



HAL
open science

Valorisation de co-produits de filières agroindustrielles, de la chimie verte aux applications

Amandine Flourat

► **To cite this version:**

Amandine Flourat. Valorisation de co-produits de filières agroindustrielles, de la chimie verte aux applications. Chimie organique. Ecole doctorale sciences fondamentales et santé - Université de Reims Champagne-Ardenne, 2020. Français. NNT: . tel-03516641

HAL Id: tel-03516641

<https://agroparistech.hal.science/tel-03516641v1>

Submitted on 7 Jan 2022

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Chimie organique

Présentée et soutenue publiquement par

AMANDINE FLOURAT

Le 20 novembre 2020

Valorisation de co-produits agricoles : De la chimie verte aux applications

Thèse dirigée par **ARNAUD HAUDRECHY ET JEAN-HUGUES RENAULT**

JURY

Mme Aurore Richel,	Professeur,	Université de Liège,	Présidente
M. Arnaud Haudrechy,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
M. Jean-Hugues Renault,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
Mme Dominique Urban,	Chargé de Recherche HDR,	Université Paris Saclay,	Rapporteur
M. David Gueyraud,	Maître de Conférences HDR,	Université Claude Bernard, Lyon 1,	Rapporteur
Mme Claude Grison,	Professeur,	Université de Montpellier,	Examineur
M. Florent Allais,	Professeur,	AgroParisTech,	Invité

« Ce qu'il défendait, c'était une marge humaine, un monde, n'importe lequel, mais où il y aurait place même pour une aussi maladroite, une aussi encombrante liberté. Progression des terres cultivées, électrification, construction de routes et de villes, disparition des paysages anciens devant une œuvre colossale et pressante, mais qui devait rester assez humaine cependant pour qu'on pût exiger de ceux qui se lançaient ainsi en avant qu'ils s'encombrement malgré tout de ces géants malhabiles pour lesquels il ne semblait plus y avoir de place dans le monde qui s'annonçait... »

Romain Gary, *Les Racines du Ciel*

*« Patience et longueur de temps
Font plus que force ni que rage. »*

Jean de La Fontaine, *Le Lion et le Rat*

A mon P  p  

Remerciements

Merci aux membres du jury qui me font l'honneur d'accorder du temps à ce travail.

Merci à Arnaud et Jean-Hugues d'avoir accepté de m'accompagner dans cette aventure en encadrant cette thèse un peu particulière. Merci pour votre exigence, le soin du mot juste et du détail. Merci d'avoir apporté des éclairages et des points de vue qui m'ont poussée à envisager différemment certains résultats.

Merci à Florent Allais, pour tout ce qu'il m'a appris en 10 ans de collaboration et tout ce qu'il ne manquera pas de m'apprendre à l'avenir. Et merci pour l'incroyable aventure qu'est la Chaire (oups l'URD) ABI.

Merci à mes collègues (passés et présents) sans qui ces travaux ne seraient certainement pas aussi aboutis. J'espère rendre justice dans ce manuscrit à votre contribution inestimable. Et pour ceux qui ne seront pas cités directement, merci pour l'émulation scientifique et la bonne humeur au quotidien. Merci à tous les stagiaires que j'ai eu le bonheur d'encadrer, c'est toujours une expérience enrichissante. Je citerai particulièrement Matthieu et Enzo qui ont directement contribué à ce travail.

Merci aux personnes qui m'ont aidée à me construire et à forger mes valeurs. Ça commence bien évidemment par ma famille, mes parents en tête, mais également leur amis (merci les taties et consorts). Mes amies à moi, toujours fidèles au poste ! Egaleme nt un grand merci à mon frère et mes cousins, avoir grandi avec vous forge le caractère et prépare à un labo de chimie très masculin. Une grosse pensée pour Grande-Mère qui a toujours mis la culture au centre ainsi que l'éducation. Pépé et Mémé ont eux ainsi mis fort l'accent sur ce dernier point. Merci pour tout l'amour que j'ai reçu. Je finirai ces remerciements par mon grand amour (2,06 m quand même) et notre merveilleuse petite Amélia dont la venue a favorisé l'écriture de ces quelques pages.

Table des matières

Citations	i
Dédicace	iii
Remerciements.....	v
Table des figures.....	viii
Table des schémas.....	ix
Table des tableaux.....	x
Introduction générale	1
Liste des molécules du Chapitre 1	6
Chapitre 1 La lévoglucosénone : une opportunité pour l'industrie papetière et forestière.....	7
Introduction.....	7
Synthèses vertes de la HBO	16
Synthèse par biocatalyse	16
Hydrolyse du formate.....	30
Synthèse sans catalyseur et sans solvant	31
Matériel et méthodes	35
Conclusion	40
Valorisation de la HBO et de la 2H-HBO.....	41
Introduction.....	41
Synthèse des époxydes chiraux vers la (S)-Dairy lactone.....	45
Synthèse de chaînes grasses de rhamnolipides.....	50
Conclusion et Perspectives.....	60
Liste des molécules principales du Chapitre 2	61
Chapitre 2 Les acides <i>para</i> -hydroxycinnamiques : entre études fondamentales et applications.....	62
Introduction.....	62
L'acide férulique : une porte vers la compréhension des lignines	67
Première stratégie de synthèse	69
Seconde stratégie de synthèse	74
Matériels et Méthodes.....	79
Conclusion	85
L'acide sinapique et ses dérivés : Nouvelles générations de filtres UV	86
Dimérisation enzymatique	87

Dimérisation au cuivre (I)	90
Optimisation par plan d'expériences de la dimérisation au cuivre (I)	93
Généralisation de la méthode à une librairie d'esters sinapiques	97
Etude des propriétés antiradicalaires et anti-UVs	98
Matériels et méthodes	105
Conclusion et perspectives	113
Conclusion	114
Conclusion générale.....	115
Références.....	118

Table des figures

Figure 1 : Evolution de l'Homme

Figure 2 : Bilan du CO₂ (*Global carbon dioxide budget*) anthropique pour 1990-2000 (en bleu) et 2000-2008 (en rouge), en milliards de tonnes de carbone (GtC) par an. Les émissions des combustibles fossiles (*fossil fuel and cement*) et celles dues aux changements de l'utilisation des sols (*land-use change*) sont basées sur les statistiques économiques et sur celles des déforestations. La croissance du taux de CO₂ atmosphérique (*atmospheric growth*) est mesurée directement. Les puits de CO₂ océanique et continental (*ocean sink* et *land sink*) sont estimés à partir des observations pour 1990-2000 (Denman *et al.* IPCC 2007). Pour 2000-2008, le puits océanique est estimé en utilisant la moyenne de plusieurs modèles, tandis que le puits terrestre est estimé comme un résidu des autres termes. © Le Queré, *Global Change*, 2009³

Figure 3 : Evolution de la production de papiers et cartons en France entre 2007 (à gauche) et 2017 (à droite)

Figure 5 : Structure des liquides ioniques ([BMMIM]CF₃SO₃) (à gauche) et ([EMIM]p-CH₃C₆H₄SO₃) (à droite)

Figure 6 : Diagramme schématique du procédé FuracellTM

Figure 7 : Exemple d'inducteur chiral (à gauche), de ligands chiraux (au centre) et d'organo-catalyseur (à droite)

Figure 8 : Exemples de molécules synthétisées à partir de la LGO

Figure 9 : Cinétiques de conversion de la LGO en fonction du temps et de la température de réaction

Figure 10 : Influence de la concentration de la réaction sur le rendement

Figure 11 : Structure de la *Candida Antarctica Lipase B*

Figure 12 : Activité résiduelle de la CAL-B en fonction du temps de réaction lors de l'oxydation de la LGO (40 °C, [LGO] = 0.75 M dans l'acétate d'éthyle, enzyme/LGO ratio 219 PLU mmol⁻¹, 1.2 équiv. H₂O₂)

Figure 13 : Structures des tampons solides utilisés

Figure 14 : Suivi cinétique de la conversion de la LGO en fonction des différents tampons solides utilisés

Figure 15 : Design CCF choisi pour le plan d'expériences, soit 17 expériences

Figure 16 : Coefficient des variables centrées réduites pour le modèle de la conversion de la LGO (à gauche) et le modèle de l'activité enzymatique résiduelle (à droite)

Figure 17 : Surfaces de réponses obtenues pour la conversion de la LGO (haut) et pour l'activité enzymatique résiduelle (bas)

Figure 18 : Représentation en 4D du « point doux » ou « sweet spot », dans la zone verte les deux critères sont remplis, dans les zones bleues un seul des deux critères est atteint et aucun dans les zones blanches

Figure 19 : Représentation du risque d'échec pour une conversion de la LGO > 80%. Dans la zone verte, le risque d'échec est inférieur à 1% alors que la zone rouge indique un risque supérieur à 2%

Figure 20 : Suivi cinétique de la production de HBO en fonction de la quantité de H₂O₂

Figure 21 : Exemple d'un montage de distillation sur couche mince

Figure 22 : Exemple de structure d'un rhamnolipide

Figure 23 : Structures des principaux acides *para*-hydroxycinnamiques

Figure 24 : Structure de l'acide chlorogénique et de la sinapine et représentation de l'acide férulique estérifié à une chaîne d'arabinoxylane (Buanafina 2009)¹⁵⁹

Figure 25 : Monomères constitutifs des lignines ou monolignols précurseurs des unités H, G et S (à gauche) et structure fictive de lignines faisant apparaître les différentes liaisons possibles¹⁷⁶

Figure 26 : Molécules modèles faisant l'objet de la revue proposée par Oregui-Bengoechea *et al.*¹⁷⁶

Figure 27 : Structure des composés cibles

Figure 28 : Spectre ¹H-RMN du deuxième produit isolé

Figure 29 : Spectres ¹H-RMN du produit 1 (en haut) et du supposé trimère hydrogéné (en bas)

Figure 30 : Exemple de chromatogramme obtenu lors de la dimérisation enzymatique initiée par la laccase de *Trametes versicolor* (conditions eau MilliQ/AcOEt 1/1, 50 °C, ajout de 25 U/mmol, débit 10 mL.h⁻¹)

Figure 31 : Environnement du Cu (I) pour la laccase de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.* 2002)

Figure 32 : Chromatogrammes des réactions de dimérisation du sinapate d'éthyle dans la pyridine (noir), l'acétate d'éthyle (bleu), l'éthanol (rose) et le CyreneTM (vert) enregistrés à 320 nm

Figure 33 : Suivi cinétique de la réaction par HPLC

Figure 34 : Coefficients des variables centrées réduites pour le modèle de la conversion du sinapate d'éthyle (à gauche) et le modèle du rendement en disinapate de diéthyle (à droite)

Figure 35 : Surfaces de réponses obtenues pour la conversion du sinapate d'éthyle (en haut) et le rendement en disinapate de diéthyle (en bas)

Figure 36 : Comparaison des spectres UV des dimères d'esters sinapiques et de l'octinoxate (en haut) et de l'acide *trans*-sinapoyl malique (en bas)

Figure 37 : Relations entre structure et absorbance UV

Figure 38 : Pourcentage de dégradation des dimères d'esters sinapiques 23 à 29 et 31 et des références (octinoxate et acide *trans*-sinapoyl malique) sous irradiation UV

Figure 39 : Pourcentage de dégradation des esters sinapiques précurseurs des dimères et des références (octinoxate et acide *trans*-sinapoyl malique) sous irradiation UV
 Figure 40 : Activité antiradicalaire des dimères β - β obtenus en comparaison du BHT et du BHA
 Figure 41 : Activité antiradicalaire des esters sinapiques précurseurs des dimères β - β
 Figure 42 : Traduction des 12 principes de la chimie verte énoncés par P. Anastas et J. Warner

Table des schémas

Schéma 1 : Présentation de l'URD ABI sous la forme d'un corps humain
 Schéma 2 : Mécanismes proposés pour obtenir la lévoglucosénone (issu de Greatrex *et al.* 2017)
 Schéma 3 : Synthèse de la lévoglucosénone à partir du D-galactose inspirée de Shibagaki *et al.*
 Schéma 4 : Synthèse de la lévoglucosénone à partir du 2-vinyl furane inspirée de Taniguchi *et al.*
 Schéma 5: Synthèse de la HBO à partir de l'acide L-glutamique d'après Ravid *et al.*⁵³ et Tomioka *et al.*⁵⁶
 Schéma 6 : Synthèse de la HBO à partir de la D-ribonolactone
 Schéma 7 : Synthèse de la HBO à partir du 1,2:5,6-D-isopropylidènemannitol inspirée de Häfele *et al.*⁶⁵
 Schéma 8 : Procédures existantes de synthèse de la HBO à partir de la LGO
 Schéma 9 : Réaction de Baeyer-Villiger biocatalysée sur cétones cycliques
 Schéma 10 : Oxydation biocatalysée de Baeyer-Villiger appliquée à la LGO et transposition en FBO
 Schéma 11 : Mécanisme d'oxydation de Baeyer-Villiger en condition acide et en présence d'acide peracétique
 Schéma 12 : Mécanisme de l'oxydation de Baeyer-Villiger en condition basique en présence d'acide peracétique
 Schéma 13 : Mécanisme d'oxydation de Baeyer-Villiger en présence de peroxyde d'hydrogène à 30% dans l'eau
 Schéma 14 : Possibilités offertes au chimiste organicien par la HBO
 Schéma 15 : Produits naturels synthétisés à partir de la HBO
 Schéma 16 : Composés pharmaceutiques synthétisés à partir de la 2H-HBO
 Schéma 17 : Molécules issues des époxydes chiraux (S)-3-(oxiran-2-yl)propanoates de méthyle ou d'éthyle
 Schéma 18 : Synthèse des époxydes chiraux à partir de la 2H-HBO
 Schéma 19 : Synthèse de la (S)-Dairy lactone par la méthode de Habel *et al.* (haut), de Shin *et al.* (milieu) et Péru *et al.* (bas)
 Schéma 20 : Synthèse de 3-hydroxy-acides gras mise en place par Menhour *et al.*^{125,126}
 Schéma 21 : Synthèse de 3-hydroxy-acides gras mise en place par Bauer *et al.*¹²⁹
 Schéma 22 : Schéma rétrosynthétique de l'obtention de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque à partir de la LGO
 Schéma 23 : Addition de Michael de l'eau sur la LGO
 Schéma 24 : Synthèse de HBO-OH par oxydation de Baeyer-Villiger de LGO-OH
 Schéma 25 : Synthèse de HBO-I-OAc
 Schéma 26 : Réaction de Bernet-Vasella à partir de HBO-I-OAc
 Schéma 27 : Synthèse de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque "2 steps-1 pot" à partir de HBO-Ts-OAc
 Schéma 28 : Synthèse de l'acide (R)-3-acétoxydécanoïque
 Schéma 29 : Couplage enzymatique de deux chaînes lipidiques
 Schéma 30 : Voie de biosynthèse des acides *para*-hydroxycinnamiques d'après Humphreys *et al.*¹⁵⁷
 Schéma 31 : Voie de rétrosynthèse pour l'obtention du dihydrotrimère naturel (β -5)-(β -O-4) de monolignol G et du dihydroxytrimère -(β -5)-(β -O-4) de G par « aldolisation »
 Schéma 32 : Synthèse du dimère (β -5) de G à partir de l'acide férulique
 Schéma 33 : Formation du précurseur des trimères par « aldolisation »
 Schéma 34 : Voie de rétrosynthèse pour l'obtention du dihydrotrimère naturel (β -5)-(β -O-4) de monolignol G et du dihydroxytrimère (β -5)-(β -O-4) de G par substitution nucléophile
 Schéma 35 : Synthèse du bromocétoester 10 à partir de l'acétovanillone
 Schéma 36 : Synthèse du trimère 13 à partir de 10 et de 5
 Schéma 37 : Synthèse du dihydrotrimère naturel (β -5)-(β -O-4) du monolignol G à partir de 13
 Schéma 38 : Synthèse du dihydroxytrimère (β -5)-(β -O-4) du monolignol G à partir de 13
 Schéma 39 : Synthèse infructueuse de 14 *via* le diester 17
 Schéma 40 : Dimérisation sélective des esters sinapiques
 Schéma 41 : Dimérisation enzymatique de l'alcool sinapylique
 Schéma 42 : Mécanisme d'obtention du composé 22 à partir du sinapate d'éthyle
 Schéma 43 : Synthèse non optimisée du disinapate de diéthyle β - β
 Schéma 44 : Mécanisme de l'oxydation catalysée au cuivre
 Schéma 45 : Modifications structurales de 23 pour obtenir les composés 31 à 34

Schéma 46 : Molécules plateformes issues de la LGO synthétisées

Schéma 47 : Stratégie pour l'obtention des acides *p*-hydroxycinnamiques à partir des lignines

Table des tableaux

Tableau 1 : Matrice et réponses enregistrées pour chaque point du plan d'expériences

Tableau 2 : Expériences supplémentaires pour affiner le modèle

Tableau 3 : Coefficients centrés et réduits (CR.) du modèle, leur écart-type, la *p*-value et l'intervalle de confiance à 95% (IC) pour la conversion en LGO

Tableau 4 : Coefficients centrés et réduits (CR.) du modèle, leur écart-type, la *p*-value et l'intervalle de confiance à 95% (IC) pour l'activité enzymatique résiduelle

Tableau 5 : Validation expérimentale sur trois points optimaux du modèle

Tableau 6 : Résultats des tests de recyclabilité de l'enzyme ([LGO] = 0,75 M dans l'acétate d'éthyle, 40 °C, 1.2 équiv. H₂O₂)

Tableau 7 : Variables indépendantes et leurs niveaux utilisés pour le plan d'expériences

Tableau 8 : Matrice du design composite faces centrées et les réponses expérimentales

Tableau 9 : Comparaison des procédés de production de HBO suivant deux indicateurs, le PMI et l'Ecoscale

Tableau 10 : Résultats d'addition de Michael de l'eau sur la LGO

Tableau 11 : Comparaison des Ecoscales et PMIs pour les différentes procédures étudiées

Tableau 12 : Exemples de grandes cultures représentant des sources importantes d'acides *para*-hydroxycinnamiques¹⁵⁸

Tableau 13 : Tentatives d'attribution des signaux RMN ¹H et ¹³C pour le trimère supposé (β-5)/(β-O-4)

Tableau 15 : Variables indépendantes et leur niveau utilisé par le plan d'expériences

Tableau 16 : Matrice du plan d'expériences

Tableau 17 : Conditions opératoires optimales d'après le logiciel Modde et les réponses expérimentales obtenues

Tableau 18 : Calcul des points de pénalité de l'Ecoscale pour la réaction non optimisée et pour la réaction optimisée

Tableau 19 : Rendements obtenus pour la dimérisation de différents esters sinapiques suivant les deux procédures

Tableau 20 : Gain apporté par la dimérisation pour l'activité antiradicalaire

Introduction générale

Au sein du règne animal, l'Homme a développé la capacité de modifier son environnement de façon profonde et durable. Initialement, les premiers représentants de la famille Homo ont conçu des outils simples permettant d'améliorer la chasse et de se défendre contre les prédateurs (*Homo habilis*). Par la suite, l'Humanité s'est disséminée sur toute la planète (*Homo erectus*) avant de se sédentariser (*Homo sapiens*) en développant l'élevage et l'agriculture (Figure 1). L'Homme ayant sécurisé ses apports alimentaires, il a cherché à développer son confort et sa sécurité (ex : industrie textile, armement). Si l'ère anthropocène, et notamment son commencement, peut faire débat, il est admis que la découverte de la machine à vapeur nous a fait basculer dans l'ère industrielle.¹ Les aménagements de territoires qui avaient déjà eu pour effet la déforestation, l'assèchement de zones humides se sont accélérés. L'extraction des ressources minières (charbon, pétrole, fer) a explosé. L'utilisation intensive des ressources fossiles a permis une amélioration rapide des conditions de vie (ex : chauffage central, électricité) et l'essor de nombreuses techniques (ex : électroménager, automobile, médecine).

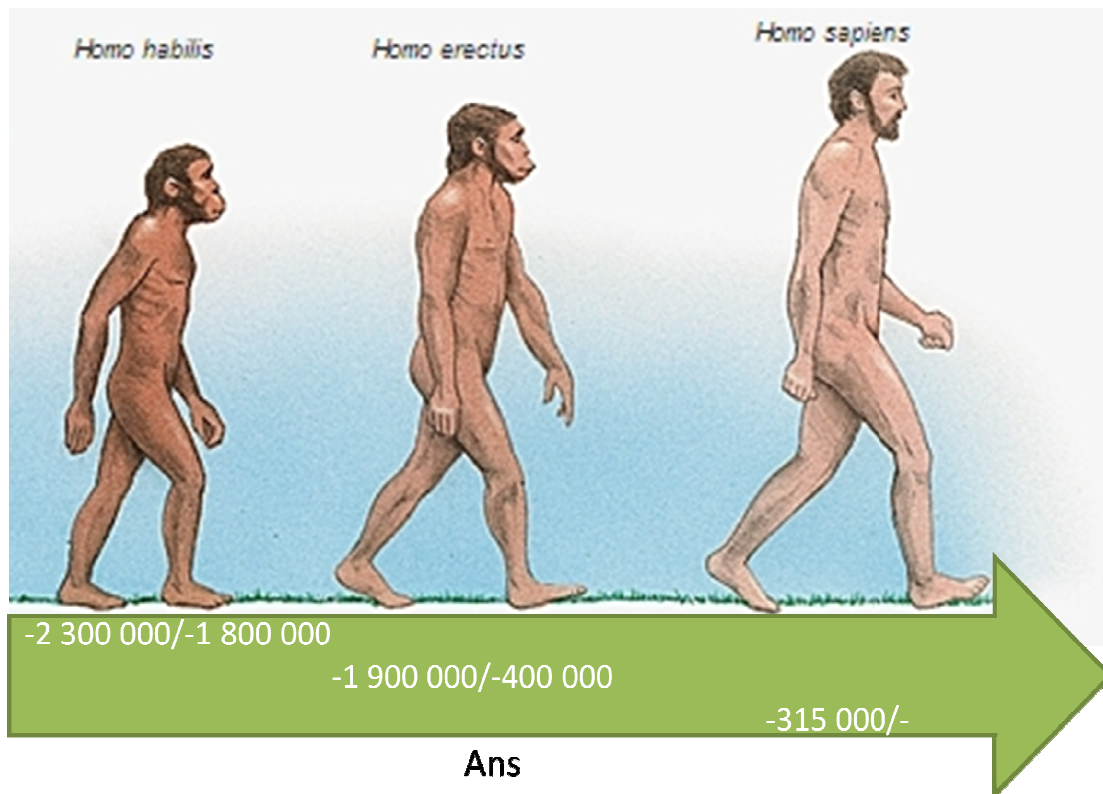


Figure 1 : Evolution de l'Homme

Ce bond extraordinaire présente cependant des contreparties que nous devons dorénavant affronter. Celle qui très probablement bouleversera drastiquement nos conditions de vies est bien entendu le réchauffement climatique. Le groupe d'experts international sur l'évolution du climat (GIEC) alerte régulièrement sur les répercussions de l'augmentation de la température moyenne, que ce soit sur la désertification ou la montée des océans.² En effet, l'utilisation massive des ressources fossiles (gaz,

charbon, pétrole) conduit à la libération, entre autres, de dioxyde de carbone dans l'atmosphère renforçant et amplifiant l'effet de serre naturel dû à l'atmosphère (Figure 2). Pour inverser cette tendance préjudiciable et limiter le réchauffement climatique, il est important de modifier en profondeur nos modes de production en nous appuyant sur des sources de carbone renouvelable et non plus sur le carbone fossile.

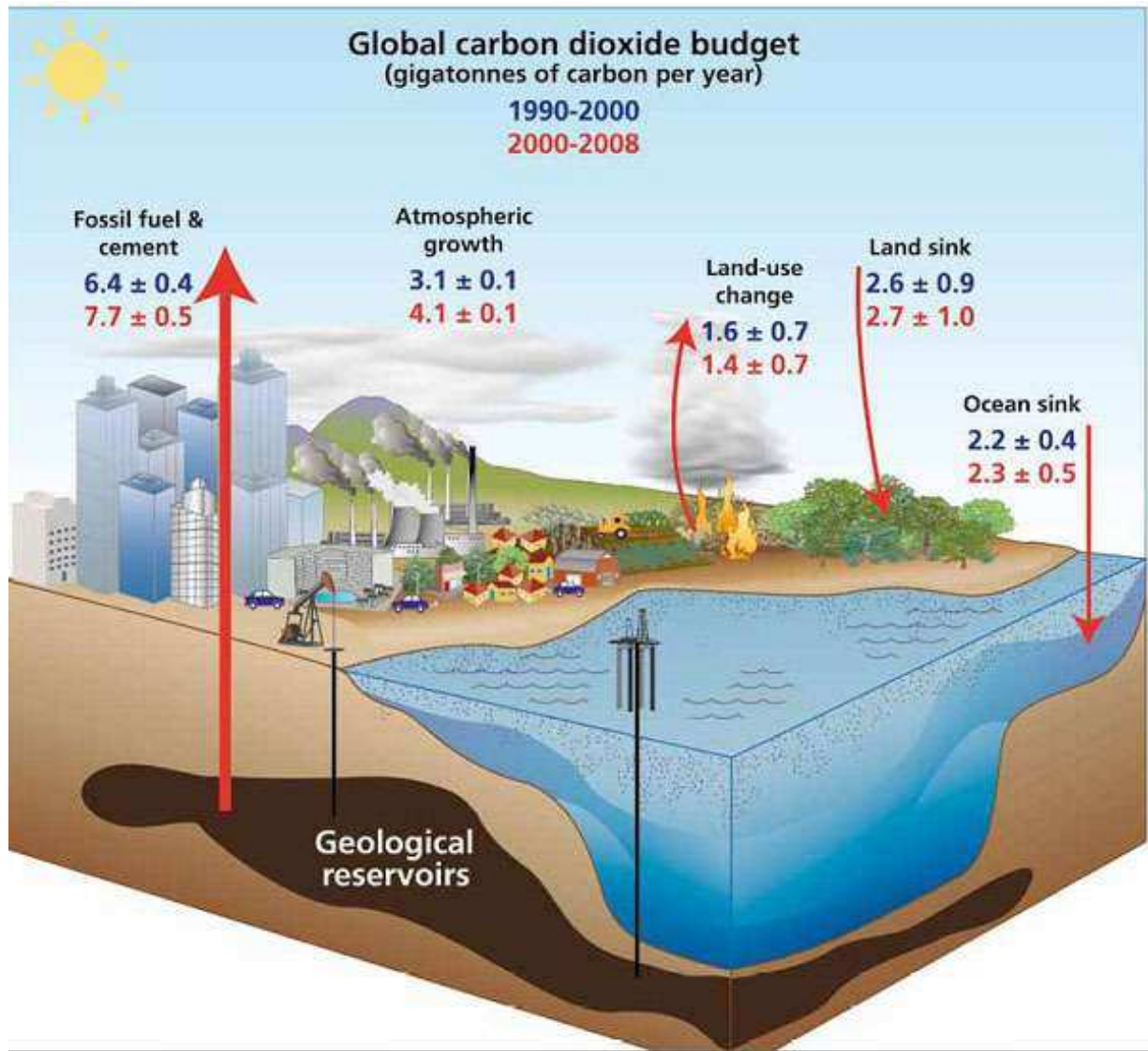


Figure 2 : Bilan du CO₂ (*Global carbon dioxide budget*) anthropique pour 1990-2000 (en bleu) et 2000-2008 (en rouge), en milliards de tonnes de carbone (GtC) par an. Les émissions des combustibles fossiles (*fossil fuel and cement*) et celles dues aux changements de l'utilisation des sols (*land-use change*) sont basées sur les statistiques économiques et sur celles des déforestations. La croissance du taux de CO₂ atmosphérique (*atmospheric growth*) est mesurée directement. Les puits de CO₂ océanique et continental (*ocean sink* et *land sink*) sont estimés à partir des observations pour 1990-2000 (Denman *et al.* IPCC 2007). Pour 2000-2008, le puits océanique est estimé en utilisant la moyenne de plusieurs modèles, tandis que le puits terrestre est estimé comme un résidu des autres termes. © Le Queré, *Global Change*, 2009³

Ce carbone renouvelable est aussi nommé bioressource ou biomasse. Le développement de produits à partir de ces bioressources a donné naissance au concept de bioéconomie, définie comme suit :

La bioéconomie englobe l'ensemble des activités de production et de transformation de la biomasse, qu'elles soient d'origine agricole, forestière ou aquacole, à des fins de production alimentaire (humaine ou animale), de chimie biosourcée, de matériaux biosourcés ou d'énergie.⁴

Bien que l'énergie constitue le point de dépense en carbone le plus important, il s'avère nécessaire de structurer l'ensemble des filières concernées afin de répondre au mieux aux défis climatiques, démographiques et sociétaux de demain.

La durabilité est un autre aspect clef de la transition écologique. Idéalement, cette transition doit garantir la pérennité ou l'amélioration de la qualité des sols, en limitant la pollution des eaux et de l'air et en préservant la biodiversité. La protection de l'écosystème devrait également bénéficier à la santé humaine. Malheureusement, le développement d'un certain nombre de molécules visant à améliorer la production agricole (ex : glyphosate), la conservation des aliments (ex : bisphénol A dans les conserves et cannettes), les propriétés de certains additifs des polymères (ex : phtalates dans le PVC), présentent un impact sur la santé des utilisateurs directs et des consommateurs en bout de chaîne (ex : développement de cancers, perturbation endocrinienne). Parfois même, certaines molécules (ex : anti-UVs) développées pour nous protéger se trouvent controversées, pouvant elles aussi entraîner des conséquences néfastes sur la santé (allergies, infertilité).

La récente pandémie de coronavirus (SARS-CoV-2) montre également l'intérêt de développer des systèmes de production locaux et adaptatifs afin d'améliorer la résilience de nos sociétés en cas de crise. L'Union européenne annonce ainsi un plan de relance économique basé sur la transition écologique qui devrait accélérer le mouvement déjà engagé.

La France s'est déjà dotée d'un plan d'action intitulé : « Une stratégie bioéconomie pour la France » comprenant 5 axes :⁵

- améliorer la connaissance
- promouvoir la bioéconomie et ses produits auprès du grand public
- créer les conditions d'une rencontre de l'offre et de la demande
- produire, mobiliser et transformer durablement des bioressources
- lever les freins et mobiliser les financements

Les unités de recherche que sont l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (UMR CNRS 7312) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA) associé au CNRS et l'Unité de Recherche et Développement AgroBiotechnologies Industrielles (URD ABI) d'AgroParisTech s'inscrivent évidemment fortement dans le premier point de cette stratégie avec pour objectif d'abonder l'axe 4 grâce à cette connaissance et transformer durablement notre société.

L'URD ABI est une structure relativement récente (2012) et de petite taille (21 permanents), organisée autour de trois pôles de recherche (microbiologie, génie des procédés et chimie verte) structurés et appuyés sur une plateforme analytique et une cellule de valorisation.⁶ Elle est présentée dans le schéma ci-dessous par analogie avec un organisme humain (Schéma 1). Travaillant pour ma part au sein de cet

organisme depuis sa création, et malgré que sa pluridisciplinarité interne forge une entité autonome, les collaborations sont un atout majeur pour une recherche fructueuse de qualité.

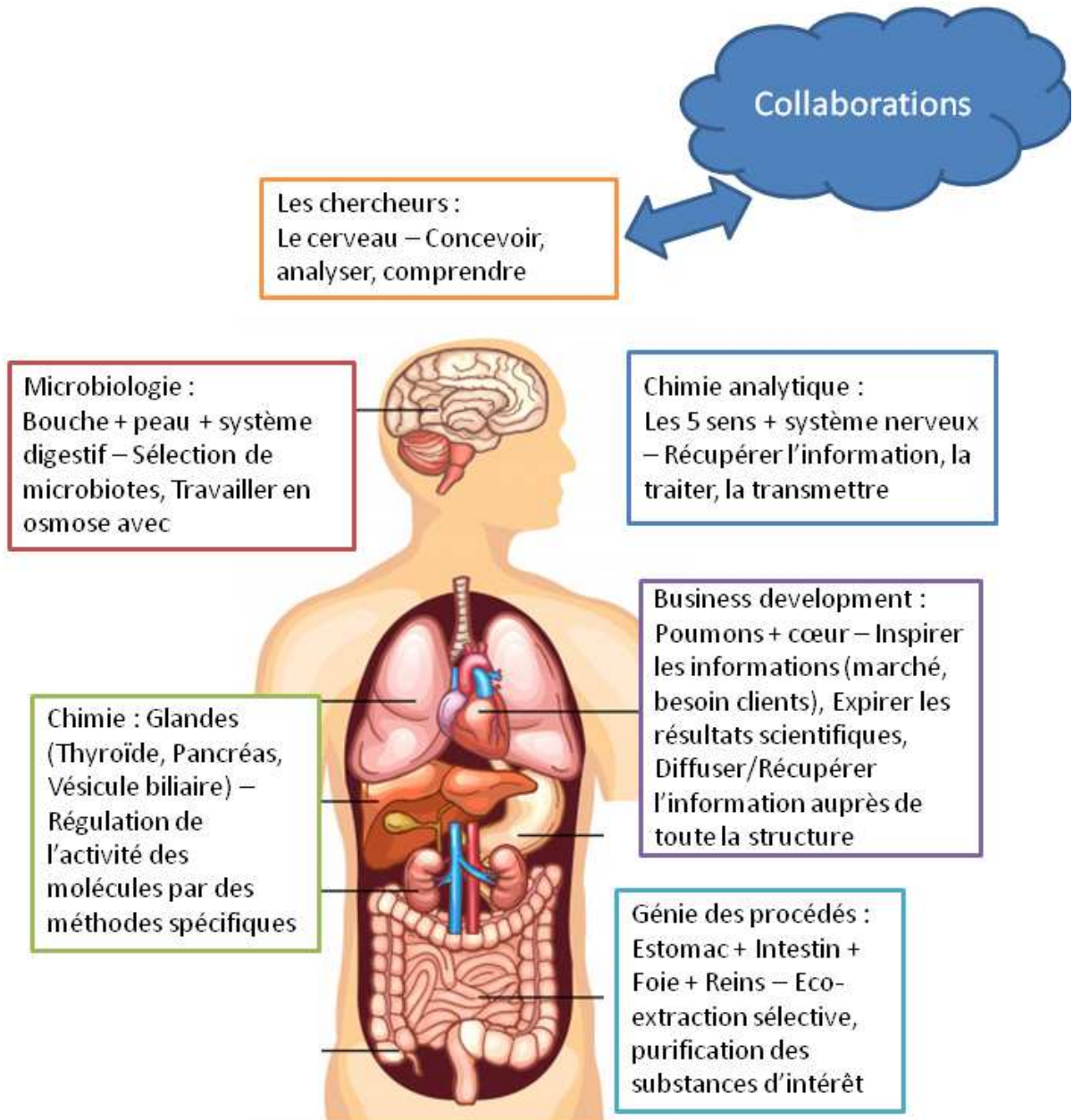


Schéma 1 : Présentation de l'URD ABI sous la forme d'un corps humain

Un partenariat fort s'est installé depuis plusieurs années avec l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR).

L'ICMR est une unité de recherche associée au CNRS depuis sa création en 2008. Ses personnels y mènent une activité de recherche fondamentale sur les différents aspects de son cœur de métier : la chimie moléculaire. Le projet d'unité se structure autour de questionnements originaux en matière de réactivité chimique, de caractérisation structurale, d'activité biologique ou de développements de procédés intensifiés associant les aspects de relations structures/fonctions, ce en lien avec les secteurs tels que la Chimie du Végétal, la Santé, les Matériaux, les Nanosciences ou encore l'Environnement.⁷

Les activités de recherche se réalisent au sein de 5 équipes structurées sur la base d'un partage de compétences scientifiques et techniques :

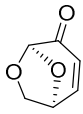
- Méthodologie en Synthèse Organique
- Biomolécules : Synthèses et Mécanismes d'Action
- Chimie de Coordination
- Chimie des Substances Naturelles
- Polymères Fonctionnels et Réseaux

En soutien de ces activités, l'ICMR dispose d'un :

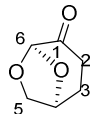
- Service de Soutien Analytique
- Service de Soutien Administratif et Technique

L'intitulé de cette thèse « Valorisation de co-produits agricoles : de la chimie verte aux applications » s'insère complètement dans la stratégie menée par ces deux entités. Nous considérerons ici deux exemples de molécules issues d'une première transformation de la biomasse et à forts potentiels pour le développement d'une chimie durable. Dans un premier chapitre, la lévoglucosénone, molécule chirale issue de la cellulose sera considérée en tant que molécule plateforme pour la synthèse d'un autre synthon d'intérêt, le (*S*)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide (**HBO**) ainsi que des applications qui en découlent et pour la synthèse d'éliciteurs des plantes, les rhamnolipides. Dans un second chapitre, les acides *para*-hydroxycinnamiques seront abordés à la fois en vue de travaux de recherche fondamentale mais aussi vers une recherche appliquée.

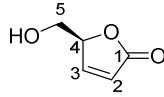
Liste des molécules du Chapitre 1



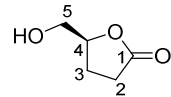
Lévoglucosénone
LGO



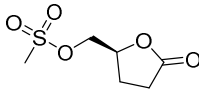
Cyrene™
2H-LGO



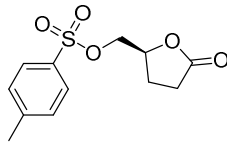
(S)-γ-hydroxyméthyl-α,β-buténoïde
HBO



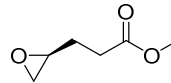
(S)-γ-hydroxyméthyl-γ-butyrolactone
2H-HBO



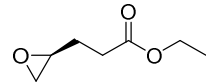
(S)-γ-méthanesulfonyloxyméthyl-γ-butyrolactone
2H-HBO-MS



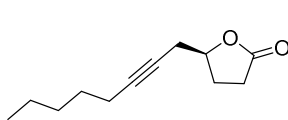
(S)-γ-toluènesulfonyloxyméthyl-γ-butyrolactone
2H-HBO-TS



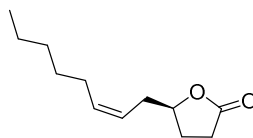
(S)-3-(oxiran-2-yl)propanoate de méthyle
(S)-Epoxy-Me



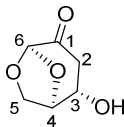
(S)-3-(oxiran-2-yl)propanoate d'éthyle
(S)-Epoxy-Et



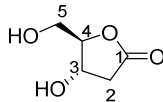
(S)-5-(Oct-2-yn-1-yl)-butyrolactone



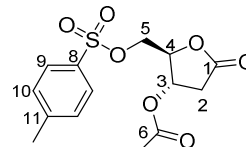
(S)-Dairy lactone



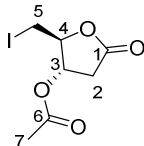
Hydrate de lévoglucosénone
LGO-OH



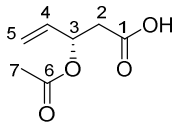
4-(S)-hydroxy-5-(R)-hydroxyméthyl-γ-butyrolactone
HBO-OH



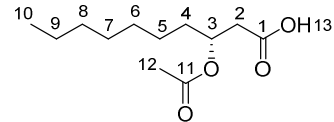
4-(S)-acétoxy-5-(R)-tosyloxyméthyl-γ-butyrolactone
HBO-Ts-OAc



4-(S)-acétoxy-5-(S)-iodométhyl-γ-butyrolactone
HBO-I-OAc



acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque



acide (R)-3-acétoxy-décanoïque

Chapitre 1 La lévoglucosénone : une opportunité pour l'industrie papetière et forestière

Introduction

L'industrie papetière française a connu sur la dernière décennie (2007-2017) une baisse significative de sa production, -2% par an en moyenne.⁸ C'est la production de papier graphique (notamment utilisé pour les journaux) qui a connu le plus fort recul (Figure 3). L'utilisation de pâte à papier a quant à elle diminué de 3% en moyenne par an entre 2007 et 2017, valeur en partie contrebalancée par une augmentation de l'usage des papiers et cartons issus du recyclage. En effet, pour produire 100 g de papier, il fallait en moyenne, en 2007, 39,5% de pâte à papier pour 52,6% de papier recyclé alors qu'en 2017, il faut 36% de pâte pour 58,4% de matière recyclée. La diminution de l'utilisation de charge est notable, de 14,9% à 10,4%.

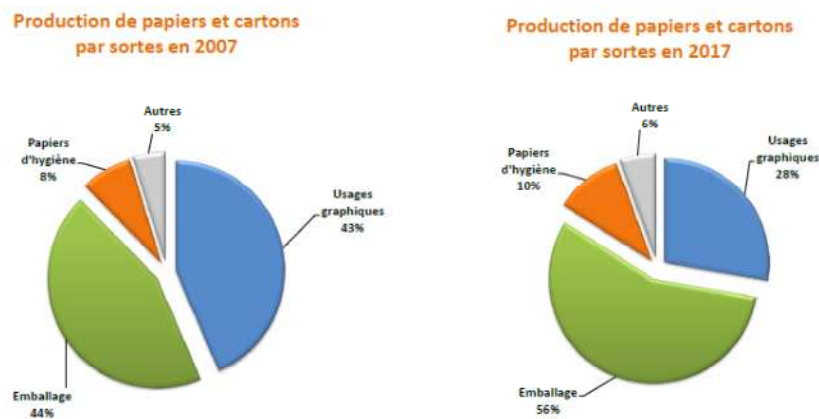
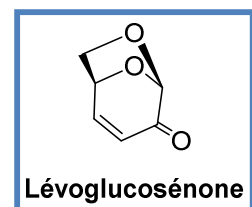


Figure 3 : Evolution de la production de papiers et cartons en France entre 2007 (à gauche) et 2017 (à droite)

Bien que la tendance soit à une stabilisation du marché, pour garantir la pérennité de ce secteur d'activité, qui représente en France 5,3 Mrd € de chiffre d'affaires et 12 500 emplois (données de 2016), une diversification des activités semble nécessaire. Ici, nous nous intéresserons aux opportunités qu'offre la lévoglucosénone qui peut être obtenue à partir de résidus riches en cellulose, par exemple la sciure de bois ou le papier usagé.

La Lévoglucosénone (CAS n° 37112-31-5, **LGO**) n'est pas encore connue en 1970 lorsque Tsuchiya et Sumi⁹ décrivent les composés issus de la décomposition thermique de la cellulose et remarquent la présence d'un composé en quantité abondante qui devient même majoritaire en conditions acides. Il faudra attendre les travaux de Halpern *et al.*¹⁰ en 1973 pour voir identifiée cette nouvelle molécule, la 1,6-anhydro-3,4-didésoxy- Δ - β -D-Pyranosèn-2-one, et lui voir attribuer le nom de lévoglucosénone. Le mécanisme d'obtention de la **LGO** a fait l'objet de plusieurs propositions dont certaines sont résumées dans les travaux publiés en 2017 par Greatrex *et al.*¹¹



(Schéma 2). Eux-mêmes émettent une nouvelle hypothèse faisant intervenir des énergies de transition peu élevées, de l'ordre de quelques $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ à quelques dizaines de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, compatibles avec la transformation rapide du lévoglucosane (**2** sur le schéma 1) et du 1,4:3,6-dianhydro- α -D-glucopyranose (**12** sur le schéma 2) en **LGO**.

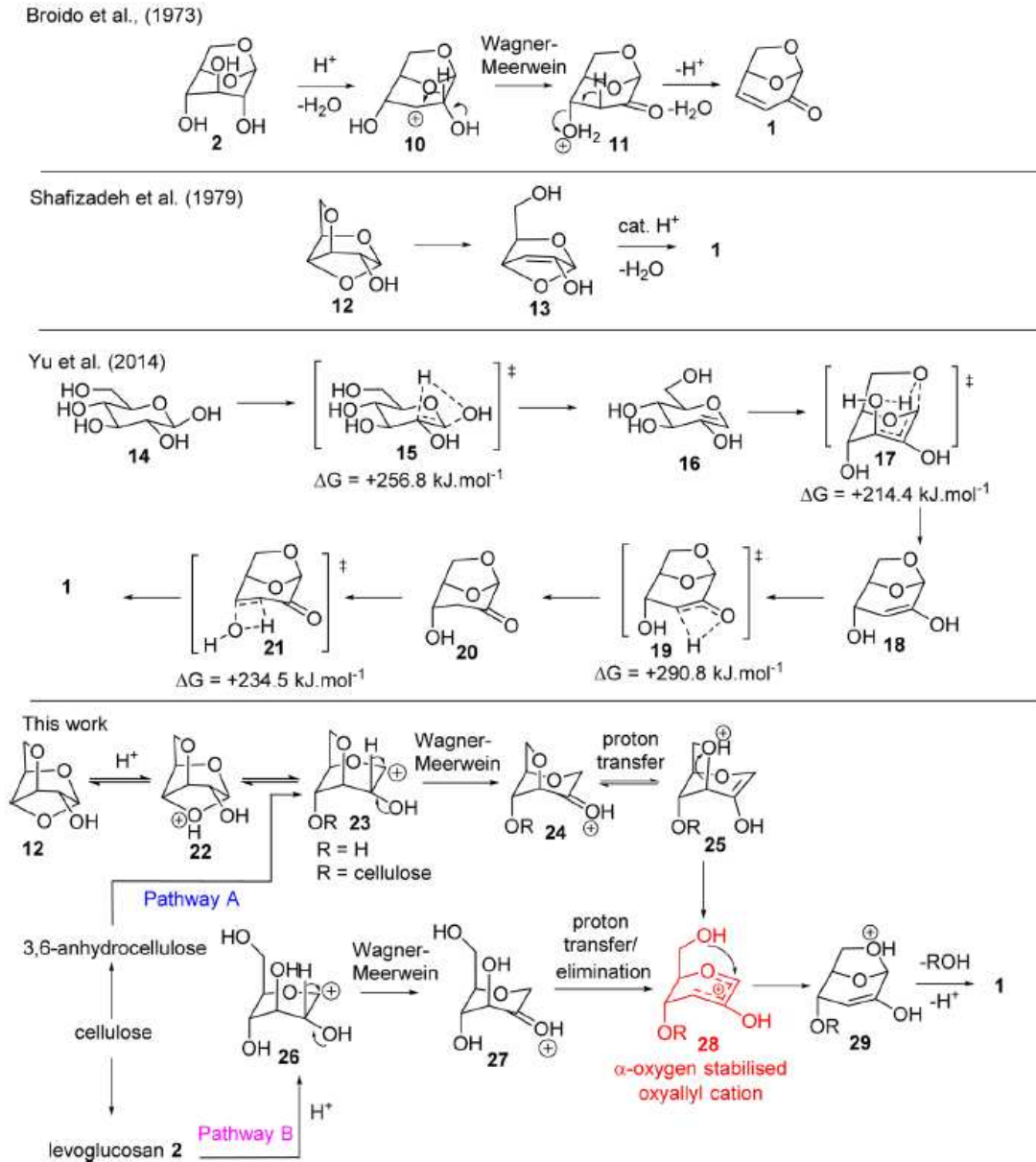


Schéma 2 : Mécanismes proposés pour obtenir la lévoglucosénone (issu de Greatrex *et al.* 2017)

Bien que la lévoglucosénone soit très majoritairement obtenue par pyrolyse, des méthodes alternatives de synthèse organique sont reportées dans la littérature.

A partir du D-galactose, Shibagaki *et al.*¹² ont proposé une voie de synthèse en 7 étapes dont les rendements sont bons voire excellents, aboutissant à un rendement global de 48%. L'étape clef de cette

procédure est la décarboxylation réductive du dérivé acétoxy acétal, catalysée à l'oxyde de zirconium hydraté (Schéma 3). Dans un chapitre de livre, Witczak¹³ rapporte d'autres synthèses permettant d'obtenir la **LGO** à partir de 1,6-anhydrosucres avec des rendements modérés.

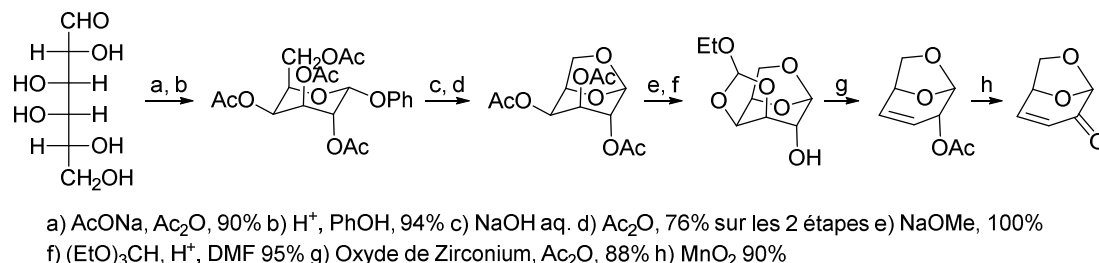


Schéma 3 : Synthèse de la lévoglucosénone à partir du D-galactose inspirée de Shibagaki *et al.*

De manière plus étonnante, Taniguchi *et al.*¹⁴ ont publié une synthèse à partir d'un composé qui n'est pas un ose (le 2-vinyl furane) en 6 étapes pour obtenir les deux énantiomères de la **LGO** avec pour étapes clés une dihydroxylation asymétrique de Sharpless et une réaction oxydative d'expansion de cycle. Le rendement global à partir du 2-vinyl furane est de 12% (Schéma 4). Dans des travaux plus récents, la même équipe propose une méthode permettant d'obtenir un mélange racémique de la **LGO** à partir d'un dimère d'acroléine en 6 étapes avec 36% de rendement.¹⁵ Puis une résolution racémique est réalisée en employant des lipases à partir du dérivé réduit et acétylé de la lévoglucosénone. Une fois séparés, les composés peuvent être déprotégés et oxydés pour retrouver les molécules désirées.

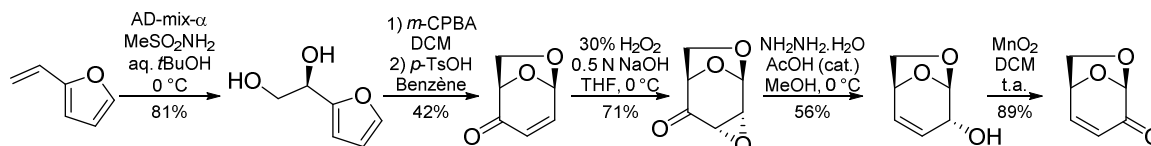


Schéma 4 : Synthèse de la lévoglucosénone à partir du 2-vinyl furane inspirée de Taniguchi *et al.*

Pour en revenir à la méthode la plus commune, la pyrolyse, suite à la découverte de la **LGO**, un certain nombre de travaux ont été publiés dans les années 70, cependant le sujet est tombé en désuétude dans les années 80-90 avant de connaître un regain d'intérêt, à partir du début des années 2000, qui semble se poursuivre.

Le groupe de Shafizadeh a été parmi les premiers en 1979 à s'intéresser à l'optimisation de la production de lévoglucosénone par pyrolyse.¹⁶ L'article correspondant décrit les rendements massiques obtenus en fonction de la quantité d'acide phosphorique, de la pression et de la température appliquées lors de la pyrolyse ainsi que de l'échelle sur laquelle elle est réalisée. Les meilleurs résultats obtenus sont des rendements de 11, 6 et 2% à partir de cellulose, de papier kraft et de papier usagé respectivement, avec une pureté de 90 à 95%.

Ces travaux ont notamment servi de base à Dobeles *et al.* qui ont publié une série d'articles, entre 1999 et 2005.¹⁷⁻²⁰ Ils se sont intéressés à l'impact du prétraitement par l'acide phosphorique sur la cristallinité et le degré de polymérisation de la cellulose, qu'elle soit ou non initialement microcristalline. Ces travaux

ont été étendus à de la pulpe kraft recyclée, à de la sciure de bouleau et au papier journal. En ajustant la quantité d'acide phosphorique imprégné dans les matériaux, les rendements massiques obtenus lors de la pyrolyse rapide vont de 17% pour la sciure à 34% pour la cellulose microcristalline.

Il est possible de remarquer dans la littérature récente l'apparition de techniques faisant intervenir des catalyseurs solides plutôt que de l'imprégnation à partir de solutions pour laquelle un séchage est nécessaire avant la pyrolyse. Les travaux de Casoni *et al.*²¹ semblent très prometteurs avec un rendement massique de 53% en **LGO** à partir de cellulose microcristalline en utilisant un catalyseur à base d'aluminium supporté sur un matériau mésoporeux, le MCM-41. La recyclabilité de ce catalyseur a été testée, permettant un deuxième cycle avec un bon rendement (41%), ce dernier s'effondrant néanmoins au troisième cycle (13%). De ce point de vue, Ye *et al.*²² suggèrent une solution plus robuste avec un charbon activé à l'acide phosphorique. Bien que les rendements soient plus modestes (14,7% à partir de cellulose microcristalline), six cycles ont pu être réalisés avec un rendement quasi-constant (12,5% au 6^e cycle). De plus, cette technique a été testée sur un petit pilote de laboratoire au lieu d'une échelle analytique et sur des biomasses telles que le bois de peuplier ou de pin avec des rendements intéressants, 7 et 7,8% respectivement.

La majorité des travaux de pyrolyse de la cellulose reportés dans la littérature sont réalisés sans solvant à l'exception de ceux de Kawamoto *et al.*²³ qui réalisent leurs réactions dans le sulfolane, un solvant à haut point d'ébullition (285 °C). La pyrolyse est alors réalisée à une température inférieure à 280 °C. Le meilleur rendement a été obtenu par pyrolyse à 200 °C sous 0.12 atm, pendant 6 min en présence de 0.1% d'acide sulfurique pour un rendement de 42 % par rapport à la cellulose. Cao *et al.*^{24,25} ont eux aussi utilisé un milieu polaire aprotique, le THF, pour réaliser la conversion de la cellulose en **LGO** mais cette fois sous pression de gaz inerte (Argon, 6.9 MPa) à 210 °C en présence d'acide sulfurique pour atteindre 51% de rendement. Les recherches de Kudo *et al.*^{26,27} ont porté sur l'utilisation de liquides ioniques, servant à la fois de solvant et de catalyseur, pour favoriser la formation de lévoglucosénone durant la pyrolyse de la cellulose microcristalline. Le ([EMIM]*p*-CH₃C₆H₄SO₃) a montré une bonne activité mais une faible recyclabilité contrairement au ([BMMIM]CF₃SO₃) (Figure 5). Dans un dernier article,²⁸ les liquides ioniques ont été supportés sur du charbon issu de la pyrolyse de la cellulose.

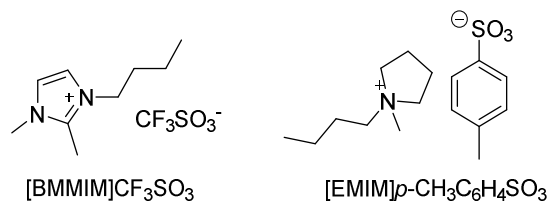


Figure 4 : Structure des liquides ioniques ([BMMIM]CF₃SO₃) (à gauche) et ([EMIM]*p*-CH₃C₆H₄SO₃) (à droite)

L'utilisation des micro-ondes a aussi été reportée en premier lieu par Sarotti *et al.*²⁹ avec des rendements modestes. D'autre part, De Bruyn *et al.*³⁰ les ont utilisés dans une approche qui a pour particularité d'avoir comme substrat de départ des lignines issues d'une hydrolyse enzymatique visant à produire du bioéthanol. L'objectif est de convertir les résidus saccharidiques en **LGO** et d'obtenir une lignine plus pure, ce qui est réalisé avec une conversion d'environ 40 % des sucres résiduels en lévoglucosénone. Il

est aussi à noter qu'aucun catalyseur n'est ajouté, les résidus d'acide de l'étape d'hydrolyse étant suffisants pour induire le processus.

Malgré le grand nombre d'articles traitant de la production de **LGO**, peu de brevets^{25,31} ont été déposés et à notre connaissance, seul celui de Circa Group³¹ a donné lieu à une réalisation industrielle. Le procédé continu FuracellTM est une flash-pyrolyse réalisée en présence de sulfolane et d'acide phosphorique vaporisés sur la matière première, et des rendements d'une dizaine de pourcents sont obtenus à partir de sciure de bois. Un schéma de son fonctionnement est représenté sur la Figure 6.³²

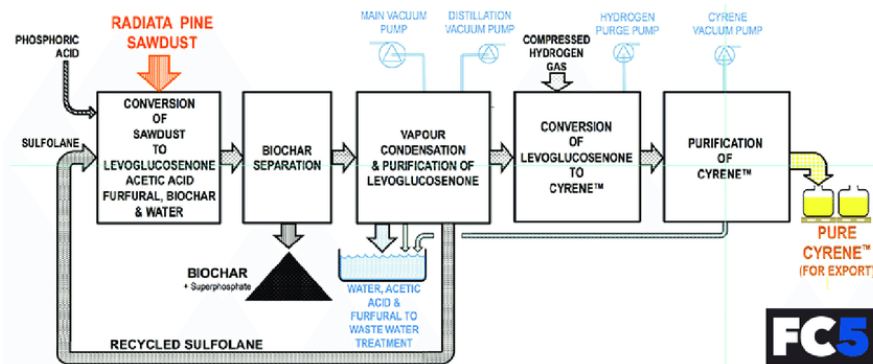


Figure 5 : Diagramme schématique du procédé FuracellTM

Bien avant la mise au point d'un procédé industrialisable, la **LGO** a intéressé les chercheurs. En effet, sa structure chirale et bicyclique comportant trois fonctions chimiques (acétal, cétone et alcène), en fait un synthon de choix que ce soit pour des études fondamentales ou en vue d'applications variées.

Les réactions exploitant sa double liaison sont nombreuses que ce soient des additions dipolaires 1,3, des réactions de Diels-Alder ou une simple réduction. Cette dernière transformation a donné naissance au CyrèneTM utilisé comme solvant de substitution des solvants polaires aprotiques classiques³³ qui présentent souvent une toxicité non négligeable. Le CyrèneTM peut être obtenu par hydrogénation pallado-catalysée sous pression mais aussi par voie biotechnologique.³⁴ D'autres dérivés de la lévoglucosénone ont été testés comme solvants.³⁵ Cependant, un solvant pour être économiquement viable doit être produit en gros volume et à faible coût. Notre axe de départ étant de produire des molécules à haute valeur ajoutée pour améliorer la stabilité économique de certaines filières agro-industrielles, nous allons explorer les applications à plus fortes valeurs ajoutées.

La chiralité de la **LGO** a inspiré une équipe de recherche argentine sous la direction de R. A. Spanevello et A. G. Suárez qui ont publié un grand nombre d'articles sur la synthèse d'inducteurs, de ligands et d'organo-catalyseurs à base de lévoglucosénone (Figure 7). Ces travaux ont été résumés dans une revue récente³⁶ consacrée à la lévoglucosénone à la fois dans les rôles cités précédemment de promoteur de chiralité et dans le rôle de synthon chirale dans des synthèses énantiospécifiques.

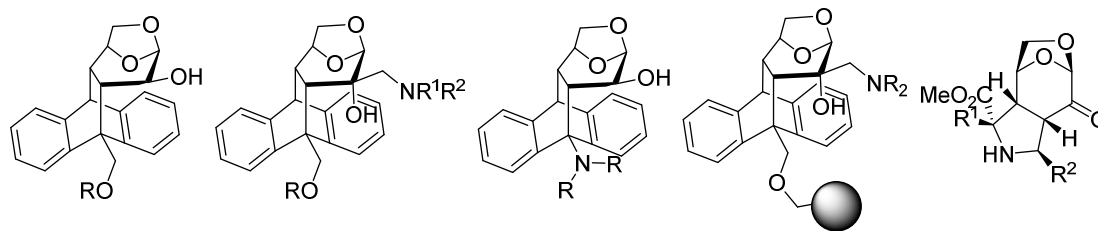


Figure 6 : Exemple d'inducteur chiral (à gauche), de ligands chiraux (au centre) et d'organo-catalyseur (à droite)

De part la présence d'un centre asymétrique sur la **LGO**, elle a souvent servi de synthon lors de synthèses de molécules bioactives. Il est à noter un certain nombre d'applications dans le domaine médical avec la synthèse d'anti-tumoraux³⁷⁻⁴² (Figure 8 en rouge) ou encore d'un dérivé anti-angiogénique⁴³ (Figure 5 en violet). La littérature fait aussi état de molécules telles que des phéromones utiles dans le cadre du bio-contrôle⁴⁴⁻⁴⁶ (Figure 8 en bleu). L'équipe d'Isobe a longtemps travaillé sur la synthèse d'une toxine naturelle, la (-)-tétrodotoxine,^{47,48} (Figure 8 en vert) à partir de la lévoglucosénone. Pour un certain nombre d'autres molécules complexes, la lévoglucosénone est envisagée comme un précurseur possible notamment, récemment, pour l'œstrone⁴⁹ ou encore l'indinavir.⁵⁰

La **LGO** obtenue à partir d'un polysaccharide, la cellulose, a aussi été largement utilisée pour la synthèse de disaccharides. Ces applications sont regroupées dans une revue publiée par Sarotti *et al.* en 2012.⁵¹

Enfin, la lévoglucosénone peut aussi servir à produire le (*S*)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide, autre synthon chiral aux multiples applications.

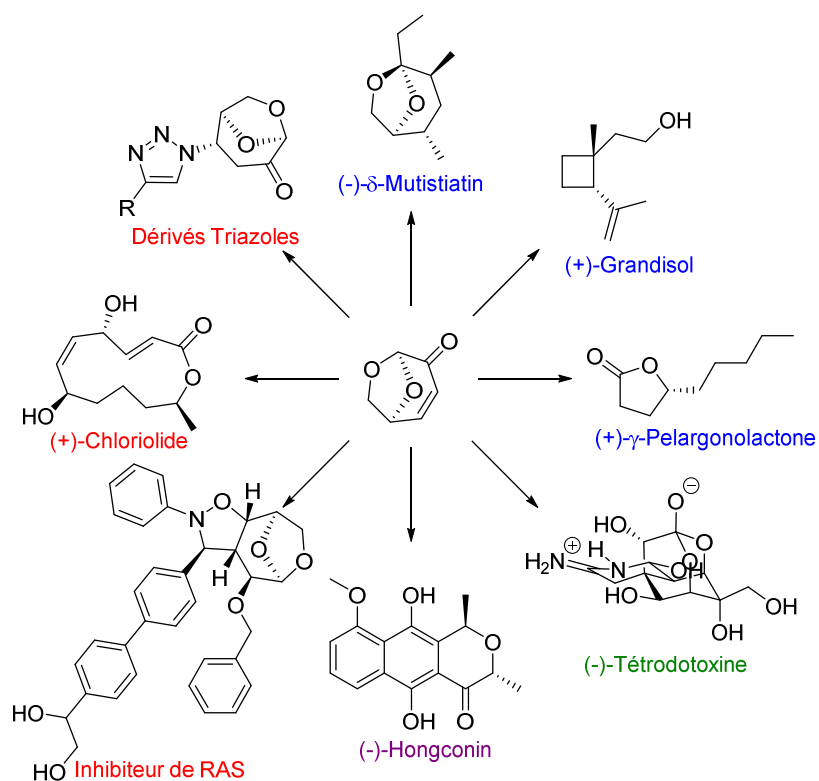
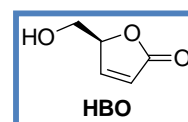


Figure 7 : Exemples de molécules synthétisées à partir de la LGO

Le (*S*)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide (CAS n° 78508-96-0, (*S*)-5-hydroxyméthyl-2(*5H*)-Furanone ou **HBO**) est connu depuis de nombreuses années et largement utilisé comme molécule plateforme pour la synthèse de composés actifs.



La littérature rapporte majoritairement quatre précurseurs pour la synthèse de la **HBO** que sont l'acide L-glutamique, la D-ribonolactone, le D-mannitol et la lévoglucosénone.

A partir des années 70, il est possible d'obtenir de la (*S*)- γ -hydroxyméthyl- γ -lactone, **2H-HBO**, *via* une synthèse en deux étapes à partir de l'acide L-glutamique (Schéma 5).^{52,53} Trois étapes supplémentaires sont ensuite nécessaires pour obtenir une forme protégée de la **HBO** : protection de la fonction alcool, phénylsélélation et oxydation.⁵⁴⁻⁵⁶ Il faudrait une étape supplémentaire de déprotection pour obtenir la **HBO** libre. Non seulement cette procédure est longue mais de plus, elle nécessite des réactifs toxiques.

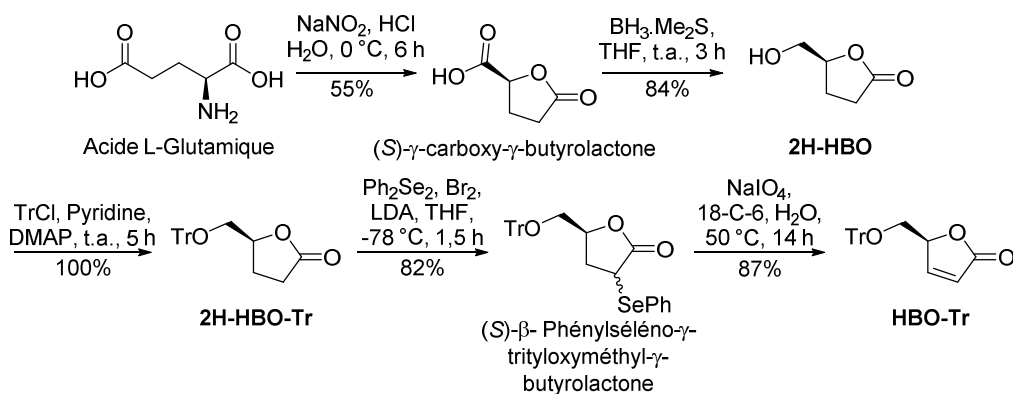


Schéma 5: Synthèse de la HBO à partir de l'acide L-glutamique d'après Ravid *et al.*⁵³ et Tomioka *et al.*⁵⁶

En 1981, Camps *et al.*⁵⁷ décrivent une synthèse en deux étapes à partir de la D-ribonolactone : la formation d'un orthoester sélectivement sur les diols vicinaux avec de l'orthoformate de triéthyle, suivie d'une pyrolyse sous pression réduite pendant 12 h (Schéma 6). Le rendement global reporté est de 68%. La même synthèse a été reprise par Magnus et Becker⁵⁸ sur une échelle plus importante (0.1 mol) avec pour résultat une diminution significative du rendement (48%). Cette synthèse, bien qu'économe en nombre d'étapes, présente un inconvénient majeur, la matière première utilisée étant coûteuse (D-ribonolactone 34 €/g)⁵⁹. Cela n'a pas empêché Ireland *et al.*,⁶⁰ Vekemans *et al.*⁶¹ et Shimarizu et Toste⁶² de proposer également des voies de synthèse de la HBO à partir de la D-ribonolactone (Schéma 6).

