), 157.2 (C-2), 157.46 (C-5), 162.8 (C-8a), 165.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 178.2 (C-4) ppm.

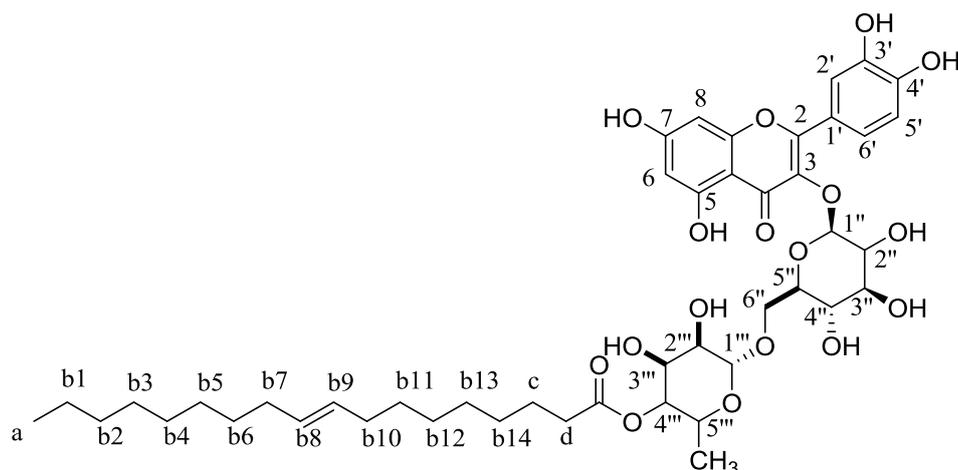
Composé 17e :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.73 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, CH_3 rhamnose), 0.89 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.14-1.33 (ma, 28 H, H-b), 1.38-1.6 (ma, 2 H, H-c), 2.1-2.21 (ma, 2 H, H-d), 3.13-3.56 (ma, 8 H, H sucre), 3.7 (d, J = 10.5 Hz, 1 H, H sucre), 4.51 (s, 1 H, H-1'''), 4.55 (t, J = 9.8 Hz, 1 H, H-4'''), 5.48 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H-1''), 6.24 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-6), 6.35 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-8), 6.85 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-5), 7.51 (s, 1 H, H-6'), 7.53 (s, 1 H, H-2') ppm.

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 18.2 (C-rhamnose), 23.6 (C-b1), 25.7 (C-c), 29.3 (C-b14), 29.6 (C-b3,13), 29.8 (C-b4,5,6,7,8,9,10,11,12), 32 (C-b2), 34.8 (C-d), 66.1 (C-6''), 68.3 (C-5'''), 69.1 (C-4''), 70.7 (C-3'''), 71.5 (C-2'''), 74.6 (C-4'''), 75.2 (C-2''), 76.4 (C-5''), 77.6 (C-3''), 94 (C-8), 100.4 (C-6), 101.2 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 105.1 (C-5a), 116.3 (C-2''), 117.4 (C-5'), 122.7 (C-6'), 125.9 (C-1'), 135.4 (C-3), 145.6 (C-3'), 149.2 (C-4'), 157.1 (C-2), 157.6 (C-5), 162.4 (C-8a), 165.8 (C-7), 173.5 (CO ester), 178 (C-4).

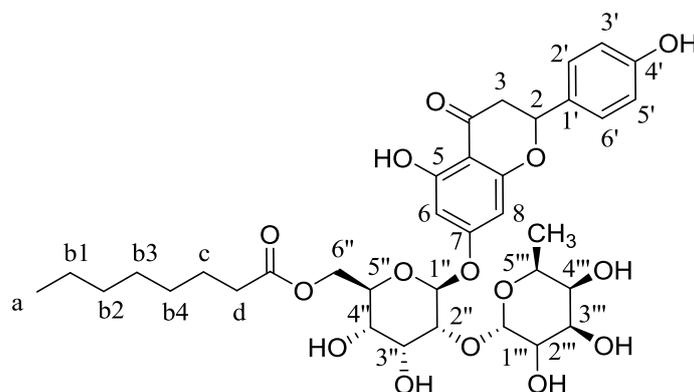
Composé 17f :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.73 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, CH_3 rhamnose), 0.89 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-a), 1.14-1.33 (ma, 28 H, H-b1,2,3,4,5,6,11,12,13,14), 1.38-1.6 (ma, 2 H, H-c), 1.98-2.09 (ma, 4 H, H-b7,10), 2.1-2.21 (ma, 2 H, H-d), 3.13-3.56 (ma, 8 H, H sucre), 3.7 (d, J = 10.5 Hz, 1 H, H sucre), 4.51 (s, 1 H, H-1'''), 4.55 (t, J = 9.8 Hz, 1 H, H-4'''), 5.40-5.43 (ma, 2 H, H-b,9), 5.48 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, H-1''), 6.24 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-6), 6.35 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-8), 6.85 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-5), 7.51 (s, 1 H, H-6'), 7.53 (s, 1 H, H-2').

