

Université de Lille

École Doctorale – 104 Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biotechnologies, Agroalimentaire, Sciences de l'aliment, Physiologie

Par

Juan RODRIGUEZ MOSHEIM

Soutenu le 25/03/2024

Fonctionnalisation de terpènes biosourcés par biocatalyse enzymatique pour des applications en pharmacologie et en biocontrôle

Rapportrices :

Pr. ZAPARUCHA Anne, Génoscope CEA/Génomique Métabolique (Université Evry-Paris-Saclay)
Pr. GUIVARC'H Nathalie, Université de Tours

Examinatrice :

Présidente du jury : Pr. HUMEAU Catherine, Université de Lorraine

Encadrement :

Directeur de thèse : Pr. FROIDEVAUX Rénato, Université de Lille
Co-directeur de thèse : Pr. HILBERT Jean-Louis, Université de Lille
Co-encadrant de thèse : Dr. HEUSON Egon, Centrale Lille Institut
Co-encadrant de thèse et invité : HANCE Philippe, Université de Lille

Remerciements

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier mes encadrants ; Rénato et Egon, pour toutes nos discussions, de m'avoir conseillé et aidé tout au long de ces années, de m'avoir fait confiance. Jean-Louis et Philippe, de m'avoir fait découvrir la chicorée et les terpènes, de m'avoir permis de travailler sur ce nouveau projet.

Je remercie la région des Hauts de France, l'école doctorale SMRE et l'université de Lille, d'avoir soutenu ce projet. A l'Institut Charles Viollette/UMR BioEcoAgro, la plateforme RealCat et toutes leurs équipes, pour leur aide et leur accueil si chaleureux.

A tous mes collègues de bureau et de labo, doctorants, post-docs, techniciens, ingénieurs, ceux qui sont parti et ceux qui sont encore là. Pour votre aide et pour tous les bons moments partagés.

A mes stagiaires Chiara, Claire et Meryle, que j'ai eu l'honneur d'encadrer. Merci d'avoir travaillé avec moi sur ce projet et de m'avoir permis de participer à votre formation

A mes autres collaborateurs et collaboratrices : Francesca, Nicolas Willand, ainsi que Catherine Humeau, pour les discussions intéressantes et pour leur participation à ce travail.

Je remercie ma famille, qui, bien que loin géographiquement, est toujours proche de mon cœur. Merci de m'avoir toujours soutenu de manière exceptionnelle. Mon père, qui serait très content de voir où je suis arrivé, et qui me soutient toujours, à sa manière. Ma mère, pour laquelle aucun mot n'est suffisamment puissant pour exprimer ma gratitude. À mon épouse, qui est entrée dans ma vie au cours de cette thèse, de m'avoir accompagné à mes côtés et à distance.

Merci au lecteur, merci d'avoir accordé du temps à la lecture de mon travail.

Abréviations

4-IBA : alcool 4-isopropylbenzylique

ACN : acétonitrile

ADH : alcool déshydrogénase

ADH-Gs : alcool déshydrogénase issue de *Geobacillus stearothermophilus*

ADH-Rr : alcool déshydrogénase issue de *Rhodococcus ruber*

Bm-TA : transaminase de *Burkholderia multivorans*

CAL-B : lipase B de *Candida antarctica*

Cv-TA : transaminase de *Chromobacterium violaceum*

DHLc : 11 β ,13-dihydrolactucine

DHLc-A : 11 β ,13-dihydrolactucine acétate / acétyl 11 β ,13-dihydrolactucine

DHLp : 11 β ,13-dihydrolactucopirine

DHLp-A : 11 β ,13-dihydrolactucopirine acétate / acétyl 11 β ,13-dihydrolactucopirine

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMSO : diméthylsulfoxyde

E.coli: *Escherichia coli*

ESI : ionisation par électrospray

FID : détecteur à ionisation de flamme

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

G-Ac : acétyl géraniol

GC : chromatographie phase gazeuse

GOH : géraniol

G-Hex : hexanoate de géraniol

HPLC : chromatographie liquide à haute pression

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactoside

LDH : lactate déshydrogénase

Lc : lactucine

Lc-A : lactucine acétate / acétyl lactucine

Lipase RM : lipase de *Rhizomucor miehei*

Lipase Vg : enzyme issue de *Ipomoea batatas*

Lp : lactucopirine

Lp-A : lactucopirine acétate / acétyl lactucopirine

LST : lactone sesquiterpénique

MeAcAc : acétoacétate de méthyle

MS : spectroscopie de masse

MEP : méthylérythritol phosphate

MVA : mévalonate

N435 : Novozym 435 (CAL-B immobilisée)

NAD+: nicotinamide adénine dinucléotide
(forme oxydée)

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
(forme réduite)

PLP : phosphate de 5-pyridoxal

POH : alcool périllique

Pyr : acide pyruvique

RMN : résonance magnétique nucléaire

(S)-MBA : (S)-methylbenzylamine

TA : transaminase

UPLC : chromatographie liquide à ultra haute
pression

Vf-TA : transaminase de *Vibrio fluvialis*

Table des Matières

Introduction	18
État de l'art	20
I. Fondamentaux sur les terpènes d'origine végétale	22
1. Histoire et évolution de la connaissance des terpènes	22
1.1. Introduction	22
1.2. Évolution historique de l'étude des terpènes.....	22
1.3. Classification actuelle des terpènes et leur rôle dans la nature	25
1.3.1. Généralités sur les monoterpènes	27
1.3.2. Généralités sur les sesquiterpènes.....	27
2. Biosynthèse des terpènes chez les végétaux	30
2.1. Biosynthèse des précurseurs communs à l'ensemble des terpènes	30
2.1.1. La voie du mévalonate	30
2.1.2. La voie MEP/ voie de Rohmer	32
3. Utilisation des précurseurs communs dans la synthèse des différentes familles	34
3.1. Condensation des unités isoprène donnant lieu aux précurseurs des mono et sesquiterpènes ...	34
3.2. Biosynthèse des lactones sesquiterpéniques	37
II. La chicorée : une potentielle source régionale de LST	40
1. Les plantes du genre <i>Cichorium</i> : historique et généralités	40
2. Composition de la racine de chicorée industrielle	42
3. Propriétés des LST présents dans la racine de chicorée.....	45
III. Valorisation des terpénoïdes pour des applications industrielles	48
1. Intérêt industriel des terpènes en tant que composés bioactifs	48
1.1. Introduction	48
1.2. Propriétés biologiques des monoterpénoïdes.....	49
1.3. Propriétés biologiques des LST	53
2. Modification des terpénoïdes dans la synthèse de nouveaux principes actifs	57
2.1. Introduction	57
2.2. Principales voies d'acylation utilisées sur les terpènes	58
2.2.1. Couplage avec l'acide carboxylique en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et diisopropylcarbodiimide (DIC).....	58
2.2.2. Utilisation d'agents acylants activés	59
2.3. Synthèse d'esters de lactones sesquiterpéniques : des analogues plus performants.....	60
2.3.1. Étude sur les hélénanolides.....	61
2.3.2. Étude sur l'acide sonchifolinique	63
2.3.3. Étude sur la scabertopine.....	64
2.3.4. Les analogues de la Thapsigargine	65
2.3.5. Synthèse chimio-enzymatique d'analogues du micheliolide	68
2.4. Conclusion sur la synthèse de dérivés acylés	70

IV. La biocatalyse au service de la synthèse d'esters de terpénoïdes	72
1. Utilisation d'hydrolases dans la synthèse de dérivés acyles de terpènes naturels.....	72
1.1. Contexte : l'avantage des enzymes dans le marché des esters de monoterpénoïdes	72
1.2. Généralités sur les lipases.....	72
1.2.1. La lipase B de <i>Candida antarctica</i> : une lipase d'intérêt.....	73
1.2.2. Mécanisme catalytique des lipases dans des réactions de transestérification	74
1.3. Synthèse d'esters de monoterpénoïdes pour des applications agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques	76
1.3.1. Principaux exemples de monoterpénoïdes utilisés dans ce contexte	76
1.3.2. Le choix des conditions réactionnelles.....	77
1.4. Synthèse d'esters de lactones sesquiterpéniques	80
Résultats et discussions	84
Préambule.....	86
Chapitre 1 : Utilisation de lipases dans l'acylation de monoterpénoïdes	88
I. Criblage et introduction de chaînes aliphatiques.....	88
1. Introduction.....	88
2. Acylation du géraniol et investigation d'une lipase végétale de la patate douce	89
3. Utilisation de la lipase Novozym 435 dans l'acylation de l'alcool périllique avec l'acide acétique et l'acetate de vinyle	94
II. Introduction de chaînes cétoester sur des monoterpénoïdes.....	97
1. Synthèse d'un dérivé α -cétoester de l'alcool périllique.....	97
2. Synthèse de dérivés α -cétoester d'autres monoterpénoïdes courants	101
3. Synthèse du dérivé β -céto ester de l'alcool périllique via la transestérification avec l'acétoacetate de méthyle	103
Chapitre 2 : Acylation des lactones sesquiterpéniques retrouvées dans la racine de chicorée	107
I. Modification de la 11β,13-dihydrolactucine	107
1. Introduction.....	107
2. Première synthèse de la 11 β ,13-dihydrolactucine acetate	109
2.1. Transestérification enzymatique entre la DHLc et l'acetate de vinyle.....	109
2.2. Analyse infrarouge	112
2.3. Estérification enzymatique entre la DHLc et l'acide acétique	114
3. Synthèse d'autres esters aliphatiques de la 11 β ,13-dihydrolactucine	115
3.1. Mise en œuvre des réactions.....	115
3.2. Explication de la régiosélectivité observée	117
4. Synthèse d'esters non-aliphatiques de la 11 β ,13-dihydrolactucine.....	119
II. Extension du procédé aux autres LST de la chicorée, synthèse des dérivés acetate de la lactucine, lactucopicine et dihydrolactucopicine.....	123
1. Acétylation de la lactucine, lactucopicine et la 11 β ,13-dihydrolactucopicine.....	123
Chapitre 3 : Acylation d'extraits de racine de chicorée riches en lactones sesquiterpéniques d'intérêt	126
I. Obtention et caractérisation des extraits	126
1. Introduction.....	126
2. Obtention d'un extrait de racine par macération	126

II.	Utilisation de Novozym 435 dans la transestérification d'un extrait avec l'acétate de vinyle	130
1.	Mise en œuvre de la réaction et analyse des extraits par infrarouge	130
2.	Identification des composés par LC-MS	134
Chapitre 4 : Evaluation des activités biologiques des extraits obtenus		140
I.	Premiers tests d'activité antifongique sur extraits de racine avant et après modification	140
1.	Tests antifongiques sur <i>Rhizoctonia solani</i> via la méthode de diffusion par puits.....	140
2.	Développement du test antifongique à haut-débit basé sur la réduction de la résazurine	142
2.1.	Le principe du test.....	142
2.2.	Étude du comportement d'une solution de spores de <i>Fusarium</i> 2DA63 en présence de résazurine	142
2.3.	Étude de la viabilité de spores de <i>Fusarium</i> en présence de différents extraits de racine	144
Chapitre 5 : Extension du contexte à des nouveaux types de réactions biocatalytiques		148
I.	Introduction	148
II.	Utilisation de transaminases dans l'amination de terpénoïdes d'intérêt	150
1.	Transamination des cétoesters de l'alcool périllique	150
2.	Transamination du monoterpénoïde myrténal	153
2.1.	Contexte	153
2.2.	Gamme d'absorbance du myrténol et du myrténal.....	153
2.3.	Test de transamination basé en utilisant la L-alanine et la lactate déshydrogénase	156
III.	Utilisation d'alcool déshydrogénases dans des réactions d'oxydoréduction	158
1.	Sélection et production de deux alcool déshydrogénases (ADH).....	158
1.1.	Généralités sur le choix des ADH	158
1.2.1.	Production de ADH-Gs.....	159
1.2.2.	Production de ADH-Rr	161
2.	Utilisation des alcool déshydrogénases sur différents substrats	162
2.1.	Tests d'activité sur des substrats possédant des fonctions alcool primaire et secondaire	162
Conclusion et Perspectives		166
Partie expérimentale		169
Biologie Moléculaire et Biochimie		170
1.	Production de protéines recombinantes	170
1.1.	Transformation	171
1.2.	Étalement sur boîte de pétri :.....	171
1.3.	Préculture	171
1.3.1.	A partir d'une colonie.....	171
1.3.2.	Préparation de 'glycérol stock' pour la conservation des cellules transformées	172
1.3.3.	Préculture à partir de 'glycérol stock '	172
1.4.	Culture	172
1.5.	Induction.....	172
1.6.	Récupération des cellules	172
1.7.	Dialyse au sulfate d'ammonium	173
1.8.	Détermination de la quantité de protéines totale.....	173
1.9.	Purification de la transaminase issue de <i>Burkholderia multivorans</i> (Bm-TA)	173
1.10.	Réalisation des gels SDS-page pour l'identification des protéines	174
2.	Tests d'activité enzymatique	174
2.1.	Généralités.....	174

2.2.	Tests d'activité pour les ADH	175
2.2.1.	Tests d'oxydation des alcools	175
2.2.2.	Test de réduction des carbonyles	175
2.3.	Tests d'activité des transaminases	175
2.3.1.	Généralités	175
2.3.2.	Test utilisant la (S)-MBA comme donneur d'amine	176
2.3.3.	Test utilisant la L-alanine couplé à la lactate déshydrogénase	176
2.4.	Test d'activité des lipases basés sur l'hydrolyse du p-nitrophenylbutyrate	176
Synthèses enzymatiques		177
1.	Réactions d'acylation de monoterpénoïdes	177
1.1.	Généralités	177
1.2.	Mise en œuvre des réactions de synthèse d'esters aliphatiques du géraniol	177
1.3.	Synthèse du (S)-perillyl acetate	178
1.4.	Synthèse de l'ester pyruvique de l'alcool périllique	178
1.5.	Synthèse des esters pyruviques d'autres monoterpénoïdes	178
1.6.	Synthèse de l'ester acétoacétique de l'alcool périllique	179
2.	Réactions d'acylation des lactones sesquiterpéniques.....	179
2.1.	Généralités.....	179
2.2.	Synthèse des acétates de DHLc, DHLp, Lc et Lp en utilisant la CAL-B.....	179
2.3.	Synthèse d'esters de la DHLc avec des donneurs d'acyle commerciaux en utilisant la CAL-B	180
2.4.	Tentative de synthèse d'esters de la DHLc avec des aryl vinyl esters	180
2.5.	Etudes de modélisation des interactions entre les LST et la CAL-B	180
Études sur les extraits de racine de chicorée.....		181
1.	Préparation des extraits de racine de <i>Cichorium intybus</i>	181
2.	Réactions d'acylation catalysée par la CAL-B en utilisant l'acétate de vinyle	181
3.	Tests d'activité antifongique	182
3.1.	Généralités.....	182
3.2.	Tests d'activité contre <i>Rhizoctonia solani</i>	182
3.3.	Tests d'activité basés sur la méthode de la résazurine	182
3.3.1.	Préparation des spores	182
3.3.2.	Évaluation de la viabilité des spores de <i>Fusarium</i>	183
Chimie analytique.....		184
1.	Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)	184
2.	Chromatographie phase gazeuse	184
3.	Chromatographie liquide	184
4.	Spectroscopie Infrarouge	185
Attribution RMN des principales molécules :		186
Bibliographie.....		189

Table des figures

Figure 1 Représentation des mono et sesquiterpènes majoritaires retrouvés dans l'essence de térébenthine.....	23
Figure 2 Monoterpènes majoritaires de l'huile de citron	24
Figure 3 a) Représentation historique de Wallach ; b) Représentation actuelle (figure de <i>Christmann et al.(2010)</i>).....	25
Figure 4 Principales sous-familles de sesquiterpènes (figure de <i>Seaman et al.(1982)</i>).....	28
Figure 5 Structure des deux précurseurs universels des terpènes	30
Figure 6 Schéma biosynthétique de la voie du mévalonate (Figure modifié de <i>Vinokur et al. (2016)</i>).....	31
Figure 7 Voie du 2-C-méthylérythriol-4-phosphate (MEP).....	33
Figure 8 Exemples de types de condensation « régulière" impliqués dans la biosynthèse du squelette terpénique (exemple avec l'IPP).....	34
Figure 9 Illustration de la synthèse des précurseurs des monoterpènes et des sesquiterpènes via une condensation de type « Head to tail »	36
Figure 10 Échange entre les deux principales voies de biosynthèse (image de <i>Yu et al. (2009)</i>)	36
Figure 11 Biosynthèse de la lactone sesquiterpénique (+)-costunolide (image adaptée de <i>Kraker et al. (2001)</i>).....	38
Figure 12 <i>Cichorium intybus</i> var. <i>sativum</i> . (A) En culture, (B) Feuilles, (C) Racines (Figure de <i>Vandoorne et al.(2012)</i>).....	41
Figure 13. Structure de l'inuline.....	42
Figure 14. Représentation des composés retrouvés dans le genre <i>Cichorium</i> (partie aérienne et racine) (à partir de la figure de <i>Nwafor et al.(2017)</i>).....	43
Figure 15 Structure, clog(P) et surface polarity des principaux LST non conjuguées retrouvés dans la racine de chicorée industrielle (données de <i>Willeman et al. (2014)</i>)	44
Figure 16 Exemple d'activités biologiques des monoterpénoïdes (figure de <i>Zielinska-Blajet et al.(2020)</i>).....	50
Figure 17 Résumé des différents mécanismes associés aux différentes activités biologiques des monoterpènes (figure de <i>Paulino et al.(2022)</i>).....	51
Figure 18 Illustration de certaines caractéristiques structurales des monoterpènes associés à leur activité antimicrobienne et antioxydante (figure de <i>Paulino et al.(2022)</i>).....	52
Figure 19 Monoterpénoïdes actifs contre des bactéries agroalimentaires	53
Figure 20 Structures de lactones sesquiterpeniques amplement connues dans la littérature	55
Figure 21 Illustration de la réactivité des groupements cyclopentanone α,β -insaturée et α MGL face à des nucléophiles biologiques soufrés tels que le glutathionne (GSH) (inspiré de <i>Schmidt et al.(2006)</i>)	56
Figure 22 Mécanisme de l'estérification de Steglich	58
Figure 23 Mécanismes impliqués dans l'utilisation de chlorure d'acyles pour la synthèse d'esters	59
Figure 24 Mécanisme de l'acylation entre un alcool et un anhydride catalysée par DMAP	60
Figure 25. Structures des hélénanolides naturels et semi-synthétiques	61
Figure 26 Structure de l'acide sonchifolinique et ses dérivés semi-synthétiques.....	63
Figure 27 Schéma réactionnel de la synthèse des dérivés de la scabertopin par <i>Zhang et al.(2022)</i>	65

Figure 28 Structure de la thapsigargine, de son analogue 12ADT et des différentes chaînes peptidiques pouvant être introduites (figure issue de <i>Isaacs et al. (2021)</i>)	66
Figure 29 Synthèse de l'analogue 12ADT de la thapsigargine (figure de <i>Zimmermann et al.(2020)</i>)	67
Figure 30 Illustration des dérivés sémi-synthétiques du micheliolide (figure de <i>Fasan et al.(2019)</i>)	69
Figure 31 Règle de Kazlauskas pour les alcools et esters secondaires (figure de <i>Gotor-Fernandez et al.(2006)</i>).....	73
Figure 32 Illustration de l'immobilisation de la lipase par activation interfaciale retrouvée dans Novozym 435.....	74
Figure 33 Représentation du cycle catalytique de CAL-B lors de la réaction d'acylation. Les flèches rouges représentent le mouvement d'électrons qui ont lieu lors du passage à la prochaine étape. Le groupement R en bleu représente la chaîne alkyle introduite	75
Figure 34 Principaux monoterpénoïdes d'intérêt ayant fait l'objet de réactions d'acylation enzymatiques catalysées par des hydrolases (figure de <i>Staudt et al.(2022)</i>).....	76
Figure 35 Bilan des réactions décrites dans l'étude d'acylation de la Cnicine (figure de <i>Monsalve et al.(2009)</i>).....	81
Figure 36 Structure de l'alcool périllique et du géraniol.....	89
Figure 37 Structure de l'acide isochlorogénique.....	89
Figure 38 Principe du test d'activité des lipases basé sur l'hydrolyse du <i>para</i> -nitrophenyl butyrate	90
Figure 39 Illustration de la synthèse d'esters du géraniol	92
Figure 40 Spectres GC-FID de l'acylation du géraniol (GOH) catalysée par les lipases Vg (4,6 µg de protéines), RM (4,72 µg de protéines) et N435 (10 mg de solide) après 24 h. A) Transesterification avec 20 mM de GOH, 60 mM d'acétate de vinyle dans 1 mL de MTBE:ACN (3:1), en présence de 3 sphères de tamis moléculaire 5 Å à 37 °C et 35 RPM ; B) Esterification avec 20 mM de GOH, 60 mM d'acide hexanoïque dans 1 mL de MTBE:ACN (3:1) en présence de 3 sphères de tamis moléculaire 5 Å à 37 °C et 35 rpm	93
Figure 41 Réaction d'acylation de l'alcool périllique catalysée par la CAL-B; via la transesterification avec l'acétate de vinyle ou l'estérification avec l'acide acétique	94
Figure 42 Chromatogrammes des réactions d'acylation de l'alcool périllique avec l'acide acétique (à gauche) et l'acétate de vinyle (à droite)	95
Figure 43 ¹ H RMN (DMSO-D ₆) témoignant la formation du périllyl acétate. (1) Spectre du produit de la réaction d'acylation et (2) spectre du témoin contenant l'alcool périllique.....	96
Figure 44 Illustration du dérivé oxalate de la DHLc et Lc retrouvé naturellement dans la racine de chicorée (à gauche) servant d'inspiration pour la synthèse de nouveaux terpènes (à droite) ..	97
Figure 45 Illustration de la réaction d'estérification entre l'alcool périllique et l'acide pyruvique	98
Figure 46 Suivi réactionnel par GC-FID montrant la consommation de l'alcool périllique et la formation de l'ester d'intérêt via la réaction d'estérification avec l'acide pyruvique catalysée par N435.....	98
Figure 47 ¹ H RMN (DMSO-D ₆) des milieux réactionnels de l'estérification de l'alcool périllique avec l'acide pyruvique. (1) Spectre du milieu réactionnel avec le produit de la réaction ; (2) Spectre du témoin sans lipase. Les déplacements correspondant aux hydrogènes de l'alcool périllique sont représentés en bleu et ceux du produit de la réaction en rouge.	99

Figure 48 Spectre de masse de l'ester pyruvique de l'alcool périllique et principales fragmentations caractéristiques. Produit de la réaction sortant a un temps de rétention de 10,6 min	100
Figure 49 : Bilan des monoterpénoïdes et leurs dérivés α -cétoester synthétisés <i>via</i> l'estérification avec l'acide pyruvique catalysée par la CAL-B immobilisée.....	101
Figure 50 Suivi réalisé par GC-FID de la formation des différents esters monoterpéniques issus de l'estérification avec l'acide pyruvique catalysée par N435 à 40 °C dans le MTBE	102
Figure 51 Décarboxylation de l'acide acétoacétique.....	103
Figure 52 Illustration de la synthèse du β -cétoester de l'alcool périllique.....	104
Figure 53 ^1H RMN (CDCl_3) des milieux réactionnels de l'acylation de l'alcool périllique avec le MeAcAc. (1) Spectre du milieu réactionnel avec le produit de la réaction ; (2) Spectre du témoin sans lipase. Les déplacements correspondant aux hydrogènes de l'alcool périllique sont représentés en bleu et ceux du produit de la réaction en rouge. (Conditions : 50 mM alcool périllique, 300 mM MeAcAc, 10 mg N435, t ₀ + 24 h)	105
Figure 54. Structure de la DHLc : A) représentation planaire de la molécule et B) Représentation stick de la structure 3D	109
Figure 55. Comparaisons des milieux réactionnels par RMN ^1H (DMSO- D_6). 1) Milieu réactionnel avec 10 mM de DHLc, 100 mM d'acétate de vinyle, 20 mg de N435 après 48 h ; 2) Milieu réactionnel témoin en absence de lipase après 48 h ; 3) DHLc pure utilisée dans la réaction.....	111
Figure 56 Illustration de la réaction d'acétylation de la DHLc catalysée par la CAL-B	112
Figure 57 FTIR de la réaction de transestérification de la DHLc après 48h avec (A) Témoin sans lipase et (B) Milieu réactionnel avec lipase	113
Figure 58 Structure des esters vinyliques utilisés comme donneur d'acyle	115
Figure 59 Représentation de la réaction d'acylation de la DHLc catalysée par la CAL-B immobilisée (Novozym 435). Structure des différents dérivés synthétisés avec le % de conversion associé après 48 h. Entre parenthèse figurent les valeurs du $\log(P)$ calculées sur l'algorithme de SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics)	116
Figure 60 Proximité du groupement OH primaire de la DHLc aux résidus catalytiques de l'intermédiaire acyl-enzyme (formé <i>via</i> l'acylation avec l'acétate de vinyle). Stabilisation de l'intermédiaire par liaisons hydrogène avec les acides aminés de la poche oxyanionique	118
Figure 61 Aryl vinyl esters testés dans la réaction d'acylation de la DHLc catalysée par Novozym 435.....	119
Figure 62 Représentation des interactions entre la DHLc et la cavité catalytique de la CAL-B. A) Interactions majoritairement hydrophobes entre la DHLc et les résidus Ile189, Ile285 et Val154, avec les régions plus hydrophiles de la cavité (bleu) et les plus hydrophobes (marron) ; B) Mode de liaison entre la DHLc et l'intermédiaire acyl-enzyme de la CAL-B en présence de la chaîne octanoyle (molécule en violet). La surface accessible au solvant est représentée en gris, et les résidus hydrophobes Ile189 et Ile285 en violet	121
Figure 63 Illustration de l'acétylation de la lactucine avec l'acétate de vinyle	123
Figure 64 . Spectres ^1H NMR (DMSO- D_6) des milieux réactionnels issus de la transestérification entre la Lc et l'acétate de vinyle. (1) Milieu réactionnel après 48 h avec 10 mM de Lc, 100 mM d'acétate de vinyle, 20 mg de N435; (2) Milieu réactionnel du témoin négatif en absence de lipase	124
Figure 65 Structure de la lactucopirine (Lp) et de la dihydrolactucopirine (DHLp)	125

Figure 66 Acétyl esters de quatre LST retrouvés dans la racine de chicorée ayant été synthétisés <i>via</i> la transestérification avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase CAL-B	125
Figure 67 Schéma simplifié du protocole de préparation des extraits de racine de chicorée	127
Figure 68 Pourcentage relatif des différents LST retrouvés dans l'extrait brut obtenue par macération à 25 °C pendant 2 h ou 24 h, d'après le chromatogramme analysée à 254 nm. L'annotation LST-gly ou LST-ox signifie la présence d'une LST sous forme de conjuguée glycosyle ou oxalate mais dont la structure n'a pas pu être identifiée précisément avec la base de données utilisée.	129
Figure 69 Photographie de l'échantillon contenant l'extrait but aqueux dans l'acétonitrile ; avant et après bain à ultrasons	130
Figure 70 Spectres FTIR de la DHLc non modifiée, de la DHLc-A, de l'extrait organique (POm) et de son témoin sans lipase (PO) après 24 et 48 h de réaction	132
Figure 71 Spectres FTIR de l'échantillon EBm après 48h de réaction. Echantillon sans centrifugation, culot de centrifugation repris dans l'eau, et surnageant après centrifugation	133
Figure 72 Chromatogrammes (UV 254 nm) obtenus pour les différents milieux réactionnels contenant l'extrait organique (PO) après 48 h de réaction. POm = milieu réactionnel avec lipase et donneur d'acyle ; Témoin A = témoin négatif sans lipase ; Témoin B = témoin négatif sans donneur d'acyle.....	135
Figure 73 Chromatogrammes (UV 254 nm) obtenus pour les différents milieux réactionnels contenant l'extrait organique (PO) après 24 ou 48 h de réaction. POm = milieu réactionnel avec lipase et donneur d'acyle	136
Figure 74 Intensités mesurées correspondant aux différents composés détectés dans l'extrait non modifié, le témoin négatif et l'extrait modifié après 24 h	137
Figure 75 Dérivés '8-deoxy' identifiés dans l'extrait modifié et potentielles structures pouvant correspondre au nouveau produit identifié dans l'extrait modifié.....	138
Figure 76 Résultats des tests antifongiques sur <i>Rhizoctonia solani</i> après 3j d'incubation. (A) Dépôts EB _{24h} , EBm _{24h} , TC _{24h} et POM _{24h} ; (B) Dépôts TC _{48h} , TB _{48h} et POM _{48h} ; (C) Quatre dépôts de Cycloheximide 10 µg ; (D) Dépôts TB _{24h} , EB _{48h} , EBm _{48h} et PO _{48h} ; (E) Quatre dépôts de DMSO 2,5 % ; (F) <i>R. solani</i> seul. Le diamètre de croissance de <i>R. solani</i> est indiqué par le cercle en pointillé noir.	141
Figure 77 Principe du test de viabilité cellulaire basée sur la réduction de la résazurine (non fluorescente) en résorufine (fluorescente)	142
Figure 78 Détermination de la fluorescence mesurée pour des spores et/ou du milieu de culture (MH) incubés pendant 24 h à 30 °C après l'ajout de résazurine (10 ou 100 µM).....	143
Figure 79 Pentas d'émission de fluorescence obtenues pour le test de viabilité cellulaire à la résazurine en présence de différents extraits et témoins. Pour les blancs réalisés en absence de spores, uniquement les pentes positives figurent sur le graphique.	145
Figure 80 Performance de plusieurs transaminases dans la transamination de différentes cétones cycliques (figure de Richter et al.(2015))	149
Figure 81 Schéma de la stratégie envisagée permettant la synthèse de nouveaux dérivés aminés de terpénoïdes tels que l'alcool périllique en passant par des intermédiaires α et β-cétoesters	150
Figure 82 Principe du test d'activité pour les transaminases en utilisant la SMBA en tant que donneur d'amine	151
Figure 83 Schéma de la cascade hybride en deux étapes permettant de produire de la myrténylamine à partir du myrténol	153