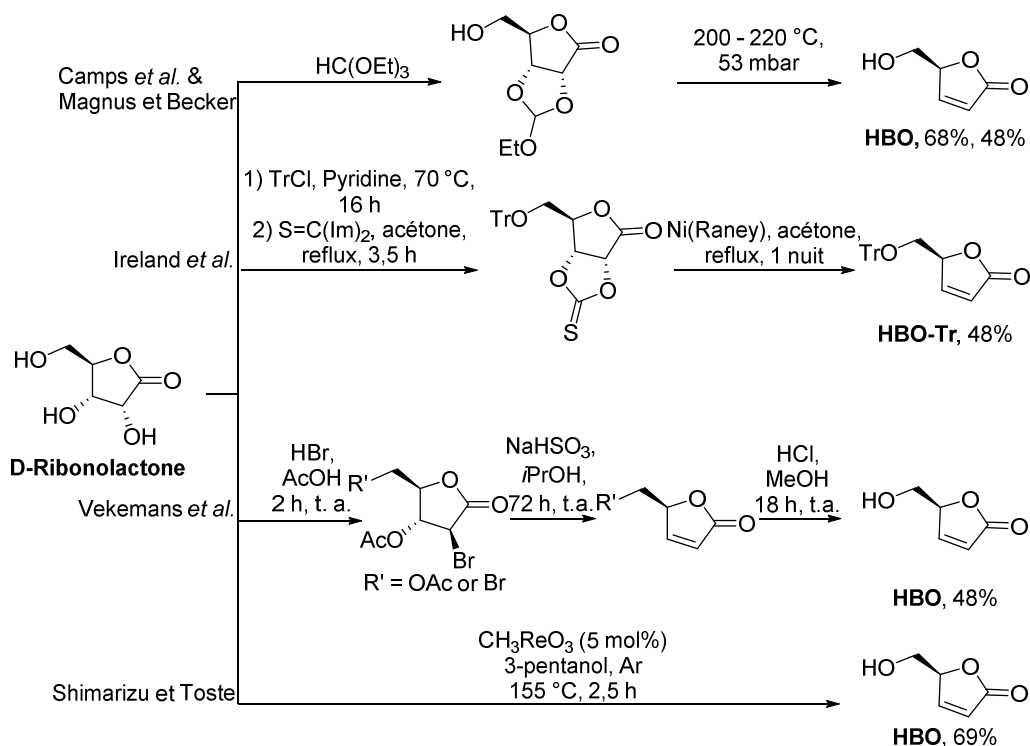


Schéma 6 : Synthèse de la HBO à partir de la D-ribonolactone

Dans le cas des synthèses proposées à partir du D-mannitol, le produit de départ est nettement plus abordable (58 €/kg),⁶³ mais la synthèse nécessite au minimum 4 étapes. Les premiers à avoir utilisé le D-mannitol pour la synthèse de la **HBO** semblent être Takano *et al.*⁶⁴ en 1986 avec un protocole en 6 étapes à partir du 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-D-mannitol. Häfele et Jäger⁶⁵ en 1987 ont obtenu un rendement de 39% à partir de l'acétonide en seulement 3 étapes. Diaz-Rodriguez *et al.*⁶⁶ en 2009 rapportent un rendement global de 36% après une protection des diols-1,2 et -5,6 par un acétonide, une coupure oxydante pour obtenir le D-glycéraldéhyde, suivie d'une oléfination de Wittig et enfin d'une déprotection en milieu acide (Schéma 7). Aucune de ces étapes ne peut être qualifiée de verte à notre sens car employant des réactifs toxiques (acétate de plomb), des quantités sur-stoechiométriques (excès de phosphorane), générant des sous-produits en quantité importante (oxyde de triphényl-phosphine) ou employant des solvants nocifs, notamment du dichlorométhane.

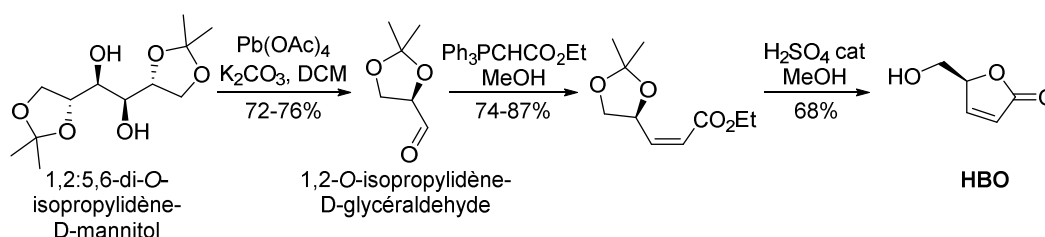


Schéma 7 : Synthèse de la HBO à partir du 1,2:5,6-D-isopropylidènemannitol inspirée de Häfele *et al.*⁶⁵

Enfin, la synthèse de la **HBO** à partir de la lévoglucosénone est réalisée en deux étapes *via* une oxydation de Baeyer-Villiger suivie d'une hydrolyse acide afin de convertir le formate de **HBO**, nommé **FBO**, en **HBO** (Schéma 8). Koseki *et al.*^{67,68} décrivent l'utilisation de peracides que sont l'acide *m*-chloro-perbenzoïque et l'acide peracétique pour réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger tandis que Paris *et al.*⁶⁹ se servent de complexes « métal-zéolites » pour réaliser cette étape. Ces deux méthodes donnent de très bons rendements (80-90%) mais présentent des inconvénients tels que la dangerosité, la génération de sous-produits avec l'utilisation des peracides (acide *m*-chlorobenzoïque) ou une toxicité élevée avec les zéolites à l'étain (celles donnant les meilleurs résultats).

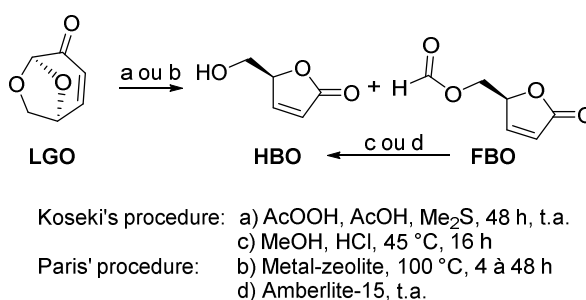


Schéma 8 : Procédures existantes de synthèse de la HBO à partir de la LGO

Chavez *et al.* ont décrit, en 2013, la génération *in situ* de l'acide peracétique par une catalyse enzymatique pour réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger sur des cétones cycliques (Schéma 9).⁷⁰ Nous nous sommes inspirés de ces travaux pour mettre en place la première synthèse durable de la **HBO** à partir de la **LGO**.

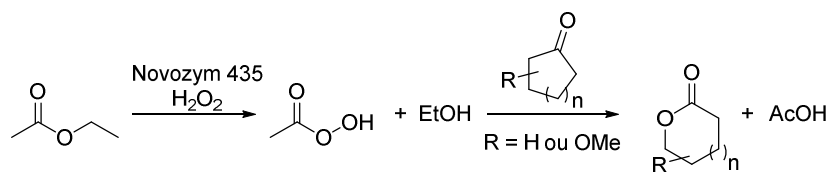


Schéma 9 : Réaction de Baeyer-Villiger biocatalysée sur cétones cycliques

Synthèses vertes de la HBO

Synthèse par biocatalyse

Ces travaux sont le fruit d'un travail d'équipe au sein de l'URD ABI, auxquels ont participé Aurélien Péru, Andreia Teixeira, Fanny Brunissen et Florent Allais. Ils ont donné lieu à un brevet (WO 2015165957) et deux publications :

- **Chemo-enzymatic synthesis of key intermediates (S)- γ -hydroxymethyl- α,β -butenolide and (S)- γ -hydroxymethyl- γ -butyrolactone via lipase-mediated Baeyer-Villiger oxidation of levoglucosenone** A. L. Flourat, A. A. M. Péru, A. R. S. Teixeira, F. Brunissen, F. Allais* *Green Chem.* **2014**, *17*, 404-412.⁷¹
- **Lipase-Catalyzed Baeyer-Villiger Oxidation of Cellulose-Derived Levoglucosenone into (S)- γ -hydroxymethyl- α,β -Butenolide: Optimization by Response Surface Methodology** A. R. S. Teixeira*, A. L. Flourat, A. A. M. Péru, F. Brunissen, F. Allais *Frontiers in Chemistry* **2016**, *4*, 16/1-16/11.⁷²

Premiers essais de mise en œuvre de l'oxydation de Baeyer-Villiger enzymatique à la LGO

La première synthèse chimio-enzymatique du (S)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide à partir de lévoglucosénone a été réalisée dans l'acétate d'éthyle en présence d'une lipase, la *Candida antarctica lipase B* ou **CAL-B**, sous sa forme supportée (Novozym 435) et de peroxyde d'hydrogène suivant les conditions proposées par Chavez *et al.*⁷⁰ Ce premier essai, en plus d'avoir été fructueux avec 80% de **LGO** convertie en un mélange de **HBO** et de son formate, **FBO**, a permis de démontrer la faisabilité de cette réaction dans les standards de la chimie verte : Faible température (40 °C), solvant et réactif non toxique, matières premières renouvelables, condition catalytique (Schéma 10). De plus, le suivi cinétique par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de la réaction a montré que celle-ci ne nécessitait que 8 heures de réaction comparé aux 24 à 48 h nécessaires avec les cétones cycliques utilisées par Chavez *et al.*⁷⁰ Cette différence de réactivité peut s'expliquer par la structure particulière de la **LGO**. La présence de l'acétal en alpha de la fonction cétone, enrichit électroniquement cette position par effet mésomère et favorise ainsi la migration de ce carbone sur l'oxygène du peroxyde.⁷³ En effet, la réaction de Baeyer-Villiger est un mécanisme concerté où la migration du carbone vers l'oxygène est facilitée par le départ de l'acide acétique (Schéma 11). Les électrons de la liaison carbone-carbone sont attirés vers l'oxygène d'autant plus facilement que leur « départ » peut être compensé.⁷⁴ Cet effet est confirmé lorsque la réaction est réalisée sur la forme hydrogénée de la **LGO**, le cyrène ou **2H-LGO**, avec une régiosélectivité totale du côté de l'acétal.

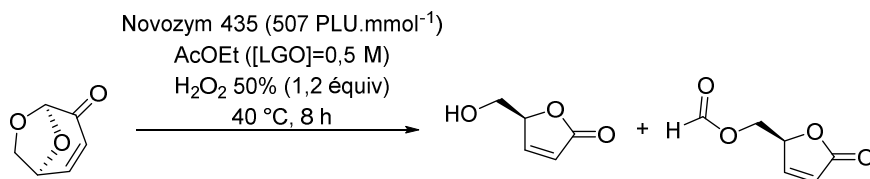


Schéma 10 : Oxydation biocatalysée de Baeyer-Villiger appliquée à la LGO et transposition en FBO

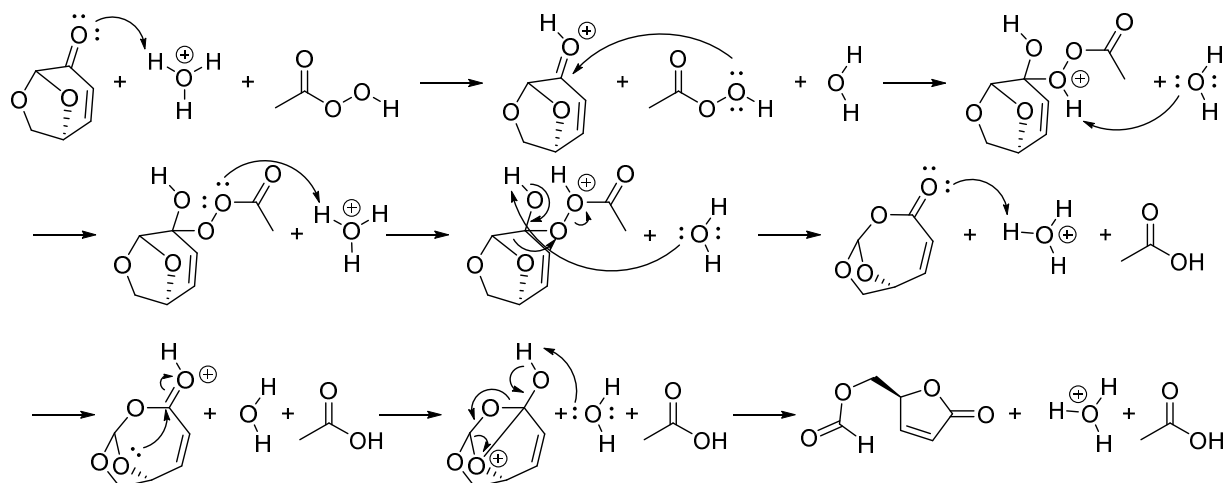


Schéma 11 : Mécanisme d'oxydation de Baeyer-Villiger en condition acide et en présence d'acide peracétique

Pour obtenir le produit désiré avec un bon rendement, il est nécessaire d'hydrolyser l'intermédiaire réactionnel qu'est le formate de **HBO**. Les méthodes proposées dans la littérature font intervenir des conditions acides. Pour Koseki *et al.*,⁶⁷ il s'agit d'une méthanolyse à chaud (45 °C) catalysée par l'acide chlorhydrique alors que Paris *et al.*⁶⁹ utilisent une résine acide, l'Amberlite 15, dans le 1,4-dioxane à température ambiante. Dans un premier temps, nous avons, pour des raisons de facilité de mise en œuvre au laboratoire, utilisé le procédé par méthanolyse de Koseki *et al.*⁶⁷

Leviers d'amélioration de la réaction biocatalysée

Après développement d'une méthode HPLC, nous avons réalisé des cinétiques de réaction à différentes températures pour évaluer l'importance de l'influence de ce paramètre sur la réaction (Figure 9). Trois conditions ont été choisies. La première a été de conserver la température de la réaction initiale à 40 °C comme point de référence. La deuxième a été d'abaisser la réaction à température ambiante pour estimer si un gain énergétique était possible. Enfin, la troisième a été d'augmenter la température à 60 °C (la CAL-B étant connue pour sa bonne résistance thermique), pour voir si un gain de temps significatif pouvait être observé. Les cinétiques ont été réalisées sur 24 heures.

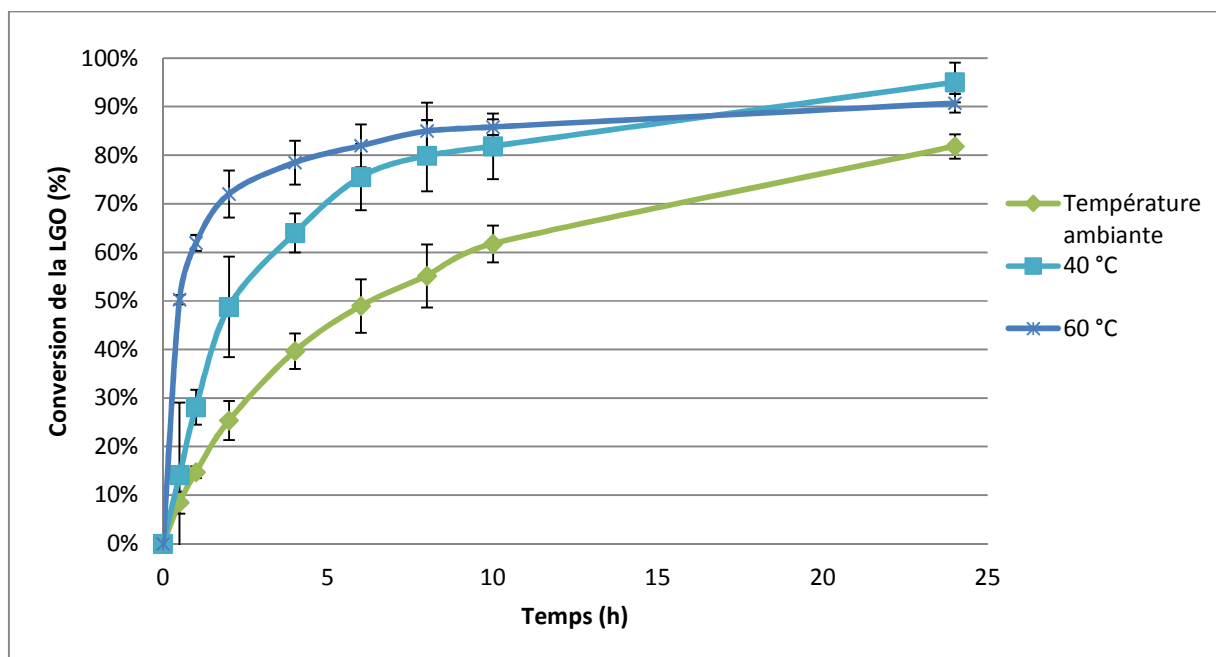


Figure 8 : Cinétiques de conversion de la LGO en fonction du temps et de la température de réaction

Comme attendu, plus la réaction est menée à température élevée, plus la vitesse initiale de réaction est importante. Cependant, bien que la vitesse initiale à 60 °C soit plus importante, elle ne permet pas d'obtenir une conversion significativement supérieure après 8 h. A 24 h, la réaction semble même moins performante. Enfin, travailler à température ambiante limite la conversion à 80% après 24 h de réaction, alors que cette valeur est atteinte en 7 h à 40 °C. Le gain énergétique est contrebalancé par la perte de productivité.

Nous choisissons donc de rester à 40 °C, afin de contrôler s'il est possible d'obtenir une conversion totale de la **LGO** en augmentant le ratio enzyme/substrat, initialement de 464 PLU.mmol⁻¹ pour un rendement après méthanolyse et purification de 74%. Les résultats exprimés ici sont donc des rendements isolés en **HBO**. En multipliant la charge enzymatique initiale par 1,5 ou 2, aucune amélioration sur le rendement en **HBO** n'est observée (respectivement 72 et 75%), de même qu'en utilisant une première charge d'enzyme puis en ajoutant une seconde charge après 4 h de réaction (75%). Pour vérifier que nous ne serions pas limités par la quantité d'H₂O₂, un essai avec 1,5 équivalents au lieu de 1,2 est réalisé, qui aboutit à une légère perte de rendement (70%).

Par la suite, nous cherchons à évaluer l'impact de la concentration en **LGO** sur la réaction à une charge enzymatique donnée (464 PLU.mmol⁻¹) et un ratio de peroxyde d'hydrogène fixe (1.2 équiv.) (Figure 10). Une augmentation du rendement est constatée lorsque la concentration en **LGO** dans le milieu augmente jusqu'à atteindre un plateau.

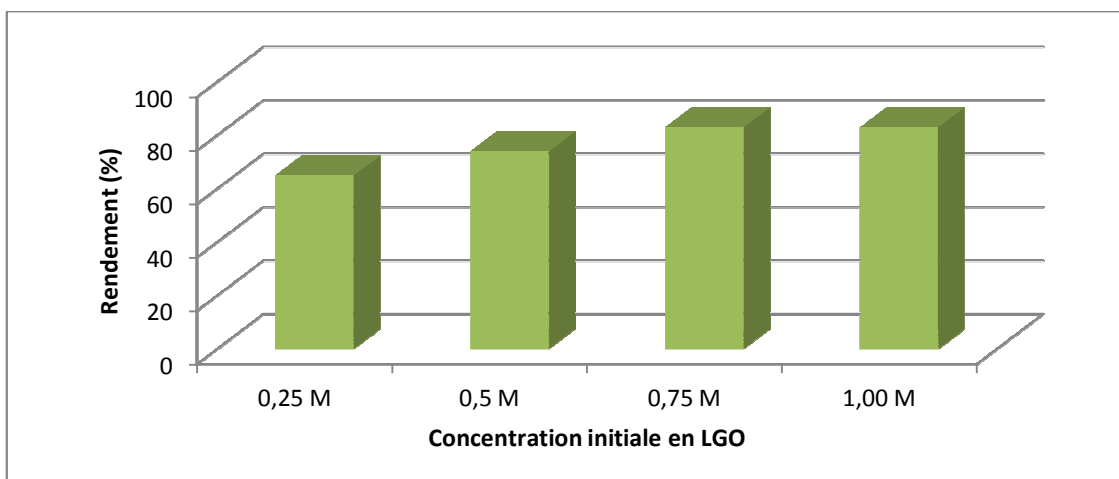


Figure 9 : Influence de la concentration de la réaction sur le rendement

A partir de ces nouvelles conditions ($[LGO] = 0,75 \text{ M}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $1,2 \text{ } \text{equiv. de } H_2O_2$), cette fois-ci des essais de réduction de la charge enzymatique sont réalisés. Une perte de rendement de 10% est observée pour une diminution de 50% de la charge en **CAL-B** initiale, cette valeur restant constante avec seulement 30% d'enzyme. Il est donc possible de réduire significativement le coût du procédé moyennant un léger compromis sur le rendement.

Activité résiduelle de la CAL-B⁷⁵

Il est connu que l'activité enzymatique est impactée par le pH du milieu réactionnel. Etant en milieu organique, il est compliqué de déterminer un pH mais nous savons qu'au cours de la réaction de l'acide acétique et de l'acide formique sont générés et relargués dans le milieu. De telles conditions acides peuvent mener à une dénaturation de la protéine notamment par rupture des ponts disulfures assurant sa cohésion. Nous avons donc souhaité suivre au cours du temps l'activité enzymatique résiduelle afin d'évaluer les possibilités de recyclage de cette enzyme supportée. Pour cela, une méthode de dosage de l'activité enzymatique par GC-MS reposant sur la conversion de l'acide laurique en laurate de *n*-propyle a été mise en place. Le graphique représenté ci-dessous (Figure 12) montre l'activité résiduelle de l'enzyme au cours de la réaction. Il est aisé de constater que très rapidement l'enzyme perd de son activité ; environ $\frac{1}{4}$ d'efficacité est perdue après 8 h et plus de 60% après 16 h de réaction. Pour maintenir une activité enzymatique permettant la recyclabilité de l'enzyme, nous avons envisagé de neutraliser les acides formés.



Figure 10: Structure de la *Candida Antarctica Lipase B*

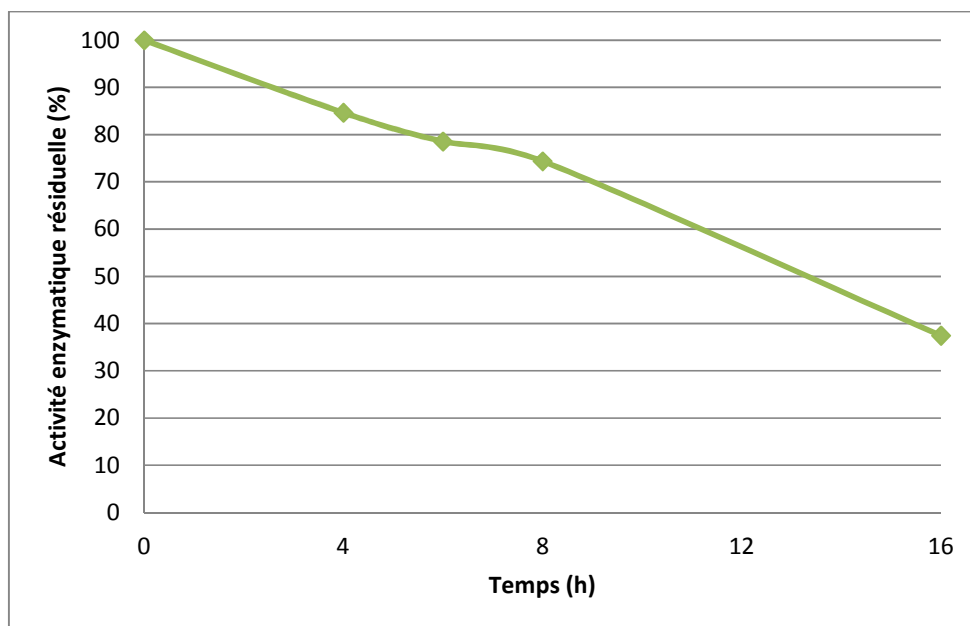


Figure 11: Activité résiduelle de la CAL-B en fonction du temps de réaction lors de l'oxydation de la LGO (40 °C, [LGO] = 0.75 M dans l'acétate d'éthyle, enzyme/LGO ratio 219 PLU mmol⁻¹, 1.2 équiv. H₂O₂)

Des essais ont été menés en utilisant des sources d'oxydant contenant une base. Nous avons débuté cette étude avec du percarbonate de sodium (2Na₂CO₃.3H₂O₂, CAS n°15630-89-4),⁷⁵ malheureusement les rendements obtenus n'ont pas excédé les 23%. L'hypothèse que nous avons formulée est que l'ajout d'eau nécessaire à l'activation du réactif perturbe le fonctionnement de la réaction. Nous nous sommes alors tournés vers une source organique d'oxydant, l'adduit urée-péroxyde d'hydrogène (CO(NH₂)₂.H₂O₂, CAS n° 124-43-6). Ici encore, les rendements obtenus ont été décevants avec un maximum d'environ 50% en 4 h puis la décomposition partielle du produit désiré. Comme les nouvelles sources d'oxydant ne se sont pas montrées efficaces, une tentative avec du peroxyde d'hydrogène en présence d'un tampon phosphate aqueux à pH 7.2 a été menée. Encore une fois, le rendement après hydrolyse et purification n'a conduit qu'à 47% du produit désiré. Notre hypothèse d'une déstabilisation du système enzymatique due à la présence d'eau se confirme et est appuyée par des données bibliographiques.⁷⁶⁻⁷⁸ Bien que l'eau soit le solvant de choix pour la majorité des réactions biocatalytiques, elle peut provoquer dans certaines conditions de milieu l'hydrolyse de certaines liaisons peptidiques, des désaminations ou encore la transformation de résidus cystine entraînant une désactivation de l'enzyme. La conformation hydrodynamique de l'enzyme est également influencée par le milieu et donc diffère entre un milieu aqueux et un milieu organique. De plus, la polarité du milieu peut influencer la solubilité et la stabilité des autres constituants de la réaction. Enfin, dans la réaction considérée ici, nous utilisons une lipase dans un rôle de transfert d'oxydation, la présence d'eau en grande quantité pouvant interférer dans l'orientation de l'activité enzymatique désirée.

Pour s'affranchir d'un ajout d'eau trop massif, nous avons par la suite étudié la possibilité de réaliser cette réaction en présence de tampons solides. Pour cela, trois couples acide et base conjugués (sous forme de sel de sodium) ont été choisis dans la gamme de pH optimale décrite pour l'enzyme (Figure 13) :

- MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique), pKa = 7,2
- TAPS (acide *N*-[tris(hydroxyméthyl)-méthyl]-3-aminopropanesulfonique), pKa = 8,4
- CAPSO (acide 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonique), pKa = 9,6

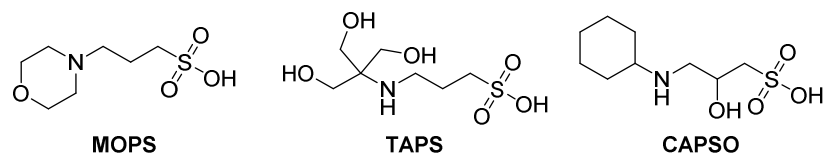


Figure 12 : Structures des tampons solides utilisés

Le suivi cinétique des réactions menées avec ces tampons solides a été réalisé (Figure 14). Les conditions expérimentales retenues étaient les suivantes : $[LGO] = 0,75 \text{ mol.L}^{-1}$, $169 \text{ PLU.mmol}^{-1}$ de Novozym® 435, 1,2 équivalent de H_2O_2 , $40 \text{ }^\circ\text{C}$ et 20 mg.mL^{-1} de la forme basique et de la forme acide du tampon solide considéré. Les résultats sont reportés sur le graphique représenté ci-dessous. Ce dernier montre une réduction très significative du temps nécessaire pour atteindre une conversion maximale de 8 à 2 heures. De plus, la conversion maximale enregistrée avec le **MOPS** est équivalente à celle obtenue sans tampon alors qu'avec le **TAPS** et le **CAPSO**, 90% de conversion sont atteints. Cependant, il est à noter qu'alors que ces deux derniers restent sous forme de poudre en suspension dans le milieu, le **MOPS** forme un gel au fond du réacteur, son efficacité pouvant en être réduite. De surcroît, ce gel apporte une gêne à la mobilité des billes sur lesquelles est supportée la CAL-B, pouvant réduire l'activité enzymatique. L'augmentation de la cinétique de réaction peut s'expliquer par un changement de mécanisme pour l'oxydation de Baeyer-Villiger, dû aux conditions basiques. Le mécanisme généralement proposé (Schéma 11) fait intervenir une catalyse acide, initiée par l'acidité intrinsèque de la solution de peroxyde d'hydrogène, cependant la réaction peut être réalisée en milieu basique comme décrit dans le Schéma 12.

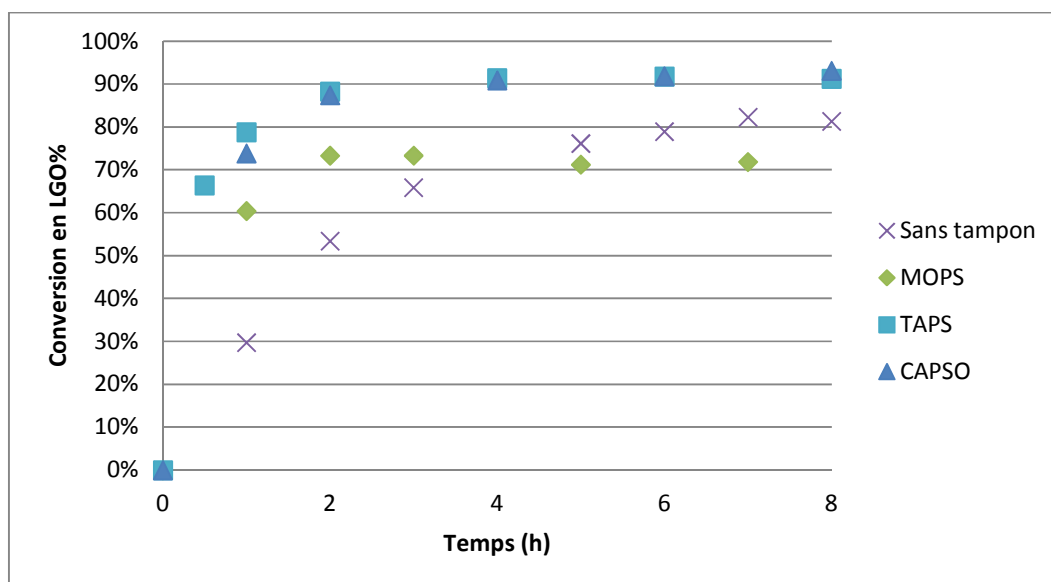


Figure 13 : Suivi cinétique de la conversion de la LGO en fonction des différents tampons solides utilisés

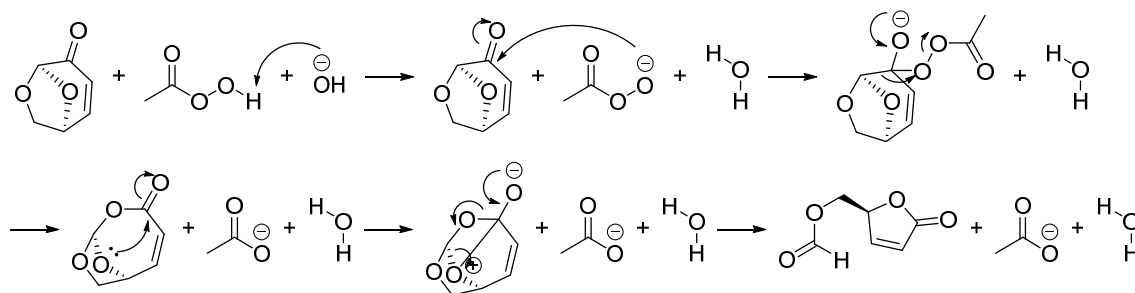


Schéma 12 : Mécanisme de l'oxydation de Baeyer-Villiger en condition basique en présence d'acide peracétique

Après ces études rapides pour évaluer les différents paramètres pouvant influencer la réaction, qui s'intéressaient à une variable à la fois (One variable on time – OVAT), nous avons désiré considérer les synergies possibles entre certains de ces paramètres en utilisant la méthodologie des plans d'expériences.

Optimisation par plan d'expériences de l'oxydation enzymatique de Baeyer-Villiger de la LGO

Pour aller plus loin et mieux comprendre l'impact de ces tampons solides sur la réaction, un plan d'expériences s'intéressant à trois variables, que sont le pH *via* le pKa des tampons solides utilisés (MOPS 7,2, TAPS 8,4 et CAPSO 9,6), la charge en enzyme (55 à 285 PLU.mmol⁻¹) variant de 2 à 10% en masse par rapport au substrat et la concentration en LGO (0,5 à 1,0 mol.L⁻¹), a été réalisé mesurant deux réponses : le pourcentage de conversion de la LGO et l'activité enzymatique résiduelle (Figure 15).

Nous avons choisi un design de type cubique faces centrées (CCF, cubic centered faced) complet pour réaliser ce plan d'expériences car il permet d'évaluer des corrélations entre les différentes variables et donc d'avoir une meilleure robustesse du modèle statistique généré. Pour générer la matrice et traiter les données, nous avons utilisé le logiciel Modde de Umetrics AB (v10.1).

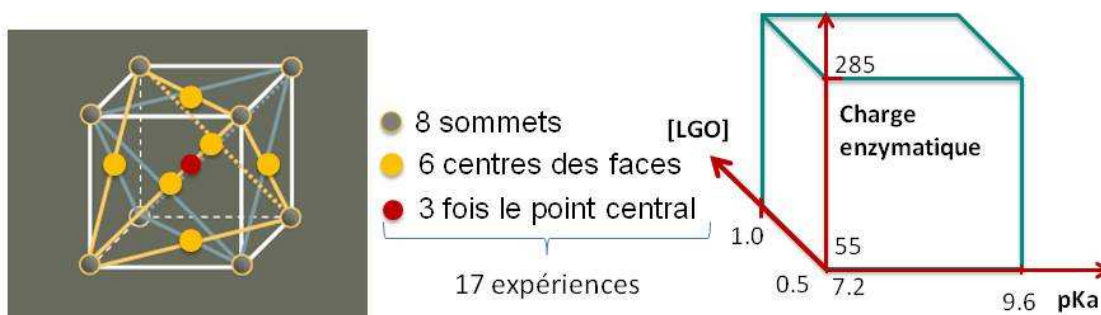


Figure 14 : Design CCF choisi pour le plan d'expériences, soit 17 expériences

Nous avons par ailleurs choisi de fixer certains paramètres, suite aux expériences réalisées précédemment. La température sera pour toutes les expériences fixée à 40 °C afin d'assurer une bonne conversion sans risque de détérioration de l'enzyme ou du substrat. Le temps de réaction sera de 2 heures, ce qui correspond au plateau cinétique observé avec les tampons solides et permet de limiter le temps de contact entre l'enzyme et les inhibiteurs du milieu. Enfin, la quantité de peroxyde d'hydrogène sera maintenue à 1,2 équivalent par rapport au substrat.

La matrice présente ainsi 17 expériences à réaliser pour mener à bien ce plan d'expériences, dont 3 points centraux pour tester la reproductibilité de la régression polynomiale obtenue (Figure 15). Chaque expérience est réalisée en duplicata afin d'affiner la précision du modèle. Au total, 34 expériences sont planifiées suivant la matrice présentée ci-dessous.

Tableau 1 : Matrice et réponses enregistrées pour chaque point du plan d'expériences

Exp/Réplikat ^a	Tampon solide (pKa)	Charge en enzyme (PLU.mmol ⁻¹)	[LGO] (M)	Conversion de la LGO (%)	Activité résiduelle de l'enzyme (%)
1/18	MOPS (7,2)	55	0,5	57,4/68,0	88,5/82,0
2/19	CAPSO (9,6)	55	0,5	79,9/79,7	63,6 ^b /37,6
3/20	MOPS (7,2)	285	0,5	81,3/87,0	85,3/81,0
4/21	CAPSO (9,6)	285	0,5	87,5/90,8	52,7/57,3
5/22	MOPS (7,2)	55	1,0	74,8/74,5	70,3/76,9
6/23	CAPSO (9,6)	55	1,0	47,3/63,9	60,2/60,7
7/24	MOPS (7,2)	285	1,0	81,5/91,6	51,2/44,8
8/25	CAPSO (9,6)	285	1,0	87,2/90,4	69,2/52,4 ^b
9/26	MOPS (7,2)	170	0,75	84,4/87,2	72,4/73,4
10/27	CAPSO (9,6)	170	0,75	90,0/88,9	68,9/67,0
11/28	TAPS (8,4)	55	0,75	73,9/82,0	73,1/63,1
12/29	TAPS (8,4)	285	0,75	67,8 ^b /91,3	74,8/50,6
13/30	TAPS (8,4)	170	0,5	86,6/87,6	61,8/61,1
14/31	TAPS (8,4)	170	1,0	88,4/89,5	12,6 ^b /67,5
15/32	TAPS (8,4)	170	0,75	87,9/90,2	65,7/68,5
16/33	TAPS (8,4)	170	0,75	93,8/90,3	74,9/74,1
17/34	TAPS (8,4)	170	0,75	92,4/89,9	76,8/75,8

^a Les expériences sont conduites dans un ordre aléatoire ^b Point aberrant : le point observé est trop distant des autres résultats. Ces points sont exclus du modèle.

De façon à éviter les biais de manipulations, les expériences ont été réalisées de façon aléatoire et non conduites les unes après les autres dans l'ordre proposé par la matrice. Les résultats obtenus pour les deux paramètres étudiés sont reportés dans le tableau 1. A l'issue de la réalisation de ce plan, quatre valeurs sont jugées aberrantes et exclues du calcul du modèle statistique. Pour affiner le modèle (Tableau 2), nous réalisons en duplicata deux expériences supplémentaires dans des zones « chaudes » en matière de conversion et d'activité résiduelle de l'enzyme. Suite au problème rencontré avec le MOPS, une expérience est également conduite avec de l'HEPES (acide *N*-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-*N*-(2-éthanesulfonique) et son sel conjugué, ce qui fixe le pH à 7,5.

Tableau 2 : Expériences supplémentaires pour affiner le modèle

Exp/Réplikat	Tampon solide (pKa)	Charge en enzyme (PLU.mmol ⁻¹)	[LGO] (M)	Conversion de la LGO (%)	Activité résiduelle de l'enzyme (%)
35/36	MOPS (7,2)	152	0,70	78,0/80,8	78,2/79,4
37/38	CAPSO (9,6)	80	0,94	72,5/73,6	70,0/71,6
39	HEPES (7,5)	120	0,65	79,7	76,5

Pour obtenir une régression polynomiale fiable, il est important que la distribution des réponses se répartisse de façon gaussienne. Pour cela, il peut être nécessaire d'appliquer une transformation au modèle de type logarithmique ou exponentielle. Ici les deux réponses sont transformées selon un logarithme négatif pour assurer cette distribution normalisée des réponses. Les équations du modèle seront donc du type suivant (Equation 1) :

$$(Equation 1) \quad -\log(100 - Y) = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

Où :

- Y est soit la conversion de la **LGO** (Y1), soit l'activité résiduelle de l'enzyme (Y2)
- Les valeurs prises par les variables centrées et réduites sont x1 (le pH), x2 (le ratio enzyme/substrat) et x3 (la concentration en **LGO**).
- β_0 est une constante et les β_{ij} correspondent aux coefficients des termes simples, carrés et quadratiques du modèle.

Ces coefficients β sont calculés à l'aide du logiciel Modde ainsi qu'un indice de leur signification (*p*-value) si cet indice est inférieur à 0,05, alors le coefficient considéré comme significatif sera par conséquent pris en compte. Inversement, si cette valeur est supérieure à 0,05, alors le terme ne sera pas considéré (Tableaux 3 et 4).

Tableau 3 : Coefficients centrés et réduits (CR.) du modèle, leur écart-type, la *p*-value et l'intervalle de confiance à 95% (IC) pour la conversion en LGO

Conversion	Coeff. CR.	Ecart-type	<i>p</i> -value	IC _{95%} (±)
Constante	0,992	0,029	3,62×10⁻²⁴	0,061
x₁	0,050	0,020	0,020	0,041
x₂	0,201	0,022	6,08×10⁻¹⁰	0,045
x₃	0,004	0,021	0,841	0,043
x₁×x₁	-0,125	0,039	3,59×10⁻³	0,081
x₂×x₂	-0,119	0,044	0,011	0,089
x₃×x₃	0,057	0,039	0,165	0,081
x₁×x₂	0,020	0,024	0,417	0,049
x₁×x₃	-0,082	0,024	1,74×10⁻³	0,048
x₂×x₃	0,028	0,024	0,24	0,049

Les valeurs *p*-value significatives (< 0,05) sont identifiées en gras

Tableau 4 : Coefficients centrés et réduits (CR.) du modèle, leur écart-type, la *p*-value et l'intervalle de confiance à 95% (IC) pour l'activité enzymatique résiduelle

Activité résiduelle	Coeff. CR.	Ecart-type	<i>p</i> -value	IC _{95%} (±)
Constante	-1,48	0,029	2,49×10⁻²⁸	0,060
x₁	-0,090	0,020	1,73×10⁻⁴	0,043
x₂	-0,032	0,022	0,158	0,046
x₃	-0,039	0,022	0,090	0,046
x₁×x₁	0,035	0,069	0,377	0,080
x₂×x₂	-0,011	0,043	0,790	0,088
x₃×x₃	-0,040	0,042	0,343	0,086
x₁×x₂	0,059	0,025	0,025	0,051
x₁×x₃	0,123	0,024	2,67×10⁻⁵	0,050
x₂×x₃	-0,027	0,025	0,284	0,051

Les valeurs *p*-value significatives (< 0,05) sont identifiées en gras

Les équations suivantes modélisent la conversion (Equation 2) et l'activité enzymatique résiduelle (Equation 3)

$$\text{(Equation 2)} - \log(100 - Y1) = -0.992 + 0.050x_1 + 0.201x_2 - 0.125x_1^2 - 0.119x_2^2 - 0.082x_1x_3$$

$$\text{(Equation 3)} - \log(100 - Y2) = -1.48 - 0.090x_1 + 0.059x_1x_2 + 0.123 x_1x_3$$

Pour s'assurer que ces équations représentent bien la réaction, certains indicateurs donnés par le logiciel Modde sont à prendre en compte, dont l'analyse de la variance (ANOVA). Le coefficient de détermination, R², doit être supérieur à 0,5 pour être considéré valable et s'approcher au maximum de 1 pour assurer la bonne régression du modèle à partir des données acquises lors du plan d'expériences. Nous enregistrons des valeurs de R² égales à 0,828 et 0,674 respectivement pour la conversion et l'activité résiduelle. Ensuite le coefficient de validation croisée, Q², qui assure la bonne prédictibilité du modèle doit lui aussi être supérieur à 0,5. Dans le cas présent, il est de 0,733 et 0,50 pour nos réponses Y1 et Y2 respectivement. Enfin le modèle doit être significatif, deux indicateurs mesurant cela : la régression polynomiale est évaluée par la *p*-value (<0.05) et enfin le *lack of fit* (>0.05) qui indique si les écarts expérimentaux sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec le modèle. Dans notre cas, ces deux indicateurs sont atteints quelle que soit la réponse considérée. Les modèles statistiques générés sont donc considérés comme valides et peuvent être interprétés. Nous ne nous dispenserons toutefois pas de réaliser une validation externe aux optima calculés par le logiciel Modde. Pour l'interprétation, l'utilisation des valeurs centrées réduites est précieuse, le signe des coefficients indiquant si il y a un effet bénéfique sur l'observable, lorsqu'il est positif, ou au contraire néfaste lorsque celui-ci est négatif. La figure 16 permet de se rendre compte que les facteurs qui sont positifs pour l'amélioration de la conversion – augmentation du pH (pKa) et du ratio d'enzyme (Enz) – sont défavorables à la conservation de l'activité enzymatique de même que l'augmentation de la concentration en LGO (LGO). Inversement le terme quadratique montrant l'interaction entre le pKa et la concentration en substrat (pKa*LGO) est négatif à la conversion mais fortement positif pour l'activité enzymatique résiduelle.

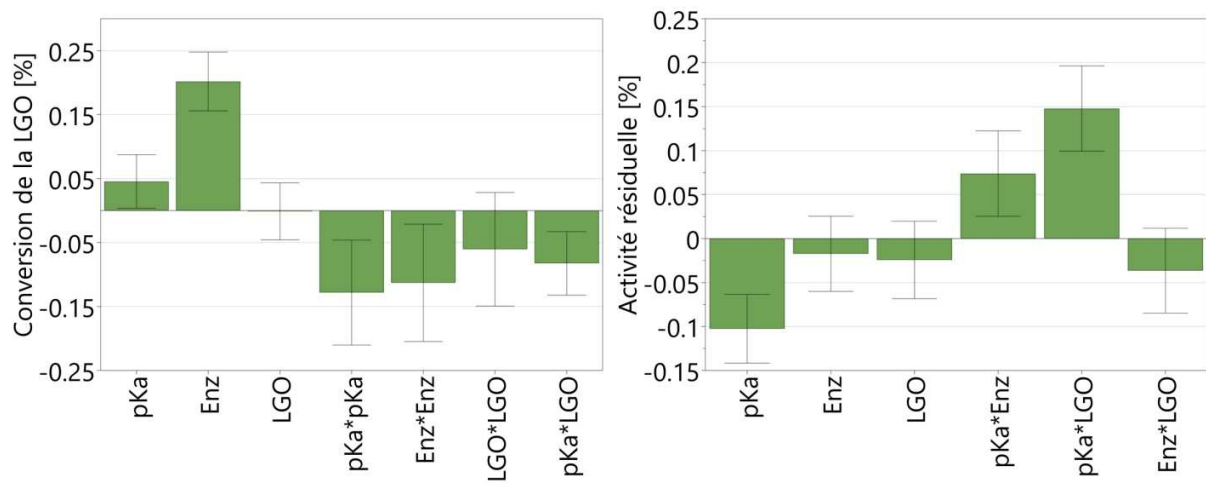


Figure 15 : Coefficient des variables centrées réduites pour le modèle de la conversion de la LGO (à gauche) et le modèle de l'activité enzymatique résiduelle (à droite)

Il apparaît dès lors qu'un compromis entre les deux valeurs sera à trouver. Cela est confirmé par l'observation de la représentation de type carte de chaleur des réponses étudiées (Figure 17). Cette représentation est permise par l'approche méthodologique des surfaces de réponses (RSM, response surface methodology).⁷⁹

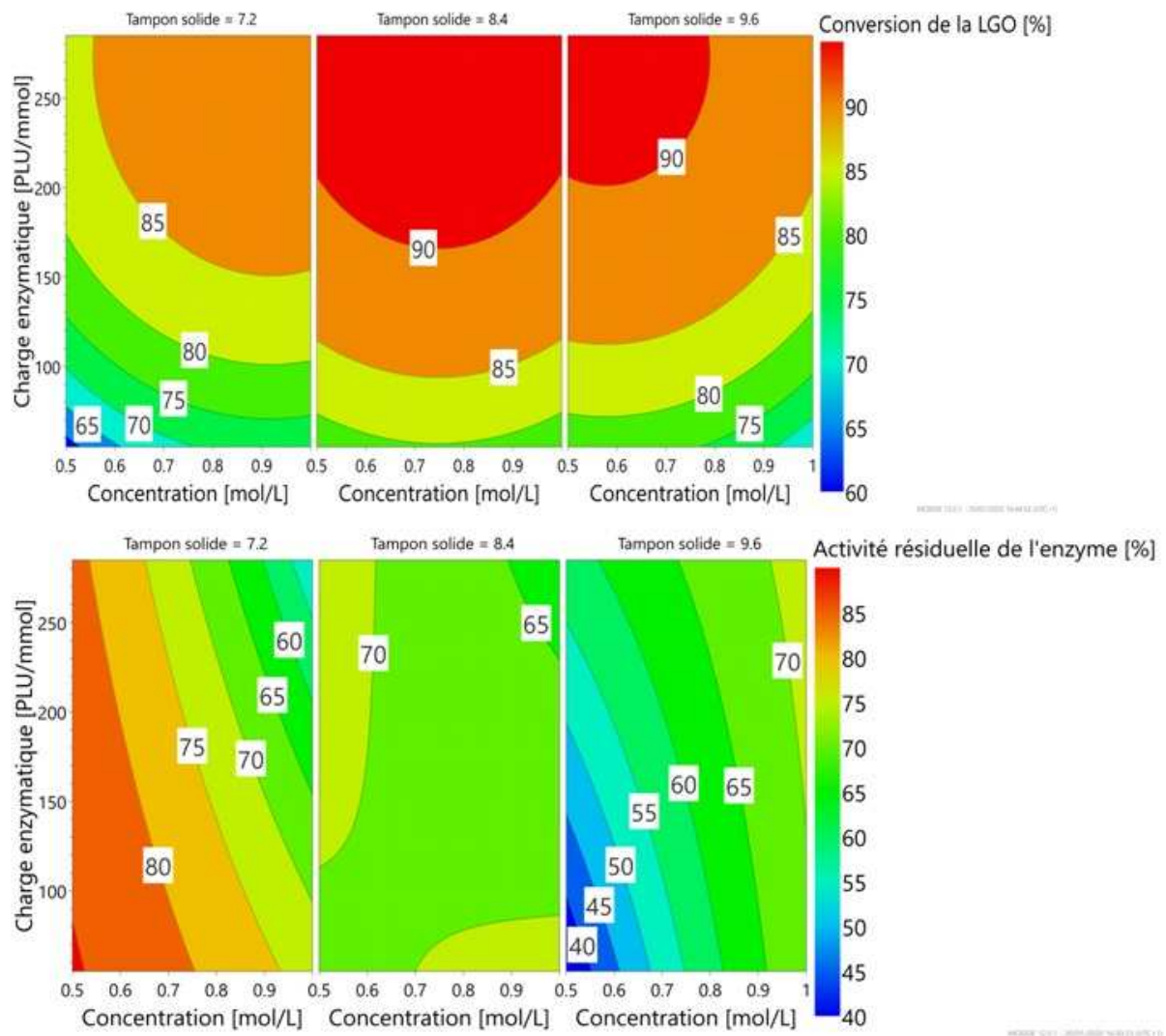


Figure 16 : Surfaces de réponses obtenues pour la conversion de la LGO (haut) et pour l'activité enzymatique résiduelle (bas)

Dans ce cas précis, il est très intéressant d'avoir cette approche par plan d'expériences car des contraintes sur les réponses observées peuvent également être appliquées pour trouver le compromis désiré. Nous avons décidé de chercher une zone où une valeur de 80% de chaque réponse puisse être atteinte. La représentation graphique représentée ci-dessous, nous montre que cet objectif est accessible sur une zone réduite de l'espace considéré par notre plan d'expériences. En effet, la zone verte montre où les deux critères peuvent être réalisés simultanément, les zones bleues avec un seul des deux critères et pour les zones blanches aucun (Figure 18). Il faudra donc se positionner à un pH faible, à des concentrations réduites en **LGO** ($<0.57 \text{ mol.L}^{-1}$) et à un ratio enzyme/substrat compris entre 115 et $190 \text{ PLU.mmol}^{-1}$.

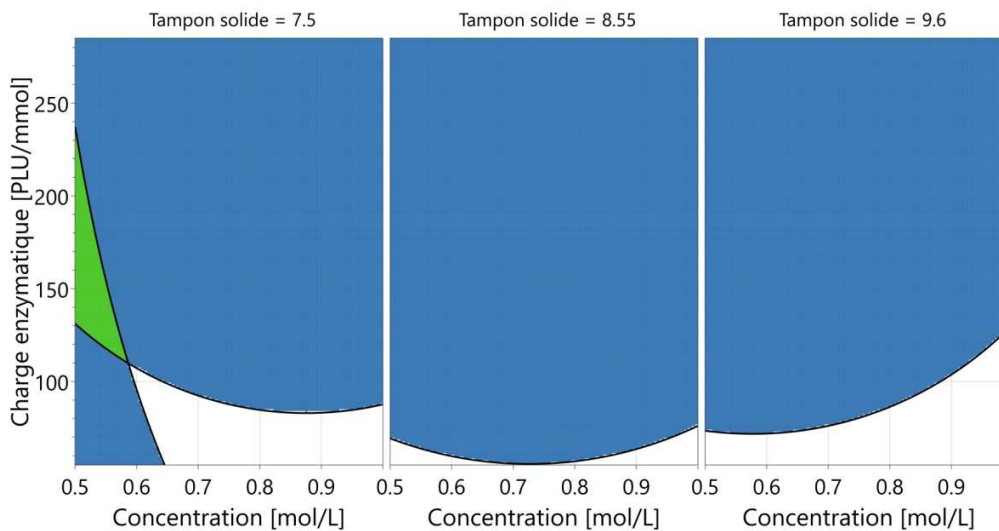


Figure 17 : Représentation en 2D du « point doux » ou « sweet spot », dans la zone verte les deux critères sont remplis, dans les zones bleues un seul des deux critères est atteint et aucun dans les zones blanches

Bien que cette zone soit réduite, elle représente encore un grand nombre de possibilités expérimentales. Encore une fois, nous nous sommes appuyés sur les capacités prédictives du modèle pour trouver les points répondant à un minimum de 80% pour chaque réponse mais en prenant aussi en compte des contraintes expérimentales et économiques. Ces dernières consistent à rechercher des points où il est possible de limiter la quantité d'enzyme utilisée tout en conservant des chances d'atteindre nos objectifs à 98 et 99% mais à un pH fixe de 7,5 (Figure 19). Ce dernier point représente notre contrainte expérimentale. En effet, comme évoqué précédemment, le **MOPS** forme un gel qui empêche sa réutilisation ultérieure et peut piéger des billes d'enzyme. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc remplacé le **MOPS** par le **HEPES** (acide *N*-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-*N*-(2-éthanesulfonique), un autre tampon solide dont le pKa de 7,5 reste proche de la neutralité et qui dans les conditions de réaction est resté sous forme de poudre en suspension.

Pour valider le modèle de façon expérimentale ou par validation externe, nous réalisons les expériences correspondant aux trois points générés par la simulation (Figure 19). Le point A est identifié comme l'optimum par l'algorithme d'optimisation non linéaire exploitant le concept de simplexe et développé par Nelder-Mead, ce avec un risque d'échec inférieur à 2% sur les deux réponses pour les conditions minimales demandées de 80%. Le point B est le point nécessitant le moins d'enzyme également, avec le même risque d'échec. Enfin le point C est le point où le modèle prédit que les deux conditions minimales seront remplies avec un risque d'échec minimum. Les résultats sont reportés dans le tableau 5.

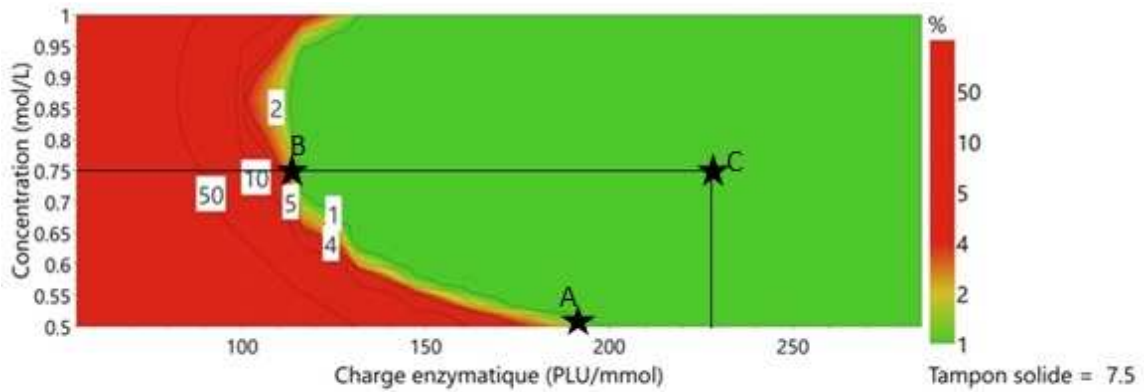


Figure 18 : Représentation du risque d'échec pour une conversion de la LGO > 80%. Dans la zone verte, le risque d'échec est inférieur à 1% alors que la zone rouge indique un risque supérieur à 2%

Tableau 5 : Validation expérimentale sur trois points optimaux du modèle

Exp.	Variables			Réponses estimées		Réponses expérimentales	
	x_1 (pKa)	x_2 (PLU.mmol ⁻¹)	x_3 (M)	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
A	HEPES (7,5)	194	0,50	83,6±4,1	80,6±3,4	79,5	80,4
B	HEPES (7,5)	113	0,75	82,9±2,5	76,1±2,8	84,0	74,3
C	HEPES (7,5)	227	0,75	89,5±4,5	71,6±3,5	94,0	69,4

Pour les trois expériences, les résultats obtenus sont en adéquation avec ceux prédits par le modèle. Le modèle est donc parfaitement utilisable.

Suite à ces résultats, les recyclages de l'enzyme et du tampon solide ont pu être étudiés. Ces deux éléments ont été simplement récupérés du milieu réactionnel précédent par filtration et, après un lavage à l'acétate d'éthyle, réintroduits pour un cycle supplémentaire d'oxydation.

Recyclage de l'enzyme et du tampon solide

Nous avons considéré que sur les trois points testés comme optima de réaction, les deux derniers (B et C) utilisant moins de solvant se révèlent les plus pertinents dans une optique de chimie durable. Les essais de recyclage ont donc été effectués dans les conditions reportées pour ces deux points et comparés aux résultats obtenus sans tampon solide après 8 heures de réaction. Le tableau 6 met en évidence que sans tampon solide, la conversion au premier cycle est moindre et que le recyclage est impossible (entrées 1 et 2). Dans les conditions demandant le minimum d'enzyme (B), deux cycles peuvent être réalisés en conservant une conversion équivalente, cette dernière chutant fortement au-delà du deuxième cycle, ce qui s'explique par la forte diminution de l'activité enzymatique entre le deuxième et le troisième cycle (entrées 3 à 6). Enfin en doublant la quantité d'enzyme (C), les conversions augmentent légèrement pour les deux premiers cycles (94 et 91%) et permettent d'obtenir une conversion moyenne au 3^{ème} cycle avec 43% pour 46% d'activité enzymatique initiale (entrées 7 à 9). Un quatrième cycle est possible pour finir d'épuiser l'enzyme, cependant avec seulement 29% de conversion (entrée 10). Le fait de tamponner le milieu induit bien un effet bénéfique sur l'activité

enzymatique, ce qui permet un recyclage sur 2 à 4 cycles de l'enzyme en fonction de sa quantité initiale. Cependant, si au-delà des considérations scientifiques, le prisme économique est pris en compte, le coût des tampons solides associé à celui d'une enzyme supportée n'est pas viable industriellement.

Tableau 6 : Résultats des tests de recyclabilité de l'enzyme ([LGO] = 0,75 M dans l'acétate d'éthyle, 40 °C, 1.2 équiv. H₂O₂)

Entrée	Tampon solide	[CALB] (PLU.mmol ⁻¹)	Cycle d'oxydation	Temps de réaction (h)	Conversion en LGO (%)	Activité enzymatique relative ^a (%)
1	-	113	1 ^{er}	8	65	100
2	-	113	2 ^{ème}	8	6	9
3	HEPES	113	1 ^{er}	2	84	100
4	HEPES	113	2 ^{ème}	2	81	96
5	HEPES	113	3 ^{ème}	2	16	19
6	HEPES	113	4 ^{ème}	2	17	19
7	HEPES	227	1 ^{er}	2	94	100
8	HEPES	227	2 ^{ème}	2	91	97
9	HEPES	227	3 ^{ème}	2	43	46
10	HEPES	227	4 ^{ème}	2	29	31

^a Pourcentage relatif calculé par rapport à l'activité enzymatique du premier cycle.

Réaction de Baeyer-Villiger avec une enzyme libre

Nous avons souhaité, afin d'intégrer des contraintes économiques, réaliser la réaction avec la même enzyme, *Candida antarctica lipase B*, mais sous sa forme libre en solution vendue sous le nom de lipozyme. Cette version libre de l'enzyme est dix fois moins coûteuse que sa forme supportée. Nous ne cherchions donc pas à recycler l'enzyme et l'emploi des tampons solides coûteux a donc été également abandonné. Le premier essai a été réalisé dans les conditions suivantes : 103 PLU.mmol⁻¹, 40 °C, 24 heures, [LGO] = 0,75 mol.L⁻¹, 1 équiv. de H₂O₂. Le résultat de cette manipulation montre que l'enzyme libre est capable elle aussi de supporter les conditions opératoires avec un rendement mesuré par HPLC de 90%, sans purification. Guillaume Bonneau sous la supervision d'Aurélien Péru, a conduit par la suite, une étude de l'impact de la quantité d'enzyme et de la concentration en LGO sur le rendement. Les principaux enseignements en sont les suivants :

- Un rendement très similaire à celui du test initial a été obtenu avec seulement 52 PLU.mmol⁻¹.
- Il n'est pas possible d'augmenter la concentration du milieu sans affecter significativement le rendement.

Durant ce projet, nous nous sommes plusieurs fois intéressés à l'hydrolyse du formate pour trouver des conditions plus vertes et économiquement plus pertinentes que celles proposées dans la littérature. Cette partie a également été principalement menée par Guillaume Bonneau et Aurélien Péru.

Hydrolyse du formate

Ne souhaitant pas utiliser le 1,4-dioxane, identifié comme à « fort risque » du fait de la possible génération de peroxydes,⁸⁰⁻⁸² mais conserver la résine qui présente l'avantage d'être facilement éliminée du milieu par filtration et qui peut être régénérée et donc recyclée, nous avons testé l'Amberlite 15-H sèche (« dry ») et l'Amberlite 15-H humide (« wet ») avec l'éthanol comme solvant. Ce dernier est non seulement bio-sourcé mais aussi faiblement toxique, ce qui rend son usage habituel en milieu industriel.

A température ambiante, le temps de réaction s'est avéré plus long qu'avec le 1,4-dioxane pour atteindre l'hydrolyse complète. Avec un chauffage modéré (50 °C), il est possible de réduire ce temps à 2 h. Pour réduire la quantité de solvant utilisé, la réaction d'hydrolyse est réalisée à une concentration de 2 mol.L⁻¹. La résine humide ne permet d'obtenir que 50% de rendement après purification alors que la résine sèche permet d'obtenir un résultat de 71% de rendement. Les nouvelles conditions d'hydrolyse sont donc les suivantes : Amberlite sèche, 50 °C, 2 h.

Synthèse sans catalyseur et sans solvant

Ces travaux sont le fruit d'un travail d'équipe au sein de l'URD ABI auxquels j'ai participé avec Guillaume Bonneau, Aurélien Péru et Florent Allais. Ils ont fait l'objet d'un brevet (WO 2018007764) et d'une publication :

- **Organic solvent- and catalyst-free Baeyer Villiger oxidation of levoglucosenone and dihydrolevoglucosenone (Cyrene): a sustainable route to (S)- γ -hydroxymethyl- α,β -butenolide and (S)- γ -hydroxymethyl- γ -butyrolactone** G. Bonneau, A. A. M. Péru, A. L. Flourat and F. Allais* *Green Chem.* **2018**, **20**, 2455-2458.⁸³

Premier essai et étude cinétique

Nous avons, lors de l'étude de biocatalyse, réalisé des contrôles sans enzyme qui avaient montré que le peroxyde d'hydrogène seul dans l'acétate d'éthyle conduisait à des conversions très faibles. Toutefois la possibilité de réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger avec uniquement du H₂O₂ qui génère comme seul sous-produit de l'eau est très séduisante. La structure particulière de la **LGO** avec la présence de la fonction acétal en α de la cétone lui confère une réactivité accrue. Nous avons donc décidé de réaliser une expérience en mettant directement la **LGO** en contact avec du peroxyde d'hydrogène à 30% massique dans l'eau sans dilution par un solvant organique. La conversion a été suivie par HPLC, démontrant non seulement que la réaction progressait rapidement mais également que le formate était converti rapidement en **HBO** (83% en 8 h). Comme précédemment, sans ajout de base, le mécanisme d'oxydation de Baeyer-Villiger passe par une catalyse acide due à l'acidité intrinsèque de la solution de peroxyde d'hydrogène. Sans dilution du milieu, cette acidité est suffisante pour réaliser également l'hydrolyse du formate (Schéma 13).