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 18.2 (C-rhamnose), 23.6 (C-b1), 25.7 (C-c), 29 (C-b14), 29.3 (C-b3), 29.4 (C-b13), 29.7 (C-b4,5,12), 29.9 (C-b6,11), 31.9 (C-b2), 33.7 (C-b7,10), 34.2 (C-d), 66.1 (C-6''), 68.3 (C-5'''), 69.1 (C-4''), 70.7 (C-3'''), 71.5 (C-2'''), 74.6 (C-4'''), 75.2 (C-2''), 76.4 (C-5''), 77.6 (C-3''), 94 (C-8), 100.4 (C-6), 101.2 (C-1'''), 101.7 (C-1''), 105.1 (C-5a), 116.3 (C-2''), 117.4 (C-5'), 122.7 (C-6'), 125.9 (C-1'), 130.6 (C-b8,9), 135.4 (C-3), 145.6 (C-3'), 149.2 (C-4'), 157.1 (C-2), 157.6 (C-5), 162.4 (C-8a), 165.8 (C-7), 173.5 (CO ester), 178 (C-4).

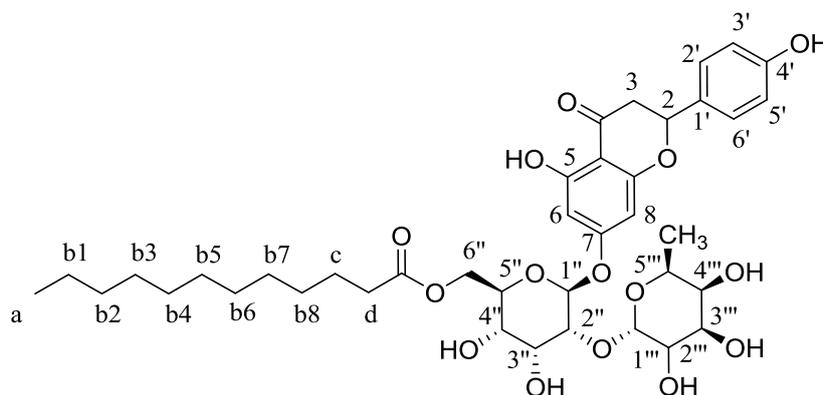
Composé 18a :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.85 (t, J = 6.85 Hz, 3 H, H-a), 1.17 (d, J = 5.8 Hz, 3 H, CH_3), 1.2-1.31 (ma, 8 H, H-b), 1.32-1.54 (ma, 2 H, H-c), 2.12-2.33 (ma, 2 H, H-d), 2.76 (dd, J = 17.2, 2.8 Hz, 1 H, H-3 α), 3.15-3.17 (ma, 1 H, H-3 β), 3.36–3.94 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.51 (s, 1 H, OH-3'''), 4.71 (s, 1 H, OH-3''), 4.77 (s, 1 H, OH-2'''), 4.88 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 5.11–5.13 (ma, 1 H, H-1''), 5.24-5.25 (ma, 1 H, H-1'''), 5.36–5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.16 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-8), 6.19 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2'; H-6'), 9.06 (s, 1 H, OH-4'), 12.06 (s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17 (C- CH_3), 22.7 (C-b1), 25 (C-c), 29 (C-b3,4), 31.8 (C-b2), 33.9 (C-d), 43 (C-3), 63.1 (C-6''), 72 (C-4''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.1 (C-2'''), 74.2 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.2 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 94.1 (C-8), 94.9 (C-6), 101.8 (C-5a), 107 (C-1''), 110.1 (C-1'''), 116.1 (C-5', 3'), 127.4 (C-6', 2'), 130.1 (C-1'), 145.7 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163 (C-5), 166.5 (C-7), 173 (CO ester), 196.8 (CO).