Figure 84 Gamme d'absorbance du myrténol et du myrténal pour une concentration entre 62,5 μ M et 1 mM ; avec 100 mM de tampon NaP à pH 7,5 ; 30 °C	155
Figure 85 Schéma du test de transamination du myrténal couplé avec la L-alanine et l'enzyme lactate déshydrogénase.....	156
Figure 86 Activité spécifique des transaminases en présence de myrténal ou de propanal avec 1 % DMSO tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,5) réalisé à 30 °C. Concentrations finales : 20 mM L-alanine, 2 mM myrténal ou propanal, 0.8 mM NADH, 100 μ M PLP, 0.2 U LDH et 40 μ g de <i>Cv</i> -TA, 20 μ g de <i>Bm</i> -TA ou 79 μ g de <i>Vf</i> -TA.....	157
Figure 87 Gels-SDS PAGE BioRad strain-free (8 % acrylamide). Le gel de gauche montre des échantillons du lysat dialysé avant et après choc thermique de la première production de ADH-Gs. Le gel de droite montre les échantillons du lysat et de lysats dialysés avant et après choc thermique pour une deuxième production de ADH-Gs	159
Figure 88 Gel SDS-PAGE BioRad strain-free (8 % acrylamide). Les échantillons correspondent au lysat cellulaire avant et après dialyse pour ADH-Rr.....	161
Figure 89 Principe et conditions générales du test spectrophotométrique pour les ADH basé sur la formation de NADH.....	163
Figure 90 Activité spécifique mesurée pour 26 μ g d'ADH-Gs et 41 μ g d'ADH-Rr avec 10 mM d'alcool, 2.5 mM NAD ⁺ , 60 mM tampon phosphate de sodium à pH 8, 30 °C.....	164
Figure 91 Activité spécifique relative des alcools déshydrogénases à différents pH, en présence de 10 mM de 2-butanol dans les conditions standards du test.....	165

Table des Tableaux

Tableau 1 Classification des terpènes (d'après <i>Brahmkshatriya et al.(2013)</i> et <i>Laure M.B Martinelli et al.(2020)</i>)	26
Tableau 2 Principales sous-classes de LST	29
Tableau 3 Exemples d'activités pharmacologiques <i>in-vitro</i> associées à des LST extraits de <i>Chicorium intybus</i>	46
Tableau 4 Principaux marchés pour les terpénoïdes	49
Tableau 5 Avantages et inconvénients des principaux donneurs d'acyle pour des réactions d'acylation d'alcools	77
Tableau 6 Bilan des conditions réactionnelles utilisés dans la synthèse d'esters du géraniol catalysée par des lipases (tableau adapté à partir de <i>Liu et al.(2022)</i>).....	79
Tableau 7 Tableau récapitulatif de l'acétylation enzymatique de la cnicine (d'après <i>Monsalve et al.(2009)</i>). Acronymes : CAL-A (lipase A de <i>Candida antarctica</i> immobilisée), CAL-B (lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée), CRL (lipase de <i>Candida rugosa</i>), LIP-RM (lipase de <i>Rhizmucor miehei</i> immobilisée), PPL (lipase de pancréas de porc), PSL (lipase de <i>Pseudomonas</i>), AcOEt (acétate d'éthyle), ACN (acétonitrile), DIPE (diisopropyl ether)	82
Tableau 8 Activité spécifique mesurée pour la lipase Vg de la patate douce et le blanc sans enzyme dans l'hydrolyse de 0,5 mM de p-NPB (1 % ACN) dans 100 mM de tampon phosphate de sodium, 150 mM NaCl à pH 7,2 et 37 °C. Calculs réalisés avec ϵ (p-NPB) _{400nm} = 14,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹	91
Tableau 9 Solubilité de la 11 β ,13-dihydrolactucine (20 mM) dans différents solvants	108
Tableau 10. Taux de conversion obtenus lors de l'estérification entre la DHLc et l'acide acétique, estimé par HPLC-MS et RMN 1H. Conditions : 10 mM DHLc, 100 mM acide acétique, 20 mg N435, 37 °C, 35 rpm dans 1 mL de MBTE : ACN (3 : 1). Les % de conversion sont calculés à partir du ratio des aires entre la DHLc et la DHLc-A formée au cours de la réaction.	114
Tableau 11 Taux de conversion obtenus après 48 h pour les différents donneurs d'acyle dans la réaction d'acylation entre la DHLc avec 20 mg de N435 à 37 °C. 10 équivalents de donneur d'acyle sont utilisés par rapport à la DHLc	115
Tableau 12 Résumé des milieux réactionnels préparés pour l'analyse LC-MS. Conditions générales : 2 billes de tamis moléculaire 5 A, 1 mL d'acétonitrile, 35 °C et 30 rpm dans des vials en verre de 2 mL recouverts de papier aluminium	134
Tableau 13 Récapitulatif des structures détectées en LC-MS sur l'extrait modifié (POm) et le témoin sans enzyme (Témoin A) à l'aide de MetaboScape. Vert = présence des molécules ayant été confirmées avec des standards analytiques	137
Tableau 14 Activité spécifique calculée pour la transamination des cétoesters. Mesure à 245 nm tous les 30 secondes pendant 40 min dans une microplaque de 96 puits (Greiner UVstar) avec 200 μ L de volume réactionnel. Conditions : 1 mM d'accepteur (2 et 4 mM pour le MeAcAc), 10 mM de S-MBA, 100 μ M de pyridoxal-5-phosphate (PLP) et 20 μ g de Cv-TA ou 9,6 μ g de Bm-TA, dans du tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,5).....	152
Tableau 15 Poids moléculaire de ADH-Gs et ADH-Rr sans et avec le tag d'affinité composé de 6 histidines	158
Tableau 16 Bilan des productions (A) et (B) de ADH-Gs.....	160
Tableau 17 Récapitulatif des enzymes produites.....	170

Introduction

Les terpènes constituent une vaste famille de molécules naturelles omniprésentes chez les végétaux et l'ensemble des êtres vivants. Depuis des millénaires, l'humanité a exploité les plantes pour traiter diverses maladies, une tradition transmise de génération en génération. Au cœur de nombreuses préparations à base de plantes se trouvent souvent des terpènes. En effet, cette famille de molécules représente une source extraordinairement diverse de principes actifs. Grâce aux avancées technologiques, l'humanité a pu identifier la structure de ces molécules et mieux comprendre leur action biologique.

Un exemple notable est celui de l'artémisinine. Dans les années 1960-1970, des chercheurs chinois ont évalué plus de 2000 préparations traditionnelles à base de plantes dans la recherche de traitements contre le paludisme, un effort qui a abouti à la découverte de cette molécule, une lactone sesquiterpénique issue d'*Artemisia annua* et utilisée aujourd'hui dans le traitement de cette maladie.^[1,2] Au cours des dernières décennies, des approches similaires ont été menées sur de nombreuses plantes, permettant la découverte de terpènes possédant d'importantes propriétés antitumorales, anti-inflammatoires et antibiotiques. Bien que ces composés présentent un potentiel considérable, leur utilisation en tant que principes actifs est parfois limitée par des propriétés physico-chimiques défavorables ou un manque de sélectivité pour des cibles spécifiques. De plus, de nombreux terpènes d'intérêt sont parfois produits en faibles quantités, posant ainsi des problèmes d'approvisionnement et ralentissant la recherche. Afin de trouver des applications industrielles, notamment dans le domaine pharmaceutique, de nombreux chercheurs ont étudié des voies permettant de modifier chimiquement ces molécules pour créer des dérivés plus performants. Néanmoins, les voies de modification classiques présentent parfois des inconvénients en termes de rendement et de sélectivité vis-à-vis d'un motif particulier de la molécule, elles utilisent également des réactifs pouvant présenter des problèmes de toxicité et engendrer des sous-produits indésirables nécessitant des étapes de purification supplémentaires.

Dans ce travail, nous avons exploré la fonctionnalisation de terpènes, principalement de la famille des monoterpénoïdes et des lactones sesquiterpéniques, en utilisant des enzymes. L'utilisation de cette approche basée sur la biocatalyse dans la synthèse de dérivés peut présenter plusieurs avantages par rapport aux méthodes chimiques traditionnelles, notamment en termes d'impact environnemental et de sélectivité. Dans ce contexte, l'accent a été mis sur l'utilisation d'enzymes de la famille des lipases pour la formation de nouveaux esters afin de moduler les propriétés physico-chimiques des molécules ciblées. Dans l'optique de valoriser une matière première locale, nous nous sommes intéressés aux lactones sesquiterpéniques retrouvées dans la chicorée (plantes du genre *Cichorium*), une plante largement cultivée dans le nord de la France et n'ayant pas encore été exploitée pour l'utilisation de cette sous-famille de terpènes. Plus largement, cette thèse s'inscrit dans les préoccupations nationales de chimie verte et de bioéconomie, notamment car elle vise à valoriser des produits naturels et éventuellement des coproduits de l'agroalimentaire, et plus particulièrement ici, la chicorée industrielle, afin de proposer des alternatives aux molécules issues du pétrole

État de l'art

I. Fondamentaux sur les terpènes d'origine végétale

1. Histoire et évolution de la connaissance des terpènes

1.1.Introduction

Avec plus de 64000 molécules identifiées à ce jour, les terpènes sont la classe la plus nombreuse et diverse de produits naturels connue, ils sont présents chez les trois grands domaines du vivant (Eubacteria, Aechaebacteria et Eucarya).^[3] Bien que les sources de terpènes soient très variées, nous nous concentrerons sur les terpènes d'origine végétale, particulièrement les monoterpènes et les lactones sesquiterpéniques que nous verrons plus tard dans les parties correspondantes. Les terpènes d'origine végétale constituent une classe extrêmement variée de produits naturels. Leur abondance dans la nature les rend accessibles pour la recherche et leur utilisation industrielle, ce qui explique en partie la longue histoire d'utilisation de ces molécules à travers les différentes époques. De même, la diversité chimique des terpènes végétales ouvre des possibilités variées en termes d'applications, notamment en pharmacologie et cosmétique. Cette diversité incite à l'innovation, avec de nombreuses opportunités à explorer dans la modification et la synthèse de nouvelles molécules. Dans le contexte actuel, les terpènes végétaux sont également envisagés comme des substituts prometteurs aux molécules dérivées de la pétrochimie, offrant ainsi une alternative plus durable et respectueuse de l'environnement.

1.2.Évolution historique de l'étude des terpènes

De manière historique, l'humanité a découvert, étudié et exploité les terpènes principalement à travers les plantes et, plus précisément, grâce à l'utilisation d'huiles essentielles et d'exsudats végétaux obtenus principalement à partir de conifères.^[4] Parmi les extraits ayant une grande importance historique on retrouve notamment l'essence de térébenthine, une huile obtenue après distillation de l'oléorésine issue principalement de différentes variétés de pin (genre *Pinus*), mais également d'autres arbres résineux tels que le pistachier térébinthe (*Pistacia terebinthus*) endémique de la méditerranée. La composition de cette essence est variable en fonction de l'espèce et de la procédure d'extraction. Néanmoins, l'essence de térébenthine est souvent composée majoritairement de α -pinène et β -pinène (> 50 %), ainsi que plusieurs dizaines d'autres monoterpènes, quelques sesquiterpènes bicycliques (cadinène, cadinol) et des traces d'autres composés (**Figure 1**).

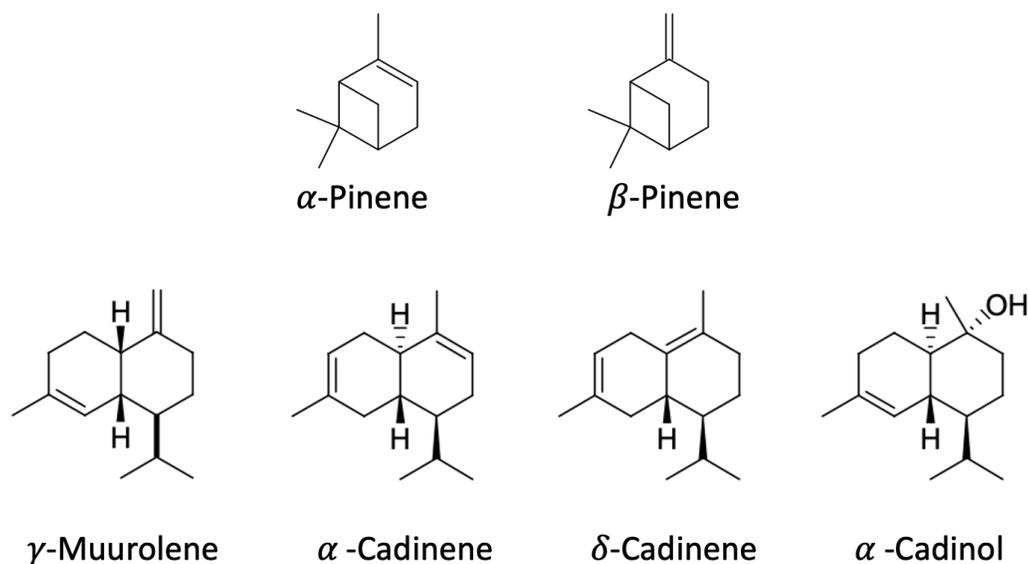


Figure 1 Représentation des mono et sesquiterpènes majoritaires retrouvés dans l'essence de térébenthine

L'une des premières études approfondies concernant les caractéristiques des molécules présentes dans l'essence de térébenthine a débuté en 1803 par M. Kind, un apothicaire allemand de la ville d'Eutin, qui étudie la réaction entre l'acide chloridrique gazeux et l'essence de térébenthine. Cette réaction a donné lieu à un composé cristallin qu'il nomme « camphre artificiel », faisant référence au monoterpène camphre (IUPAC 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one) qui était déjà connu depuis plusieurs siècles et utilisé notamment par les chinois à des fins d'embaumement ainsi que pour parfumer le savon. Cette réaction suscite l'intérêt d'autres scientifiques contemporains, dont des membres de la société d'Apothicaire de Paris, et a fait l'objet de plusieurs études.^[5] Les chimistes Oppermann et Dumas postulent que le camphre artificiel, ainsi que probablement d'autres composés présents dans cette essence, étaient majoritairement composés de carbone et d'hydrogène. Des expériences similaires ont été réalisées avec d'autres huiles essentielles (e.g. huile de citron) et ont contribué à approfondir nos connaissances sur ce type d'hydrocarbures biosourcés. ^[5] Pour information, dans l'huile de citron on retrouve principalement le monoterpène D-limonene et des faibles quantités de citral, linalool, β -myrcène et géraniol (**Figure 2**).^[6]

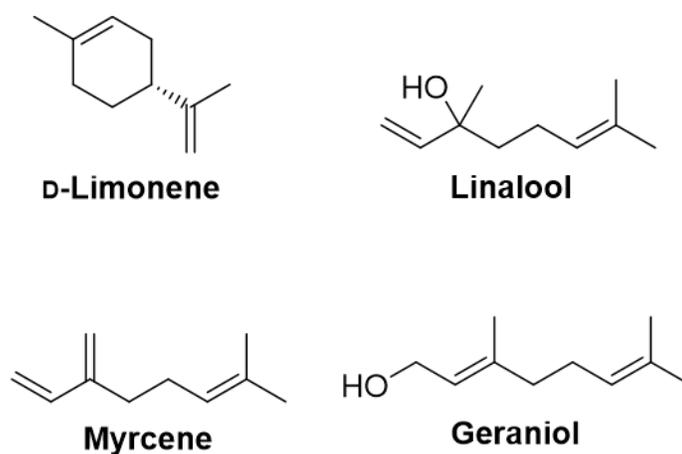


Figure 2 Monoterpènes majoritaires de l'huile de citron

En 1818 Jacques Labillardière, biologiste/botaniste Français, remarque un ratio de 5 carbones et 8 hydrogènes qui semblait être une caractéristique partagée par une majorité de composés présents dans l'essence de térébenthine. Mais ce n'est que dans les années 1890s que le chimiste allemand Otto Wallach (prix Nobel de chimie 1910) postule officiellement le motif élémentaire nC_5H_8 dans sa « règle de l'isoprène » qui permet de décrire les structures de cette famille de molécules connue sous le nom de terpènes ou isoprénoïdes. Ses travaux ont également permis d'élucider la structure de nombreux monoterpénoïdes (**Figure 3**).^[7] L'intérêt pour ces composés était très fort dès les premières découvertes, puisque même en absence de techniques analytiques modernes, les structures proposées par Otto Wallach sont remarquablement similaires à celles qui ont été élucidés plusieurs décennies plus tard. En effet, l'ensemble des liaisons et le positionnement des atomes sont correctement placés, et les seules caractéristiques manquantes sont les angles de liaisons et la stéréochimie exacte des molécules.

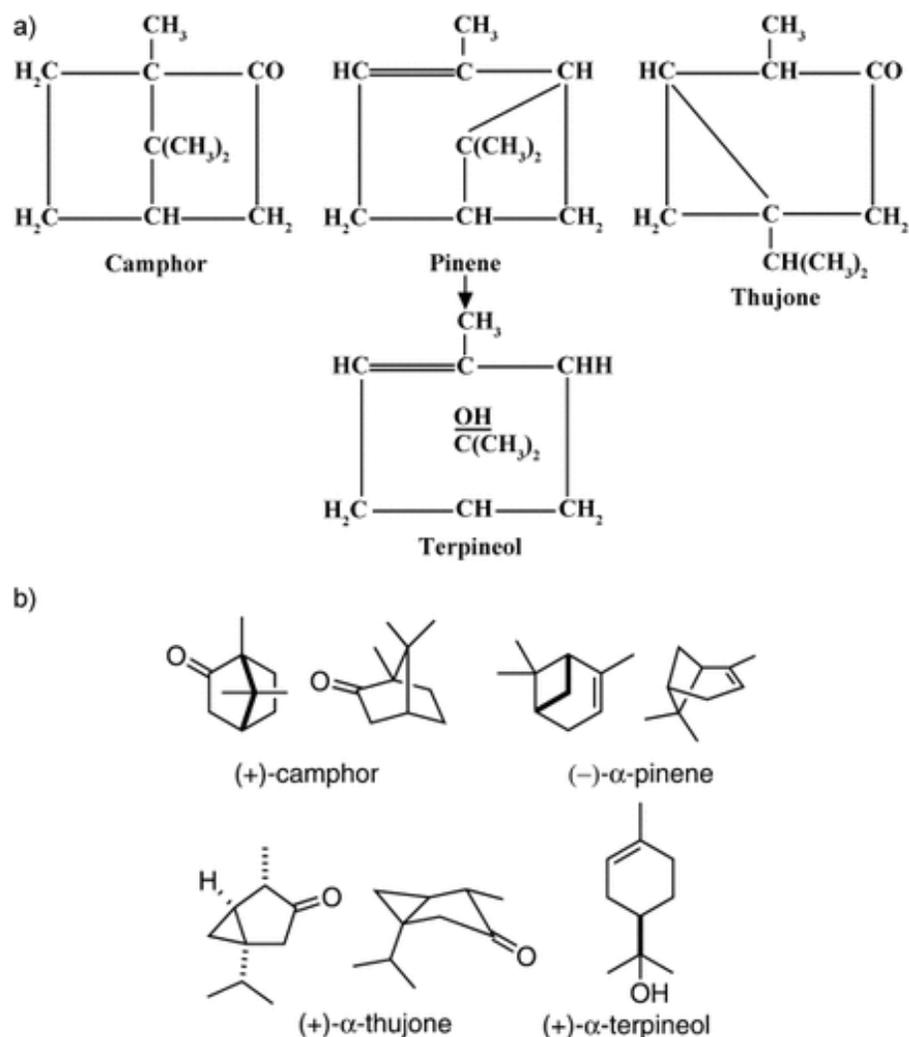


Figure 3 a) Représentation historique de Wallach ; b) Représentation actuelle (figure de *Christmann et al.*(2010))

1.3. Classification actuelle des terpènes et leur rôle dans la nature

Du point de vue structurel, les terpènes sont des composés insaturés composés d'un squelette carboné selon la formule nC_5H_8 , avec n = le nombre d'unités isoprène. On distingue alors plusieurs classes, notamment les monoterpènes ($n=2$; 10 carbones), les sesquiterpènes ($n=3$; 15 carbones) et les diterpènes ($n=4$; 20 carbones), etc. (**Tableau 1**).

Dans la littérature traitant des terpènes, on rencontre fréquemment le terme « terpénoïde » pour désigner ces molécules. Bien que ces deux termes soient souvent utilisés de façon interchangeable, ils présentent de légères différences. Le terme « terpène » désigne une vaste famille de molécules construites autour d'un motif élémentaire commun. En revanche, le terme « terpénoïdes » fait généralement référence aux dérivés de cette famille présentant d'autres hétéroatomes dans leur structure, notamment des atomes d'oxygène.

Tableau 1 Classification des terpènes (d'après *Brahmkshatriya et al.(2013)* et *Laure M.B Martinelli et al.(2020)*)

Classe	Unités isoprène	Atomes de carbone	Exemple
Hémiterpènes	1	5	Isoprène
Monoterpènes	2	10	Limonène
Sesquiterpènes	3	15	Farnésène
Diterpènes	4	20	Kahwéol
Triterpènes	6	30	Squalène
Tetraterpènes	8	40	β-Carotène
Polyterpènes	> 8	> 40	Caoutchouc

La diversité des terpènes végétaux s'est développée au fur et à mesure avec l'évolution et la spécialisation des plantes dans leur environnement, une grande majorité des terpènes sont donc spécifiques à une famille donnée. Même s'ils sont pour la plupart considérés comme des métabolites secondaires, il est présumé qu'une centaine de terpènes sont présents chez la totalité des plantes connues et participent dans des processus physiologiques fondamentaux. De ce fait, certains terpènes rentrent dans la définition des métabolites primaires. Ces terpènes du métabolisme primaire peuvent jouer des rôles hormonaux, participer à la fluidité membranaire et à la modification des protéines, agir comme antioxydants ou intervenir dans la chaîne transporteuse d'électrons. ^[8] Dans le domaine de la botanique, une attention particulière a été accordée à l'étude des terpènes du métabolisme secondaire. Ces molécules jouent un rôle crucial dans la défense des plantes contre les parasites et les maladies, tout en participant à de nombreuses autres fonctions écologiques et biologiques. L'examen de la littérature concernant la biosynthèse et la fonction des terpènes chez les plantes met en évidence plusieurs tendances émergentes. D'une part, la présence dans le génome de chaque espèce végétale d'un grand nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse des terpènes semble être à l'origine de la capacité actuelle des lignées de plantes à produire un grand nombre de terpènes. D'autre part, des nouveaux terpènes continuent d'apparaître dans des lignées de plantes spécifiques, potentiellement en conséquence de la coévolution avec les ennemis naturels. Cependant, l'analyse de ces tendances n'a pas encore permis de comprendre comment les terpènes sont devenus la plus grande classe de composés produits par les plantes. ^[9-11] Pour comprendre les processus évolutifs et écologiques qui ont conduit à ces modèles, nous devons approfondir notre compréhension des coûts et avantages conférés par les terpènes spécialisés aux organismes qui les synthétisent. ^[12-14]

Comme nous le verrons plus tard, uniquement les monoterpènes et les sesquiterpènes ont été utilisés dans le cadre de ce projet. Les premiers dû à leur abondance et à leur utilité en tant que composés modèle, et les deuxièmes à cause de leur présence dans une source locale encore inexploitée ainsi qu'à leurs propriétés biologiques. Ces deux classes seront traitées dans ce manuscrit.

1.3.1. Généralités sur les monoterpènes

La classe des monoterpènes fait référence aux terpènes possédant 10 atomes de carbone (2 unités isoprène), ceux-ci peuvent être retrouvés sous forme linéaire (acycliques), monocyclique ou bicyclique. Or, leurs structures présentent une très grande diversité qui est assurée par les différents processus enzymatiques impliqués dans leur biosynthèse. ^[15] Les monoterpènes sont des composés principalement lipophiles et typiquement possédant un caractère volatile variable. Néanmoins, on retrouve également des monoterpènes possédant d'autres atomes en plus du carbone et de l'hydrogène. On peut donc regrouper l'ensemble des dérivés formés à partir du squelette de 2 unités isoprène sous le terme de monoterpénoïdes. On retrouve notamment les monoterpénoïdes oxygénés (e.g. alcools, acides, aldéhydes), qui sont souvent dotés d'une polarité plus importante. ^[10]

Les monoterpènes sont abondants dans la nature. Ils sont notamment un des éléments principaux des essences végétales aromatiques appelées huiles essentielles. Des exemples notables incluent le camphre, le géraniol, le menthol, le limonène et le citral. Ces composés se trouvent dans plus de deux mille plantes de soixante familles différentes. Ils contribuent au goût et à l'arôme qu'on retrouve notamment dans les fruits et les feuilles de certaines de ces plantes. ^[15] Chez les végétaux, ils agissent en tant que molécules 'infectochimiques', utilisés comme des attractants ou des répellents d'autres êtres vivants. De même, certains d'entre eux ont un caractère toxique lorsqu'ils sont concentrés, d'où leur rôle protecteur contre des herbivores et des agents pathogènes. ^[15,16]

1.3.2. Généralités sur les sesquiterpènes

La famille des sesquiterpènes est l'une des plus nombreuses et diverses. Structurellement, ces molécules ont parfois autant de différences que de similitudes, or elles partagent toutes un squelette terpénique de 15 atomes de carbone constitué de 3 unités isoprène (sauf exception, le chamazulène C₁₄). Le squelette des sesquiterpènes peut être de caractère linéaire ou cyclique et avec des variations structurelles très importantes. Les guaïanes, germacrane, eudesmanes, humulane, bisabolane et cadinane, entre autres, font partie des grandes sous-familles de sesquiterpènes (**Figure 4**). ^[17]

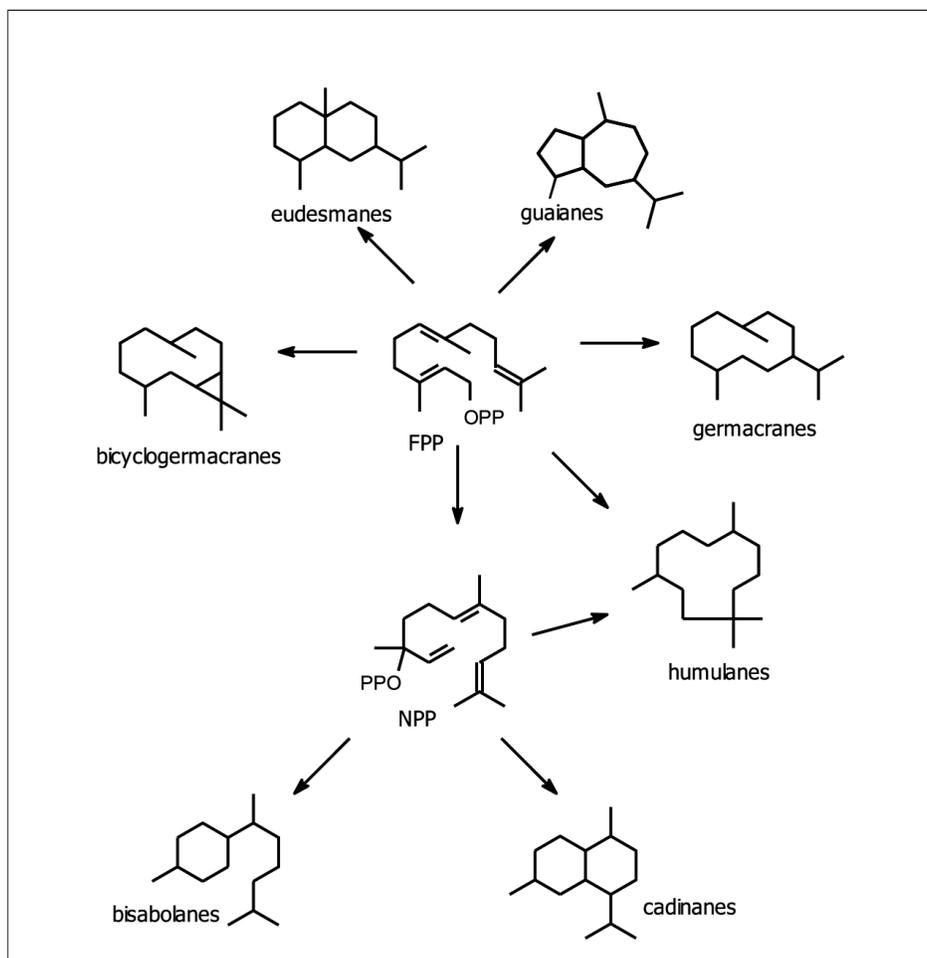


Figure 4 Principales sous-familles de sesquiterpènes (figure de *Seaman et al.(1982)*)

Dans la grande famille des sesquiterpènes, on retrouve une sous-famille particulièrement intéressante dans le cadre de ce projet : la sous-famille des lactones sesquiterpéniques (LST).