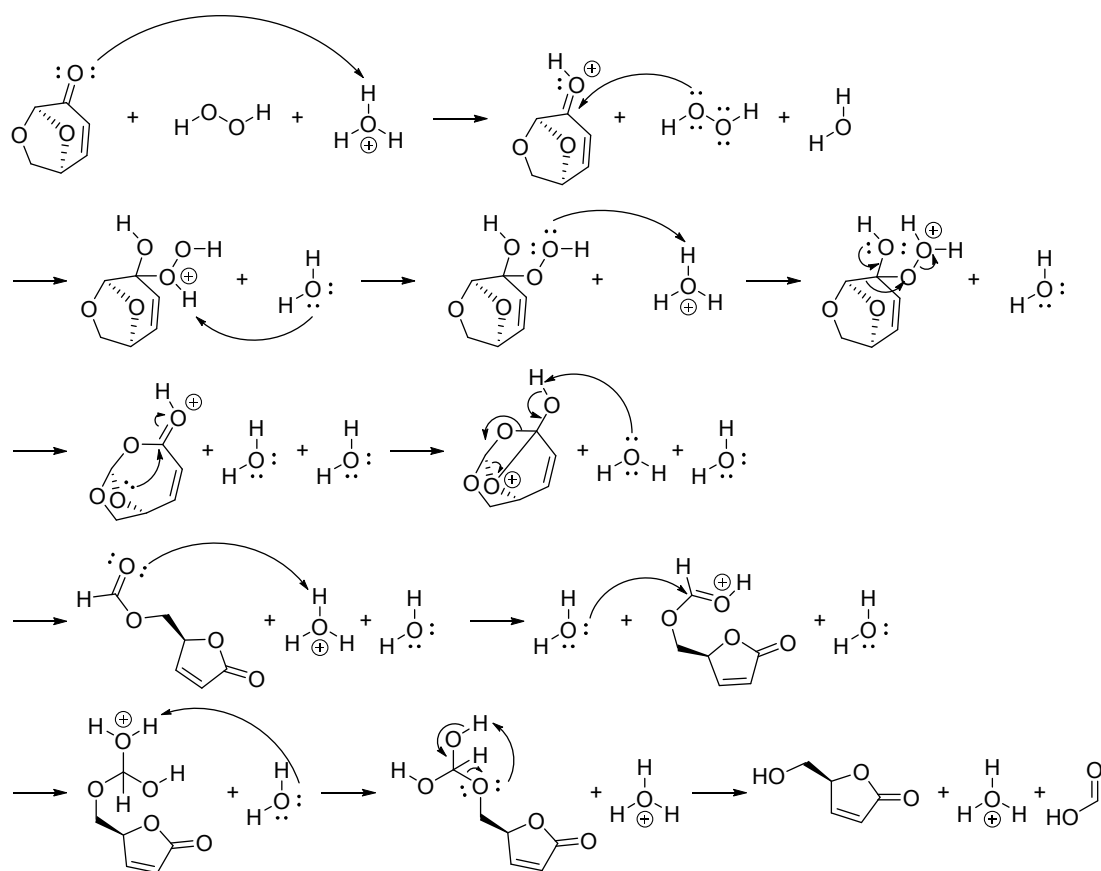


Schéma 13 : Mécanisme d'oxydation de Baeyer-Villiger en présence de peroxyde d'hydrogène à 30% dans l'eau

Cette première réaction effectuée avec un léger excès de H_2O_2 (1,1 équivalent) à $50\text{ }^\circ\text{C}$, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'augmentation de la quantité de H_2O_2 dans le milieu réactionnel afin de déterminer s'il était possible d'atteindre un rendement de 100% en **HBO** sans étape supplémentaire d'hydrolyse (Figure 20). Le suivi de ces réactions a été réalisé sur 24 heures avec des équivalences en H_2O_2 de 1,08 ; 1,47 ; 2,45 et 4,9. A partir de 2,45 équivalents de H_2O_2 , il a été possible de compléter la réaction au bout de 24 h. Plus la quantité d' H_2O_2 initialement introduite est forte, plus la vitesse initiale de la réaction est élevée, cependant pour toutes les réactions réalisées sur cette étude, plus de 90% du rendement total est obtenu en moins de 8 h. Le gain de temps obtenu par un ajout massif de H_2O_2 ne semble pas pertinent, d'autant qu'il implique une plus grande quantité de bisulfite nécessaire à la neutralisation de l'excès de peroxyde d'hydrogène et donc plus de déchets à traiter *in fine*. Pour éviter l'usage de sel de neutralisation, la littérature décrit qu'un chauffage à $90\text{ }^\circ\text{C}$ peut permettre de dégrader l' H_2O_2 résiduel. Dans notre cas, malgré une diminution de la quantité d' H_2O_2 présente en fin de réaction, cette technique n'a pas permis de l'éliminer totalement. La première réaction ayant donné de bons résultats (83 % de rendement avec un léger excès de H_2O_2), nous avons désiré tester ce qu'il adviendrait pour une réaction avec un très léger défaut en H_2O_2 .

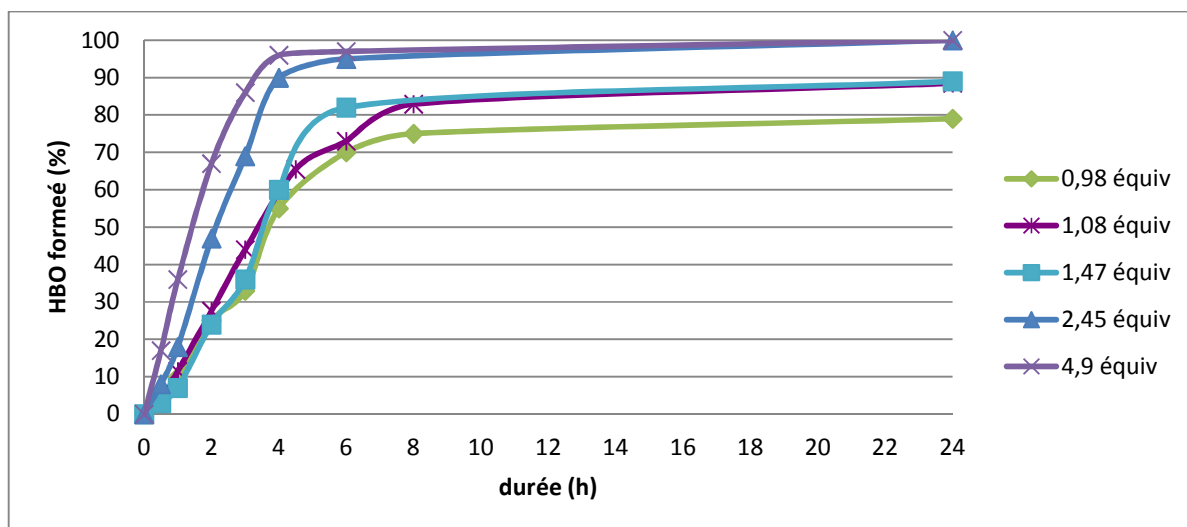


Figure 19 : Suivi cinétique de la production de HBO en fonction de la quantité de H₂O₂

Mise au point du procédé et changement d'échelle

La réaction a été réalisée toujours à 50 °C mais avec seulement 0.98 équivalent de H₂O₂. Bien que la cinétique soit plus lente et que seulement 74% de rendement ait été atteint en 8h, cette réaction présente l'avantage de ne nécessiter aucun traitement de la réaction avant l'étape de purification. Dans l'optique d'un passage à l'échelle industrielle, il nous a paru plus pertinent de limiter le nombre d'opérations unitaires et la production de déchets liés au procédé, quitte à établir un compromis sur le rendement. Nous avons transposé cette réaction à plus grande échelle afin de s'assurer de la robustesse des résultats obtenus. Cette transposition n'a pas révélé d'impact sur le rendement, en revanche elle a permis de constater l'exothermicité de la réaction. En effet, l'H₂O₂ par précaution est ajouté à température ambiante au goutte à goutte avant de démarrer le chauffage de la réaction. Nous avons pu constater une augmentation certaine de la température entre le début et la fin de l'ajout. Ce point a été pris en compte lors du passage à l'échelle du kilogramme de la réaction. En aménageant la durée de l'ajout du peroxyde d'hydrogène, il est possible de limiter ce caractère exothermique et de rester sous les 50 °C.

Par la suite, le dérivé hydrogéné de la **LGO**, **2H-LGO** ou Cyrene®, a été utilisé comme substrat pour la réaction afin de produire de la **2H-HBO**. L'oxydation de Baeyer-Villiger a bien eu lieu avec une sélectivité totale comme précédemment observée lors de la biocatalyse, les rendements obtenus étant également similaires. Cependant la montée en température de la réaction lors de l'ajout de H₂O₂ s'est produite beaucoup plus soudainement et rapidement qu'avec la **LGO**. Afin de limiter les risques liés à cette forte exothermicité, diluer le milieu afin de dissiper la chaleur générée dans un plus grand volume, nous a semblé le meilleur parti. En effet, la **LGO** comme le Cyrene® étant solubles dans l'eau, une dilution était aisée sans avoir recours à un solvant organique. Les essais réalisés avec une masse d'eau équivalente à la masse de substrat initiale ont montré que l'exothermicité pouvait être contenue sans affecter le rendement. Cette procédure a donc été généralisée pour la production de **HBO**. Pour compléter le procédé, une technique de purification adaptée à l'industrialisation devait être explorée.

Purification par distillation couche mince

Précédemment, les rendements donnés après purification l'étaient après une étape de chromatographie flash. Cette technique très pratique à l'échelle du laboratoire, n'est envisageable à l'échelle industrielle que pour des applications avec des milieux complexes où la silice et les solvants peuvent être recyclés, car utilisés en grande quantité. Ici, le milieu peut être qualifié de simple car comprenant seulement quatre éléments : le produit désiré, l'hydrate de la **HBO**, le formate résiduel et de l'eau. Malgré le haut point d'ébullition de la **HBO** (334 °C à pression atmosphérique),⁸⁴ la distillation semble la meilleure approche, les masses molaires et les solubilités étant trop proches pour envisager une séparation par membrane ou par extraction.

L'eau peut facilement être éliminée par une distillation classique sous vide. Le brut réactionnel ainsi obtenu a fait l'objet, au laboratoire, d'une distillation sous vide à trajet court afin de confirmer la faisabilité d'une telle séparation. Les résultats très satisfaisants obtenus avec un distillat composé uniquement de **HBO** et les lourds contenant majoritairement l'hydrate de **HBO**, sous-produit de la réaction, nous avons sollicité la société ARD pour réaliser des essais sur leur distillateur couche mince (Figure 21).

L'ensemble du dispositif évolue sous un vide de 1,4 mbars. Le brut réactionnel est chauffé vers 50 °C dans la cuve d'approvisionnement et introduit progressivement dans le corps de chauffe par une pompe péristaltique (1,5 à 2,5 mL.min⁻¹). Le corps de chauffe est muni d'une pâle qui permet d'étaler une fine couche de produit le long de la paroi, c'est pourquoi cette technique est appelée distillation couche mince ou encore distillation moléculaire. Il est chauffé à une température de 155 °C à 160 °C. Les molécules volatiles dans ces conditions sont entraînées vers le condenseur (0 °C) alors que les « lourds » sont récupérés dans un ballon situé sous le corps de chauffe. Cette technique semi-continue peut permettre de distiller de grandes quantités de produit en fonction de la cuve d'alimentation et des réceptacles choisis.

Dans le cas de nos produits, sur les bruts obtenus à l'issue des expériences à l'échelle du kilogramme, des rendements de 71 et 72% ont été enregistrés pour la **HBO** et la **2H-HBO** avec une pureté de 96%. Les impuretés correspondent à l'hydrate dans le cas de la conversion de la **LGO** en **HBO** alors qu'il s'agit d'un reste de formate dans le cas de la **2H-HBO**.



Figure 20 : Exemple d'un montage de distillation sur couche mince

Matériel et méthodes

La (-)-lévoglucosénone a été offerte par Circa Group (Knoxfield Victoria, Australie). La Novozym® 435 (CAL-B, lot no. SLBF9301 V, 9600 PLU g⁻¹), le peroxyde d'hydrogène (50% m/m), le peroxyde d'hydrogène-urée, le palladium sur charbon (10%), le MOPS, le sel de sodium de MOPS, le TAPS, le sel de sodium de TAPS, le CAPSO, le sel de sodium de CAPSO, le HEPES, le sel de sodium de HEPES, l'acide laurique, le 1-propanol et l'acide chlorhydrique concentré (36% m/m), la résine Amberlite-15 ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'acétate d'éthyle, le cyclohexane, le méthanol, l'éthanol, l'hexane et l'acétonitrile ont été achetés chez Thermofisher Scientific. De l'eau ultra-pure (MilliQ, 18.2 megaOhms, 25 °C) a été employée pour les analyses HPLC. Les analyses GC-MS ont été réalisées avec GC5975 couplé à MS7890 (Agilent) en impact électronique à 70 eV. Les analyses HPLC ont été réalisées sur une Ultimate 3000 (Thermofisher) équipée d'un DAD. Les incubations ont été menées dans un incubateur orbital minishaker (VWR). Les spectres FTIR et UV-visible ont été enregistrés respectivement sur un Cary630 et un Cary60 (Agilent). Les spectres RMN ont été enregistrés à 300 MHz pour les ¹H et 75 MHz pour les ¹³C sur un Fourier 300 (Bruker) et calibrés sur le pic de chloroforme résiduel (δ -¹H = 7,26 ppm et δ -¹³C = 77.16 ppm). Les pouvoirs rotatoires sont mesurés sur un polarimètre 241 Perkin Elmer.

Synthèse de la (S)-5-(Hydroxyméthyl)furan-2(5H)-one (HBO)

Oxydation de Baeyer-Villiger

Les oxydations de Baeyer-Villiger par une lipase ont été réalisées avec entre 250 mg et 10 g de (-)-lévoglucosénone. La (-)-lévoglucosénone (**LGO**, 1 équiv.) a été dissoute dans de l'acétate d'éthyle (C = 0,5-1 M). Quand spécifié, un tampon solide, sous sa forme acide et son sel sodique (20 mg.L⁻¹ de chaque) sont ajoutés. Une quantité catalytique de CAL-B, puis le peroxyde d'hydrogène (1.2 équiv. 50% m/m) sont ajoutés à la réaction. Le milieu est incubé (20–60 °C) pendant 2 à 24 heures sous agitation (250 rpm). La CAL-B est retirée du milieu par filtration et lavée à l'acétate d'éthyle (10 mL). Le filtrat et l'acétate d'éthyle de lavage sont réunis et le milieu est concentré.

Méthanolyse

Le brut réactionnel précédent est repris dans le méthanol (C = 0,1 M par rapport à la **LGO** initiale). HCl conc. (12 équiv.) est ajouté à température ambiante, puis la réaction est chauffée à 45 °C pendant une nuit.

Hydrolyse à l'Amberlite-15

Le brut réactionnel précédent est repris dans le 1,4-dioxane (C = 3 M par rapport à la **LGO** initiale). La résine Amberlite-15 (420 mg.mmol⁻¹ de **LGO**) est ajoutée et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 8 h. La résine Amberlite-15 est éliminée par filtration.

Purification

Le brut réactionnel est concentré, puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice (75 à 100 % d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane) pour obtenir de la **HBO** pure sous forme d'une huile incolore.

Rf = 0,24 (20/80 cyclohexane-acétate d'éthyle), spot marron clair ; **FT-IR** (pur) : 3423 (OH), 1728 (C=O), 1329, 1162, 1050 cm⁻¹ ; **UV** (EtOH) : 221 nm ; [α]₂₀^D -112,0 (c 0,01, CHCl₃) ; [reporté -114,5 (c 0,1, CHCl₃)]
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 3,25 (s, 1H, H₆), 3,79 (dd, 1H, *J* = 12 et 3.6 Hz, H_{5a}), 3,99 (d, 1H, *J* = 12 Hz, H_{5b}), 5,17 (m, 1H, H₄), 6,20 (dd, 1H, *J* = 5,7 et 1,8 Hz, H₂), 7,53 (dd, 1H, *J* = 5,7 et 1,5 Hz, H₃) ppm ; **¹³C RMN** (CDCl₃, 75 MHz): δ 62,2 (C₁), 84,3 (C₄), 122,8 (C₂), 154,0 (C₃), 173,5 (C₁) ppm. **HRMS**: m/z [M + H]⁺ calculé C₅H₆O₃: 115,0395, trouvé: 115,0396.

Synthèse de la (5R)-6,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octan-4-one (2H-LGO)

10% Pd/C (10% m/m, 500 mg) sont ajoutés sous atmosphère inerte (N₂) à une solution de (-)-lévoglucosénone **LGO** (5 g, 39,7 mmol) dans de l'acétate d'éthyle (50 mL, C = 0,8 M) à température ambiante. Le milieu réactionnel est vivement agité sous un courant d'hydrogène jusqu'à complète conversion du substrat, puis il est filtré sur Celite®. Le filtrat est concentré. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash (10 à 60% d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane) pour obtenir la **2H-LGO** pure sous forme d'une huile incolore (4,4 g, 87%).

Rf = 0,64 (20/80 cyclohexane-acétate d'éthyle), spot violet ; **FT-IR** (pur) : 2965, 1739 (C=O), 1418, 1285, 1108 cm⁻¹ ; **UV** (EtOH) : 308, 211 nm ; [α]₂₀^D -253.6 (c 0,01, CHCl₃) ; **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz) : δ 2,02 (m, 1H, H_{3b}), 2,34 (m, 2H, H_{2b} + H_{3a}), 2,62 (m, 1H, H_{2a}), 4,00 (m, 2H, H_{5a} + H₄), 4,70 (m, 1H, H_{5b}), 5,10 (s, 1H, H₆)

ppm ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 29,9 (C_3), 31,1 (C_2), 67,5 (C_5), 73,1 (C_4), 101,5 (C_6), 200,3 (C_1) ; HRMS: m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_3$: 129,0552, trouvé: 129,0553.

Synthèse de la (S)-5-(Hydroxyméthyl)dihydrofuran-2(3H)-one (2H-HBO)

A partir de la (S)-5-(hydroxyméthyl)furan-2(5H)-one (HBO).

10% Pd/C (10% m/m, 140 mg) sont ajoutés sous atmosphère inerte (N_2) à une solution de HBO (1,4 g, 12,3 mmol) dans de l'acétate d'éthyle (15 mL, $\text{C} = 0,8 \text{ M}$) à température ambiante. Le milieu réactionnel est vivement agité sous un courant d'hydrogène jusqu'à complète conversion du substrat, puis il est filtré sur Celite®. Le filtrat est concentré. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash (100% acétate d'éthyle) pour obtenir la 2H-HBO pure sous forme d'une huile incolore (1,30 g, 90%).

A partir de la (5R)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octan-4-one (2H-LGO).

2H-LGO (500 mg, 1 équiv.) est dissoute dans de l'acétate d'éthyle ($\text{C} = 0,75 \text{ M}$). La CAL-B (50 mg, 10% m/m), puis le peroxyde d'hydrogène à 50% (1.2 équiv.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est incubé à 40 °C sous agitation (250 rpm) jusqu'à consommation complète du substrat. En fin de réaction, la CAL-B est récupérée par filtration et lavée avec de l'acétate d'éthyle (10 mL). Le filtrat et l'acétate d'éthyle de lavage sont réunis et le milieu est concentré puis hydrolysé comme décrit ci-dessus et enfin purifié par chromatographie flash (100% acétate d'éthyle) pour obtenir la 2H-HBO pure sous forme d'une huile incolore (353 mg, 78%).

Rf = 0,27 (20/80 cyclohexane-acétate d'éthyle), spot noir ; FT-IR (pur) : 3420 (OH), 2938, 1752 (C=O), 1353, 1181 cm^{-1} ; UV (EtOH) : 207 nm ; $[\alpha]_{20}^{\text{D}}$ +52,9 (c 0,01, CHCl_3) ; [(reporté +55,2 (c 0,1, CHCl_3))] ; ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 2,20 (m, 2H, H_3), 2,61 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_6$), 3,66 (dd, 1H, $J = 12,6$ et 4,5 Hz, H_{5a}), 3,92 (dd, 1H, $J = 12,6$ et 2,7 Hz, H_{5b}), 4,64 (m, 1H, H_4) ppm ; ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 23,1 (C_2), 28,7 (C_3), 64,1 (C_5), 80,8 (C_4), 177,7 (C_1) ppm ; HRMS : m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_5\text{H}_8\text{NaO}_3$: 139,0371 ; trouvé 139,0379.

Détermination de l'activité enzymatique résiduelle

En fin de réaction, la CAL-B est récupérée par filtration, lavée avec AcOEt (10 mL) puis avec de l'hexane (10 mL), séchée à l'étuve 1 h à 40 °C puis placée au dessiccateur sous vide toute la nuit. Une solution équimolaire d'acide laurique et de 1-propanol contenant 3% d'eau est préparée et stockée à 60 °C. Les analyses sont réalisées en triplicat. 14 mg d'enzyme sont pesés dans un vial et conservés à 60 °C. Après 1 h, 5 g de la solution d'acide laurique sont ajoutés à l'enzyme. Le milieu est incubé sous une agitation de 400 rpm à 60 °C pendant 15 min. Des échantillons de 2 μL sont prélevés, introduits dans un vial compatible GC-MS, pesés, dilués avec 1 mL d'hexane sec. La conversion de l'acide laurique en laurate de propyle est déterminée par GC-MS (méthode ci-dessous).

Une unité d'enzyme (1 PLU) = 1 μmol de laurate de propyle formé par gramme d'enzyme et par minute à 60 °C. La conversion de l'acide laurique est mesurée par GC-MS.

1 μL d'échantillon est injecté en mode split (40 :1) à 280 °C sur une colonne capillaire HP5-MS (Agilent, 30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm) avec le gradient de température suivant : 60 °C pendant 1 min, puis 20 °C.min $^{-1}$ jusqu'à 325 °C maintenu pendant 5 min, puis sous un flux d'hydrogène de 1,2 mL.min $^{-1}$. L'analyse en masse est réalisée avec une source à 230 °C et le quad à 150 °C. Une courbe de calibration

de l'acide laurique est réalisée à chaque fois dans l'hexane (0,2 – 4,5 mg.mL⁻¹). Les temps de rétention pour l'acide laurique et le laurate de propyle sont de 7,22 et 7,92 min, respectivement.

Suivi cinétique par HPLC

10 µL de milieu réactionnel sont dilués dans 1,5 mL d'acétonitrile qualité HPLC.

10 µL d'échantillon sont injectés sur une colonne Synchronis aQ (250×4.6 mm, 5 µm, Thermoscientific) avec un débit de phase mobile de 0,8 mL.min⁻¹ à 30 °C. Le gradient suivant eau MilliQ/acétonitrile est appliqué : 85/15 de 0 à 5 min, de 85/15 à 90/10 de 5 à 10 min, 90/10 de 10 à 15 min puis 90/10 à 85/15 de 15 à 16 min. Le chromatogramme est enregistré à 220 nm. Le pic de **LGO** est identifié et quantifié grâce à une solution standard dans l'acétonitrile qui a servi à réaliser la courbe de calibration. Les temps de rétention pour la **HBO**, le **FBO** et le **LGO** sont de 3,73, 3,87 et 8,40 min, respectivement.

Plan d'expériences et analyse statistique

Le design du plan d'expériences choisi est cubique faces centrées à 3 facteurs et 3 niveaux. Ce design permet d'obtenir des corrélations entre les termes quadratiques et ainsi d'augmenter légèrement l'intervalle de confiance. Le temps (2 h) et la température (40 °C) sont des paramètres fixes. Les variables indépendantes (X_i) sont présentées dans le tableau 7, avec leur intervalle respectif et leur correspondance codée (x_i), c'est-à-dire la valeur centrée réduite (équation 1).

$$x_i = (X_i - X_0)/X_i \text{ ou } i = 1, 2, 3, \dots, k \text{ (équation 1)}$$

Tableau 7 : Variables indépendantes et leurs niveaux utilisés pour le plan d'expériences

Variables	Niveaux		
	-1	0	+1
pKa du tampon solide	MOPS (7.2)	TAPS (8.4)	CAPSO (9.6)
Charge enzymatique (PLU.mmol ⁻¹)	55	170	285
Concentration en LGO (M)	0.5	0.75	1

La matrice du plan d'expériences est présentée dans le tableau 8 ainsi que les réponses obtenues pour la conversion de la **LGO** (Y_1) et l'activité enzymatique résiduelle (Y_2) et ce pour les 17 expériences et leur réplicat. Les expériences ont été conduites dans un ordre aléatoire. Des expériences supplémentaires ont été réalisées pour affiner le modèle et incluses à l'analyse statistique.

Afin d'exprimer la relation entre réponse et variables, une équation polynomiale du second ordre est utilisée. Sa forme est la suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{kij} x_i x_j$$

où Y_i représente la réponse i (conversion de la **LGO** et activité résiduelle de l'enzyme), x_i sont les variables indépendantes centrées réduites, β_0 est une constante et β_{ki} , β_{kii} et β_{kij} sont respectivement les coefficients linéaires, quadratiques et d'interactions.

Le logiciel Modde v10.1 (Umetrics AB, Suède) est utilisé pour générer le design CCF, analyser les données expérimentales, déterminer les coefficients significatifs du modèle et établir l'équation de modélisation ainsi que fournir les informations statistiques (R^2 , Q^2 , reproductibilité, validité) nécessaires pour valider la cohérence du modèle.

Tableau 8 : Matrice du design composite faces centrées et les réponses expérimentales

Essai/Réplicat ^a	Tampon solide (pKa)	Charge enzymatique (PLU.mmol ⁻¹ de LGO)	[LGO] (M)	Conversion de la LGO (%)	Activité enzymatique résiduelle (%)
			x ₃	Y ₁	Y ₂
	x ₁	x ₂			
1/18	MOPS (7,2)	55	0,5	57,4/68,0	88,5/82,0
2/19	CAPSO (9,6)	55	0,5	79,9/79,7	63,6 ^b /37,6
3/20	MOPS (7,2)	285	0,5	81,3/87,0	85,3/81,0
4/21	CAPSO (9,6)	285	0,5	87,5/90,8	52,7/57,3
5/22	MOPS (7,2)	55	1,0	74,8/74,5	70,3/76,9
6/23	CAPSO (9,6)	55	1,0	47,3/63,9	60,2/60,7
7/24	MOPS (7,2)	285	1,0	81,5/91,6	51,2/44,8
8/25	CAPSO (9,6)	285	1,0	87,2/90,4	69,2/52,4 ^b
9/26	MOPS (7,2)	170	0,75	84,4/87,2	72,4/73,4
10/27	CAPSO (9,6)	170	0,75	90,0/88,9	68,9/67,0
11/28	TAPS (8,4)	55	0,75	73,9/82,0	73,1/63,1
12/29	TAPS (8,4)	285	0,75	67,8 ^b /91,3	74,8/50,6
13/30	TAPS (8,4)	170	0,5	86,6/87,6	61,8/61,1
14/31	TAPS (8,4)	170	1,0	88,4/89,5	12,6 ^b /67,5
15/32	TAPS (8,4)	170	0,75	87,9/90,2	65,7/68,5
16/33	TAPS (8,4)	170	0,75	93,8/90,3	74,9/74,1
17/34	TAPS (8,4)	170	0,75	92,4/89,9	76,8/75,8
Essais additionnels					
35/36	MOPS (7,2)	152	0,70	78,0/80,8	78,2/79,4
37/38	CAPSO (9,6)	80	0,94	72,5/73,6	70,0/71,6
39	HEPES (7,5)	120	0,65	79,7	76,5

^a Expériences conduites dans un ordre aléatoire

^b Outlier: point aberrant, exclu de l'analyse statistique.

Oxydation de Baeyer-Villiger sans enzyme et sans solvant

Le peroxyde d'hydrogène à 30% m/m dans l'eau (0.98 équiv.) est additionné goutte à goutte (3,5 h) à une solution de **LGO** (1,25 kg) et d'eau (1 L) dans un réacteur de 5 L agité à 2 °C. Une fois l'ajout terminé, le réacteur est porté à 50 °C pendant la nuit et maintenu à 50 °C pendant 8h. Le brut réactionnel est concentré sous vide pour éliminer l'eau et l'acide formique.

Distillation couche mince

8.8 kg de brut réactionnel ont été distillés à 160 °C à une pression variant de 1,4 à 2,5 mbar(s) et un débit de 1,5 mL.min⁻¹ soit une durée totale de 57 h. 4,8 kg de **HBO** pure ont été récupérés pour 3,9 kg de lourd. Un deuxième passage de 300 g de lourd a montré que 20 g de **HBO** pouvaient être récupérés.

Conclusion

Nous avons désiré quantifier le gain en termes de durabilité des procédés proposés pour la conversion de la **LGO** en **HBO** vis-à-vis des deux méthodes décrites dans la littérature (Tableau 9). Pour cela, nous avons calculé deux indicateurs : l'Ecoscale décrit par Van Aken *et al.*,⁸⁵ qui s'intéresse au coût écologique de la réaction, et l'économie d'atomes ou intensité massique du procédé (PMI, process mass intensity) qui regarde l'efficacité dans l'utilisation des atomes et donc la création de déchets.

Tableau 9 : Comparaison des procédés de production de HBO suivant deux indicateurs, le PMI et l'Ecoscale

Procédé	PMI	Ecoscale
Koseki <i>et al.</i> 1990	15,9	50,5 ^a
Paris <i>et al.</i> 2013 ^b	32,4 ^c	55,5 ^a
Flourat <i>et al.</i> 2014	22,7 ^d	63/45,5 ^e
Bonneau <i>et al.</i> 2018	1,96	75/68,5 ^e

^a La procédure reportée ne décrit pas le traitement ni la purification de la réaction

^b La préparation du catalyseur n'est pas prise en compte dans le calcul

^c Du fait de leur recyclabilité, l'Amberlite 15-IR et le catalyseur ne sont pas pris en compte

^d Le calcul est effectué sur la base d'une procédure avec deux cycles, pour un rendement global de 67%. La procédure d'hydrolyse incluant de l'Amberlite comme précédemment, la masse d'Amberlite n'a pas été considérée

^e Avec/sans étape de purification

Il est facile de constater que la méthode sans solvant ni catalyseur (Bonneau *et al.*⁸³) permet d'avoir l'intensité massique la plus faible, c'est-à-dire le moins de déchets avec un ratio entre la masse totale de l'ensemble des flux entrants (excepté l'eau) et la masse finale du produit désiré inférieur à 2, alors que les trois autres techniques donnent un résultat supérieur à 15. L'économie d'atomes est donc substantielle. Nous avons voulu croiser cette information avec un autre indicateur, l'Ecoscale, qui ne prend pas en compte les déchets générés mais accorde des malus pour l'utilisation de composés toxiques ou l'utilisation de technologies énergivores. Le principe de l'Ecoscale est de partir d'une note de 100 et d'enlever des points en fonction du rendement, de la nécessité de chauffer ou de refroidir la réaction, du temps de réaction, de la toxicité et du prix des réactifs utilisés, des contraintes opératoires (boîtes à gant, atmosphère inerte...) et de la demande énergétique du traitement et de la purification. Du coup, un Ecoscale haut signifie que peu de points ont été perdus et implique donc une bonne éco-compatibilité du procédé. Encore une fois la technique sans solvant ni catalyseur (faisant intervenir une distillation moléculaire pour la purification finale) obtient le meilleur score, même comparé aux procédures de Koseki *et al.* et Paris *et al.*, où le traitement et la purification n'ont pas pu être pris en compte. La perte principale de points pour ce procédé est due au rendement. Comme discuté précédemment, nous avons préféré privilégier la sécurité en utilisant un léger défaut en peroxyde d'hydrogène ce qui ne nous permet pas d'atteindre une conversion totale mais nous assure l'absence de ce composé en fin de manipulation.

Nous avons donc réussi à développer une voie d'accès durable vers les molécules plateformes à fort potentiel que sont la **HBO** et la **2H-HBO**, en une seule étape à partir d'un réactif bio-sourcé.

Valorisation de la HBO et de la 2H-HBO

Introduction

La **HBO** comme la **2H-HBO**, (*S*)- γ -hydroxyméthyl- γ -butyrolactone (CAS n°32780-06-6), sont utilisées comme molécules plateformes pour la synthèse d'un grand nombre de composés. La présence du centre stéréogène permet l'obtention de produits finaux énantiopurs. Les fonctions alcool et lactone donnent accès à un panel important de réactions. De plus, pour la **HBO**, la polarisation de la double liaison permet une régiosélectivité importante dans le cas d'additions nucléophiles (Schéma 14).

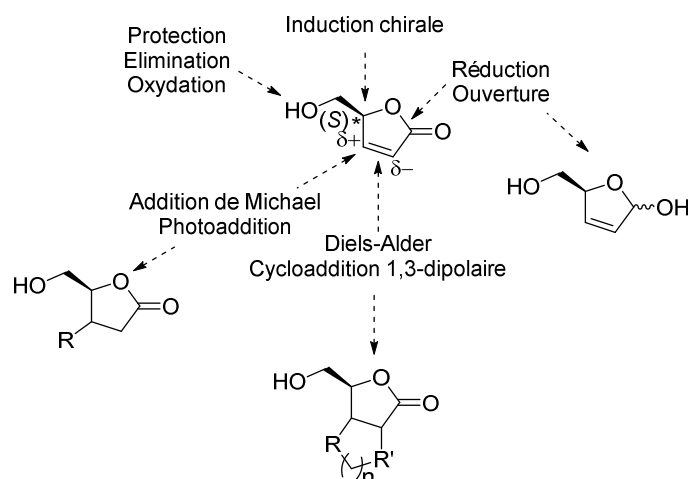


Schéma 14 : Possibilités offertes au chimiste organicien par la HBO

Ce dernier aspect a été étudié par différents groupes de recherches pour les additions de Michael, les réactions de Diels-Alder, les cycloadditions 1,3-dipolaires ainsi que la photoaddition. Une revue détaillée des différentes sélectivités rencontrées a été publiée durant cette thèse :

- **(S)- γ -hydroxyméthyl- α,β -butenolide (aka HBO), a Valuable Chiral Synthone: Syntheses, Reactivity and Applications** Amandine L. Flourat, Arnaud Haudrechy, Florent Allais et Jean-Hugues Renault *Organic Process Research & Development* **2019** 10.1021/acs.oprd.9b00468.

Pour résumer, les réactions de Diels-Alder observées ont toujours montré une sélectivité totale diastéréofaciale *anti*. Alors que les réactions de Michael, les cycloadditions 1,3-dipolaires et les photoadditions sont régiosélectives du fait de la polarisation de la liaison et bien que souvent accompagnées d'une sélectivité faciale *anti*, celles-ci ne sont que rarement totalement sélectives. Toutefois, cette sélectivité faciale peut être exacerbée, notamment par le choix d'un groupe protecteur encombrant sur l'alcool. Les conditions opératoires jouent aussi un rôle non négligeable dans certains cas.

Pour la **HBO**, nous avons également, dans cette revue, listé de manière exhaustive les applications répertoriées dans la littérature. Le premier usage qui ressort est la synthèse de composés de type nucléoside notamment dans le cadre de la lutte contre le VIH. La **HBO** a aussi été utilisée pour la synthèse totale de molécules naturelles d'intérêts (Schéma 15), tels que des phéromones, des

fragrances, des anti-leucémiques ou encore des anti-nutritifs. A partir de la **HBO**, une autre molécule plateforme peut être obtenue, la γ -hydrométhyl- γ -butyrolactone ou **2H-HBO**.

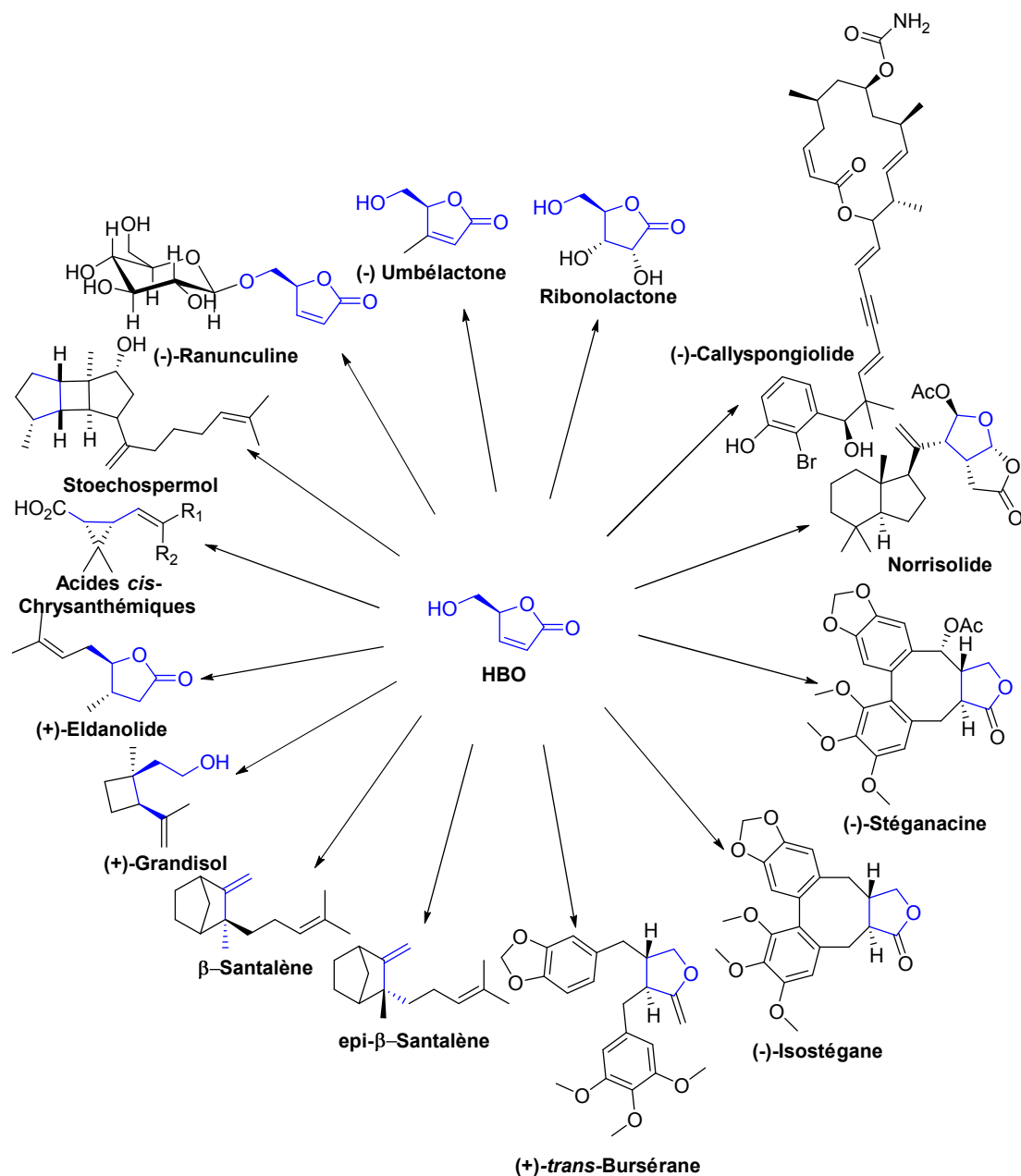
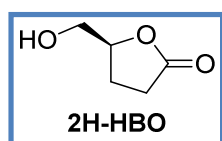


Schéma 15 : Produits naturels synthétisés à partir de la HBO



La **2H-HBO** (CAS n° 32780-06-6), comme nous l'avons vu, peut être obtenue par simple hydrogénation pallado-catalysée à partir de la **HBO** ou par oxydation de la **LGO** préalablement réduite en Cyrene®. Ce synthon de choix a été utilisé dans de nombreuses synthèses (plus de 200 références recensées en tant que réactifs en

chimie de synthèse), particulièrement dans la conception de voies de synthèse de composés à visée thérapeutique. Un chapitre lui a été consacré dans un ouvrage intitulé « Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis ». ⁸⁶ Comme le montre le Schéma 16, une dizaine de brevets récents utilisent la **2H-HBO** pour la production d'antiviraux, ⁸⁷ d'anti-thrombotiques, ⁸⁸ d'anticancéreux, ^{89,90} de traitements contre la schizophrénie ⁹¹ et de divers inhibiteurs pour des récepteurs impliqués dans les maladies auto-immunes, inflammatoires et métaboliques. ⁹²⁻⁹⁴

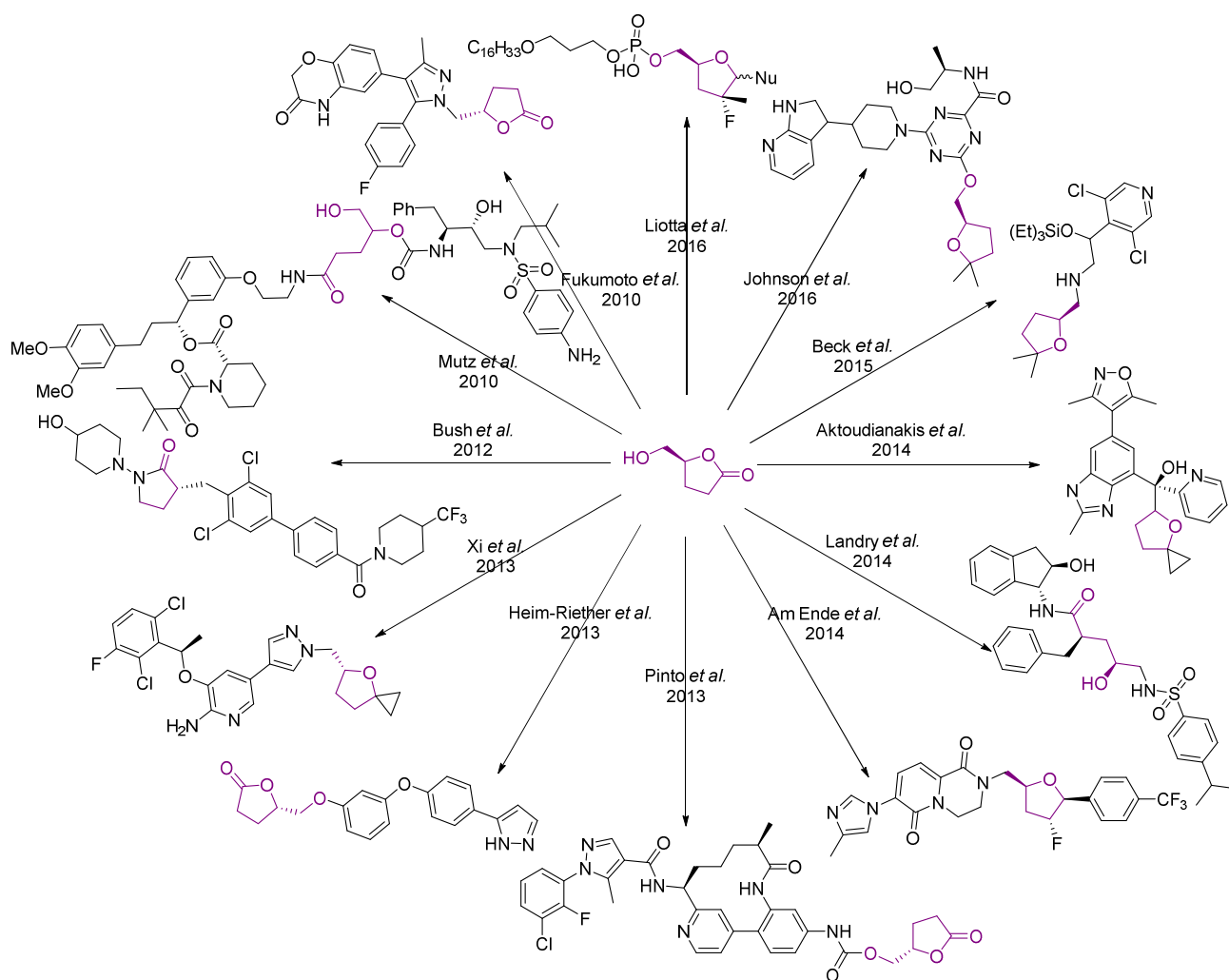


Schéma 16 : Composés pharmaceutiques synthétisés à partir de la 2H-HBO

Cependant les applications de la **2H-HBO** ne se limitent pas aux molécules à visée thérapeutique. Elle a été utilisée récemment pour la synthèse de divers produits naturels, ⁹⁵⁻⁹⁸ d'un antifongique ⁹⁹ et de polymères. ¹⁰⁰⁻¹⁰³

Enfin, une autre famille de molécules plateformes peut être obtenue à partir de la **2H-HBO**, en l'occurrence celle des époxydes possédant un centre asymétrique. Parmi ceux accessibles, nous avons synthétisé le (S)-3-(oxiran-2-yl)propanoate de méthyle (CAS n° 85428-31-5) et le (S)-3-(oxiran-2-

yl)propanoate d'éthyle (CAS n° 128969-94-8).¹⁰⁴ Récemment, ces composés utilisés en tant que précurseurs ont été retrouvés dans la synthèse de macrolides tels que la bis-déoxylophotoxine,¹⁰⁵ une neurotoxine, la Streptorubine B,¹⁰⁶ un antibiotique et le (-)-Stagonolide D,¹⁰⁷ un herbicide, ou de lactones telles que la Diplobifuranylone B,¹⁰⁸ une phytotoxine et des Neonectrolides,¹⁰⁹ ainsi que des anticancéreux potentiels (Schéma 17). Pour des applications médicales, Montagnat *et al.*¹¹⁰ ont synthétisé des composés pouvant mimer des peptides alors que Stockton *et al.*¹¹¹ ont synthétisé des cyclopropanes agonistes de récepteurs GABA_c dont le (-)-TAMP (Schéma 17). Ces époxydes ont également servi à la synthèse de phéromones de scarabée et de mouche des tiges, le 4-dodécanolide et le (*R,Z*)-9-octadécène-4-olide respectivement (Schéma 17).^{112,113} Pour notre part, nous nous en sommes servis pour synthétiser un arôme.

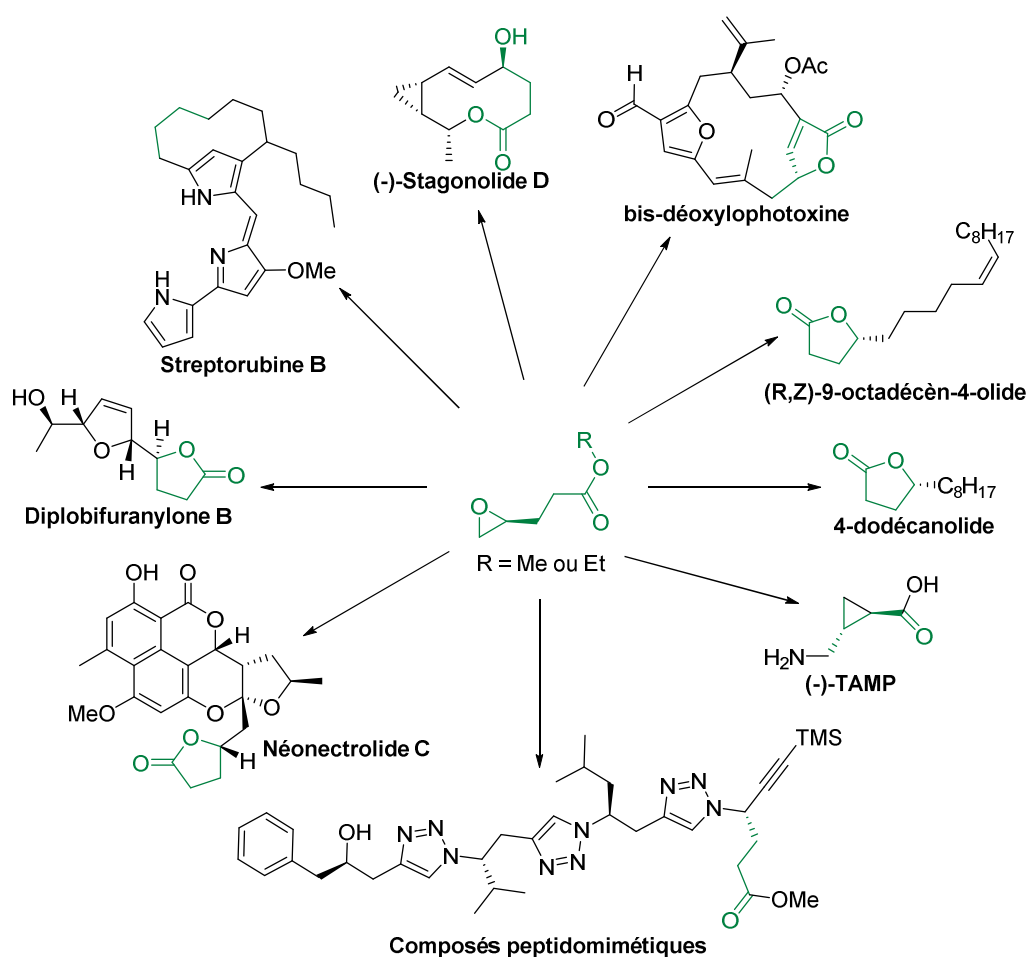
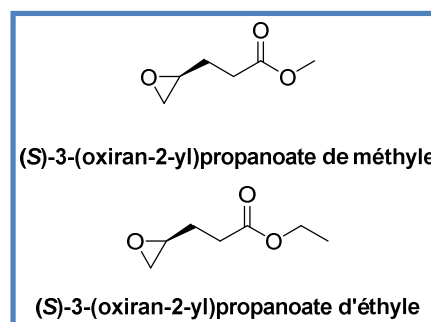
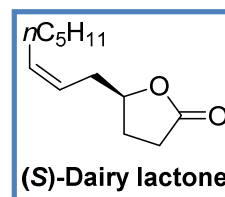


Schéma 17 : Molécules issues des époxydes chiraux (*S*)-3-(oxiran-2-yl)propanoates de méthyle ou d'éthyle

Synthèse des époxydes chiraux vers la (S)-Dairy lactone

Dans le cadre de la valorisation de la **LGO**, nous nous sommes intéressés à une molécule à très forte valeur ajoutée, la dairy lactone (CAS n°63357-98-2). Cet arôme qui, selon la dilution, peut exprimer un goût de beurre ou apporter une note de pêche, est utilisé en parfumerie et dans l'industrie agroalimentaire. Actuellement, la dairy lactone est produite par voie biotechnologique (50 kg/an), ce qui présente deux inconvénients majeurs : (1) la dairy lactone est obtenue sous forme racémique or la forme (*R*) altère les qualités organoleptiques en apportant un arrière-goût rance ; (2) la purification de la molécule en fin de procédé étant complexe, le prix se trouve fortement impacté avec un prix reporté de 10 000 €/g. Ces deux aspects limitent l'utilisation de cet arôme notamment pour des applications agroalimentaires.



L'ensemble des molécules plateformes évoqués ci-avant (**HBO**, **2H-HBO**, (*S*)-3-(oxiran-2-yl)propanoates de méthyle ou d'éthyle) sont mises en œuvre lors de cette synthèse.

Ce travail de synthèse, mené en collaboration avec la startup australienne CIRCA group et le laboratoire dirigé par Ben Greatrex de l'université australienne de New England, a donné lieu à un brevet (WO 2016162646) et une publication :

- **Chemo-Enzymatic Synthesis of Chiral Epoxides Ethyl and Methyl (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoates from Renewable Levoglucosenone: An Access to enantiopure (S)-Dairy Lactone.** Aurélien A. M. Péru, Amandine L. Flourat, Christian Gunawan, Warwick Raverty, Martyn Jevric, Ben W. Greatrex,* and Florent Allais* *Molecules*, **2016**, *21*, 988.

Résultats et discussion

La première étape de cette synthèse totale est bien évidemment la conversion de la **LGO** en **2H-HBO** *via* soit le Cyrene[®], soit la **HBO** selon que l'hydrogénation est réalisée avant ou après l'oxydation de Baeyer-Villiger. La conversion de la fonction alcool est ensuite réalisée pour le transformer en meilleur groupe partant, soit par méthylation (62%), soit par tosylation (84%). La lactone activée va pouvoir subir une ouverture nucléophile qui générera les époxydes chiraux, les (*S*)-3-(Oxiran-2-yl)propanoates de méthyle et d'éthyle, nouvelles molécules plateformes obtenues à partir de la **LGO**. Pour cette étape, des alcoolates de sodium sont utilisés. Le méthanolate de sodium conduit à un excellent rendement à partir du tosylate (97%), alors qu'à partir du mésylate, le rendement est plutôt médiocre (42%) pour ce type de réaction. L'instabilité du mésylate est très probablement responsable de ce faible rendement. Avec l'éthanolate de sodium, la même tendance est observée bien que moins marquée avec 96% de rendement à partir du tosylate et tout de même 86% à partir du mésylate. L'éthanolate de sodium présente donc le double avantage de pouvoir travailler dans l'éthanol, solvant peu toxique comparativement au méthanol, et de conduire à de très bons rendements. Pour maximiser le rendement et être le plus éco-compatible possible, il est donc préférable de choisir la combinaison tosylate et éthanolate de sodium, l'économie d'atomes que pourrait représenter l'utilisation du mésylate étant perdue du fait de rendements plus faibles. Les deux époxydes chiraux sont donc obtenus à partir de la **2H-HBO** en deux étapes avec un rendement supérieur à 80% et en 4 étapes à partir de la **LGO** avec un rendement de près de 60%. Ces étapes sont résumées dans le schéma 18.

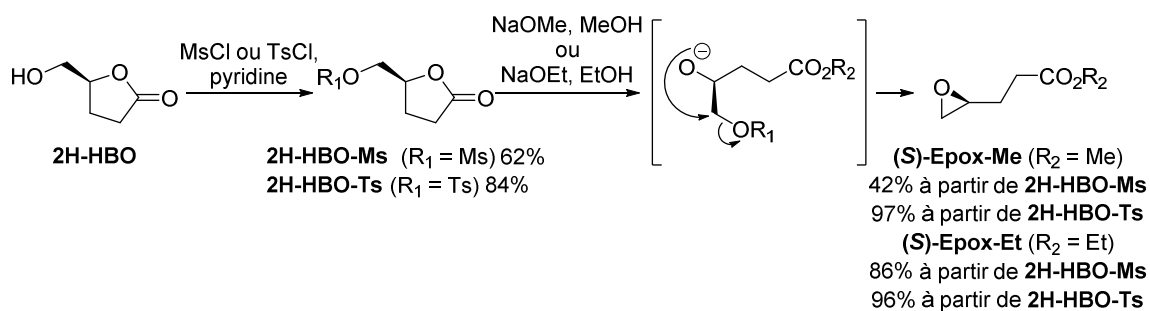


Schéma 18 : Synthèse des époxydes chiraux à partir de la 2H-HBO

Pour obtenir la (*S*)-dairy lactone, deux voies de synthèse chimique sont décrites dans la littérature. La première décrite par Habel *et al.* valorise comme produit de départ un glycidyl alcène énantio pur.¹¹⁴ Trois étapes sont nécessaires pour arriver à la molécule cible avec un rendement global de 74%, une alcynylation, une coupure oxydante et une *syn*-hydrogénation (Schéma 19). La deuxième étape faisant intervenir du tétraoxyde d'osmium, composé hautement toxique même à très faible quantité, l'utilisation de cette voie à des fins agroalimentaires ne paraît pas envisageable.

La deuxième procédure a été décrite par Shin *et al.* à partir du (*S*)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate de méthyle.¹¹⁵ L'addition d'un cuprate d'ordre supérieur permet d'obtenir la (*S*)-dairy lactone en une seule étape à partir de l'époxyde chiral avec un très bon rendement (84%). Cependant, il faut prendre en considération la formation de ce cuprate qui fait intervenir du cyanure de cuivre, ce qui représente un risque certain pour le manipulateur.

Nous avons donc choisi d'explorer une route en trois étapes : alcynylation, lactonisation et *syn*-hydrogénation (Schéma 19). Pour l'alcynylation, l'heptynure de lithium est formé par action du *n*-butyllithium sur le 1-heptyne en présence de BF_3 .étherate, l'addition sur l'époxyde étant totalement régiosélective sur le carbone le moins encombré. Les γ -hydroxyesters ainsi formés sont engagés, sans purification intermédiaire, dans un traitement à l'acide *para*-toluène sulfonique pour réaliser la lactonisation. Enfin, la *syn*-hydrogénation permettant d'obtenir la double liaison en configuration *Z* est catalysée au palladium de Lindlar dans l'acétate d'éthyle. La (*S*)-Dairy lactone est obtenue après une étape de purification sur gel de silice.

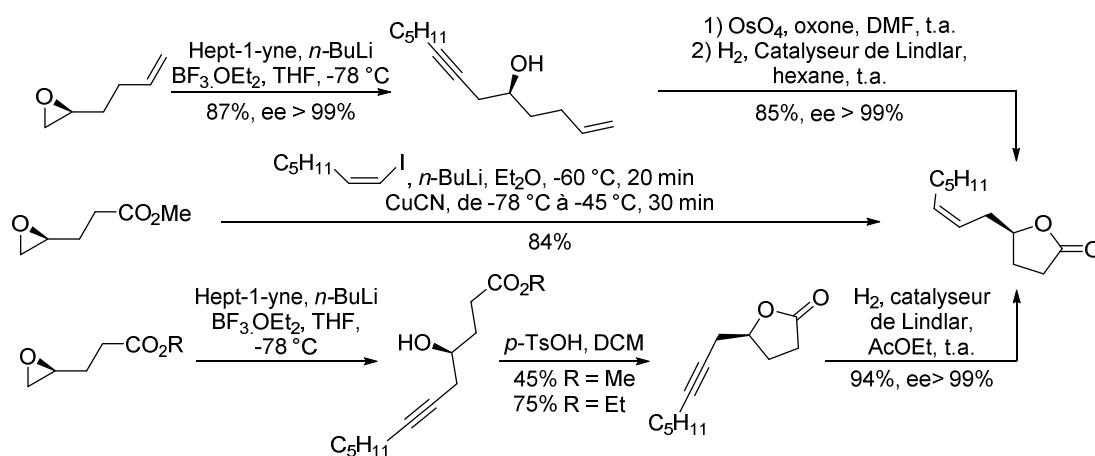


Schéma 19 : Synthèse de la (*S*)-Dairy lactone par la méthode de Habel *et al.* (haut), de Shin *et al.* (milieu) et Péru *et al.* (bas)

Matériels et méthodes

La (-)-lévoglucosénone a été fournie gracieusement par Circa group. Le Novozym® 435 (N435, CAL-B) a été acheté chez Univar. Les autres réactifs ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich et utilisés tels quels. Les solvants ont été achetés auprès de Thermofisher Scientific. Les solvants ont été séchés sur mBraun SPS 800 si nécessaire. Le CDCl_3 a été acheté chez Euriso-top. Les évaporations ont été conduites sous pression réduite à moins de 40 °C. Les purifications sur gel de silice ont été conduites sur un Puriflash 4100, Interchim, équipé de colonnes pré-packées PF-30SI-HP (silice 30 μm). Les analyses IR ont été conduites sur un Cary 630 FTIR d'Agilent Technologies. Les pouvoirs rotatoires spécifiques ont été déterminés après mesure de la déviation optique sur un polarimètre ADP410, Bellingham and Stanley. Les analyses RMN ont été réalisées sur un Fourier 300 de chez Bruker. Les spectres ^1H sont enregistrés à 300 MHz dans le CDCl_3 et calibrés sur le pic de solvant résiduel ($\delta = 7,26$ ppm). Les spectres ^{13}C sont enregistrés à 75 MHz dans le CDCl_3 et calibrés sur le pic de solvant résiduel ($\delta = 77,16$ ppm).

Synthèse de la (S)- γ -méthanesulfonyloxyméthyl- γ -butyrolactone, 2H-HBO-Ms

Sous azote, la 2H-HBO (5,0 g, 43,5 mmol) et le chlorure de méthane sulfonyle (5,0 mL, 64,7 mmol, 1,5 équiv.) sont dissous dans le dichlorométhane sec (22 mL) et la pyridine (8,7 mL), puis le milieu est agité à température ambiante pendant 3 h. Le brut réactionnel est dilué avec 200 mL de DCM, lavé par deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique diluée (3 M, 100 mL), puis deux fois avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (100 mL) et enfin avec de la saumure (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre, filtrée et concentrée. Le produit brut est trituré dans l'éther diéthylique (40 mL), essoré et séché. 5,2 g de 2H-HBO-Ms sont récupérés (62%) sous forme de poudre beige.

Point de fusion : 46,5 °C; $[\alpha]_{20}^{\text{D}}$ +30,6° (c 0,10, CHCl_3); [reporté +33,7° (c 1, CHCl_3)];¹¹⁶ **FT-IR** (pur) : 3012, 2936, 1758 (C=O), 1338, 1157 cm^{-1} ; **^1H -RMN** (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 2,12 (m, 1H, H-3a), 2,36 (m, 1H, H-3b), 2,56 (m, 2H, H-2), 3,05 (s, 3H, H-6), 4,26 (m, 1H, H-5a), 4,42 (m, 1H, H-5b), 4,75 (m, 1H, H-4); **^{13}C -RMN** (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 23,4 (C-3), 28,0 (C-2), 37,7 (C-6), 70,0 (C-5), 76,8 (C-4), 176,3 (C-1).

Synthèse de la (S)- γ -toluènesulfonyloxyméthyl- γ -butyrolactone, 2H-HBO-Ts

Sous azote, la 2H-HBO (2,5 g, 21,5 mmol) et le chlorure de *p*-toluène sulfonyle (6,16 g, 32,3 mmol, 1,5 équiv.) sont dissous dans le dichlorométhane sec (10 mL) et la pyridine (4,3 mL), puis agité à température ambiante pendant 9 h. Le brut réactionnel est dilué avec 100 mL de DCM, lavé par deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique diluée (3 M, 50 mL), puis deux fois avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (50 mL) et enfin avec de la saumure (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre, filtrée et concentrée. Le produit brut est trituré dans l'éther diéthylique (40 mL), essoré et séché. 3,88 g de 2H-HBO-Ts sont récupérés (84%) sous forme de poudre beige.

Point de fusion : 83,3 °C; $[\alpha]_{20}^{\text{D}}$ +47,9° (c 0,11, CHCl_3); [reporté +44,5° (c 0,95, CHCl_3)];¹¹⁷ **UV** (CDCl_3) λ_{max} 237, 263, 274 nm; **FT-IR** (pur) : 2961, 1765 (C=O), 1595 (C=Carom), 1448 (C=Carom), 1364, 1169 cm^{-1} ; **^1H -RMN** (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 2,25 (m, 2H, H-3), 2,45 (s, 3H, H-10), 2,55 (m, 2H, H-2), 4,16 (m, 2H, H-5), 4,68 (m, 1H, H-4), 7,36 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H-8), 7,78 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H-7); **^{13}C -RMN** (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 21,8 (C-10), 23,7 (C-2), 28,0 (C-3), 70,1 (t, C-5), 76,5 (d, C-4), 128,1 (C-7), 130,2 (C-8), 132,3 (C-9), 145,6 (C-6), 176,2 (C-1).

Synthèse du (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate de méthyle et du (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate d'éthyle

Sous azote, le **2H-HBO-Ts** (2,0 g, 7,37 mmol) ou le **2H-HBO-Ms** (1,4 g, 7,37 mmol) sont dissous soit dans le méthanol soit dans l'éthanol (10 mL) et le méthoxyde ou l'éthoxyde de sodium est ajouté (1.1 équiv.). Le milieu réactionnel est agité pendant 3h à température ambiante. Le milieu est concentré et repris dans de l'eau (10 mL). Le produit est extrait par deux fois à l'éther diéthylique (15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure (20 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées.

Le (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate de méthyle est récupéré (0,93 g, 97% à partir de **2H-HBO-Ts**) sous forme d'une huile orange. Le produit peut-être distillé sous pression réduite, conduisant à une huile incolore.

$[\alpha]^{20}_D$ -17,0° (c 0,11, CHCl₃) ; [reporté -17,9° (c 7,4, CHCl₃)] ; ¹⁷FT-IR (pur) : 2952, 1731 (C=O), 1437, 1360, 1256, 1172 cm⁻¹ ; ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1,78 (m, 1H, H-3a), 1,98 (m, 1H, H-3b), 2,48 (m, 3H, H-2, H-5a), 2,77 (m, 1H, H-5b), 2,98 (m, 1H, H-4), 3,69 (s, 3H, H-6) ; ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ 27,7 (C-3), 30,3 (C-2), 47,2 (C-5), 51,4 (C-4), 51,8 (C-6), 173,4 (C-1).

Le (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate d'éthyle est récupéré (1,02 g, 96% à partir de **2H-HBO-Ts**) sous forme d'une huile orange. Le produit peut-être distillé sous pression réduite conduisant à une huile incolore.

$[\alpha]^{20}_D$ -15,6° (c 0,11, CHCl₃) ; [reporté -17,1° (c 0,8, CHCl₃)] ; ¹⁶FT-IR (pur) : 2982, 1729 (C=O), 1371, 1254, 1176 cm⁻¹ ; ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1,22 (td, 3H, J = 7,2 et 1,2 Hz, H-7), 1,74 (m, 1H, H-3), 1,92 (m, 1H, H-3), 2,42 (m, 3H, H-2, H-5), 2,72 (m, 1H, H-5), 2,94 (m, 1H, H-4), 4,10 (qd, 2H, J = 7,2 et 1,2 Hz, H-6) ; ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ 14,4 (C-7), 27,8 (C-3), 30,6 (C-2), 47,2 (C-5), 51,4 (C-4), 60,7 (C-6), 173,0 (C-1).