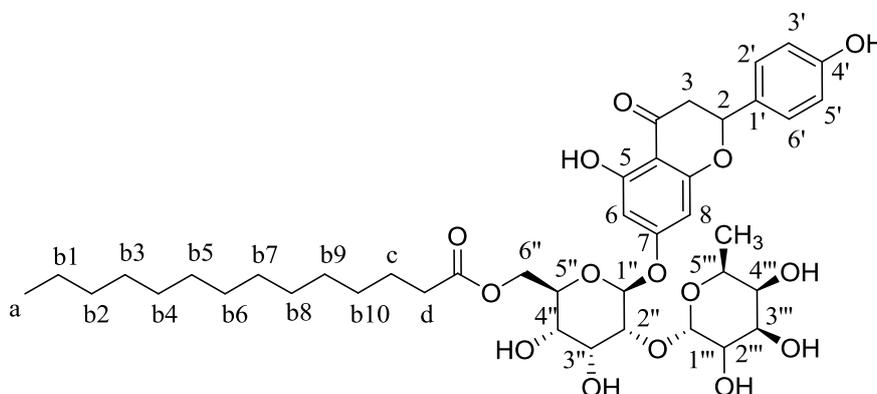
Composé 18b :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.82 (t, J = 7 Hz, 3 H, H-a), 1.17 (d, J = 5.7 Hz, 3 H, CH_3), 1.22-1.34 (ma, 16 H, H-b), 1.37-1.56 (ma, 2 H, H-c), 2.17-2.34 (ma, 2 H, H-d), 2.80 (dd, J = 17, 2.8 Hz, 1 H, H-3 α), 3.16-3.18 (ma, 1 H, H-3 β), 3.38–3.96 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.50 (s, 1 H, OH-3'''), 4.73 (s, 1 H, OH-3''), 4.75 (s, 1 H, OH-2'''), 4.89 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 5.12–5.15 (ma, 1 H, H-1''), 5.26-5.28 (ma, 1 H, H-1'''), 5.36–5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.16 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-8), 6.19 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2'; H-6'), 9.06 (s, 1 H, OH-4'), 12.1 (s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14.1 (C-a), 17 (C- CH_3), 22.7 (C-b1), 25 (C-c), 29 (C-b8), 29.3 (C-b3,7), 29.6 (C-b4,5,6), 31.9 (C-b2), 33.9 (C-d), 43 (C-3), 63.1 (C-6''), 72 (C-

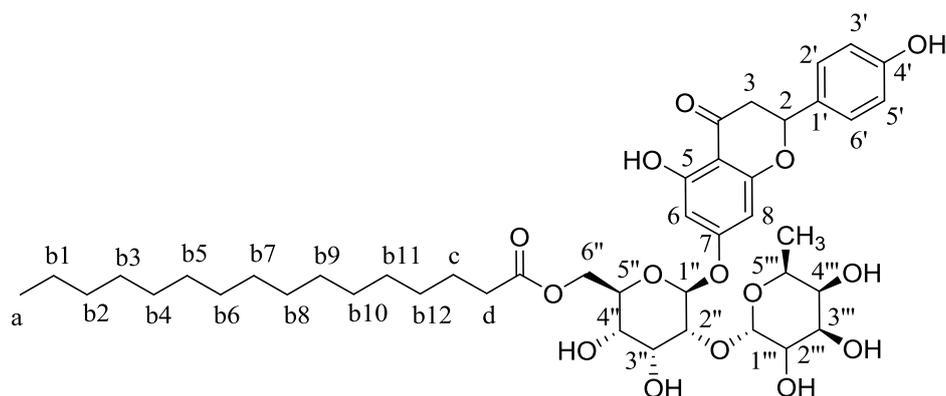
4''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.1 (C-2'''), 74.5 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 94.1 (C-8), 95 (C-6), 101.8 (C-5a), 107.4 (C-1''), 110.9 (C-1'''), 116.1 (C-5', 3'), 127.4 (C-6', 2'), 130.1 (C-1'), 145.8 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163 (C-5), 166.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 196.8 (CO). **Composé 18c** :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7 Hz, 3 H, H-a), 1.17 (d, J = 5.7 Hz, 3 H, CH_3), 1.20-1.35 (ma, 20 H, H-b), 1.37-1.57 (ma, 2 H, H-c), 2.17-2.32 (ma, 2 H, H-d), 2.78 (dd, J = 17, 3 Hz, 1 H, H-3 α), 3.16-3.19 (ma, 1 H, H-3 β), 3.40-4 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.49 (s, 1 H, OH-3'''), 4.74 (s, 1 H, OH-3''), 4.76 (s, 1 H, OH-2'''), 4.9 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 5.12-5.15 (ma, 1 H, H-1''), 5.26-5.29 (ma, 1 H, H-1'''), 5.35-5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.15 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-8), 6.19 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2'; H-6'), 9.04 (s, 1 H, OH-4'), 12.1 (s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 17.1 (C- CH_3), 22.8 (C-b1), 25.2 (C-c), 29 (C-b10), 29.3 (C-b3,9), 29.7 (C-b4,5,6,7,8), 32 (C-b2), 33.9 (C-d), 43.5 (C-3), 63.1 (C-6''), 72 (C-4''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.1 (C-2'''), 74.5 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 94 (C-8), 94.9 (C-6), 101.5 (C-5a), 107.2 (C-1''), 111 (C-1'''), 116.2 (C-5', 3'), 127.4 (C-6', 2'), 130 (C-1'), 145.9 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163.1 (C-5), 166.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 196.8 (CO).