Le nombre de LST identifiés à ce jour s'élève à plus de 5000, principalement chez les plantes de la famille des Astéracées.^[18] Les LST se caractérisent par la présence d'un groupement gamma-lactone à 5 chaînons (cycle C) avec une liaison carbone-carbone en position alpha, cette dernière peut être saturée ou insaturée. Lorsqu'elle est insaturée, on dit qu'il s'agit d'un motif « alpha-méthylène-gamma-lactone ». La famille des lactones sesquiterpéniques possède une grande variabilité structurale, notamment au niveau de la taille des cycles carbonés (hors lactone) et du type de substituants présents ainsi que de leur position. Pour ces raisons, ces molécules sont organisées dans plusieurs sous-classes en fonction des caractéristiques structurales communes (**Tableau 2**).^[19]

Tableau 2 Principales sous-classes de LST

Nom	Caractéristiques cycle A	Caractéristiques cycle B	Schéma
Eudesmanolides	Cyclohexyl (6C) Méthyl en C4	Cyclohexyl (6C), méthyl en position 10	
Guaianolides	Cyclopentyl (5C) Méthyl en C4	Cycloheptyl (7C), méthyl en position 10	
Pseudoguaianolides	Cyclopentyl (5C) Méthyl en position 5	Cycloheptyl (7C), méthyl en position 10	
Germacranolides	Absent	10 carbones, méthyl en position 4 et 10	
Xanthanolides	Absent, chaîne butyle non cyclique	Cycloheptyl (7C), méthyl en position 10 et butyle en position 1	

Les sesquiterpènes ont été conçus par la nature en partie comme des outils de défense des plantes pour faire face à des situations de stress et des prédateurs. Elles aident à protéger les plantes contre les herbivores et les agents pathogènes, grâce à leurs propriétés répulsives, toxiques ou antimicrobiennes. Certaines plantes les utilisent également pour attirer les pollinisateurs ou pour la communication inter-plantes, où les terpènes servent de signaux chimiques pour avertir d'autres plantes d'un danger imminent, comme une attaque d'insectes. Les sesquiterpènes ont aussi un rôle dans l'adaptation des plantes à leur environnement, en contribuant à la réponse au stress, comme la sécheresse par exemple. ^[20]

2. Biosynthèse des terpènes chez les végétaux

Compte-tenu de la grande abondance des différents terpènes retrouvés dans la nature, nous allons voir comment ceux-ci sont synthétisés chez les végétaux. Dans un premier temps, nous allons voir la provenance des précurseurs communs chargés d'apporter les unités isoprène. Dans un deuxième temps, nous allons voir comment ces précurseurs communs donnent eux-mêmes lieu aux précurseurs respectifs des différentes classes de terpènes. Finalement, au bout de cette deuxième partie nous verrons le processus de biosynthèse de la sous famille des lactones sesquiterpéniques, molécules importantes dans le cadre de ce projet.

2.1. Biosynthèse des précurseurs communs à l'ensemble des terpènes

Le fait que l'ensemble des terpènes soient constitués d'un nombre variable d'unités isoprène (C_5H_8) s'explique par le fait qu'ils sont tous formés à partir de deux uniques précurseurs linéaires à 5 atomes de carbone. Les deux sources d'unités isoprène sont l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et son isomère de position : le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (**Figure 5**).^[21]

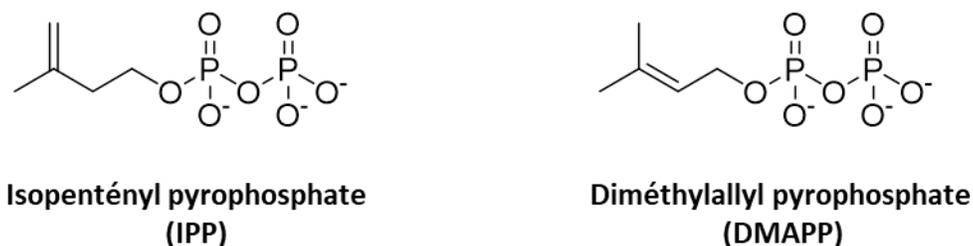


Figure 5 Structure des deux précurseurs universels des terpènes

Deux voies métaboliques sont impliquées dans la synthèse de ces deux précurseurs ; (1) la voie du mévalonate (MVA) et (2) la voie du méthylérythritol phosphate (MEP). Bien que la connaissance approfondie de ces voies de synthèse ne soit pas indispensable pour ce projet de thèse, il est important d'avoir une vision du processus biologique responsable de l'existence de ces molécules.

2.1.1. La voie du mévalonate

Comme mentionné, il existe deux voies identifiées pour la synthèse des précurseurs de l'ensemble des terpènes, la voie du mévalonate fut la première à avoir été identifiée. Les transformations associées à cette voie se déroulent au niveau du cytoplasme ainsi qu'au niveau du réticulum endoplasmique et des peroxysomes. Cette voie est utilisée par la plupart des Eucaryotes et Archées, ainsi que quelques bactéries comme *Staphylococcus aureus*.^{[22,23],[24]} La synthèse débute avec la condensation de deux molécules d'acétyl-Coenzyme-A, typiquement issus de la glycolyse, pour former de l'acétoacétyl-CoA. Cette dernière est ensuite transformée en mévalonate et finalement en isopentényl pyrophosphate (IPP) à la suite de plusieurs étapes enzymatiques, illustrées dans la Figure 6, consommant du NADPH et de l'ATP.^[25,26] A la

fin de cette cascade, l'IPP peut également être transformé en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP), l'autre précurseur commun, via l'action d'une isomérase (**Figure 6**).^[27]

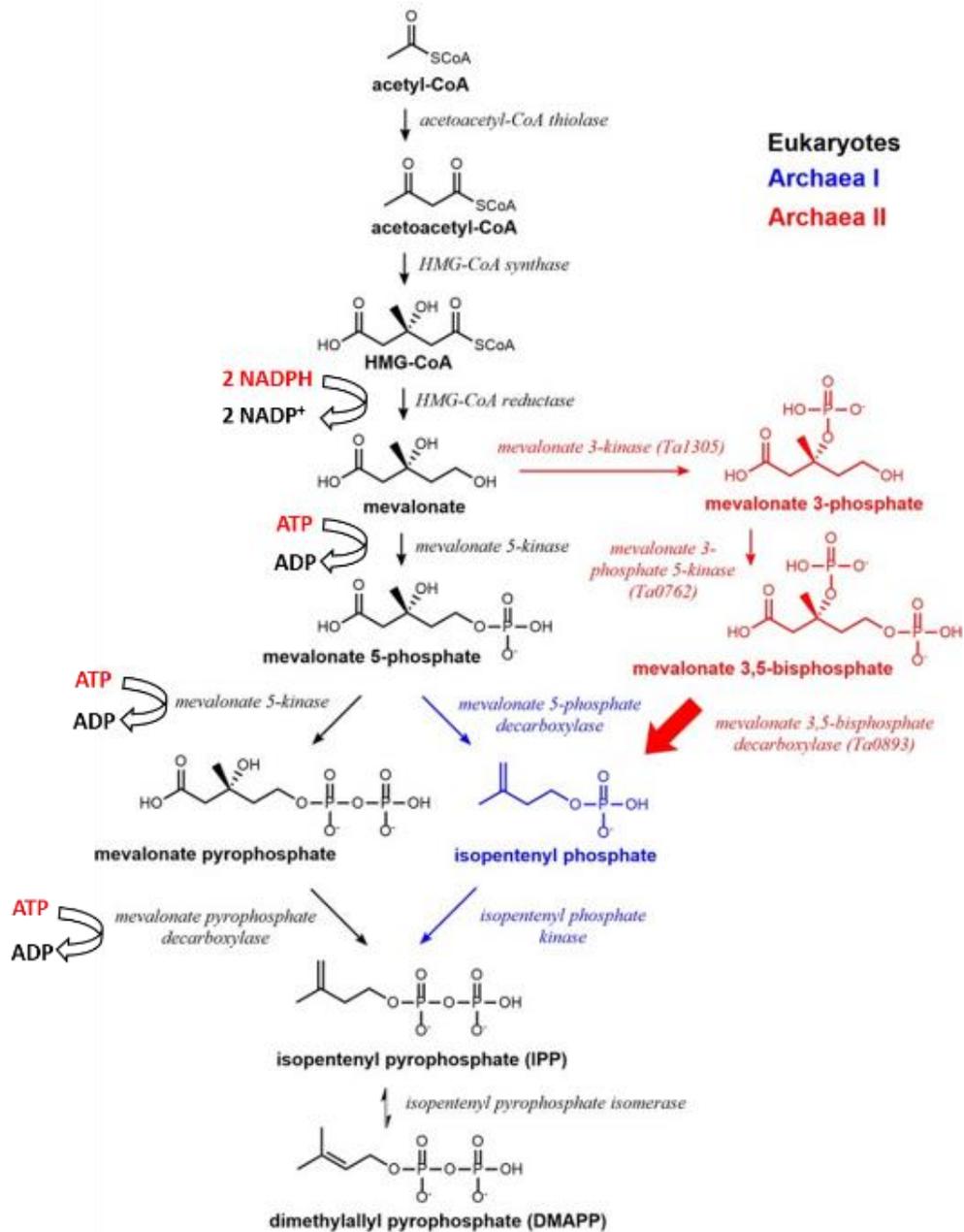


Figure 6 Schéma biosynthétique de la voie du mévalonate (Figure modifié de Vinokur et al. (2016))

2.1.2. La voie MEP/ voie de Rohmer

Nous allons maintenant voir la deuxième voie de synthèse des précurseurs communs des terpénoïdes. Initialement, la connaissance de la biochimie des isoprénoïdes végétaux a été en grande partie déduite des recherches effectuées sur les cellules animales ou de levure. Il était donc logique de supposer que le mévalonate (MVA) était le précurseur universel de la biosynthèse des isoprénoïdes, y compris chez les plantes et les bactéries. Cependant, plusieurs observations expérimentales ont rapidement semé le doute quant à ce rôle fondamental du MVA dans la biosynthèse des isoprénoïdes. C'est notamment en 1957 que Irving Zabin, lors de son étude sur la biosynthèse du lycopène chez la tomate, postule que la biosynthèse du lycopène dans les plantes pourrait être distincte de celle des composés isoprénoïdes dans les tissus animaux. Elle postule qu'une unique unité monomérique, comprenant cinq ou six atomes de carbone, pourrait être la source de tous les isoprénoïdes, bien qu'elle soit produite par des réactions distinctes selon les organismes. ^[28]

Des années plus tard, une autre voie, connue sur le nom de voie de « Rohmer » ou voie MEP, a été identifiée chez les plantes et des bactéries. ^[29-31] La voie du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP), également connue sous le nom de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) est une autre voie métabolique pour la synthèse de DMAPP et IPP. Elle est principalement utilisée par les plantes, les bactéries et d'autres microorganismes dont certains protozoaires. ^[32] Cette voie utilise du pyruvate et du glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) pour produire de l'IPP et du DMAPP *via* 7 étapes enzymatiques illustrées dans la **Figure 7**. ^[33,34]

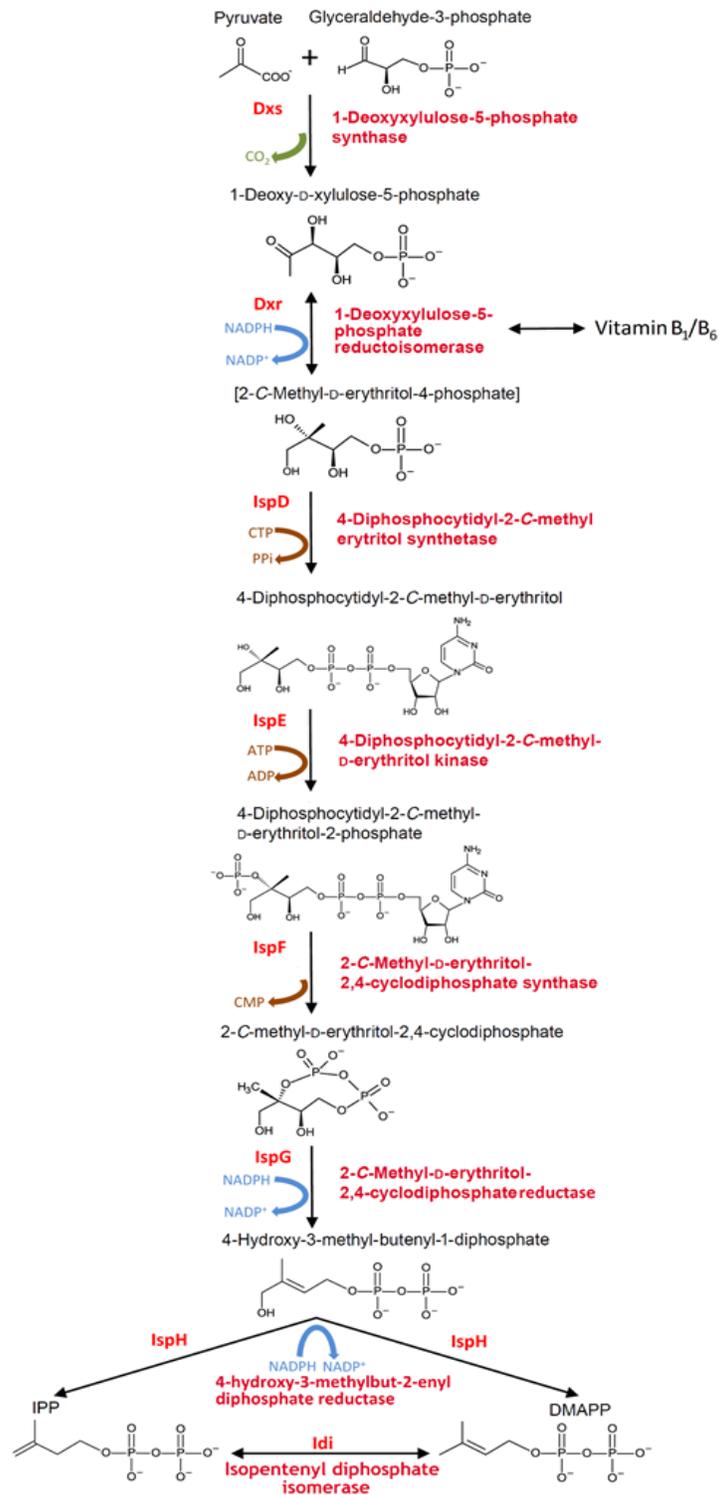


Figure 7 Voie du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP)

3. Utilisation des précurseurs communs dans la synthèse des différentes familles

3.1. Condensation des unités isoprène donnant lieu aux précurseurs des mono et sesquiterpènes

La synthèse du squelette carboné des différentes familles de terpènes est synthétisé en plusieurs étapes par différentes enzymes de type prényltransférase, terpène synthase et terpène cyclase à partir de molécules jouant le rôle de précurseurs. Ce processus se fait *via* un enchainement de multiples réactions de condensation entre deux molécules partenaires pouvant être l'IPP, le DMAPP ou un produit issu d'une étape précédente. Les condensations se font *via* un processus qui peut être de type « head to head », « head to tail » ou « tail to tail ». Ici, head et tail font référence aux positions des carbones impliqués dans la formation de la nouvelle liaison (par rapport à leur localisation au niveau de l'unité isoprène). Head suggère que la nouvelle liaison carbone-carbone a été formée au niveau d'une double liaison ramifiée d'un des substrats. A l'inverse, tail indique que le substrat a réagi par une extrémité non ramifiée de sa chaîne, souvent au niveau du carbone adjacent au groupement diphosphate. La **figure 8** illustre un exemple des modes de condensation possible. Il existe également d'autres types de condensation dits « non réguliers » qui aboutissent à la formation d'une liaison C-C au milieu de la chaîne et non pas aux extrémités. (Figure 8)

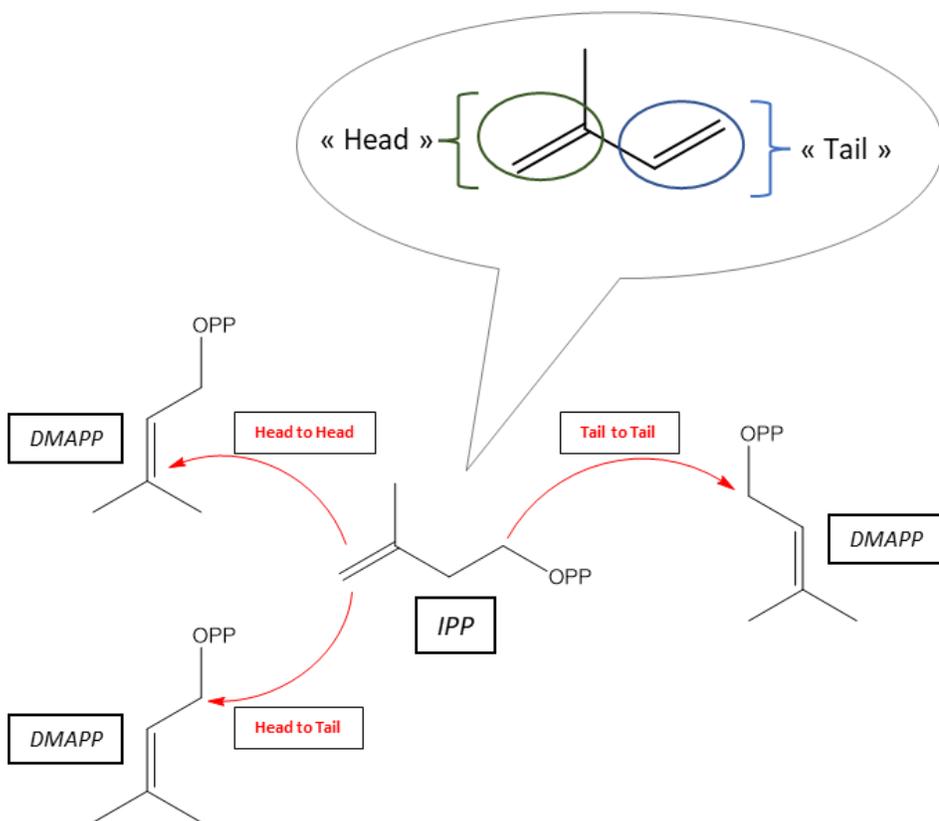


Figure 8 Exemples de types de condensation « régulière » impliqués dans la biosynthèse du squelette terpénique (exemple avec l'IPP)

Des enzymes prényltransférases utilisent l'IPP et le DMAPP pour synthétiser les précurseurs linéaires des différentes sous-familles de terpènes. Le premier précurseur est le géranyle diphosphate (C10), donnant

lieu à l'ensemble des monoterpénoïdes. Celui-ci est synthétisé par la géranyle diphosphate synthase, une prényltransferase à chaîne courte, *via* une condensation de type head to tail entre l'IPP et le DMAPP. Le mécanisme passe par la substitution nucléophile du groupement OPP du DMAPP impliquant la formation d'un carbocation intermédiaire, suivie de la formation d'une double liaison (*Z*) *via* l'élimination stéréospécifique de l'hydrogène pro-*R* du carbone adjacent (**Figure 9**).^[35,36] L'étude du mécanisme de cette réaction par des méthodes de modélisation (combinaison de méthodes de mécanique quantique et de dynamique moléculaire), appuyé par les données empiriques connues, indique que la condensation et l'élimination de l'hydrogène auraient lieu lors d'une seule étape réactionnelle.^[37]

Le *E,E*-farnesyl diphosphate, précurseur de sesquiterpènes, est synthétisé de la même manière par l'enzyme farnesyl diphosphate synthase (sesquiterpène synthase). Cette étape a longtemps été considérée comme ayant lieu exclusivement au niveau du cytosol et du réticulum endoplasmique, or certaines études ont mis en évidence un échange entre la voie MVA et MEP, en effet certains sesquiterpènes sont formés à partir de IPP/DMAPP dérivés de la voie MEP qui se déroule au niveau des plastides (**Figure 10**).^[38] De plus, l'identification des sesquiterpène synthases au niveau des chloroplastes a mis en évidence un certain nombre d'aspects de leur biosynthèse qui ne sont pas encore bien compris.^[39]

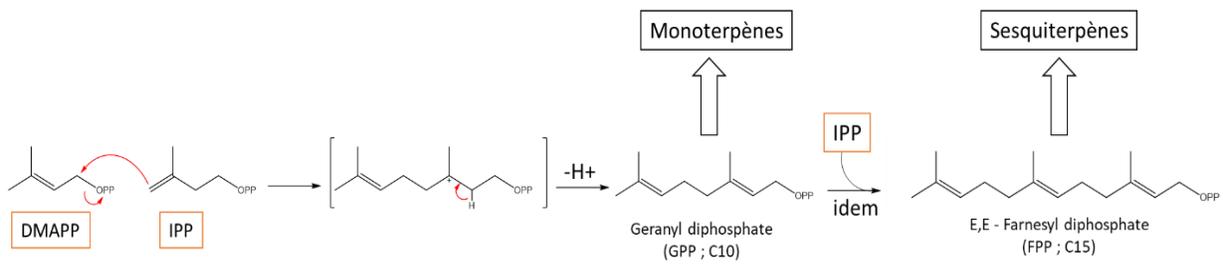


Figure 9 Illustration de la synthèse des précurseurs des monoterpènes et des sesquiterpènes via une condensation de type « Head to tail »

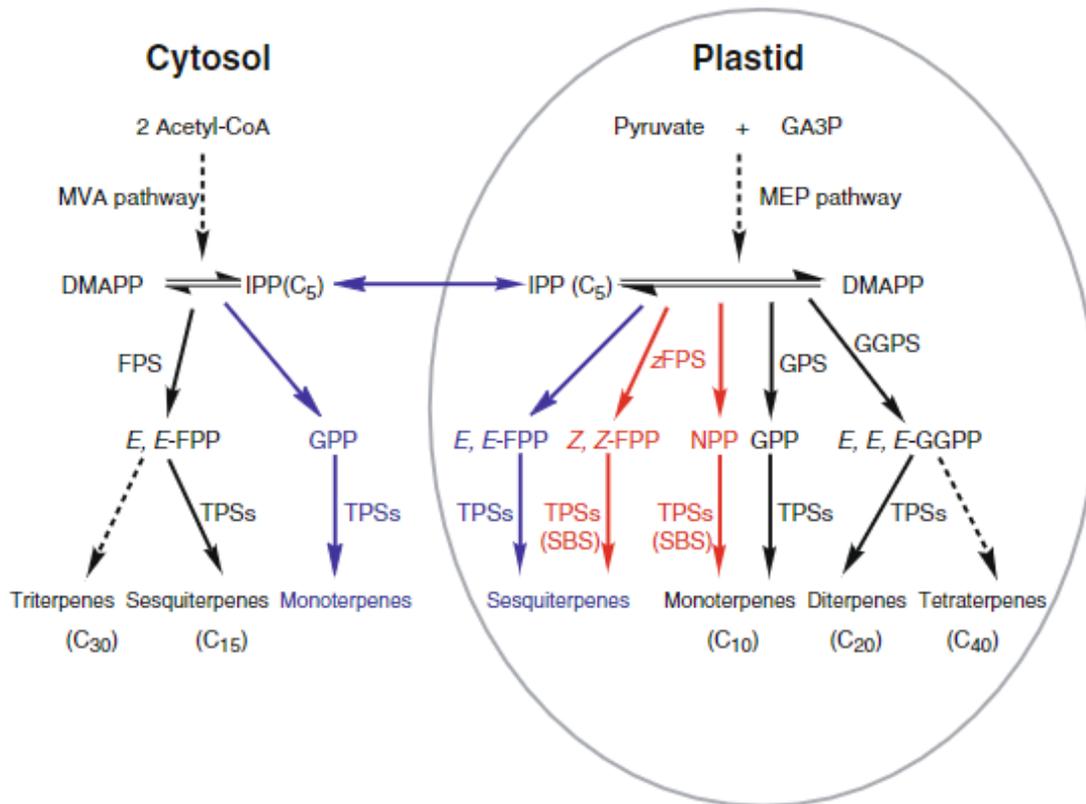


Figure 10 Échange entre les deux principales voies de biosynthèse (image de Yu *et al.* (2009))

3.2. Biosynthèse des lactones sesquiterpéniques

La biosynthèse des terpénoïdes fait également intervenir d'autres types de transformations introduisant des hétéroatomes ainsi que différents types de fonctions chimiques. Parmi ces types de fonctionnalisations, les réactions d'oxydoréduction restent parmi les plus représentées, celles-ci sont catalysées par des nombreuses enzymes de la classe des oxydoréductases, dont celles appartenant à la famille des cytochrome P450. ^[40,41] Chez les plantes il est estimé que les gènes codant pour les enzymes du cytochrome P450 peuvent représenter jusqu'à 1% de leur génome, d'où la grande diversité. ^[42] Des exemples d'oxydation sont notamment l'introduction de groupements hydroxyle (alcools) *via* l'époxydation ou l'hydroxylation d'une double liaison carbone-carbone, ainsi que par l'oxydation directe d'une liaison carbone-hydrogène. ^[42] Pour illustrer ce type de fonctionnalisations avec un exemple pertinent, nous verrons le processus biosynthétique donnant lieu à la formation du cycle 'alpha-méthylène-gamma-lactone', caractéristique clé de la sous-famille des lactones sesquiterpéniques.

Le processus de formation du cycle lactone est bien connu pour les germacranolides, eudesmanolides, guaianolides et les pseudo-guaianolides. Ces sous-classes dérivent d'un précurseur commun : le (+)-costunolide. La formation du cycle lactone fait intervenir plusieurs étapes d'oxydation qui aboutissent à la réaction de lactonisation/cyclisation intramoléculaire entre un alcool et un acide carboxylique. Ce processus est illustré dans la (Figure 11).