Synthèse de la (S)-5-(Oct-2-yn-1-yl)-butyrolactone

Sous azote, à -78 °C, le 1-Heptyne (1,0 mL, 7,53 mmol, 1,4 équiv.) est dissous dans le THF (11 mL), puis le *n*-butyl lithium à 2,5M dans l'hexane (3,0 mL, 7,53 mmol, 1,4 équiv.) est ajouté. Après 5 min d'agitation, le BF₃.étherate (0,93 mL, 7,53 mmol, 1,4 équiv.) est ajouté, puis après 30 min supplémentaires, le (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate de méthyle (0,70 g, 5,38 mmol, 1 équiv.) ou d'éthyle (0,78 g, 5,38 mmol, 1 équiv.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à -78 °C, puis quenché avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (6 mL) et de l'eau (50 mL). Le produit est extrait par trois fois au dichlorométhane (20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure (40 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie flash sur gel de silice (95/5 à 90/10 cyclohexane/AcOEt). Le produit désiré est obtenu sous forme d'une huile jaune (70% à partir du (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate d'éthyle et 45 % à partir du (S)-3-(Oxiran-2-yl)propanoate de méthyle).

$[\alpha]^{20}_D$ -29,5° (c 0,12, CHCl₃) ; FT-IR (pur) : 2929, 2858, 1772 (C=O), 1349, 1172 cm⁻¹ ; ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ 0,89 (m, 3H, H-12), 1,31 (m, 4H, H-10, H-11), 1,47 (m, 2H, H-9), 2,13 (m, 3H, H-3, H-8), 2,38 (m, 1H, H-3), 2,58 (m, 4H, H-2, H-5), 4,60 (m, 1H, H-4) ; ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ 14,1 (C-12), 18,7 (C-8), 22,3 (C-11), 25,6 (C-5), 26,6 (C-3), 28,6 (C-2, C-9), 31,1 (C-10), 73,6 (C-6), 78,2 (C-4), 83,7 (C-7), 177,0 (C-1).

Synthèse de la (S)-dairy lactone

La (S)-5-(Oct-2-yn-1-yl)-butyrolactone (2,72 g, 14,0 mmol) est dissoute dans l'acétate d'éthyle (56 mL, C 0,25 M) et le palladium de Lindlar (0,20 g, 7,5% m/m) est ajouté. Le milieu réactionnel, sous vive agitation, est placé sous courant d'hydrogène jusqu'à réaction complète. Puis, il est filtré sur Célite® et

concentré. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie flash sur gel de silice (80/20 à 50/50 cyclohexane/AcOEt). Le produit désiré est obtenu sous forme d'huile incolore (2,59 g, 94%).

$[\alpha]_D^{20}$ +7,5° (c 0,51, CHCl₃) ; [reporté +17,7° (c 0,37, MeOH)] ; ¹¹⁸ **FT-IR** (pur) : 2923, 2854, 1771 (C=O), 1459, 1348, 1173 cm⁻¹ ; **¹H-RMN** (CDCl₃, 300 MHz) : δ 0,82 (m, 3H, H-12), 1,23 (m, 6H, H-9, H-10, H-11), 1,84 (m, 1H, H-3a), 1,98 (m, 2H, H-8), 2,23 (m, 1H, H-3b), 2,37 (m, 1H, H-5a), 2,47 (m, 3H, H-2, H-5b), 4,47 (q, 1H, *J* = 6,6 Hz, H-4), 5,29 (m, 1H, H-6), 5,51 (m, 1H, H-7) ; **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75 MHz) : δ 14,0 (C-12), 22,5 (C-10), 27,1 (C-3), 27,4 (C-8), 28,7 (C-2), 29,1 (C-11), 31,4 (C-9), 32,8 (C-5), 80,2 (C-4), 122,2 (C-6), 134,0 (C-7), 177,1 (C-1).

Conclusion et perspectives

Bien que l'ensemble de cette synthèse soit plus verte que les méthodes existantes, elle reste basée sur une chimie assez « classique ». Pour améliorer la durabilité de cette procédure, diverses pistes peuvent être explorées. Un point de dépense énergétique considérable est l'alcynylation qui est réalisée à -78 °C. Nos collègues australiens ont expérimenté la chimie en flux pour réaliser cette étape avec des résultats prometteurs à -45 °C. Pour améliorer encore le procédé, des essais de substitutions de solvants pourraient être envisagés. Enfin, la purification finale peut être menée par distillation moléculaire, limitant ainsi l'usage de solvants et la production de déchets dangereux (silice).

Synthèse de chaînes grasses de rhamnolipides

La versatilité de la lévoglucosénone s'exprime dans la diversité des produits qui peuvent en être issus. En effet, elle peut servir à synthétiser un sucre rare, la D-ribonolactone,¹¹⁹ ainsi que des dérivés de sucres pour la synthèse de nucléosides, mais elle peut également de manière surprenante, donner naissance à des chaînes grasses comme nous allons le voir ici, avec la synthèse de rhamnolipides.

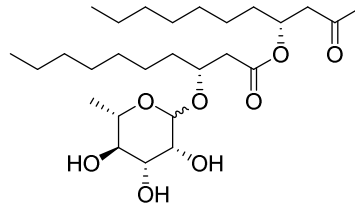


Figure 21 : Exemple de structure d'un rhamnolipide

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles dont la tête polaire est constituée d'une (ou deux) unité(s) rhamnose(s) liée(s) à une simple, double ou triple chaîne grasse par une liaison acétal (Figure 22).¹²⁰ Ces biosurfactants peuvent être produits par culture fongique et ce depuis plus de trente ans. Cependant, avec un downstream processing représentant 70 à 80% du prix de production, l'industrialisation de ces procédés reste très limitée et ce malgré de très nombreuses applications.¹²¹ Ranshawa et Rahman citent cinq applications majeures qui devraient conduire les rhamnolipides sur le devant de la scène :¹²¹

- Meilleure récupération du pétrole et traitement des sols contaminés
- Applications pharmaceutiques et thérapeutiques
- Applications cosmétiques
- Détergence
- Biostimulation

Cette dernière application est étudiée au sein de l'Université de Reims-Champagne-Ardenne notamment pour lutter contre les maladies de la vigne. Deux revues très récentes donnent un état de l'art des connaissances des systèmes de réponses immunitaires mis en œuvre au sein des plantes.^{122,123} Il a été mis en évidence que la réponse immunitaire des plantes est due principalement à la partie lipidique des rhamnolipides.¹²⁴ Des travaux antérieurs ont permis la synthèse de la bi-chaîne lipidique à partir du 3-hydroxy-pent-4-énoate de *tert*butyle.^{125,126} Le produit de départ étant racémique, il est nécessaire de réaliser un dédoublement racémique par voie enzymatique afin d'accéder à l'énantiomère (*S*) pur. Il est à noter que l'énantiomère (*R*) peut être transformé en (*S*) *via* une réaction de Mitsunobu. La chaîne grasse est ensuite étendue par réaction de métathèse (Schéma 20). Cette synthèse bien qu'efficace ne répond pas aux critères de la chimie verte surtout si l'on prend en compte que pour former le 3-hydroxy-pent-4-énoate de *tert*butyle, il est nécessaire de faire réagir de l'acroléine (mortel, corrosif, très inflammable et fortement nocif pour l'environnement) avec de l'acétate de *tert*-butyle à -78 °C dans le THF.

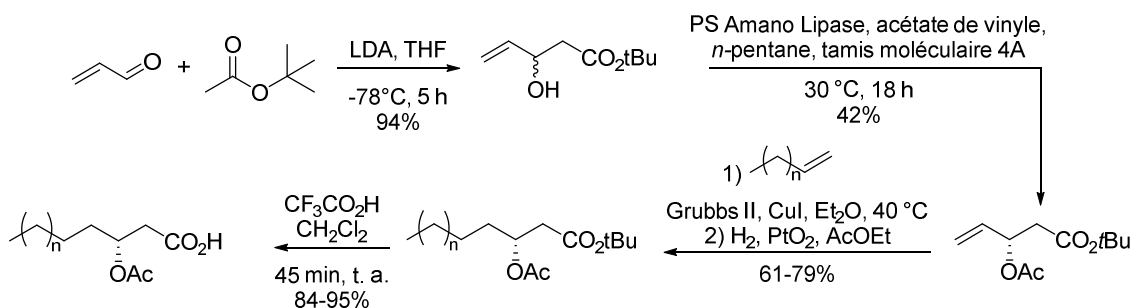


Schéma 20 : Synthèse de 3-hydroxy-acides gras mise en place par Menhour et al.^{125,126}

Dans la littérature, une autre méthodologie permet d'obtenir les hydroxy-acides gras énantio-purs à partir de l'acide de Meldrum et d'un chlorure d'acyle gras dans le dichlorométhane en présence de pyridine (Schéma 21).¹²⁷⁻¹²⁹ Ensuite une réduction énantiosélective est réalisée avec le catalyseur de Noyori (Schéma 21). Cette synthèse est complétée par des étapes de protection/déprotection de l'acide et de l'alcool (Schéma 21). Il est important de noter que Bauer *et al.* ont développé un procédé permettant à partir des hydroxy-acides gras et de L-rhamnose protégé et activé par un acétimide en position anomérique de former des rhamnolipides par voie chimique. Ce procédé est appelé « Hydrophobically assisted switching phase synthesis » ou HASPS.^{129,130}

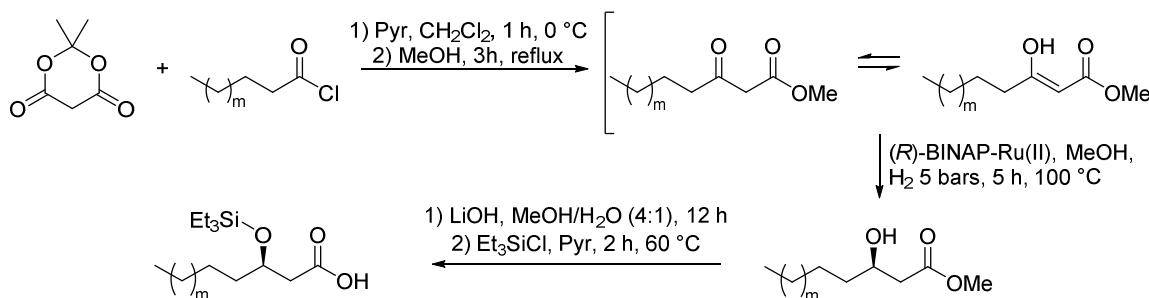


Schéma 21 : Synthèse de 3-hydroxy-acides gras mise en place par Bauer et al.¹²⁹

Nous comparerons ces deux méthodes d'obtention des hydroxy-acides gras énantio-purs avec la synthèse que nous avons développée à base de **LGO** à l'aide des indicateurs précédemment utilisés qui sont l'Ecoscale et le PMI.⁸⁵

Le **LGO** va donc servir ici de synthon biosourcé et chiral pour la synthèse de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque, puis des hydroxyacides gras (Schéma 22).

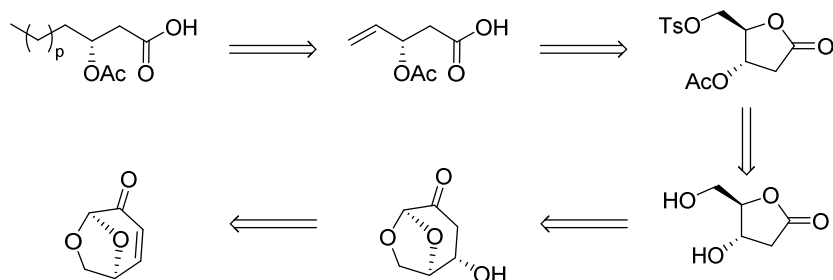


Schéma 22 : Schéma rétrosynthétique de l'obtention de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque à partir de la LGO

Ces travaux ont été financés par la SFR Concorcet sous l'acronyme LÉGO (La **LGO** : une brique moléculaire pour la synthèse d'éliciteurs) au travers du stage d'Enzo Petracco.

Les résultats obtenus pendant ce stage font l'objet d'une publication qui sera soumise prochainement.

- **A green way to (S)- γ -hydroxy-fatty acids from Levoglucosenone: A new gate for the synthesis of rhamnolipids.** Enzo Petracco, Amandine Flourat, Marie-Charlotte Belhomme, Stéphanie Castex, Florent Allais et Arnaud Haudrechy.

Formation de l'hydrate de LGO

Dès 1979, l'hydratation de la **LGO** a été décrite par Shafizadeh en milieu acide et en milieu basique.¹⁶ Récemment, des travaux parallèles au sein de l'URD ABI ont déterminé des conditions d'hydratation favorable pour ce substrat de départ en utilisant une base minérale, le phosphate de potassium tribasique (K_3PO_4). Il est nécessaire de se placer en condition très diluée (80 mmol.L^{-1}) afin d'obtenir majoritairement le produit désiré (Schéma 23, Tableau 10, entrée 1). En effet, dans un milieu plus concentré, la formation du dimère **LGO**-Cyrène est favorisée. Deux expériences d'addition goutte à goutte de la lévoglucosénone dans le milieu ont été menées dans l'espoir d'améliorer encore le rendement ou de réduire le volume réactionnel. Dans la première, la concentration finale était de 80 mmol.L^{-1} et la conversion en produit désiré était légèrement supérieure à celle menée en « batch » (Tableau 10, entrée 2). Dans la seconde, le milieu concentré dix fois ($C_f = 0,8 \text{ mol.L}^{-1}$), une forte proportion de dimère a été enregistrée (Tableau 10, entrée 3). Visuellement, les gouttes de **LGO** ne se dissolvent pas immédiatement dans le milieu. Deux hypothèses peuvent alors être formulées. La première est que la formation de dimère est favorisée par la faible solubilité de la **LGO** dans la solution de phosphate de sodium tribasique conduisant ainsi à des maxima locaux de concentrations. La seconde tient dans la réversibilité de l'addition de Michael. En effet, si le produit final n'est pas stable, il ne sera pas possible de réduire le volume réactionnel. Pour favoriser la dispersion de la **LGO** dans le milieu réactionnel, celle-ci a été diluée dans l'acétone ($C = 4 \text{ mol.L}^{-1}$) et ajoutée goutte à goutte à une solution de K_3PO_4 à 5 mol% pour atteindre une concentration finale de $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ (soit au final un milieu 80/20 H_2O /acétone). En plus des trois espèces précédemment identifiées, le spectre RMN révèle la présence de pics inconnus attribués à des oligomères. Bien que visuellement la dispersion de la **LGO** dans le milieu soit améliorée par l'acétone, l'impact de cette dernière est très négatif par rapport au but recherché. Cette augmentation des formes oligomériques de la **LGO** tend à montrer que l'addition de l'eau est réversible.

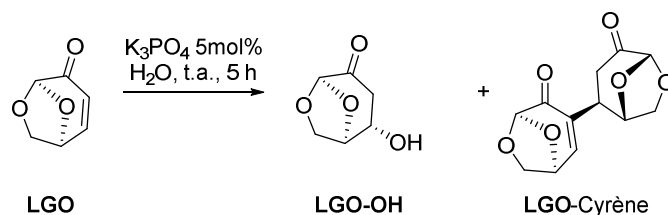


Schéma 23 : Addition de Michael de l'eau sur la LGO

Tableau 10 : Résultats d'addition de Michael de l'eau sur la LGO

Entrée	Addition	Concentration (mol.L ⁻¹)	%LGO restante	%LGO-OH	%LGO-Cyrene
1	En une fois	0,08 (eau)	3,4	86,2	10,4
2	Goutte à goutte	0,08 (eau)	1,8	89,3	8,9
3	Goutte à goutte	0,8 (eau)	6,6	60,2	33,1

Les essais précédents ont été menés sur un lot de **LGO** purifiée par chromatographie flash. En effet, la lévoglucosénone fournie par Circa Group n'est plus distillée et donc elle est fournie sous forme d'une liqueur contenant des impuretés, notamment des acides. La quantité de base est ajustée pour compenser la présence de ces acides. En doublant la quantité de K_3PO_4 , le pH initial de la solution atteint 11,2 contre 11,7 pour la solution à 5% molaire à partir de **LGO** purifiée. L'analyse en RMN du proton du brut réactionnel montre une proportion de **LGO** n'ayant pas réagi, de dimère et de **LGO-OH** de 5,4, 13 et 81,6% respectivement. Il ne semble donc pas nécessaire de purifier la matière première avant la première étape. La **LGO-OH** est isolée par chromatographie flash sur silice. 7,3 g de produit désiré sont récupérés à partir de 12,3 g de la liqueur brute fournie par Circa Group (59% m/m).

Synthèse de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque

La **LGO-OH** est convertie en **HBO-OH** par oxydation de Baeyer-Villiger dans les conditions mises au point précédemment, sans solvant et sans catalyseur (Schéma 24).⁸³ En respectant une montée en température douce pour remonter de 0 °C (température d'ajout du peroxyde d'hydrogène) à température ambiante puis en chauffant à 45 °C pendant une nuit, la réaction ne nécessite aucun traitement ni purification. Le produit désiré est obtenu après concentration avec un rendement de 97%. Il est arrivé que l'hydrolyse soit incomplète avec un faible pourcentage de formate résiduel (\approx 5%) auquel cas une éthanolyse en présence d'amberlite A15 est réalisée à 40 °C. Les billes d'Amberlite sont éliminées par filtration et le milieu est concentré pour donner la **HBO-OH** pure.

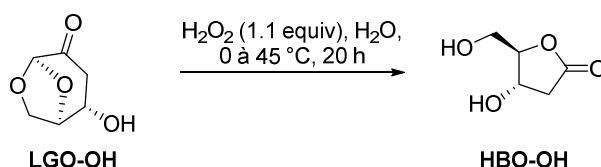


Schéma 24 : Synthèse de HBO-OH par oxydation de Baeyer-Villiger de LGO-OH

L'alcool primaire de la **HBO-OH** est ensuite activé par tosylation alors que l'alcool secondaire est protégé par acétylation. Ces deux étapes sont réalisées « one pot » (Schéma 25). Le produit désiré ne précipite pas dans un mélange d'eau acidifiée et de glace, il est donc nécessaire de réaliser une extraction à

l'acétate d'éthyle. Le brut réactionnel après extraction est filtré sur silice pour éliminer les traces résiduelles d'acide acétique. Un léger excès de chlorure de tosyloxy (1,25 équiv.) est utilisé mais après traitement, le spectre RMN du proton révèle que les impuretés existent en quantité négligeable. Le produit peut être engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. Le **HBO-Ts-OAc** est soumis à une iodation en présence d'iodure de sodium dans l'acétone pour donner l'intermédiaire **HBO-I-OAc** (Schéma 25). La réaction est totale et 91% du produit désiré sont récupérés. Le produit ne nécessite pas de purification.

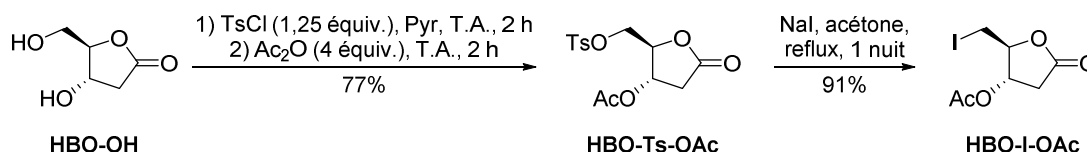


Schéma 25 : Synthèse de HBO-I-OAc

La réaction de Bernet-Vasella est ensuite menée en présence d'un excès de zinc activé (10 équiv.) (Schéma 26).¹³¹ Dans un premier temps, un mélange THF/eau (8/2) est utilisé comme solvant (82%).¹³² La littérature reporte également l'utilisation de *n*-propanol et d'eau pour réaliser la réaction de Vasella¹³³ mais le substrat **HBO-I-OAc** s'est avéré insoluble dans le *n*-propanol, ne permettant pas l'usage de ce solvant vert. Bien que le THF soit souvent remplacé par le méthyl-tétrahydrofurane, le cyclopentylméthyl éther a été sélectionné comme alternative au THF. Cet éther biosourcé a la particularité de ne générer que très peu de peroxydes.¹³⁴ Cet avantage est indéniable en termes de sécurité notamment pour une utilisation à grande échelle. La réaction générant un acide carboxylique, il est nécessaire de rincer la Célite® à l'eau et à l'acétate d'éthyle après filtration du zinc. La phase aqueuse est acidifiée (pH=1-2) afin de permettre l'extraction du produit en phase organique. En employant 1,5 équivalents de zinc fraîchement activé pour une solution de **HBO-I-OAc** à 1 mol.L⁻¹ dans le mélange CPME/H₂O (8/2), le produit désiré est récupéré avec 81% de rendement. Là encore aucune purification n'est nécessaire au vue des spectres RMN. Un essai en doublant la concentration pour atteindre 1 mol.L⁻¹ a conduit à 86% de rendement prouvant qu'il était possible de réaliser la réaction de Bernet-Vasella en milieu concentré. Au final, le volume réactionnel a été divisé par 2 et la quantité de zinc par 6,7.

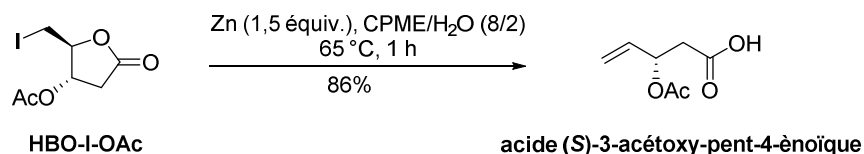


Schéma 26 : Réaction de Bernet-Vasella à partir de HBO-I-OAc

L'étape d'iodation pouvant être réalisée dans une grande variété de solvants¹³⁵⁻¹³⁸ et ne nécessitant pas de purification, un essai « 2 steps 1 pot » est tenté pour coupler l'iodation et la réaction de Bernet-Vasella (Schéma 27). Le **HBO-Ts-OAc** est dissous dans le CPME et l'iodure de sodium est ajouté. Après une nuit à 65 °C, l'eau et le zinc sont introduits puis 1 h plus tard la réaction est stoppée. Cette méthode s'est avérée efficace (88%) et a permis de supprimer une étape de traitement et l'usage de l'acétone.

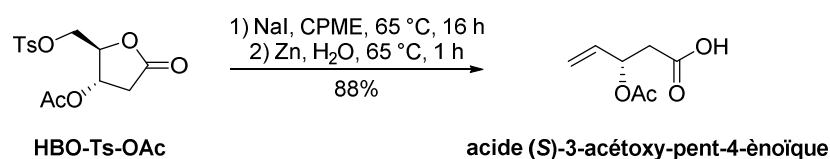


Schéma 27 : Synthèse de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque "2 steps-1 pot" à partir de HBO-Ts-OAc

Réaction de métathèse croisée

Le catalyseur de Grubbs de seconde génération (GII) est connu pour sa bonne stabilité face à de nombreux groupes fonctionnels. Il a déjà été employé en présence d'un acide carboxylique libre pour réaliser la métathèse croisée d'acides gras avec de bons résultats.^{139,140} Le protocole de Menhour *et al.* est donc employé sur l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque (Schéma 28). Toutefois l'éther diéthylique est remplacé par le CPME. La conversion du produit de départ est observée par chromatographie sur couche mince. Le brut de réaction est engagé, après filtration sur un pad de sulfate de magnésium et de sable, dans l'étape d'hydrogénation. Cette dernière a été modifiée afin de remplacer l'oxyde de platine par du palladium supporté sur charbon actif (Pd/C). En effet, ce dernier est bien moins coûteux (8,5 €/g vs 98 €/g). L'hydrogénation n'ayant pas été totale en présence de Pd/C dans l'acétate d'éthyle, un solvant protique a été testé. L'éthanol a permis la réduction totale des doubles liaisons. Ainsi l'usage de l'oxyde de platine a pu être évité tout en restant dans un solvant vert. Le produit désiré est isolé par chromatographie flash sur gel de silice avec un rendement médiocre (20%).

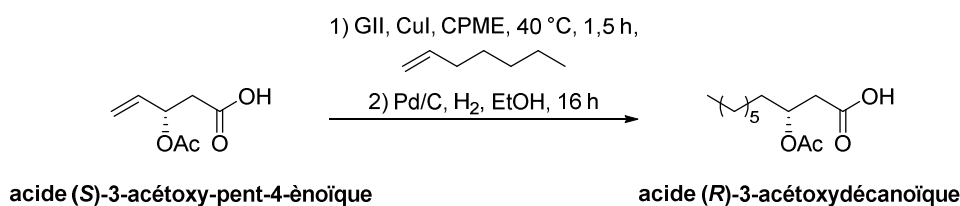


Schéma 28 : Synthèse de l'acide (R)-3-acétoxydécanoïque

Récemment, un nouveau catalyseur a été développé par l'équipe du Pr. Hoveyda pour réaliser des métathèses en présence d'acide carboxylique.¹⁴¹ Celui-ci permet une nette augmentation de rendement dans le cas d'acides α,β -insaturés. Il pourrait être une alternative au catalyseur GII. Une autre alternative peut être l'estérification de l'acide par l'éthanol pour obtenir des esters éthyliques. Ces derniers pourraient être engagés dans une réaction de transestérification pour générer les bichaînes lipidiques de rhamnolipides.

Comparaison avec l'état de l'art

Les calculs de l'Ecoscale et de l'intensité en masse du procédé (PMI) permettent de mieux appréhender la qualité environnementale d'une réaction. Comme décrit précédemment, ces indicateurs sont relativement simples à calculer et donnent une tendance sans aller dans le détail que pourrait apporter une analyse de cycle de vie. Dans le tableau ci-dessous, les valeurs de l'Ecoscale et du PMI ont été calculées pour chaque étape et pour les trois procédures, les deux références de la littérature et la synthèse développée ci-dessus (Tableau 11). Enfin l'avant-dernière ligne correspond à la valeur moyenne des deux indicateurs pour chaque procédure et la dernière ligne au rendement global de la réaction.

Comme précédemment, toutes les réactions en milieux dilués dans des solvants organiques souffrent d'un PMI élevé. Les efforts portés sur les réactions en milieux aqueux, la réduction des volumes réactionnels ainsi que des volumes de solvants utilisés dans les traitements permettent à la procédure à base de **LGO** d'afficher un PMI globalement faible malgré une dernière étape consommatrice de solvant. Cette dernière étape de métathèse reste problématique, notamment en terme de coût et de rendement ce qui fait largement chuter l'Ecoscale (Tableau 11 étape 5). Nous remarquons qu'il est toutefois moins mauvais que celui de la procédure de Menhour *et al.* pour cette même étape de métathèse principalement du fait du remplacement de l'éther diéthylique qui cumule les mauvais points au niveau de la sécurité (Tableau 11 étape 3).

Tableau 11 : Comparaison des Ecoscales et PMIs pour les différentes procédures étudiées

Etape	Bauer <i>et al.</i> 2006		Menhour <i>et al.</i> 2016		Procédure LGO	
	Ecoscale	PMI	Ecoscale	PMI	Ecoscale	PMI
1	32	15	-18	32	65	12.7
2	56	4	8	25	83.5	1.4
3	60	347	-7	77	60	13.4
4	38	116	76.5	1092	43	96
5	-	-	-	-	1	372
Moyenne	46.5	121	14.9	306.5	50.5	99.1
Rendement global	62%		28%		7,8%	

La procédure proposée par Bauer *et al.* atteint un très bon rendement global (62%), avec un Ecoscale moyen de 46,5 et 121 de PMI, elle est relativement propre mais perfectible. Le remplacement d'un solvant toxique tel que le méthanol fortement utilisé dans cette approche pourrait permettre d'améliorer l'Ecoscale. Cependant, il ne sera peut-être pas possible de substituer le chloroforme utilisé en très grande quantité pour l'extraction de l'hydroxy-acide gras avant sa protection par un groupement silylé. Ce souci correspond à la troisième étape de déprotection qui montre un PMI extrêmement élevé (347). *A contrario*, l'étape 4 de la procédure de Menhour *et al.* doit son PMI gigantesque à la très forte dilution de l'étape de déprotection réalisée sur des quantités très faibles. En augmentant l'échelle, une réduction de la quantité de solvant est facilement envisageable réduisant ainsi le PMI. En revanche, cette procédure est très mal notée en suivant la démarche Ecoscale. De trop nombreux produits toxiques sont utilisés. De plus, le rendement global est faible principalement du fait du dédoublement racémique. La procédure que nous proposons est globalement plus verte mais souffre d'être plus longue et d'une dernière étape qui demande à être optimisée. Ici le rendement global a été calculé à partir de la **LGO** brute fournie par Circa group alors que les autres procédures démarrent de produits commerciaux purs. Si nous prenons en compte les résultats d'hydratation obtenus par nos collègues sur de la **LGO** après purification de celle-ci (87%), le rendement global jusqu'à l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque est de 57%. Cela prouve que l'approche est efficace bien qu'il reste du travail pour optimiser la réaction de métathèse croisée.

Perspectives

Sur la synthèse en elle-même le passage de la **HBO-OH** à l'acide (*S*)-3-acétoxy-pent-4-énoïque reste perfectible. La métylation à la place de la tosylation pourrait être envisagée pour gagner en économie d'atomes. Un screening de solvants « verts » pourrait également intervenir pour diminuer au minimum l'usage de la pyridine. Evaluer l'impact d'une augmentation de la présence d'eau dans la réaction de Bernet-Vasella pourrait être intéressant pour diminuer l'usage de solvant. Le recyclage du zinc est aussi à envisager. Enfin comme évoqué précédemment, la métathèse croisée est peu efficace. L'utilisation d'un autre catalyseur au ruthénium serait à tester pour améliorer le rendement et éviter l'usage de l'iodure de cuivre.¹⁴¹ L'utilisation d'un catalyseur supporté pourrait permettre à la fois d'améliorer sa stabilité et de limiter les coûts en recyclant le catalyseur.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Les résultats obtenus sont toutefois encourageants, il serait donc intéressant d'élargir la bibliothèque de composés en proposant une autre protection sur l'alcool par addition de l'alcool benzylique sur la **LGO**.¹⁴⁵ L'addition d'autres alcools sur la **LGO** peut conduire à une bibliothèque d'analogues « éthers » des chaînes grasses de rhamnolipides dont les propriétés biologiques pourraient être testées.

Un autre point d'intérêt est la constitution d'une bi-chaîne lipidique par estérification enzymatique (Schéma 29).

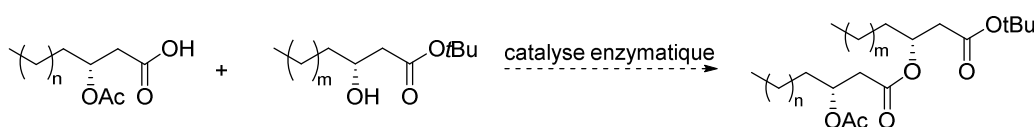


Schéma 29 : Couplage enzymatique de deux chaînes lipidiques

Enfin, la glycosylation de la chaîne lipidique avec le L-rhamnose peut être envisagée par HASPS¹²⁹ ou par voie enzymatique. Dans ce dernier cas, la méthode de traitement de la réaction devra faire l'objet d'une réflexion particulière pour éviter les problèmes rencontrés lors du downstream processing par voie biotechnologique.

Matériels et Méthodes

La (-)-lévoglucosénone a été fournie gracieusement par Circa group. Le phosphate de potassium tribasique, l'iodure de cuivre (I), la poudre de zinc, le CPME, le catalyseur de Grubbs II et le palladium sur charbon ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich. La triéthylamine, le 1-heptanol, le peroxyde d'hydrogène, la pyridine, l'iodure de sodium sont achetés auprès de Fischer. Les solvants et l'anhydride acétique ont été achetés auprès de VWR. Le 1-heptène, le chlorure de *p*-toluène sulfonyle ont été achetés auprès de TCI. Les bandelettes de test pour les peroxydes sont des Quantofix Peroxide 100 de Macherey-Nagel. Les solvants ont été séchés sur mBraun SPS 800 si nécessaire. Les solvants deutérés ont été achetés chez Euriso-top. Les évaporations ont été conduites sous pression réduite à moins de 40 °C. Les purifications sur gel de silice ont été conduites sur un Puriflash XS, Interchim, équipé de colonnes pré-packées PF-30SI-HP (silice 30 µm). Les pouvoirs rotatoires spécifiques ont été déterminés après mesure de la déviation optique sur un polarimètre ADP410, Bellingham and Stanley. Les analyses RMN ont été réalisées sur un Fourier 300 de chez Bruker. Les spectres ¹H sont enregistrés à 300 MHz calibrés

sur le pic de solvant résiduel ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm ; $\delta_{\text{DMSO-d}_6} = 2,50$ ppm). Les spectres ^{13}C sont enregistrés à 75 MHz dans le CDCl_3 et calibrés sur le pic de solvant résiduel ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,16$ ppm ; $\delta_{\text{DMSO-d}_6} = 39,5$ ppm).

Synthèse de l'hydrate de LGO, LGO-OH.

12,3 g de **LGO** brute sont dissous dans de l'eau (1,2 L) puis le phosphate de potassium tribasique est ajouté (1,8 g, 8,5 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 5 h puis neutralisé par addition de HCl (1M) et concentré. Le brut réactionnel est dilué dans l'acétone (300 mL), filtré et concentré. L'huile brune obtenue est purifiée par chromatographie flash sur gel de silice (60/40 à 30/70 cyclohexane/AcOEt). Le produit désiré est obtenu sous forme d'une huile jaune (7,3 g).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d₆, 300 MHz): $\delta = 5,40$ (d, $J=4,6$ Hz, 1H, H-7), 5,05 (s, 1H, H-6), 4,61-4,54 (m, 1H, H-3), 4,14-4,07 (m, 1H, H-5), 3,97 (dd, $J_1=7,8$ Hz, $J_2=1,2$ Hz, 1H, H-5), 3,75 (dd, $J_1=7,9$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, 1H, H-4), 2,90 (dd, $J_1=16,9$ Hz, $J_2=5,9$ Hz, 1H, H-2), 2,18-2,09 (m, 1H, H-2). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 201,2$ (C-1), 100,8 (C-6), 77,6 (C-4), 69,3 (C-3), 65,1 (C-5), 31,2 (C-2). $[\alpha]_{\text{D}}^{23,6} = -196^\circ$ (c 1,0, Ethanol) ; [reporté - 204° (c = 0,1, methanol)].¹⁴⁶

Synthèse de HBO-OH.

A 0 °C, 6,6 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% w/v (53,5 mmol, 1,1 équiv.) sont additionnés goutte à goutte sur 7,0 g de **LGO-OH** (48,6 mmol). Après que le bain de glace ait fondu (≈ 3 h), la réaction est chauffée à 45 °C durant 16 h. En fin de réaction, l'absence de H_2O_2 est vérifiée avant concentration du brut réactionnel. Si des restes de peroxyde sont détectés, une solution de thiosulfate de sodium à 2,5 mol.L⁻¹ est additionnée goutte à goutte jusqu'à neutralisation complète, puis le milieu est concentré, dilué dans l'acétone, filtré sur Célite® et concentré à nouveau. Le produit désiré est obtenu sous forme d'huile jaune pâle ne nécessitant pas de purification (6,2 g, 97%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d₆, 300 MHz): $\delta = 5,52$ (d, $J=4,0$ Hz, 1H, H-7), 5,10 (t, $J_1=5,4$ Hz, 1H, H-6), 4,33-4,20 (m, 2H, H-4 and H-3), 3,61-3,47 (m, 2H, H-5), 2,81 (dd, $J_1=6,3$ Hz, $J_2=17,7$ Hz, 1H, H-2), 2,22 (dd, $J_1=2,0$ Hz, $J_2=17,7$, 1H, H-2). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 176,7$ (C-1), 88,7 (C-4), 68,2 (C-3), 61,2 (C-5), 38,4 (C-2). $[\alpha]_{\text{D}}^{24,2} = -20^\circ$ (c 1,0, Ethanol).

Synthèse de HBO-Ts-OAc

HBO-OH (5,8 g, 44 mmol) est dissous dans la pyridine (30 mL) puis le chlorure de tosylo est additionné (10,5 g, 55 mmol, 1,25 équiv.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h, puis l'anhydride acétique est ajouté (10 mL, 176 mmol, 4 équiv). Le milieu réactionnel est de nouveau agité à température ambiante pendant 2 h, puis neutralisé avec une solution d'HCl à 1 mol.L⁻¹ (100 mL). Le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle deux fois (50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec HCl 1 mol.L⁻¹ (50 mL), NaCl_{sat} (50 mL), séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et concentrées. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une huile jaune (11,3 g, 78%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 300 MHz): $\delta = 7,76$ (d, $J=8,3$ Hz, 2H, H-9), 7,37 (d, $J=8,0$ Hz, 2H, H-10), 5,26 (dd, $J=9,0$ Hz, 1H, H-3), 4,60-4,55 (m, 1H, H-4), 4,39 (dd, $J_1=2,4$ Hz, $J_2=11,1$ Hz, 1H, H-5), 4,20 (dd, $J_1=2,6$ Hz, $J_2=11,1$ Hz, 1H, H-5), 2,99 (dd, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=18,8$ Hz, 1H, H-2), 2,57 (dd, $J_1=1,7$ Hz, $J_2=18,8$ Hz, 1H, H-2), 2,46 (s, 3H, H-12), 2,09 (s, 3H, H-7). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 173,4$ (C-1), 170,4 (C-6), 145,7 (C-11), 131,8 (C-8),

130,2 (C-10), 128,0 (C-9), 81,7 (C-4), 71,0 (C-3), 68,3 (C-5), 34,6 (C-2), 21,7 (C-12), 20,7 (C-7). $[\alpha]_D^{26,3} = +17^\circ$ (c 1,0, CH₂Cl₂) ; [reporté = +8,47° (c 6,26, CH₂Cl₂)].¹⁴⁷

Synthèse de l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque

HBO-Ts-OAc (7,42 g, 22,6 mmol) est dissous dans le CPME (18 mL) puis l'iodure de sodium est additionné (4,2 g, 28,3 mmol, 1,25 équiv.). Le milieu réactionnel est chauffé à 65 °C pendant 3 h puis l'eau (4,5 mL) et le zinc activé (2,2 g, 33,9 mmol, 1,5 équiv.) sont ajoutés. La réaction est poursuivie à 65 °C pendant 1 h. Le milieu réactionnel est dilué avec 50 mL d'eau, filtré sur Célite®. La Célite® est rincée à l'eau (20 mL), puis à l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase aqueuse est acidifiée à pH 1 avec quelques gouttes de HCl 12 N, puis extraite à l'acétate d'éthyle (2*30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Le produit désiré est récupéré sous forme d'une huile jaune ne nécessitant pas de purification.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 12,40 (s, 1H, H-8), 5,95-5,77 (m, 1H, H-4), 5,55-5,41 (m, 1H, H-3), 5,29-5,10 (m, 2H, H-5), 2,68-2,46 (m, 2H, H-2), 2,00 (s, 1H, H-7). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171,5 (C-1), 169,8 (C-6), 136,2 (C-4), 116,9 (C-5), 70,9 (C-3), 39,1 (C-2), 21,2 (C-7). $[\alpha]_D^{23,5} = -12^\circ$ (c 1,0, AcOEt).

Synthèse de l'acide (R)-3-acétoxydécanoïque

Sous azote, l'acide (S)-3-acétoxy-pent-4-énoïque (158 mg, 1 mmol) est dissous dans le CPME (10 mL), l'hept-1-ène (0,56 mL, 4 mmol, 4 équiv) est ajouté, puis l'iodure de cuivre (I) (13,3 mg, 0,07 mmol, 7 mol%) et le catalyseur de Grubbs II (41,7 mg, 0,05 mmol, 5 mol%) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à 40 °C pendant 1h30 puis filtré sur un pad de sable et de MgSO₄ anhydre et rincé à l'éthanol. Le milieu est concentré à sec, repris dans 10 mL d'éthanol, purgé à l'azote. Le palladium sur charbon (20 mg) est ajouté. Le milieu est de nouveau purgé à l'azote avant d'être placé sous flux d'hydrogène. Le lendemain, le milieu est filtré sur pad de Célite®, rincé à l'éthanol et concentré. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Cyclohexane / AcOEt : 90/10). Le produit désiré est obtenu sous forme d'une huile incolore (23 mg, 20%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 9,12 (s, 1H, H-13), 5,26-5,12 (m, 1H, H-3), 2,70-2,50 (m, 2H, H-2), 2,03 (s, 3H, H-12), 1,71-1,52 (m, 2H, H-4), 1,39-1,16 (m, 10H, H-5, H-6, H-7, H-8 et H-9), 0,86 (t, $J_1=6,0$ Hz, $J_2=12,0$ Hz 3H, H-10). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 176,5 (C-1), 170,6(C-11), 70,3(C-3), 38,9 (C-2), 33,9 - 31,7 - 29,3 - 29,1 - 25,1 - 22,6 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8 et C-9), 21,1 (C-12), 14,1 (C-10). $[\alpha]_D^{24} = -2,5^\circ$ (c 0,01, AcOEt) ; [reporté -2,8 ° (c = 0,9, CHCl₃)].

Conclusion et Perspectives

La lévoglucosénone est une vraie plateforme de jeux pour le chimiste organicien. Ses nombreuses fonctionnalités donnent matière à de nombreuses réactions chimiques (addition de Michael, cycloaddition, oxydation de Baeyer-Villiger, réduction de la cétone, etc). De plus, sa chiralité oriente la sélectivité de certaines de ces réactions. Comme nous l'avons vu cette molécule est extrêmement versatile et peut donner naissance à d'autres synthons organiques eux-mêmes chiraux, comme la **HBO**.

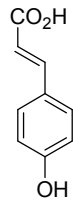
Bien que sa production ait atteint l'échelle industrielle, son usage reste limité et essentiellement orienté vers la production de son produit d'hydrogénation, le Cyrène® utilisé comme solvant. Le développement de molécules existantes et à forte valeur ajoutée (telle que la dairy lactone), à partir de la **LGO** pourrait permettre de diversifier ses débouchés.

La **LGO** offre aussi une matière première biosourcée aux chimistes en quête d'amélioration des voies de synthèse dans le respect des principes de la chimie verte. L'exemple de la synthèse d'une chaîne grasse de rhamnolipides à partir de **LGO** montre la pertinence de cette approche.

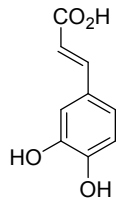
En ne prenant en considération que l'amélioration de synthèses organiques existantes à partir des synthons que sont la **LGO**, la **HBO**, la **2H-HBO** et les époxydes chiraux, le travail qui reste à réaliser est déjà énorme. Les perspectives deviennent infinies en y ajoutant la synthèse de molécules existantes potentiellement dérivables de ces synthons et tout le champ des molécules nouvelles qui peuvent être obtenues à partir de la **LGO**.

Des partenariats solides avec les acteurs de la bioéconomie et la pluridisciplinarité permettant un autre regard tant au point de vue scientifique que technique, sont des atouts pour le chimiste afin de choisir les voies à explorer devant l'immensité des possibles.

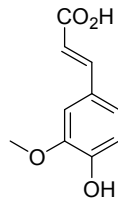
Liste des molécules principales du Chapitre 2



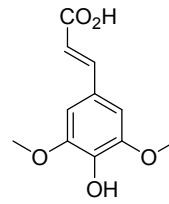
acide coumarique



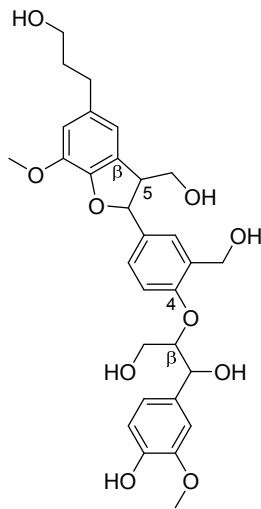
acide cafféique



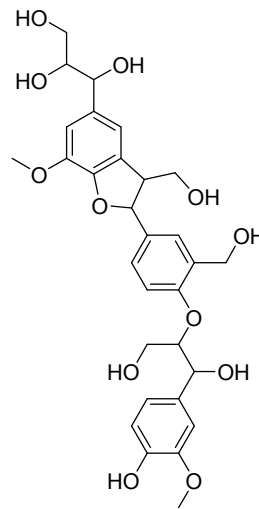
acide férulique



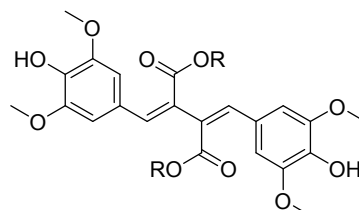
acide sinapique



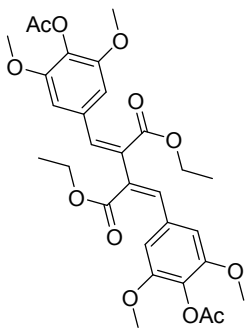
(β -5)/(β -O-4)-Dihydrotrimère de **G**
1



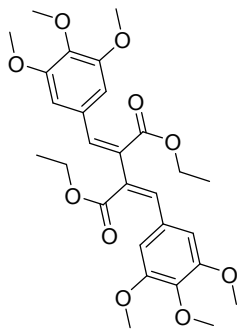
(β -5)/(β -O-4)-Dihydroxytrimère de **G**
2



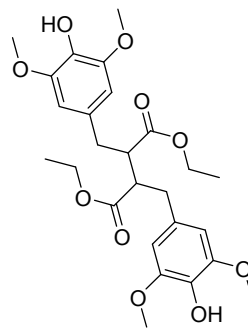
Structure générale des dimères β - β d'esters sinapiques



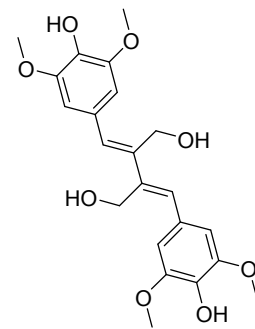
30



31



32



33

Chapitre 2 Les acides *para*-hydroxycinnamiques : entre études fondamentales et applications

Introduction

Les acides *para*-hydroxycinnamiques représentent une famille de composés phénoliques possédant des propriétés multiples qui leur ouvrent un large champ applicatif (Figure 23). En plus d'être anti-radicalaires,¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ propriété liée à la présence de la fonction phénol, ils sont également antibactériens.¹⁵¹ L'acide sinapique est aussi décrit comme possédant des propriétés anticancéreuse, anti-inflammatoire et anxiolytique.¹⁵² L'acide férulique est quant à lui présenté comme un conservateur pour l'industrie agroalimentaire¹⁵³ ou comme un agent blanchissant pour la cosmétique.¹⁵⁴ De plus, des études lui attribuent, ainsi qu'à l'acide caféique, des propriétés anticancéreuses.¹⁵⁵ L'acide coumarique et l'acide férulique sont également étudiés en tant que neuro-protecteurs potentiels.^{154,156}

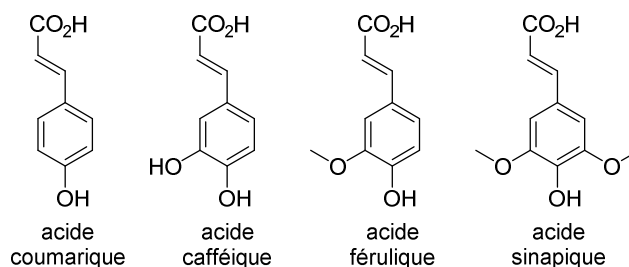


Figure 22 : Structures des principaux acides *para*-hydroxycinnamiques

La voie de biosynthèse des acides *para*-hydroxycinnamiques est décrite dans le schéma 30.¹⁵⁷ Une cascade enzymatique partant de la phénylalanine permet la formation successive de l'acide *p*-coumarique (ou acide *p*-hydroxycinnamique) et de ses quatre dérivés, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide 5-hydroxy-férulique et l'acide sinapique qui diffèrent par leur degré d'hydroxylation et de méthylation. Ces cinq composés représentent l'ensemble des acides *para*-hydroxycinnamiques naturels nommés d'après le premier d'entre eux. Ils sont présents dans l'ensemble du monde végétal puisque ce sont des précurseurs de la voie de biosynthèse des lignines. L'acide 5-hydroxy-férulique n'est rencontré qu'en quantité infime dans les plantes, alors que les quatre autres acides *para*-hydroxycinnamiques se trouvent en quantités non négligeables dans certaines plantes de grandes cultures telles que le maïs, le blé, le riz, le colza, le café ou la moutarde (Tableau 12). Il est à noter également que la majeure partie de ces composés se retrouve dans la fraction non alimentaire (tourteau, son...).

Tableau 12 : Exemples de grandes cultures représentant des sources importantes d'acides *para*-hydroxycinnamiques¹⁵⁸

Source	Production mondiale (kt) en 2017	Nature et quantité du co-produit	Acide <i>p</i> -hydroxycinnamique majoritaire
Maïs	1 134 747	Drêches (9 286kt, 0.8%)	Acide férulique
Riz	769 657	Son (9 155 kt, 1.2%)	Acide férulique
Blé	771 718	Son (9 895 kt, 1.3%)	Acide férulique / Acide coumarique
Colza	76 238	Tourteau (50%)	Acide sinapique
Tournesol	47 863	Tourteau (50%)	Acide caféïque
Café	9 212	Moud	Acide caféïque
Moutarde	564	Tourteau (50%)	Acide sinapique

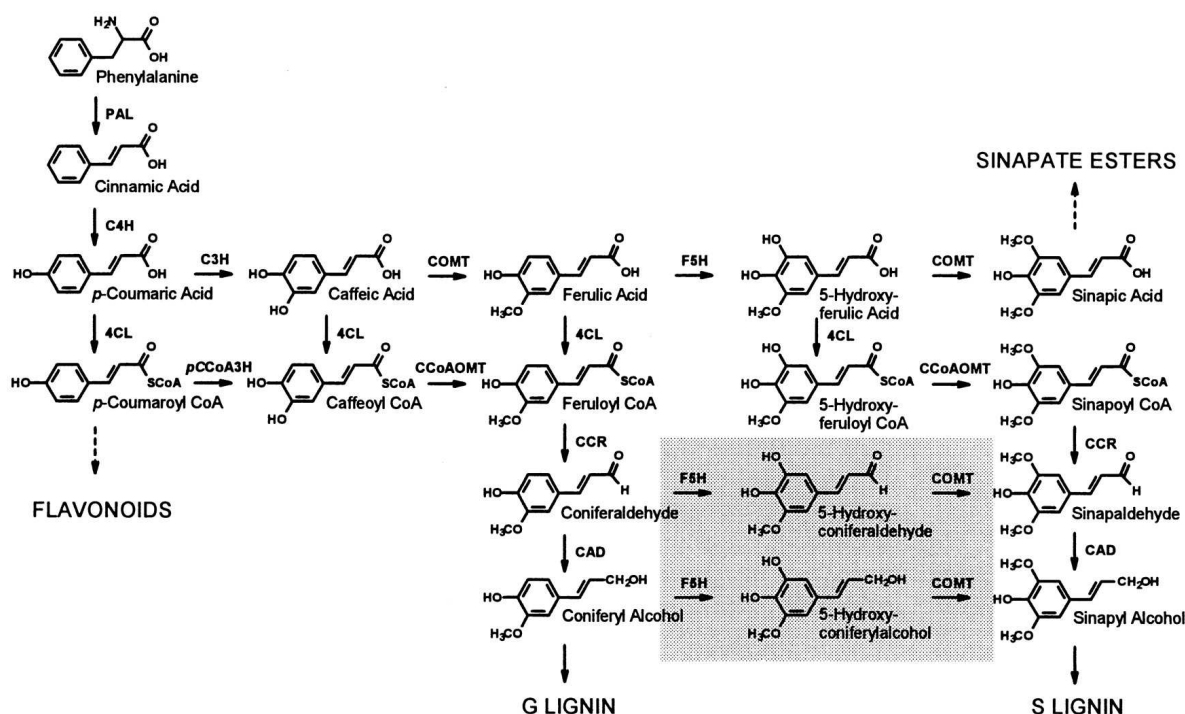


Schéma 30 : Voie de biosynthèse des acides *para*-hydroxycinnamiques d'après Humphreys et al.¹⁵⁷

Le concept de bioraffinerie étant de valoriser l'ensemble de la ressource agricole, ces déchets de la première transformation agroindustrielle deviennent, de fait, des coproduits à exploiter. L'utilisation actuelle de ces résidus est souvent à faible valeur ajoutée (alimentation animale, méthanisation...). L'extraction de molécules à forte valeur ajoutée, tels que les acides *para*-hydroxycinnamiques, pourrait permettre non seulement d'augmenter mais aussi de diversifier le nombre de produits biosourcés et également d'apporter de nouvelles ressources économiques à l'agriculture. Du point de vue de la durabilité, il est important qu'une fois l'extraction terminée, le résidu ultime puisse encore être exploité pour produire du compost ou de l'énergie par exemple.

Pour l'exploitation des acides *para*-hydroxycinnamiques, il faut toutefois noter qu'ils existent majoritairement sous leurs formes estérifiées dans la matrice végétale, que ce soit en tant que petites molécules indépendantes (acide chlorogénique, sinapine) ou en lien avec la structure de la paroi végétale, ce qui est majoritairement le cas pour les acides férulique et coumarique (Figure 24). Dans le premier cas, les petites molécules peuvent être extraites de la matrice végétale puis saponifiées, alors que dans le second cas l'ensemble de la matière devra subir une hydrolyse afin de libérer les molécules désirées.

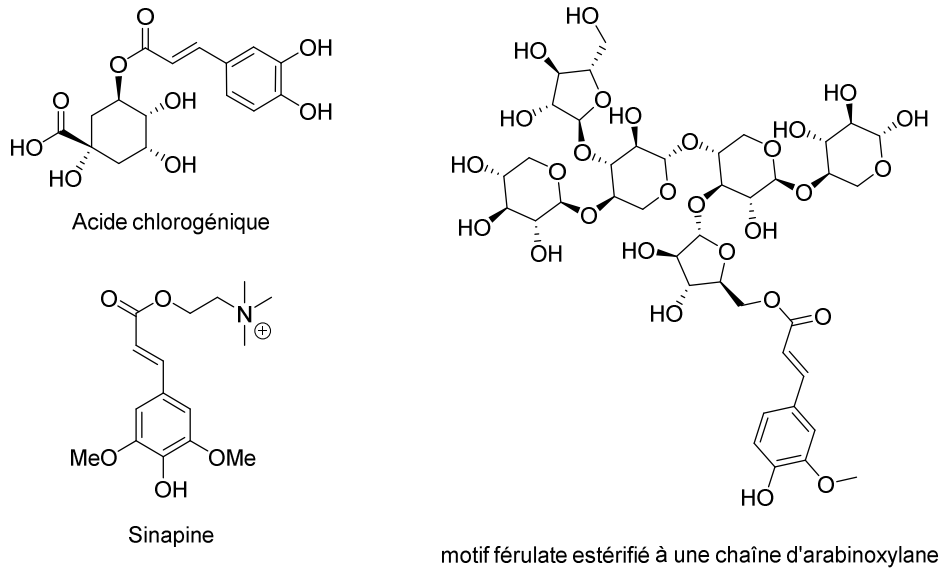


Figure 23 : Structure de l'acide chlorogénique et de la sinapine et représentation de l'acide férulique estérifié à une chaîne d'arabinoxylane (Buanafina 2009)¹⁵⁹

La récupération de l'acide férulique à partir de co-produits agricoles est développée à l'échelle industrielle. En effet, l'acide férulique biosourcé démontre une grande valeur car il peut être converti par des procédés biotechnologiques en vanilline,¹⁶⁰ cette molécule étant très recherchée dans les secteurs agroalimentaire et cosmétique. Cette pression positive du marché a permis la naissance de procédés industriels.

Le procédé le plus répandu se base sur l'hydrolyse alcaline de la biomasse. Par exemple, Rhodia a mis au point un procédé d'extraction alcaline couplée à une filtration membranaire afin de récupérer à la fois l'acide férulique mais également les sucres fermentescibles.¹⁶¹ Des alternatives émergent, telles que l'extraction par solvant pressurisé.^{162,163} Cette technique nécessite des volumes moins importants mais présente trois inconvénients majeurs (1) l'utilisation de solvant(s) organique(s); (2) la dangerosité inhérente à toute réaction effectuée sous pression; (3) la nécessité de réaliser une seconde hydrolyse dans le but de libérer l'acide férulique à partir des férulates d'éthyle ou de méthyle formés. Enfin, les approches paraissant les plus prometteuses sont les approches enzymatiques qui permettent de produire un acide férulique « naturel », cependant elles sont souvent freinées par leurs coûts.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Des efforts sont aussi orientés vers la récupération de l'acide férulique à partir des hydrolysats grâce à

différentes techniques : résines échangeuses d'ions couplées à l'électrodialyse,¹⁶⁵ utilisation de zéolites¹⁶⁷ ou procédés membranaires.^{161,168}

Comme nous l'avons décrit précédemment, les plantes de la famille des Brassicaceae (colza et moutarde par exemple) représentent des sources potentielles importantes d'acide sinapique (Tableau 12). L'entreprise Charbonneau-Brabant, implantée à Reims et productrice des moutardes Clovis, est entrée en contact avec l'URD ABI dans le but de valoriser des résidus issus de leur production de pâte de moutarde. Une première qualification de la matière première et une première étude portant sur l'extraction des composés phénoliques présents dans ces sons ont été menées et ont donné lieu à une publication :

- **Eco-Friendly extraction of sinapine from residues of mustard production.** Amandine L. Flourat, Gaëlle Willig, Andreia R. S. Teixeira et Florent Allais *Frontiers in sustainable food systems* **2019**, *3*, Article 12, DOI: 10.3389/fsufs.2019.00012.

Ces premiers résultats étant prometteurs, une thèse en co-tutelle avec le centre technique Extractis a débuté en février 2019, menée par Valentin Reungoat. Cette thèse, intitulée « Développement d'un procédé durable et industrialisable intégrant des techniques d'extraction et de purification pour l'obtention de l'acide sinapique à partir de co-produits agro-industriels », porte sur la récupération de la sinapine contenue dans le tourteau de colza et dans le son de moutarde suivie de son hydrolyse, afin d'obtenir l'acide sinapique qui devra être purifié à l'aide de techniques membranaires. Les premiers résultats sur la partie extraction ont fait l'objet d'une publication.

- **Optimization of an ethanol/water-based sinapine extraction from mustard bran using response surface methodology.** Valentin Reungoat, Morvan Gaudin, Amandine L. Flourat, Emilie Isidore, Louis M. M. Mouterde, Florent Allais, Hélène Ducatel et Irina Ioannou *Food and Bioproducts Processing* **2020**, *122*, 322-331, DOI: 10.1016/j.fbp.2020.06.001

Une autre source possible d'approvisionnement en acide *para*-hydroxycinnamique réside dans leur biosynthèse par des organismes modifiés en partant de sucres fermentescibles.¹⁶⁹ Cette approche est mise en œuvre au sein de l'URD ABI en collaboration avec la start-up Abolis. Cette dernière élabore les voies métaboliques dans les organismes hôtes, et l'URD ABI, au travers de la thèse de Jeanne Combes, optimise les fermentations pour améliorer la productivité des souches.

Enfin, il est possible de synthétiser les acides *para*-hydroxycinnamiques par chimie verte à partir de l'aldéhyde correspondant.¹⁷⁰⁻¹⁷² Cependant, ces derniers sont onéreux et rarement biosourcés. Cette voie ne permet donc pas pour l'instant d'envisager un développement à l'échelle industrielle.

Dans une revue, nous avons présenté l'état de l'art ainsi que les avantages et inconvénients des différents modes de production/récupération des acides *para*-hydroxycinnamiques :

- ***para*-Hydroxycinnamic acids: chemical synthesis, biomass recovery or engineered microbial production ?** Amandine L. Flourat, Jeanne Combes, Claire Bailly-Maitre-Grand, Kevin Magnien, Arnaud Haudrechy, Jean-Hugues Renault et Florent Allais, soumis à *ChemSusChem*.

Une fois les sources d'approvisionnement possible en acides *para*-hydroxycinnamiques cités, il faut ajouter que de façon générale, l'accès à des molécules aromatiques non pétrosourcées revêt un intérêt majeur en raison du grand nombre d'applications des composés aromatiques. Sachant que la ressource naturelle la plus importante pour ce type de molécule est la lignine, et que celle-ci est malheureusement peu exploitée du fait de sa grande complexité, nous avons sélectionné les acides *para*-hydrocinnamiques pour élaborer des modèles permettant de mieux étudier et comprendre cette ressource. Il est également à noter que les lignines, en plus d'être une source potentielle de monomères, peuvent également fournir des oligomères chiraux, les lignanes. Ces molécules présentent des activités biologiques et thérapeutiques d'intérêt.¹⁷³⁻¹⁷⁵

L'acide férulique : une porte vers la compréhension des lignines

Comme nous venons de l'évoquer, les lignines de par leur caractère tridimensionnel impliquant diverses liaisons (β -O-4, β -5, β - β , 5-5, α -O-4...) entre trois unités constitutives (H, G, S) sont difficiles à dépolymériser pour obtenir des composés monomériques (Figure 25). Bien que des applications se développent de plus en plus pour l'utilisation des lignines, notamment issues des procédés papetiers, ces travaux restent marginaux comparativement au potentiel d'utilisation des noyaux aromatiques (une fois la lignine dépolymérisée). Afin de réussir ce défi, les chercheurs utilisent des modèles structuraux pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans la lignification, ainsi que pour appréhender des systèmes susceptibles de conduire à une dépolymérisation efficace, notamment en limitant les phénomènes de recondensation.

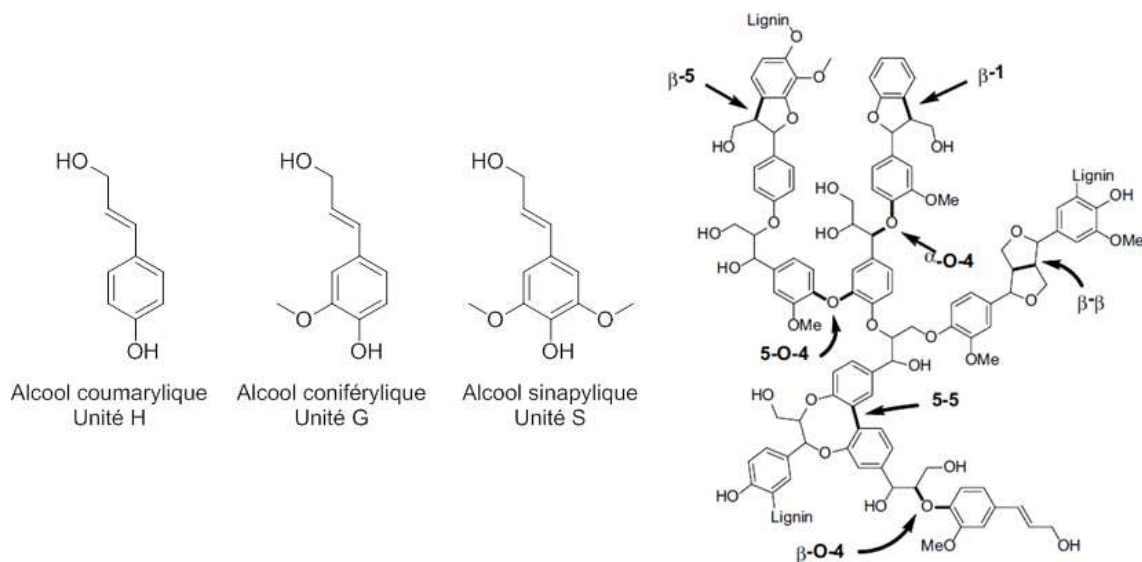


Figure 24 : Monomères constitutifs des lignines ou monolignols précurseurs des unités H, G et S (à gauche) et structure fictive de lignines faisant apparaître les différentes liaisons possibles¹⁷⁶

Le premier exemple de modèle de lignine synthétique remonte aux années 50.¹⁷⁷ De nombreuses études récentes utilisent des modèles de lignines pour explorer des systèmes capables de l'oxyder.¹⁷⁸⁻¹⁸⁴ Cependant, ces modèles se focalisent souvent uniquement sur les liaisons labiles de la lignine, à savoir les liaisons de type éthers (β -O-4, α -O-4, 5-O-4), négligeant les liaisons condensées bien plus récalcitrantes à la dépolymérisation. Lorsque celles-ci sont abordées, le système est souvent simplifié à l'extrême, comme le montrent les molécules faisant l'objet de la revue proposée en 2019 par Oregui-Bengoechea *et al.* (Figure 26).¹⁷⁶ Il est à noter que même si les modèles pour la liaison β -O-4 sont un peu plus développés, la chaîne propanoyl reste souvent absente de ces études. Dans le cas du modèle développé par Forsythe *et al.*¹⁸⁵ permettant d'obtenir des oligomères contrôlés contenant des liaisons de type β -O-4, β -5 et 5-5, la chaîne latérale est présente mais non fonctionnalisée. Les effets stériques ou électroniques qu'elle apporte sont donc par conséquent négligés.