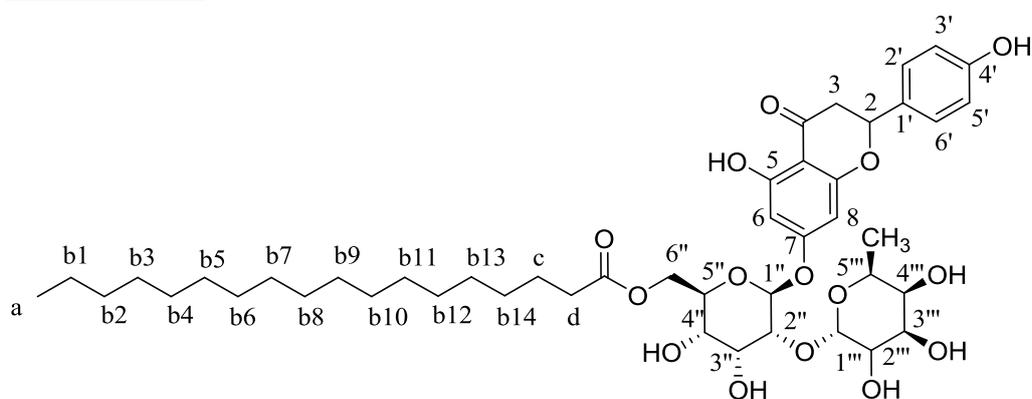
Composé 18d :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, H-a), 1.18 (d, $J = 5.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.19-1.35 (ma, 24 H, H-b), 1.37-1.58 (ma, 2 H, H-c), 2.15-2.32 (ma, 2 H, H-d), 2.78 (dd, $J = 17, 3$ Hz, 1 H, H-3 α), 3.15-3.19 (ma, 1 H, H-3 β), 3.40–3.97 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.50 (s, 1 H, OH-3'''), 4.72 (s, 1 H, OH-3''), 4.74 (s, 1 H, OH-2'''), 4.87 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 5.12–5.15 (ma, 1 H, H-1''), 5.27-5.29 (ma, 1 H, H-1'''), 5.34–5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-8), 6.17 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6), 6.8 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2', H-6'), 9.05 (s, 1 H, OH-4'), 12.(s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 17.1 (C- CH_3), 22.8 (C-b1), 25.2 (C-c), 29 (C-b12), 29.3 (C-b3,11), 29.7 (C-b4,5,6,7,8,9,10), 32.5 (C-b2), 34 (C-d), 43.5 (C-3), 63.1 (C-6''), 72.1 (C-4'''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.1 (C-2'''), 74.5 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 93.9 (C-8), 94.9 (C-6), 101.5 (C-5a), 107.3 (C-1''), 111 (C-1'''), 116.2 (C-5', 3'), 127.4 (C-6', 2'), 130.1 (C-1'), 145.9 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163.2 (C-5), 166.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 196.8 (CO).