La première réaction (Étape 1, Figure 11) est la réaction de cyclisation intramoléculaire du farnésyl pyrophosphate (FPP) catalysée par l'enzyme « germacrene-A synthase », celle-ci aboutit à la formation du précurseur (+)-germacrene A à partir du FPP. Le processus de formation du cycle lactone commence par l'oxydation de la double liaison exo-cyclique (Étape 2) et permet d'introduire un groupement hydroxyle au niveau du carbone n°12 du (+)germacrene A. Cette oxydation est réalisée par l'enzyme « (+)-germacrene A hydroxylase », une hémoprotéine de la famille des cytochrome P450, il s'agit d'une monooxygénase NADPH-dépendante. En réalité, cette enzyme catalyse également l'oxydation de l'alcool en aldéhyde (Étape 3) et ensuite en acide carboxylique (Étape 4), c'est-à-dire un total de 3 réactions d'oxydation successives, pour donner lieu à l'intermédiaire « germacrène acid ». ^[43,44] Le passage de l'acide à la lactone se fait grâce à une oxydation (hydroxylation) stéréosélective au niveau du carbone n°6 (Étape 5), réalisée par l'enzyme « costunolide synthase » qui a également été identifiée comme étant une cytochrome P450 monooxygénase NADPH-dépendante. La fonction lactone est formée *via* une cyclisation intramoléculaire (Étape 6).^[45]

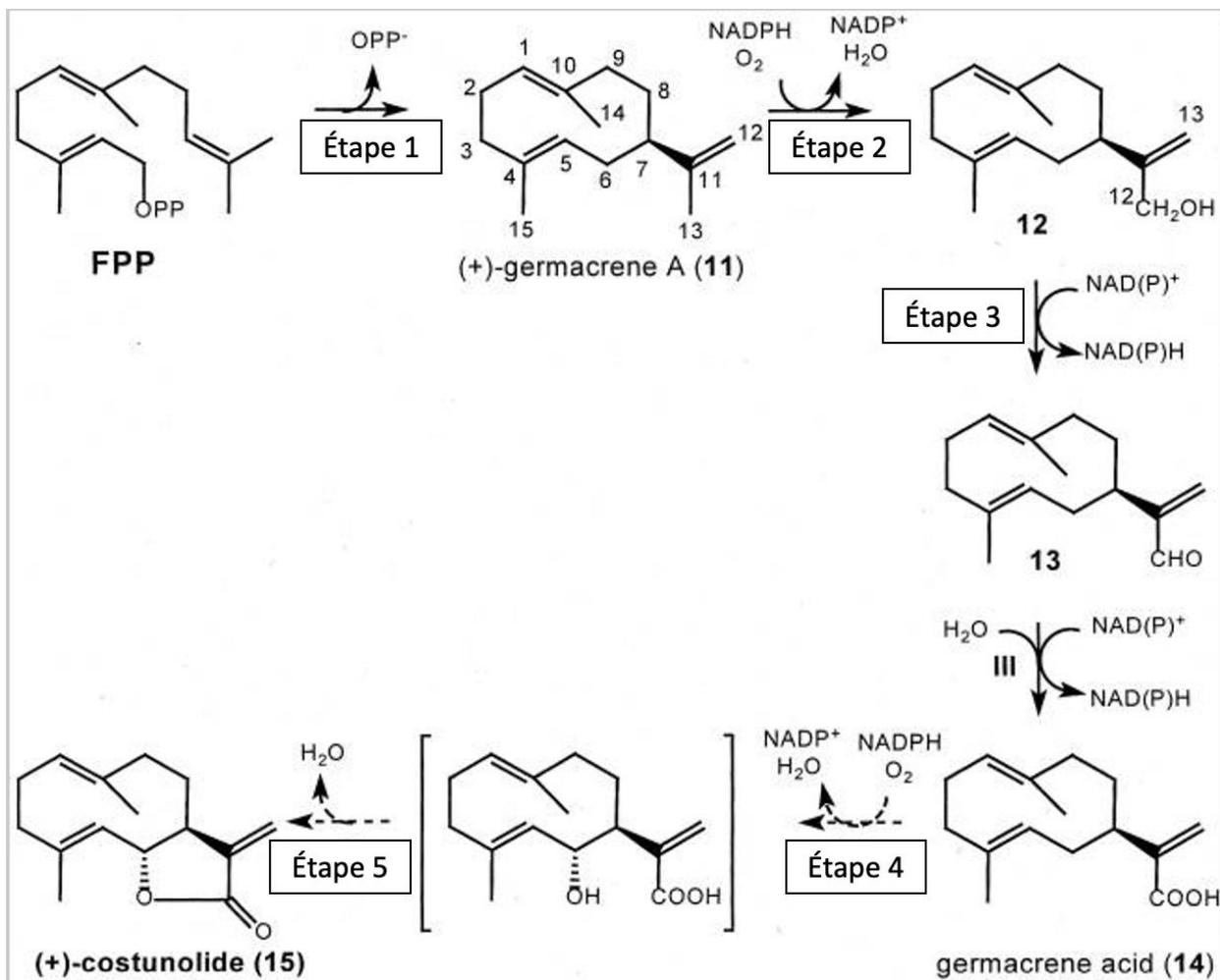


Figure 11 Biosynthèse de la lactone sesquiterpénique (+)-costunolide (image adaptée de *Kraker et al. (2001)*)

II. La chicorée : une potentielle source régionale de LST

1. Les plantes du genre *Cichorium* : historique et généralités

Les plantes du genre *Cichorium* sont des membres de la famille des Astéracées et sont originaires de la région méditerranéenne, du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord. La chicorée était cultivée par différentes cultures dont les Grecs, les Égyptiens et les populations habitant dans la région nord de la Chine qui connaissaient déjà ses vertus en tant que plante médicinale. ^[46] Elle était notamment utilisée dans le traitement de pathologies respiratoires, hépatobiliaires et du système digestif. ^[47] A l'heure actuelle, plus d'une dizaine d'espèces du genre *Cichorium* sont retrouvées dans le monde. En Europe, on reconnaît trois grandes espèces : *Cichorium spinosum*, *Cichorium endivia* et *Cichorium intybus*.

- *Cichorium spinosum* est une espèce exclusivement sauvage retrouvée en Espagne et en Grèce et n'ayant pas fait l'objet d'un processus de sélection par l'être humain. Cette espèce est parfois consommée par les herbivores (e.g. bétail) dans les pâturages pendant des périodes de pénurie.
- *Cichorium endivia* est une plante annuelle répandue principalement dans le sud de l'Europe et le Nord de l'Afrique. On distingue deux groupes principaux : la chicorée frisée et l'escarole. Ces variétés sont cultivées depuis l'Antiquité pour la consommation de leurs feuilles vertes.
- La *Cichorium intybus*, l'espèce de chicorée la plus répandue, se trouve à l'état sauvage ou semi-sauvage dans diverses régions du monde, notamment en Europe, en Amérique, en Afrique du Sud, en Australie et en Asie. Cette espèce présente une grande variété d'utilisations, avec plusieurs variétés cultivées soit pour leurs feuilles, soit pour leurs racines. On distingue deux principales méthodes de culture : la récolte en plein champ et la culture en deux étapes, impliquant une croissance en champ suivie d'une culture forcée en conditions artificielles pour obtenir une tête de feuilles étiolées. Dans le premier cas de culture, les feuilles sont consommées soit fraîches, comme la chicorée verte 'Pain de sucre' et les variétés rouges 'Chioggia' et 'Verone', soit cuites, comme la chicorée 'Catalogna'. Dans le second cas, les feuilles de chicorée peuvent présenter diverses couleurs et textures : rouges comme la variété 'Treviso', panachées comme la 'Variegato di Castelfranco', ou vertes comme la 'Barbe de capucin' ou le 'witloof' (également connu sous les noms 'endive' ou 'chicon'). Par ailleurs, certaines variétés de chicorée sont cultivées pour leurs racines (étroites et cylindriques) et consommées cuites de façon similaire au salsifis (par exemple, les variétés 'Soncino' ou 'Tête d'Anguille').^[48]

La domestication de *Cichorium intybus* en Europe a mené à la diversification de cette espèce en plusieurs variétés selon l'usage. Les principales variétés comprennent : la chicorée 'industrielle', cultivée principalement pour l'extraction d'inuline ou comme substitut de café ; la chicorée 'fourragère', utilisée depuis les années 1970 pour améliorer le pâturage pour le bétail ; la chicorée de 'Bruxelles/Witloof', consommée sous le nom de 'chicon' ; et la chicorée 'feuille/Radicchio', souvent appréciée dans les salades ou préparée selon les traditions culinaires de la région.^[48]

La chicorée utilisée dans le cadre de cette thèse est la sous-espèce *Cichorium intybus var sativum*, couramment appelée chicorée industrielle. Il s'agit d'une plante biannuelle possédant une longue racine pouvant atteindre jusqu'à 75 cm de longueur et une partie aérienne foliaire pouvant mesurer 1 mètre de

hauteur (**Figure 12**).^[49] Cette espèce semble avoir dérivé d'une variété d'une espèce antique connue sous le nom de chicorée de Magdebourg, celle-ci était déjà utilisée en tant que substitut du café en Europe depuis le 16^{ème} siècle.^[48]

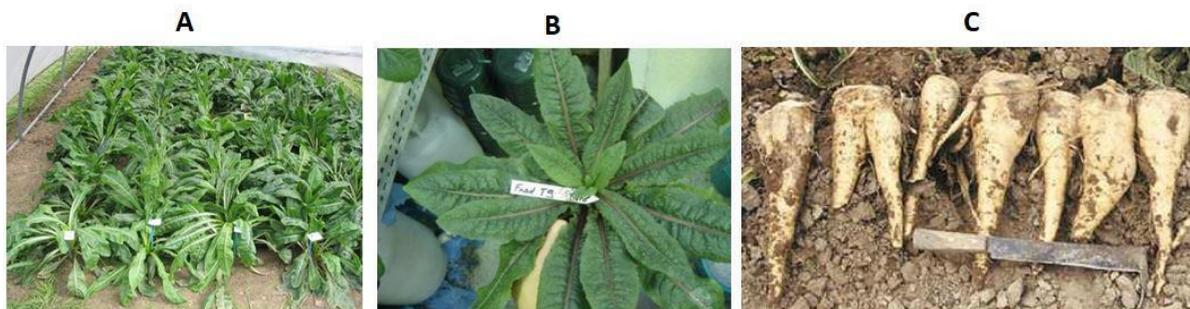


Figure 12 *Cichorium intybus* var. *sativum*. (A) En culture, (B) Feuilles, (C) Racines (Figure de *Vandoorne et al.*(2012)).

Comme mentionné, la racine de chicorée *intybus* était principalement utilisée dans l'alimentation notamment en tant que substitut du café, or il a été découvert plus tard que l'inuline pouvait potentiellement servir de substitut au sucre ou à la graisse en raison de sa faible valeur calorique.^[49] Depuis le milieu des années 1980s elle est donc principalement exploitée pour sa teneur en inuline. La chicorée est particulièrement intéressante en tant que culture de rente car elle peut atteindre plus de 62 tonnes par hectare dans des conditions favorables. La teneur en inuline peut atteindre en moyenne 15 % du poids frais de la racine et un rendement de 8 tonnes par hectare d'inuline est réalisable. La forme la plus stable pour la commercialisation de l'inuline est l'extrait en poudre, pour sa facilité de manipulation, de transport, de stockage et de consommation.^{[49],[50],[51]} Les principaux pays producteurs de racine sont la Belgique et la France, particulièrement dans la Région de Hauts-de-France. La Belgique toute seule représente plus de la moitié de la production globale de racine, avec 464370,68 tonnes en 2018, suivie de près par la France et ensuite les Pays-Bas. 95,5% de la production de racine de chicorée dans le monde est faite en Europe.^[52]

Concernant les caractéristiques de l'inuline, il s'agit un polysaccharide linéaire composé de résidus fructose connectés par des liaisons $\beta(2,1)$ avec un résidu glucose en position terminale, sa structure est polymérique à degré de réticulation variable (**Figure 13**). Dans l'industrie agroalimentaire elle est principalement hydrolysée et utilisée comme une source de fructose ainsi que d'oligofructose (utilisée comme une alternative aux sucres traditionnels).^[53] Cette fibre ne peut pas être naturellement digérée par les êtres humains dû à l'absence d'enzymes de type inulinases (E.C. 3.2.1.80 et E.C. 3.2.1.7) capables de couper des liaisons $\beta(2-1)$ -glycosidiques, cependant des microorganismes du microbiote tels que les *lactobacillus* expriment ces enzymes et peuvent donc participer à sa digestion. L'inuline est donc également attractive en tant que probiotique, de plus elle est également utilisée dans l'alimentation animale (notamment en tant que plante fourragère bioactive).^[54]

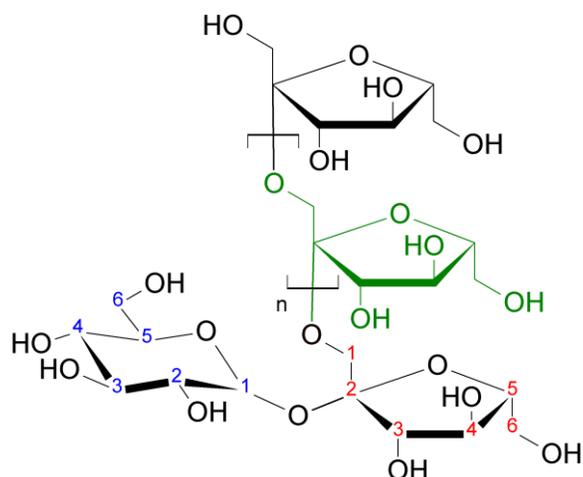


Figure 13. Structure de l'inuline

2. Composition de la racine de chicorée industrielle

Comme évoqué dans partie précédente, la chicorée et particulièrement la chicorée industrielle possède une racine de grande taille qui contient la plupart de la masse de la plante. Les racines fraîches sont typiquement composées de 69 % d'inuline, 14 % glucose, 5 % de cellulose, 6 % de protéines, 4 % de cendres et 3 % d'autres composés.^[55] Les autres composés sont pour la plupart des métabolites secondaires tels que des composés poly-phénoliques, des lactones sesquiterpéniques, des flavonoïdes et certains triterpènes, parmi d'autres.^[56] Parmi les composés qui peuvent être considérés comme majoritaires on retrouve les acides et esters phénoliques et les polyphénols. Notamment l'acide coumarique, l'acide caféique et l'acide chlorogénique qui sont parmi les dérivés plus représentés au niveau de la racine. Concernant les flavonoïdes et les coumarines, ceux-ci peuvent être retrouvés en faibles quantités dans la racine de certaines variétés de chicorée, cependant ils sont typiquement plus représentés dans la partie aérienne de la plante. Les structures de plusieurs de ces molécules sont représentées ci-dessous (Figure 14).^[55]

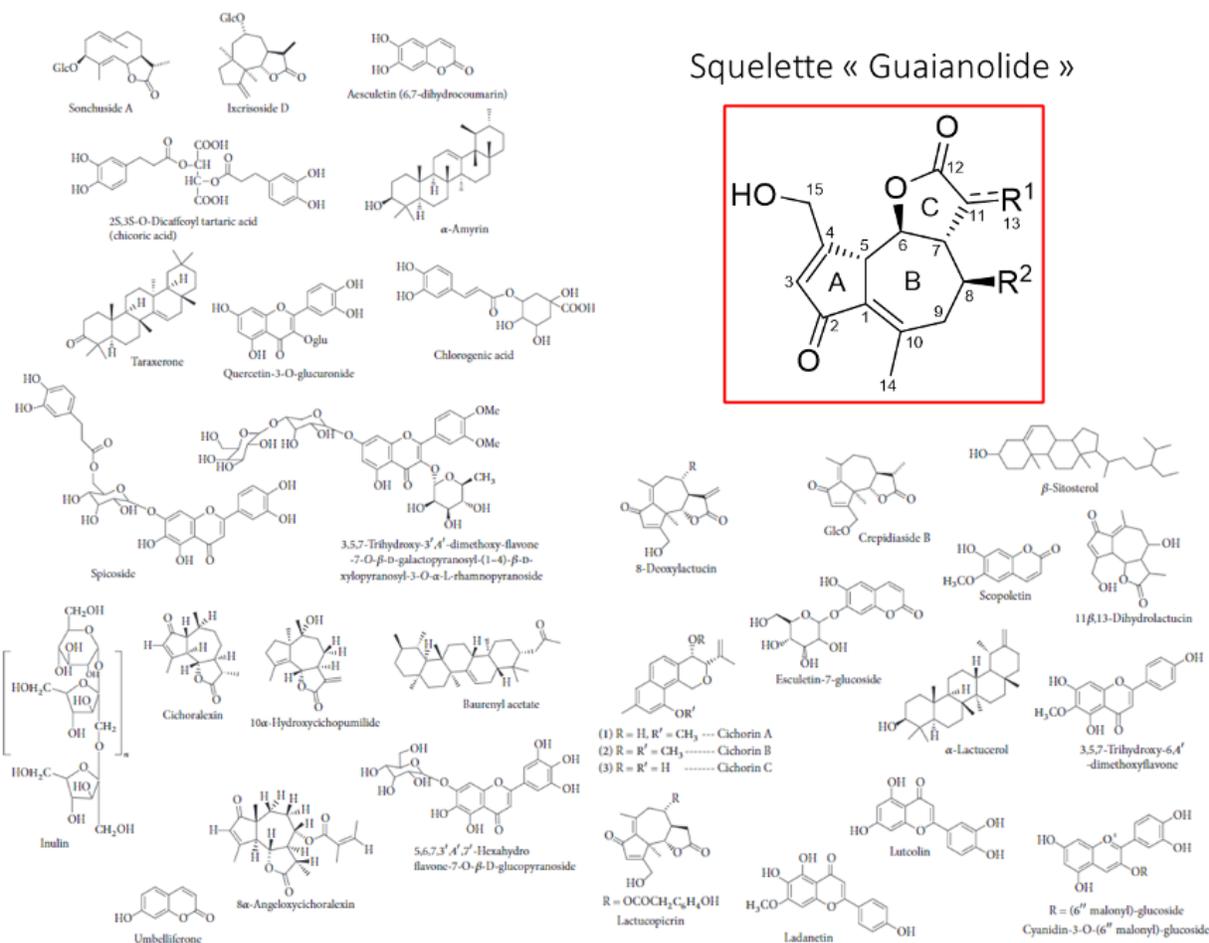
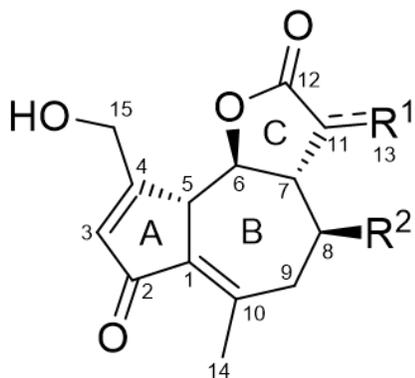


Figure 14. Représentation des composés retrouvés dans le genre *Cichorium* (partie aérienne et racine) (à partir de la figure de *Nwafor et al.(2017)*)

Une des caractéristiques principales de cette plante est son amertume, celle-ci est reliée à la présence de lactones sesquiterpéniques. En effet, la chicorée et notamment la variété de chicorée industrielle (*Cichorium intybus var. sativum*) est connue pour être une source de lactones sesquiterpéniques de la sous-famille des guaianolides. Environ une quinzaine de LST sont retrouvées dans la racine de la chicorée. Ces molécules portent le même squelette, mais diffèrent principalement au niveau du motif α -méthylène- γ -lactone, qui peut être saturée (e.g. dihydrolactucine) ou insaturée (e.g. lactucine), et par la présence de groupements hydroxyle porté par le carbone numéro 8 et/ou le carbone numéro 15. Ce dernier peut être sous forme alcool libre, conjugué avec des adduits tels que des oxalates ou des sucres, ou complètement absent (e.g. 8-deoxylactucine). Il a cependant été montré que les LST de la chicorée au niveau de la racine sont présents majoritairement sous forme de conjugués oxalate et glucoside. [57] Les structures des principales LST de cette plante sont décrits en détail dans la littérature. [58-60] Ci-dessous sont représentées celles des principales molécules sous leur forme libre (non conjuguée), ainsi que leur $\log(P)$ et leur polarité de surface (surface polarity) (Figure 15). [61] On remarque notamment une lipophilie moins importante pour la lactucine par

rapport à son analogue saturée (DHLc). De plus, la présence de l'ester aromatique pour les analogues lactucopicrines entraîne une augmentation de leur $\log(P)$.



<i>STL</i>	R^1	R^2	$\text{clog}(P)$	Surface Polarity
lactucine	CH_2	OH	- 0.7	83
lactucopicrine	CH_2	$\text{OCOCH}_2\text{PhOH}$	1.1	110
8-deoxylactucine	CH_2	H	0.208	63,6
<i>11\beta,13</i> - dihydrolactucine	CH_3	OH	- 0.54	83
<i>11\beta,13</i> - dihydrolactucopicrine	CH_3	$\text{OCOCH}_2\text{PhOH}$	1.27	110

Figure 15 Structure, $\text{clog}(P)$ et surface polarity des principaux LST non conjugués retrouvés dans la racine de chicorée industrielle (données de Willeman et al. (2014))

3. Propriétés des LST présents dans la racine de chicorée

Les lactones sesquiterpéniques (LST) retrouvées dans la chicorée ont démontré des diverses propriétés biologiques. Parmi les LST les plus connues on trouve la lactucine (Lc) et la lactucopicrine (Lp), initialement identifiées chez la laitue sauvage (*Lactuca virosa*). Le latex de la laitue sauvage, connu sous le nom de lactucarium ou « lettuce opium », était utilisé en notamment en Europe et plus tard aux Etats-Unis comme alternative à l’opium pour ses propriétés antalgiques, antitussives et sédatives. L’amertume et les effets de ce latex ont été attribués principalement aux deux molécules mentionnées. ^[62,63] ^[19] Une étude plus récente a montré que la lactucine et son analogue lactucopicrine possèdent des propriétés sédatives et antalgiques, or celles-ci restent relativement modestes avec 30 mg/kg étant équivalent à 60 mg/kg d’ibuprofène chez la souris. ^[64] Bien que les composés purs ne soient actuellement pas facilement disponibles sur le marché, un extrait de laitue (*Lactuca sativa*) nommé Sedan® (Pharco Pharmaceutical Company) contenant de la lactucine semble avoir été commercialisé en Égypte en tant que sédatif hypnotique. ^[19,65]

En outre, d’autres propriétés biologiques ont aussi été identifiées pour les LST retrouvées dans la chicorée. Notamment, la 11 β ,13-dihydrolactucine (DHLc) et la lactucopicrine (Lp) possèdent des propriétés inhibitrices sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. Quant à la DHLp, celle-ci s’est également révélée efficace contre *Staphylococcus aureus* tandis que la DHLc a montré de bons résultats contre 5 différentes souches de *Candida*. ^[66] Des propriétés antiparasitaires ont été signalées pour les LST de la chicorée telles que la lactucine et la lactucopicrine, notamment contre la souche Honduras-1 du *Plasmodium falciparum*. ^[67] La lactucine a également été associée à des effets anti-adipogenèse *in vivo* et *in vitro* et à des activités anticancéreuses. ^[68,69] Le tableau ci-dessous illustre certaines de propriétés décrites pour les LST isolés de la cette plante (**Tableau 3**).

Tableau 3 Exemples d'activités pharmacologiques *in-vitro* associées à des LST extraits de *Chicorium intybus*

Molécules associées	Activités	Références
Lactucine et Lactucopirine	Antipaludique Analgesique (in-vivo) Antidiabétique	<i>Bischoff et al. (2004)</i> <i>Wesołowska et al.(2006)</i> <i>Wesołowska et al.(2006)</i> <i>Fan et at.(2017)</i>
<i>11β,13</i> -dihydrolactucine	Analgésique (in-vivo) Antifongique Antidiabétique	<i>Wesolowska et al.(2006)</i> <i>Mares et al.(2005)</i> <i>Fan et al.(2017)</i>
<i>11β,13</i> -dihydrolactucopirine	Antidiabétique	<i>Fan et al.(2017)</i>
8-déoxylactucine	Antifongique Antidiabétique	<i>Mares et al.(2005)</i> <i>Fan et al.(2017)</i>
Jacquinéline (<i>11β,13</i> -dihydro-6-déoxylactucine)	Antidiabétique	<i>Fan et al.(2017)</i>

Il est intéressant de constater que les lactones sesquiterpéniques (LST) présentes dans la chicorée montrent des propriétés bioactives significatives, avec des effets antimicrobiens et des impacts sur des processus métaboliques complexes tels que la douleur, le cancer, le diabète et l'inflammation. La racine de chicorée cultivée dans la région des Hauts-de-France représente une source locale de ces LST. Actuellement le potentiel des LST de chicorée reste largement inexploité, étant donné que la racine est principalement exploitée pour sa teneur en inuline. À l'avenir, ces composés pourraient être une source lucrative de molécules à haute valeur ajoutée, ouvrant de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cette racine au-delà de l'extraction de l'inuline.

III. Valorisation des terpénoïdes pour des applications industrielles

1. Intérêt industriel des terpènes en tant que composés bioactifs

1.1.Introduction

Nous avons vu dans le Chapitre 1 que les terpènes ont une grande importance chez les plantes, or, les humains ont évidemment cherché à utiliser ces molécules à leurs propres fins. Les composés qu'on appelle aujourd'hui terpènes et terpénoïdes ont longtemps attiré l'intérêt de l'humanité à cause de leurs propriétés particulières. Entre la conception des premières potions à base de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise, les lampes d'éclairage publique qui fonctionnaient avec un mélange d'essence de térébenthine et de l'éthanol, et l'utilisation du paclitaxel (taxol) en tant que médicament anti-cancéreux, il y a eu de nombreuses avancées théoriques et technologiques. ^[71] Néanmoins, les principaux marchés pour les terpènes et leurs dérivés restent relativement similaires. La cosmétique (principalement parfumerie), les médicaments, les polymères et l'énergie (dans une moindre mesure) sont les principaux secteurs d'utilisation. Les principaux exemples de terpènes utilisés dans ces marchés, ainsi que les opportunités et les challenges associées sont résumés ci-dessous (**Tableau 4**). ^[72]

Tableau 4 Principaux marchés pour les terpénoïdes

MARCHE	EXEMPLE DE TERPENES	OPPORTUNITES	DEFIS
COSMETIQUE	Myrcène, limonène, carvone, citral, camphor, menthol, cymène, squalène	Marché à haute valeur ajoutée Retour vers l'utilisation de produits d'origine naturelle	Difficulté à remplacer les matières premières d'origine pétrochimique
PHARMACEUTIQUE	Artémisinine, squalane, terpinène	Marché à très haute valeur ajoutée Faible concentration en principes actifs dans les médicaments Plusieurs domaines d'application (formulation, principe actifs)	Difficulté à remplacer les matières premières d'origine pétrochimique Difficultés d'approvisionnement pour les terpènes plus complexes
POLYMERES	Monomères : myrcène, limonène, farnésène Production de PET : cymène Caoutchouc synthétique : isoprène, geraniol Catalyseurs de polymérisation : pinènes et pinanes	Potentiel pour le développement de polymères renouvelables	Difficultés techniques dans la production à l'échelle industrielle

Depuis l'antiquité, des nombreuses plantes riches en terpènes ont été, et continuent à être, utilisées à des fins médicinales par diverses cultures à travers le monde. Les progrès scientifiques au cours des 2 derniers siècles ont permis d'identifier de nombreux terpènes responsables d'au moins une partie de la bioactivité recherchée sur ces plantes. Je vous présenterai à continuation des propriétés biologiques prometteuses des monoterpénoïdes et des lactones sesquiterpéniques

1.2. Propriétés biologiques des monoterpénoïdes

Un grand nombre de monoterpènes et monoterpénoïdes végétaux sont reconnus pour avoir des propriétés antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire ou antitumorale, dont différents exemples sont répertoriés dans un nombre de revus de la littérature (**Figure 16**). [73–75]

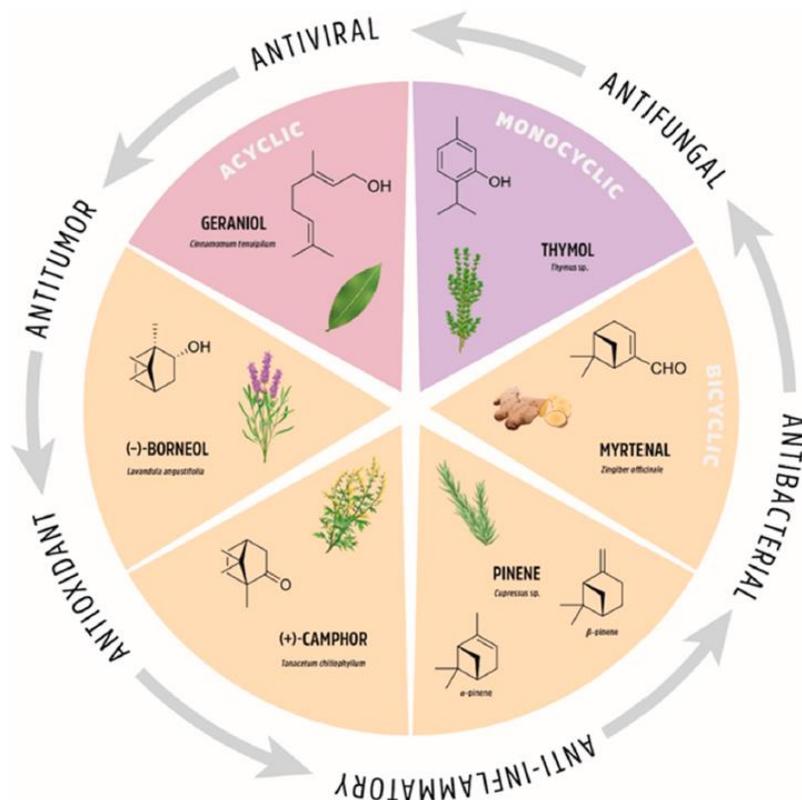


Figure 16 Exemple d'activités biologiques des monoterpénoïdes (figure de Zielinska-Blajet et al.(2020))

La diversité des effets des monoterpènes et monoterpénoïdes provient d'une multitude de mécanismes différents. Parmi ces derniers on retrouve : la modulation de l'équilibre redox, la production de cytokines pro et anti-inflammatoires, les voies de signalisation de l'insuline, la glycolyse et la gluconéogenèse, la phosphorylation de l'AMPK, la peroxydation lipidique, l'autophagie, la croissance cellulaire et la régulation à la hausse et à la baisse de l'expression de l'ARNm de certaines protéines (**Figure 17**). Ceux-ci ne seront pas détaillés dans ce manuscrit mais le lecteur peut consulter la revue de *Paulino et al.(2022)* pour plus d'informations. [76]

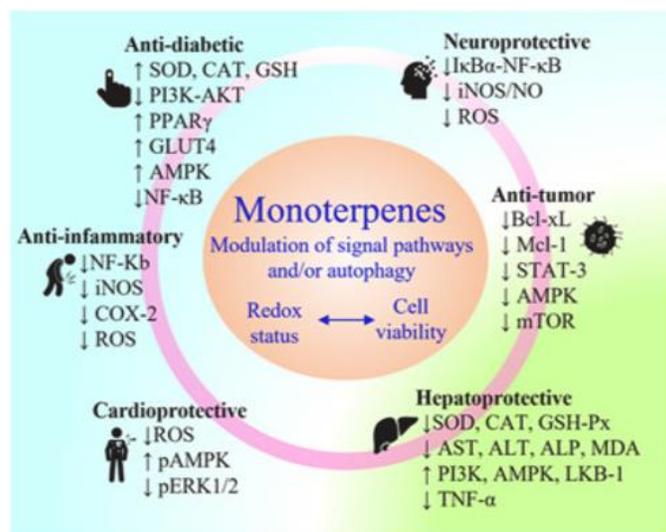


Figure 17 Résumé des différents mécanismes associés aux différentes activités biologiques des monoterpènes (figure de Paulino et al.(2022))

Les monoterpénoïdes sont connus pour avoir des activités antibactériennes. Cet aspect était particulièrement intéressant car la recherche de nouveaux agents antibactériens pour des applications en biocontrôle et/ou dans l'industrie pharmaceutique était une des idées principales de ce projet dans le moyen/long-terme.