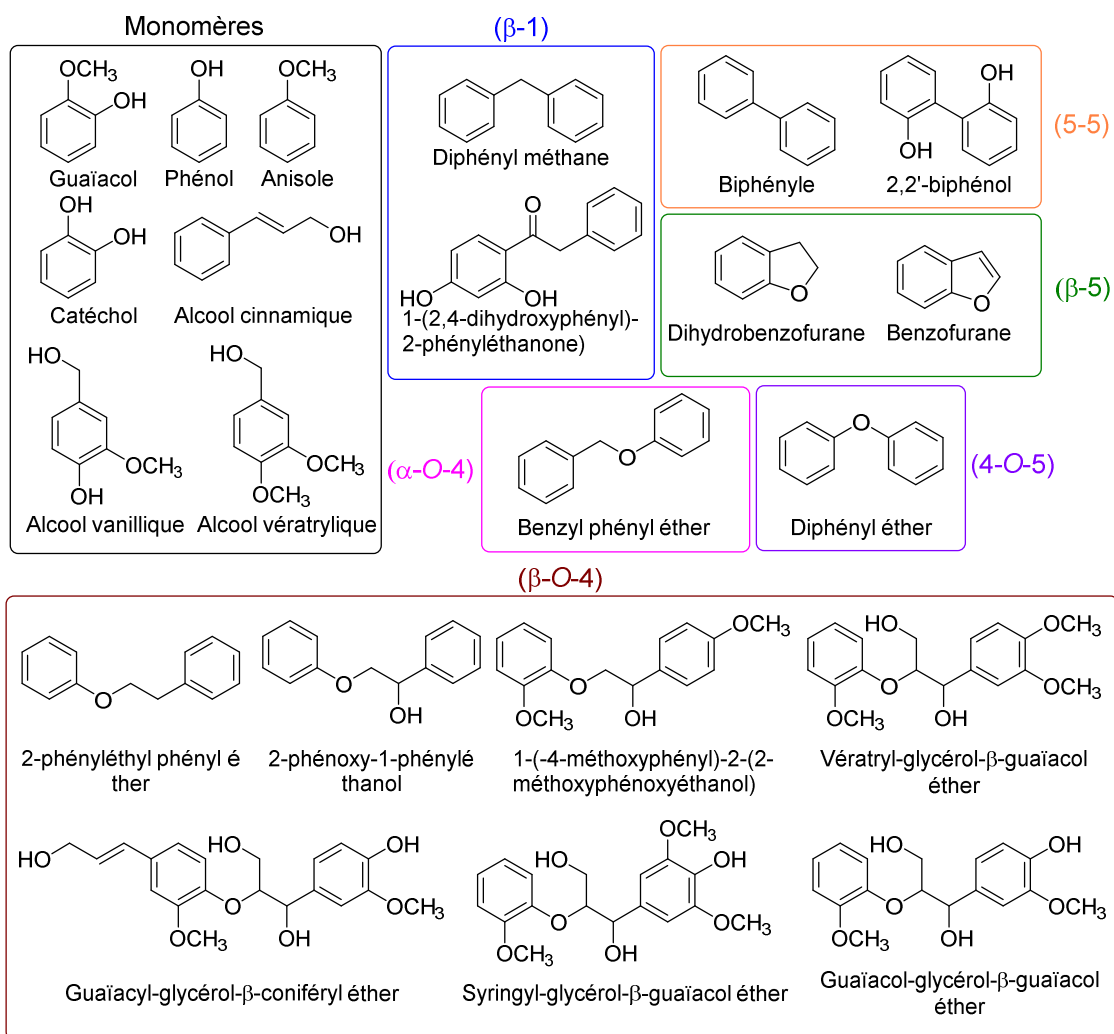
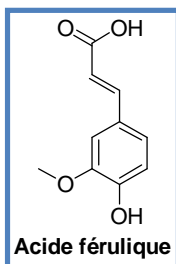


Figure 25 : Molécules modèles faisant l'objet de la revue proposée par Oregui-Bengoechea *et al.*¹⁷⁶

Nous avons développé une méthodologie de synthèse pour accéder à des trimères de lignine incluant à la fois une liaison labile β-O-4, une liaison condensée β-5 et une chaîne latérale plus ou moins fonctionnalisée.

Ces travaux ont donné lieu à une publication conjointe entre l'URD ABI et l'ICMR :

- **First total synthesis of (β-5)-(β-O-4) dihydroxytrimer and dihydrotrimer of coniferyl alcohol (G): advanced lignin model compounds.** Amandine L. Flourat, Aurélien A. M. Peru, Arnaud Haudrechy, Jean-Hugues Renault, Florent Allais *Frontiers in Chemistry* **2019**, 7, Article 842, _DOI: 10.3389/fchem.2019.00842



L'acide férulique (CAS n° 1135-24-6) est sélectionné comme précurseur pour la synthèse de l'alcool coniférylique ou monolignol **G**. Celui-ci a été choisi car il est le plus répandu naturellement. En effet, il est le constituant principal des lignines de conifères (>90%), comme l'indique son nom mais est aussi présent en grande quantité dans les lignines de feuillus (30 à 40%) et de graminées (35 à 50%). L'obtention du dihydrotrimère naturel (β-5)-(β-O-4) de **G**, **1**, ainsi que celle du composé dihydroxylé, **2** pourra permettre des comparaisons de réactivités de ces composés en fonction de la complexité de la chaîne latérale (Figure 27).

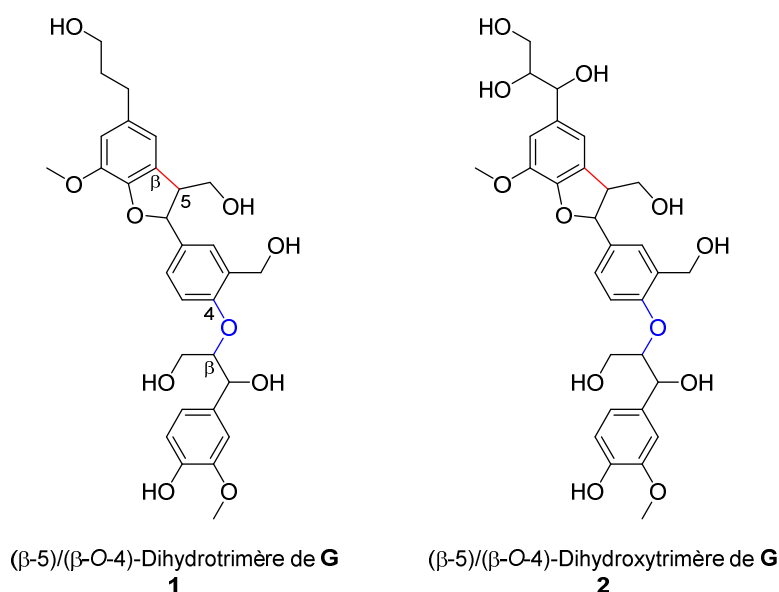


Figure 26 : Structure des composés cibles

Première stratégie de synthèse

Dans une première approche, nous pensons synthétiser les molécules cibles suivant une méthodologie proche de celle que nous avons appliquée lors de la synthèse du trimère (5-5)/(β-O-4) de l'acide férulique, à savoir :¹⁸⁶ (1) Former la liaison condensée par oxydation enzymatique avec une laccase puis (2) Former la liaison éther par « aldolisation » (Schéma 31).

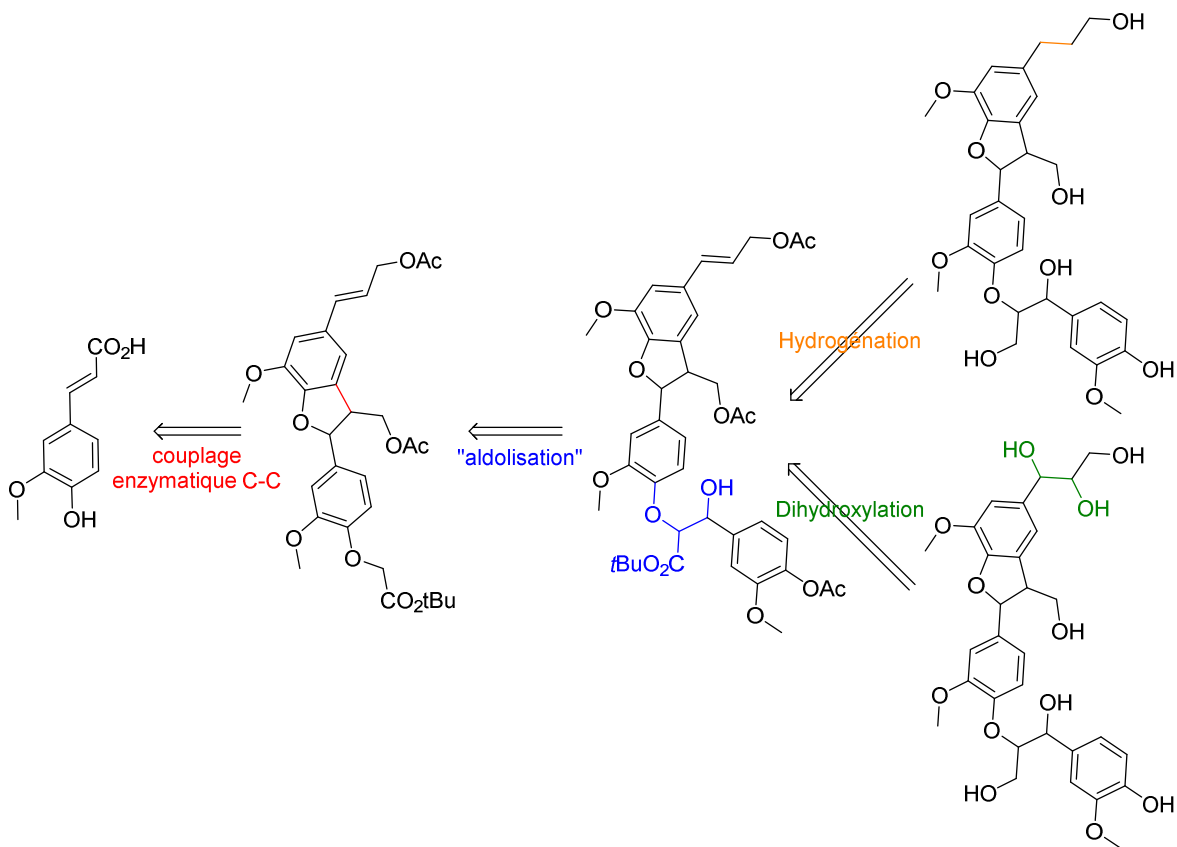


Schéma 31 : Voie de rétrosynthèse pour l'obtention du dihydrotrimère naturel (β-5)-(β-O-4) de monolignol G et du dihydroxytrimère -(β-5)-(β-O-4) de G par « aldolisation »

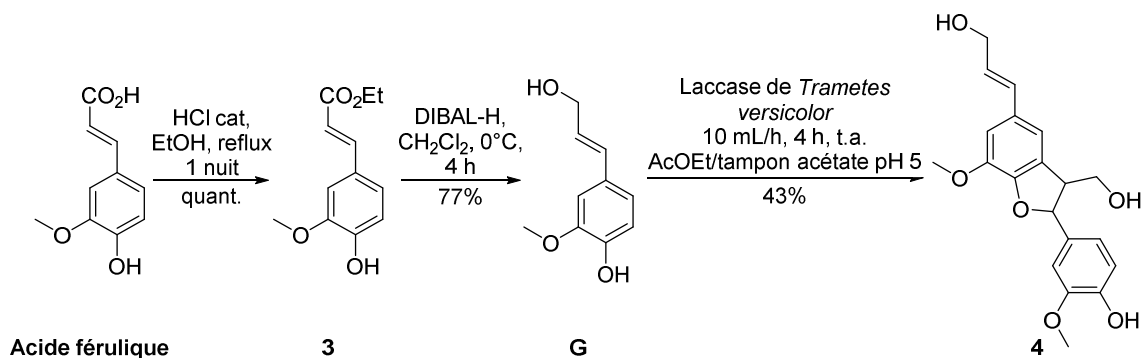


Schéma 32 : Synthèse du dimère (β-5) de G à partir de l'acide férulique

Dans une première étape, le monolignol **G** a été synthétisé par réduction du férulate d'éthyle **3**, à l'aide de l'hydruide de diisobutyl aluminium, DIBAL-H (Schéma 32).¹⁸⁷ Cette réaction, bien connue, a permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement global de 77% à l'issue des deux étapes. L'homocouplage sélectif β-5 a ensuite été réalisé en milieu biphasique (acétate d'éthyle/tampon acétate pH 5) par action de la laccase de *Trametes versicolor* à température ambiante pendant 4h (Schéma 32). Le dimère est séparé du monolignol restant et des oligomères formés par chromatographie sur gel de silice. L'addition lente de la solution de laccase dans le milieu réactionnel (10 mL/h) permet de réduire la formation de

ces oligomères en contrôlant la quantité de radicaux formés. Le dimère (β -5) de **G**, **4**, est isolé avec un rendement de 43%. Le spectre RMN est conforme aux données de la littérature.¹⁸⁸ La chromatographie sur couche mince sur silice montre la présence d'un second produit plus polaire que nous avons pu isoler lors de la chromatographie flash avec un éluant AcOEt:MeOH (95:5). Ce second produit représente 4% de la masse initiale. Après analyse RMN, le produit semble être un trimère de **G** (Figure 28, Tableau 13). En effet, l'apparition en RMN du proton de deux singulets dont l'un intègre pour le double de l'autre entre 3.7 et 3.8 ppm laisse à penser que trois groupements méthoxy sont portés par la molécule en question. De plus, le doublet de doublet présent à 5,29 ppm correspond à la liaison furanique (β -5) déjà observée pour le dimère **4**. Par couplage radicalaire, les trimères les plus probables sont (β -5)/(β -5), (β -5)/(β -O-4), (β -5)/(5-5) et (β -5)/(β - β). Ce dernier conduirait à l'absence de double liaison dans la molécule, or deux pics sont observés à 6,43 et 6,24 ppm. Au contraire, le trimère (β -5)/(5-5) devrait conduire à doubler les signaux de double liaison, ce qui ne semble pas être le cas bien que les intégrations ne soient pas probantes pour l'ensemble de la molécule par rapport à la théorie. De plus, le spectre carbone de la molécule est proche de la description réalisée par Landucci *et al.* du trimère (β -5)/(β -O-4) de **G** acétylé.¹⁸⁹ N'ayant pu déterminer avec une certitude absolue la configuration, nous comparerons les spectres de la molécule inconnue avec ceux de la molécule obtenue en fin de synthèse.

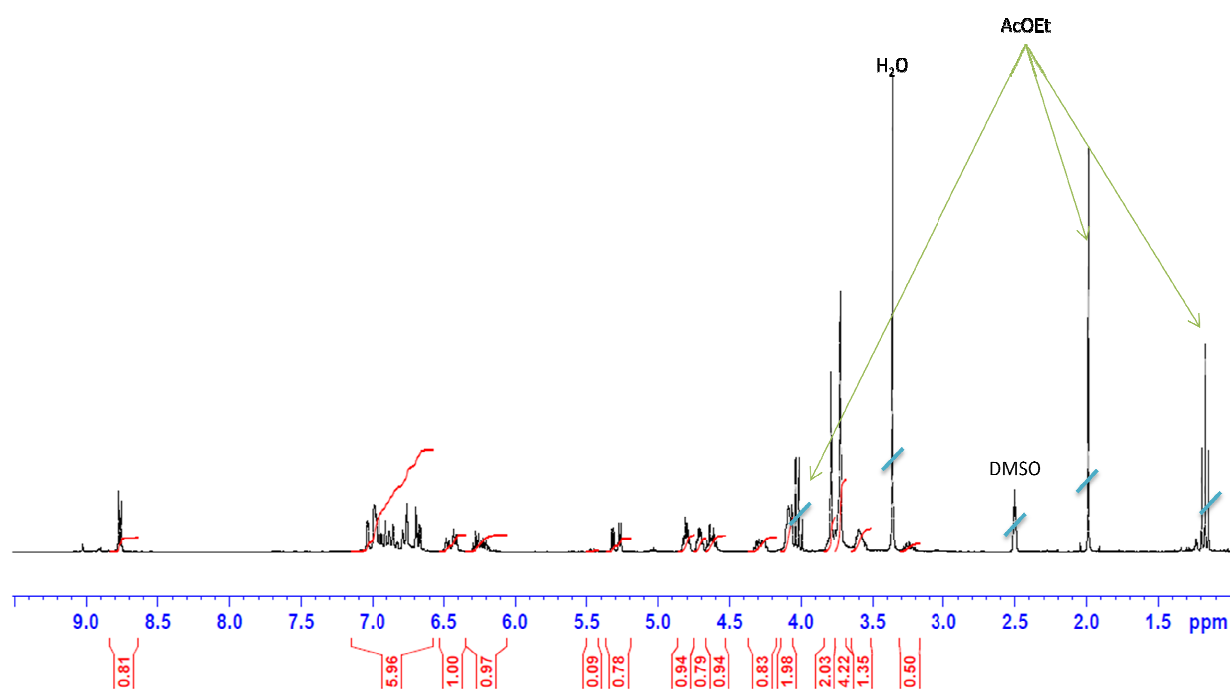
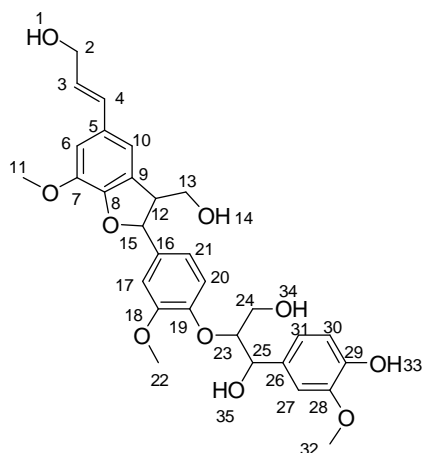


Figure 27 : Spectre ¹H-RMN du deuxième produit isolé

Tableau 13 : Tentatives d'attribution des signaux RMN ¹H et ¹³C pour le trimère supposé (β-5)/(β-O-4)



Attribution	δH (ppm)	δC (ppm)
1	4,81	#
2	4,09	60,1
3	6,34	128,6
4	6,45	130,2
5	#	131,5
6	6,85-6,90	109,8
7	#	147
8	#	147,6
9	#	119,5
10	6,85-6,88	111,4
11	3,79	55,7
12	3,73	55,4
13	4,09	61,7
14	4,62	#
15	5,29	83,8
16	#	133,2
17	6,90-7,05	109,8
18	#	149,7
19	#	147,8
20	6,65-6,70	114,7
21	6,65-6,70	114,6
22	3,73	55,5
23	4,28	84,3
24	3,59	59,8
25	4,71	71,0 & 71,6
26	#	133,0
27	6,80-6,90	111,0
28	#	149,7
29	#	145,5
30	6,75-6,79	119,1
31	6,75-6,79	115,5
32	3,73	55,6
33	8,76	#
34	4,61	#
35	4,64	#

La synthèse se poursuit par l'acétylation de l'ensemble des fonctions hydroxy du dimère, suivie par la déprotection sélective pour régénérer la fonction phénol. Ces deux étapes fournissent la molécule **5** avec un rendement de 92% en partant du dimère. Le phénolate, produit par action du carbonate de potassium, est ensuite alkylé par le 2-bromoacétate de *tert*-butyle dans le *N,N*-diméthylformamide en présence d'iodure de potassium avec un excellent rendement (97%). « L'aldolisation » a ensuite été réalisée dans le THF à -78 °C en présence de *N,N*-diisopropylamide de lithium (LDA), dans l'espoir d'une réaction avec la vanilline acétylée. Cependant la réaction n'a pas permis d'obtenir le produit désiré (Schéma 33a), notamment en raison d'une désacétylation des produits de départ. Une benzoylation du dimère après alkylation sélective de la position phénolique a été réalisée en utilisant du bromure de benzyle et de l'iodure de tétra-*n*-butylammonium (TBAI) dans le toluène avant une étape d'oxydation à l'oxyde d'argent, avec un rendement cependant modeste (36%). Le produit benzylé, **8**, a été engagé dans

« l'aldolisation » avec de la vanilline benzylée, le produit désiré étant alors formé avec seulement 21% de rendement (Schéma 33b). Face à ces difficultés, une nouvelle stratégie a été envisagée.

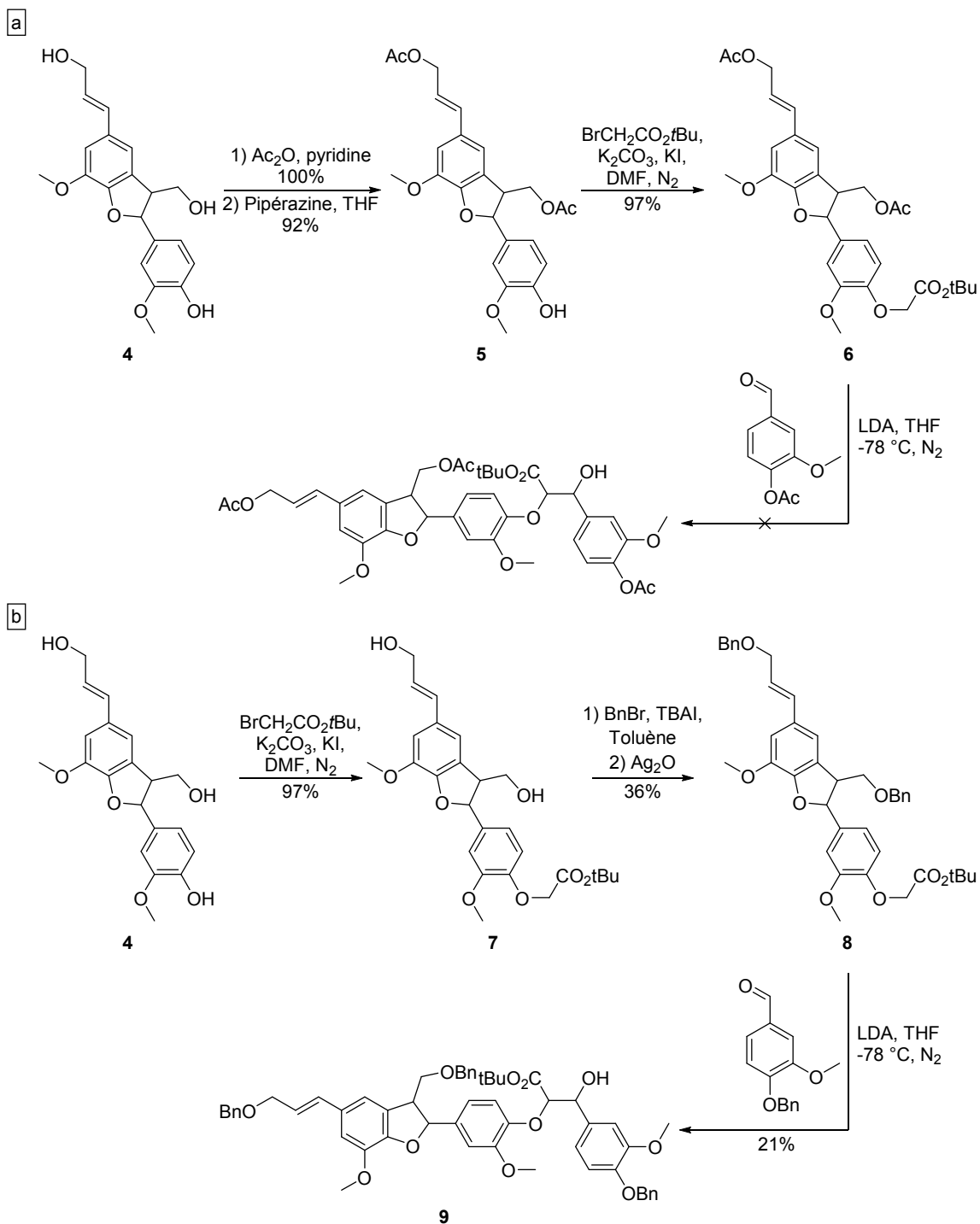


Schéma 33 : Formation du précurseur des trimères par « aldolisation »

Seconde stratégie de synthèse

Nous nous sommes alors orientés vers une synthèse convergente à partir de l'acétovanillone et toujours de l'acide férulique. L'acétovanillone est convertie en α -bromocétoester, **10**, tandis que l'acide férulique est soumis aux mêmes transformations décrites précédemment pour obtenir **5**. Par la suite, la liaison (β -O-4) est obtenue par substitution nucléophile entre le phénolate issu de **5** et l' α -bromocétoester. Les molécules cibles peuvent ensuite être obtenues soit *via* une dihydroxylation pour le dihydroxytrimère **2** ou par hydrogénation catalytique pour le dihydrotrimère **1** (Schéma 34).

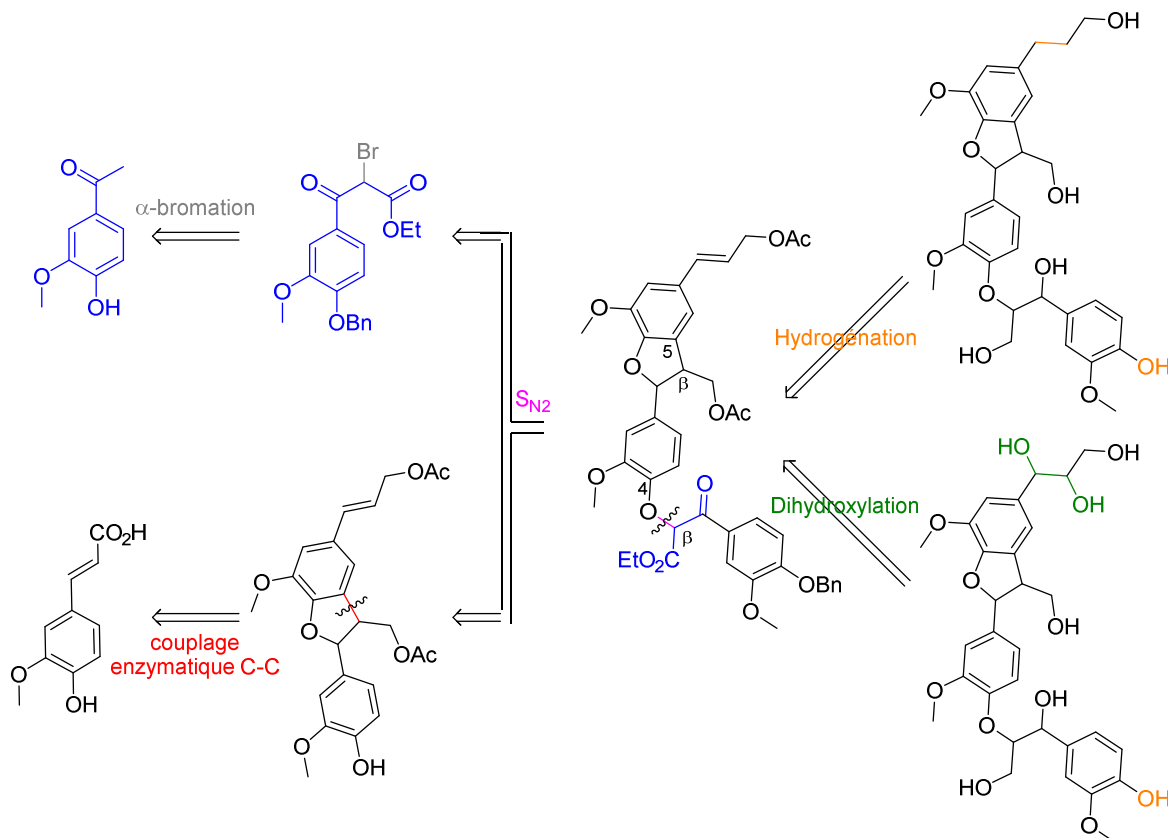


Schéma 34 : Voie de rétrosynthèse pour l'obtention du dihydrotrimère naturel (β -5)-(β -O-4) de monolignol G et du dihydroxytrimère (β -5)-(β -O-4) de G par substitution nucléophile

L' α -bromocétoester de guaiacol **10** est synthétisé à partir de l'acétovanillone suivant une méthodologie en trois étapes proposée par Forsythe *et al.*¹⁸⁵ Tout d'abord, une benzylation du phénol est effectuée avec du bromure de benzyle en présence d'iodure de potassium et de carbonate de potassium, le premier servant d'activateur par transhalogénéation et le second agissant comme base pour former le phénolate. La *O*-benzylacétovanillone **11** est récupérée après extraction avec un rendement quantitatif et mise à réagir avec du carbonate de diéthyle en présence d'hydrure de sodium. Le β -cétoester **12** est formé avec un rendement de 78% après purification. Enfin, la bromation est réalisée par action du *N*-bromosuccinimide (NBS) dans des conditions acides (Amberlite A15) dans l'acétate d'éthyle donnant ainsi le produit désiré **10** (79% de rendement, 62% de rendement global à partir de l'acétovanillone) (Schéma 35).

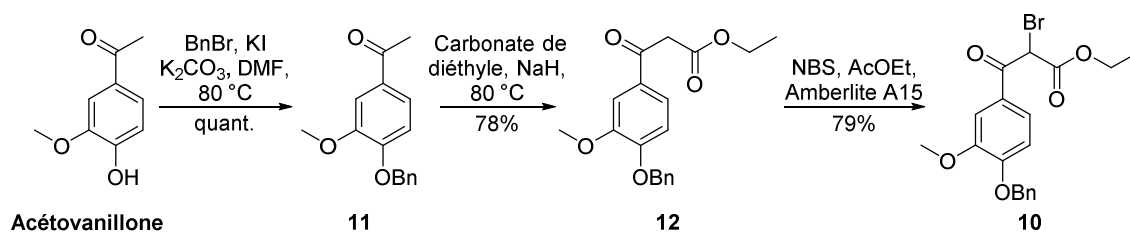


Schéma 35 : Synthèse du bromocétyle 10 à partir de l'acétovanillone

Disposant dorénavant des deux précurseurs, la synthèse du trimère **13** par S_N2 est tentée en présence de carbonate de potassium dans le DMF. Nous avons privilégié le DMF par rapport à l'acétone utilisée par Forsythe *et al.*¹⁸⁵ car les travaux de Kishimoto *et al.*¹⁹⁰ rapportent un bien meilleur rendement dans ce solvant (97% dans le DMF vs 49% dans l'acétone). L'action de déprotonation du phénol par le carbonate de potassium s'est avérée bien visible grâce à la coloration jaune du milieu due à la formation du phénolate. Après quelques heures d'agitation à température ambiante, le produit désiré est obtenu après chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) avec un très bon rendement (83%) (Schéma 36). Nous allons donc pouvoir poursuivre la synthèse afin d'obtenir les deux trimères cibles.

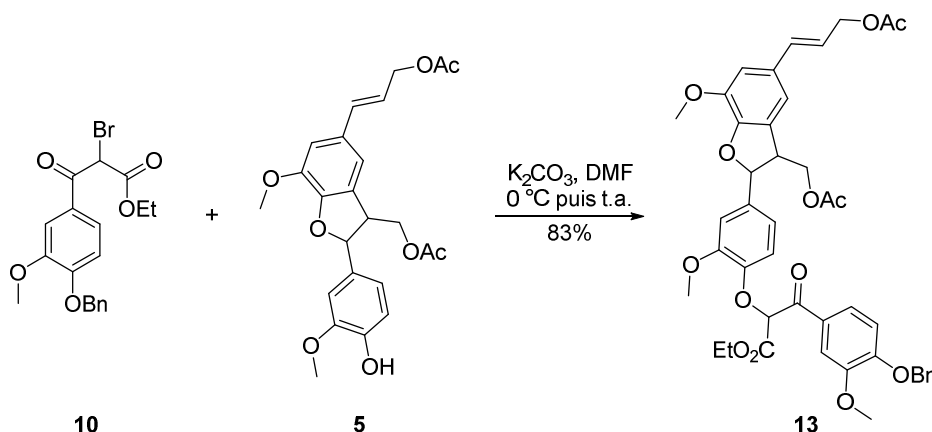


Schéma 36 : Synthèse du trimère 13 à partir de 10 et de 5

Le dihydrotrimère naturel **1** est synthétisé en deux étapes à partir de **13**. Les fonctions CO (esters et cétone) sont réduites sous l'action du tétrahydroborate de sodium suivant la procédure décrite par Pathil *et al.*¹⁹¹ L'efficacité de la réaction est confirmée par la disparition, en RMN du proton, des signaux des acétates entre 1,5 et 2,5 ppm ainsi que ceux de l'ester éthylique à 4,21 et 1,21 ppm et, en RMN du carbone, du pic de la cétone à 190,0 ppm. Le tétraol **14** est ensuite dihydrogéné. Une première hydrogénation dans l'éthanol a permis de réduire la double liaison C=C mais pas de cliver le groupement benzyle protégeant le phénol. Il a été nécessaire de réaliser l'hydrogénation dans un solvant plus polaire et plus acide (MeOH/AcOH 95/5) afin d'observer les deux réactions simultanément (Schéma 37). Cependant, il n'a pas été possible d'obtenir une analyse par masse haute résolution de l'ion moléculaire pour cette molécule, du fait de sa dégradation pendant le procédé. Cependant le spectre RMN montre clairement la disparition des signaux attribués au groupement benzyle et à la double liaison. Le

rendement global de la synthèse de ce composé à partir de l'acide férulique est de 20% après 8 étapes de synthèse.

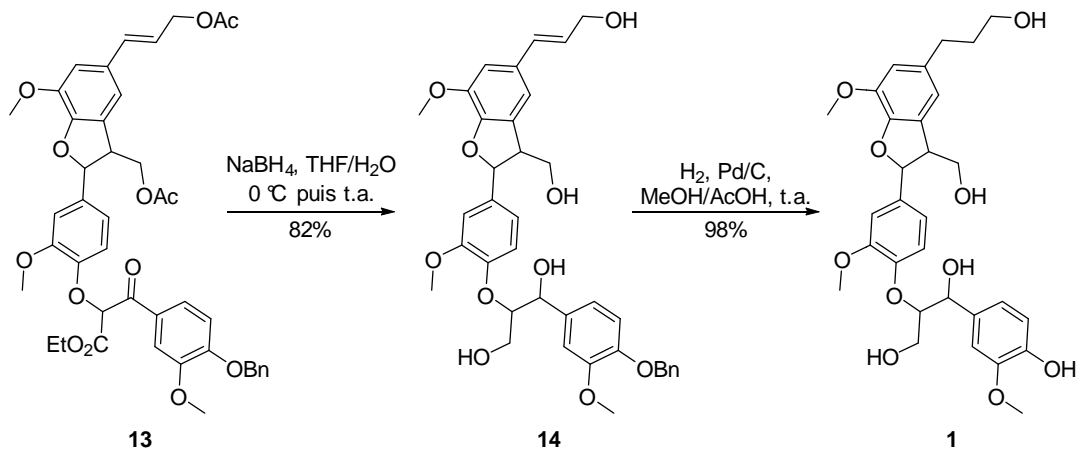
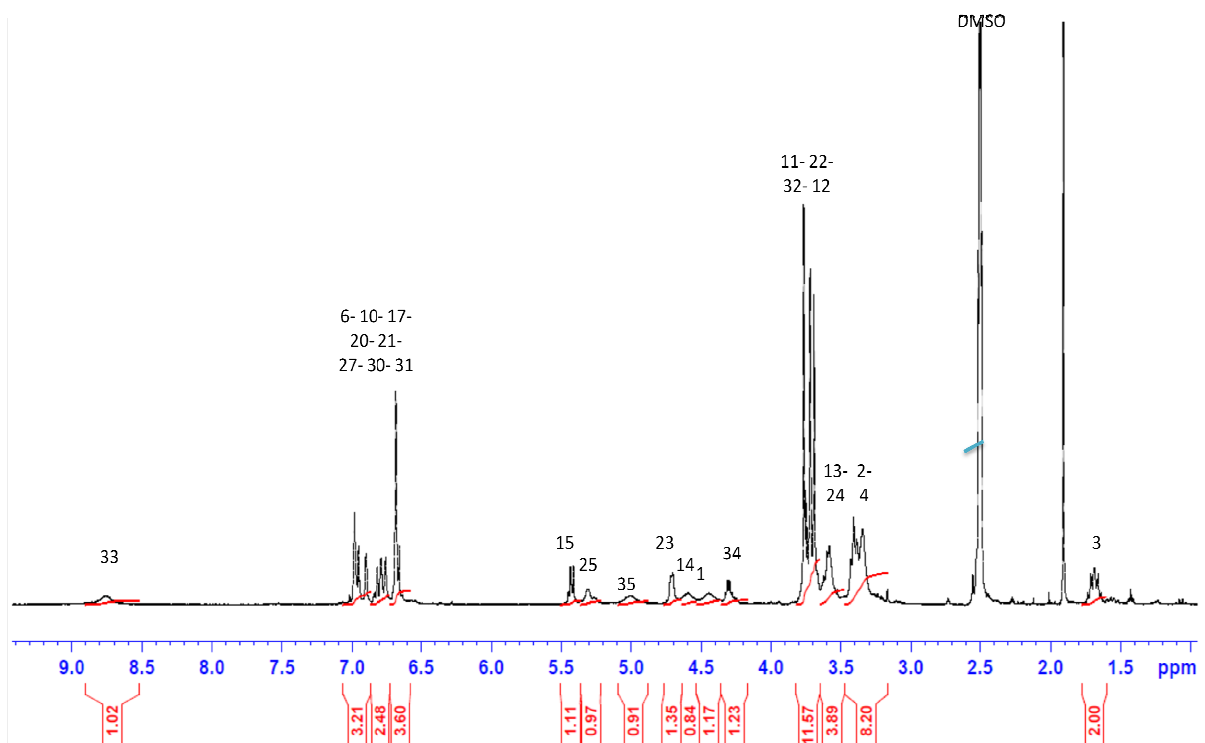


Schéma 37 : Synthèse du dihydrotrimère naturel (β-5)-(β-O-4) du monolignol G à partir de 13

Le supposé trimère (β-5)-(β-O-4) obtenu en petite quantité lors du couplage enzymatique a été hydrogéné et les spectres RMN ont été comparés avec ceux du produit 1. Malgré de grandes similarités en RMN ¹H (Figure 29), le manque de définition dans la zone entre 4.0 et 5.5 ppm laisse planer un doute quant au produit isolé lors de la dimérisation.



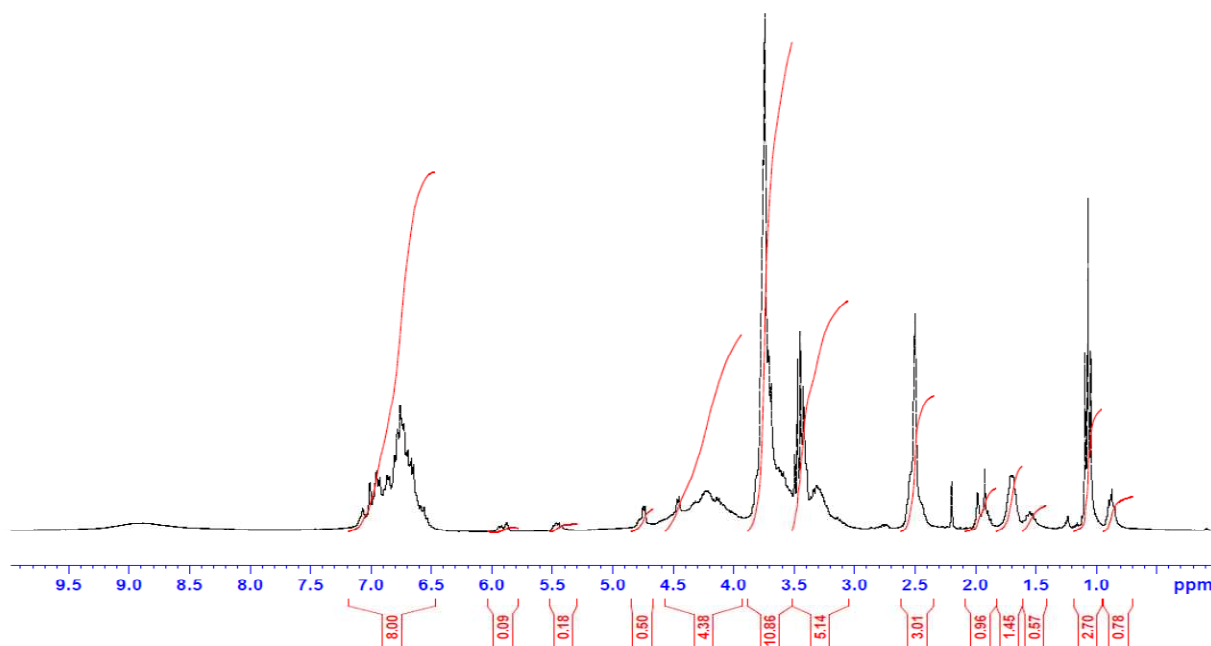


Figure 28 : Spectres ^1H -RMN du produit **1** (en haut) et du supposé trimère hydrogéné (en bas)

Afin d'obtenir le dihydroxytrimère **2**, la double liaison du composé **13** a été convertie en 1,2-*syn*-diol *via* une dihydroxylation d'Upjohn modifiée précédemment utilisée au laboratoire.¹¹⁹ L'osmate de potassium, $\text{K}_2[\text{OsO}_2(\text{OH})_4]$, permet de générer *in situ* du tétraoxyde d'osmium (OsO_4), composé hautement toxique, par action de la *N*-méthyl morpholine-*N*-oxyde (NMO) dans un milieu composé d'eau, d'acétone et d'éthanol contenant de l'acide citrique. Le rendement de cette réaction sur notre substrat est de 58%. Par la suite, la séquence réduction au tétrahydruroborate de sodium suivie d'une hydrogénation pallado-catalysée a été réalisée. Le produit **16** est isolé après une purification par chromatographie flash à polarité de phase inversée (C18, eau/méthanol 1/4) avec un rendement de 65%. Afin d'obtenir le produit **2** pur à l'issue de l'hydrogénation, le palladium supporté sur charbon est éliminé par filtration à l'aide d'une membrane en PTFE de porosité 0,2 μm , puis les traces d'acide acétique et de méthanol sont éliminées par distillation azéotropique (Schéma 38). Cette dernière étape est conduite avec un rendement excellent (99%, 9% de rendement global à partir de l'acide férulique après 9 étapes de synthèse).

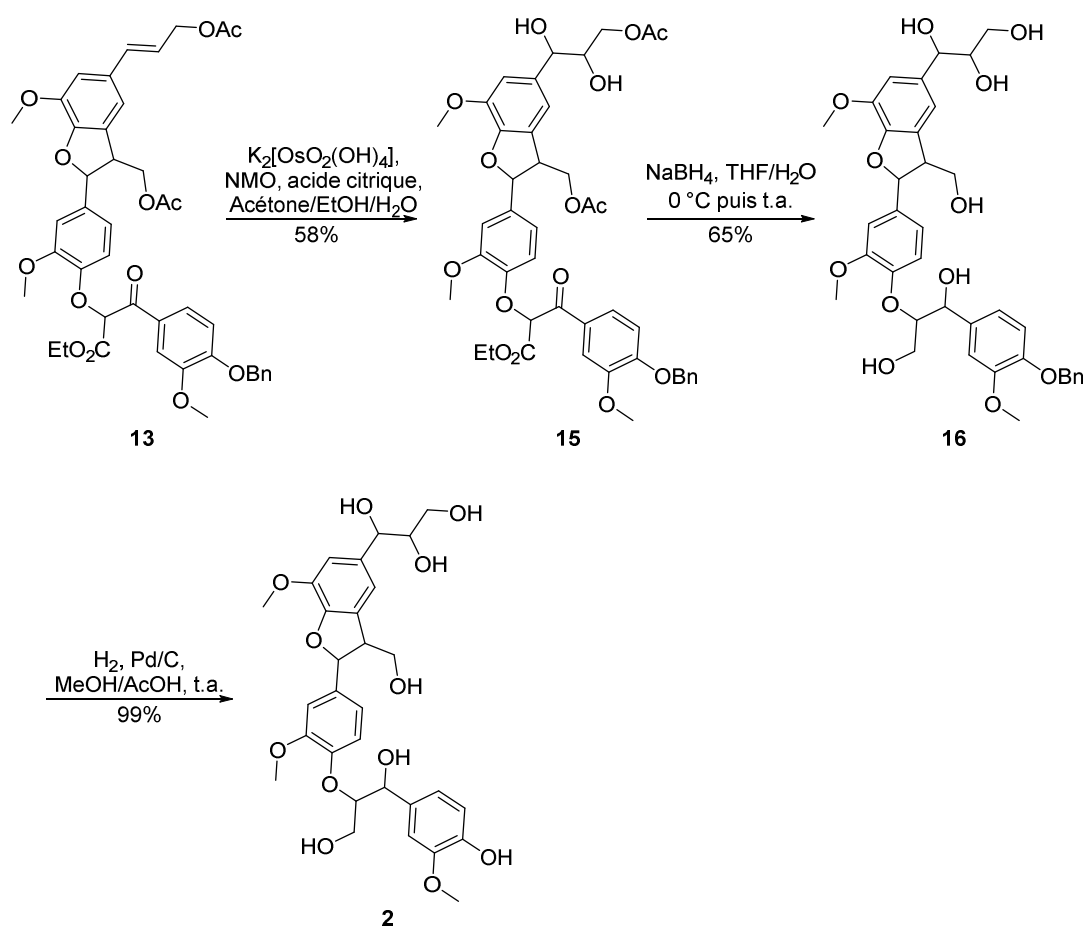


Schéma 38 : Synthèse du dihydroxytrimère (β-5)-(β-O-4) du monolignol G à partir de 13

Par la suite, une nouvelle voie de synthèse a été testée afin de réduire le nombre d'étapes (Schéma 39). Le férulate d'éthyle **3** est directement engagé dans l'étape d'oxydation avec la laccase en suivant le protocole précédent. Le diester **17** est obtenu avec un rendement similaire à celui observé pour le dimère (β-5) **4**. Cette nouvelle procédure permet d'économiser l'étape de réduction de **3** en **G** ainsi que les deux étapes de protection et déprotection sélective des alcools. Le phénolate est directement généré à partir de **17** par action du carbonate de potassium. Le couplage par S_N2 avec **10** conduit à un très bon rendement en produit couplé **18** (84%). La réduction de **18** pour obtenir l'intermédiaire **16** s'est avérée quant à elle complexe. Dans un premier temps, cette étape a été tentée avec du DIBAL-H. Bien que le suivi par chromatographie sur couche mince montre que la réaction a bien eu lieu, le produit n'a pu être séparé des sels d'aluminium formés de manière concomitante. Dans un second temps, la réduction au tétrahydruroborate de sodium a été tentée dans un mélange THF/eau, mais l'ester conjugué n'a pas été réduit, ni en augmentant la quantité de tétrahydruroborate de sodium, ni en modifiant le temps de réaction. Deux nouvelles réductions de **18** ont été tentées avec du tétrahydruroborate de lithium, l'une dans un milieu THF/eau, l'autre en milieu MeOH/eau/THF, sans plus de succès.

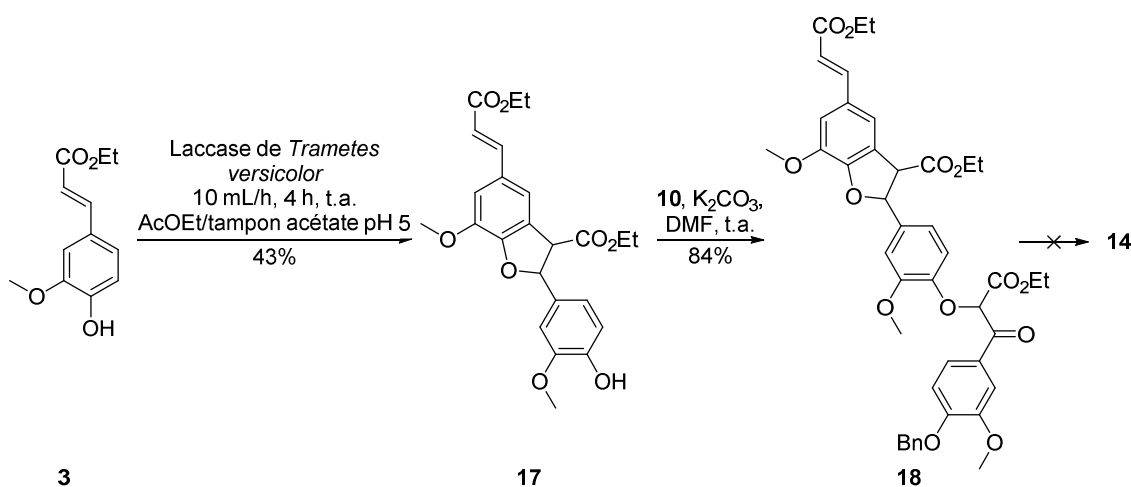


Schéma 39 : Synthèse infructueuse de 14 via le diester 17

Matériels et Méthodes

Matériels

L'acide férulique, la solution d'hydrure de diisobutylaluminium 1M dans le dichlorométhane, le bromure de benzyle, la laccase de *Trametes versicolor* (776 U/g), la pipérazine et l'hydrure de sodium ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés tels quels. L'acétovanillone, le tétrahydroborate de sodium, la pyridine et le carbonate de diéthyle ont été achetés chez TCI et utilisés tels quels. Le palladium sur charbon et le sulfate de magnésium anhydre ont été achetés chez Acros Organics et utilisés tels quels. Les solvants deutérés sont fournis par Euriso-top. Tous les autres réactifs, sels et solvants ont été achetés chez VWR.

Le *N,N*-diméthylformamide DMF a été séché sur mBraun SPS 800. Les évaporations ont été conduites sous pression réduite (Vario Vacuubrand pump) à l'aide d'un Buchi R300. Les chromatographies Flash ont été réalisées à l'aide d'un Puriflash 4100 (Interchim) avec des colonnes pré-packées INTERCHIM PF-30SI-HP (30 μ m silica gel). Les analyses infrarouges ont été réalisées à l'aide d'un Cary 630 FTIR (Agilent). Les spectres RMN sont enregistrés à l'aide d'un Fourier 300 (Bruker). Les spectres RMN ¹H des échantillons sont enregistrés à 300 MHz, le déplacement chimique est reporté en partie par million (ppm) relativement au pic résiduel du solvant (CDCl₃ δ = 7,26 ppm; DMSO-d₆ δ = 2,50 ppm). Les spectres RMN ¹³C des échantillons sont enregistrés à 75 MHz et calibrés sur le pic résiduel du solvant (CDCl₃ δ = 77,16 ppm; DMSO-d₆ δ = 39,52 ppm).

Méthodes

Synthèse de l'alcool coniférylique (G) :

L'acide férulique (23.3 g, 120 mmol) est dissous dans l'éthanol (150 mL), puis 3 gouttes d'acide chlorhydrique 12N sont ajoutées. Le milieu est chauffé à reflux durant une nuit, puis ramené à température ambiante. L'éthanol est évaporé. Le brut réactionnel est dilué dans l'acétate d'éthyle (75 mL) et lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (3x50 mL) puis avec de la

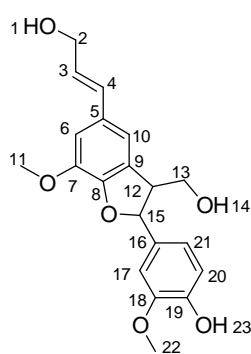
saumure (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et concentrée. Le férulate d'éthyle est directement engagé dans l'étape de réduction.

Sous N₂, Le férulate d'éthyle (120 mmol) est dissous dans le dichlorométhane sec (200 mL). Le milieu réactionnel est placé à 0°C et le DIBAL-H (385 mL à 1 mol.L⁻¹ dans le CH₂Cl₂, 3.2 équiv.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est ramené à température ambiante et la réaction est poursuivie pendant 5 h. Le milieu réactionnel est neutralisé par addition de méthanol (38 mL) au goutte à goutte puis d'une solution d'acide citrique à 20% (m/m) (190 mL) et enfin dilué avec (190 mL de CH₂Cl₂ et 95 mL d'eau). Le mélange est agité toute la nuit. Les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (2*100 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Le produit est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec pour éluant une solution cyclohexane/acétate d'éthyle (30/70). 16,6 g d'une solution blanc cassé sont récupérés (77%).

Les caractérisations menées sont conformes à celles reportées dans la littérature.¹⁹²

Synthèse du dimère (β-5) (4) :

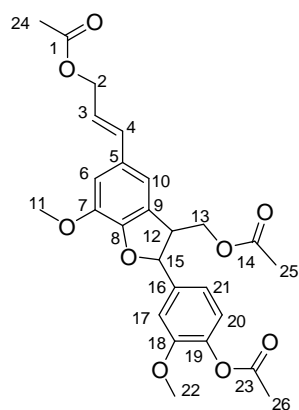
L'alcool coniférylique **G** (3,0 g, 16,6 mmol) est dissous dans l'acétate d'éthyle (170 mL) à température ambiante, puis le tampon acétate pH 5 (170 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est agité vigoureusement (1000 rpm). La laccase de *Trametes versicolor* (21 mg, 16,3 U/mmol) est dissoute dans le tampon pH 5 (50 mL) et ajoutée à un débit de 10 mL.h⁻¹ au milieu. A la fin de l'addition, les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle (75 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Le produit est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec pour éluant une solution cyclohexane/acétate d'éthyle (10/90). 1,28 g de mousse orange sont récupérés (43%).



FT-IR (pur) : $\nu = 3332$ (O-H), $2926 + 2869$ (C=C), $1610 + 1516 + 1496 + 1461$ (C=C arom) cm⁻¹ ; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300 MHz) $\delta = 9,02$ (s, 1H, H₂₃), $6,93$ (m, 3H, H₁₀ + H₂₀ + H₂₁), $6,75$ (s, 2H, H₆ + H₁₇), $6,46$ (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H₄), $6,21$ (dt, 1H, $J = 15,9$ Hz, $J = 5,4$ Hz, H₃), $5,45$ (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, H₁₅), $5,02$ (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, H₁₄), $4,78$, (t, 1H, $J = 5,7$ Hz, H₁), $4,08$ (td, 2H, $J = 5,4$ Hz, $J = 1,2$ Hz, H₂), $3,79$ (s, 3H, H₂₂), $3,74$ (s, 3H, H₁₁), $3,58$ - $3,74$ (m, 2H, H₁₃), $3,43$ (m, 1H, H₁₂) ppm ; **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz) $\delta = 147,6+147,1$ (C₈ + C₁₉), $146,4+143,7$ (C₇ + C₁₈), $132,3$ (C₁₆), $130,5$ (C₅), $129,5$ (C₉), $129,0$ (C₄), $128,0$ (C₃), $118,5+115,3$ (C₆ + C₁₇), $114,9$ (C₂₀), $110,3$ (C₁₀ + C₂₁), $87,2$ (C₁₅), $62,9$ (C₁₃), $61,7$ (C₂), $55,6$ (C₁₁ + C₂₂), $53,0$ (C₁₂) ppm, **HRMS** : m/z [M+H]⁺ calculé C₂₀H₂₃O₆⁺ : 359,1489, trouvé : 359,1566.

Synthèse du dimère tri-O-acétylé (β-5) (5):

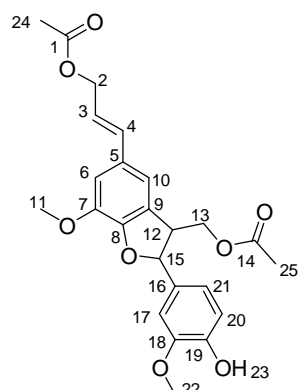
4 (2,6 g, 7,25 mmol) est dissous dans la pyridine (18 mL) et l'anhydride acétique (11 mL, 109 mmol, 5 équiv/fonction) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante, puis est versé dans un mélange d'eau acidifiée et de glace. Le précipité est filtré et rincé à l'eau jusqu'à pH neutre. Après séchage, **5** est obtenu avec un rendement quantitatif et est utilisé tel quel pour l'étape suivante.



FT-IR (pur) : $\nu = 2940$ (C-C), 1733 (C=O), $1603 + 1506 + 1462 + 1421 + 1366 + 1332$ (C=C arom), $1214 + 1187 + 1146 + 1127$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 6,98$ (m, 3H, $\text{H}_{10} + \text{H}_{20} + \text{H}_{21}$), $6,88$ (m, 2H, $\text{H}_6 + \text{H}_{17}$), $6,59$ (m, 1H, H_4), $6,15$ (dt, 1H, $J = 15,6$ Hz, $J = 6,6$ Hz, H_3), $6,54$ (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H_{15}), $4,70$ (dd, 2H, $J = 6,6$ Hz, $1,2$ Hz, H_2), $4,26$ - $4,47$ (m, 2H, H_{13}), $3,91$ (s, 3H, H_{22}), $3,78$ (m, 4H, $\text{H}_{15} + \text{H}_{11}$), $2,30$ (s, 3H, H_{26}), $2,09$ (s, 3H, H_{24}), $2,05$ (s, 3H, H_{25}) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO-d_6) $\delta = 171,0+170,8$ ($\text{C}_{14} + \text{C}_1$), $169,0$ (C_{23}), $151,3$ (C_{18}), $148,2$ (C_8), $144,4$ (C_7), $139,7+139,4$ ($\text{C}_{16} + \text{C}_{19}$), $134,3$ (C_4), $130,7$ (C_5), $127,3$ (C_9), $122,9$ (C_{20}), $121,3$ (C_3), $118,2$ (C_{21}), $115,4$ (C_{10}), $110,6$ (C_{17}), $109,9$ (C_6), $88,1$ (C_{15}), $65,4$ (C_{13}), $65,2$ (C_2), $56,0 + 55,9$ ($\text{C}_{11} + \text{C}_{22}$), $50,5$ (C_{12}), $20,6$ - $21,1$ ($\text{C}_{24} + \text{C}_{25} + \text{C}_{26}$) ppm; **HRMS** : m/z [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculé $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{Na}^+$: 507,1631, trouvé : 507,1637.

Synthèse du dimère di-O-acétylé (β -5) (**1**):

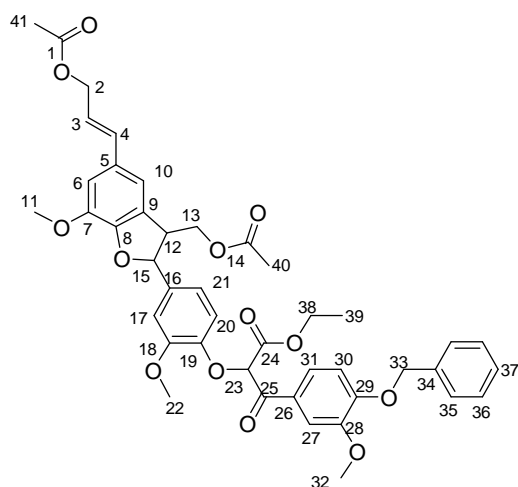
5 (7,25 mmol) est dissous dans le THF (70 mL) et la pipérazine (1,87 g, 21,75 mmol, 3 équiv.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h. Le THF est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est dissous dans l'AcOEt (50 mL) et lavé avec HCl 1M (3*15 mL) et de la saumure (20 mL), séché sur MgSO_4 anhydre, filtré et concentré. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice avec un éluant cyclohexane/AcOEt (40/60), **1** est obtenu sous forme d'huile incolore (2,95 g, 92%).



FT-IR (pur): $\nu = 3443$ (OH), 2939 (C-C), 1732 (C=O), $1601 + 1515 + 1493 + 1460 + 1423 + 1364 + 1331$ (C=C arom), $1216 + 1144$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 6,88$ (m, 5H, $\text{H}_6 + \text{H}_{10} + \text{H}_{17} + \text{H}_{20} + \text{H}_{21}$), $6,60$ (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_4), $6,16$ (dt, 1H, $J = 15,9$ Hz, $J = 6,6$ Hz, H_3), $5,65$ (s, 1H, H_{23}), $5,47$ (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H_{15}), $4,71$ (dd, $J = 1,2$ Hz, $J = 6,6$ Hz, 2H, H_2), $4,37$ (m, 2H, H_{13}), $3,91$ (s, 3H, H_{22}), $3,86$ (s, 3H, H_{11}), $3,77$ (m, 1H, H_{12}), $2,10$ (s, 3H, H_{24}), $2,03$ (s, 3H, H_{25}) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO-d_6 , 75 MHz) $\delta = 171,1$ (C_{14}), $171,0$ (C_1), $148,4$ (C_8), $146,8$ (C_{18}), $146,0$ (C_{19}), $144,5$ (C_7), $134,5$ (C_{16}), $132,3$ (C_4), $130,6$ (C_5), $127,8$ (C_9), $121,2$ (C_3), $119,7$ (C_{21}), $115,4$ (C_{20}), $114,4$ (C_{10}), $110,6$ (C_{17}), $108,7$ (C_6), $89,0$ (C_{15}), $65,4$ ($\text{C}_2 + \text{C}_{13}$), $56,1$ ($\text{C}_{11} + \text{C}_{22}$), $50,4$ (C_{12}), $21,2$ (C_{24}), $21,0$ (C_{25}) ppm; **HRMS** : m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculé $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_8^+$: 443,1700, trouvé : 443,1867.

Synthèse de **9**:

Sous azote, **1** (1,4 g, 3,16 mmol) est dissous dans du DMF sec (10 mL) et K_2CO_3 (0,66 g, 4,75 mmol, 1,5 équiv.) est ajouté (la réaction devient jaune). La température est abaissée à 0°C , puis une solution de **6** (1,9 g, 4,75 mmol, 1,5 équiv.) dans le DMF (9 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h, puis neutralisé avec de l'eau (50 mL) et extrait à l'AcOEt (3*50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et concentrées. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice avec un éluant cyclohexane/AcOEt (1/1), **9** est obtenu sous forme d'huile (2,04 g, 83%).

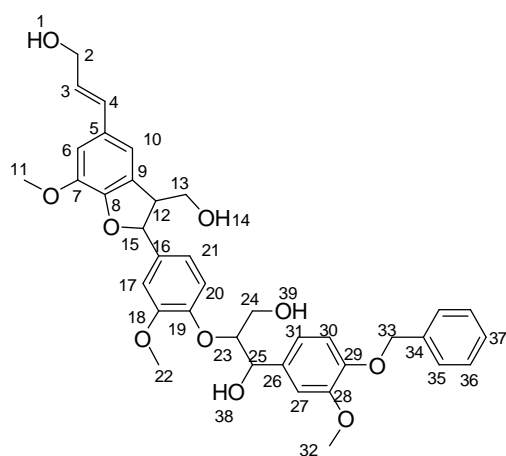


FT-IR (pur) : $\nu = 2953$ (C-C), 1734 (C=O ester), 1676 (C=O cétone), $1593 + 1508 + 1459 + 1420 + 1379 + 1332$ (C=Carom), $1209 + 1143$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 7,77$ (dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,1$ Hz, 1H, H_{31}), $7,68$ (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H_{27}), $7,27-7,45$ (m, 5H, $\text{H}_{35} + \text{H}_{36} + \text{H}_{37}$), $6,74-6,94$ (m, 6H, $\text{H}_6 + \text{H}_{10} + \text{H}_{17} + \text{H}_{20} + \text{H}_{21} + \text{H}_{30}$), $6,59$ (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, H_4), $6,15$ (dt, $J = 15,6$ Hz, $J = 6,6$ Hz, 1H, H_3), $5,73$ (s, 1H, H_{23}), $5,47$ (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, H_{15}), $5,23$ (s, 2H, H_{33}), $4,71$ (d, $J = 6,6$ Hz, 2H, H_2), $4,43$ (m, 1H, H_{13a}), $4,24$ (m, 3H, $\text{H}_{13b} + \text{H}_{38}$), $3,92$ (s, 3H, H_{32}), $3,90$ (s, 3H, H_{11}), $3,75$ (m, 4H, $\text{H}_{22} + \text{H}_{12}$), $2,09$ (s, 3H, H_{41}), $2,01$ (s, 3H, H_{40}), $1,21$ (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, H_{39}) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 190,0$ (C_{25}), $170,9-171,3$ ($\text{C}_1 + \text{C}_{14}$), $167,0$ (C_{24}), $153,3$ (C_{29}), $150,7$ (C_{18}),

$150,6$ (C_8), $149,5$ (C_{28}), $148,2$ (C_{34}), $146,3$ (C_{19}), $144,5$ (C_7), $136,2$ ($\text{C}_5 + \text{C}_{16}$), $134,4$ (C_4), $130,7$ (C_9), $128,8$ (C_{36}), $128,3$ (C_{26}), $127,5$ (C_{37}), $127,3$ (C_{35}), $124,8$ (C_{31}), $121,3$ (C_3), $118,7$ (C_{20}), $118,3$ (C_{21}), $115,4$ (C_{10}), $112,1$ (C_{30}), $112,0$ (C_{27}), $110,5$ (C_{17}), $110,4$ (C_6), $88,4$ (C_{15}), $82,7$ (C_{23}), $70,9$ (C_{33}), $65,3$ ($\text{C}_2 + \text{C}_{13}$), $62,3$ (C_{38}), $56,0-56,1$ ($\text{C}_{11} + \text{C}_{22} + \text{C}_{32}$), $50,4$ (C_{12}), $21,2$ (C_{41}), $20,9$ (C_{40}), $14,3$ (C_{39}) ppm; **HRMS** : m/z [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculé $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{O}_{13}\text{Na}^+$: 791,2680, trouvé : 791,2668.

Synthèse de 10:

9 (700 mg, 0,91 mmol) est dissous dans le THF (7,6 mL) puis l'eau est ajoutée (2,4 mL). A 0°C , le NaBH_4 (344 mg, 9,1 mmol, 10 équiv.) est ajouté par portions. A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h, puis neutralisé avec une solution saturée de NH_4Cl (10 mL) et extraite avec de l'AcOEt (2×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et concentrées. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice avec un éluant 100% AcOEt, **10** est obtenu sous forme d'une huile (432 mg, 82%).