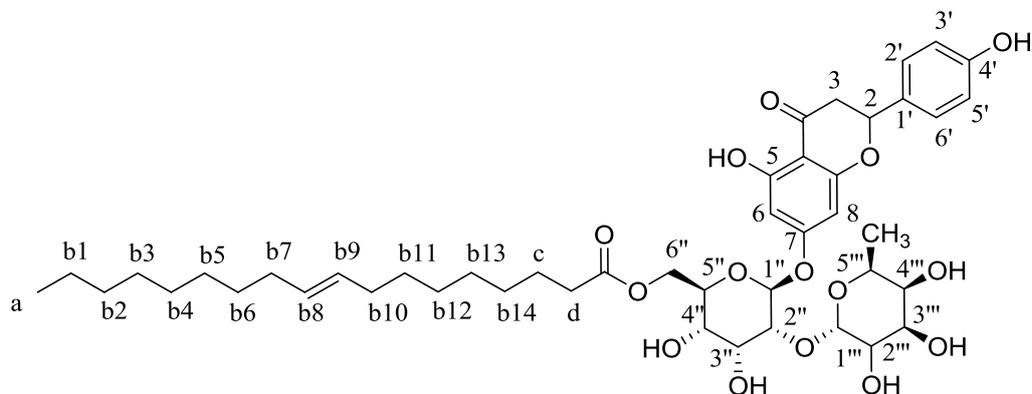
Composé 18e :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.81 (t, J = 7 Hz, 3 H, H-a), 1.17 (d, J = 5.7 Hz, 3 H, CH_3), 1.20-1.35 (ma, 28 H, H-b), 1.37-1.57 (ma, 2 H, H-c), 2.17-2.32 (ma, 2 H, H-d), 2.78 (dd, J = 17, 3 Hz, 1 H, H-3 α), 3.16-3.19 (ma, 1 H, H-3 β), 3.40-4 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.49 (s, 1 H, OH-3'''), 4.74 (s, 1 H, OH-3''), 4.76 (s, 1 H, OH-2'''), 4.9 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 5.12-5.15 (ma, 1 H, H-1''), 5.26-5.29 (m, 1 H, H-1'''), 5.35-5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.15 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-8), 6.19 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.34 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2'; H-6'), 9.04 (s, 1 H, OH-4'), 12.1 (s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 14 (C-a), 17.1 (C- CH_3), 22.8 (C-b1), 25.2 (C-c), 29 (C-b14), 29.3 (C-b3,13), 29.7 (C-b4,5,6,7,8,9,10,11,12), 32 (C-b2), 33.9 (C-d), 43.5 (C-3), 63.1 (C-6''), 72 (C-4''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.2 (C-2'''), 74.5 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 94 (C-8), 94.9 (C-6), 101.5 (C-5a), 107.2 (C-1''), 111 (C-1'''), 116.2 (C-5', 3'), 127.4 (C-6',2'), 130 (C-1'), 145.9 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163.1 (C-5), 166.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 196.8 (CO).

Composé 18f :



^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.80 (t, J = 7.3 Hz, 3 H, H-a), 1.18 (d, J = 5.5 Hz, 3 H, CH_3), 1.19-1.35 (ma, 20 H, H-b1,2,3,4,5,6,11,12,13,14), 1.37-1.58 (ma, 2 H, H-c), 2.10-2.13 (ma, 4 H, H-b7,10), 2.15-2.32 (ma, 2 H, H-d), 2.78 (dd, J = 17, 3 Hz, 1 H, H-3 α), 3.15-3.19 (ma, 1 H, H-3 β), 3.40-3.97 (ma, 8H, H-5''', H-5'', H-3''', H-3'', H-2''', H-2'', H-4''', H-4''), 4.50 (s, 1 H, OH-3'''), 4.72 (s, 1 H, OH-3''), 4.74 (s, 1 H, OH-2'''), 4.87 (s, 2 H, OH-4'', OH-4'''), 4.98-5.08 (ma, 2 H, b8,9), 5.12-5.15 (ma, 1 H, H-1''), 5.27-5.29 (ma, 1 H, H-1'''), 5.34-5.40 (ma, 1 H, H-2), 6.15 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-8), 6.17 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.8 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2'; H-6'), 9.05 (s, 1 H, OH-4'), 12.(s, 1 H, OH-5).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 13.9 (C-a), 17.1 (C-CH $_3$), 22.8 (C-b1), 25.2 (C-c), 29 (C-b14), 29.3 (C-b3), 29.4 (C-b13), 29.7 (C-b4,5,12,13), 29.9 (C-b6,11), 31.9 (C-b2), 33.7 (C-b7,10), 34 (C-d), 43.5 (C-3), 63.1 (C-6''), 72.1 (C-4''), 72.4 (C-3'''), 73.7 (C-4'''), 74.1 (C-2'''), 74.5 (C-5'''), 75.7 (C-3'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2), 84.8 (C-2''), 93.9 (C-8), 94.9 (C-6), 101.5 (C-5a), 107.3 (C-1''), 111 (C-1'''), 116.2 (C-5', 3'), 127.4 (C-6',2'), 130.1 (C-1'), 130.6 (C-b8,9), 145.9 (C-4'), 162.8 (C-8a), 163.2 (C-5), 166.5 (C-7), 173.5 (CO ester), 196.8 (CO).