Les monoterpénoïdes se distinguent par leurs propriétés physicochimiques qui les rendent particulièrement intéressants pour l'industrie pharmaceutique. Une étude *in silico* menée par Badawy et al. a analysé 36 monoterpènes et a constaté qu'aucun d'entre eux ne violait les règles de Lipinski et de Veber. Ces règles sont très souvent utilisées comme guide pour déterminer la probabilité qu'une molécule devienne un médicament administrable par voie orale. [77] De plus, leur hydrophobie est suffisante pour pénétrer les membranes microbiennes, ce qui les rend capables de perturber l'ordre et la stabilité de la bicouche lipidique, conduisant à une diminution de l'intégrité membranaire. Cette capacité à interagir avec les membranes cellulaires les rend potentiellement utiles pour la conservation des aliments, en inhibant ou en prévenant la croissance des pathogènes d'origine alimentaire, améliorant ainsi la durée de conservation des produits alimentaires. Ainsi, les monoterpènes offrent une opportunité prometteuse non seulement pour le développement de nouvelles formulations pharmaceutiques et nutraceutiques destinées à l'administration orale, mais aussi comme agents de conservation alimentaire. [76,77]

En effet, des nombreux monoterpénoïdes naturels ont montré une activité contre des bactéries et des champignons. Comme mentionné, le mécanisme d'action antimicrobien des terpènes est étroitement lié à leur caractère lipophile, qui provoque des perturbations dans les protéines membranaires et des perturbations dans la chaîne respiratoire. [78] Concernant les bactéries, les gram positives sont typiquement plus sensibles aux terpènes que les gram négatives. Pour ces dernières, la présence de lipopolysaccharides, leur conférant une charge négative plus importante, ainsi qu'une bicouche de peptidoglycane et cardiolipine au niveau de leur membrane leur rend moins susceptible à l'effet perméabilisant des terpènes. [78,79] Des études réalisées sur la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* ont montré que l'activité des

monoterpènes, et particulièrement pour monoterpénoïdes oxygénés, semble être dépendante de la longueur de la chaîne hydrophobe ainsi que de la présence de doubles liaisons carbone-carbone. [80,81]

D'autres caractéristiques structurales des monoterpénoïdes, telles que la présence d'un noyau aromatique, modulent également leur activités (**Figure 18**).

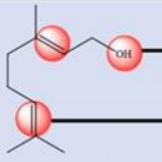
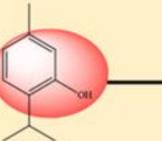
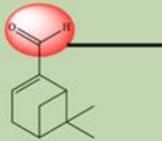
Monoterpeneid group	Structural features	Antibacterial and antioxidant activity
 <p>Acyclic</p>	<p>Hydroxyl groups</p> <p>Number of double bonds</p>	<p>Hydroxyl groups in acyclic monoterpeneoids ↑ antibacterial activity ↑ antioxidant activity</p> <p>↑Number of double bonds in acyclic monoterpeneoids ↑ antibacterial activity ↑ antioxidant activity</p>
 <p>Monocyclic</p>	<p>Conjugated double bonds</p> <p>Phenol group</p>	<p>Conjugated double bonds in monoterpene molecules ↑ antioxidant activity</p> <p>Phenol ring in cyclic monoterpeneoids ↑ antioxidant activity</p> <p>↑ antibacterial activity and make them most effective that cyclic and acyclic hydrocarbon monoterpeneoids</p>
 <p>Bicyclic</p>	<p>Carbonyl group (aldehydes or ketones)</p>	<p>Bicyclic monoterpeneoids containing carbonyl group ↑ antibacterial activity</p>

Figure 18 Illustration de certaines caractéristiques structurales des monoterpènes associés à leur activité antimicrobienne et antioxydante (figure de *Paulino et al.(2022)*)

Les monoterpènes oxygénés montrés dans la figure suivante possèdent des activités contre des bactéries problématiques dans l'industrie agroalimentaire : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* (**Figure 19**). Parmi ceux-ci, les monoterpénoïdes aromatiques semblent être les plus actifs, particulièrement le thymol qui montre une CMI (concentration inhibitrice minimale) de 7 µg/mL pour *B.cereus*, *E.coli* et *S.aureus*, et de 3 µg/mL pour *S.typhimurium*. [82]

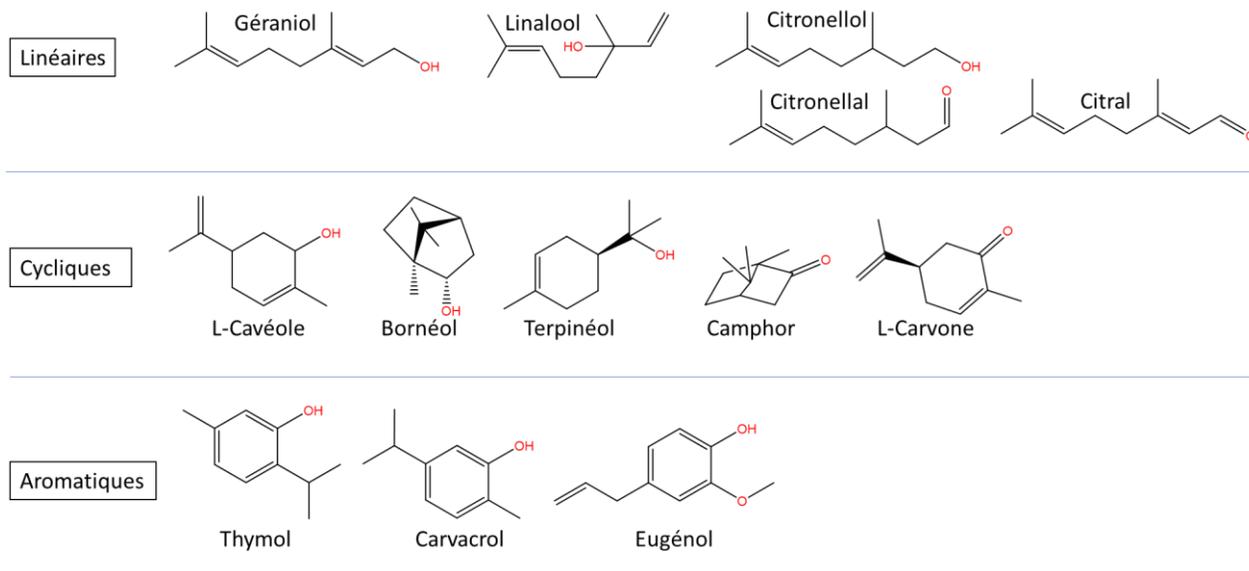


Figure 19 Monoterpénoïdes actifs contre des bactéries agroalimentaires

Une étude a également mis en évidence des activités contre 12 espèces de champignons (3 levures et 9 filamenteux) pour le citral et le géranol, et en moindre mesure pour le linalol et le (-)-menthol. ^[83] Le menthol et d'autres monoterpénoïdes ont également un effet inhibiteur sur les biofilms produits par *Candida albicans*. ^[84] Comme évoqué précédemment, il est supposé que l'effet antibactérien des monoterpénoïdes tels que le thymol et le (-)-menthol soit en partie dû à la perturbation de la membrane lipidique des bactéries. Leur efficacité dépendrait de leur lipophilie (liée à la capacité à diffuser à travers les membranes), de la présence de certains groupements (alcool, phénol, aldéhyde) et varie en fonction des caractéristiques spécifiques de la membrane du microorganisme ciblé. ^[85]

Les monoterpènes composés purement de carbone et d'hydrogène sont globalement moins actifs que les terpènes oxygénés, un compromis entre leur caractère apolaire et leur hydrosolubilité semble donc nécessaire. C'est en partie pour cette raison que nous avons choisi de travailler avec des terpénoïdes oxygénés dans le cadre de ce projet de thèse, en effet ceux-ci présentent des propriétés physico-chimiques plus attractives pour le développement de nouveaux principes actifs.

1.3. Propriétés biologiques des LST

Comme nous l'avons vu, les lactones sesquiterpéniques sont des terpènes hautement fonctionnalisés, conçus par la nature en partie comme des outils de défense des plantes pour faire face à des situations de stress. ^[20] De ce fait, beaucoup d'entre eux sont également dotés de propriétés pharmacologiques. Cette sous-famille de terpènes est principalement connue pour leur activité antitumorale et anti-inflammatoire, avec plus de 1500 publications entre 1990 et 2010 concernant ces deux propriétés. ^[86] Les LST sont également reconnus pour leur propriétés antipaludique ^[67,87], antioxydantes ^[88] et antimicrobiennes ^[19], notamment contre *Mycobacterium tuberculosis*. ^[89] Lorsqu'on s'intéresse aux LST comme potentiels médicaments, les activités biologiques les plus prometteuses sont généralement celles impliquant l'interaction de la molécule avec une cible particulière, souvent une protéine. Les LST possédant

uniquement une action cytotoxique largement non spécifique sont donc typiquement exclus dans la recherche pharmaceutique, mais peuvent être intéressants pour d'autres applications (e.g. biocontrôle).

Plusieurs cibles biologiques sont décrites pour les activités biologiques des LST. Concernant les cibles déclenchant des propriétés antitumorales, on retrouve des facteurs de transcription tels que *c-myb*. Un facteur de transcription qui intervient dans des processus de prolifération et différenciation cellulaire. La dérégulation de *c-myb* est connue comme étant un marqueur important dans le développement de tumeurs chez l'humain, particulièrement dans les leucémies et les cancers du sein et du colon. Or il semblerait que l'inhibition de ce processus pourrait représenter un nouveau mécanisme qui s'avère prometteur dans le traitement des cancers décrits précédemment.^[90] De plus, d'autres mécanismes sont également reportés, notamment pour la thapsigargine, qui est un puissant inhibiteur de la pompe à Ca^{2+} associée à une protéine nommée SERCA ('sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase'). Cette dernière contrôle le taux de calcium dans différentes lignées cellulaires et est essentielle à leur viabilité.^[91] Quant aux propriétés antiinflammatoires, les LST peuvent agir sur des nombreuses cibles, or, les principales voies métaboliques impliquées sont NF- κ B (« nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »), MAPK et JAK-STAT. Leur action au niveau de ces voies de signalisation affecte la prolifération, la survie, la maturation, la différenciation et le mouvement des cellules immunitaires au sein des tissus.^[92,93]

Les propriétés antibiotiques, antitumorales et antiinflammatoires des LST semblent avoir un point commun, celles-ci semblent être corrélées avec le nombre de sites alkylants dans la molécule, principalement les motifs, α MGL, cyclopentanone α,β -insaturée, des époxydes et des esters de type acrylate pouvant former des liaisons covalentes avec certaines protéines. Or, leur orientation spatiale et leur propriétés physicochimiques sont également des facteurs clés.^[86,89] Parmi des LST reconnues pour avoir des fortes propriétés biologiques, on retrouve le parthenolide, le costunolide, l'artémisinine et la thapsigargine (**Figure 20**).

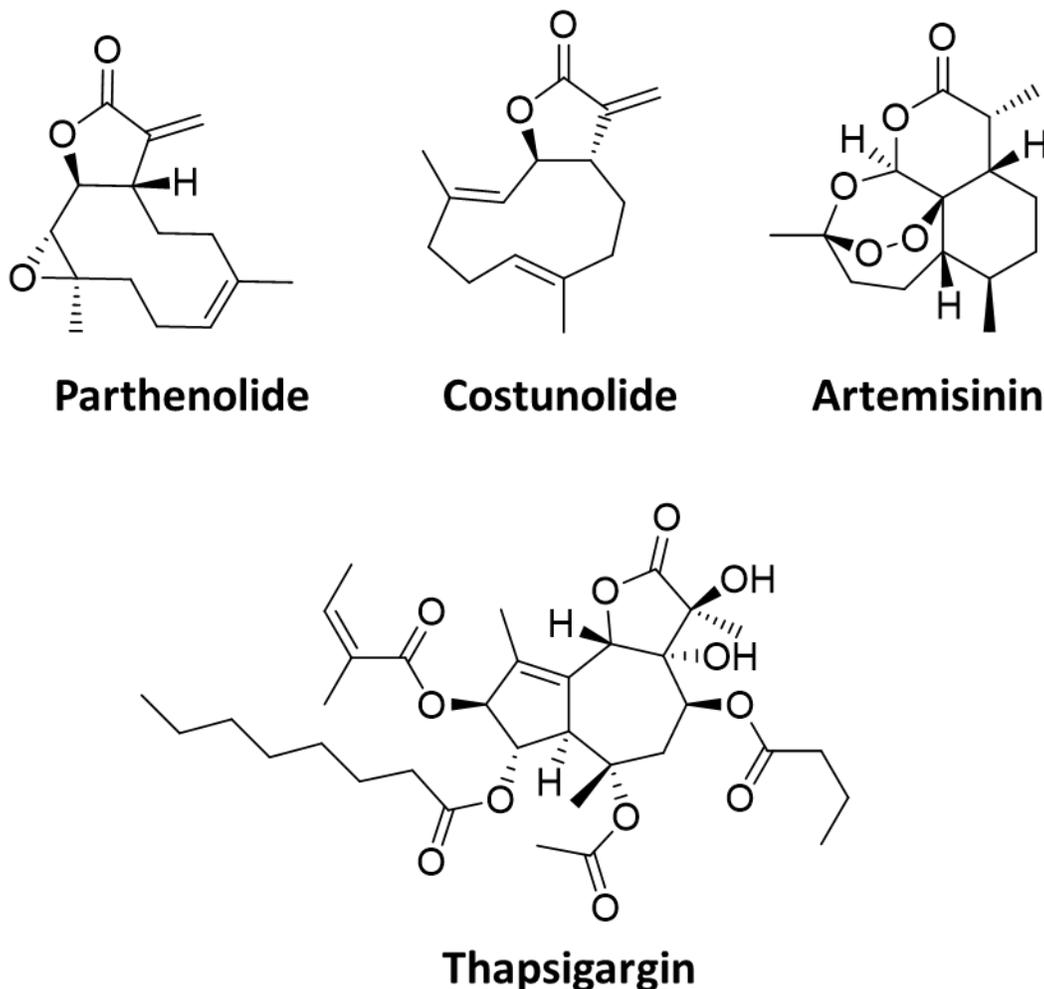


Figure 20 Structures de lactones sesquiterpeniques amplement connues dans la litterature

- A propos du caractère cytotoxique des LST

Plusieurs LST sont dotés de propriétés cytotoxiques qui peuvent être vues comme un atout ou comme un inconvénient. Une cytotoxicité élevée peut s'avérer problématique lorsque la molécule est étudiée en tant qu'un potentiel médicament dû aux effets secondaires que cela peut entraîner chez l'humain ou l'animal, c'est pour cette raison que les composés cytotoxiques sont typiquement mis de côté dès les premières phases de screening dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, cette propriété est souvent reliée aux effets antitumoraux chez les LST, cela peut donc être vu comme un point positif lorsque la molécule possède une certaine sélectivité vis-à-vis d'une cible d'intérêt (e.g. un type cellulaire). Autrement, la cytotoxicité peut également être avantageuse dans le développement d'agents antibiotiques (bactéricides, fongicides) qui ne sont pas destinés à la consommation, par exemple pour des produits utilisés dans le biocontrôle ou en tant qu'agents nettoyeurs (par exemple dans les hôpitaux).

Des études de relation structure-activité ont mis en évidence que le principal facteur structurel influençant la cytotoxicité des LST était la présence d'un cycle cyclopentanone α,β -insaturée, ayant un caractère électrophile similaire à celui du cycle α MGL, mais une réactivité supérieure par rapport à la vitesse de la

réaction avec des thiols (présents notamment dans les protéines). Ces études ont également montré que la réaction des nucléophiles biologiques (principalement thiols) avec le cycle α MGL est irréversible, mais plus lente que celle avec la cyclopentènone (**Figure 21**). D'autres éléments augmentant la cytotoxicité sont la présence de fonctions ester de type acrylate et le caractère lipophile de la molécule. ^[94,95]

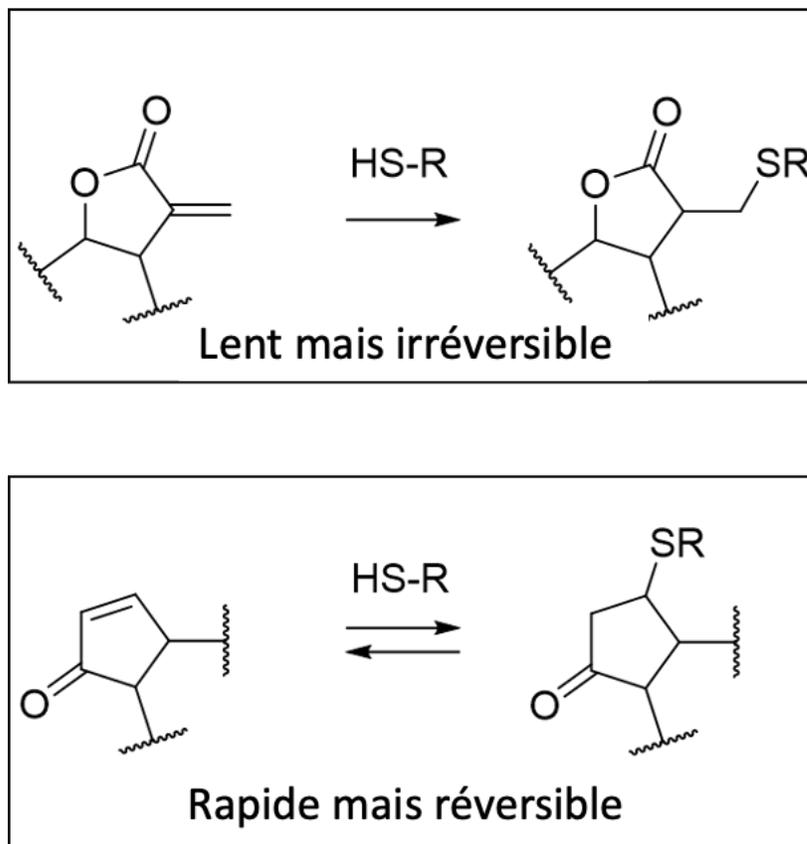


Figure 21 Illustration de la réactivité des groupements cyclopentanone α,β -insaturée et α MGL face à des nucléophiles biologiques soufrés tels que le glutathionne (GSH) (inspiré de *Schmidt et al.(2006)*)

En conclusion, les lactones sesquiterpéniques (LST) constituent une gamme diverse de molécules qui représentent une source prometteuse de principes actifs pour le traitement de maladies importantes de notre époque. Leur large gamme de propriétés pharmacologiques, notamment antitumorales et anti-inflammatoires, ainsi que leurs effets antipaludiques et antimicrobiens, souligne leur potentiel en tant que candidats pour de nouveaux médicaments. Cependant, pour que ces molécules soient pleinement adaptées et efficaces dans des domaines d'utilisation spécifiques, un travail d'optimisation est encore nécessaire.

La diversité structurale des LST offre des opportunités pour moduler leurs activités biologiques en les rendant plus performants et/ou plus sélectifs, notamment pour être utilisés en tant que médicaments. De même, bien que certaines de leurs propriétés soient déjà bien documentées, une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action et de leurs interactions avec les cibles biologiques est encore important.

2. Modification des terpénoïdes dans la synthèse de nouveaux principes actifs

2.1. Introduction

Nous avons vu que des nombreux terpénoïdes présentent un intérêt pour des applications biologiques, notamment pour l'industrie pharmaceutique. Naturellement, des chercheurs publiques et privés se sont intéressés au développement de voies de valorisation des terpénoïdes pour les utiliser en tant que molécules plateforme. Dans ce contexte de valorisation des terpénoïdes pour des applications industrielles, deux grandes approches figurent dans la littérature :

- 1) Des méthodes permettant d'obtenir des terpènes naturels d'intérêt à partir d'une matière première et/ou de synthons, ces derniers peuvent être notamment des terpènes ayant une structure plus simple et/ou étant disponibles à des hauts tonnages. C'est notamment le cas des monoterpènes alpha et beta-pinène qui sont utilisés dans la synthèse de plusieurs monoterpénoïdes différents.
- 2) Des méthodes centrées sur la modification de terpènes avec le but d'obtenir des dérivés plus performants selon les types de propriétés recherchées. Cette approche est principalement utilisée dans le domaine pharmaceutique dans la conception de nouveaux médicaments. D'autres exemples sont la recherche d'agents de biocontrôle (insecticides, fongicides, antibactériens) ou encore des matériaux via la formation de polymères.

Dans le cadre de ce projet de thèse, notre cible principale était de travailler avec des LST avec l'idée d'utiliser la chicorée comme matière première. Le but étant d'explorer des voies de modification pour nos molécules d'intérêt avec l'objectif d'augmenter leurs activités biologiques. Dans ce contexte, seulement l'approche (2) sera explorée à continuation.

Des articles décrivant des réactions chimiques impliquant des terpénoïdes sont nombreux dans la littérature, et la plupart des grands types de transformation chimiques sont représentées de façon plus ou moins importante. Pour ce projet, notre attention se porte principalement sur un type spécifique de réaction : l'acylation. Cette réaction est particulièrement intéressante car elle permet d'exploiter les fonctions alcool, fréquemment présentes dans nos composés d'intérêt et largement répandues parmi les terpénoïdes, comme sites idéaux pour la fonctionnalisation. En ce qui concerne les lactones sesquiterpéniques (LST), les études impliquant la synthèse de nouveaux dérivés acylés (principalement des esters) ont révélé des résultats prometteurs, indiquant que l'acylation pourrait être une voie efficace pour améliorer leur activité biologique.

Dans un premier temps, nous examinerons les principales méthodes chimiques utilisées pour l'acylation des terpénoïdes, particulièrement en ce qui concerne les LST. En effet, les études sur l'acylation des LST sont peu nombreuses, en partie à cause de la rareté de ces molécules. Nous aborderons donc ces exemples de manière individuelle, puisque la modification de cette sous-famille de composés est particulièrement pertinente dans le cadre de notre approche. Chaque exemple sera analysé en détail pour mieux comprendre l'impact de ces méthodes sur le développement des dérivés acylés semi-synthétiques.

2.2. Principales voies d'acylation utilisées sur les terpènes

Parmi le type de modifications qui intéressent la communauté scientifique dans le cadre des terpènes, on retrouve la formation de liaisons ester. Ces dérivés acylés sont synthétisés dans le but d'introduire des nouveaux groupements ayant un effet bénéfique pour leur activité biologique.^[75] Concernant la synthèse de ces dérivés, deux voies majoritaires sont décrites :

2.2.1. Couplage avec l'acide carboxylique en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et diisopropylcarbodiimide (DIC)

La première voie est celle de la réaction de couplage entre un alcool et un acide carboxylique en présence de diisopropylcarbodiimide (DIC) et de diméthylaminopyridine (DMAP), également appelée estérification de Steglich. Il s'agit d'une adaptation de la réaction de couplage peptidique entre une amine et un acide carboxylique en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC).^[96] Cette réaction comporte les deux étapes suivantes :

- 1) L'acide carboxylique portant la chaîne d'intérêt réagit avec la DIC en présence d'une base (ici DMAP) pour former un intermédiaire acylé fortement électrophile. Ce composé est ensuite attaqué par la DMAP pour former l'amide correspondante qui possède une réactivité encore plus importante.
- 2) Le dérivé acylé de la DMAP est très réactif et peut être attaqué par l'alcool d'intérêt en libérant de la DMAP dans le milieu. Cette réactivité s'explique par le fait que la DMAP est un très bon groupe partant (nucléofuge). Dans ces conditions, la DMAP peut être utilisée en quantités sub-stoechiométriques (catalytiques) puisque celle-ci est régénérée à la fin de la réaction (**Figure 22**).

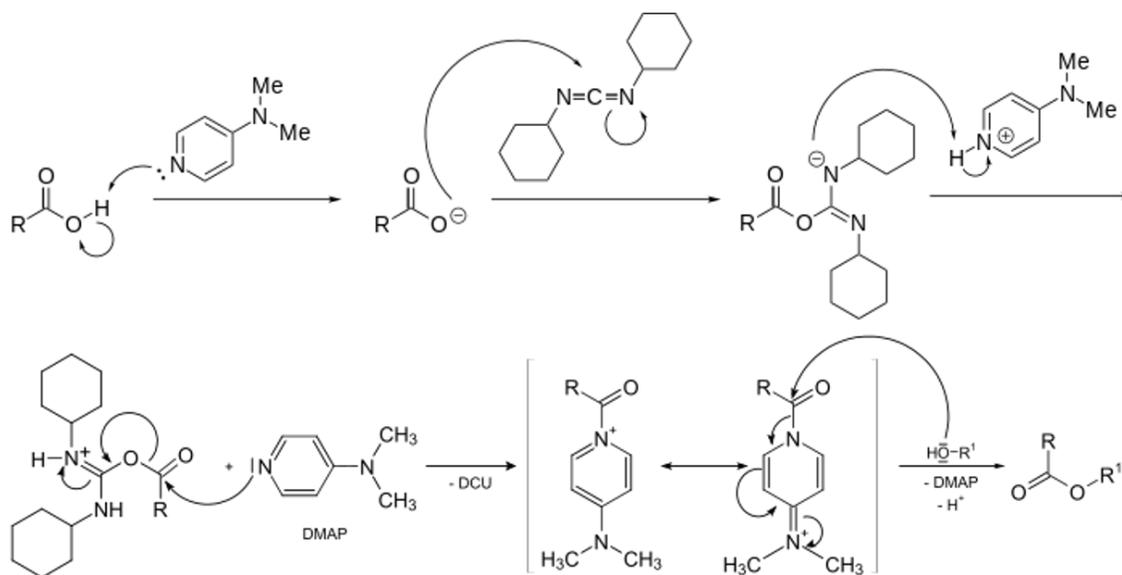


Figure 22 Mécanisme de l'estérification de Steglich

La méthode d'estérification de Steglich est couramment utilisée dans la formation d'esters de différents composés naturels, y compris des terpènes (e.g. bornéol, menthol, thymol, carvacrol, eugenol, taxol) .^[97-99] Cette réaction est attractive car elle accepte un grand nombre d'acides carboxyliques et alcools, et peut

être réalisée à température ambiante à un pH proche de la neutralité.^[98] Cependant, cette réaction présente plusieurs inconvénients à considérer. Le DIC est un composé toxique en cas d'ingestion et en contact avec la peau et les yeux, il est également irritant (mentions H302, H311, H317, H318). (Fiche DIC - ECHA) Quant à la DMAP, il s'agit d'une substance particulièrement hasardeuse qui est toxique par inhalation et ingestion, potentiellement mortelle à forte dose en contact avec la peau et toxique pour les organes. Elle est également très délétère pour les organismes aquatiques.^[101] De plus, l'utilisation d'agents de couplage tels que le DIC engendre la production de sous-produits, comme la 1,3-diisopropylurée qui est formée en quantité stœchiométrique par rapport à l'ester d'intérêt. C'est pour ces raisons qu'une étape de purification sous colonne de silice/HPLC est très souvent nécessaire, or des résidus des composés toxiques mentionnés préalablement peuvent toujours être présents dans le produit final.^[98]

2.2.2. Utilisation d'agents acylants activés

L'autre méthodologie couramment utilisée dans l'acylation de terpénoïdes est celle faisant intervenir des agents acylants activés, principalement des chlorures d'acyle mais également des anhydrides. Les chlorures d'acyle sont parmi les agents acylants les plus utilisés en synthèse chimique, et un grand nombre de structures sont disponibles commercialement. Cependant, afin d'introduire des chaînes ester spécifiques, les chlorures d'acyle d'intérêt sont également couramment synthétisés au laboratoire *via* une réaction entre l'acide carboxylique correspondant et du chlorure de thionyle (SOCl₂).^[102] Les chlorures d'acyle sont typiquement préparés avec un excès de SOCl₂ et purifiés par distillation, ou dans certains cas, tout simplement en concentrant le milieu afin d'évaporer l'excès de SOCl₂ et le SO₂ produit au cours la réaction (deux composés volatiles) (**Figure 23**).^[102,103]