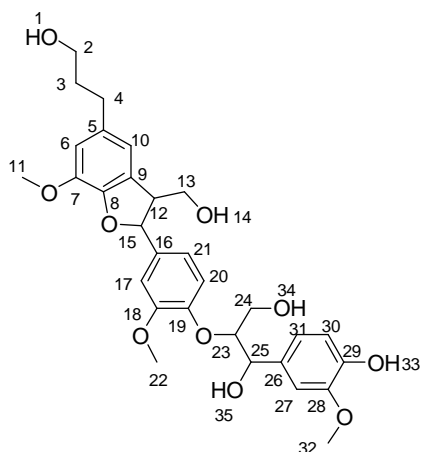


FT-IR (pur) : $\nu = 3346$ (O-H), 2934 (C-C), $1595 + 1508 + 1459 + 1420 + 1379 + 1326$ (C=Carom), $1257 + 1217 + 1137$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO-d_6 , 300 MHz) $\delta = 7,30-7,44$ (m, 5H, $\text{H}_{35} + \text{H}_{36} + \text{H}_{37}$), $6,75-7,15$ (m, 8H, $\text{H}_6 + \text{H}_{10} + \text{H}_{17} + \text{H}_{20} + \text{H}_{21} + \text{H}_{27} + \text{H}_{30} + \text{H}_{31}$), $6,60$ (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, H_4), $6,21$ (dt, $J = 15,6$ Hz, $J = 6,6$ Hz, 1H, H_3), $5,49$ (m, 1H, H_{15}), $5,45$ (m, 1H, H_{25}), $5,05$ (m, 3H, $\text{H}_{33} + \text{H}_{39}$), $4,74$ (m, 1H, H_{23}), $4,64$ (m, 2H, H_2), $4,33$ (m, 1H, H_{24a}), $3,80$ (s, 3H, H_{11}), $3,73$ (m, 4H, $\text{H}_{32} + \text{H}_1$), $3,67$ (s, 3H, H_{22}), $3,60$ (m, 3H, $\text{H}_{13} + \text{H}_{24b}$), $3,42$ (m, 1H, H_{12}) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 150,0$ (C_8), $148,9$ (C_{19}), $148,3$ (C_{28}), $148,1$ (C_{18}), $147,2$ (C_{29}), $144,2$ (C_7), $137,8$ (C_{34}), $135,7$ (C_{16}), $134,4$ (C_5), $134,3$ (C_4), $130,1$ (C_9), $129,9$ (C_{26}), $128,8$ ($\text{C}_{36} + \text{C}_{37}$), $128,2$ (C_{35}), $121,4$ (C_3), $119,6$ (C_{31}),

$118,5$ (C_{21}), $116,0$ (C_{10}), $115,7$ (C_{20}), $113,2$ (C_{30}), $111,8$ (C_{27}), $111,0$ (C_{17}), $110,8$ (C_6), $87,5$ (C_{15}), $84,0$ (C_{25}), $71,9$ (C_{23}), $70,3$ (C_{33}), $65,1$ (C_2), $60,4$ (C_{24}), $60,2$ (C_{13}), $56,1$ ($\text{C}_{11} + \text{C}_{22}$), $55,8$ (C_{32}), $53,5$ (C_{12}) ppm.

Synthèse de **11**:

10 (250 mg, 0,38 mmol) est dissous dans un mélange méthanol/acide acétique (95/5) (5 mL). Le milieu réactionnel est purgé par de l'azote pendant 15 min, puis le palladium sur charbon (25 mg, 10% w/w) est ajouté. Le milieu réactionnel est placé sous flux de dihydrogène à température ambiante pendant une nuit. Une fois la réaction totale, le milieu réactionnel est purgé au diazote pendant 20 min, filtré sur filtre seringue en PTFE, rincé deux fois avec 5 mL d'éthanol et concentré. **11** est obtenu sous forme de mousse (217 mg, 98%) sans étape de purification supplémentaire.

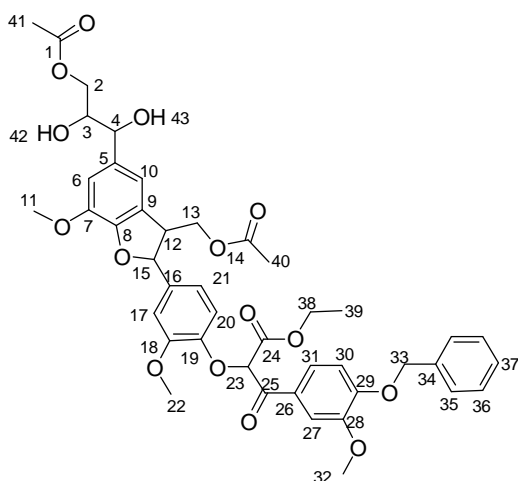


FT-IR (pur) : $\nu = 3388$ (O-H), 2934 (C-C), $1602 + 1509 + 1460 + 1421 + 1366$ (C=C arom), $1258 + 1210 + 1138$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 300 MHz) $\delta = 8,75$ (s, 1H, H₃₃), 7,02-6,64 (m, 8H, H₆ + H₁₀ + H₁₇ + H₂₀ + H₂₁ + H₂₇ + H₃₀ + H₃₁), 5,43 (m, 1H, H₁₅), 5,28 (m, 1H, H₂₅), 5,00 (s, 1H, H₃₅), 4,70 (m, 1H, H₂₃), 4,59 (s, 1H, H₁₄), 4,44 (s, 1H, H₁), 4,29 (m, 1H, H₃₄), 3,77-3,69 (m, 12H, H₁₁ + H₂₂ + H₃₂ + H₁₂), 3,59 (m, 4H, H₁₃ + H₂₄), 3,40 (m, 8H, H₂ + H₄), 1,69 (m, 2H, H₃) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl₃, 75 MHz) $\delta = 150,4$, (C₈), 148,2 (C₁₉), 147,4 (C₂₈), 146,1 (C₁₈), 145,9 (C₂₉), 143,9 (C₇), 140,0 (C₁₆), 134,6 (C₅), 133,7 (C₉), 128,2 (C₂₆), 119,9 (C₂₁ + C₃₁), 116,9 (C₁₀ + C₂₀), 112,9 (C₃₀ + C₂₇), 111,0 (C₁₇ + C₆), 95,5 (C₁₅), 84,0 (C₂₅), 72,0 (C₂₃), 63,8 (C₂), 63,5 (C₂₄), 60,4 (C₁₃), 56,1 (C₁₁ + C₂₂ + C₃₂), 55,9 (C₁₂),

31,8 (C₃), 30,6 (C₄) ppm.

Synthèse de **15**:

9 (840 mg, 1,1 mmol) et l'acide citrique (275 mg, 1,3 mmol) sont dissous dans un mélange acétone (3 mL), éthanol (2 mL) et eau (1,5 mL). La solution de tétraoxyde d'osmium à 4% dans l'eau (170 μL , 27 μmol) est ajoutée et ensuite la solution de *N*-méthyl morpholine *N*-oxyde à 0,5 M dans l'eau (270 μL , 1,3 mmol) l'est aussi. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante toute la nuit, puis neutralisé avec une solution de Na₂S₂O₃ à 2,5 mol.L⁻¹ (10 mL) et extrait à l'AcOEt (3*10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice avec un éluant initial composé de cyclohexane/AcOEt (1/1) et un éluant final AcOEt (100%), **15** est obtenu sous forme d'une huile (512 mg, 58%).



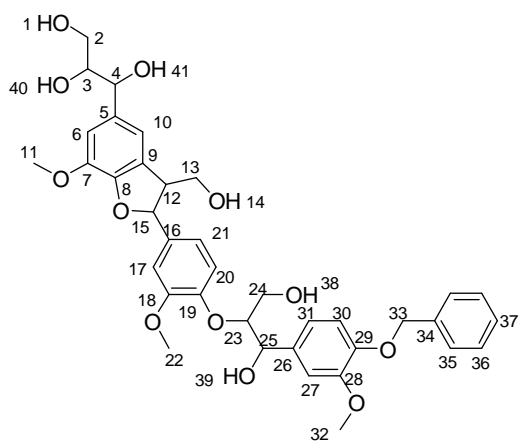
FT-IR (pur) : $\nu = 3456$ (O-H), 2937 (C-C), 1734 (C=O ester), 1675 (C=O cétone), $1592 + 1508 + 1454 + 1419 + 1368$

(C=C arom), $1209 + 1135$ (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl₃, 300 MHz) $\delta = 7,77$ (dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,1$ Hz, 1H, H₃₁), 7,68 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H₂₇), 7,31-7,44 (m, 5H, H₃₅ + H₃₆ + H₃₇), 6,82-6,93 (m, 6H, H₆ + H₁₀ + H₁₇ + H₂₀ + H₂₁ + H₃₀), 5,73 (s, 1H, H₂₃), 5,47 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, H₁₅), 5,23 (s, 2H, H₃₃), 4,57 (m, 1H, H₄), 4,39 (m, 1H, H_{13a}), 4,21-4,35 (m, 3H, H_{13b} + H₃₈), 4,12 (m, 1H, H), 3,87-4,01 (m, 9H, H), 3,78 (m, 4H, H₂₂ + H₁₂), 2,10 (s,

3H, H₄₁), 2,00 (s, 3H, H₄₀), 1,21 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, H₃₉) ppm ; ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) $\delta = 190,0$ (C₂₅), 170,9 and 171,4 (C₁ + C₁₄), 167,0 (C₂₄), 153,3 (C₂₉), 150,6 (C₁₈), 149,5 (C₈), 149,5 (C₂₈), 148,2 (C₇), 146,3 (C₁₉), 144,5 (C₇), 136,2 (C₃₄ + C₅ + C₁₆), 134,4 (C₄), 130,7 (C₉), 128,8 (C₃₆), 128,3 (C₂₆), 127,5 (C₃₇), 127,4 (C₃₅), 124,8 (C₃₁), 118,8 (C₂₀), 118,3 (C₂₁), 115,0 (C₁₀), 112,1 (C₃₀), 112,0 (C₂₇), 110,9 (C₁₇), 110,4 (C₆), 88,4 (C₁₅), 82,7 (C₂₃), 77,4, 74,6, 74,3 (C₄), 70,9 (C₃₃), 65,5+65,3 (C₂ + C₁₃), 62,3 (C₃₈), 56,0-56,2 (C₁₁ + C₂₂ + C₃₂), 50,6 (C₁₂), 21,0 (C₄₁), 20,9 (C₄₀), 14,2 (C₃₉) ppm ; HRMS : m/z [M+Na]⁺ calculé C₄₃H₄₆O₁₅Na⁺ : 825,2726, trouvé : 825,2734.

Synthèse de 16:

15 (794 mg, 0,99 mmol) est dissous dans un mélange THF/eau (8,2 mL/2,6 mL). A 0 °C, le NaBH₄ (375 mg, 9,9 mmol, 10 équiv.) est ajouté par portion. A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 h. Le THF est éliminé par distillation sous pression réduite et 2,5 mL de méthanol sont ajoutés. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash sur phase inverse C18 avec comme éluant initial eau/MeOH (1/1) et éluant final eau/ MeOH (1/4). **16** est obtenu sous forme de mousse (448 mg, 65%).

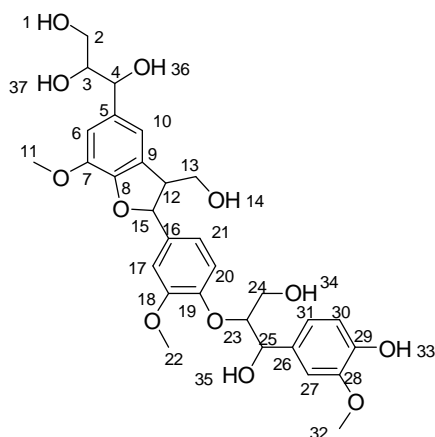


FT-IR (pur) : $\nu = 3344$ (O-H), 2932 + 2873 (C-C), 1602 + 1507 + 1451 + 1419 + 1321 (C=C arom), 1258 + 1213 + 1135 (C-O) cm⁻¹ ; ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) $\delta = 7,31$ -7,41 (m, 5H, H₃₅ + H₃₆ + H₃₇), 6,81-7,06 (m, 8H, H₆ + H₁₀ + H₁₇ + H₂₀ + H₂₁ + H₂₇ + H₃₀ + H₃₁), 5,38-5,47 (m, 2H, H₂₃ + H₄₁), 5,04 (s, 3H, H₃₃ + H₁), 4,99 (t, $J = 4,5$ Hz, 1H, H₃₉), 4,76 (m, 1H, H₃), 4,66 (m, 1H, H₁₄), 4,53 (m, 1H, H₃₈), 4,45 (m, 2H, H₂₅ + H₄₀), 4,33 (m, 1H, H₁₅), 3,68-3,77 (m, 10H, H₁₁ + H₂₂ + H₃₂ + H_{13a}), 3,60 (m, 3H, H₂ + H_{13b}), 3,43-3,48 (m, 2H, H₁₂ + H_{24a}), 3,31 (m, 1H, H₄), 3,19 (m, 1H, H_{24b}) ppm ; ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) $\delta = 149,6$ (C₇), 148,5 (C₁₈), 147,8 (C₈), 146,8 (C₂₈), 146,3 (C₂₉), 143,0-143,1 (C₁₉), 137,4 (C₃₄), 136,8 (C₁₆), 135,3 (C₂₆), 134,4 (C₅),

128,4 (C₃₆ + C₉), 127,8 (C₃₇ + C₃₅), 119,2 (C₃₁), 118,0 (C₂₁), 115,1-115,4 (C₁₀), 112,9 (C₃₀), 11,4 (C₁₇), 111,0-111,4 (C₂₀), 110,4 (C₆), 86,8 (C₂₃), 83,5 (C₁₅), 75,9 (C₄), 72,8-73,0 (C₂₅), 71,5 (C₃), 69,9 (C₃₃), 63,2 (C₁₃), 62,7 (C₂₄), 60,0 (C₂), 55,7 and 55,4 (C₂₂ + C₃₂ + C₁₁), 53,5 (C₁₂) ppm ; HRMS : m/z [M+Na]⁺ calculé C₃₇H₄₂O₁₂Na⁺ : 701,2574, trouvé : 701,2565.

Synthèse de 14:

16 (325 mg, 0,48 mmol) est dissous dans un mélange MeOH/AcOH (95/5) (4,8 mL). Le milieu réactionnel est purgé par du diazote pendant 15 min, puis le palladium sur charbon (32 mg, 10% w/w) est ajouté. Le milieu réactionnel est placé sous flux de dihydrogène à température ambiante pendant une nuit. Une fois la réaction totale, le milieu réactionnel est purgé au diazote pendant 20 min, filtré sur filtre seringue en PTFE, rincé deux fois avec 5 mL d'éthanol et concentré. Le brut réactionnel est soumis à des distillations azéotropiques avec du toluène (*3) puis de l'eau (*3) pour éliminer les résidus d'acide acétique. Le produit est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune (99%).



FT-IR (pur) : $\nu = 3324$ (O-H), 2933 (C-C), 1601 + 1507 + 1451 + 1420 (C=C), 1261 + 1214 + 1134 (C-O) cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 300 MHz) $\delta = 6.52\text{-}7.01$ (m, 13H, $\text{H}_6 + \text{H}_{10} + \text{H}_{17} + \text{H}_{20} + \text{H}_{21} + \text{H}_{27} + \text{H}_{30} + \text{H}_{31}$), 5.45 (m, 1H, H_{23}), 4.70 (m, 3H, $\text{H}_3 + \text{H}_{37} + \text{H}_{36}$), 4.39 (m, 3H, H_{25}), 4.24 (m, 2H, H_{15}), 3.63-3.77 (m, 14H, $\text{H}_{11} + \text{H}_{22} + \text{H}_{32} + \text{H}_{13a}$), 3.08-3.55 (m, 14H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_{12} + \text{H}_{13b} + \text{H}_{23} + \text{H}_{24}$) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 149,6\text{-}145,5$ ($\text{C}_7 + \text{C}_{18} + \text{C}_8 + \text{C}_{28} + \text{C}_{29}$), 142,9-143,1 (C_{19}), 136,8-136,9 (C_{16}), 132,9-134,4 ($\text{C}_5 + \text{C}_{26}$), 128,2-128,4 (C_9), 118,0-120,7 ($\text{C}_{21} + \text{C}_{31}$), 114,6-115,5 ($\text{C}_{10} + \text{C}_{30}$), 113,2-113,3 (C_{27}), 110,4-111,4 ($\text{C}_{17} + \text{C}_{20}$), 107,8-108,0 (C_6), 86,8 (C_{23}), 83,7 (C_{15}), 75,9-76,1 (C_4), 72,8-73,1 (C_{25}), 71,5 (C_3), 63,2-64,3 (C_{13}), 62,6 (C_{24}), 59,9-60,0 (C_2), 55,4-55,7 ($\text{C}_{11} + \text{C}_{22} + \text{C}_{32}$), 53,5 (C_{12}) ppm;

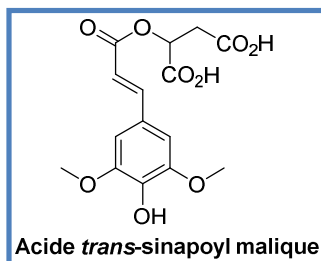
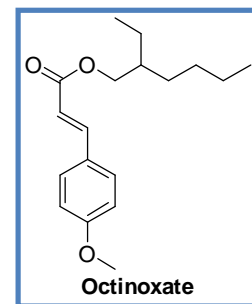
HRMS : m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{Na}^+$: 611,2104, trouvé : 611,2110.

Conclusion

La synthèse totale des deux trimères cibles, le dihydroxytrimère $\beta\text{-}5/\beta\text{-}O\text{-}4$ du monolignol **G** (**11**) ainsi que le dihydrotrimère naturel $\beta\text{-}5/\beta\text{-}O\text{-}4$ de **G** (**10**) a été menée à son terme en employant une approche convergente, les produits de départ étant l'acétovanilline d'une part et l'acide férulique d'autre part. Les molécules désirées ont été synthétisées en 9 étapes avec un rendement global à partir de l'acide férulique de 20% pour **10** et de 9% pour **11**. Les étapes clefs ont été une dimérisation biocatalysée avec de la laccase de *Trametes versicolor* suivie d'une substitution nucléophile ($\text{S}_{\text{N}}2$) puis d'une hydrogénation pallado-catalysée pour obtenir **10** ou d'une dihydroxylation dans le cas de **11**.

L'acide sinapique et ses dérivés : Nouvelles générations de filtres UV

L'un des enjeux majeurs du couple bioraffinerie/chimie verte consiste à produire des molécules apportant des solutions techniques innovantes et présentant un impact faible tant sur la santé humaine que sur les écosystèmes. Le remplacement des filtres UV actuellement utilisés par l'industrie cosmétique est un défi stimulant à relever. En effet, l'impact des rayonnements UV sur la prédominance des cancers de la peau est prouvé, et il est par conséquent important de pouvoir s'en prémunir. Les solutions actuellement les plus répandues présentent des inconvénients non négligeables. Les filtres minéraux, principalement les nanoparticules d'oxydes de titanes sont pointées du doigt car l'impact de ce type précis de nanoparticules est encore mal connu. Bien que la commission européenne autorise l'usage du dioxyde de titane dans les crèmes solaires, elle avertit sur ses dangers potentiels.¹⁹³ D'autre part, les filtres organiques sont réputés perturbateurs endocriniens.¹⁹⁴ De surcroît, la molécule la plus utilisée, l'octinoxate (4-méthoxycinnamate de 2-éthylhexyle, CAS n° 5466-77-3) en plus de son supposé effet sur la santé humaine,¹⁹⁵ promeut le développement de virus qui détruisent les coraux. Cette molécule a d'ailleurs été interdite d'utilisation dans certaines îles.¹⁹⁶ L'industrie cosmétique cherche activement de nouvelles solutions, cependant en plus d'éventuelles contraintes techniques, il existe des contraintes réglementaires fortes pour la mise sur le marché de nouveaux anti-UV. Pour introduire un nouvel anti-UV, il faut que celui-ci possède une autre activité majeure (antioxydant, blanchissant, hydratant...).



Acide *trans*-sinapoyl malique

Les composés phénoliques sont intrinsèquement anti-radicalaires donc possèdent potentiellement des propriétés antioxydantes. De plus, parmi les métabolites issus de l'acide sinapique (CAS n° 530-59-6), il a été prouvé que l'acide *trans*-sinapoyl malique (CAS n° 92344-58-6) était synthétisé par les plantes pour absorber les rayonnements solaires dans les longueurs d'onde correspondant aux ultra-violets.¹⁹⁷ L'étude de cette molécule a permis de mettre en évidence que les propriétés anti-UVs étaient dues à sa conjugaison étendue (cycle aromatique conjugué à un ester α,β -insaturé) et à la présence d'un groupement encombrant sur la double liaison facilitant l'isomérisation *cis-trans* lorsque la molécule est exposée à un rayonnement ultra-violet.¹⁹⁸ Notre hypothèse de travail est qu'une augmentation de la conjugaison *via* une dimérisation β - β sélective permettrait d'exacerber les propriétés anti-UVs et antiradicalaires (schéma 40).

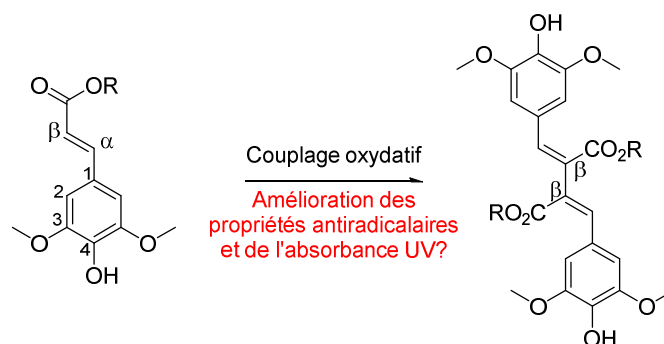


Schéma 40 : Dimérisation sélective des esters sinapiques

Ces travaux sont partie intégrante de deux projets : L'ANR Sinap'UV qui a pour but de développer de nouveaux anti-UVs pour des applications cosmétiques et le projet européen Horizon 2020 BoostCrop qui vise à transformer les rayonnements UV en chaleur afin de permettre la protection des cultures face à des épisodes de gel voire à implanter des cultures en altitude. Les travaux sur la dimérisation β - β spécifique ont été débutés dans le cadre du stage de Matthieu Mention et poursuivis lors de son CDD. Ces travaux ont donné lieu à une publication :

- **Biomimetic regioselective and high-yielding Cu(I)-catalyzed dimerization of sinapate esters in green solvent Cyrene™: towards sustainable antioxidant and anti-UV ingredients.** Matthieu M. Mention, Amandine L. Flourat, Cédric Peyrot, Florent Allais *Green Chemistry* **2020**, *22*, 2077-2085, DOI : 10.1039/D0GC00122H

De plus, le dimère β - β du sinapate d'éthyle a fait l'objet d'une étude de photochimie chez nos partenaires de l'université de Warwick en Angleterre, ces travaux ayant été publiés récemment :

- **Exploring the photochemistry of an ethyl sinapate dimer: An attempt towards a better ultraviolet filter.** Michael Horbury, Matthew A. P. Turner, Jack S. Peters, Matthieu Mention, Amandine L. Flourat, Nicholas D. M. Hine, Florent Allais, Vasilios Stavros *Frontiers in chemistry* **2020**, *8*, Article 633, DOI: 10.3389/fchem.2020.00633

Dimérisation enzymatique

Pour réaliser la dimérisation souhaitée, le sinapate d'éthyle a été choisi pour servir de molécule modèle pour l'étude car il est facile à synthétiser en grande quantité et représente un ester simple. Nous nous sommes tout d'abord inspirés de travaux menés précédemment à la Chaire ABI dans le cadre de la thèse d'Abdus Samad Jaufurally.¹⁸⁷ Ce dernier avait réussi, en jouant sur la température et la vitesse d'addition de la laccase de *Trametes versicolor* dans le milieu réactionnel, à modifier la sélectivité de la dimérisation de l'alcool sinapylique pour former quasi exclusivement le syringarésinol (93%) (Schéma 41).

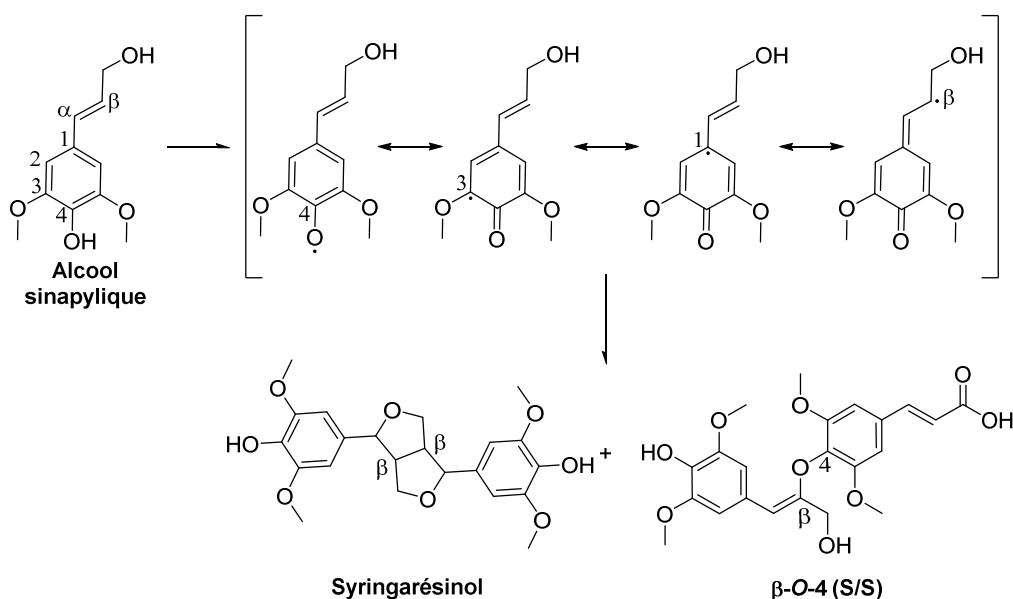


Schéma 41 : Dimérisation enzymatique de l'alcool sinapylique

Nous avons appliqué les conditions optimisées pour l'alcool sinapylique au sinapate d'éthyle. Malheureusement, dans ces conditions, la réaction n'est pas sélective et conduit majoritairement à la formation d'oligomères. Pour pallier ce problème, la réaction a été réalisée dans un système biphasique tampon pH 4.5/AcOEt, à l'image de la dimérisation de l'alcool coniférylique donnant le dimère β -5 (Schéma 32). Visuellement, les oligomères semblent moins nombreux (absence de précipité), cependant la purification n'a permis de récupérer qu'une quantité minimale de dimère. Les oligomères solubles restent majoritaires. De plus, l'analyse RMN effectuée sur la molécule isolée ne correspond pas à la molécule souhaitée mais au composé **22**. D'après les données de la littérature, celui-ci serait formé par addition d'eau sur l'intermédiaire réactionnel de type méthylène quinone suivie d'une transposition de la molécule favorisée par le milieu réactionnel acide (Schéma 42).

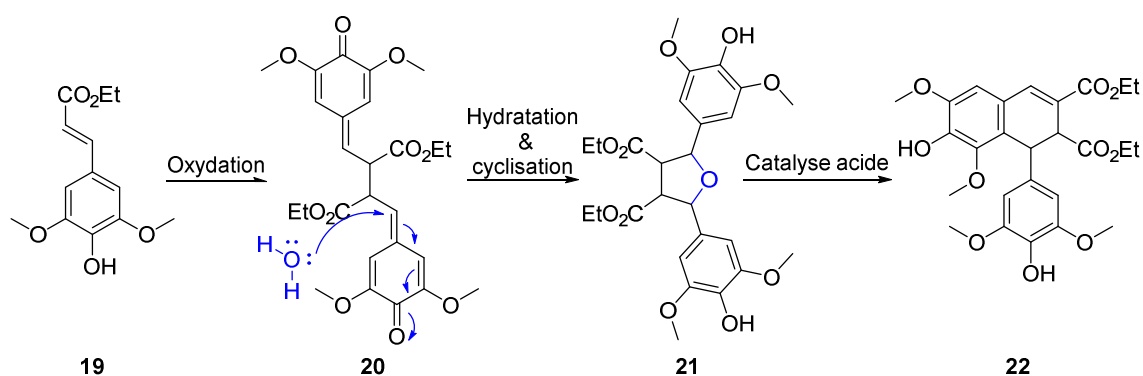


Schéma 42 : Mécanisme d'obtention du composé **22** à partir du sinapate d'éthyle

Pour limiter l'activité enzymatique de la laccase et la transposition du produit β - β , le pH de la phase aqueuse a été porté à 6. Les résultats observés ne présentent pas de différence significative. Nous avons vu que la lipase B de *Candida Antarctica* supportée sur résine acceptait un milieu 100% organique

(Chapitre 1). Un essai dans l'acétate d'éthyle a été lancé mais la laccase non immobilisée n'a pas supporté ces conditions drastiques et aucune conversion n'a été observée. Il est donc important que de l'eau soit présente dans le milieu. Nous savons, par expérience, que la laccase est active dans une eau désionisée, l'eau de grade MilliQ (conductivité 18.2 MΩ). Dans un milieu biphasique (eau MilliQ/AcOEt), la transposition du dimère β-β est inhibée. Malheureusement, malgré des essais incluant la variation de la température, de la quantité et de la vitesse d'addition de l'enzyme, du ratio eau MilliQ/AcOEt, les oligomères restent majoritaires. De plus, pour le suivi de la formation des dimères, une méthode de séparation par UHPLC a été mise en place (Figure 30). Le produit **22** isolé, le dimère désiré produit selon le protocole de Bunzel *et al.* et le sinapate d'éthyle sont utilisés comme standard. Un pic majoritaire est observé, ne correspondant à aucun des standards introduits. L'oxydation enzymatique produit une espèce radicalaire, les délocalisations possibles pour le radical nous font penser que ce produit est possiblement le dimère β-O-4. La laccase ne permet donc ni sélectivité entre les dimères, ni des dimères envers les oligomères. Nous nous tournons donc vers une autre classe d'enzyme capable de réaliser l'oxydation des composés phénoliques, les peroxydases.

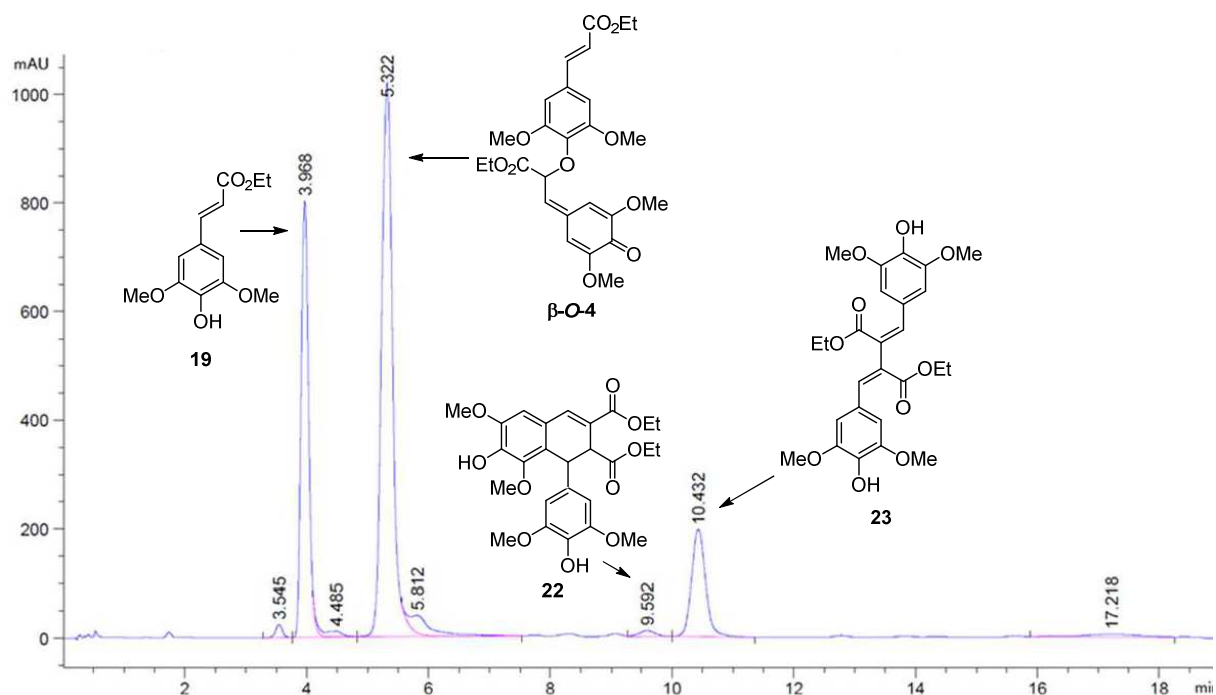


Figure 29 : Exemple de chromatogramme obtenu lors de la dimérisation enzymatique initiée par la laccase de *Trametes versicolor* (conditions eau MilliQ/AcOEt 1/1, 50 °C, ajout de 25 U/mmol, débit 10 mL.h⁻¹)

En effet, la littérature rapporte des couplages β-β réalisés par action de peroxydases.^{199–201} De plus, ces dernières sont connues pour présenter une affinité faible pour les substrats de type sinapique.²⁰² Cette dernière caractéristique pourrait permettre de limiter la formation des oligomères. Le milieu biphasique ne convient pas aux peroxydases de raifort testées (HRP IV et II), le sinapate d'éthyle n'étant pas consommé. Un milieu composé d'eau MilliQ et d'acétone (1:1) permet l'activité des peroxydases, cependant bien que nous n'observions plus de précipité, les oligomères restent majoritaires. Cette constatation va dans le sens des données bibliographiques, une affinité moins forte des peroxydases

pour les noyaux de type sinapique conduisant à des oligomères de masses moléculaires plus faibles mais ne permettant pas d'arrêter le processus au stade du dimère. De plus, le dimère **22** et le dimère β -O-4 sont formés en quantité plus importante que le dimère β - β . Un milieu biphasique semble indispensable pour réduire la proportion du dimère **22** au profit du composé désiré **23** en empêchant l'étape d'hydratation.

Nos essais de catalyse enzymatique s'étant révélés infructueux, nous décidons de nous tourner vers une catalyse métallique en nous inspirant de ce que nous connaissons du site actif de la laccase.

Dimérisation au cuivre (I)

Le site actif des laccases est occupé par quatre atomes de cuivre ; un atome de cuivre (I) relativement éloigné des trois autres atomes de cuivre de types (II) et (III). Le premier est responsable de l'oxydation des composés phénoliques. Les trois autres atomes de cuivre permettent de transférer l'électron (issu de l'oxydation) à l'oxygène qui sert de co-facteur à l'enzyme. Le cuivre (I) présent dans la poche du site actif de l'enzyme est coordonné par deux résidus histidine, H395 et H458 (Figure 31).²⁰³ Nous souhaitons mimer cet environnement pour réaliser la dimérisation.

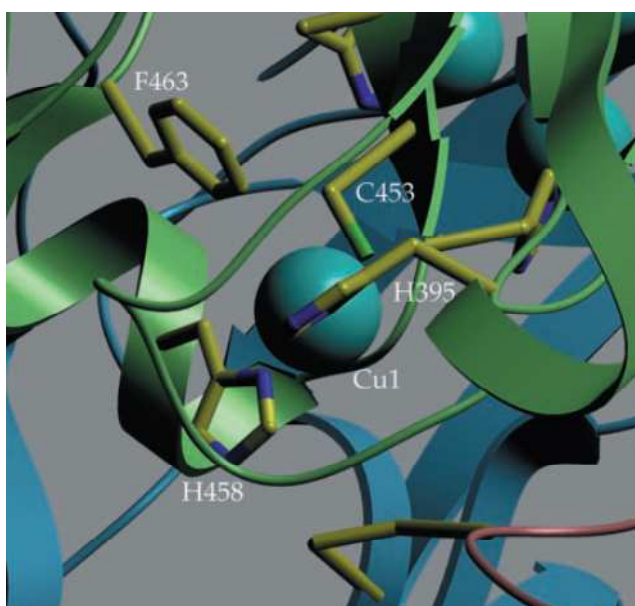


Figure 30 : Environnement du Cu (I) pour la laccase de *Trametes versicolor* (Piontek et al. 2002)

Le bromure de cuivre est choisi comme source de cuivre (I) et la pyridine comme substitut de l'histidine. La réaction est investiguée dans des conditions où le sinapate d'éthyle est dissous dans la pyridine pour atteindre une concentration de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, puis le bromure de cuivre (I) est ajouté en quantité catalytique (10 mol%) (Schéma 43). Le milieu est chauffé à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 h sous agitation. Après traitement et purification du brut réactionnel, le produit désiré **23** est isolé avec 62% de rendement. Dans ces conditions, il n'y a pas de transposition du produit en **22**, et de surcroît une sélectivité totale est observée pour le dimère β - β , le dimère β -O-4 n'étant pas détecté.

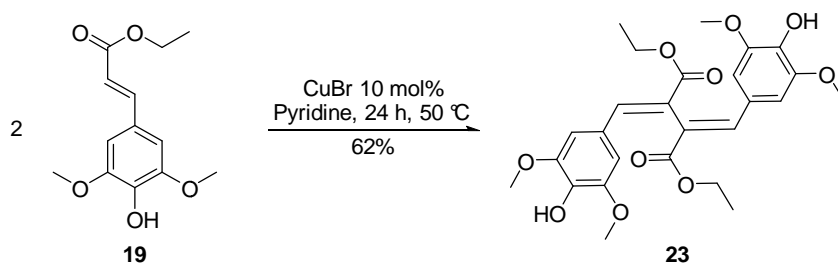


Schéma 43 : Synthèse non optimisée du disinapate de diéthyle β - β

Nous avons réussi à découvrir des conditions opératoires permettant d'obtenir le dimère β - β avec un rendement correct, cependant celles-ci sont loin de satisfaire les exigences de la chimie durable. Le point le plus critique est l'utilisation de la pyridine dans le double rôle de ligand et de solvant.²⁰⁴ Le premier effort a alors consisté à substituer la pyridine « solvant » par un solvant plus éco-compatible. L'éthanol, l'acétate d'éthyle et le Cyrene™ ont été testés dans ce rôle en conservant un équivalent de pyridine dans le milieu (soit 10 équivalents par rapport au cuivre (I)). Seul le Cyrene™ a permis d'obtenir le produit désiré (Figure 32).

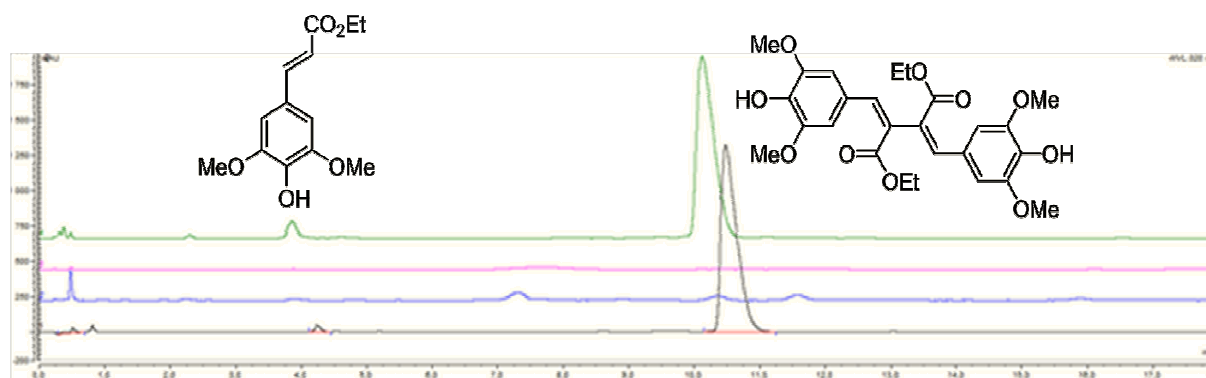


Figure 31 : Chromatogrammes des réactions de dimérisation du sinapate d'éthyle dans la pyridine (noir), l'acétate d'éthyle (bleu), l'éthanol (rose) et le Cyrene™ (vert) enregistrés à 320 nm

Pour confirmer la nécessité de la pyridine dans le rôle de ligand, une expérience sans pyridine a été menée, et aucune conversion du sinapate d'éthyle n'a été observée. L'activation du cuivre est donc nécessaire. D'autres amines ont été testées pour cette activation : la triéthylamine et la 4-*N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP). Avec cette dernière, le résultat obtenu est très similaire à celui avec la pyridine alors qu'avec la triéthylamine, deux produits sont identifiés, le dimère désiré **23** et le produit de transposition **22**. L'aromaticité de l'amine semble donc nécessaire pour initier une bonne sélectivité. Parmi les amines aromatiques, nous n'avons pas identifié de dérivé susceptible d'être significativement moins toxique que la pyridine.

Nous avons également souhaité confirmer le mécanisme de régénération du Cu (I) grâce à l'oxygène de l'air et ce malgré l'absence de la triade de cuivre (II) et (III) présente au sein de l'enzyme. Une expérience est conduite sous atmosphère inerte. Pratiquement, nous avons appliqué un flux de diazote. La conversion extrêmement faible pour cette réaction (5%) confirme que l'oxygène est nécessaire pour la régénération du cuivre (Schéma 44).

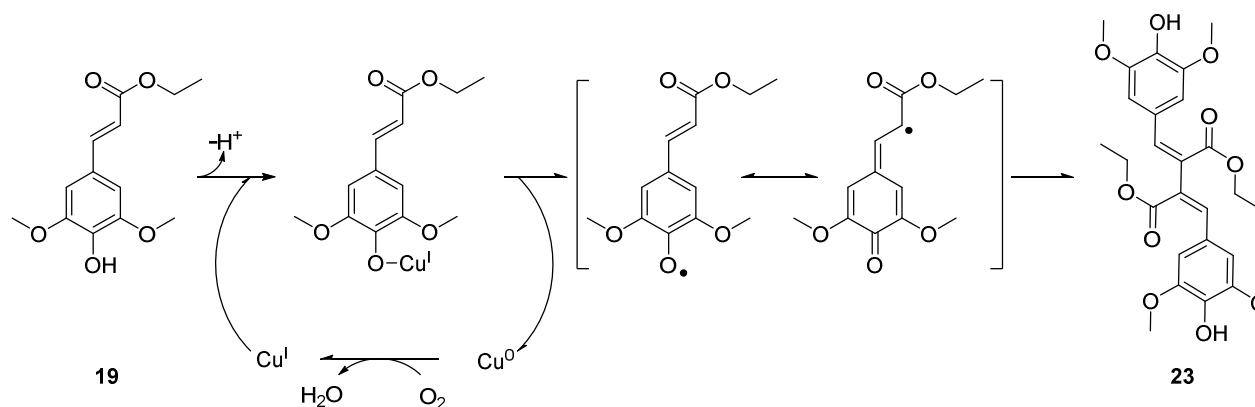


Schéma 44: Mécanisme de l'oxydation catalysée au cuivre

Un nouvel essai, visant à réduire la quantité de pyridine à 0,5 équivalent a été conduit avec succès (63% de rendement). Un suivi cinétique a été ensuite réalisé pour améliorer le temps de réaction initialement fixé à 24h (Figure 33). Bien que la conversion du sinapate d'éthyle progresse tout au long du suivi effectué pour atteindre 100% au bout de 24 h, la production de disinapate de diéthyle connaît un maximum vers 7 h (69%) avant de légèrement diminuer. La quantité de sous-produits augmente donc fortement après 7 h de réaction.

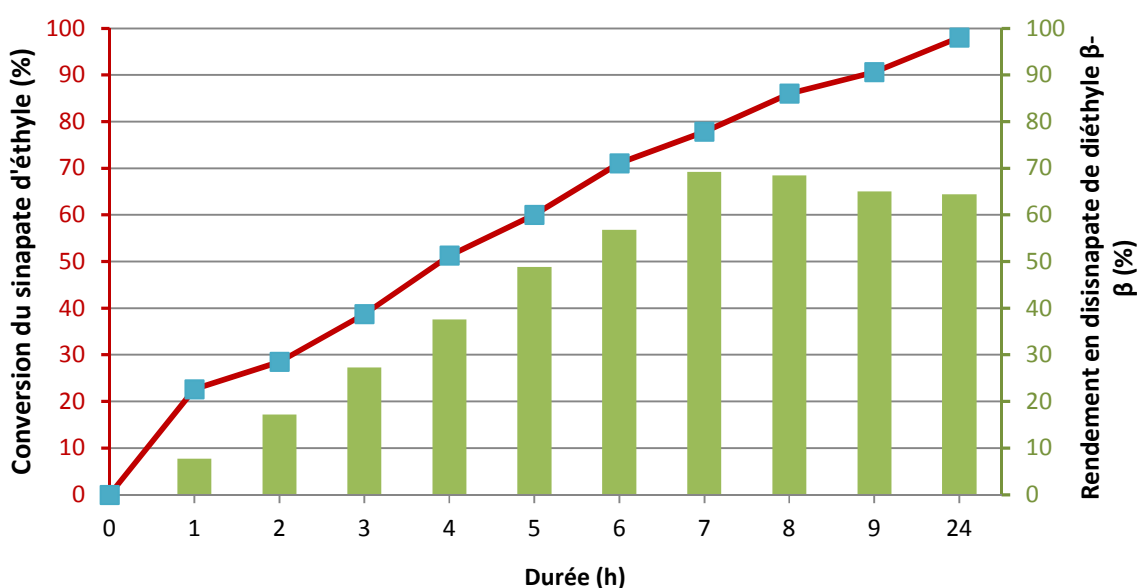


Figure 32 : Suivi cinétique de la réaction par HPLC

Pour aller plus loin dans l'étude de cette réaction, nous avons mis en place un plan d'expériences afin de comprendre les paramètres importants influençant le rendement et ainsi déterminer un optimum.

Optimisation par plan d'expériences de la dimérisation au cuivre (I)

Nous avons choisi de construire ce plan d'expériences autour de quatre variables : la température (Temp), le ratio entre le substrat et le catalyseur (S/C), le ratio entre l'amine et le catalyseur (A/C) et enfin la concentration en substrat dans le milieu. Les intervalles de chaque paramètre ainsi que leur équivalent centré réduit sont indiqués dans le tableau 15. Le temps quant à lui est fixé à 7 h suite à l'étude cinétique précédemment effectuée. La matrice est générée par le logiciel Modde pour un design « cubique faces centrées » (Tableau 16), et au total ce plan génère 27 expériences dont le triplicat du point central.

Tableau 14 : Variables indépendantes et leur niveau utilisé par le plan d'expériences

Variables	Niveaux		
	-1	0	1
Temp (°C)	25	47,5	70
Ratio S/C	2	6	10
Ratio A/C	1	5,5	10
Conc. (mol/L)	0,25	1,375	2,5

Tableau 15 : Matrice du plan d'expériences

Exp	Ordre	Température (°C)	Ratio Substrat/Cat	Ratio Amine/Cat	Concentration (mol.L ⁻¹)	Rendement (%)	Conversion (%)
N1	3	25	2,01	1	0,249	0,01	0,01
N2	14	70	2,03	1	0,247	0,01	7,58
N3	15	25	10,1	1	0,249	0,01	0,01
N4	27	70	10	1	0,25	0,01	0,01
N5	17	25	2,01	10	0,249	0,01	0,01
N6	4	70	2,01	10,1	0,246	1,63	3,26
N7	7	25	9,95	10,02	0,251	2,84	5,68
N8	23	70	10,2	10	0,246	16,83	20,71
N9	9	25	1,99	1,01	2,49	0,01 ^a	33,31
N10	10	70	2,01	1,02	2,447	3,41	59,34
N11	1	25	10,1	1	2,49	12,27	81,05
N12	11	70	10,2	1	2,447	4,22	83,89
N13	24	25	2,02	10	2,48	3,88	27,71
N14	5	70	2	10,07	2,487	34,49	97,08
N15	12	25	9,91	10,02	2,52	35,49	94,8
N16	20	70	10,3	9,99	2,428	26,23	99,99
N17	13	25	6,02	5,5	1,358	34,99	56,7
N18	26	70	6,06	5,49	1,358	40,78	98,37
N19	21	47,5	1,99	5,51	1,374	55,79	64,59
N20	16	47,5	10,47	5,3	1,358	69,77	99,99
N21	25	47,5	5,99	1	1,368	7,32	88,61
N22	22	47,5	6,02	10,02	1,363	53,29	79,64
N23	8	47,5	6,06	5,5	0,248	5,41	11,18
N24	6	47,5	6	5,51	2,497	49,87	98,69
N25	18	47,5	5,98	5,51	1,374	89,05	98,02
N26	19	47,5	6,02	5,51	1,363	83,3	95,4

N27	2	47,5	6,03	5,51	1,363	81,46	97,01
N28	28	70	2,01	10,1	0,246	0,01	28,68
N29	29	70	2	10,07	2,487	35,7	88,56
N30	30	25	9,91	10,02	2,52	61,11	95
N31	31	25	6,02	5,5	1,358	57,5	75,11
N32	32	47,5	6,02	10,02	1,363	53,02	60,59

a : Valeur exclue

Les réponses que nous avons souhaitées suivre sont le rendement en dimère β - β (Y1) ainsi que la conversion du sinapate d'éthyle (Y2). Ces données ont été obtenues suite à une analyse en HPLC en comparaison avec une gamme d'étalonnage pour chacun des produits. Après traitement des données à l'aide du logiciel Modde, malgré de bons coefficients de régression ($R^2 = 0,95$) et de prédiction ($Q^2 = 0,81$), la régression générée ne permet pas d'ajuster pleinement le modèle (validité du modèle $< 0,25$). En effet, l'erreur interne du modèle reste supérieure à la répétabilité au point central (0,99) et ce malgré l'exclusion d'un point aberrant pour le rendement (N9) et l'application d'une transformation mathématique de type logarithmique pour cette même réponse. Les points présentant la plus forte variation par rapport à la prédiction sont dupliqués (expériences N28 à N32). Une fois ces nouvelles données incluses, tous les paramètres sont validés, que ce soit pour le rendement : $R^2 = 0,88$, $Q^2 = 0,77$, validité = 0,92 et répétabilité = 0,85 ; ou pour la conversion du sinapate d'éthyle : $R^2 = 0,94$, $Q^2 = 0,90$, validité = 0,64 et répétabilité = 0,93. L'analyse de la variance, réalisée à l'aide des outils statistiques du logiciel Modde utilisé ici, permet d'établir que les équations générées sont significatives avec une marge d'erreur du même ordre de grandeur que celle expérimentale. Les équations avec les valeurs réelles des variables sont données ci-dessous :

$$\text{Log}(Y1/100 - Y1)$$

$$= -6.9034 + 0.0840X1 + 0.0420X2 + 0.4879X3 + 3.6926X4 - 0.0010X1^2 \\ - 0.0469X3^2 - 0.7730X4^2 + 0.0023X1X3 + 0.0195X2X3 - 0.0495X2X4 \\ - 0.0478X3X4$$

$$Y2 = -75.7650 + 1.7907X1 + 3.5114X2 + 5.8929X3 + 77.7829X4 - 0.0142X1^2 - 0.6055X3^2 \\ - 23.8050X4^2 - 0.0740X1X2 + 0.0369X1X3 + 0.1547X1X4 + 1.9015X2X4$$

Pour l'interprétation du modèle, nous nous intéresserons à la figure 34 ci-après montrant les coefficients pour chaque variable centrée réduite. Cette représentation permet immédiatement de constater si une variable montre une incidence positive (coefficient positif) ou négative (coefficient négatif) sur la réponse concernée. Ici les variables indépendantes ont toutes des coefficients positifs, que ce soit pour le rendement ou la conversion, faisant penser que l'augmentation des facteurs est bénéfique à la réaction, notamment la concentration qui a le coefficient le plus élevé. Cependant, les effets carrés de ces mêmes facteurs sont négatifs, montrant qu'un optimal peut être atteint. En effet, un coefficient carré négatif montre que plus la valeur du terme s'éloigne du point central, plus son impact sera important sur la perte de rendement ou de conversion. Une fois encore le coefficient le plus important est celui lié à la concentration. Pour les interactions quadratiques, elles influencent moins fortement les réponses mais permettent d'affiner le modèle.

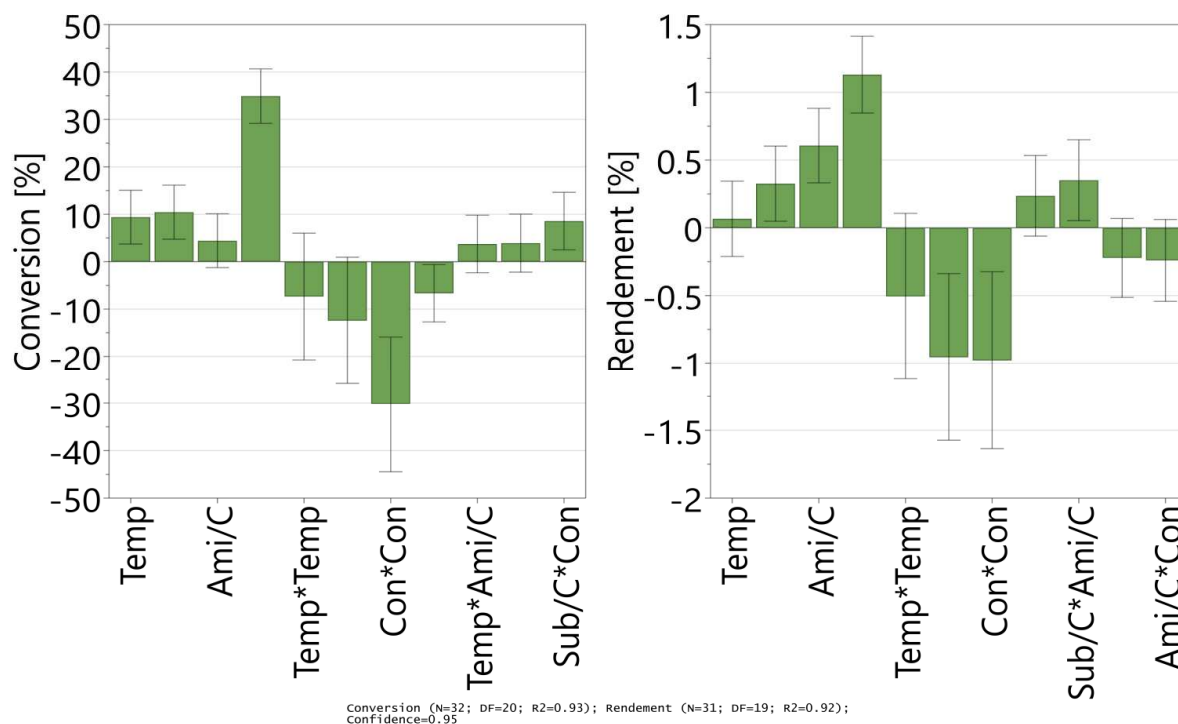


Figure 33 : Coefficients des variables centrées réduites pour le modèle de la conversion du sinapate d'éthyle (à gauche) et le modèle du rendement en disinapate de diéthyle (à droite)

L'analyse des données statistiques est facilitée par l'utilisation des surfaces de réponses (Figure 35). La représentation sous forme de carte de chaleur permet immédiatement de visualiser les conditions d'obtention d'une bonne conversion ou d'un bon rendement.

Alors que la « zone chaude » est très étendue pour la conversion, montrant qu'un grand nombre de conditions opératoires permet d'atteindre une forte conversion, elle est beaucoup plus restreinte pour le rendement en dimère β - β . Il faut donc choisir soigneusement les conditions opératoires pour obtenir une bonne sélectivité. La température optimale va se situer entre 40 et 55 °C pour une concentration importante de l'ordre de 1,5 à 2,0 mol.L⁻¹ qui toutefois n'est pas la limite maximale de notre plan d'expériences (2,5 mol.L⁻¹). En revanche seule la quantité maximum de catalyseur maximise le rendement. Cependant une quantité d'amine et donc un ratio amine/catalyseur intermédiaire apporte de meilleurs résultats qu'un ratio plus élevé.

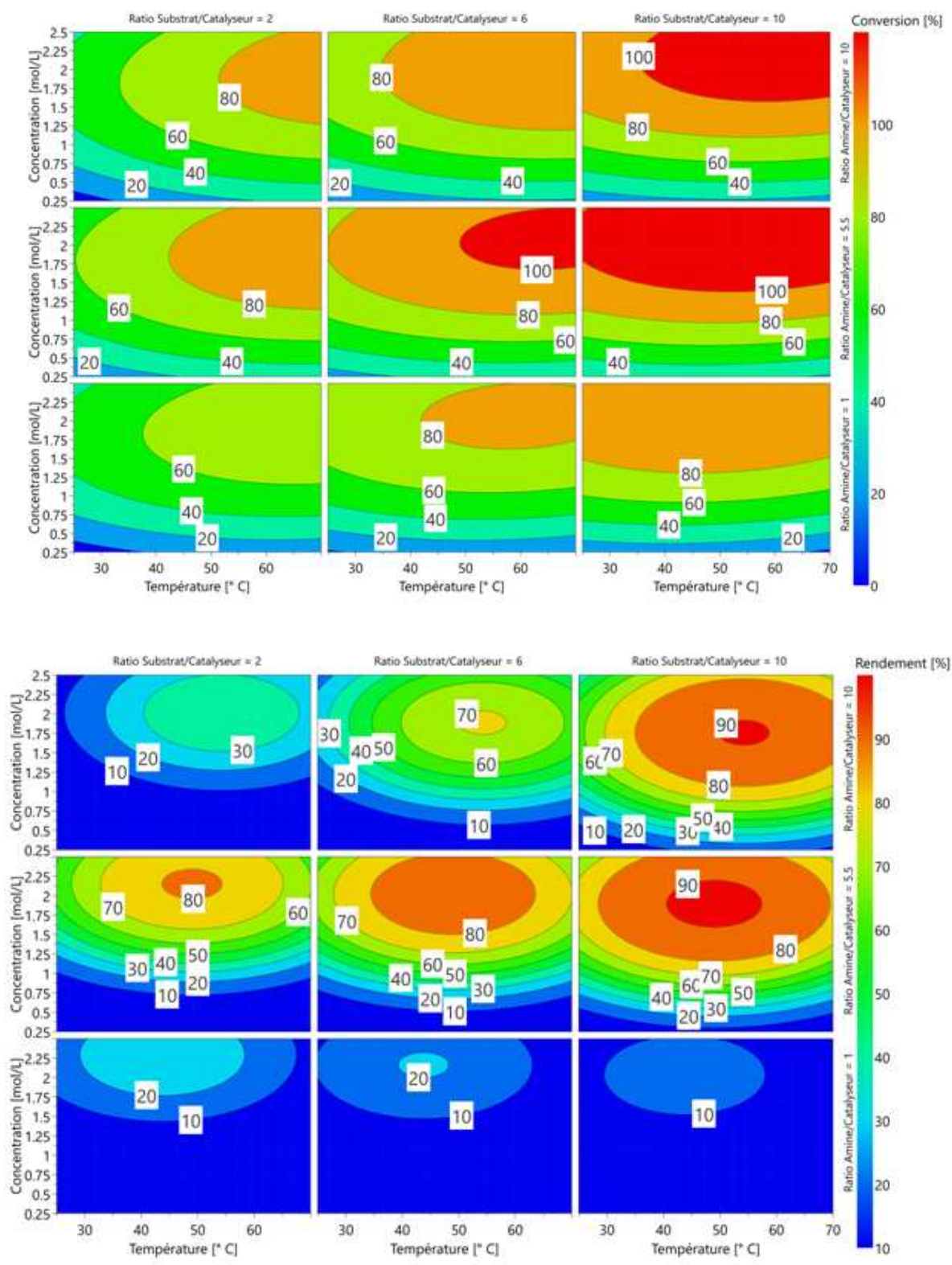


Figure 34 : Surfaces de réponses obtenues pour la conversion du sinapate d'éthyle (en haut) et le rendement en disnapate de diéthyle (en bas)

L'algorithme de type Nelder Mead du logiciel Modde a généré des conditions optimales que nous testons en duplicata pour valider expérimentalement les résultats statistiques (Tableau 17).

Tableau 16 : Conditions opératoires optimales d'après le logiciel Modde et les réponses expérimentales obtenues

Conditions	Temp (°C)	S/C	A/C	Conc (mol/L)	t (h)	Conv (%)	Yield (%)
Prédites	51,5	10	7,6	1,81	7	100	84-98
Expérimentales	51,5	10	7,6	1,81	7	99/100	89/88

Bien que le maximum ne soit pas atteint pour le rendement, nous sommes dans la fourchette de l'estimation fournie par le logiciel, et par conséquent les résultats statistiques sont validés.

Grâce à cette optimisation, nous avons gagné en concentration de manière importante, de 0,5 à 1,81 mol.L⁻¹, soit 1,45 L de solvant économisé par mole de réactif, ceci sans augmenter fortement la température ou les quantités d'amine et de catalyseur.

Si nous réutilisons les indicateurs évoqués dans le chapitre 1 que sont le PMI et l'Ecoscale, le PMI passe de 14,3 pour la procédure non optimisée à 4,6 pour la procédure optimisée, et ce, sans prendre en compte le traitement et la purification (Tableau 18). Globalement, la réaction est 3 fois moins consommatrice de produits. La réaction optimisée a un Ecoscale excellent de 81/100 sans tenir compte du traitement et de la purification, celui-ci restant très bon (78/100) avec le traitement (étant donné que la réaction ne nécessite pas de purification une fois optimisée). *A contrario*, la réaction non optimisée est fortement impactée par son rendement moyen (62 %, 19 points de pénalité), ce qui nécessite une purification par chromatographie (10 points de pénalité supplémentaires), l'Ecoscale chutant alors à 52/100. Il est de plus à signaler que les points de pénalité liés à la sécurité sont dus à l'usage de la pyridine, hautement inflammable, aspect que nous réduisons fortement dans la procédure optimisée.

Tableau 17 : Calcul des points de pénalité de l'Ecoscale pour la réaction non optimisée et pour la réaction optimisée

Catégorie	Points de pénalité de la réaction non optimisée	Points de pénalité de la réaction optimisée
Rendement	19	6
Prix des réactifs	3	0
Sécurité	10	10
Besoin technique	0	0
Température/Temps	3	3
Traitement/Purification	13	3
Total	48	22

Généralisation de la méthode à une librairie d'esters sinapiques

Par la suite, la méthode développée a été appliquée à une série d'esters sinapiques synthétisés au laboratoire soit par estérification de Fischer¹⁸⁷ ou de Steglich²⁰⁵ à partir de l'acide sinapique, soit par Knoevenagel-Doebner à partir du syringaldéhyde.¹⁷² Ces synthèses ont été réalisées par Cédric Peyrot et Matthieu Mention ainsi que par moi-même. Matthieu a par la suite mis en œuvre la dimérisation avec

deux méthodes, l'initiale utilisant la pyridine comme solvant et celle optimisée. Les rendements après purification par chromatographie flash sont reportés dans le tableau décrit ci-après (Tableau 19).

Tableau 18 : Rendements obtenus pour la dimérisation de différents esters sinapiques suivant les deux procédures

Composé	R	Rendement pour la procédure non optimisée (%)	Rendement pour la procédure optimisée (%)
23		62	89
24		64	90
25		55	88
26		58	89
27		58	91
28		42	87
29		42	88

Les rendements optimisés sont du même ordre de grandeur pour toutes les molécules testées, ce qui confirme que la procédure est généralisable à l'ensemble des esters sinapiques.

Etude des propriétés antiradicalaires et anti-UVs

Afin de déterminer des relations structures-activités, quatre nouveaux composés sont synthétisés. Les modifications apportées à **23** ont porté sur la protection du phénol par acétylation (composé **30**) ou par méthylation (composé **31**), ainsi que sur la conjugaison qui a été diminuée soit par hydrogénation pallado-catalysée des doubles liaisons (composé **32**), soit par réduction sélective des esters au DIBAL-H (composé **33**) (Schéma 45).

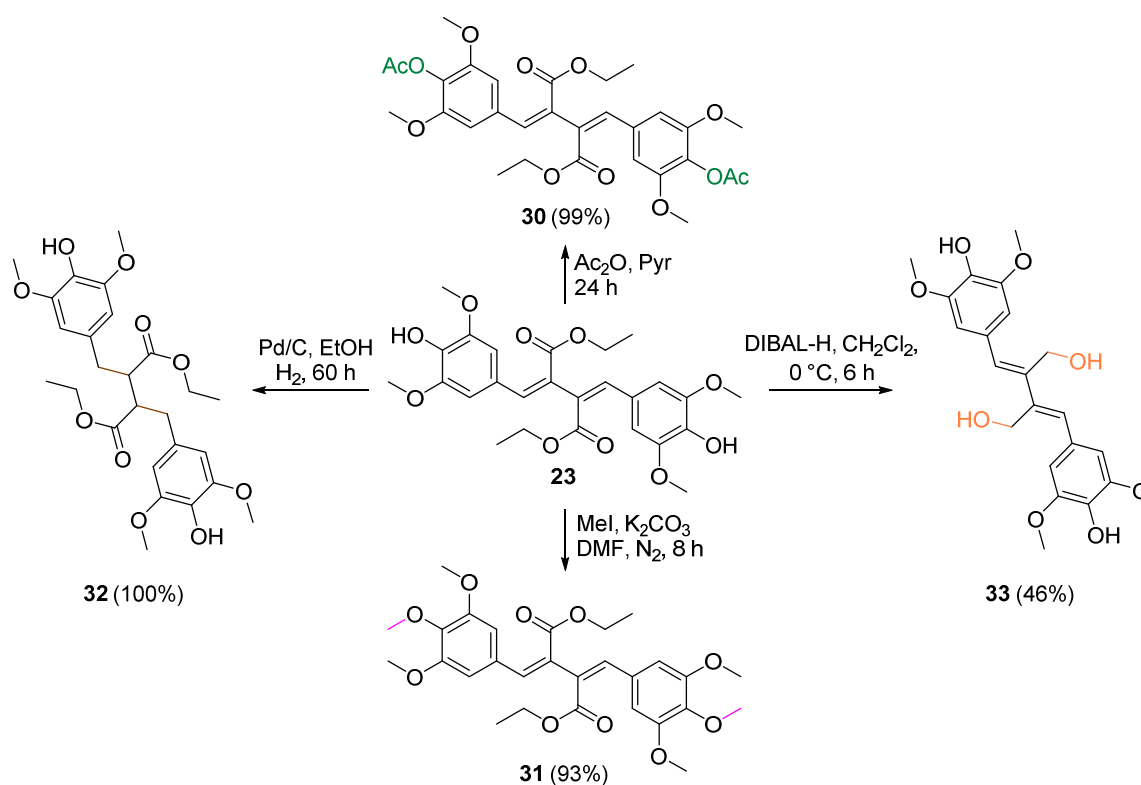


Schéma 45 : Modifications structurales de **23** pour obtenir les composés **31** à **34**

Propriétés anti-UVs

Spectres d'absorbance

Les spectres UV de chaque composé (**23** à **33**) sont réalisés dans l'éthanol ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et comparés au composé commercial utilisé en cosmétique (l'octinoxate), ainsi qu'au métabolite secondaire des plantes (l'acide *trans*-sinapoyl malique) (Figure 36).