2. Propriétés physico-chimiques et biologiques

2.1. Détermination des coefficients de partage ($\log k'_w$) par HPLC

Les mesures ont été effectuées sur un HPLC « Shimadzu » composé d'une colonne analytique (Luna[®] 3 μm C18(2) 100 Å – 150 x 2 mm) à une température stable de 25°C. Les composés ont été dissous dans du méthanol à une concentration de 1M. Les temps de rétention ont été ensuite mesurés par injection des différentes solutions avec quatre phases mobiles de polarité différentes constituées d'eau et de méthanol. Le paramètre k' a été défini par la relation suivante :

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

avec t_R : temps de rétention du composé élué, et t_0 : temps d'élution de la phase mobile (temps mort).

La variation du $\log k'$ en fonction de la proportion en éthanol présente dans chaque éluant a été tracée. La régression linéaire obtenue a permis d'établir l'équation de droite $y = ax + b$ avec y étant le $\log k'$, x étant la fraction en méthanol, a étant la pente de la droite et finalement b étant le coefficient de partition ($\log k'_w$).

2.2. Détermination de la solubilité maximale dans l'eau

Dans un erlenmeyer contenant 10 mL d'eau, les produits synthétisés ont été ajoutés jusqu'à saturation. Après décantation, un volume de 5 mL a été prélevé et lyophilisé. Le volume prélevé après lyophilisation a été pesé afin de déterminer la masse de produit qui a été solubilisée dans 5 mL d'eau.

2.3. Détermination de la tension superficielle

Les mesures de la tension superficielle ont été déterminées à l'aide d'un tensiomètre Krüss K-100 avec la méthode de la plaque de Wilhelmy avec un thermostat réglé à 25°C

Les molécules à tester ont été solubilisés dans de l'eau afin d'obtenir neuf solutions de concentrations différentes. Chaque mesure a été effectuée trois fois. Des blancs (eau distillée) ont été réalisés avant chaque série de mesures. Le cristalliseur a été nettoyé à l'eau distillée et à l'éthanol et placé à l'étuve à 40°C entre chaque composé.

2.4. Evaluation de la disparition du radical DPPH

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 7,8 mg de DPPH dans 200 ml de méthanol, différentes concentrations de solutions échantillons et témoin ont été ajoutées à 1ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures séparées \pm écart type. L'IC₅₀ est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

2.5. Inhibition de l'oxydation induite du linoléate de méthyle

La mesure de l'activité antioxydant est mesurée par la capacité d'une substance à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle choisi comme référence pour cette étude. C'est un composé très sensible à l'oxygène sous l'effet de la présence d'un atome d'hydrogène (en C11) en position α par rapport aux doubles liaisons. L'accélération de l'oxydation est accompagnée en augmentant la température et l'ajout d'un amorceur radicalaire l'azobisisobutyronitrile (AIBN).

La réaction d'oxydation de linoléate de méthyle a été effectuée en présence des composés antioxydants avec du butan-1-ol dans un Pyrex à double enveloppe thermostatée maintenu sous température de 60°C relié à une vanne attaché à une pompe pour assurer le vide dans le Pyrex, une autre vanne reliée à l'arrivée de dioxygène et un réfrigérant à 4°C au dessus de réacteur pour condenser le solvant de la solution à traiter. Ce réacteur contient deux phases liquides de volume 4 cm², et une phase gazeuse doit être de volume 100 cm². Tout ce système est relié à un ordinateur pour mesurer la pression de dioxygène. Après refroidissement à 5°C, les réactifs suivants ont été ajoutés successivement ; 1 mL de linoléate de méthyle à 0.4 M, 2

mL d'AIBN à 9.10^{-3} M, 1 mL de nos composés synthétisés à 2.10^{-2} M, avec une pression d'oxygène de 147 Torr. Le milieu réactionnel a été porté à 60°C pendant 3 heures. L'évolution de la pression en oxygène au cours du temps qui révèle la quantité d'oxygène consommée durant cette oxydation a été enregistrée automatiquement par un système informatisé grâce à un logiciel OXY BAR.