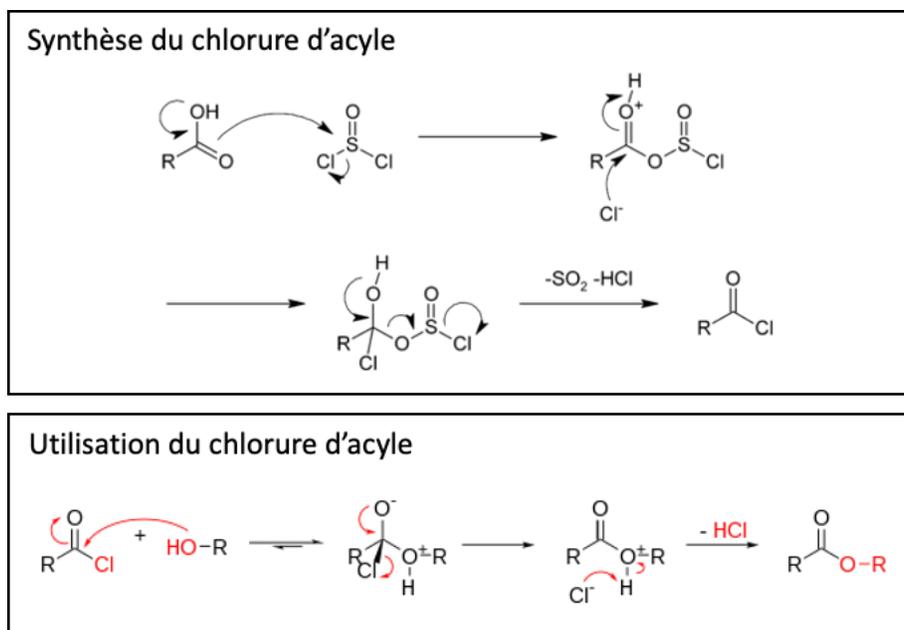


Figure 23 Mécanismes impliqués dans l'utilisation de chlorure d'acyles pour la synthèse d'esters

Lors de la réaction entre l'alcool et le chlorure d'acyle, des bases telles que la triéthylamine (Et₃N) et la DMAP sont souvent utilisées en quantités sub-stœchiométriques (catalytiques) car elles améliorent les

performances de la réaction *via* l'activation du chlorure d'acyle. La même chose est constatée pour l'utilisation d'anhydrides à la place du chlorure d'acyle (**Figure 24**).^[104,105]

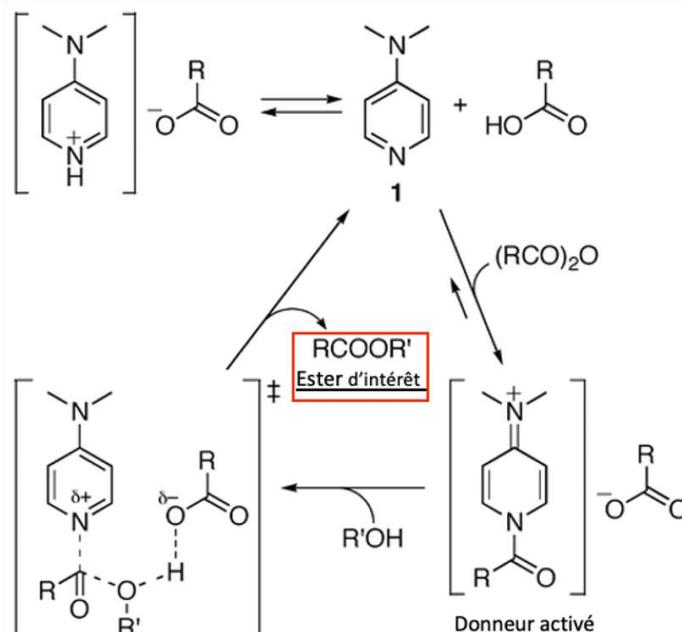


Figure 24 Mécanisme de l'acylation entre un alcool et un anhydride catalysée par DMAP

En ce qui concerne les inconvénients de cette méthodologie, on retrouve encore ceux liés à l'utilisation de la DMAP mentionnés auparavant, même si les quantités sont typiquement faibles. (Fiche DMAP - ECHA) De plus, la synthèse des chlorures d'acyle fait souvent intervenir des agents chlorants très toxiques tels que le SOCl_2 et qui provoquent également la production du dioxyde de soufre (SO_2), un gaz toxique. (Fiche SOCl_2 - ECHA,) Concernant l'utilisation de chlorure d'acyle, leur présence sous forme d'impuretés dans des produits pharmaceutiques relève de la controverse dû à leur toxicité, même si leur risque en tant que mutagène n'est pas confirmée dans ce contexte. J'invite au lecteur à consulter l'article d'Amberg et al. sur le journal OPRD qui traite ce sujet plus en détail.^[107]

2.3. Synthèse d'esters de lactones sesquiterpéniques : des analogues plus performants

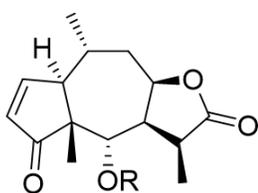
Nous allons maintenant voir les exemples disponibles concernant la synthèse d'esters de lactones sesquiterpéniques (LST). Nous avons vu que les principales caractéristiques structurales responsables de la plupart des activités biologiques des LST sont la présence d'un groupement α -méthylène-gamma lactone (α -MGL) et d'autres motifs électrophiles tels que le cycle cyclopenténone insaturés. Ces derniers interagissent avec des protéines *via* des réactions d'addition de Michael avec des résidus cystéine. Bien que ces éléments aient été identifiés comme les principaux pharmacophores, d'autres facteurs jouent un rôle dans la modulation de cette réactivité, comme la lipophilie, le nombre de sites alkylants (par exemple, accepteur de Michael, halogènes primaires) et la présence de certaines chaînes latérales ester.^[94,108]

2.3.1. Étude sur les hélénanolides

Un exemple d'étude de relation structure-activité concernant les esters de LST a été réalisé par Aaron Beekman et al. sur la hélénaline et d'autres hélénanolides appartenant à la sous-classe des methylpseudoguaianolides (**Figure 25**). [109] L'influence des motifs de substitution sur la l'activité antitumorale de 21 hélénanolides a été déterminée sur une ligne cellulaire clonée de tumeur ascitique d'Ehrlich, EN2.

Dans une série d'esters d'hélénaline, l'acétate et l'isobutyrate se sont avérés plus actifs que l'hélénaline elle-même. Cependant, les esters avec des groupes acyle plus grands (tiglate et isovalérate) présentaient une toxicité réduite par rapport à l'hélénaline (portant une fonction alcool). Des relations similaires ont été observées sur les analogues acétate et isovalérate de la mexicanine I. De plus, sur une série d'esters de 11*R*,13-dihydrohélénaline, la cytotoxicité a été directement liée à la taille et à la lipophilicité de la chaîne latérale de l'ester. La dihydrohélénaline, porteur du groupement OH non estérifié, a été composé le moins actif de ce groupe. Les résultats de cette étude suggèrent que l'introduction d'une chaîne ester à caractère lipophile contribue est bénéfique pour leur activité. Cependant, un encombrement stérique trop important de la molécule pourrait perturber l'interaction avec la cible biologique d'intérêt.

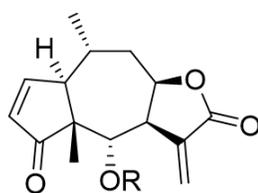
13-dihydrohelenalins



R=

- H
- Acetyl
- Tigloyl
- Isovaleryl

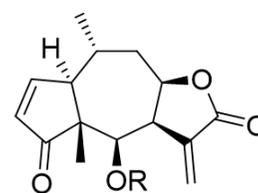
Helenalins



R=

- H (helenalin)
- Acetyl
- Isobutyryl
- Tigloyl
- Isovaleryl

Mexicanins I



R=

- H (mexicanin I)
- Acetyl
- Isovaleryl

Figure 25. Structures des hélénanolides naturels et semi-synthétiques

Concernant les dérivés semi-synthétiques, l'acétate de mexicanine I a été synthétisé via l'acylation de la fonction alcool avec un agent acylant activé. La réaction est faite avec 10 mM (10 mg) de mexicanine I et 500 μ L d'anhydride acétique (solution à 10 % dans pyridine) à reflux pendant 3 h. Le brut réactionnel a ensuite été concentré à pression réduite et purifié dans une colonne de silice sous vide, cela leur a permis de récupérer une masse de 6 mg d'acétate de mexicanine I, donnant un rendement de 51 %.

D'autre part, l'isovalérate de mexicanine a été synthétisé *via* une réaction d'estérification de Steglich. Celle-ci s'est faite en solubilisant avec 15 mM de mexicanine I, 19 mM (25 mg) d'acide isovalérique, 16 mM (43 mg) de dicyclohexylcarbodiimide, et 2 mM (3 mg) de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans 13 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) anhydre et sous agitation pendant la nuit. Une extraction liquide-liquide et une purification sur colonne de silice sous vide sont réalisées, ce qui a permis de récupérer 18 mg d'isovalérate de mexicanine I, soit un rendement de 26,5 %.

Nous pouvons remarquer que dans les deux cas, les rendements obtenus sont relativement modestes et quelle que soit la méthode de synthèse, même si l'utilisation d'un agent acylant activé semble préférable. De même, une étape de purification est indispensable afin de s'en débarrasser des sous-produits indésirables. Dans cette étude, l'absence de régiosélectivité de la réaction d'acylation n'est pas une contrainte puisque le composé modifié porte une seule fonction alcool.

2.3.2. Étude sur l'acide sonchifolinique

Dans un autre exemple, *Kitai et al.* ont réalisé la synthèse de plusieurs dérivés esters (propyle, butyle, pentyle et 2-méthoxy éthylnyle) de l'acide sonchifolinique, un germacranolide (sous type melampolide) isolée des feuilles de yacon (*Smallanthus sonchifolius*, famille des astéracées) (**Figure 26**). Ils ont étudié leur cytotoxicité contre des lignées cellulaires « HeLa » en évaluant l'influence des dites chaînes latérales. Il a été observé que l'introduction de chaînes alkyles de longueur croissante augmentait effectivement la cytotoxicité du composé parent, et que cet effet était probablement dû à une lipophilie plus élevée des nouveaux esters. Cependant, une diminution de l'activité a été observé pour le dérivé pentyle, suggérant une relation qui semblerait suivre une courbe en U renversée, avec des chaînes alkyles trop longues/volumineuses ayant un effet contreproductif. Une hypothèse pour expliquer cela serait que la chaîne ester pourrait empêcher ou perturber l'interaction du pharmacophore de la molécule avec sa cible. [110]

Les dérivés ont été synthétisés une réaction d'estérification de Fischer (à reflux et en présence d'un catalyseur acide tel que l'acide sulfurique) avec 10 mM (36 mg) d'acide sonchifolinique, en utilisant 1 mL d'alcool correspondant (propanol, butanol, pentanol, 2-méthoxyéthanol) en tant que solvant à 80 °C pendant 6 h. Les milieux réactionnels sont ensuite concentrés à pression réduite (non précisée) et le résidu purifié via HPLC préparative. De rendements de l'ordre de 10-20 % ont été obtenus (6,5 à 8,1 mg).

Même si cette étude concerne la formation d'un ester semi-synthétique d'une LST, il s'agit d'un exemple différent aux autres puisque substrat impliqué dans cette étude possède une fonction acide carboxylique au lieu d'une fonction alcool, il agit donc en tant que donneur d'acyle et non pas comme accepteur. Or, les rendements obtenus avec cette méthode sont faibles. Même si les auteurs ne l'ont pas précisé, le fait de maintenir le milieu à reflux dans un solvant alcoolique a probablement provoqué une dégradation de l'acide sonchifolinique.

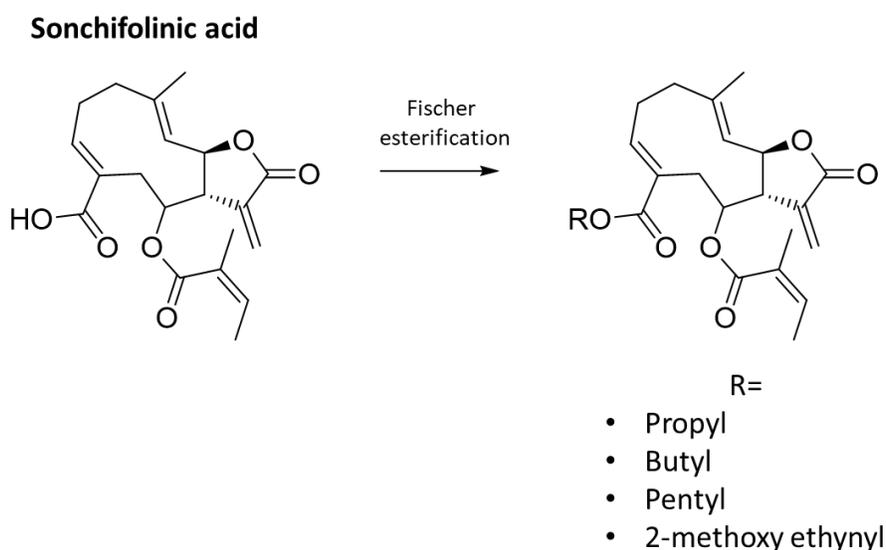


Figure 26 Structure de l'acide sonchifolinique et ses dérivés semi-synthétiques

2.3.3. Étude sur la scabertopin

La scabertopin (SCP) est une LST de la sous-famille des germacrane retrouvée dans la plante *Elephantopus scaber*. Ce composé a été choisi par Zhang *et al.* comme référence pour la synthèse de dérivés après avoir montré un effet inhibiteur sur l'adénocarcinome du poumon (cellules A549).^[111] Treize dérivés semi-synthétiques ont été synthétisés, en remplaçant la fonction ester naturellement présente sur la scabertopin par une série d'esters possédant des cycles aromatiques.^[112] Les tests *in-vitro* ont montré que la plupart des dérivés (sauf SCP-3) possédaient un effet inhibiteur contre cette lignée de cancer du poumon (cellules A549), avec le dérivé SCP-7 étant le plus actif (**Figure 27**). D'après les auteurs, ce dernier induit une mort cellulaire par apoptose qui semble être associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant des perturbations au niveau de la mitochondrie. Ils ont également postulé que ce composé pourrait interagir avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et inhiber son expression dans les cellules cancéreuses du poumon, il serait donc un antitumoral potentiel pour le traitement du « non-small cell lung cancer » (NSCL).

Concernant les synthèses, les auteurs ont utilisé une méthodologie comportant 3 étapes réactionnelles (Figure 27). La première étape est une hydrolyse de l'ester de la scabertopin avec K_2CO_3 réalisée dans du méthanol anhydre. Cette réaction n'est pas sélective puisque le méthanol réagit également avec la double liaison du groupe α -MGL pour former une fonction éther méthylique. Une deuxième étape permet donc de régénérer la double liaison exocyclique *via* une réaction d'élimination en présence d'une base (ici 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene ou DBU) dans du toluène à 85 °C. Les esters souhaités sont finalement formés *via* une réaction d'estérification de Steglich en présence de DMAP et d'un agent de couplage. Dans cette réaction la fonction alcool secondaire du substrat est acylée en présence de l'acide carboxylique correspondant (1 équivalent), en présence d'un équivalent de DMAP (diméthylaminopyridine) et d'un équivalent de l'agent de couplage EDCI (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide). Cette dernière étape est réalisée dans du dichlorométhane sec à température ambiante pendant 4-48 h sous agitation. Les esters correspondants sont obtenus avec des rendements allant de 52,6 % à 94,6 % après work-up (extraction liquide-liquide du milieu réactionnel avec EtOAc) et purification sous HPLC préparative. Dans cette étude plus récente, les rendements obtenus sont meilleurs que dans les études que nous avons vu précédemment. En effet, les conditions douces de l'estérification de Steglich limitent la dégradation du substrat. Cependant dans ce cas les auteurs ont utilisé un équivalent de DMAP, au lieu de l'utiliser en quantités catalytiques (sub-stœchiométriques), ce qui a probablement contribué à l'augmentation du rendement.

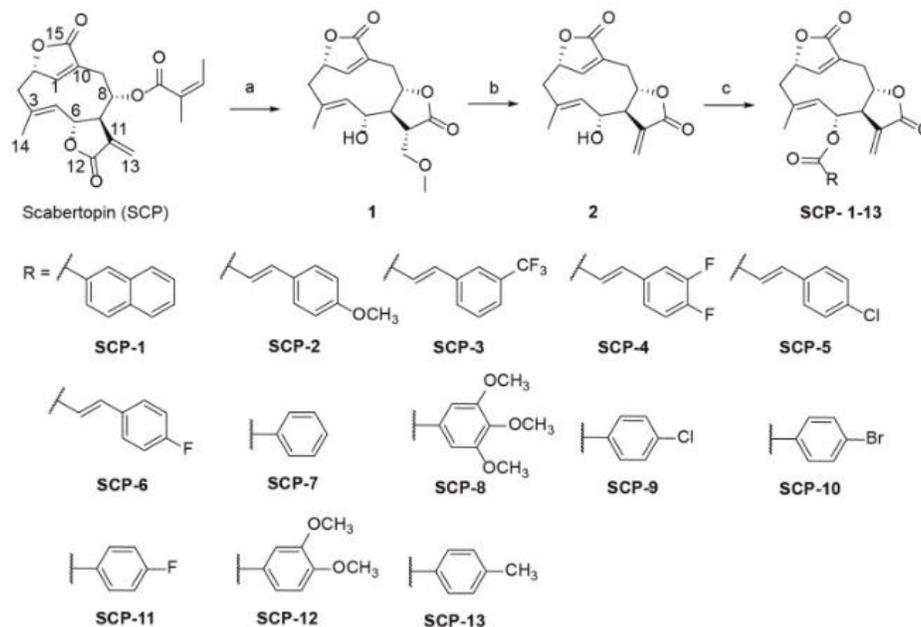


Figure 27 Schéma réactionnel de la synthèse des dérivés de la scabertopin par Zhang *et al.*(2022)

2.3.4. Les analogues de la Thapsigargine

La thapsigargine, une lactone sesquiterpénique découverte dans les racines et les fruits des plantes méditerranéennes de l'espèce *Thapsia garganica L.*, est utilisée depuis des siècles en médecine traditionnelle pour traiter les douleurs rhumatismales, les maladies pulmonaires et l'infertilité féminine. Dans l'époque contemporaine, la thapsigargine a été identifiée comme un puissant agent cytotoxique induisant l'apoptose des cellules cancéreuses.^[91] Cette activité biologique a encouragé des études sur l'utilisation de la thapsigargine comme nouvel agent anticancéreux avec un mécanisme innovant. Cependant, son développement en tant que médicament a été limité en raison de sa forte toxicité pour les cellules saines. Par conséquent, plusieurs dérivés ont été élaborés dans le but de créer des composés plus sélectifs pour certaines cellules tumorales, tout en conservant l'activité biologique. Parmi les différentes possibilités d'analogues, un dérivé semi-synthétique (12ADT) présentant une chaîne ester avec un groupement 12-aminododecanoyl au niveau a été retenue en tant que molécule plateforme. En effet, cette chaîne ester joue le rôle de 'linker' et permet de coupler la LST avec des chaînes peptidiques, donnant lieu à des pro-drogues plus sélectives pour le type cellulaire ciblé. Les chaînes peptidiques introduites améliorent la solubilité du composé et sont criblées par des enzymes surexprimées chez certaines cellules tumorales (**Figure 28**).^[113]

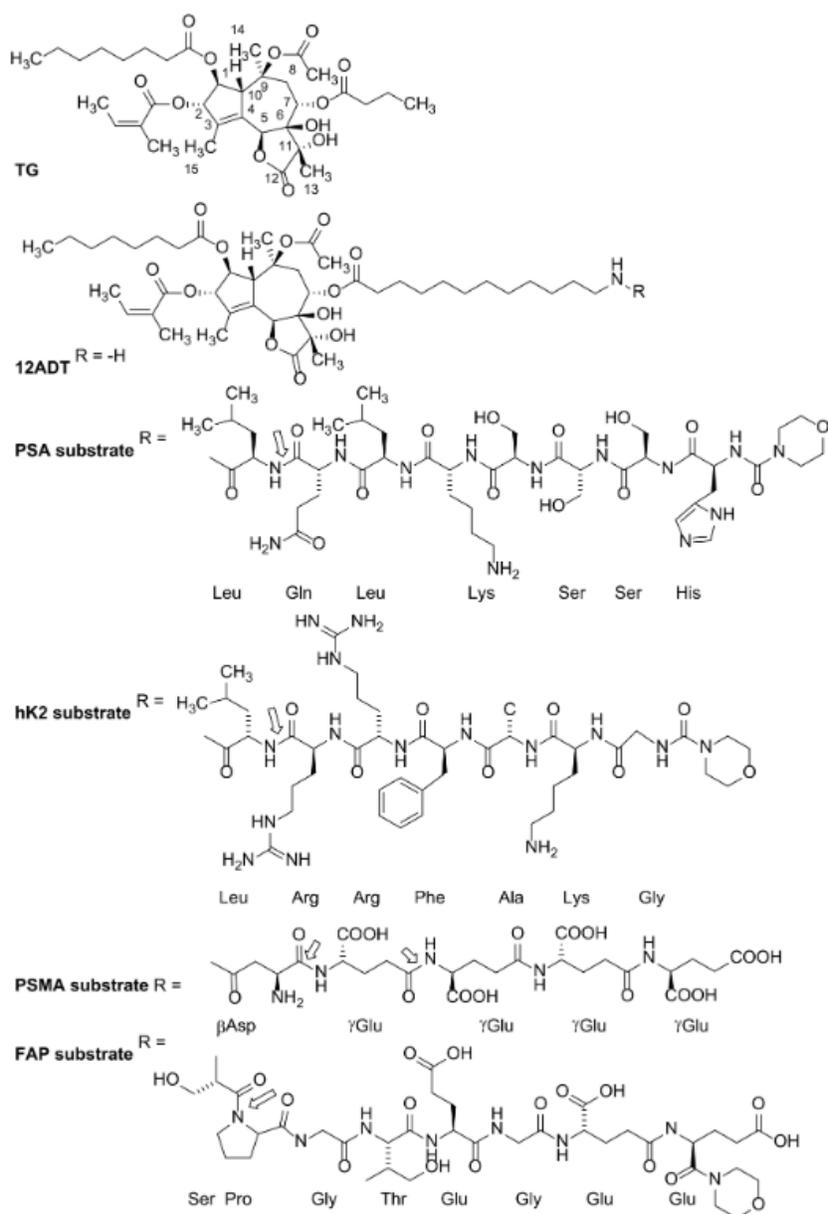


Figure 28 Structure de la thapsigargine, de son analogue 12ADT et des différentes chaînes peptidiques pouvant être introduites (figure issue de *Isaacs et al. (2021)*)

Le développement de ces analogues a historiquement été limité à cause des difficultés d’approvisionnement de la thapsigargine. Cependant, une étude récente a montré qu’il était possible d’obtenir ces analogues à partir d’une autre LST structurellement similaire et pouvant être isolée en quantités plus importantes : le trilobolide.^[114] En effet, *Zimmermann et al.* ont réussi à synthétiser l’analogue 12ADT à l’échelle du gramme *via* une stratégie à plusieurs étapes (**Figure 29**). Pour plus d’information, j’invite le lecteur à consulter leur publication. Dans le contexte de ce projet de thèse, nous verrons uniquement l’étape qui consiste à introduire la nouvelle chaîne ester, étant donné que les conditions utilisées dans cette étude un meilleur rendement pour cette réaction que d’autres études précédentes.

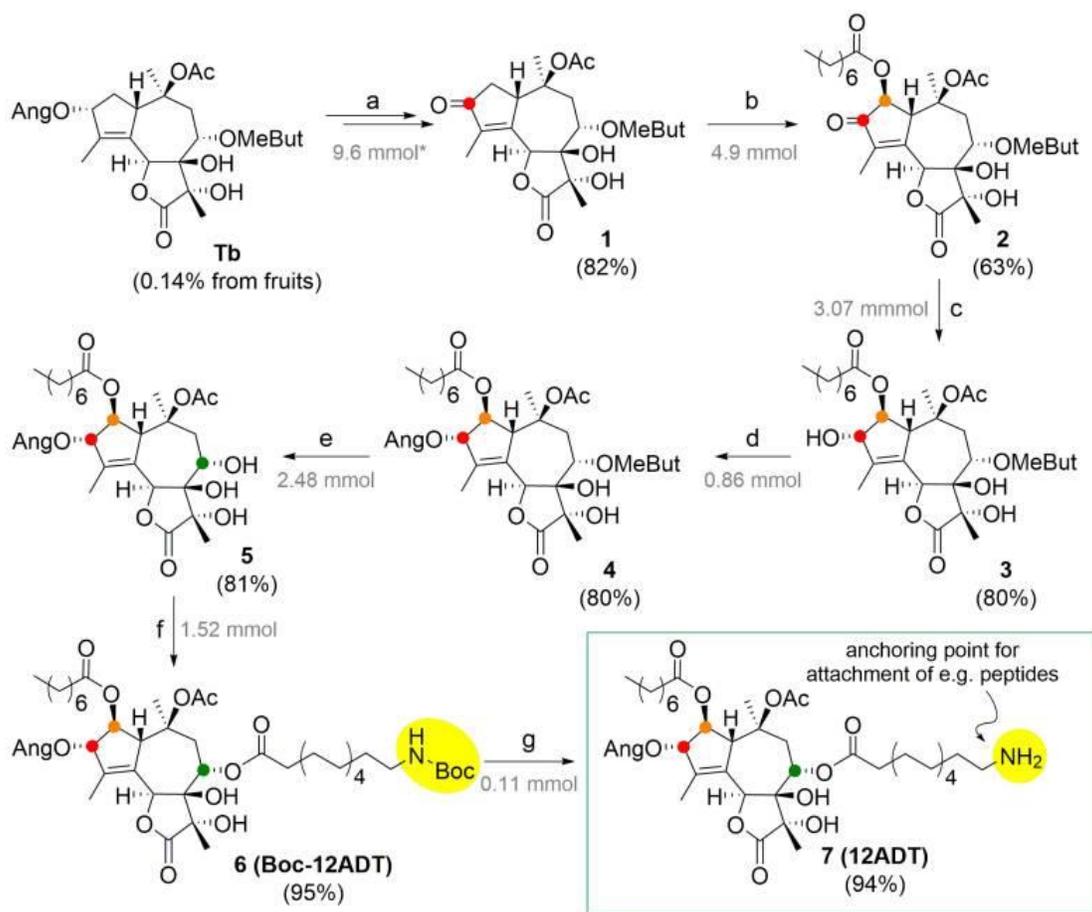


Figure 29 Synthèse de l'analogue 12ADT de la thapsigargine (figure de Zimmermann *et al.*(2020))

Concernant la synthèse, le passage de la thapsigargine (composé **4**) au 12ADT (composé **7**) a été réalisé via une stratégie en trois étapes réactionnelles : 1) l'hydrolyse de l'ester naturellement présent sur le carbone 8 pour former un alcool secondaire ; 2) l'estérification de cet alcool secondaire avec un acide aminé à 12 carbones muni d'un groupe protecteur ; 3) la déprotection de l'amine.

Dans la première étape, les auteurs ont rompu la liaison ester par une réaction de méthanolyse. Pour ce faire, la thapsigargine (1,65 g ou 2,48 mmol) est dissoute dans du méthanol à 0 °C, et environ 30 équivalents de triéthylamine sont ajoutés au mélange. La température est ensuite augmentée jusqu'à 20 °C et le mélange est agité pendant 21 heures. Finalement, une solution de KHSO₄ est ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne une valeur comprise entre 5 et 6. Une extraction liquide-liquide, suivie d'une purification sur colonne de silice, sont effectuées pour isoler le produit d'intérêt. Selon les auteurs, les conditions douces utilisées sont suffisamment sélectives pour cette fonction ester et permettent d'obtenir l'alcool souhaité avec un rendement de 81 %. Ceci suggère que la position 8 est plus réactive, les autres esters présents n'ayant pas été dégradés.

Une fois l'alcool (**5**) obtenu, il est soumis à une réaction d'estérification de Steglich avec de l'acide Boc-*N*-12-aminododécanoïque. Cette réaction est réalisée avec 1,5 équivalents d'acide carboxylique, 2 équivalents de l'agent de couplage EDC et 0,5 équivalents de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans du dichlorométhane anhydre à 15 °C sous atmosphère d'argon pendant 15 heures. Bien qu'une extraction

liquide-liquide et une purification sur colonne de silice soient nécessaires, la réaction est régiosélective et permet d'obtenir un rendement de 95 %. Dans ce cas, la sélectivité est due au fait que les autres alcools disponibles sont tertiaires et donc nettement moins réactifs. Enfin, le groupe amine est déprotégé de manière quantitative en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans du dichlorométhane, donnant un rendement de 94 % après purification sur colonne de silice.

En conclusion, cet exemple met en évidence l'intérêt marqué pour la synthèse d'analogues de la thapsigargine possédant des fonctions esters. En effet, l'optimisation d'une nouvelle méthodologie a permis d'atteindre de bons rendements dans la production de ces analogues. Cette avancée représente un progrès significatif dans la recherche de composés plus efficaces pour des applications dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, il convient de noter que cette approche nécessite plusieurs étapes réactionnelles et de purification par chromatographie, ce qui peut compliquer le processus de synthèse. De plus, ces réactions génèrent des sous-produits toxiques, posant des défis supplémentaires en termes de sécurité et d'impact environnemental. Des progrès sont donc encore nécessaires pour développer des méthodes de synthèse plus simples et plus sûres.