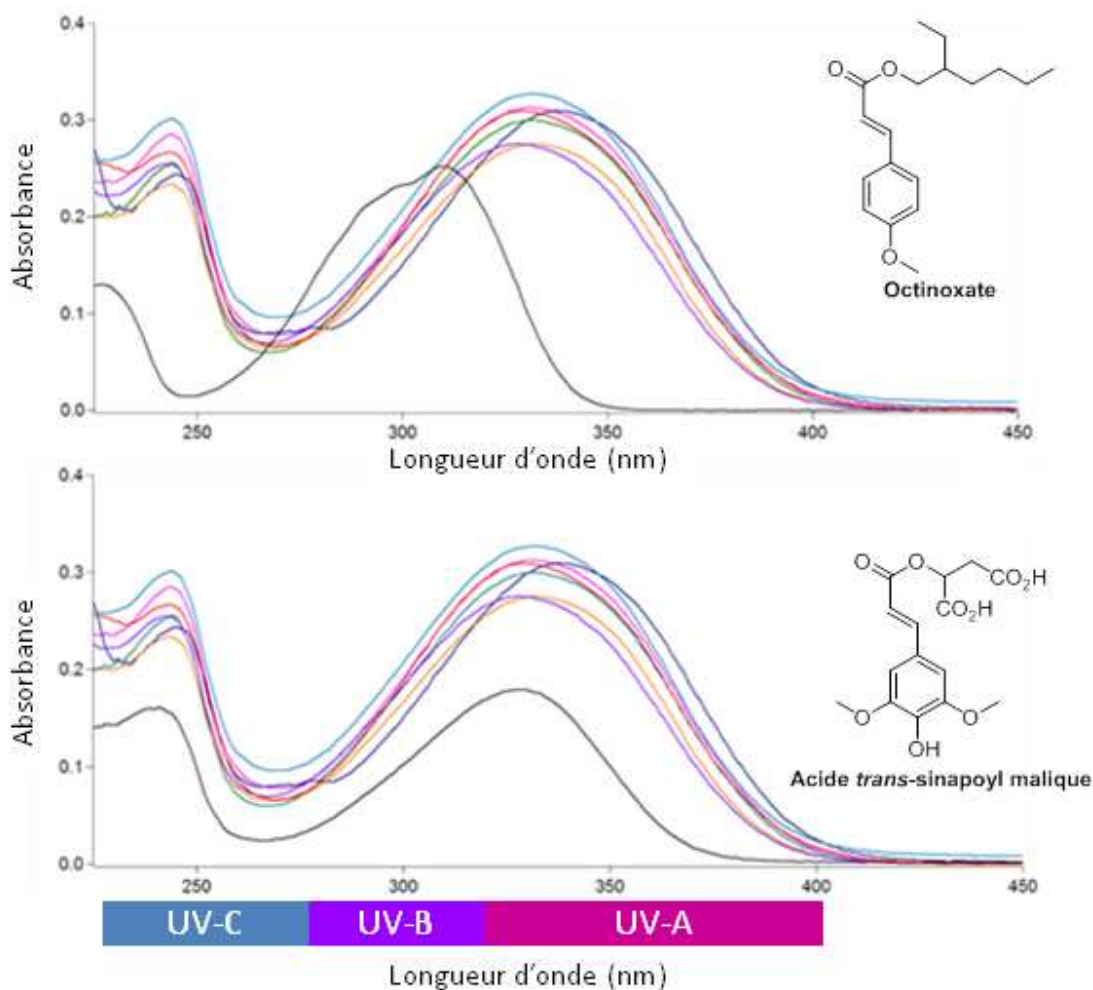


Figure 35 : Comparaison des spectres UV des dimères d'esters sinapiques et de l'octinoxate (en haut) et de l'acide *trans*-sinapoyl malique (en bas)

Tous les dimères testés présentent des spectres d'absorbance similaires (Figure 36), seul celui du sinapate de guaïacol est légèrement décalé par rapport aux autres, probablement du fait de la contribution du noyau aromatique du guaïacol. L'absorbance maximale de nos composés est supérieure à celle des composés de référence. Des augmentations de facteurs 1,4 et 1,6 sont observées respectivement pour l'octinoxate et l'acide *trans*-sinapoyl malique. Ce maximum d'absorption est centré autour de la même longueur d'onde (335 nm) pour l'acide *trans*-sinapoyl malique, et décalé par rapport à celui de l'octinoxate (310 nm). Nous pensons que cet effet bathochrome par rapport à l'octinoxate est lié au fait que les phénols de nos molécules sont libres. Enfin, le point majeur notable est l'élargissement de la bande d'absorption, puisqu'alors que l'acide *trans*-sinapoyl malique absorbe de 270 à 360 nm, nos composés absorbent de 270 jusqu'à 400 nm, couvrant ainsi l'ensemble des UV-A et des UV-B. Ces deux types d'UV sont principalement mis en cause dans les développements de cancers de la peau.²⁰⁶ Nos molécules pourraient ainsi permettre de simplifier les formulations cosmétiques et de limiter leur

toxicité. En effet, la benzophénone, composé pétro-sourcé et perturbateur endocrinien suspecté, est utilisé en tant qu'anti-UV-A.²⁰⁷

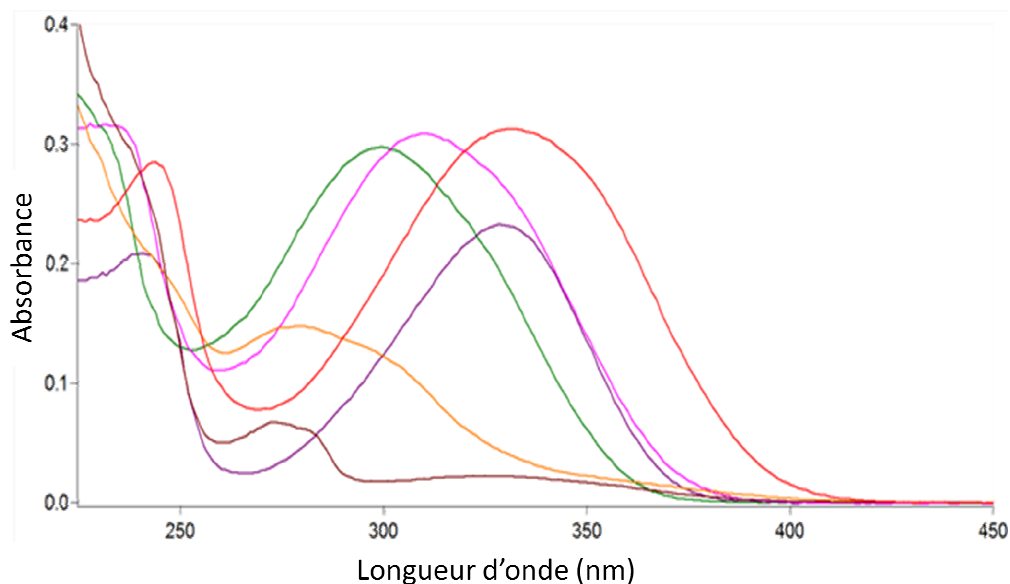


Figure 36 : Relations entre structure et absorbance UV

La comparaison du spectre d'absorbance du composé **23** (rouge) avec ceux des composés acétylé **30** (vert) et méthylé **31** (rose) confirme que l'effet bathochrome observé précédemment est bien lié à la protection de la fonction phénol (Figure 37). Celui-ci est plus marqué avec l'acétate (250-360 nm) comparativement aux données pour le dérivé méthylé (265-370 nm). De plus, l'intensité maximale de l'absorbance diminue très légèrement entre **23** et **31**, cette baisse étant plus prononcée dans le cas de **30**. Toutefois, l'intensité reste largement supérieure à celle du sinapate d'éthyle (violet). Pour les composés réduits (**32** et **33**), la perte d'intensité ainsi que le décalage de la zone d'absorption est spectaculaire. Pour **33**, bien que la conjugaison soit présente entre les deux noyaux aromatiques, la perte de la conjugaison avec l'ester conduit à la perte de la moitié de l'absorbance par rapport au sinapate d'éthyle, confirmant l'importance de la conjugaison avec l'ester pour anticiper des propriétés anti-UVs.

L'utilisation d'une combinaison de dimères β - β non protégés et acétylés pourrait permettre de couvrir avec une intensité maximum l'ensemble des UV-A et UV-B.

Stabilité

La stabilité des molécules sous irradiation UV a été testée dans un Rayonet équipé de 12 lampes UV à 254 nm. Le pourcentage de dégradation est évalué par rapport à la diminution du pic d'absorbance au λ_{\max} . Les résultats sont reportés dans la Figure 38.

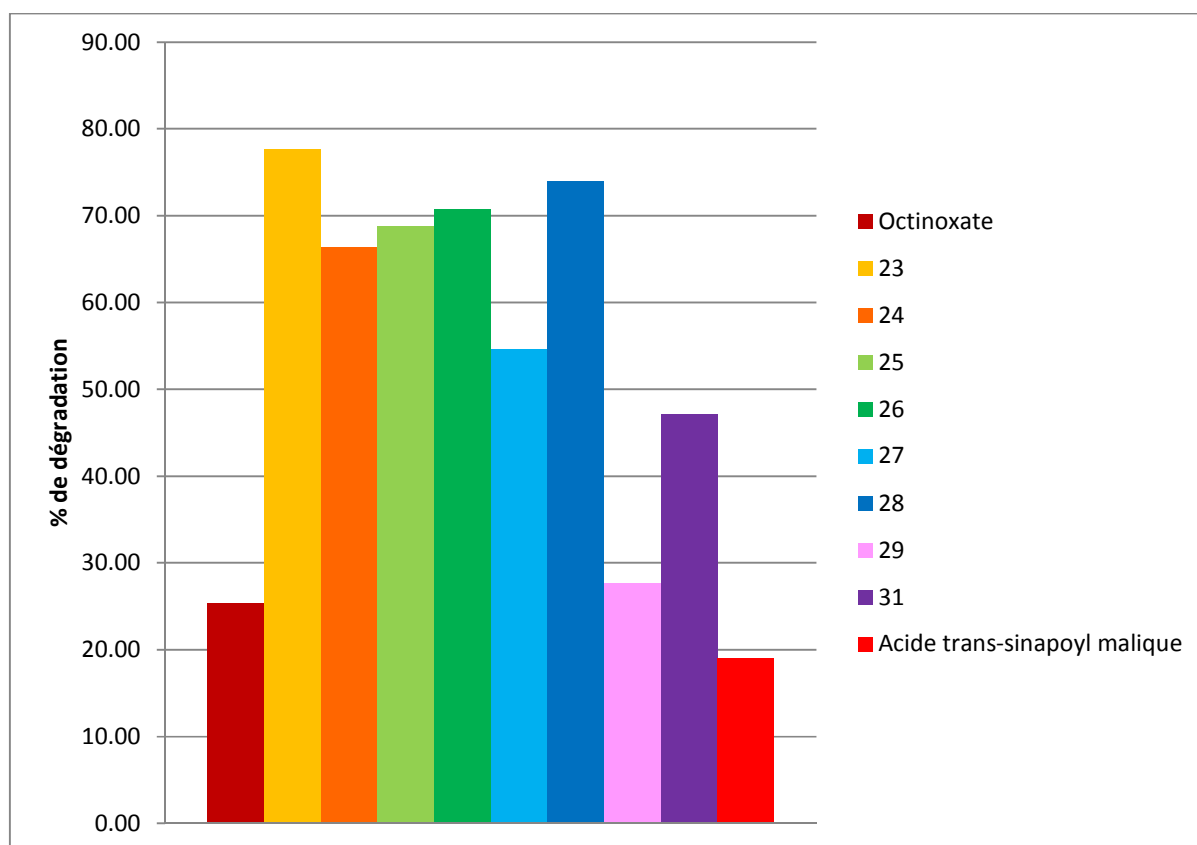


Figure 37 : Pourcentage de dégradation des dimères d'esters sinapiques 23 à 29 et 31 et des références (octinoxate et acide *trans*-sinapoyl malique) sous irradiation UV

Les dimères synthétisés sont très peu stables dans ces conditions par rapport à nos références avec des pourcentages de dégradation supérieurs à 50%, à l'exception du composé **29**, le dimère de *trans*-sinapoyl malate de *di**tert*butyle, qui présente une dégradation similaire à celle de l'octinoxate, et la molécule **31** qui correspond au dimère **23** méthylé. Il semblerait que la protection de la fonction phénol ainsi que la présence d'un groupement ester très encombrant soient des atouts pour la stabilité des dimères. Cependant, cette tendance ne se retrouve pas sur les monomères initiaux (Figure 39). En effet, la dégradation du sinapate d'éthyle méthylé (violet) est légèrement supérieure à celle du sinapate d'éthyle (jaune). De plus, aucune tendance nette ne se dégage quant à l'encombrement du groupement ester. En effet alors que nous avons une progression de la stabilité entre les dérivés diéthyl, diisopropyl et *di**tert*butyl dans le cas des dimères (jaune > vert foncé > bleu clair), celle-ci n'est pas retrouvée chez les monomères (isopropyl > *tert*butyl > éthyl soit vert foncé > bleu clair > jaune). De même le *trans*-sinapoyl malate de *di**tert*butyle est peu stable par rapport à l'autre monomère et moins stable que le dimère formé. Il n'est donc pas possible de prédire la stabilité du dimère par rapport à celle du monomère et inversement.

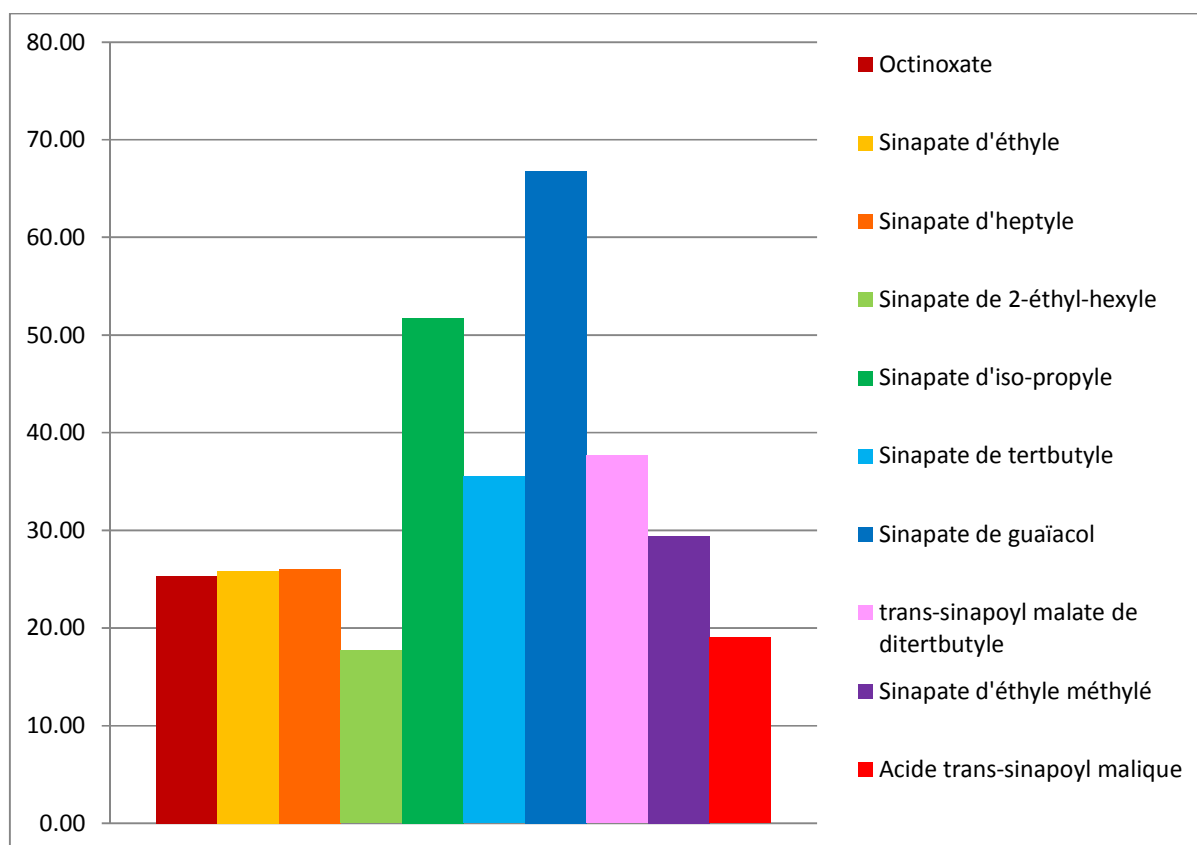


Figure 38 : Pourcentage de dégradation des esters sinapiques précurseurs des dimères et des références (octinoxate et acide trans-sinapoyl malique) sous irradiation UV

Propriétés antiradicalaires

Nos composés ont été comparés à deux antioxydants commerciaux largement utilisés, le BHT et la BHA. Le BHT se retrouve notamment dans de nombreuses formulations cosmétiques. Un test au radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, CAS n°1898-66-4) est couramment utilisé au laboratoire pour déterminer des activités antiradicalaires. Cependant, la réaction de nos composés avec le DPPH a généré des composés absorbant à 520 nm, la longueur d'onde permettant habituellement de suivre la décroissance du radical DPPH. Pour réaliser cette comparaison, nous nous sommes donc tournés vers une autre espèce radicalaire, l'ABTS^{•+}. Pour générer ce radical, une solution d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), CAS n° 250-396-6), et de peroxydisulfate de potassium (K₂S₂O₈, CAS n° 7727-21-1) a été préparée selon le protocole de Re et al.²⁰⁸

Tous nos composés présentent une activité antiradicalaire plus importante que celle du BHT. En effet, la quantité de réactif nécessaire pour la diminution de la population de radicaux de 50 % (EC50) est nettement plus faible pour nos molécules (2,73 - 6,51) que pour le BHT (8,65). En revanche, nos dimères présentent une activité assez similaire à celle du BHA, à l'exception des composés **29**, **32** et **33** qui présentent des activités plus marquées. L'activité supérieure de **32** par rapport à **23** est similaire à ce qui a été observé pour les macrobisphénols, où la réduction de l'insaturation entraîne une plus forte activité antiradicalaire. L'hypothèse avancée par Reano et al. est qu'une dismutation se produit, conduisant à la

régénération de la fonction phénol pour les molécules insaturées. Le composé **33** est également très efficace car l'alcool sinapylique montre une activité plus importante que celle des esters (Figure 40). La même explication est valable pour la molécule **29** dont le précurseur montre lui aussi une plus forte activité que les autres esters, probablement due à son très fort encombrement (Figure 41).

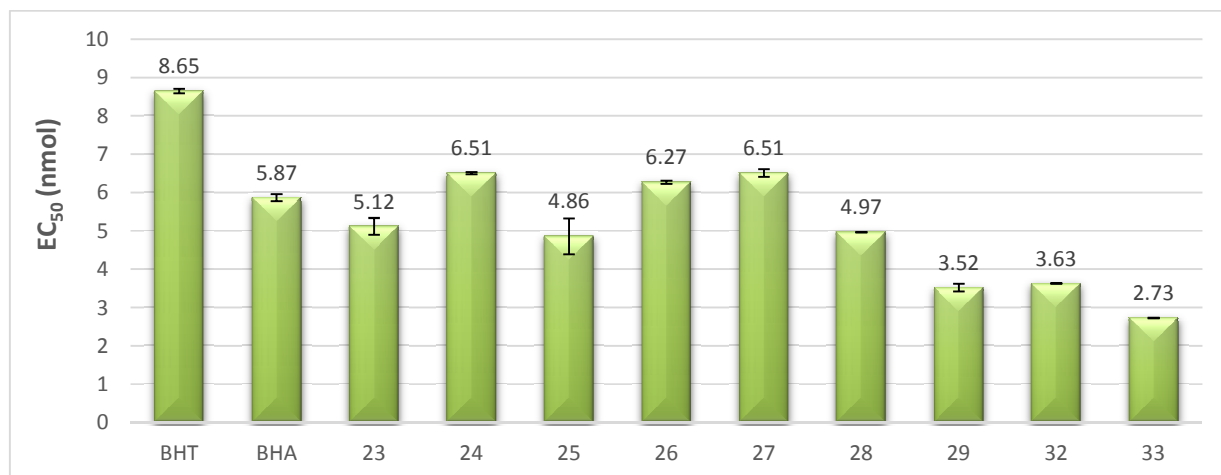


Figure 39 : Activité antiradicalaire des dimères β - β obtenus en comparaison du BHT et du BHA

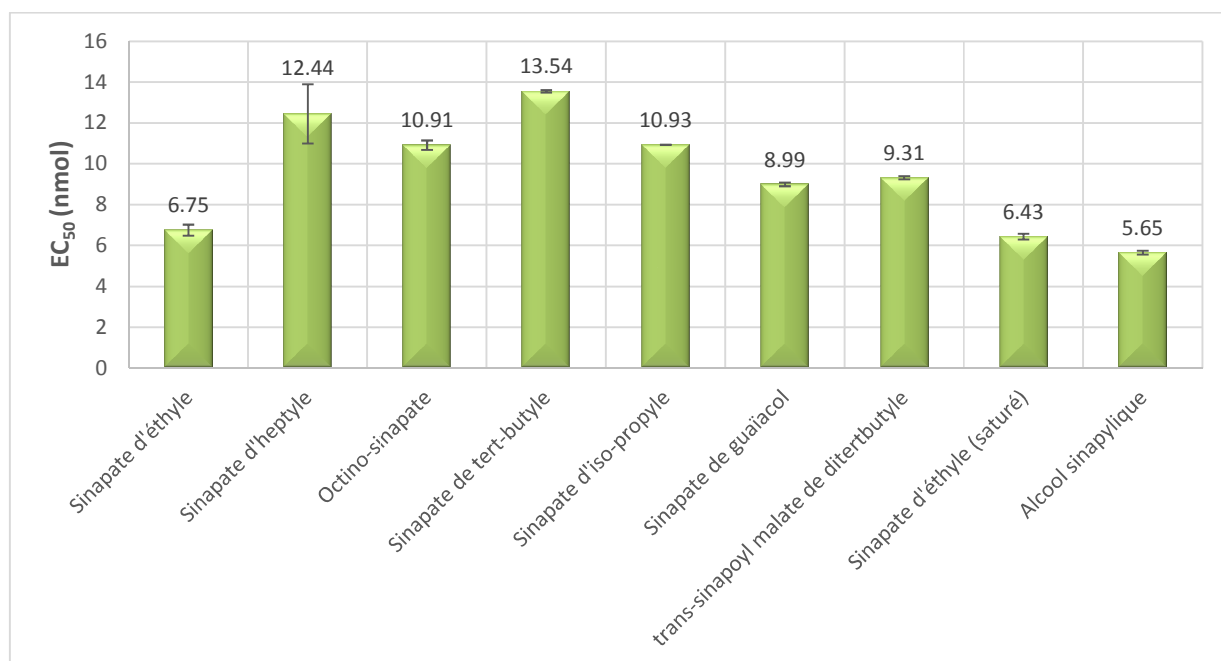


Figure 40 : Activité antiradicalaire des esters sinapiques précurseurs des dimères β - β

L'activité radicalaire étant liée aux fonctions phénoliques, nous désirons calculer le gain réel apporté par la dimérisation et pour cela nous réalisons le calcul suivant :

$$\text{Gain} = 1 - \frac{EC50 \text{ dimère}}{EC50 \text{ monomère}/2}$$

Les résultats reportés dans le tableau 20 montrent que la dimérisation n'apporte pas de gain réellement significatif, se révélant légèrement positif ou négatif selon les molécules.

Tableau 19 : Gain apporté par la dimérisation pour l'activité antiradicalaire

Dimères β - β	Gain
23	-0,52
24	-0,05
25	0,11
26	0,07
27	-0,19
28	-0,11
29	0,24
32	-0,13
33	0,03

Matériels et méthodes

Matériels

Le syringaldéhyde, le bromure de cuivre (I), l'aniline, la pyridine, l'acide malonique, l'heptanol, le *tert*-butanol, l'*iso*-propanol, le guaïacol, le carbonate de sodium, l'iodure de méthyle, l'acide acétique, la solution d'hydruure de diisobutyl aluminium 1M dans le dichlorométhane (DIBAL-H), le palladium sur charbon (10% m/m), le persulfate de potassium, la laccase de *Trametes versicolor* et les peroxydases de raifort (HRP II et HRP IV) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'acide de Meldrum, l'ABTS et le 2-éthylhexanol ont été achetés chez TCI. Le HCl concentré ainsi que les solvants ont été achetés chez Fisher Scientific. Le Cyrene™ a été offert par Circa Group LTD. Les solvants deutérés sont fournis par Euriso-top. Tous les réactifs ont été utilisés tels quels.

Les évaporations ont été conduites sous pression réduite (Vario Vacuubrand pump) à l'aide d'un Buchi R300. Les chromatographies Flash ont été réalisées à l'aide d'un Puriflash 4100 (Interchim) avec des colonnes pré-packées INTERCHIM PF-30SI-HP (30 μ m silica gel). Les analyses infrarouges ont été réalisées à l'aide d'un Cary 630 FTIR (Agilent). Les spectres RMN sont enregistrés sur un Fourier 300 (Bruker). Les spectres RMN ^1H des échantillons sont enregistrés à 300 MHz, le déplacement chimique étant reporté en partie par million (ppm) relativement au pic résiduel du solvant (CDCl_3 δ = 7,26 ppm ; DMSO-d_6 δ = 2,50 ppm ; Acétone-d_6 δ = 2.05 ppm). Les spectres RMN ^{13}C des échantillons sont enregistrés à 75 MHz et calibrés sur le pic résiduel du solvant (CDCl_3 δ = 77,16 ppm ; DMSO-d_6 δ = 39,52 ppm ; Acétone-d_6 δ = 29.84 ppm). Les spectres UV/Visible sont enregistrés dans l'éthanol ($C = 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans des cuvettes en quartz à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis (Agilent). Les points de fusion sont réalisés sur MP50 (Mettler Toledo) avec des tubes capillaires ME-18552 suivant un programme de chauffe de 2 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ de 40 $^{\circ}\text{C}$ à 170 $^{\circ}\text{C}$. Les analyses HPLC sont conduites sur un système Ultimate 3000 (ThermoFischer) équipé de deux détecteurs (un DAD à 320 nm et un corona ultra RS) et d'une colonne

Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1*50 mm*1,8 μm) sous un débit de 0,6 mL.min⁻¹ à 30 °C. Un gradient est appliqué de 75/25 à 70/30 acétonitrile/eau MilliQ sur 18 min. Les spectres de masse haute résolution sont réalisés par la plateforme PLANet de l'URCA sur un Micromass GC-TOF. Le logiciel Modde v.12.0 (Umetrics AB, Suède) est utilisé pour générer le design CCF, analyser les données expérimentales, déterminer les coefficients significatifs du modèle et établir l'équation de modélisation ainsi que fournir les informations statistiques (R^2 , Q^2 , reproductibilité, validité) nécessaires pour valider la cohérence du modèle. Les tests d'activités antiradicalaires sont conduits à l'aide d'un Epoch 2 (Biotek) dans des plaques 96-puits.

Méthodes

Synthèses des esters sinapiques

Synthèse du sinapate d'éthyle (19)

Le syringaldéhyde (10 g, 55 mmol, C=4 M), l'acide malonique (8,6 g, 82,5 mmol, 1,5 équiv.), l'aniline (0,1 équiv.) et la pyridine (14 mL) sont introduits dans un ballon. Le milieu réactionnel est mis sous agitation à une température de 60 °C pendant 23 h. La solution est versée dans de l'eau glacée avant d'être acidifiée jusqu'à pH=2 à l'aide de HCl_{conc}. Le précipité obtenu est essoré, puis lavé jusqu'à pH neutre avec de l'eau. Une poudre jaune est obtenue (84%).

Point de fusion : 193 °C ; **FT-IR** (pur) : 3306 (OH), 1658 (C=O), 1513 (C=C_{ar}) cm⁻¹ ; **UV** : λ_{max} (EtOH, nm) 203, 218, 308 ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 3.79 (s, 6H, H₅), 6.42 (d, 1H, $J=15.9$ Hz, H _{α}), 6.99 (s, 2H, H₂), 7.49 (d, 1H, $J=15.9$ Hz, H _{β}), 8.92 (s, 1H, H_{phénol}), 12.14 (s, 1H, H_{acide}) ppm ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 56.1 (C₅), 106.0 (C₂), 116.1 (C _{β}), 124.6 (C₁), 138.0 (C₄), 144.9 (C _{α}), 148.0 (C₃), 168.0 (C _{γ}) ppm.

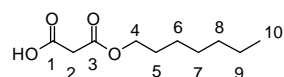
L'acide sinapique (20 g, 89,3 mmol, C=1 M), l'éthanol (90 mL) et quelques gouttes de HCl_{conc} sont introduits dans un ballon. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et chauffé à reflux pendant 28 h. Après refroidissement à température ambiante, l'éthanol est évaporé sous pression réduite pour donner une huile. Celle-ci est diluée dans 100 mL d'acétate d'éthyle puis lavée avec 3*50 mL de NaHCO_{3sat} et 50 mL de NaCl_{sat}. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporée après filtration. Un solide orange est obtenu (96%).

Point de fusion : 71 °C ; **FT-IR** (pur) : 3499 (OH), 1687 (C=O), 1512 (C=C_{ar}) cm⁻¹ ; **UV** : λ_{max} (EtOH, nm) 202, 239, 329 ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) δ : 1.25 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, H₇), 3.79 (s, 6H, H₅), 4.16 (quad, 2H, $J=7.2$ Hz, H₆), 6.53 (d, 1H, $J=15.9$ Hz, H _{α}), 7.03 (s, 2H, H₂), 7.55 (d, 1H, $J=15.9$ Hz, H _{β}), 8.97 (s, 1H, H_{phénol}) ppm ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) δ : 14.3 (C₇), 56.1 (C₅), 59.7 (C₆), 106.2 (C₂), 115.0 (C _{β}), 124.4 (C₁), 138.3 (C₄), 145.3 (C _{α}), 148.2 (C₃), 166.6 (C _{γ}) ppm.

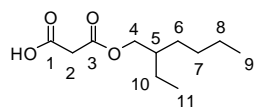
Synthèse des monoesters de malonate

- L'acide de Meldrum (5,0 g, 35 mmol) et l'heptan-1-ol ou le 2-éthyl-hexylalcool ou le gaiacol (35 mmol, 1 équiv.) sont fondus à 95 °C sous agitation. Après 3 h de réaction, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante, dilué dans l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl_{conc} jusqu'à

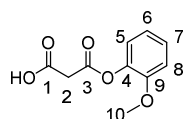
pH 1 et extraite à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées et séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et concentrées.



Malonate de monoheptyle (77%, huile incolore). **FT-IR** (pur) : 2926, 2856, 1714, 1463, 1410, 1318, 1150 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, CDCl_3) : δ 0,88 (t, 3H, J = 6 Hz, H_{10}), 1,29 (m, 8H, $\text{H}_{6,7,8,9}$), 1,65 (m, 2H, H_5), 3,44 (s, 2H, H_2), 4,17 (t, 2H, J = 6,7 Hz, H_4) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, CDCl_3) : δ 14,2 (C_{10}), 22,7 (C_9), 25,8 (C_8), 28,5 (C_5), 29,0 (C_7), 31,8 (C_6), 40,7 (C_2), 66,4 (C_4), 167,5 (C_3), 171,11 (C_1) ; **HRMS** (m/z) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}^+$: 225,1103, trouvé : 225,1103.

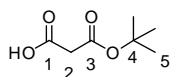


Malonate de mono-2-éthylhexyle (83%, huile jaune pâle). **FT-IR** (pur) : 2958, 2928, 2861, 1717, 1461, 1410, 1382, 1318, 1267, 1149 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 0,85 (m, 6H, $\text{H}_{9,11}$), 1,29 (m, 8H, $\text{H}_{6,7,8,10}$), 1,54 (m, 1H, H_5), 3,36 (s, 2H, H_2), 3,97 (s, 2H, H_4), 12,76 (s, 1H, H_{COOH}) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 10,8 (C_9), 14,0 (C_{11}), 22,4 (C_8), 23,1 (C_{10}), 28,3 (C_7), 29,7 (C_6), 38,1 (C_5), 41,7 (C_4), 66,6 (C_2), 167,0 (C_3), 168,1 (C_1) ; **HRMS** (m/z) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}^+$: 225.1103, trouvé : 225.1103.

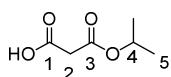


Malonate de monoguaiacol (60%, cristaux blancs). Les caractérisations menées sont conformes à celles reportées dans la littérature.²⁰⁹

- b) L'acide de Meldrum (4.0 g, 27.8 mmol) et un excès de *tert*-butanol ou d'isopropanol sont chauffés à reflux pendant au moins une nuit. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et l'excès d'alcool est évaporé.



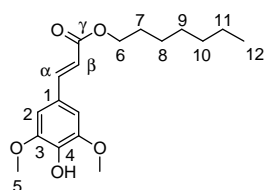
Malonate de mono-*tert*-butyle (97%, huile jaune pâle). Les caractérisations menées sont conformes à celles reportées dans la littérature.²¹⁰



Malonate de mono-iso-propyle (76%, huile jaune pâle). Les caractérisations menées sont conformes à celles reportées dans la littérature.²¹¹

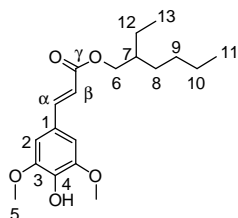
Protocole général de synthèse pour les esters de sinapyle à partir des mono-esters de malonate

Le mono-ester de malonate (8,6 mmol), le syringaldéhyde (1,89 g, 10,4 mmol, 1,1 équiv.), l'aniline (79 μL , 0,86 mmol, 0,1 équiv.) sont mis en solution dans la pyridine (5,7 mL). Le milieu réactionnel est agité une nuit à 60 °C. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec une solution de HCl 1M (10 mL), puis est extrait à l'acétate d'éthyle (2*10 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et concentrées. Les bruts réactionnels sont purifiés par chromatographie flash sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle.

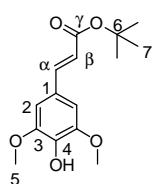


Sinapate d'heptyle, huile brune (72 %). **FT-IR** (pur): 3406, 2925, 2853, 1700, 1631, 1601, 1511, 1455, 1424, 1375, 1337, 1279, 1252, 1214, 1149, 1109 cm^{-1} ;

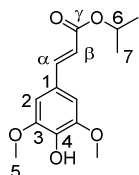
UV (Ethanol): λ_{\max} 202, 241, 330 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, Acétone-*d*6): δ 0,77 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz, H_{12}), 1,23 (m, 8H, $H_{8,9,10,11}$), 1,58 (m, 2H, H_7), 3,79 (s, 6H, H_5), 4,08 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, H_6), 6,19 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_β), 6,65 (s, 2H, H_2), 7,47 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_α) ppm ; **¹³C-RMN** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 14,1 (C_{12}), 22,6 (C_{11}), 26,0 (C_{10}), 28,8 (C_7), 29,0 (C_9), 31,8 (C_8), 56,3 (C_5), 64,7 (C_6), 105,0 (C_2), 116,0 (C_β), 125,9 (C_1), 137,1 (C_4), 144,9 (C_α), 147,2 (C_3), 167,3 (C_γ) ppm ; **HRMS** (m/z) : $[M+H]^+$ calculé $C_{18}H_{27}O_5$: 323,1858, trouvé : 323,1855.



Sinapate de 2-éthylhexyle, huile jaune orangée (66 %). **FT-IR** (pur) : 3407, 2928, 2858, 1699, 1631, 1598, 1511, 1455, 1424, 1377, 1337, 1278, 1252, 1214, 1148, 1109 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 202, 240, 332 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 0,88 (t, 6H, $J = 7,4$ Hz, $H_{11,13}$), 1,34 (m, 8H, $H_{8,9,10,12}$), 1,59 (m, 1H, H_7), 3,80 (s, 6H, H_5), 4,05 (dd, 2H, $J = 5,7, 2,0$ Hz, H_6), 6,53 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_β), 7,03 (s, 1H, H_2), 7,54 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_α), 9,00 (s, 1H, $H_{\text{phénol}}$) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 10,9 (C_{11}), 14,0 (C_{13}), 22,5 (C_{10}), 23,2 (C_{12}), 28,4 (C_9), 29,8 (C_8), 38,4 (C_7), 56,1 (C_5), 65,7 (C_6), 106,2 (C_2), 114,9 (C_β), 124,4 (C_1), 138,2 (C_4), 145,4 (C_α), 148,0 (C_3), 168,9 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[M+Na]^+$ calculé $C_{19}H_{28}O_5Na^+$: 359,1834, trouvé : 359,1835.

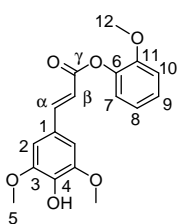


Sinapate de tert-butyle, poudre jaune pâle (56 %). **Point de fusion** : 68 - 71 °C ; **FT-IR** (pur) : 3388, 2970, 2933, 1706, 1631, 1598, 1511, 1463, 1424, 1367, 1333, 1308, 1248, 1222, 1133, 1096 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 202, 204, 238, 327 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, Acétone-*d*6) : δ 1.46 (s, 9H, H_7), 3.85 (s, 6H, H_5), 6.29 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_β), 6.95 (s, 2H, H_2), 7.46 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_α) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, Acétone-*d*6) : δ 28.4 (C_7), 56.6 (C_5), 80.1 (C_6), 106.5 (C_2), 118.0 (C_β), 126.2 (C_1), 139.1 (C_4), 145.0 (C_α), 148.8 (C_3), 166.9 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[M+Na]^+$ calculé $C_{15}H_{20}O_5Na^+$: 303.1208, trouvé : 303.1207.

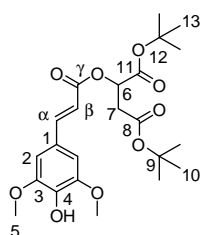


Sinapate d'iso-propyle (73%, huile jaune pâle). Les caractérisations menées sont conformes à celles reportées dans la littérature.²¹²

Sinapate de guaiacol (55%, solide jaune-orangé). **Point de fusion** : 158 - 160 °C ; **FT-IR** (pur) : 3377, 3062, 3021, 2936, 2842, 1716, 1603, 1496, 1458, 1426, 1380, 1338, 1307, 1286, 1248, 1213, 1154, 1106 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 201, 220, 242, 337 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 3,77 (s, 3H, H_{12}), 3,82 (s, 6H, H_5), 6,78 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_β), 6,97 (td, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz, H_7), 7,14 (m, 4H, $H_{2,8,9}$), 7,25 (td, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz, H_{10}), 7,73 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H_α), 9,08 (s, 1H, $H_{\text{phénol}}$) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 55,7 (C_{12}), 56,1 (C_5), 106,6 (C_2), 112,8 (C_8), 113,7 (C_β), 120,6 (C_7), 123,0 (C_9), 124,3 (C_1), 126,8 (C_{10}), 138,7 (C_4), 139,5 (C_6), 147,3 (C_α), 148,1 (C_3), 151,1 (C_{11}), 164,8 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[M+Na]^+$ calculé $C_{18}H_{18}O_6Na^+$: 353,1001, trouvé : 353,1002.



Synthèse du *trans*-sinapoyl malate de ditertbutyle



Le *trans*-sinapoyl malate de ditertbutyle a été synthétisé en suivant la procédure décrite par Allais *et al.* (33 % rendement global, huile jaune). **FT-IR** (pur) : 3421, 2976,

2935, 1711, 1631, 1599, 1512, 1456, 1367, 1218, 1138, 1109 ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 242, 334 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 1,41 (s, 18H, H_{10,13}), 2,79 (m, 2H, H₇), 3,81 (s, 6H, H₂), 5,25 (m, 1H, H₆), 6,60 (d, 1H, J = 15,8 Hz, H _{β}), 7,06 (s, 2H, H₂), 7,61 (d, 1H, J = 15,8 Hz, H _{α}), 9,04 (s, 1H, H_{phénol}) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 27,5 (C₁₀), 27,7 (C₁₃), 37,0 (C₇), 68,7 (C₆), 80,9 (C₉), 81,9 (C₁₂), 106,4 (C₂), 113,7 (C _{β}), 124,2 (C₁), 138,6 (C₄), 146,7 (C _{α}), 148,1 (C₃), 165,8 (C _{γ}), 167,7 (C₈), 168,2 (C₁₁) ; **HRMS** (*m/z*) : [M+Na]⁺ calculé C₂₃H₃₂O₉Na⁺ : 475,1944, trouvé : 475,1950.

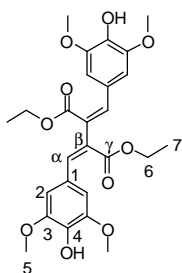
Synthèse des dimères β - β d'esters sinapiques

Procédure initiale

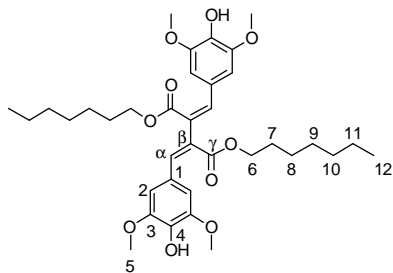
L'ester sinapique (32 mmol) et le bromure de cuivre (I) (0,46 g, 3,2 mmol) sont dissous dans la pyridine (80 mL, 993 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 50 °C pendant 24 h dans un ballon ouvert. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante, puis de l'acétate d'éthyle et une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées, lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Le produit désiré est récupéré après purification par chromatographie flash en utilisant un solvant cyclohexane/acétate d'éthyle.

Procédure optimisée

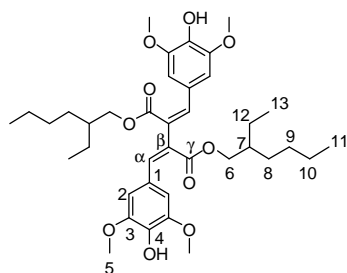
L'ester sinapique (1 mmol, 1,81 M), CuBr (14,3 mg, 0,1 mmol) et la pyridine (61 μ L, 0,76 mmol) sont dissous dans le Cyrene™ (552 μ L). Le milieu réactionnel est agité à 51,5 °C pendant 7 h dans un ballon ouvert. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante, de l'acétate d'éthyle et une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées, lavées avec HCl 1M, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées.



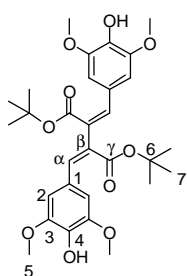
23 (62% non optimisé / 89% après optimisation, poudre jaune). **Point de fusion** : 98 - 101 °C ; **FT-IR** (pur) : 3525, 3263, 2956, 1693, 1580, 1510, 1452, 1329, 1212, 1152, 1102, 1028 cm⁻¹ ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 203, 243, 331 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, Acétone-*d*6) : δ 1,12 (t, 6H, J = 7,1 Hz, H₇), 3,76 (s, 12H, H₅), 4,14 (q, 4H, J = 7,0 Hz, H₆), 6,96 (s, 4H, H₂), 7,82 (s, 2H, H _{α}) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, Acétone-*d*6) : δ 14,6 (C₇), 56,6 (C₅), 61,3 (C₆), 108,8 (C₂), 126,2 (C _{β}), 126,6 (C₁), 139,0 (C₄), 142,7 (C _{α}), 148,6 (C₃), 167,6 (C _{γ}) ; **HRMS** (*m/z*) : [M+Na]⁺ calculé C₂₆H₃₀O₁₀Na⁺ : 525,1737, trouvé : 525,1740.



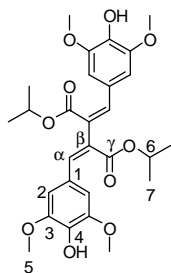
24 (64% non optimisé / 90% après optimisation, huile brun clair). **FT-IR** (pur) : 3464, 3168, 2924, 1707, 1582, 1513, 1453, 1329, 1214, 1107 cm⁻¹ ; **UV** (Ethanol) : λ_{\max} 201, 244, 333 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 0,82 (t, 6H, J = 6,9 Hz, H₁₂), 1,16 (m, 16H, H_{8,9,10,11}), 1,42 (m, 4H, H₇), 3,66 (s, 12H, H₅), 3,98 (m, 2H, H₆), 4,10 (m, 2H, H₆), 6,93 (s, 4H, H₂), 7,78 (s, 2H, H _{α}), 9,04 (s, 2H, H_{phénol}) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 13,9 (C₁₂), 22,0 (C₁₁), 25,3 (C₁₀), 28,2 (C₉), 28,3 (C₇), 31,2 (C₈), 55,8 (C₅), 64,5 (C₆), 107,8 (C₂), 124,0 (C _{β}), 124,6 (C₁), 138,0 (C₄), 141,6 (C _{α}), 147,7 (C₃), 166,7 (C _{γ}) ; **HRMS** (*m/z*) : [M+H]⁺ calculé C₃₆H₅₁O₁₀⁺ : 643,3482, trouvé : 643,3473.



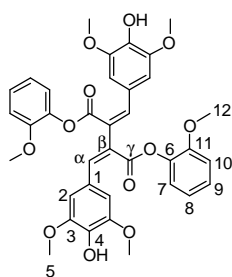
25 (55% non optimisé / 88% après optimisation, huile brun clair). **FT-IR** (pur) : 3407, 2927, 1698, 1588, 1510, 1454, 1329, 1213, 1152, 1104 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 202, 244, 333 nm ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, CDCl_3) : δ 0,77 (m, 12H, $\text{H}_{11,13}$), 1,15 (m, 16H, $\text{H}_{8,9,10,12}$), 1,42 (m, 2H, H_7), 3,79 (s, 12H, H_5), 3,95 (m, 2H, H_6), 4,03 (m, 2H, H_6), 5,71 (s, 2H, $\text{H}_{\text{phénol}}$), 6,84 (s, 4H, H_2), 7,81 (s, 2H, H_α) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, CDCl_3) : δ 11,0 (C_{11}), 14,2 (C_{13}), 23,0 (C_{10}), 23,8 (C_{12}), 29,0 (C_9), 30,4 (C_8), 38,9 (C_7), 56,30 (C_5), 67,3 (C_6), 107,1 (C_2), 125,5 (C_β), 126,3 (C_1), 136,7 (C_4), 142,1 (C_α), 147,0 (C_3), 167,6 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_{10}^+$: 671,3795, trouvé : 671,3800.



26 (58% non optimisé / 89% après optimisation, poudre jaune). **Point de fusion** : 75 - 77 $^\circ\text{C}$; **FT-IR** (pur) : 3394, 2933, 1689, 1588, 1510, 1452, 1331, 1245, 1145, 1105 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 204, 244, 328 nm ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, Acétone- d_6) : δ 1,36 (s, 18H, H_7), 3,77 (s, 12H, H_5), 6,92 (s, 4H, H_2), 7,67 (s, 2H, H_α) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, Acétone- d_6) : δ 28,0 (C_7), 56,2 (C_5), 80,4 (C_6), 107,9 (C_2), 108,3 (C_2), 126,8 (C_β), 128,1 (C_1), 138,1 (C_4), 141,3 (C_α), 148,3 (C_3), 166,9 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{10}\text{Na}^+$: 581,2363, trouvé : 581,2358.

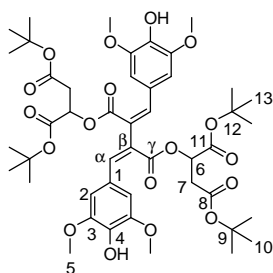


27 (58% non optimisé / 91% après optimisation, poudre jaune). **Point de fusion** : 48 - 51 $^\circ\text{C}$; **FT-IR** (pur) : 3384, 2935, 1688, 1587, 1509, 1451, 1370, 1325, 1214, 1154, 1092 cm^{-1} ; **UV/Vis** (Ethanol) : λ_{max} 201, 244, 333 nm ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, Acétone- d_6) : δ 1,04 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H_7), 1,18 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H_7), 3,76 (s, 12H, H_5), 4,98 (sept, 2H, $J = 6,3$ Hz, H_6), 6,94 (s, 4H, H_2), 7,78 (s, 2H, H_α) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, Acétone- d_6) : δ 21,9 (C_7), 22,1 (C_7), 56,6 (C_5), 68,6 (C_6), 108,6 (C_2), 126,8 (C_β), 126,9 (C_1), 138,8 (C_4), 142,4 (C_α), 148,6 (C_3), 167,2 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{10}\text{Na}^+$: 553,2050, trouvé : 553,2049.



28 (42% non optimisé / 87% après optimisation, poudre jaune). **Point de fusion** : 128 - 131 $^\circ\text{C}$; **FT-IR** (pur) : 3398, 2935, 1712, 1585, 1498, 1453, 1329, 1211, 1148, 1105, 1021 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 202, 246, 338 nm ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 3,58 (s, 6H, H_{12}), 3,72 (s, 12H, H_5), 6,87 (dd, 2H, $J = 7,9, 1,7$ Hz, H_7), 6,95 (td, 2H, $J = 7,6, 1,4$ Hz, H_8), 7,11 (dd, 2H, $J = 7,9, 1,7$ Hz, H_{10}), 7,15 (s, 4H, H_2), 7,23 (m, 2H, H_9), 8,04 (s, 2H, H_α), 9,20 (s, 2H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 55,6 (C_{12}), 55,9 (C_5), 108,3 (C_2), 113,1 (C_{10}), 120,7 (C_8), 122,5 (C_7), 122,6 (C_β), 124,4 (C_1), 127,0 (C_9), 138,5 (C_4), 139,6 (C_6), 143,9 (C_α), 147,7 (C_3), 151,1 (C_{11}), 164,9 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculé : $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{O}_{12}\text{Na}^+$: 681,1948, trouvé : 681,1953.

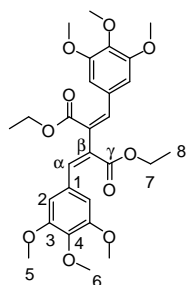
29 (42% non optimisé / 88% après optimisation, poudre jaune). **Point de fusion** : 72 - 74 $^\circ\text{C}$; **FT-IR** (pur) : 3421, 2975, 1709, 1590, 1510, 1454, 1366, 1212, 1143, 1101 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 204, 243, 329 nm ; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 1,33 (m, 18H, H_{10}), 1,37 (m, 18H, H_{13}), 2,74 (m, 4H,



H₇), 3,66 (s, 12H, H₅), 5,19 (m, 2H, H₆), 6,88 (m, 4H, H₂), 7,77 (s, 2H, H_α), 9,05 (s, 2H, H_{phénol}) ; ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 27,5 (C_{10,13}), 36,8 (C₇), 55,8 (C₅), 69,2 (C₆), 80,7 (C₉), 81,7 (C₁₂), 108,0 (C₂), 122,3 (C_β), 124,1 (C₁), 138,2 (C₄), 142,6 (C_α), 147,6 (C₃), 165,5 (C_γ), 167,4 (C₁₁), 168,0 (C₈) ; HRMS (*m/z*) : [M+Na]⁺ calculé : C₄₆H₆₂O₁₈Na⁺ : 925,3834, trouvé : 925,3835.

Méthylation du composé 23

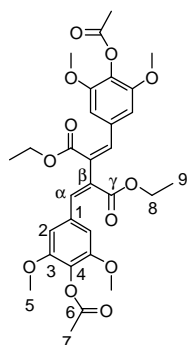
23 (201 mg, 0,40 mmol, 0,5 M) est dissous dans du *N,N*-diméthylformamide anhydre (800 μL) sous N₂. Puis, K₂CO₃ (276 mg, 2 mmol) et de l'iodure de méthyle (125 μL, 2 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité toute la nuit, puis dilué avec HCl 1M. Après quelques minutes, de l'acétate d'éthyle est ajouté et les phases sont séparées. La phase organique est lavée à l'eau et à la saumure, séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et concentrée.



30 (93%, solide orange). **Point de fusion** : 130 - 132 °C ; **FT-IR** (pur) : 2936, 1695, 1573, 1500, 1459, 1415, 1333, 1230, 1115, 1029 cm⁻¹ ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 202, 230, 310 nm ; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 1,10 (t, 6H, *J* = 7,1 Hz, H₈), 3,77 (s, 12H, H₅), 3,84 (s, 6H, H₆), 4,15 (m, 4H, H₇), 6,78 (s, 4H, H₂), 7,83 (s, 2H, H_α) ; ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 14,2 (C₈), 56,1 (C₅), 61,1 (C₆), 61,4 (C₇), 107,1 (C₂), 126,9 (C_β), 130,4 (C₁), 139,5 (C₄), 142,3 (C_α), 153,2 (C₃), 167,0 (C_γ) ; HRMS (*m/z*) : [M+Na]⁺ calculé C₂₈H₃₄O₁₀Na⁺ : 553,2050, trouvé : 553,2051.

Acétylation du composé 23

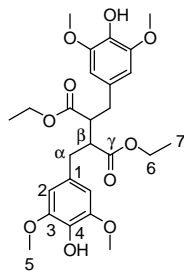
23 (201 mg, 0,40 mmol) est dissous dans de l'anhydride acétique (189 μL, 2 mmol) et de la pyridine (193 μL, 2,4 mmol). Le milieu réactionnel est agité toute la nuit. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec HCl 1M, puis à l'eau et séché.



31 (95%, solide jaune pâle). **Point de fusion** : 99 - 101 °C ; **FT-IR** (pur) : 2939, 1767, 1695, 1584, 1502, 1460, 1416, 1227, 1192, 1125, 1010 cm⁻¹ ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 205, 222, 299 nm ; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 1,10 (t, 6H, *J* = 7,1 Hz, H₉), 2,31 (s, 6H, H₇), 3,73 (s, 12H, H₅), 4,15 (m, 4H, H₈), 6,72 (s, 4H, H₂), 7,81 (s, 2H, H_α) ; ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 14,2 (C₉), 20,6 (C₇), 56,2 (C₅), 61,5 (C₈), 106,4 (C₂), 128,0 (C_β), 129,8 (C₄), 133,2 (C₁), 142,4 (C_α), 152,2 (C₃), 166,7 (C_γ), 168,6 (C₆) ; HRMS (*m/z*) : [M+Na]⁺ calculé C₃₀H₃₄O₁₂Na⁺ : 609,1948, trouvé : 609,1946.

Réduction sélective du dimère 23

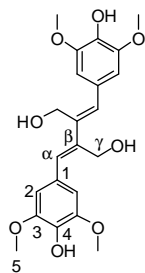
23 (1 g, 1,99 mmol, C=0,2 M) est dissous dans de l'éthanol (10 mL). Le milieu réactionnel est placé sous atmosphère de diazote pendant 15 minutes. Le palladium sur charbon (0,1 g, 10 % massique) est introduit toujours sous atmosphère de diazote. Le milieu réactionnel est ensuite placé sous flux de dihydrogène. Au bout de 60 h, le dihydrogène est éliminé par un flux de diazote et le catalyseur est éliminé par filtration sur Célite®. Le brut réactionnel est concentré.



32 (95%, solide jaune pâle). **Point de fusion** : 73 - 76 °C ; **FT-IR** (pur) : 3443, 2937, 1720, 1609, 1515, 1457, 1369, 1323, 1207, 1105, 1031 cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} 207, 273 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 1,08 (t, 6H, $J = 7,2$ Hz, H_7), 2,79 (m, 4H, H_α), 2,89 (m, 2H, H_β), 3,68 (s, 12H, H_5), 3,96 (q, 4H, $J = 7,2$ Hz, H_6), 6,34 (s, 4H, H_2), 8,16 (s, 2H, $H_{\text{phénol}}$) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 14,0 (C_7), 35,5 (C_α), 48,6 (C_β), 55,8 (C_5), 59,9 (C_6), 106,3 (C_2), 128,4 (C_1), 134,0 (C_4), 147,7 (C_3), 173,0 (C_γ) ; **HRMS** (m/z) : $[M+Na]^+$ calculé $C_{26}H_{34}O_{10}Na^+$: 529,2050, trouvé : 529,2048.

23 (2 g, 3,96 mmol, C=0,1 M) et du dichlorométhane anhydre (4 mL) sont introduits dans un ballon placé dans un bain de glace. Le milieu réactionnel est mis sous diazote, puis le DIBAL-H (7 équiv.) est ajouté goutte à goutte en 10 minutes. Après 1 h d'agitation, la réaction est arrêtée par ajout de 15 mL d'éthanol. Les solvants sont évaporés sous vide jusqu'à l'obtention d'un gel qui est repris avec 100 mL d'eau et extrait par 3*100 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre, filtrée puis placée à l'évaporateur rotatif. Le solide jaune obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice, avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle

(30/70 puis 0/100).



33 (46%, solide jaune). **Point de fusion** : 84 - 86 °C ; **FT-IR** (pur) : 3352 (OH), 1511 ($C=C_{\text{ar}}$) cm^{-1} ; **UV** (Ethanol) : λ_{max} (éthanol) 210, 274 nm ; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 3,63 (s, 12H, H_5), 3,92 (dd, 4H, $J = 14,4, 3,9$ Hz, H_γ), 5,10 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, H_{alcool}), 6,56 (s, 2H, H_α), 6,81 (s, 4H, H_2), 8,38 (s, 2H, $H_{\text{phénol}}$) ; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 55,7 (C_5), 63,6 (C_γ), 105,3 (C_2), 124,1 (C_α), 127,2 (C_1), 134,7 (C_4), 139,0 (C_β), 147,7 (C_3) ; **HRMS** (m/z) : $[M+Na]^+$ calculé $C_{22}H_{26}O_8Na^+$: 441,1525, trouvé : 441,1519.

Plan d'expériences

L'effet des 4 variables indépendantes X_1 (Température), X_2 (ratio Catalyseur/Substrat), X_3 (Ratio Amine/Catalyseur) et X_4 (Concentration) sur les réponses Y_1 (rendement) et Y_2 (conversion) est modélisé par une équation polynomiale :

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{kij} x_i x_j$$

où Y_i représente la réponse i , x_i sont les variables indépendantes centrées réduites, β_0 est une constante et β_{ki} , β_{kii} , et β_{kij} sont respectivement les coefficients linéaire, quadratique et d'interaction.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \text{ où } i = 1, 2, 3, \dots, k$$

x_i est sans dimension, X_i est la valeur réelle de la variable, X_0 est la valeur réelle au point central et ΔX_i est le pas.

Test d'activité antiradicalaire

La procédure du test à l'ABTS est adaptée de Re *et al.*²⁰⁸

Une solution d'ABTS^{•+} est préparée dans l'eau en mélangeant l'ABTS (C = 7 mmol.L⁻¹) et le persulfate de potassium (concentration finale 2.45 mmol.L⁻¹). Le mélange est agité dans le noir pendant 16h, puis dilué 50 fois avec de l'éthanol afin d'atteindre une absorbance d'environ 0,7 à 734 nm et 37 °C. Dans une

microplaque 96 puits, 10 μL d'une solution de dérivé antiradicalaire (concentration finale dans le puit allant de 2 à 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et 190 μL de la solution d'ABTS^{•+} sont incubés à 37 °C. L'absorbance est enregistrée à 734 nm jusqu'à ce que le signal soit stable (6 min). Une référence (190 μL de la solution d'ABTS^{•+} et 10 μL d'éthanol) et un blanc (200 μL d'éthanol) sont également réalisés en même temps que chaque expérience.

Conclusion et perspectives

Une méthode efficace de dimérisation sélective a été mise en place, permettant la formation de la liaison β - β à partir d'esters sinapiques, avec de très bons rendements. L'augmentation de la conjugaison ainsi obtenue a permis d'améliorer les propriétés anti-UV des molécules, notamment en élargissant fortement la bande d'absorption. Les dimères synthétisés absorbent dans la totalité des UV-A et des UV-B. Ce sont également de bons anti-radicaux, même si l'augmentation de la dimérisation n'apporte pas de gain significatif, si le résultat est rapporté au nombre de phénol(s) par rapport au monomère. En revanche, les dimères obtenus sont malheureusement peu stables dans les conditions d'exposition UV testées. Il serait intéressant de réaliser des tests avec un simulateur de rayonnement solaire afin de connaître leur stabilité dans un cadre plus proche de l'utilisation finale et d'identifier les produits de dégradation générés le cas échéant. De plus, des combinaisons avec plusieurs molécules pourraient créer des synergies favorables limitant la dégradation comme viennent de le montrer mes collègues dans une publication récente sur des composés de structures proches.²¹³ Une perspective serait donc d'évaluer des formulations.

Conclusion

Les acides *para*-hydroxycinnamiques représentent une famille de composés aux multiples propriétés. Ces dernières peuvent être améliorées par modifications chimiques. Nous avons montré que ces modifications peuvent être réalisées dans des conditions catalytiques douces répondant ainsi aux principes de la chimie verte. Les anti-UVs ainsi synthétisés représentent une alternative aux composés pétrosourcés toxiques actuellement utilisés. Les possibilités de ce domaine sont d'autant plus importantes que des combinaisons de molécules peuvent être envisagées soit pour couvrir une plus grande gamme de longueur d'ondes soit pour apporter des activités secondaires ou encore stabiliser une formulation. Les principales applications des acides *p*-hydroxycinammiques se trouvant dans des secteurs d'activités (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) où le respect environnemental et sanitaire ainsi que la naturalité sont des enjeux majeurs, il est indispensable de proposer des solutions techniques allant dans ce sens avec des molécules présentant des toxicités faibles et obtenues par des procédés éco-compatibles.

En dehors de cette vision tournée vers l'industrie, une approche fondamentale est aussi possible à partir des acides *para*-hydroxycinnamiques. En effet, en tant que précurseurs des lignines, ils sont également une source importante de connaissances dans le défi de la déconstruction de ces polymères complexes. Ils sont donc vecteurs de potentielles innovations de rupture.

Conclusion générale

Décarboner l'économie pour réaliser la transition écologique nécessaire à la préservation de notre planète est un enjeu majeur. Une exploitation ambitieuse et raisonnée des ressources renouvelables est indispensable à cette mutation. En effet, les productions agricoles devront couvrir les besoins alimentaires humain et animal, la production énergétique (biogaz, biocarburants) ainsi que la production de produits de commodités (détergents, textiles) et de spécialités (lubrifiants, médicaments).

Dans cette thèse, nous avons montré le potentiel d'une molécule issue de la flash pyrolyse de la cellulose, la lévoglucosénone et d'une famille de composés issus de la voie de biosynthèse des lignines, les acides *p*-hydroxycinnamiques. La cellulose et les lignines étant deux des composés majeurs des plantes (50 à 75% de la biomasse totale) et n'entrant pas directement en compétition avec l'alimentation, leur exploitation est un levier pour le développement de la bioéconomie.

Une économie réellement « verte » passe non seulement par l'utilisation de matières premières renouvelables mais également par des procédés de transformation éco-compatibles. Appliquer ce concept à la chimie a donné naissance aux 12 principes de la chimie verte (Figure 42).



Figure 41 : Traduction des 12 principes de la chimie verte énoncés par P. Anastas et J. Warner

Dans ces travaux, deux approches ont été menées. A partir de la lévoglucosénone, molécule biosourcée disponible, nous avons voulu développer son potentiel *via* la production de molécules plateformes (Schéma 46) pour ouvrir de nouveaux marchés à cette molécule nouvellement disponible. A l'inverse les acides *p*-hydroxycinnamiques sont bien connus pour leurs propriétés physico-chimiques (antiradicalaires, anti-UVs) et biologiques (anticancéreux) mais l'approvisionnement pour ces composés reste problématique. Ils sont donc biosourçables mais souvent pétrosourcés. Dans la revue soumise à *ChemSusChem*, les trois voies de production des acides *p*-hydroxycinnamiques sont discutées. Pour la voie chimique, celle-ci démarre des benzaldéhydes correspondants. Ceux-ci peuvent être obtenus par dégradation de la lignine. C'est pourquoi nous nous intéressons à des modèles de lignines susceptibles

d'être employés dans des études de dégradations (Schéma 47). Dans ce manuscrit, une synthèse totale est proposée pour des trimères de lignines. D'autres travaux, non discutés ici, en partenariat avec l'UTC, sont en cours de rédaction sur les mécanismes d'internalisation au sein de champignons lignivores de molécules issues de la dégradation de modèles DHPs.