La mesure de l'activité antioxydante a été définie en comparant la consommation de dioxygène en un temps donné de chaque composé par rapport à la consommation de dioxygène en absence de ce composé.

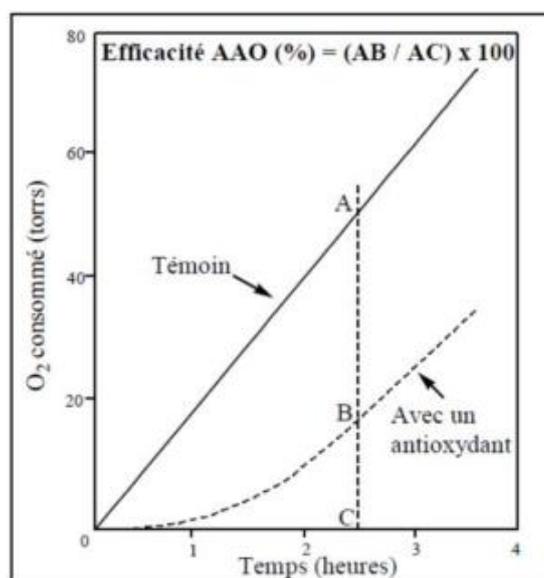


Figure130. Méthode de détermination de l'efficacité antioxydante

Chaque point (A ou B ou C) représente la pression de dioxygène pendant un instant donné qui nous permettent à décrire la formule de calcul de l'efficacité antioxydante suivante :

$$AAO(\%) = \frac{P[O_2]_{2.5h} \text{ en absence d'antioxydant} - P[O_2]_{2.5h} \text{ en présence d'antioxydant}}{P[O_2]_{2.5h} \text{ en absence d'antioxydant}} \times 100$$

2.6. Propriétés antiprolifératives

Des cellules CaCo2 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (dulbecco's modified eagles medium) constitué de 4.5 g/L de glucose, L-glutamine et bicarbonate de sodium, avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotique antimycotique. 5 mL d'une solution de tampon phosphate (PBS) ont été ajoutés sur les cellules pour enlever les traces de sérum, puis

éliminés. 1 mL de trypsine EDTA 0,25% a été ajouté et laisse agir à 37°C pendant quelques minutes. L'activité de la trypsine a été arrêtée en ajoutant 4 mL de milieu. Le volume totale a été mis dans un falcone pour centrifuger à 100 G pendant 5 minutes. Après centrifugation, le milieu a été éliminé et le culot a été récupéré et 5 mL de milieu ont été ajouté. Les cellules ont été comptées en utilisant un Vi-Cell XR cell viability analyzer Beckman avec la méthode bleu trypan. Les cellules ont été placées dans des plaques de 96 puits. Après 24 heures, les molécules à tester ont été ajoutées. Après deux jours les plaques ont été vidées et du MTT a été ajoute dans ces plaques. Après 3 heures une caractérisation par UV a été réalisée afin de déterminer la viabilité des cellules.

2.7. Modélisation moléculaire

Les calculs DFT de modélisation moléculaire one été réalisé avec le logiciel Material Studio avec la fonctionnelle B3LYP. Les calculs de différence d'énergie ont été réalisés par abstraction de proton des différentes positions de OH.

Résumé

La diminution des ressources pétrochimiques facilement accessibles, suscite, depuis ces dix dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation de matières premières d'origine renouvelable. L'industrie de première transformation du bois génère chaque année des volumes importants de déchets qui sont à l'heure actuelle, soit recyclés vers d'autres filières comme la papeterie ou l'industrie des panneaux, soit utilisés comme source d'énergie, et donc vers des marchés de faible valeur ajoutée. Le projet se situe dans ce contexte de développement durable, d'économie circulaire et de valorisation des co-produits de l'industrie du bois par l'exploitation des métabolites secondaires présents dans le bois, comme les composés phénoliques, et plus précisément les flavonoïdes qui présentent en effet un intérêt dans différents domaines en raison de leurs activités biologiques.