2.3.5. Synthèse chimio-enzymatique d'analogues du michéliolide

En 2019 le groupe de *Rudi Fasan* à l'université de Rochester (USA) a déposé un brevet sur la préparation d'analogues du michéliolide pour des applications en tant qu'agents anticancéreux et antiinflammatoires. Cette LST est connue pour avoir une bonne activité et sélectivité (*in vivo* et *in vitro*) contre différents types de cancer, particulièrement contre la leucémie (leucémie myéloïde et cellules souches leucémiques). De plus, ses propriétés physico-chimiques (e.g. stabilité, hydrosolubilité) et son profil pharmacocinétique *in vivo* en font une excellente structure de base pour le développement d'analogues semi-synthétiques.

La méthode employée repose sur un procédé chimio-enzymatique en deux étapes. Initialement, des enzymes mutantes de la famille des cytochromes P450 sont utilisées afin d'introduire des groupements hydroxyle sur les carbones numéro 14 et/ou numéro 2 du michéliolide, afin de former des fonctions alcool allyliques. Par la suite, la fonction alcool d'intérêt est estérifiée par voie chimique pour générer différents dérivés semi-synthétiques incluant des chaînes ester avec des groupements aromatiques (**Figure 30**).

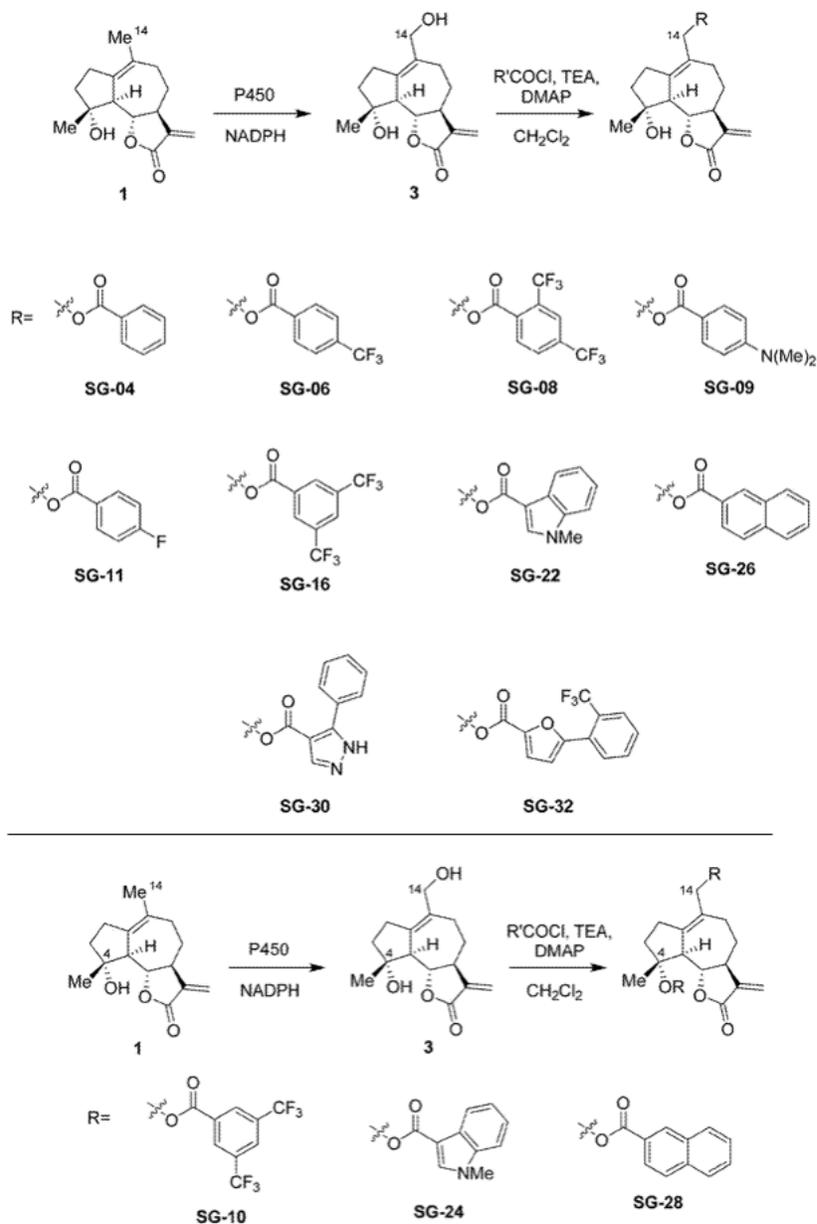


Figure 30 Illustration des dérivés sémi-synthétiques du michéliolide (figure de *Fasan et al.(2019)*)

En ce qui concerne la synthèse de ces dérivés, l'étape d'estérification est réalisée à partir de 30 mg de l'analogue hydroxylé du michéliolide, avec 5 équivalents du chlorure d'acyle correspondant et de triéthylamine, 1 équivalent de DMAP. Ces réactions sont effectuées dans du dichlorométhane anhydre et sous atmosphère inerte (argon) à une température allant de la température ambiante à 40 °C. Ces conditions requièrent une neutralisation du milieu basique (excès d'amines), suivie d'une extraction liquide-liquide, d'une étape de concentration sous pression réduite et, finalement, d'une étape de purification par chromatographie flash. Les rendements obtenus varient de 50 à 70 % lorsque l'alcool primaire est impliqué et sont inférieurs à 50 % pour les autres fonctions hydroxyles. De manière intéressante, lorsque le michéliolide utilisé présente deux fonctions alcools, un mélange des deux esters est obtenu. Cependant,

pour favoriser la formation d'un seul ester d'intérêt, les auteurs utilisent un seul équivalent du donneur d'acyle. Ceci montre que des problèmes de régiosélectivité sont présents dans cette réaction, en effet il peut être difficile de discriminer entre ces deux groupements alcool.

Dans une publication ultérieure traitant de la synthèse et de la relation structure-activité de ces analogues, les chercheurs ont démontré que l'intégration d'un groupement ester benzoyle portant un substituant CF₃ en position *para*, en position 2 ou 14 du squelette du michéliolide, augmentait de manière très significative l'activité antileucémique de la molécule. Curieusement, l'ajout d'un simple groupe ester benzoyle n'améliorait pas l'activité et pouvait même entraîner une réduction de celle-ci. Les auteurs ont donc montré que les esters aromatiques possédant un plus fort caractère lipophile entraînent un effet bénéfique sur l'activité anticancéreuse du composé.^[115]

2.4. Conclusion sur la synthèse de dérivés acylés

Nous avons vu que plusieurs LST présentent un intérêt pour le secteur de la santé. Les efforts visant à modifier les molécules de LST naturelles pour moduler leur réactivité ont mené à la synthèse et à l'évaluation biologique de divers esters semi-synthétiques. Ces travaux ont révélé que certaines chaînes ester jouent un rôle clé dans l'augmentation de l'activité biologique des LST, une propriété souvent associée à la lipophilie de la chaîne.

Les méthodes de synthèse les plus couramment utilisées dans ce contexte sont l'estérification de Steglich et l'emploi de donneurs d'acyle activés, tels que les anhydrides et les chlorures d'acyle. Dans ces processus, le DMAP (4-diméthylaminopyridine) ou d'autres bases aminées nucléophiles sont fréquemment utilisés pour améliorer les rendements. Cependant, dans la plupart des cas les rendements obtenus restent généralement modestes. De plus, lorsque la molécule d'origine présente plusieurs fonctions réactives (alcools primaires et secondaires), il peut être difficile d'obtenir une sélectivité lors de la réaction d'acylation. Finalement, une étape de purification par chromatographie est systématiquement employée de façon à obtenir une molécule suffisamment pure pour les tests biologiques, en éliminant les restes de réactifs toxiques.

IV. La biocatalyse au service de la synthèse d'esters de terpénoïdes

1. Utilisation d'hydrolases dans la synthèse de dérivés acyles de terpènes naturels

1.1. Contexte : l'avantage des enzymes dans le marché des esters de monoterpénoïdes

Les esters de monoterpènes sont couramment utilisés comme adjuvants aromatiques dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Une liste exhaustive de ces composés est reconnue comme sûre pour la consommation humaine par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et l'Union Européenne. ^[116,117] De plus, ces esters présentent souvent des propriétés physico-chimiques et caractéristiques aromatiques plus favorables que les alcools monoterpéniques, ce qui accroît la demande et l'intérêt pour ces produits. ^[118] Cependant, les esters naturels extraits de plantes sont souvent trop rares ou coûteux pour une utilisation commerciale. Dans le contexte industriel, ces arômes sont généralement obtenus par synthèse chimique, néanmoins, ils ne sont alors plus considérés comme des produits naturels ^[119]. Par conséquent, leur valeur marchande est moindre par rapport aux esters issus de sources naturelles. Au contraire, les esters produits par des méthodes enzymatiques peuvent être considérés comme 'naturels'. ^[116]

De plus, l'utilisation d'enzymes de la famille des hydrolases est particulièrement avantageuse dans ce contexte grâce à leur sélectivité, leur fonctionnement dans des conditions douces, et leur faible impact environnemental ^[120,121] Parmi les études décrivant l'utilisation d'hydrolases dans l'acylation d'alcools monoterpéniques, 95 % d'entre elles concernent des lipases, avec 79 % d'entre elles provenant de champignons. Entre 1969 et 2021, un total de 88 publications sur ce sujet ont été répertoriées dans la revue de *Staudt et al.*(2022).

1.2. Généralités sur les lipases

Les lipases (triacylglycerol hydrolases EC 3.1.1.3) sont des enzymes de la famille des hydrolases. D'un point de vue structurel, les lipases possèdent le repliement caractéristique des α/β hydrolases qui se caractérise par un noyau composé d'un feuillet α/β (avec 6 hélices α et 8 brins β). Elles possèdent également un site actif constitué d'une « triade catalytique » avec des résidus aspartate, histidine et sérine, cette dernière jouant un rôle de nucléophile. ^[122] Ce sont des enzymes omniprésentes chez les animaux, les plantes et la plupart des microorganismes, qui les utilisent dans des processus cataboliques (i.e. digestion, dégradation de molécules indésirables). Comme leur nom l'indique, les lipases ainsi que d'autres hydrolases sont capables de catalyser des réactions d'hydrolyse d'esters, ainsi que d'autres réactions avec des composés acylés (i.e. acides carboxyliques, halogénures d'acyle, esters, amides) et des nucléophiles (alcools, amines, thiols). ^[123] Les lipases sont couramment employées pour catalyser des nombreuses réactions en milieu aqueux ou dans des solvants organiques et pour contrôler les centres asymétriques d'une molécule ou d'un précurseur d'intérêt. Notamment dans la synthèse stéréosélective d'un seul isomère chiral à partir d'alcools ou d'esters racémiques *via* des réactions de transestérification ou d'hydrolyse. Cette même stratégie est également utilisée lorsqu'il s'agit d'amines ou d'amides *via* des réactions d'aminolyse ou d'amination. ^{[124] [125]} En effet, la structure tridimensionnelle au niveau du site actif des lipases leur confère une préférence pour un stéréoisomère du substrat, cette préférence dépend des substituants adjacents au groupement modifié. Ceci a été mis en évidence par Kazlauskas

dans le cas des alcools secondaires (**Figure 31**).^[126] Dans le cas d'un mélange racémique, c'est typiquement l'énantiomère *R* qui réagit plus rapidement pour donner l'ester correspondant (ou l'alcool dans des conditions d'hydrolyse).

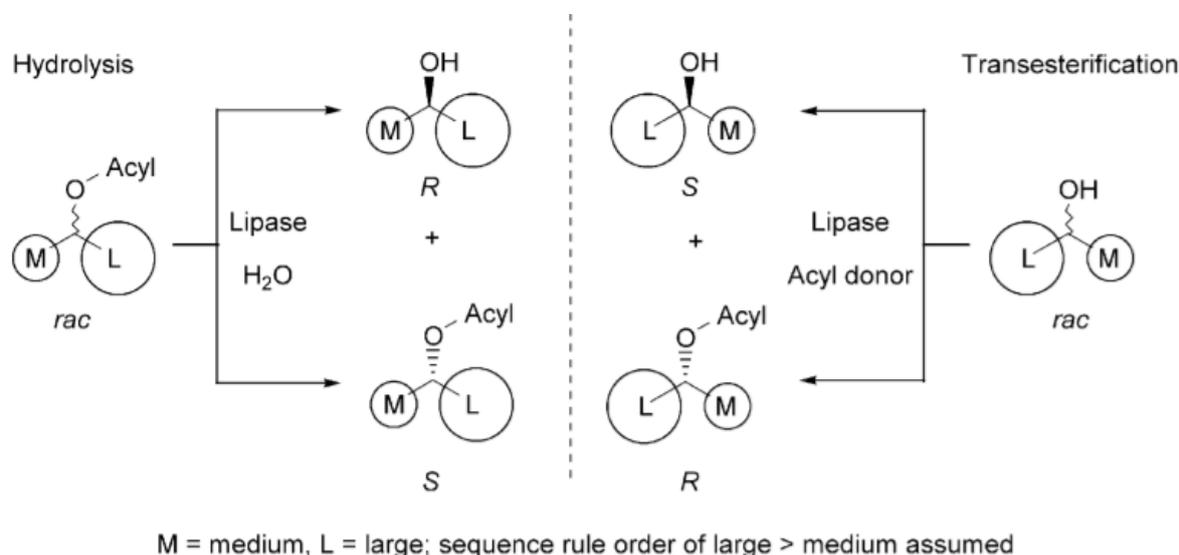


Figure 31 Règle de Kazlauskas pour les alcools et esters secondaires (figure de *Gotor-Fernandez et al.*(2006))

1.2.1. La lipase B de *Candida antarctica* : une lipase d'intérêt

L'acylation enzymatique des monoterpénoïdes décrites dans la littérature utilise principalement des lipases. En effet, ces enzymes tolèrent naturellement des milieux et des substrats hydrophobes, conditions qui s'appliquent parfaitement à la plupart de ces terpénoïdes. Parmi ces enzymes, la lipase B de *Candida antarctica* est l'une des plus utilisées dans la modification de ces molécules due à ses très bonnes performances et bonne versatilité par rapport à différents substrats et conditions réactionnelles. La CAL-B est principalement disponible sous forme immobilisée, notamment sous le nom de Novozym 435 (produit de Novozymes), or elle est aussi disponible dans différents conditionnements chez des fournisseurs tels que Sigma-Aldrich. Concernant la Novozym 435 (N435), il s'agit d'une CAL-B recombinante immobilisée via activation interfaciale sur une résine macroporeuse composée de polyméthyl méthacrylate couplée avec des groupements divinylbenzène (résine Lewatit VP OC 1600).^[127] Ce type d'immobilisation est particulièrement avantageuse car ces conditions permettent d'immobiliser uniquement la lipase sous forme active (monomérique et avec le couvercle ou 'lid' ouvert) par adsorption sur un support de nature hydrophobe. Par conséquent, la N435 possède typiquement une activité supérieure ainsi qu'une bonne résistance à différentes conditions réactionnelles (**Figure 32**).^[128]

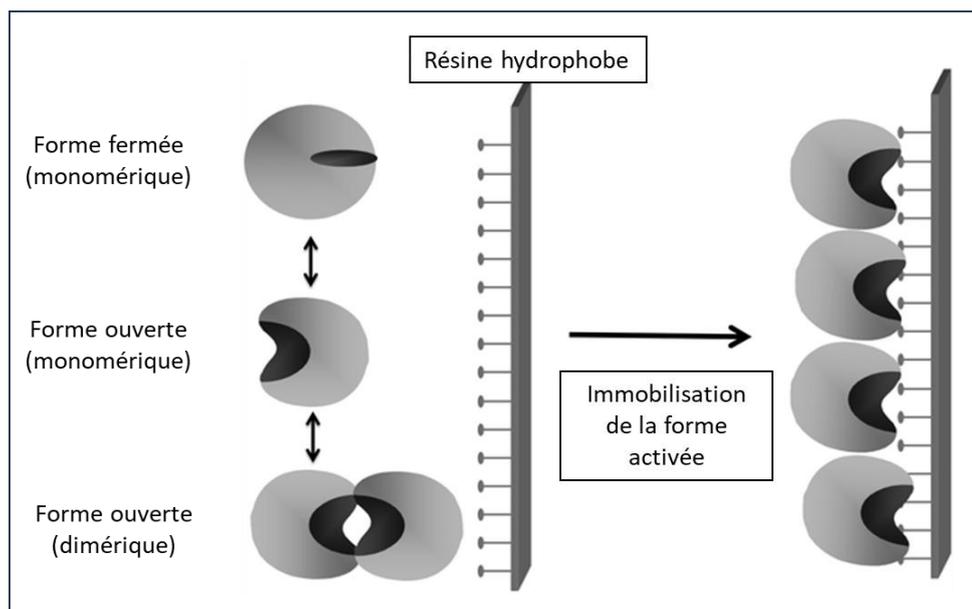


Figure 32 Illustration de l'immobilisation de la lipase par activation interfaciale retrouvée dans Novozym 435

1.2.2. Mécanisme catalytique des lipases dans des réactions de transestérification

Comme mentionné, ce travail de thèse est en majorité centré sur des réactions d'acylation. Pour faciliter la compréhension des réactions de transestérification catalysées par des lipases telles que la CAL-B, il est important d'avoir une vision globale du mécanisme de cette réaction (**Figure 33**).

Le mécanisme catalytique de la lipase repose sur la triade catalytique Asp-His-Ser. Dans ce système, le groupe carboxylate de l'acide aspartique forme une liaison hydrogène avec l'histidine, au même temps que l'azote de l'histidine est lié par une liaison hydrogène à l'alcool de la sérine. Cette liaison hydrogène avec la sérine contribue à augmenter la nucléophilie de cette dernière. Dans la première étape, l'oxygène de la sérine attaque le carbone carbonyle du substrat, au même temps que l'histidine retire l'hydrogène de l'alcool de la sérine, conduisant à la formation d'un premier état de transition tétraédrique. L'oxygène du groupement carbonyle du substrat récupère ainsi les électrons de la double liaison, formant un oxyanion. Cet oxyanion est stabilisé par des liaisons hydrogène avec les acides aminés voisins, notamment l'aspartate et l'histidine, organisés au sein d'une structure couramment appelée poche oxyanionique.

Dans l'étape suivante, les électrons de l'oxyanion sont réorientés vers le carbone tétraédrique, et le proton présent sur l'histidine est transféré à l'oxygène du groupement partant (OR^2), qui est alors libéré sous forme d'alcool. Au bout de cette étape, un intermédiaire acyl-enzyme avec la sérine catalytique est formé.

Lors de la troisième étape, l'intermédiaire acyl-enzyme réagit ensuite avec le substrat accepteur d'acyle (alcool si transestérification) formant un nouvel état de transition tétraédrique. Dans la quatrième étape, l'azote de l'histidine retire un hydrogène de l'accepteur d'acyle, et les électrons sont à nouveau réorientés vers le carbone tétraédrique, conduisant à la libération de l'ester d'intérêt. Enfin, l'oxygène de la sérine récupère l'hydrogène situé sur l'histidine, rétablissant ainsi le réseau de liaisons hydrogène initial. L'acide aspartique joue un rôle essentiel en attirant la charge positive de l'histidine lorsqu'elle est entièrement protonée.^[122,128-130]

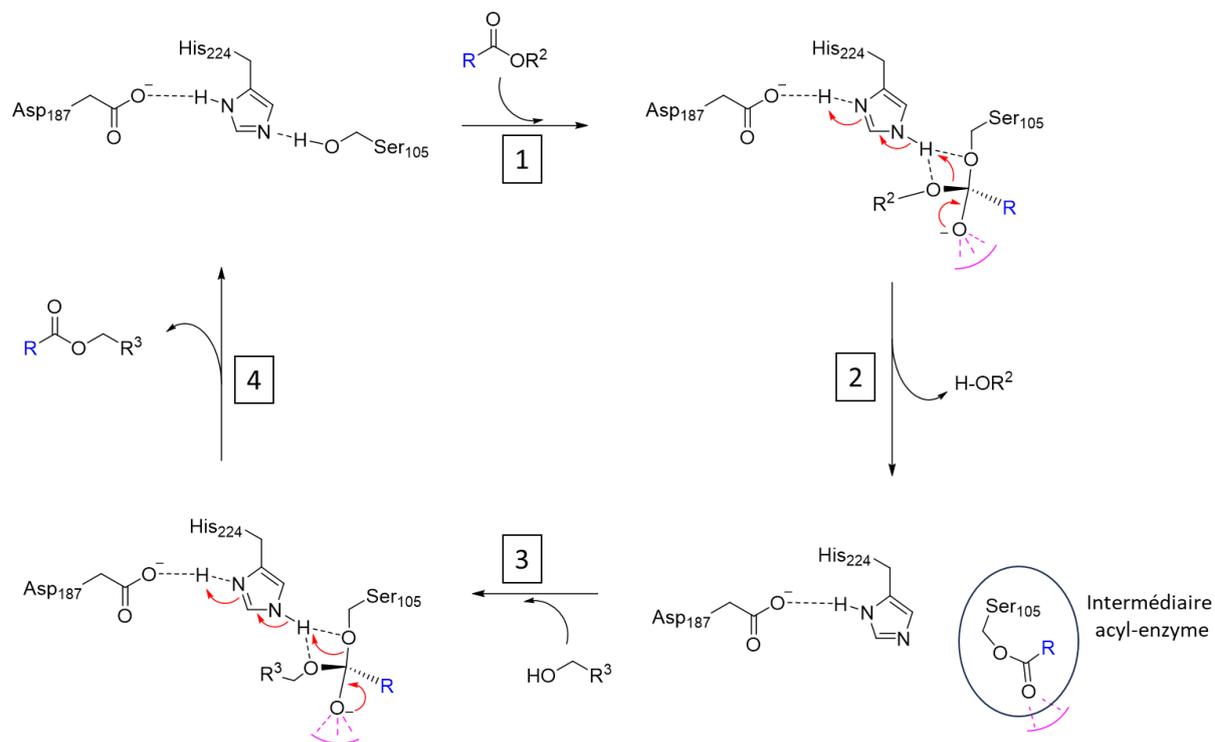


Figure 33 Représentation du cycle catalytique de CAL-B lors de la réaction d'acylation. Les flèches rouges représentent le mouvement d'électrons qui ont lieu lors du passage à la prochaine étape. Le groupement R en bleu représente la chaîne alkyle introduite

1.3.Synthèse d'esters de monoterpénoïdes pour des applications agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques

1.3.1. Principaux exemples de monoterpénoïdes utilisés dans ce contexte

Parmi les monoterpénoïdes ciblés, on retrouve principalement des monoterpénoïdes possédant des fonctions alcool primaire et secondaire, ainsi que quelques cas de terpénoïdes avec des alcools tertiaires, même si ceux derniers sont normalement peu réactifs (**Figure 34**).^[117]

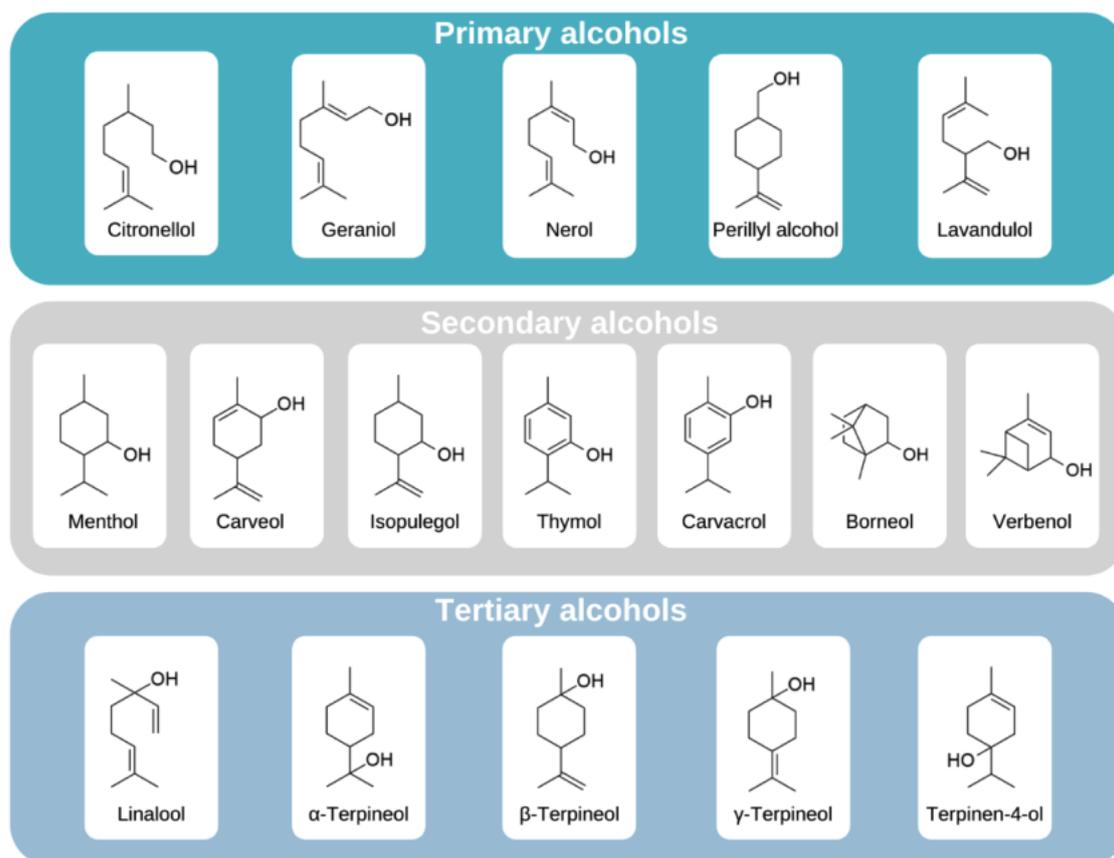


Figure 34 Principaux monoterpénoïdes d'intérêt ayant fait l'objet de réactions d'acylation enzymatiques catalysées par des hydrolases (figure de *Staudt et al.*(2022))

Le géraniol est celui qui comporte le plus d'exemples de réactions d'acylation biocatalytiques dans la littérature, ceci est en partie dû au fait que ses esters sont des produits d'intérêt pour l'industrie cosmétique. La revue de *Jiu et al.* répertorie les principales informations concernant ces réactions. Le géraniol est donc un bon exemple pour illustrer les nuances des réactions d'acylation des monoterpénoïdes catalysées par des lipases.^[116] Parmi les différentes lipases utilisées, on retrouve principalement les lipases immobilisées suivantes : la lipase B de *Candida antarctica* (CALB ou Novozym 435), la lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM), la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL) et la lipase de *Candida rugosa*. Dans la plupart des études, ces esters sont essentiellement produits par estérification avec différents acides carboxyliques (principalement aliphatiques) ou par transestérification, principalement avec des esters vinyliques tels que l'acétate de vinyle. Pour information, le **Tableau 6** récapitule l'ensemble des conditions décrites pour la synthèse d'esters du géraniol

1.3.2. Le choix des conditions réactionnelles

Le rendement et la performance, de manière générale, des réactions d'acylation catalysées par des lipases dépendent fortement des conditions réactionnelles utilisées. Parmi celles-ci, le donneur d'acyle, le solvant et la température sont des paramètres de grande importance.

- Le donneur d'acyle

Un des paramètres clés dans les réactions d'acylation catalysées par des lipases est le choix du donneur d'acyle, ainsi que le ratio donneur/accepteur.

Plusieurs types de donneurs d'acyle peuvent être utilisés dans des réactions d'acylation catalysées par des lipases. Parmi les plus couramment utilisés on retrouve les esters vinyliques (e.g. acétate de vinyle), les anhydrides, les esters méthyliques ou éthyliques et les acides carboxyliques. Pour tous ces donneurs, sauf les acides carboxyliques, la réaction catalysée par la lipase est une transestérification. Quelques avantages et inconvénients de ces donneurs sont résumés ci-dessous (**Tableau 5**). ^[131]

Tableau 5 Avantages et inconvénients des principaux donneurs d'acyle pour des réactions d'acylation d'alcools

Type de donneur	Avantages	Inconvénient
Acide carboxylique	Absence de sous-produits organiques Large choix de structures	Équilibre thermodynamique défavorable Acidification du milieu
Ester vinylique	Haute réactivité Réaction irréversible	Toxicité plus élevée Génération d'acétaldéhyde
Anhydride	Haute réactivité	Génération d'acide carboxylique Réaction chimique parasite
Ester méthylique/éthylique	Bonne réactivité	Génération d'alcool (méthanol ou éthanol)

Théoriquement, le ratio donneur/accepteur optimal pour un procédé d'acylation biocatalytique est de 1/1, à conditions qu'une conversion proche de 100 % puisse être obtenue. Néanmoins, cela est souvent difficile à atteindre due à des contraintes thermodynamiques. Dans la pratique, il est courant d'utiliser un excès de donneur d'acyle pour optimiser les rendements, typiquement 3-10 équivalents. ^[119,120,127,132-134] Cependant, lorsqu'on travaille avec un acide carboxylique, une concentration élevée peut s'avérer contre-productive. En effet, cette surconcentration peut acidifier le milieu, modifiant ainsi le pH de l'eau résiduelle entourant la lipase, ce qui peut perturber sa structure tridimensionnelle. Ce phénomène a été montré avec la lipase B de *Candida antarctica* dans une étude qui compare l'acide octanoïque et l'éthyle octanoate. ^[133] Par ailleurs, un excès d'accepteur, tel que l'alcool, peut également réduire l'activité enzymatique. Cette diminution est souvent attribuée aux interactions hydrophiles avec l'eau résiduelle de l'enzyme. La solvatation de ces résidus d'eau peut compromettre la réactivité de la lipase.