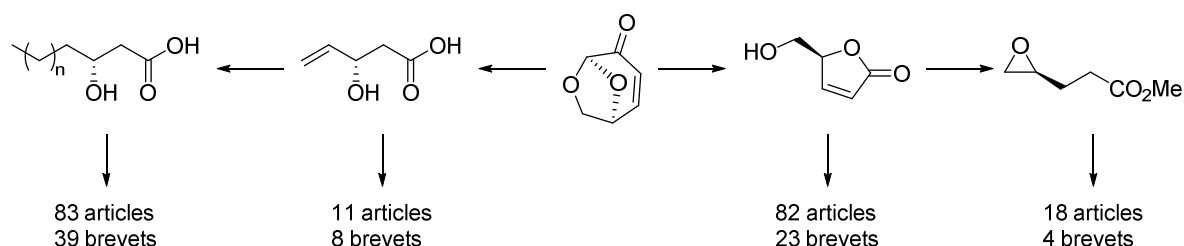


Schéma 46 : Molécules plateformes issues de la LGO synthétisées

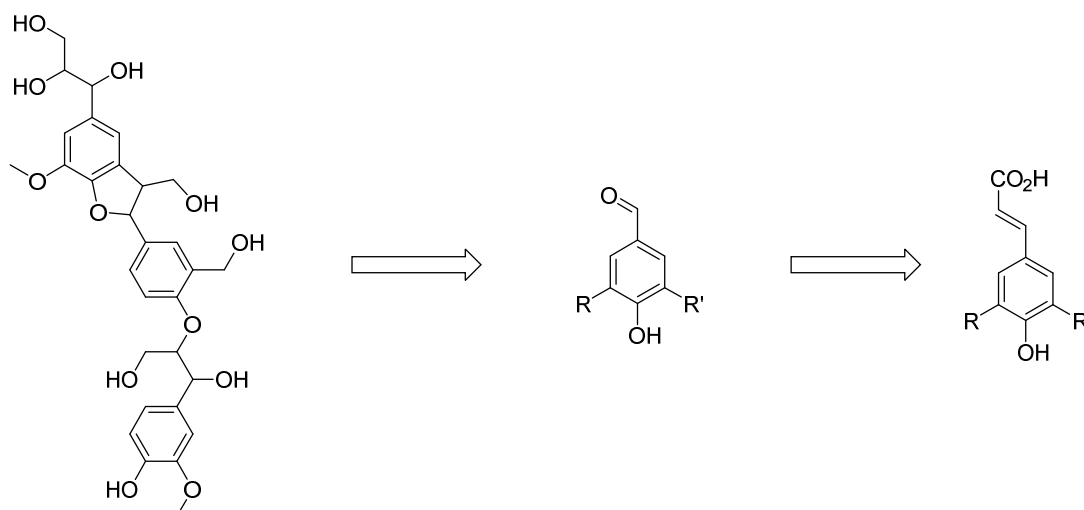


Schéma 47 : Stratégie pour l'obtention des acides *p*-hydroxycinnamiques à partir des lignines

Pour en revenir à la chimie verte, lors de la construction des voies de synthèse, si les réactions envisagées étaient déjà décrites dans la littérature, une analyse critique des protocoles a été menée dans le but de réduire l'utilisation des composés nocifs, de limiter l'utilisation de solvants et la génération de sous-produits. Cependant, si nous considérons la synthèse des dimères β-β, la littérature ne fournit aucun protocole efficace. L'expertise au sein de l'URD ABI sur la réactivité des composés phénoliques a permis d'élaborer une voie de synthèse biomimétique dans un solvant biosourcé. La méthodologie des plans d'expériences a été appliquée pour optimiser le rendement de la réaction mais également comprendre l'influence des différents facteurs entrant en jeu afin de réduire au maximum l'emploi de solvants, éviter une étape de purification, et diminuer l'utilisation de réactifs nocifs.

Lors de la synthèse de la **HBO**, les protocoles existants étaient performants mais loin des standards de la chimie verte comme nous l'avons montré grâce aux outils d'analyse que sont l'Ecoscale et le calcul du PMI. En revanche, une voie biocatalytique était décrite sur des cétones cycliques, l'adaptation de ce protocole à la **LGO** a entraîné la première synthèse « verte » de la **HBO**. Les outils statistiques mis en

œuvre ont prouvé que les conditions pour une bonne recyclabilité de l'enzyme étaient antagonistes à un fort rendement. Cependant cette étude a révélé la forte réactivité de la **LGO** conduisant à un protocole innovant, ne faisant intervenir que du peroxyde d'hydrogène sans solvant, ni catalyseur.

Lors des synthèses totales de la dairy lactone et des chaînes grasses des rhamnolipides, des étapes innovantes sont combinées avec des étapes plus classiques améliorées de façon incrémentale. La combinaison des deux approches permet d'aller vers des produits à forte valeur ajoutée rapidement tout en évaluant les points d'amélioration ainsi que les blocages qui nécessiteraient une rupture technologique.

Dans cette optique, le recyclage des catalyseurs métalliques ou des solvants pourrait également être envisagé. A l'échelle du laboratoire, la balance entre le gain de cette récupération et son coût main d'œuvre, logistique et énergétique ne sera probablement pas favorable. Cependant, les informations collectées pourraient permettre une meilleure projection à plus grande échelle. De façon générale, anticiper les problématiques dès la conception au laboratoire, que ce soit pour un changement d'échelle ou en termes de toxicité permet de porter un regard critique indispensable à l'amélioration des synthèses proposées ainsi que des pratiques opérées.

La veille bibliographique mais également les échanges avec des collègues quel que soit leur domaine de compétences nourrissent le débat et au final l'innovation. L'expertise d'un pair en chimie peut contribuer à la compréhension fine des mécanismes mis en œuvre et donc à revoir les conditions opératoires. La discussion avec un spécialiste du génie des procédés donne de nouvelles contraintes à prendre en compte mais également apporte de nouvelles armes pour surmonter ces contraintes. La biologie sous ces divers aspects ouvre un vaste champ des possibles mais également sous contrainte. Ces échanges sont une source d'inspiration pour proposer des innovations de rupture.

Ces ruptures qui apportent de grand progrès rapidement sont alimentées par les freins identifiés lors de recherches incrémentales. Par la suite, ces dernières contribuent à l'optimisation des innovations pour qu'elles donnent leur plein potentiel.

Les enjeux liés au changement climatique induisent des contraintes fortes favorisant l'innovation par le besoin de changer radicalement de logiciel. Cela passe par l'interrogation sur nos habitudes et pratiques au laboratoire. L'objectif est de proposer des synthèses efficaces mais également éco-conçues de la provenance des réactifs jusqu'à la purification finale.

Références

- (1) Geo. Géologie : qu'est-ce que l'anthropocène ? <https://www.geo.fr/environnement/geologie-quest-ce-que-lanthropocene-193622> (accessed Apr 12, 2020).
- (2) IPCC <https://www.ipcc.ch/> (accessed Apr 9, 2020).
- (3) Futura Sciences. Puits de carbone <https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/climatologie-puits-carbone-13132/> (accessed Jan 24, 2020).
- (4) Pôle IAR. Qu'est-ce que la bioéconomie ? <https://www.iar-pole.com/la-bioeconomie/> (accessed Jan 24, 2020).
- (5) Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. *Une Stratégie Bioéconomie Pour La France. Plan d'action 2018-2020*; 2018.
- (6) URD ABI - Agro Biotechnologies Industrielles - Chaire ABI <https://chaire-abi-agroparistech.com> (accessed Apr 12, 2020).
- (7) ICMR <https://www.univ-reims.fr/icmr/presentation-synthetique-de-l-icmr/presentation-synthetique-de-l-icmr,22091,36736.html> (accessed Apr 9, 2020).
- (8) Copacel. Copacel, rapport statistique 2017 http://www.copacel.fr/media/document/fichier/rapport-statistique-2017_1.pdf (accessed Oct 15, 2019).
- (9) Tsuchiya, Y.; Sumi, K. Thermal Decomposition Products of Cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* **1970**, *14*, 2003–2013.
- (10) Halpern, Y.; Riffer, R.; Broido, A. Levoglucosenone (1,6-Anhydro-3,4-Dideoxy-Delta²-Beta-D-Pyranosen-2-One). A Major Product of the Acid-Catalyzed Pyrolysis of Cellulose and Related Carbohydrates. *J. Org. Chem.* **1973**, *38* (2), 204–209.
- (11) Greatrex, B. W.; Meisner, J.; Glover, S. A.; Raverty, W. Support for a Dioxallyl Cation in the Mechanism Leading to (-)-Levoglucosenone. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12294–12299. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02109>.
- (12) Shibagaki, M.; Takahashi, K.; Kuno, H.; Honda, I.; Matsushita, H. Synthesis of Levoglucosenone. *Chem. Lett.* **1990**, 307–310.
- (13) Witczak, Z. J. New Stereoselective Functionalization of Cellulose- Derived Pyrolysis Derivatives : Levoglucosenone and Its Dimer Structural Studies and Physicochemical Properties. In *In Materials, Chemicals, and Energy from Forest Biomass*; Washington, DC, 2007; pp 332–349. <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0954.ch021>.
- (14) Taniguchi, T.; Nakamura, K.; Ogasawara, K. Non-Carbohydrate Route to Levoglucosenone and Its Enantiomer Employing Asymmetric Dihydroxylation. *Synlett* **1996**, 971–972.
- (15) Kadota, K.; Kurusu, T.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K. Lipase-Mediated Synthesis of Both Enantiomers of Levoglucosenone from Acrolein Dimer. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343* (6–7), 618–623.

- (16) Shafizadeg, F.; Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. Some Reactions of Levoglucosenone. *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 169–191.
- (17) Dobeles, G.; Rossinskaja, G.; Telysheva, G.; Meier, D.; Faix, O. Cellulose Dehydration and Depolymerization Reactions during Pyrolysis in the Presence of Phosphoric Acid. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1999**, *49*, 307–317.
- (18) Dobeles, G.; Meier, D.; Faix, O.; Radtke, S.; Rossinskaja, G.; Telysheva, G. Volatile Products of Catalytic Flash Pyrolysis of Celluloses. *Anal. and Appl. Pyrolysis* **2001**, *59*, 453–463.
- (19) Dobeles, G.; Dizhbite, T.; Rossinskaja, G.; Telysheva, G.; Meier, D.; Radtke, S.; Faix, O. Pre-Treatment of Biomass with Phosphoric Acid Prior to Fast Pyrolysis: A Promising Method for Obtaining 1,6- Anhydrosaccharides in High Yields. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2003**, *68–69*, 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(03\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(03)00063-9).
- (20) Dobeles, G.; Rossinskaja, G.; Dizhbite, T.; Telysheva, G.; Meier, D.; Faix, O. Application of Catalysts for Obtaining 1,6-Anhydrosaccharides from Cellulose and Wood by Fast Pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2005**, *74*, 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2004.11.031>.
- (21) Casoni, A. I.; Nievas, M. L.; Moyano, E. L.; Álvarez, M.; Diez, A.; Dennehy, M.; Volpe, M. A. Applied Catalysis A : General Catalytic Pyrolysis of Cellulose Using MCM-41 Type Catalysts. *Appl. Catal. A Gen.* **2016**, *514*, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2016.01.017>.
- (22) Ye, X.; Lu, Q.; Wang, X.; Guo, H.; Cui, M.; Dong, C.; Yang, Y. Catalytic Fast Pyrolysis of Cellulose and Biomass to Selectively Produce Levoglucosenone Using Activated Carbon Catalyst. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 10815–10825. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02762>.
- (23) Kawamoto, H.; Saito, S.; Hatanaka, W.; Saka, S. Catalytic Pyrolysis of Cellulose in Sulfolane with Some Acidic Catalysts. *J. Wood. Sci.* **2007**, *53*, 127–133. <https://doi.org/10.1007/s10086-006-0835-y>.
- (24) Cao, F.; Schwartz, T. J.; McClelland, D. J.; Krishna, S. H.; Dumesic, J. A.; Huber, G. W. Environmental Science Dehydration of Cellulose to Levoglucosenone Using Polar Aprotic Solvents. *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8* (6), 1808–1815. <https://doi.org/10.1039/C5EE00353A>.
- (25) Huber, G. W.; Cao, F.; Dumesic, J. A.; Schwartz, T. J. Method for Selectively Preparing Levoglucosenone (LGO) and Other Anhydrosugars from Biomass in Polar Aprotic Solvents. US 2016/0185794 A1, 2016.
- (26) Kudo, S.; Zhou, Z.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Green Chemistry Efficient Levoglucosenone Production by Catalytic Pyrolysis of Cellulose Mixed with Ionic Liquid. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3306–3311. <https://doi.org/10.1039/c1gc15975e>.
- (27) Kudo, S.; Zhou, Z.; Yamasaki, K.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Sulfonate Ionic Liquid as a Stable and Active Catalyst for Levoglucosenone Production from Saccharides via Catalytic Pyrolysis. *Catalysis* **2013**, *3*, 757–773. <https://doi.org/10.3390/catal3040757>.
- (28) Kudo, S.; Goto, N.; Sperry, J.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Production of Levoglucosenone and Dihydrolevoglucosenone by Catalytic Reforming of Volatiles from Cellulose Pyrolysis Using Supported Ionic Liquid Phase. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 1132–1140. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02463>.

- (29) Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suarez, A. G. An Efficient Microwave-Assisted Green Transformation of Cellulose into Levoglucosenone. Advantages of the Use of an Experimental Design Approach. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1137–1140. <https://doi.org/10.1039/b703690f>.
- (30) De Bruyn, M.; Fan, J.; Budarin, V. L.; Macquarrie, D. J.; Gomez, L. D.; Simister, R.; Farmer, T. J.; Raverty, W. D.; McQueen-Mason, S. J.; Clark, J. H. A New Perspective in Bio-Refining: Levoglucosenone and Cleaner Lignin from Waste Biorefinery Hydrolysis Lignin by Selective Conversion of Residual Saccharides. *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9* (8), 2571–2574. <https://doi.org/10.1039/C6EE01352J>.
- (31) Court, G. R.; Lawrence, C. H.; Raverty, W. D.; Duncan, A. J. Method for Converting Lignocellulosic Materials into Useful Chemicals. PCT/AU2010/000811, 2012.
- (32) Santander, J. A.; Alvarez, M.; Gutierrez, V.; Volpe, M. A. Solid Phosphoric Acid Catalysts Based on Mesoporous Silica for Levoglucosenone Production via Cellulose Fast Pyrolysis *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**. <https://doi.org/10.1002/jctb.5795>.
- (33) Sherwood, J.; De Bruyn, M.; Constantinou, A.; Moity, L.; McElroy, C. R.; Farmer, T. J.; Duncan, T.; Raverty, W.; Hunt, A. J.; Clark, J. H. Dihydrolevoglucosenone (Cyrene) as a Bio-Based Alternative for Dipolar Aprotic Solvents. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9650–9652. <https://doi.org/10.1039/C4CC04133J>.
- (34) Stockton, K. P.; Merritt, C. J.; Sumby, C. J.; Greatrex, B. W. Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura, Heck and Hydroarylation Reactions on (–)-Levoglucosenone and Application to the Synthesis of Chiral γ -Butyrolactones. *European J. Org. Chem.* **2015**, 6999–7008. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501083>.
- (35) Alves Costa Pacheco, A.; Sherwood, J.; Zhenova, A.; McElroy, C. R.; Hunt, A. J.; Parker, H. L.; Farmer, T. J.; Constantinou, A.; De Bruyn, M.; Whitwood, A. C.; Raverty, W.; Clark, J. H. Intelligent Approach to Solvent Substitution: The Identification of a New Class of Levoglucosenone Derivatives. *ChemSusChem* **2016**, *9*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/cssc.201600795>.
- (36) Comba, M. B.; Tsai, Y.; Sarotti, A. M.; Mangione, M. I.; Suárez, A. G.; Spanevello, R. A. Levoglucosenone and Its New Applications: Valorization of Cellulose Residues. *European J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (5), 590–604. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701227>.
- (37) Tsai, Y.; Borini Etichetti, C. M.; Di Benedetto, C.; Girardini, J. E.; Terra Martins, F.; Spanevello, R. A.; Suarez, A. G.; Sarotti, A. M. Synthesis of Triazole Derivatives of Levoglucosenone As Promising Anticancer Agents: Effective Exploration of the Chemical Space through Retro -Aza-Michael//Aza-Michael Isomerizations. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 3516–3528. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b03141>.
- (38) Czubatka-Bienkowska, A.; Sarnik, J.; Macieja, A.; Galita, G.; Witczak, Z. J.; Poplawski, T. Thio-Functionalized Carbohydrate Thiosemicarbazones and Evaluation of Their Anticancer Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2713–2720. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.051>.
- (39) Sarnik, J.; Czubatka-Bienkowska, A.; Macieja, A.; Bielski, R.; Witczak, Z. J.; Poplawski, T. The Induction of Oxidative Stress in Cervix Carcinoma Cells by Levoglucosenone Derived 4-S-Salicyl Derivative and (1-4)-S-Thio-Disaccharides. Part 4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (5), 1215–1219. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.064>.

- (40) Giri, G. F.; Danielli, M.; Marinelli, R. A.; Spanevello, R. A. Cytotoxic Effect of Levoglucosenone and Related Derivatives against Human Hepatocarcinoma Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (16), 3955–3957. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.007>.
- (41) Ostermeier, M.; Schobert, R. Total Synthesis of (+)-Chloriolide. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4038–4042.
- (42) Muller, C.; Gomez-Zurita Frau, M. A.; Ballinari, D.; Colombo, S.; Bitto, A.; Martegani, E.; Airoidi, C.; Van Neuren, A. S.; Stein, M.; Weiser, J.; Battistini, C.; Peri, F. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Levoglucosenone-Derived Ras Activation Inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 524–528. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800416>.
- (43) Swenton, J. S.; Freskos, J. N.; Dalidowicz, P.; Kerns, M. L. A Facile Entry into Naphthopyran Quinones via an Annelation Reaction of Levoglucosenone . The Total Synthesis of (-)-Hongconin. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 459–464. <https://doi.org/10.1021/jo951607e>.
- (44) Valeev, F. A.; Gorobets, E. V.; Tsyypysheva, I. P.; Singizova, G. S.; Kalimullina, L. K.; Safarov, M. G.; Shitikova, O. V.; Miftakhov, M. S. Stereochemical Aspects of Beckman Rearrangement of Oximes of Levoglucosenone and Its Dehydro Derivative. Enantioselective Synthesis of (+)-Gamma-Pelargonolactone. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39* (6), 563–568.
- (45) Witczak, Z. J.; Li, Y. New Stereoselective Approach to (-)-Delta-Multistriatin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (15), 2595–2598.
- (46) Okano, K.; Ebata, T.; Koseki, K.; Kawakami, H.; Matsumoto, K.; Matsushita, H. Formal Synthesis of (+)-Grandisol from Levoglucosenone. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41* (5), 861–865.
- (47) Isobe, M.; Nishikawa, T.; Pikul, S.; Goto, T. Synthetic Studies on Tetrodotoxin Stereocontrolled Synthesis of the Cyclohexane Moiety. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (51), 6485–6488.
- (48) Urabe, D.; Nishikawa, T.; Isobe, M. An Efficient Total Synthesis of Optically Active Tetrodotoxin from Levoglucosenone. *Chem. an Asian J.* **2006**, *1–2*, 125–135. <https://doi.org/10.1002/asia.200600038>.
- (49) Faizullina, L. K.; Faizullina, D. M.; Galimova, Y. S.; Salikhov, S. M.; Shamukaev, V. A.; Safiullin, R. L.; Valeev, F. A. Reaction of Levoglucosenone with Dane's Diene. *Russ. J. Org. Chem.* **2015**, *51* (12), 1759–1762. <https://doi.org/10.1134/S1070428015120106>.
- (50) Ledingham, E. T.; Stockton, K. P.; Greatrex, B. W. Efficient Synthesis of an Indinavir Precursor from Biomass-Derived (-)-Levoglucosenone. *Aust. J. Chem.* **2017**, *70*, 1146–1150.
- (51) Sarotti, A. M.; Zanardi, M. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. Recent Applications of Levoglucosenone as Chiral Synthons. *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 439–459.
- (52) Austin, A. T.; Howard, J. The Reaction of Nitrous Acid with Glutamine and Glutamic Acid. *J. Chem. Soc.* **1961**, *702*, 3593–3603.
- (53) Ravid, U.; Silverstein, M.; Smith, L. R. Synthesis of the Enantiomers of 4-Substituted-Gamma-Lactones with Known Absolute Configuration. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1449–1452.
- (54) Tomioka, K.; Ishiguro, T.; Koga, K. Asymmetric Total Synthesis of the Antileukaemic Lignans (+)-Trans-Burseran and (-)-Isostegane. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 652–653.

- (55) Tomioka, K.; Ishiguro, T.; Koga, K. First Asymmetric Total Synthesis of (+)-Steganacin Determination of Absolute Stereochemistry. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2973–2976.
- (56) Tomioka, K.; Ishiguro, T.; Iitaka, Y.; Koga, K. Asymmetric Total Synthesis of Natural (-)- and Unnatural (+)-Steganacin Determination of the Absolute Configuration of Natural Antitumor Steganacin. *Tetrahedron* **1984**, *40* (8), 1303–1312.
- (57) Camps, P.; Font, J.; Ponsati, O. A Short Synthesis of (S)-5-Hydroxymethyl-(5H)-Furan-2-One and Derivatives from D-Ribonolactone. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (15), 1471–1472.
- (58) Magnus, P.; Becker, D. P. Stereospecific Dicobalt Octacarbonyl Mediated Enyne Cyclization for the Enantiospecific Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *8*, 7495–7498.
- (59) TCI. D-(+)-Ribono-1,4-lactone
https://www.tcichemicals.com/eshop/fr/fr/catalog/list/search?searchWord=5336-08-3&client=default_frontend&output=xml_no_dtd&proxystylesheet=default_frontend&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&ud=1&exclude_apps=1&site=fr_fr&mode=0 (accessed Jan 20, 2020).
- (60) Ireland, R. E.; Anderson, R. C.; Badoud, R.; Fitzsimmons, B. J.; McGarvey, G. J.; Thaisrivongs, S.; Wilcox, C. S. The Total Synthesis of Ionophore Antibiotics. A Convergent Synthesis of Lasalocid A (X537A) 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1988–2006. <https://doi.org/10.1021/ja00345a055>.
- (61) Vekemans, J. A. J. M.; Franken, G. A. M.; Chittenden, G. J. F.; Godefroi, E. F. An Efficient Synthesis of (S)-5-Hydroxymethyl-2(5)-Furanone. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (20), 2299–2300.
- (62) Shiramizu, M.; Toste, F. D. Expanding the Scope of Biomass-Derived Chemicals through Tandem Reactions Based on Oxorhenium-Catalyzed Deoxydehydration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12905–12909. <https://doi.org/10.1002/anie.201307564>.
- (63) TCI. D-mannitol https://www.tcichemicals.com/eshop/fr/fr/catalog/list/search?searchWord=D-mannitol&client=default_frontend&output=xml_no_dtd&proxystylesheet=default_frontend&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&ud=1&exclude_apps=1&site=fr_fr&pageSize=20&alignmentSequ (accessed Jan 20, 2020).
- (64) Takano, S.; Kurotaki, A.; Takahashi, M.; Ogasawara, K. Practical Synthesis of Some Versatile Chiral Building Blocks from (D)-Mannitol. *Synthesis (Stuttg)*. **1986**, 403–406.
- (65) Hafele, B.; Jager, V. A Short Synthesis of (S)-5-Hydroxy-2-Penten-4-Olide from D-Mannitol via 2,3-O-Isopropylidene-D-Glyceraldehy. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 85–87.
- (66) Diaz-Rodriguez, A.; Sanghvi, Y. S.; Fernandez, S.; Schinazi, R. F.; Theodorakis, E. A.; Ferrero, M.; Gotor, V. Synthesis and Anti-HIV Activity of Conformationally Restricted Bicyclic Hexahydroisobenzofuran Nucleoside Analogs. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1415–1423. <https://doi.org/10.1039/b818707j>.
- (67) Koseki, K.; Ebata, T.; Kawakami, H.; Matsushita, H.; Naoi, Y.; Itoh, K. A Method for Easy Preparation of Optically Pure (S)-5-Hydroxy-2-Penten-4-Olide and (S)-5-Hydroxypentan-4-Olide. *Heterocycles* **1990**, *31* (3), 423–426.
- (68) Koseki, K.; Ebata, T.; Kawakami, H.; Matsushita, H.; Itoh, K.; Naoi, Y. Method of Preparing (S)-

Gamma-Hydroxymethyl-Alpha,Beta-Butenolide. 4,994,585, 1991.

- (69) Paris, C.; Moliner, M.; Corma, A. Metal-Containing Zeolites as Efficient Catalysts for the Transformation of Highly Valuable Chiral Biomass-Derived Products. *Green Chem.* **2013**, *15*, 2101–2109. <https://doi.org/10.1039/c3gc40267c>.
- (70) Chávez, G.; Hatti-kaul, R.; Sheldon, R. A.; Mamo, G. Enzymatic Baeyer – Villiger Oxidation with Peracid Generated in Situ by CaLB-CLEA Catalyzed Perhydrolysis. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2013**, *89*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.12.007>.
- (71) Flourat, A. L.; Peru, A. A. M.; Teixeira, A. R. S.; Brunissen, F.; Allais, F. Chemo-Enzymatic Synthesis of Key Intermediates. *Green Chem.* **2014**, *17*, 404–412. <https://doi.org/10.1039/c4gc01231c>.
- (72) Teixeira, A. R. S.; Flourat, A. L.; Peru, A. A. M.; Brunissen, F.; Allais, F. Lipase-Catalyzed Baeyer-Villiger Oxidation of Cellulose-Derived Levoglucosenone into (S)- γ -Hydroxymethyl- α,β -Butenolide : Optimization by Response Surface Methodology. *Front. Chem.* **2016**, *4* (16), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00016>.
- (73) Hawthorne, M. F.; Emmons, W. D.; McCallum, K. S. A Re-Examination of the Peroxyacid Cleavage of Ketones. I. Relative Migratory Aptitudes. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (23), 6393–6398. <https://doi.org/10.1021/ja01556a057>.
- (74) The organic chemistry tutor. Baeyer Villiger Oxidation Reaction Mechanism of Ketones to Esters Using H₂O₂ & CF₃CO₃H <https://www.youtube.com/watch?v=Umvw5ZkFdRw> (accessed Jan 10, 2020).
- (75) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of Lipase B from *Candida Antartica* <https://www.rcsb.org/structure/1TCA> (accessed Oct 21, 2019).
- (76) Klibanov, A. M. Improving Enzymes by Using Them in Organic Solvents. *Nature* **2001**, *409*, 241–246.
- (77) Adlercreutz, P. Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*; Carrea, G., Riva, S., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim, Germany, 2008; pp 3–24.
- (78) Rezaei, K.; Jenab, E.; Temelli, F. Effects of Water on Enzyme Performance with an Emphasis on the Reactions in Supercritical Fluids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, *27*, 183–195. <https://doi.org/10.1080/07388550701775901>.
- (79) Aydar, A. Y. Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials. In *IntechOpen*; 2018; pp 157–169. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- (80) Prat, D.; Pardigon, O.; Flemming, H.-W.; Letestu, S.; Ducandas, V.; Isnard, P.; Guntrum, E.; Senac, T.; Ruisseau, S.; Cruciani, P.; Hosek, P. Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1517–1525.
- (81) Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, E.; Sneddon, H. F. Updating and Further Expanding GSK's Solvent Sustainability Guide. *Green Chem.* **2016**, *18*, 3879–3890. <https://doi.org/10.1039/c6gc00611f>.
- (82) Byrne, F. P.; Jin, S.; Paggiola, G.; Petchey, T. H. M.; Clark, J. H.; Farmer, T. J.; Hunt, A. J.; McElroy, C.

- R.; Sherwood, J. Tools and Techniques for Solvent Selection : Green Solvent Selection Guides. *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4* (7), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0051-z>.
- (83) Bonneau, G.; Peru, A. A. M.; Flourat, A. L.; Allais, F. Organic Solvent- and Catalyst-Free Baeyer-Villiger Oxidation of Levoglucosenone and Dihydrolevoglucosenone (Cyrene®): A Sustainable Route to (S)- γ -Hydroxymethyl- α,β -Butenolide and (S)- γ -Hydroxymethyl- γ -Butyrolactone. *Green Chem.* **2018**, *20* (11). <https://doi.org/10.1039/c8gc00553b>.
- (84) Chemistry, R. S. of. (S)-5-Hydroxymethyl-2(5H)-furanone <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8351627.html> (accessed Nov 15, 2019).
- (85) Van Aken, K.; Strekowski, L.; Patiny, L. EcoScale, a Semi-Quantitative Tool to Select an Organic Preparation Based on Economical and Ecological Parameters. *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2* (3), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1860-5397-2-3>.
- (86) Boukouvalas, J. Dihydro-5-(Hydroxymethyl)-2(3H)-Furanone. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; Paquette, L. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2001. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rd227>.
- (87) Liotta, D. C.; Painter, George, R.; Bluemling, G. R.; De La Rosa, A. Nucleotide and Nucleoside Therapeutics Compositions and Uses Related Thereto. WO 2016/145142 A1, 2016.
- (88) Pinto, D. J.; Corte, J. R.; Gilligan, P. J.; Fang, T.; Smith II, L. M.; Wang, Y.; Yang, W.; Ewing, W. R. Novel Macrocycles as Factor XIA Inhibitors. WO 2013/022818 A1, 2013.
- (89) Johnson, T. W.; Richardson, P. F.; Collins, M. R.; Richter, D. T.; Burke, B. J.; Gajiwala, K.; Ninkovic, S.; Linton, M. A.; Le, P. T. Q.; Hoffman, J. E. Inhibiteurs AXL. 2 915 356 A1, 2016.
- (90) Xi, N. Compounds and Methods of Use. US 2010/0093727 A1, 2010.
- (91) Landry, D. W.; Karayiorgou, M.; Deng, S.-X. Inhibitors of Central Nervous System Vasoactive Inhibitory Peptide Receptor 2. WO 2014/075093 A1, 2014.
- (92) Aktoudianakis, E.; Chin, G.; Corkey, B. K.; Du, J.; Elbel, K.; Jiang, R. H.; Kobay-Ashi, T.; Lee, R.; Martinez, R.; Metobo, S. E.; Mish, M.; Munoz, M.; Shevick, S.; Sperandio, D.; Yang, H.; Zablocki, J. Benzimidazole Derivatives as Bromodomain Inhibitors. WO 2014/182929 A1, 2014.
- (93) Beck, H. P.; Booker, S. K.; Bregman, H.; Cee, V. J.; Chakka, N.; Cushing, T. D.; Epstein, O.; Fox, B. M.; Geuns-Meyer, S.; Hao, X.; Hibiya, K.; Hirata, J.; Hua, Z.; Human, J.; Kakuda, S.; Lopez, P.; Nakajima, R.; Okada, K.; Olson, S. H.; Oono, H.; Pennington, L. D.; Sasaki, K.; Shimada, K.; Shin, Y.; White, R. D.; Wurz, R. P.; Yi, S.; Zheng, X. M. Pyrazole Amide Derivative. WO 2015129926 A1, 2015.
- (94) Bush, J. K.; Hansen, M. M.; Li, R.; Mabry, T. E.; Snyder, N. J.; Wallace, O. B.; Xu, Y. Inhibitors of 11-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. US 8,153,807 B2, 2012.
- (95) Ma, Z.; Wang, X.; Wang, X.; Rodriguez, R. A.; Moore, C. E.; Gao, S.; Tan, X.; Ma, Y.; Rheingold, A. L.; Baran, P. S.; Chen, C. Asymmetric Syntheses of Scepterin and Massadine and Evidence for Biosynthetic Enantiodivergence. *Science* **2014**, *346* (6206), 219–224. <https://doi.org/10.1126/science.1255677>.

- (96) Dey, S.; Karabal, P. U.; Sudalai, A. Concise Enantioselective Synthesis of Naturally Active (S)-3-Hydroxypiperidine. *Synth. Commun.* **2015**, *45* (13), 1559–1565. <https://doi.org/10.1080/00397911.2015.1033428>.
- (97) Lehr, K.; Schulthoff, S.; Ueda, Y.; Mariz, R.; Leseurre, L.; Gabor, B.; Fürstner, A. A New Method for the Preparation of Non-Terminal Alkynes: Application to the Total Syntheses of Tulearin A and C. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (1), 219–227. <https://doi.org/10.1002/chem.201404873>.
- (98) Anderl, F.; Grobl, S.; Wirtz, C.; Alois, F. Total Synthesis Total Synthesis of Belizentrin Methyl Ester : Report on a Likely Conquest. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (33), 10712–10717. <https://doi.org/10.1002/anie.201805125>.
- (99) Sharipov, B. T.; Davidova, A. N.; Ryabova, A. S.; Galimzyanova, N. F.; Valeev, F. A. Synthesis and Fungicidal Activity of Methylsulfanylmethyl Ether Derivatives of Levoglucosenone. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2019**, *55* (1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/s10593-019-02415-7>.
- (100) Zamzow, M.; Hocker, H. Synthesis of Polymers with Pendant Spiro Orthoester Groups. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 2381–2400.
- (101) Ray, P.; Hughes, T.; Smith, C.; Simon, G. P.; Saito, K. Synthesis of Bioacrylic Polymers from Dihydro-5-Hydroxyl Furan-2-One (2H-HBO) by Free and Controlled Radical Polymerization. *ACS Omega* **2018**, *3*, 2040–2048. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01929>.
- (102) Diot-Néant, F.; Rastoder, E.; Miller, S. A.; Allais, F. Chemo-Enzymatic Synthesis and Free Radical Polymerization of Renewable Acrylate Monomers from Cellulose-Based Lactones Chemo-Enzymatic Synthesis and Free Radical Polymerization of Renewable Acrylate Monomers from Cellulose-Based Lactones. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (12), 17284–17293. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04707>.
- (103) Nifant'ev, I. E.; Shlyakhtin, A. V.; Bagrov, V. V.; Ezhov, R. N.; Lozhkin, B. A.; Churakov, V.; Ivchenko, P. V. Ring-Opened 4-Hydroxy- δ -Valerolactone Subunit as a Key Structural Fragment of Polyesters That Degrade without Acid Formation. *Mendeleev Commun.* **2018**, *28*, 629–631. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.11.022>.
- (104) Peru, A. A. M.; Flourat, A. L.; Gunawan, C.; Raverty, W.; Jevric, M.; Greatrex, B. W.; Allais, F. Chemo-Enzymatic Synthesis of Chiral Epoxides Ethyl and Methyl (S)-3-(Oxiran-2-Yl)Propanoates from Renewable Levoglucosenone: An Access to Enantiopure (S)-Dairy Lactone. *Molecules* **2016**, *21* (8). <https://doi.org/10.3390/molecules21080988>.
- (105) Cases, M.; Turiso, F. G. De; Hadjisoteriou, M. S.; Pattenden, G. Synthetic Studies towards Furanocembrane Diterpenes. A Total Synthesis of Bis-Deoxylophotoxin. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (15), 2786–2804.
- (106) Haynes, S. W.; Sydor, P. K.; Corre, C.; Song, L.; Challis, G. L. Stereochemical Elucidation of Streptorubin B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (6), 1793–1798. <https://doi.org/10.1021/ja109164t>.
- (107) Sravanth Kumar, A.; Praneeth, K.; Srihari, P.; Yadav, J. S. First Stereoselective Total Synthesis and Reconfirmation of Absolute Structure of Nonenolide (–)-Stagonolide D. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (6), 509–511. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.12.042>.
- (108) Cheng, X.; Quintanilla, C. D.; Zhang, L. Total Synthesis and Structure Revision of Diplobifuranylone

- B. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (17), 11054–11060. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01613>.
- (109) Purgett, T. J.; Dyer, M. W.; Bickel, B.; McNeely, J.; Porco, J. A. Gold(I)-Mediated Cycloisomerization/Cycloaddition Enables Bioinspired Syntheses of Neonectrolides B–E and Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (38), 15135–15144. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06355>.
- (110) Montagnat, O. D.; Lessene, G.; Hughes, A. B. Synthesis of Azide-Alkyne Fragments for “Click” Chemical Applications. Part 2. Formation of Oligomers from Orthogonally Protected Chiral Trialkylsilylhomopropargyl Azides and Homopropargyl Alcohols. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (2), 390–398. <https://doi.org/10.1021/jo9021887>.
- (111) Stockton, K. P.; Greatrex, B. W. Synthesis of Enantiopure Cyclopropyl Esters from (-)-Levoglucosenone. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (31), 7520–7528. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- (112) Chattopadhyay, S.; Mamdapur, V. R.; Chadha, M. S. Synthesis of Both the Enantiomers of 4-Dodecanolide, the Pheromone of the Rove Beetle. *Tetrahedron* **1990**, *46* (10), 3667–3672. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81536-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81536-2).
- (113) James, D. G.; Petroski, R. J.; Cossé, A. A.; Zilkowski, B. W.; Bartelt, R. J. Bioactivity, Synthesis, and Chirality of the Sex Pheromone of Currant Stem Girdler, Janus Integer. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29* (10), 2189–2199. <https://doi.org/10.1023/A:1026210111334>.
- (114) Habel, A.; Boland, W. Efficient and Flexible Synthesis of Chiral γ - and δ -Lactones. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (9), 1601–1604. <https://doi.org/10.1039/b801514g>.
- (115) Shin, D. S.; Yadagiri, P.; Falck, J. R.; Masferrer, J. L.; Schwartzman, M. L. Synthesis and Structure Confirmation of Compound D, A Proinflammatory Arachidonate Metabolite. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (30), 3923–3926. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99285-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99285-2).
- (116) Koga, K.; Taniguchi, M.; Yamada, S. A New Synthesis of D-Ribose from L-Glutamic Acid. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12* (3), 263–266.
- (117) Lamb, J. R.; Jung, Y.; Coates, G. W. Meinwald-Type Rearrangement of Monosubstituted Epoxides to Methyl Ketones Using an [Al Porphyrin]+[Co(CO)₄]- Catalyst. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2* (4), 346–349. <https://doi.org/10.1039/c4qo00324a>.
- (118) (Z)-dairy lactone <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1038301.html> (accessed Nov 7, 2019).
- (119) Moreaux, M.; Bonneau, G.; Peru, A. A. M.; Brunissen, F.; Janvier, M.; Haudrechy, A.; Allais, F. High-Yielding Diastereoselective Syn-Dihydroxylation of Protected HBO : An Access to D-(+)-Ribono-1,4-Lactone and 5-O-Protected Analogues. *European J. Org. Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201801780>.
- (120) Abdel-Mawgoud, A. M.; Lépine, F.; Déziel, E. Rhamnolipids: Diversity of Structures, Microbial Origins and Roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86* (5), 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>.
- (121) Randhawa, K. K. S.; Rahman, P. K. S. M. Rhamnolipid Biosurfactants-Past, Present, and Future

- Scenario of Global Market. *Front. Microbiol.* **2014**, *5* (SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
- (122) Héloir, M.-C.; Adrian, M.; Brulé, D.; Claverie, J.; Cordelier, S.; Daire, X.; Dorey, S.; Gauthier, A.; Lemaître-Guillier, C.; Negrel, J.; Trdá, L.; Trouvelot, S.; Vandelle, E.; Poinssot, B. Recognition of Elicitors in Grapevine: From MAMP and DAMP Perception to Induced Resistance. *Front. Plant Sci.* **2019**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01117>.
- (123) Schellenberger, R.; Touchard, M.; Clément, C.; Baillieul, F.; Cordelier, S.; Crouzet, J.; Dorey, S. Apoplastic Invasion Patterns Triggering Plant Immunity: Plasma Membrane Sensing at the Frontline. *Mol. Plant Pathol.* **2019**. <https://doi.org/10.1111/mpp.12857>.
- (124) Nasir, M. N.; Lins, L.; Crowet, J.; Ongena, M.; Dorey, S.; Dhondt-cordelier, S.; Clément, C.; Bouquillon, S.; Haudrechy, A.; Sarazin, C.; Fauconnier, M.-L.; Nott, K.; Deleu, M.; Differential Interaction of Synthetic Glycolipids with Biomimetic Plasma Membrane Lipids Correlates with the Plant Biological Response. *Langmuir* **2017**, *13*, 9979–9987. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01264>.
- (125) Menhour, B.; Mayon, P.; Plé, K.; Bouquillon, S.; Dorey, S.; Clément, C.; Deleu, M.; Haudrechy, A. A Stereocontrolled Synthesis of the Hydrophobic Moiety of Rhamnolipids. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (9), 1159–1161. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.01.091>.
- (126) Menhour, B.; Akong, F. O.; Mayon, P.; Plé, K.; Bouquillon, S.; Dorey, S.; Clément, C.; Deleu, M.; Harakat, D.; Haudrechy, A. Recycling Mitsunobu Coupling: A Shortcut for Troublesome Esterifications. *Tetrahedron* **2016**, *72* (47), 7488–7495. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.09.065>.
- (127) Coss, C.; Carrocci, T.; Maier, R. M.; Pemberton, J. E.; Polt, R. Minimally Competent Lewis Acid Catalysts: Indium(III) and Bismuth(III) Salts Produce Rhamnosides (=6-Deoxymannosides) in High Yield and Purity. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95* (12), 2652–2659. <https://doi.org/10.1002/hlca.201200528>.
- (128) De Vleeschouwer, M.; Sinnaeve, D.; Van Den Begin, J.; Coenye, T.; Martins, J. C.; Madder, A. Rapid Total Synthesis of Cyclic Lipodepsipeptides as a Premise to Investigate Their Self-Assembly and Biological Activity. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (25), 7766–7775. <https://doi.org/10.1002/chem.201402066>.
- (129) Bauer, J.; Brandenburg, K.; Zähringer, U.; Rademann, J. Chemical Synthesis of a Glycolipid Library by a Solid-Phase Strategy Allows Elucidation of the Structural Specificity of Immunostimulation by Rhamnolipids. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (27), 7116–7124. <https://doi.org/10.1002/chem.200600482>.
- (130) Bauer, J.; Rademann, J. Hydrophobically Assisted Switching Phase Synthesis: The Flexible Combination of Solid-Phase and Solution-Phase Reactions Employed for Oligosaccharide Preparation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7296–7297. <https://doi.org/10.1021/ja051737x>.
- (131) Bernet, B.; Vasella, A. Carbocyclische Verbindungen Aus Monosacchariden. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62* (204), 1990–2016. <https://doi.org/10.1002/hlca.19790620629>.
- (132) Soengas, R. G.; Silva, A. M. S. Domino Reaction of Iodoglycosides: Synthesis of Carbohydrate-Based Nitroalkenes. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 23, 5022–5027. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300362>.

- (133) Aspinall, G. O.; Chatterjee, D.; Khondo, L. The Hex-5-Enose Degradation: Zinc Dust Cleavage of 6-Deoxy-6-Iodo- α -D-Galactopyranosidic Linkages in Methylated Di- and Trisaccharides. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2728–2735.
- (134) Merck. The Future of Solvents : Bio Renewable. 2019.
- (135) Florent, J. C.; Ughetto-monfrin, J.; Monneret, C. Anthracyclines. 2. Isosaccharinic Acid as Chiral Template for the Synthesis of (+)-4-Demethoxy-9-Deacetyl-9-(Hydroxymethyl)Daunomycinone and (-)-4-Deoxy- γ -Rhodomycinone. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (6), 1051–1056. <https://doi.org/10.1021/jo00382a015>.
- (136) Bélanger, P.; Prasit, P. Carbocycles from Carbohydrates: A Simple Route to an Enantiomerically Pure Prostaglandin Intermediate. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29* (43), 5521–5524. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)80802-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)80802-3).
- (137) Wang, D.; Nugent, W. A. 2-Deoxyribose as a Rich Source of Chiral 5-Carbon Building Blocks. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (19), 7307–7312. <https://doi.org/10.1021/jo0712143>.
- (138) Sharipov, B. T.; Pershin, A. A.; Valeev, F. A. Synthesis of Sarcodictyin A Analogue Containing 14-Methyl Group and C(12)=C(13) Bond in Ring A from Levoglucosenone. *Mendeleev Commun.* **2017**, *27* (2), 119–121. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.03.003>.
- (139) Ngo, H. L.; Jones, K.; Foglia, T. A. Metathesis of Unsaturated Fatty Acids: Synthesis of Long-Chain Unsaturated- α,ω -Dicarboxylic Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83* (7), 629–634. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1249-0>.
- (140) Ngo, H. L.; Foglia, T. A. Synthesis of Long Chain Unsaturated- α,ω -Dicarboxylic Acids from Renewable Materials via Olefin Metathesis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84* (8), 777–784. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1089-6>.
- (141) Liu, Z.; Xu, C.; Del Pozo, J.; Torker, S.; Hoveyda, A. H. Ru-Based Catechthiolate Complexes Bearing an Unsaturated NHC Ligand: Effective Cross-Metathesis Catalysts for Synthesis of (Z)- α,β -Unsaturated Esters, Carboxylic Acids, and Primary, Secondary, and Weinreb Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (17), 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02318>.
- (142) Allen, D. P.; Van Wingerden, M. M.; Grubbs, R. H. Well-Defined Silica-Supported Olefin Metathesis Catalysts. *Org. Lett.* **2009**, *11* (6), 1261–1264. <https://doi.org/10.1021/ol9000153>.
- (143) Buchmeiser, M. R. Immobilization of Olefin Metathesis Catalysts. In *Olefin Metathesis: Theory and Practice*; Grela, K., Ed.; John Wiley & Sons Inc, 2014; pp 495–514. <https://doi.org/10.1002/9781118711613.ch20>.
- (144) Buchmeiser, M. R. Recent Advances in the Synthesis of Supported Metathesis Catalysts. *New J. Chem.* **2004**, *28*, 549–557. <https://doi.org/10.1039/b315236g>.
- (145) Kawai, T.; Isobe, M.; Peters, S. C. Factors Affecting Reaction of 1,6-Anhydrohexos-2-Ulose Derivatives. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 115–131. <https://doi.org/10.1071/CH9950115>.
- (146) Ma, X.; Liu, X.; Yates, P.; Raverty, W.; Banwell, M. G.; Ma, C.; Willis, A. C.; Carr, P. D. Manipulating the Enone Moiety of Levoglucosenone: 1,3-Transposition Reactions Including Ones Leading to Isolevoglucosenone. *Tetrahedron* **2018**, *74* (38), 5000–5011.

<https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.03.023>.

- (147) Cardellach, J.; Font, J.; Ortuno, R. M. A Facile and General Entry to Optically Active Pheromones and Aromas with Gamma-Alkyl-Gamma-Lactone Structures. A Study of Some Lactone Derivatives Pentoses. *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, *21*, 327–331.
- (148) Ferreres, F.; Fernandes, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Metabolic and Bioactivity Insights into Brassica Oleracea Var. Acephala. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (19), 8884–8892. <https://doi.org/10.1021/jf902661g>.
- (149) Nenadis, N.; Lazaridou, O.; Tsimidou, M. Z. Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (14), 5452–5460. <https://doi.org/10.1021/jf070473q>.
- (150) Robbins, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>.
- (151) El-Seedi, H. R.; El-Said, A. M. A.; Khalifa, S. A. M.; Göransson, U.; Bohlin, L.; Borg-Karlson, A. K.; Verpoorte, R. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (44), 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>.
- (152) Nićiforović, N.; Abramović, H. Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (1), 34–51. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12041>.
- (153) Ou, S.; Kwok, K. C. Ferulic Acid: Pharmaceutical Functions, Preparation and Applications in Foods. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84* (11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>.
- (154) Oryza oil & Fat Chemical CO. *FERULIC ACID: Beauty, Antioxidant, Brain Function Enhancing Effect*; 2011.
- (155) Damasceno, S. S.; Dantas, B. B.; Ribeiro-Filho, J.; Antônio M. Araújo, D.; Galberto M. da Costa, J. Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (20), 3015–3023. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>.
- (156) Pei, K.; Ou, J.; Huang, J.; Ou, S. P-Coumaric Acid and Its Conjugates: Dietary Sources, Pharmacokinetic Properties and Biological Activities. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96* (9), 2952–2962. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>.
- (157) Humphreys, J. M.; Hemm, M. R.; Chapple, C. New Routes for Lignin Biosynthesis Defined by Biochemical Characterization of Recombinant Ferulate 5-Hydroxylase, a Multifunctional Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10045–10050.
- (158) FAO. FAO Stat <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC> (accessed Dec 2, 2019).
- (159) Buanafina, M. M. D. O. Feruloylation in Grasses : Current and Future Perspectives. *Mol. Plant* **2009**, *2* (5), 861–872. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp067>.
- (160) Galadima, A. I.; Salleh, M. M.; Hussin, H.; Chong, C. S.; Yahya, A.; Mohamad, S. E.; Abd-Aziz, S.; Yusof, N. N. M.; Naser, M. A.; Al-Junid, A. F. M. Biovanillin: Production Concepts and Prevention of Side Product Formation. *Biomass Convers. Biorefinery* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00418-0>.

- (161) Revelant, D.; Foucher, S.; Horbez, D.; Marion, P. Optimized Process for Extraction of Ferulic Acid with Pretreatment. WO2014/187784 A1, 2014.
- (162) Abu-Omar, M. M.; Coller, D. H.; Klein, I. M. Extraction of Natural Ferulate and Coumarate from Biomass. WO2018/195422 A1, 2018.
- (163) Pazo-Cepeda, V.; Benito-Román, Ó.; Navarrete, A.; Alonso, E. Valorization of Wheat Bran: Ferulic Acid Recovery Using Pressurized Aqueous Ethanol Solutions. *Waste and Biomass Valorization* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00787-7>.
- (164) Gopalan, N.; Rodríguez-Duran, L. V.; Saucedo-Castaneda, G.; Nampoothiri, K. M. Review on Technological and Scientific Aspects of Feruloyl Esterases: A Versatile Enzyme for Biorefining of Biomass. *Bioresour. Technol.* **2015**, *193*, 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>.
- (165) Dupoiron, S.; Lameloise, M. L.; Bedu, M.; Lewandowski, R.; Fargues, C.; Allais, F.; Teixeira, A. R. S.; Rakotoarivonina, H.; Rémond, C. Recovering Ferulic Acid from Wheat Bran Enzymatic Hydrolysate by a Novel and Non-Thermal Process Associating Weak Anion-Exchange and Electrodialysis. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *200* (October 2017), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.031>.
- (166) Shin, H. D.; McClendon, S.; Le, T.; Taylor, F.; Chen, R. R. A Complete Enzymatic Recovery of Ferulic Acid from Corn Residues with Extracellular Enzymes from *Neosartorya Spinosa* NRRL185. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95* (6), 1108–1115. <https://doi.org/10.1002/bit.21056>.
- (167) Simon, V.; Thuret, A.; Candy, L.; Bassil, S.; Duthen, S.; Raynaud, C.; Masseron, A. Recovery of Hydroxycinnamic Acids from Renewable Resources by Adsorption on Zeolites. *Chem. Eng. J.* **2015**, *280*, 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.009>.
- (168) Domingos, J. M. B.; Teixeira, A. R. S.; Dupoiron, S.; Allais, F. Simultaneous Recovery of Ferulic Acid and Sugars from Wheat Bran Enzymatic Hydrolysate by Diananofiltration. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *242*, 116755. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116755>.
- (169) Pauthenier, C.; Carbonell, P.; Faulon, J.-L. La Conception Rationnelle de Ferments Biologiques : Comment Concevoir Un Micro-Organisme Pour Produire Un Composé Chimique Spécifique. *Actual. Chim.* **2013**, *375–376*, 30–36.
- (170) Van Schijndel, J.; Canalle, L. A.; Molendijk, D.; Meuldijk, J. The Green Knoevenagel Condensation: Solvent-Free Condensation of Benzaldehydes. *Green Chem. Lett. Rev.* **2017**, *10* (4), 404–411. <https://doi.org/10.1080/17518253.2017.1391881>.
- (171) Mouterde, L. M. M.; Allais, F. Microwave-Assisted Knoevenagel-Doebner Reaction: An Efficient Method for Naturally Occurring Phenolic Acids Synthesis. *Front. Chem.* **2018**, *6* (426), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00426>.
- (172) Peyrot, C.; Peru, A. A. M.; Mouterde, L. M. M.; Allais, F. Proline-Mediated Knoevenagel-Doebner Condensation in Ethanol: A Sustainable Access to p-Hydroxycinnamic Acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (10), 9422–9427. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00624>.
- (173) Zanella, I.; Biasiotto, G.; Holm, F.; di Lorenzo, D. Cereal Lignans, Natural Compounds of Interest for Human Health? *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (1), 139–146. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200139>.

- (174) Cui, Q.; Du, R.; Liu, M.; Rong, L. Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules* **2020**, *25* (183), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25101083>.
- (175) Frezza, C.; Venditti, A.; Toniolo, C.; De Vita, D.; Franceschin, M.; Ventrone, A.; Tomassini, L.; Foddai, S.; Guiso, M.; Nicoletti, M.; Serafini, M.; Bianco, A. Nor-Lignans : Occurrence in Plants and Biological Activities - A Review. *Molecules* **2020**, *25* (197), 1–42. <https://doi.org/10.3390/molecules25010197>.
- (176) Oregui-Bengoechea, M.; Agirre, I.; Iriondo, A.; Lopez-Urionabarrenechea, A.; Requies, J. M.; Agirrezabal-Telleria, I.; Bizkarra, K.; Barrio, V. L.; Cambra, J. F. *Heterogeneous Catalyzed Thermochemical Conversion of Lignin Model Compounds: An Overview*; Springer International Publishing, 2019; Vol. 377. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0260-5>.
- (177) Sen, B. Synthesis of Lignin Model Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (13), 3445–3447. <https://doi.org/10.1021/ja01133a531>.
- (178) Gao, R.; Li, Y.; Kim, H.; Mobley, J. K.; Ralph, J. Selective Oxidation of Lignin Model Compounds. *ChemSusChem* **2018**, *11* (13), 2045–2050. <https://doi.org/10.1002/cssc.201800598>.
- (179) Lee, T. W.; Yang, J. W. Transition-Metal-Free, Conversion of Lignin Model Compounds to High-Value Aromatics: Scope and Chemoselectivity. *Green Chem.* **2018**, *20*, 3761–3771. <https://doi.org/10.1039/C8GC01886C>.
- (180) Rinesch, T.; Bolm, C. Cobalt-Catalyzed Oxidation of the β -O-4 Bond in Lignin and Lignin Model Compounds. *ACS Omega* **2018**, *3*, 8386–8392. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00994>.
- (181) Li, S.; Li, Z.; Yu, H.; Sytu, M. R.; Wang, Y.; Zheng, W.; Sherman, B. D.; Yoo, C. G.; Leem, G. Solar-Driven Lignin Oxidation via Hydrogen Atom Transfer with a Dye-Sensitized TiO Photoanode. *ACS Energy Lett.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acseenergylett.9b02391>.
- (182) Liu, Y.; Li, C.; Miao, W.; Tang, W.; Xue, D.; Xiao, J.; Zhang, T.; Wang, C. Rhodium-Terpyridine Catalyzed Redox-Neutral Depolymerization of Lignin in Water. *Green Chem.* **2020**, 33–38. <https://doi.org/10.1039/c9gc03057c>.
- (183) Tian, H.-R.; Liu, Y.-W.; Zhang, Z.; Liu, S.-M.; Dang, T.-Y.; Li, X.-H.; Sun, X.-W.; Lu, Y.; Liu, S.-X. A Multicentre Synergistic Polyoxometalate-Based Metal–Organic Framework for One-Step Selective Oxidative Cleavage of β -O-4 Lignin Model Compounds. *Green Chem.* **2020**, *22*, 248–255. <https://doi.org/10.1039/c9gc03626a>.
- (184) Wang, W.; Wang, M.; Li, X.; Cai, L.; Shi, S. Q.; Duan, C.; Ni, Y. Microwave-Assisted Catalytic Cleavage of C-C Bond in Lignin Models by Bifunctional Pt/CDC-SiC. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06606>.
- (185) Forsythe, W. G.; Garrett, M. D.; Hardacre, C.; Nieuwenhuyzen, M.; Sheldrake, G. N. An Efficient and Flexible Synthesis of Model Lignin Oligomers. *Green Chem.* **2013**, *15*, 3031–3038. <https://doi.org/10.1039/c3gc41110a>.
- (186) Mouterde, L. M. M.; Flourat, A. L.; Cannet, M. M. M.; Ducrot, P.; Allais, F. Chemoenzymatic Total Synthesis of a Naturally Occurring (5-5'')/(8'-O-4'') Dehydrotrimer of Ferulic Acid. *European J. Org. Chem.* **2013**, 173–179. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201290>.

- (187) Jaufurally, A. S.; Teixeira, A. R. S.; Hollande, L.; Allais, F.; Ducrot, P. H. Optimization of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol and Study of Its Thermal and Antiradical Activities. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (16), 5165–5171. <https://doi.org/10.1002/slct.201600543>.
- (188) Lou, L. L.; Yao, G. D.; Wang, J.; Zhao, W. Y.; Wang, X. B.; Huang, X. X.; Song, S. J. Enantiomeric Neolignans from *Picrasma Quassioides* Exhibit Distinctive Cytotoxicity on Hepatic Carcinoma Cells through ROS Generation and Apoptosis Induction. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1263–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.043>.
- (189) Landucci, L. L.; Ralph, S. A.; Hammel, K. E. ¹³C NMR Characterization of Guaiacyl, Guaiacyl/Syringyl and Syringyl Dehydrogenation Polymers. *Holzforschung* **1998**, *52*, 160–170.
- (190) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. Synthesis of β-O-4-Type Artificial Lignin Polymers and Their Analysis by NMR Spectroscopy. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2982–2987. <https://doi.org/10.1039/b805460f>.
- (191) Patil, N. D.; Yan, N. Study of the Nitroxyl Radical Catalyst in Aerobic Oxidative Cleavage and Functionalization of Lignin Model Compounds. *Catal. Commun.* **2016**, *84*, 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2016.06.015>.
- (192) Lancefield, C. S.; Westwood, N. J. The Synthesis and Analysis of Advanced Lignin Model Polymers. *Green Chem.* **2015**, *17*, 4980–4990. <https://doi.org/10.1039/c5gc01334h>.
- (193) Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Sunscreens with Titanium Dioxide as Nanoparticles. Health Risks?*; 2014.
- (194) Lorigo, M.; Mariana, M.; Cairrao, E. Photoprotection of Ultraviolet-B Filters: Updated Review of Endocrine Disrupting Properties. *Steroids* **2018**, *131*, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.01.006>.
- (195) Szwarcfarb, B.; Carbone, S.; Reynoso, R.; Bollero, G.; Ponzo, O.; Moguilevsky, J.; Scacchi, P. Octyl-Methoxycinnamate (OMC), an Ultraviolet (UV) Filter, Alters LHRH and Amino Acid Neurotransmitters Release from Hypothalamus of Immature Rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2008**, *116* (2), 94–98. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004589>.
- (196) Niven-Phillips, L. Could Banning Sunscreen to Help Save Coral Do More Harm than Good? *The Guardian*. 2019.
- (197) Ruegger, M.; Chapple, C. Mutations that Reduce Sinapoylmalate Accumulation in *Arabidopsis Thaliana* Define Loci with Diverse Roles in Phenylpropanoid Metabolism. *Genetics* **2001**, *159* (4), 1741–1749.
- (198) Baker, L. A.; Staniforth, M.; Flourat, A. L.; Allais, F.; Stavros, V. G. Gas-Solution Phase Transient Absorption Study of the Plant Sunscreen Derivative Methyl Sinapate. *ChemPhotoChem* **2018**, *2* (8), 743–748. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800060>.
- (199) Kobayashi, T.; Taguchi, H.; Shigematsu, M.; Tanahashi, M. Substituent Effects of 3,5-Disubstituted p-Coumaryl Alcohols on Their Oxidation Using Horseradish Peroxidase–H₂O₂ as the Oxidant. *J. Wood Sci.* **2005**, *51*, 607–614. <https://doi.org/10.1007/s10086-005-0702-2>.
- (200) Lu, F.; Ralph, J.; Lu, F.; Ralph, J. Novel Tetrahydrofuran Structures Derived from Beta–Beta-

- Coupling Reactions Involving Sinapyl Acetate in Kenaf Lignins. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (20), 3681–3694. <https://doi.org/10.1039/b809464k>.
- (201) Yue, F.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. Synthesis and Characterization of New 5-Linked Pinosresinol Lignin Models. *Chem. a Eur. J.* **2012**, *18*, 16402–16410. <https://doi.org/10.1002/chem.201201506>.
- (202) Takahama, U. Oxidation of Hydroxycinnamic Acid and Hydroxycinnamyl Alcohol Derivatives by Laccase and Peroxidase. Interactions among p-Hydroxyphenyl, Guaiacyl and Syringyl Groups during the Oxidation Reactions. *Physiologia Plantarum.* 1995, pp 61–68. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930110.x>.
- (203) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (40), 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>.
- (204) INRS. *Pyridine Fiche Toxicologique*; 2011.
- (205) Allais, F.; Martinet, S.; Ducrot, P. H. Straightforward Total Synthesis of 2-O-Feruloyl-L-Malate, 2-O-Sinapoyl-L-Malate and 2-O-5-Hydroxyferuloyl-L-Malate. *Synthesis (Stuttg.)*. **2009**, No. 21, 3571–3578. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1216983>.
- (206) Fondation contre le cancer. Rayonnement ultraviolet <https://www.cancer.be/prevention/soleil-et-uv/le-soleil-danger/rayonnement-ultraviolet> (accessed Mar 25, 2020).
- (207) Que Choisir. Produits cosmétiques Les fiches des molécules toxiques à éviter <https://www.quechoisir.org/decryptage-produits-cosmetiques-les-fiches-des-molecules-toxiques-a-eviter-n2019/#benzophenone-1-benzophenone-3> (accessed Mar 25, 2020).
- (208) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- (209) Bew, S. P.; Stephenson, G. R.; Rouden, J.; Godemert, J.; Seylani, H.; Martinez-Lozano, L. A. Gaining Insight Into Reactivity Differences Between Malonic Acid Half Thioesters (MAHT) and Malonic Acid Half Oxyesters (MAHO). *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (19), 4557–4569. <https://doi.org/10.1002/chem.201605148>.
- (210) Kreibich, M.; Petrović, D.; Brückner, R. Mechanistic Studies of the Deslongchamps Annulation. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (3), 1116–1133. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02341>.
- (211) Bulman Page, P. C.; Moore, J. P. G.; Mansfield, I.; McKenzie, M. J.; Bowler, W. B.; Gallagher, J. A. Synthesis of Bone-Targeted Oestrogenic Compounds for the Inhibition of Bone Resorption. *Tetrahedron* **2001**, *57* (9), 1837–1847. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)01164-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01164-9).
- (212) Dean, J. C.; Kusaka, R.; Walsh, P. S.; Allais, F.; Zwier, T. S. Plant Sunscreens in the UV-B: Ultraviolet Spectroscopy of Jet-Cooled Sinapoyl Malate, Sinapic Acid, and Sinapate Ester Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (42), 14780–14795. <https://doi.org/10.1021/ja5059026>.
- (213) Peyrot, C.; Mention, M. M.; Brunissen, F.; Balaguer, P.; Allais, F. Innovative Bio-Based Organic UV-A and Blue Light Filters from Meldrum's Acid. *Molecules* **2020**, *25* (2178), 1–15.

Valorisation de co-produits de filières agroindustrielles : de la chimie verte aux applications

Un passage à une économie verte est de plus en plus pressant comme le confirme le récent rapport du GIEC. Afin de soutenir la structuration de filières agro-industrielles durables pour la production d'énergie ou de produits de commodité, le développement parallèle de marchés de plus petit volume mais de très forte valeur ajoutée est nécessaire. Dans cette optique, deux développements seront abordés à partir de coproduits d'une première transformation de ressource renouvelable.

Premièrement, l'industrie papetière, en crise, génère de grandes quantités de sciure de bois qui peuvent être transformées par flash pyrolyse en lévoglucosénone. Cette molécule chirale, bi-cyclique présentant de nombreuses fonctionnalités chimiques (cétone, acétal, alcène) est un composé plateforme ouvrant un vaste champ d'opportunités pour la chimie biosourcée. L'obtention de molécules chirales à partir de la lévoglucosénone ouvre des applications dans le domaine pharmaceutique, dans le secteur du bio contrôle et aussi dans l'industrie agro-alimentaire.

Deuxièmement, les acides para-hydroxycinnamiques obtenus à partir de résidus agricoles tels que le son de blé, les tourteaux de colza, de tournesol ou de moutarde, représentent une source de composés phénoliques à fort potentiel. Ces molécules sont connues pour posséder un certain nombre d'activités physico-chimiques (anti-radicalaire, anti-UV) et biologiques (anticancéreux, anti-inflammatoire). Des voies de fonctionnalisation de ces molécules par des procédés de synthèse respectant les concepts de la chimie verte seront explorées dans le but d'améliorer ces propriétés, notamment pour la production d'anti-UV.

Lévoglucosénone, acides para-hydroxycinnamiques, (5)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide, chimie verte, acide férulique, acide sinapique

AgroIndustrial co-product valorization : from Green Chemistry to applications

The need for a shift to a green economy is becoming increasingly urgent as confirmed by the recent IPCC report. In order to support the structuring of sustainable agro-industrial sectors for the production of energy or commodities, the parallel development of markets with smaller volumes but with a very high added value is necessary. Among these high-potential markets, the health and cosmetics sectors are particularly promising. Two developments related to plant chemistry will be addressed by the prism of co-products generated after a first transformation of renewable resource.

In the first place, the paper industry, in crisis, generates large quantities of sawdust that can be converted by flash pyrolysis into levoglucosenone. This chiral, bi-cyclic (5 and 7-membered) molecule with numerous chemical functionalities (ketone, acetal, alkene) is a platform compound opening up a vast field of opportunities for biosourced chemistry. Obtaining chiral molecules from levoglucosenone opens up applications in the pharmaceutical field, in the bio-control sector and also in the food industry.

On the other hand, para-hydroxycinnamic acids obtained from agricultural residues such as wheat bran, rapeseed or sunflower meal or mustard bran represent a source of phenolic compounds with high potential. These molecules are known to possess a certain number of physico-chemical (anti-radical, anti-UV) and biological (anticancer, anti-inflammatory) activities. Pathways of functionalization of these molecules by synthetic methods respecting the concepts of green chemistry will be explored in order to improve these properties, especially for the production of anti-UV.

Lévoglucosénone, para-hydroxycinnamic acids, (5)- γ -hydroxyméthyl- α,β -buténolide, green chemistry, ferulic acid, sinapic acid

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Chimie organique

Université de Reims Champagne-Ardenne

ICMR - UMR CNRS 7312

Cliquez ici pour entrer du texte.