L'objectif de ce travail est de fonctionnaliser des composés accessibles et abondants afin d'obtenir des composés polyfonctionnels à propriétés 2 en 1 et pouvoir ainsi simplifier les formulations cosmétiques. La fonctionnalisation a été envisagée par deux voies : hémisynthèse chimique et/ou catalyse enzymatique.

Par hémisynthèse chimique nous avons pu accéder à des composés bi-modulaires en associant un acide gras et un flavonoïde non glycosylé, en l'occurrence la catéchine. Des acylations directes au niveau des hydroxyles phénoliques de la catéchine ont été étudiées et la régiosélectivité a été démontrée par spectroscopie RMN et confirmée par modélisation moléculaire. Nous avons également préparé des composés tri-modulaires par hémisynthèse chimique en associant différents acides aminés, ainsi que des acides gras de longueur variable à la catéchine. Trois structures trimodulaires différentes ont ainsi été synthétisées, afin d'obtenir différents types de composés.

Par hémisynthèse enzymatique nous avons synthétisé des composés tri-modulaires, à partir des flavonoïdes glycosylés, la rutine et la naringine, en visant le greffage d'acides gras de différentes longueurs de chaîne mais cette fois-ci sur la partie glycosidique des flavonoïdes. Nous avons également synthétisé des composés penta-modulaires issus du greffage d'un acide dicarboxylique sur la naringine ou la rutine. Ces composés comportent deux entités flavonoïdes greffées de part et d'autre de la chaîne carbonée du diacide.

A l'issue de ces synthèses, les propriétés physico-chimiques des produits ont été étudiées, notamment leur solubilité dans l'eau, leurs propriétés anti-radicalaires mais également les propriétés tensioactives. Certaines activités biologiques ont également été étudiées comme l'activité antiproliférative vis-à-vis de cellules CaCo2. Afin de comprendre l'effet de la structure des composés sur leur capacité antioxydante, des travaux de modélisation moléculaire ont été entrepris ; des corrélations entre l'activité antioxydante des composés déterminée expérimentalement et des descripteurs de réactivité chimique calculés *in silico* ont été recherchés.

Abstract

The decrease in easily accessible petrochemical resources has given over the past ten years a growing interest in the use of raw materials of renewable origin. The primary wood processing industry generates large amounts of waste each year which are currently either recycled to other sectors such as paper mills or the panel industry, or used as a source of energy, and therefore to markets with low added value. The project is situated in this context of sustainable development, circular economy and valorization of co-products of the wood industry by the exploitation of secondary metabolites present in wood, such as phenolic compounds, and more precisely flavonoids, which are indeed of interest in various fields because of their biological activities.

The objective of this work is to functionalize accessible and abundant compounds in order to obtain polyfunctional compounds with 2-in-1 properties and thus be able to simplify cosmetic formulations. Functionalization has been considered by two routes: chemical hemisynthesis and/or enzymatic catalysis.

By chemical hemisynthesis we were able to obtain bi-modular compounds by combining a fatty acid and a non-glycosylated flavonoid, in this case we worked with catechin. Direct acylations on the phenolic hydroxyls of catechin have been studied and the regioselectivity has been demonstrated by NMR spectroscopy and confirmed by molecular modelling. We have also obtained tri-modular compounds by chemical hemisynthesis by combining different amino acids, as well as fatty acids of variable length with catechin. Three different trimodular structures have been synthesized.

By enzymatic hemisynthesis we have synthesized tri-modular compounds, from glycosylated flavonoids, rutin and naringin, aiming for the grafting of fatty acids of different chain lengths but this time on the glycosidic part of the flavonoids. We have also synthesized penta-modular compounds resulting from the grafting of a dicarboxylic acid on naringin or rutin. These compounds comprise two flavonoid entities grafted on either side of the carbon chain of the diacid.

At the end of these syntheses, the physico-chemical properties of the products were studied, in particular their solubility in water, their anti-radical properties but also the surfactant properties. Some biological activities have also been studied such as antiproliferative activity against CaCo2 cells. In order to understand the effect of the structure of the compounds on their antioxidant capacity, molecular modeling work has been undertaken; correlations between the antioxidant activity of compounds determined experimentally and chemical reactivity descriptors calculated *in silico* were sought.