- Le solvant

Le principal rôle d'un solvant est de permettre aux réactifs d'atteindre le site actif de l'enzyme. Théoriquement, un bon solvant devrait donc être capable de solubiliser l'accepteur et le donneur d'acyle impliqués dans la réaction. Or, le solvant va également interagir avec la structure de la lipase et peut donc avoir un effet favorable ou défavorable sur l'efficacité de la réaction. Dans ce contexte, les solvants apolaires (e.g. alcanes) ont tendance à avoir un effet favorable et sont souvent privilégiés aux solvants

trop polaires (dont les alcools à chaîne courte). Ces derniers peuvent ‘stripper’/enlever les résidus d’eau nécessaires à l’activité enzymatique. ^[128,135–137] D’autres solvants que les alcanes sont également utilisés avec des lipases telles que la Novozym 435. On retrouve notamment l’acétonitrile, le tert-butyl méthyl ether, le tert-amyl alcool, et le toluène, ainsi que d’autres solvants plus ‘exotiques’ tels que les solvants eutectiques profonds (deep eutectic solvents) et du CO₂ supercritique. ^[127,133,135,138–140]

- La température

Les lipases, en tant que catalyseurs biologiques, présentent une activité optimale dans une plage de température spécifique, généralement proche des conditions physiologiques de l’organisme duquel elles sont originaires. Une température trop basse peut ralentir la réaction en diminuant l’énergie cinétique des molécules et en réduisant l’activité de l’enzyme. À l’inverse, une température trop élevée peut entraîner une dénaturation de la structure protéique de la lipase, ce qui peut réduire son efficacité catalytique ou même l’inactiver complètement.

De manière générale, les lipases possèdent une activité convenable dans une plage de température allant de 25°C– 60 °C. Or, un nombre de lipases commerciales, typiquement issues de champignons, peuvent tolérer des températures plus élevées pouvant dépasser les 70 °C. C’est notamment le cas des lipases de *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus oryzae* et *Rhizomucor miehei*. Toutefois, la température optimale dépend du solvant utilisée et varie d’une réaction à l’autre. ^[135,141,142]

Concernant l’acylation de terpènes l’utilisation de la Novozym 435 (CAL-B immobilisée) dans la synthèse d’esters du géraniol permet d’obtenir des bons rendements avec une température entre 30- 50 °C. ^[116] En outre, lorsqu’il s’agit de composés plus complexes, telles que les LST, il est convenable de d’éviter des températures trop élevées afin de prévenir la dégradation de ces molécules.

Tableau 6 Bilan des conditions réactionnelles utilisés dans la synthèse d'esters du géranol catalysée par des lipases (tableau adapté à partir de *Liu et al.(2022)*)

Acyl donor	Molar ratio acceptor:donor	Enzyme	Enzyme amount	Solvent	Temperature °C	Time	Conversion	Ref.
Acetic acid	01:01	Novozym 435	2.2 mg/cm ₃	sc-ethane	40	10 h	98%	Peres et al. (2003)
Acetic acid	02:01	Immobilized <i>Candida cylindracea</i> lipase	100mg	n-hexane	35	24 h	95%	Chen et al. (2002)
Acetic acid	01:01	Novozym 435	2.15mg/mL	n-hexane	30	12 h	94%	Bartling et al. (2001)
Acetic acid	01:01	<i>Bacillus cereus</i> MTCC 8372 lipase	25mg/mL	n-nonane	55	15 h	84%	Verma & Kanwar (2008)
Acetic acid	01:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B	10.4mg	isooctane	37	120 h	83%	Trusek-Holownia & Noworoyta (2007)
Acetic acid	01:01	<i>Bacillus cereus</i> MTCC 8372 lipase	25mg/mL	n-octane	55	15 h	83%	Verma & Kanwar (2008)
Acetic acid	01:01	<i>Bacillus cereus</i> MTCC 8372 lipase	25mg/mL	n-heptane	55	15 h	82%	Verma & Kanwar (2008)
Acetic acid	03:02	Novozym 435	20mg	[C ₁₆ TMA][NTF ₂]	50	14 h	80%	Lozano et al. (2012)
Acetic acid	01:01	Novozym 435	2.2 mg/cm ₃	sc-CO ₂	40	10 h	73%	Peres et al. (2003)
Acetic acid	02:01	<i>Candida cylindracea</i> lipase	100mg	n-hexane	35	24 h	15%	Chen et al. (2002)
Butyric acid	1:2.5	Immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase	500mg	isooctane	30	48 h	100%	Damjanović et al. (2012)
Butyric acid	04:01	Immobilized <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC-4713	20mg	n-heptane	65	15 h	99%	Kanwar et al. (2008)
Butyric acid	03:01	Novozym 435	5wt%	Solvent-free	40	1 h	97%	Sbardelotto et al. (2018)
Butyric acid	05:01	Novozym NZL-102-LYO-HQ	5wt%	Solvent-free	70	1 h	95%	Sbardelotto et al. (2018)
Butyric acid	03:02	Immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase	3g/dm ₃	isooctane	25	16 h	94%	Knežević-Jugović et al. (2008)
Butyric acid	1.5:1	Immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase	10mg/mL	n-heptane	40	3.5–4 h	91%	Wang et al. (2019)
Cinnamic acid	03:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> NS88011	15wt%	n-heptane	70	2 h	76%	Zanetti et al. (2017)
Ethyl acetate	150 mg geraniol in 1 mL	Novozym 435	50mg	Solvent-free	50	1 h	90%	Adarme et al. (2018)
Ethyl acetate	150 mg geraniol in 1 mL	<i>Candida antarctica</i> lipase B-EPOA	50mg	Solvent-free	50	1 h	90%	Adarme et al. (2018)
Ethyl acetate	150 mg geraniol in 1 mL	<i>Candida antarctica</i> lipase B-EPOB	50mg	Solvent-free	50	1 h	89%	Adarme et al. (2018)
Ethyl acetate	01:05	Immobilized <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	6%w/w	n-heptane	55	6 h	82%	Kirdi et al. (2016)
Ethyl acetate	150 mg geraniol in 1 mL	Lipozyme RM IM	50mg	Solvent-free	50	1 h	74%	Adarme et al. (2018)
Ethyl cinnamate	02:01	Novozym 435	60mg	n-heptane	65	6 h	88%	Shinde & Yadav (2015)
Ethyl cinnamate	02:01	Lipozyme RM IM	60mg	n-heptane	65	6 h	8%	Shinde & Yadav (2015)
Ethyl cinnamate	02:01	Lipozyme TL IM	60mg	n-heptane	65	6 h	3%	Shinde & Yadav (2015)
Lauric acid	01:01	Novozym 435	3%w/w	n-hexane	35	1 h	99%	da Silva Corrêa et al. (2020)
Lauric acid	01:01	Lipozyme TL IM	3%w/w	n-hexane	35	1 h	89%	da Silva Corrêa et al. (2020)
Oleic acid	03:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B	10wt%	Solvent-free	50	6 h	93%	Chiaradia et al. (2016)
Oleic acid	05:01	Novozym 435	10wt%	Solvent-free	45	6 h	93%	Paroul et al. (2011)
Oleic acid	01:01	Novozym 435	3%w/w	n-hexane	35	1 h	91%	da Silva Corrêa et al. (2020)
Oleic acid	01:01	Lipozyme TL IM	3%w/w	n-hexane	35	1 h	47%	da Silva Corrêa et al. (2020)
Propionic acid	01:01	Novozym 435	10wt%	Solvent-free	70	6 h	97%	Paroul et al. (2012)
Propionic acid	05:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B	5w/v%	Solvent-free	60	24 h	96%	Nicoletti et al. (2015)
Propionic acid	01:01	Novozym 435	100mg	n-heptane	70	0.25 h	88%	Salvi et al. (2018)
Propionic acid	05:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B	5w/v%	Solvent-free	60	24 h	84%	Nicoletti et al. (2015)
Propionic acid	03:01	Novozym 435	10wt%	Solvent-free	40	6 h	83%	Paroul et al. (2011)
Propionic acid	03:01	Immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase B	10wt%	Solvent-free	50	6 h	82%	Chiaradia et al. (2016)
Propionic acid	01:01	Lipozyme RM IM	100mg	n-heptane	70	0.25 h	68%	Salvi et al. (2018)
Propionic acid	05:01	Immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase	5mg/mL	n-heptane	55	6 h	51%	Chiaradia et al. (2016)
Propionic acid	3.28:1	Immobilized <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	13.5wt%	Solvent-free	38	10.2 h	50%	Isah et al. (2017)
Propionic acid	01:01	Lipozyme TL IM	100mg	n-heptane	70	0.25 h	35%	Salvi et al. (2018)
Propionic acid	05:01	<i>Candida rugosa</i> lipase	10mg/mL	n-heptane	40	6 h	25%	Chiaradia et al. (2016)
Vinyl acetate	01:03	Immobilized <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	300mg	n-hexane	50	6 h	99%	Yildirim et al. (2019)
Vinyl acetate	01:03	Immobilized <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	100mg	n-hexane	50	4 h	99%	Yildirim et al. (2019)
Vinyl acetate	01:05	Novozym 435	10mg	n-heptane	55	1 h	96%	Yadav & Kamble (2018)
Vinyl acetate	01:04	Immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase	50mg	n-hexane	40	6 h	94%	Patel et al. (2016)
Vinyl acetate	01:05	Immobilized <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	50mg	n-hexane	45	15 h	93%	Gupta et al. (2013)

1.4.Synthèse d'esters de lactones sesquiterpéniques

Nous avons vu que les études décrivant l'utilisation d'hydrolases, en particulier des lipases, dans la synthèse d'esters de monoterpénoïdes sont nombreuses. Dans le chapitre précédent, nous avons également constaté que la synthèse d'esters semi-synthétiques de lactones sesquiterpéniques (LST) présente un intérêt notable. Cependant, quasiment aucun article dans la littérature décrit la synthèse d'esters de LST par voie biocatalytique. Ceci pourrait s'expliquer pour plusieurs raisons. D'une part, les LST sont des terpènes moins courants, généralement disponibles en quantités inférieures par rapport aux monoterpènes. En conséquence, la majorité des publications sur les LST se concentrent sur leur découverte et l'évaluation des propriétés biologiques des molécules naturelles. Bien que de nombreuses études aient mis en évidence le potentiel de ces molécules, leur marché d'application, notamment dans l'industrie pharmaceutique, ne s'est pas encore développé. En effet, les études explorant la synthèse de nouveaux analogues semi-synthétiques impliquant l'introduction d'une fonction ester sont réalisées à échelle de laboratoire et avec des méthodologies d'acylation éprouvées. Néanmoins, ces méthodologies présentent des inconvénients, tels que la formation de sous-produits toxiques ou indésirables, des rendements parfois modestes et une discrimination insuffisante entre différentes fonctions réactives. L'utilisation d'enzymes, telles que des lipases, pourrait offrir des solutions à ces problèmes et représenter une alternative attractive, comme cela a été le cas pour la synthèse d'esters de monoterpènes.

La publication de Monsalve et al. (2009) présente l'un des seules études véritablement pertinentes dans le contexte de l'acylation des LST par voie enzymatique. Les chercheurs ont employé des lipases pour la synthèse régiosélective de dérivés acylés de la cnicine, un germacranolide issu des plantes du genre *Centaurea* (famille des Astéracées). L'approche adoptée pour cette LST est d'autant plus intéressante qu'elle comporte plusieurs fonctions alcool, dont deux primaires et une secondaire, une chaîne ester et le cycle lactone caractéristique de ces molécules, des caractéristiques semblables à celles des LST visées dans notre projet. Les auteurs ont démontré qu'il était possible de modifier sélectivement cette molécule en fonction des conditions réactionnelles (**Figure 35**).

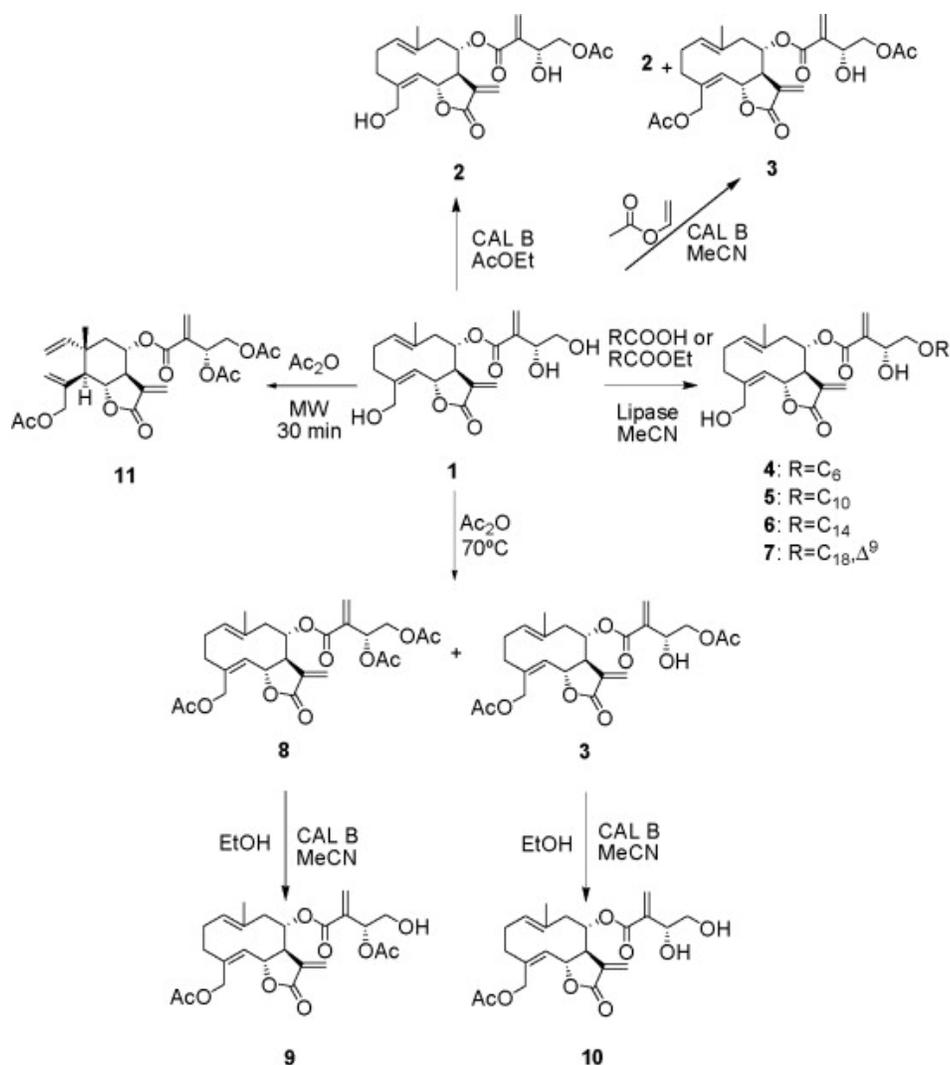


Figure 35 Bilan des réactions décrites dans l'étude d'acylation de la Cnicine (figure de *Monsalve et al.*(2009))

Initialement, différentes lipases ont été testées pour des réactions d'acétylation, menant aux observations suivantes (**Tableau 7**) :

- La CAL-B présente les meilleures performances en termes de rendement, indépendamment des conditions.
- Sauf exception, seule la fonction alcool primaire située à l'extrémité de la chaîne est acétylée (produit 2 de la **Figure 35**), cette fonction étant potentiellement la plus accessible du point de vue stérique.
- Les meilleurs rendements sont obtenus avec la CAL-B en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant réactionnel (et donc en très large excès), l'acétate d'isopropényle (donneur irréversible) dans l'acétonitrile et l'acétate de vinyle (donneur irréversible) également dans l'acétonitrile. Cependant, avec ce dernier, l'autre fonction alcool primaire réagit également, résultant en un mélange lorsqu'un grand excès (plus de 7800 équivalents) d'acétate de vinyle est utilisé.

Tableau 7 Tableau récapitulatif de l'acétylation enzymatique de la cnicine (d'après *Monsalve et al.(2009)*).
 Acronymes : CAL-A (lipase A de *Candida antarctica* immobilisée), CAL-B (lipase B de *Candida antarctica* immobilisée), CRL (lipase de *Candida rugosa*), LIP-RM (lipase de *Rhizmucor miehei* immobilisée), PPL (lipase de pancréas de porc), PSL (lipase de *Pseudomonas*), AcOEt (acétate d'éthyle), ACN (acétonitrile), DIPE (diisopropyl ether)

Enzyme	Donneur d'acyle	Solvant	Temps (h)	% de conversion pour produit 2	
				33 °C	55 °C
CAL A	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	20	22
CAL B	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	43	97
CRL	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	23	29
LIP-RM	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	13	17
PPL	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	9	9
PSL	Acétate d'éthyle	AcOEt	36	34	64
CAL B	Acétate d'isopropényle	ACN	24	–	95
PSL	Acétate d'isopropényle	ACN	24	–	84
CAL B	Acétate de vinyle	Acétone	24	–	82
PSL	Acétate de vinyle	Acétone	24	–	80
CAL B	Acétate de vinyle	MeCN	24	–	81 % de 2 + 17 % de 3
CAL B	Acétate de vinyle	DIPE	24	–	16

De plus, il a été démontré que l'acylation par voie chimique, en l'absence d'enzyme, avec l'anhydride acétique conduisait à un mélange de plusieurs produits résultant de l'acylation de toutes les fonctions alcool de la molécule. En effet, l'utilisation de la voie chimique classique ne permet pas d'obtenir de régiosélectivité dans cette réaction. L'utilisation des microondes et d'une température plus élevée, avec l'objectif d'obtenir uniquement le produit complètement acylé, a conduit à une dégradation de la LST. D'après les auteurs, cette molécule serait également sensible à la pyridine et d'autres agents couramment utilisés dans les réactions d'acylation chimiques.

En outre, la CAL-B a également été testée pour la dégradation des esters acétiques formés précédemment *via* une réaction d'alkoolyse (coupure de l'ester en présence d'éthanol). Ces expériences ont montré que seul l'ester acétique présent en bout de chaîne était dégradé par l'enzyme, et que ni la chaîne ester naturellement

présente dans la molécule ni le cycle lactone n'étaient affectés dans ces conditions, démontrant ainsi la sélectivité de l'enzyme dans ce contexte.

À la suite de ces premières expériences, les chercheurs ont utilisé d'autres donneurs d'acyle avec des chaînes aliphatiques. Pour cela, les acides hexanoïque, décanoïque, tétradécénoïque (myristique), oléique, ainsi que leurs esters éthyliques correspondants ont été testés avec la CAL-B dans l'acétonitrile. Ces réactions ont été réalisées avec 40 mg (4,4 mM) de LST, 2 équivalents de donneur d'acyle et environ 238 mg (1500 unités) de CAL-B immobilisée dans 25 mL d'acétonitrile. Les réactions, initialement effectuées à 55 °C, ont atteint une conversion maximale de 61 % avec l'acide hexanoïque, mais les auteurs ont remarqué que des temps de réaction plus longs conduisaient à une dégradation de la LST. Pour cette raison, ils ont décidé de tester une température de 10 °C avec des temps de réaction beaucoup plus longs. Cette deuxième expérience a conduit à des conversions allant de 35 % (ethyl décanoate) à 72 % (acide hexanoïque). D'après leurs résultats, on peut remarquer une meilleure activité des acides carboxyliques par rapport aux esters éthyliques, ainsi qu'une légère préférence pour les chaînes plus courtes et flexibles (hexanoïque vs oléique).

La synthèse d'esters de LST par voie biocatalytique, en particulier l'utilisation de lipases pour des réactions d'acétylation régiosélectives, présente une approche prometteuse pour le développement de nouveaux dérivés de LST avec des propriétés améliorées. Comme le montre les travaux de *Monsalve et al.* l'utilisation de lipases, et particulièrement la CAL-B, est une approche efficace et bien plus sélective que les approches chimiques traditionnelles. Ce type d'approche peut donc donner accès à des nouveaux dérivés de LST avec des propriétés intéressantes n'ayant pas été explorés précédemment. En outre, les travaux futurs pourraient se concentrer sur l'optimisation des conditions réactionnelles pour maximiser les rendements et minimiser la dégradation des LST, tout en explorant de nouvelles voies pour la synthèse d'esters avec des chaînes variées. Notamment, la réalisation de ces réactions dans des plus petits volumes et avec une concentration plus importante de LST à des températures adaptées serait une piste intéressante. De même, des efforts pour réduire la quantité d'enzyme utilisée (ici entre 280 et 400 mg) contribueraient à réduire le cout associé au procédé.

Résultats et discussions

Préambule

En parallèle de mon projet de thèse, une autre thèse « jumelle » a été lancée. Celle-ci, réalisée par Mme. Francesca Ruggieri, avait différents objectifs dont l'un était de mettre au point l'extraction ciblée et efficace des principales lactones sesquiterpéniques de la racine de chicorée cultivée dans la région. Ces molécules devant d'une part servir de substrat de départ pour les essais de ma thèse, mais également et surtout, de précurseurs pour la synthèse organique de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Ce second objectif était d'ailleurs l'objectif principal de cette thèse jumelle, laquelle est notamment supervisée par le Pr. Nicolas Willand (faculté de pharmacie de Lille), qui s'intéresse à la synthèse de ce type de nouveaux composés dans la recherche de nouveaux antibiotiques. En effet, comme évoqué dans l'étude bibliographique, la modification structurelle des terpènes suscite l'intérêt des industries pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire. Certaines modifications peuvent effectivement altérer leurs propriétés biologiques et/ou physico-chimiques de façon avantageuse. Bien que les LST de la chicorée aient montré des propriétés biologiques prometteuses, comme leur action antimicrobienne, des études sur leurs dérivés semi-synthétiques sont quasiment inexistantes dans la littérature, principalement en raison des défis associés à l'extraction des molécules.

Lorsqu'on regarde la structure des principales LST retrouvées dans la chicorée, on s'aperçoit ainsi que l'ensemble de ces molécules partagent plusieurs fonctions chimiques susceptibles d'être modifiées par voie enzymatique. Parmi celles-ci, les motifs portant des fonctions alcool sont très largement représentés, non seulement chez les LST, mais sur l'ensemble des terpénoïdes. Or, nous avons vu dans la littérature que l'acylation de certaines fonctions alcool chez ce type de composés peut être une stratégie intéressante. Dans le cas des monoterpènes, l'utilisation de lipases dans la synthèse d'esters a déjà fait ses preuves. Or, pour les LST, cette approche reste encore largement inexplorée.

Dans le cadre de ce projet, nous avons donc décidé de nous focaliser principalement sur l'acylation des LST par voie enzymatique. Or, compte tenu des faibles quantités de LST à notre disposition, particulièrement au début du projet, nous avons opté par travailler dans un premier temps avec des terpènes plus simples, pouvant servir de modèle pour tester des réactions et sélectionner les enzymes à mettre en œuvre par la suite. L'idée étant de mettre en place des méthodes enzymatiques sur des modèles simples et d'essayer de les extrapoler par la suite aux substrats plus complexes. Dans cette optique, nous avons d'abord exploré ces réactions sur des monoterpénoïdes modèles, en nous inspirant des études décrites dans la littérature. Par la suite, ces réactions ont été extrapolées aux 4 LST majoritaires de la chicorée nous servant de cible pour cette étude : la 11 β ,13-dihydrolactucine (DHLc), la lactucine (Lc), la lactucopicrine (Lp) et la 11 β ,13-dihydrolactucipicine (DHLp). Finalement, comme nous aurons l'occasion de l'évoquer tout à la fin de cette partie, nous avons également tenté de transposer cette même méthode enzymatique à la modification d'un extrait de racine riche en LST.

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, je vous présenterai l'utilisation d'autres familles d'enzymes dans le but de modifier nos composés d'intérêt. Parmi celles-ci, nous avons principalement étudié l'action d'enzymes de la famille des alcool déshydrogénases et des transaminases. La première famille vise toujours à fonctionnaliser/modifier la fonction alcool des terpènes, notamment afin de pouvoir la transformer en carbonyle. Ce dernier pourrait être en effet pris en charge par une transaminase afin d'introduire une fonction amine sur la molécule, donnant lieu à une nouvelle famille de dérivés avec des potentielles activités biologiques pouvant être valorisées dans un futur.

Chapitre 1 : Utilisation de lipases dans l'acylation de monoterpénoïdes

I. Criblage et introduction de chaînes aliphatiques

1. Introduction

Le but de cette partie du projet était de mettre au point des réactions sur des monoterpènes simples qui pourraient ensuite être réalisées sur des molécules terpéniques plus complexes et disponibles en très faible quantité, comme les lactones sesquiterpéniques retrouvées dans la racine de chicorée. Les premières réactions décrites dans ce manuscrit concernent le monoterpénoïde géraniol. Celui-ci appartient à la classe des monoterpénoïdes linéaires et est couramment utilisé comme ingrédient cosmétique, notamment sous forme d'acétate de géranyle. L'utilisation de lipases dans la synthèse de ce dernier est quelque chose qui a été explorée plusieurs fois dans la littérature.^[116,143,144] Il s'agissait donc d'un substrat judicieux pour valider l'activité des lipases qui nous intéressaient (**Figure 36**).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'acylation d'un autre monoterpénoïde : l'alcool périllique (**Figure 36**). Contrairement à d'autres monoterpénoïdes plus connus tels que le menthol, le géraniol et le bornéol, l'utilisation de lipases dans la synthèse de dérivés de l'alcool périllique a été très peu explorée jusqu'à présent. Seuls Xanthakis et collaborateurs ont exploré la possibilité de synthétiser des esters hydrophobes de l'alcool périllique (propionate, decanoate et hexadecanoate) en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) immobilisée (Novozym 435).^[145] L'alcool périllique (POH) est un monoterpénoïde cyclique dérivé du D-limonene qui a été identifié initialement dans la plante *Perilla frutescens*. Il est également retrouvé dans des huiles essentielles de diverses plantes telles que la menthe poivrée, la menthe verte, la sauge, la citronnelle, le lavandin, la bergamote sauvage, le gingergrass, la sabine, le carvi, les graines de céleri, les cerises et les canneberges (ou airelles).^[146] Le POH présente certaines similarités structurales avec les lactones sesquiterpéniques de la chicorée, principalement la présence d'une fonction alcool primaire allylique au niveau d'un motif cyclique. Celui-ci est également disponible dans le commerce à des prix abordables (9 euros/g chez Sigma-Aldrich) et ne présente aucune toxicité particulière. De plus, il n'est pas un composé hautement volatil (BP = 241.2 ± 19.0 °C à 760 mmHg ; pression de vapeur : 0.0 ± 1.1 mmHg à 25 °C), sa manipulation ne présente donc pas des contraintes particulières.

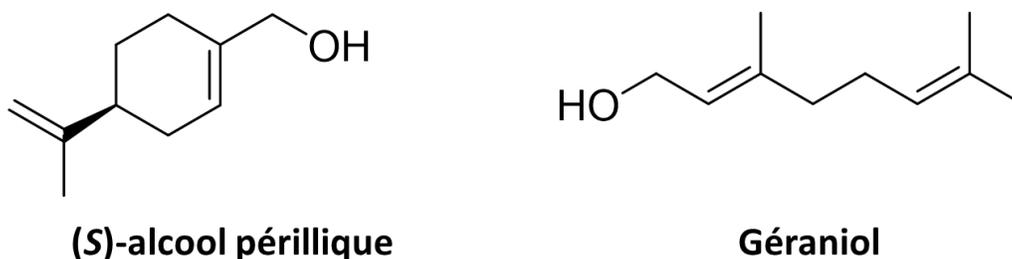


Figure 36 Structure de l'alcool périllique et du géraniol

2. Acylation du géraniol et investigation d'une lipase végétale de la patate douce

La première enzyme à laquelle nous nous sommes intéressés était une hydrolase dite 'lipase-like' de la famille GDSL identifiée chez la patate douce *Ipomoea batatas* (lipase Vg), chez laquelle elle s'est avérée être impliquée dans la synthèse de l'acide 3,5-dicaffeoylquinique (**Figure 37**). Cette enzyme nous a été fournie par le Pr Frédéric Bourgaud de Plant Advance Technologies dans le cadre un projet collaboratif avec le Pr Jean-Louis Hilbert de notre laboratoire (UMRt BioEcoAgro).

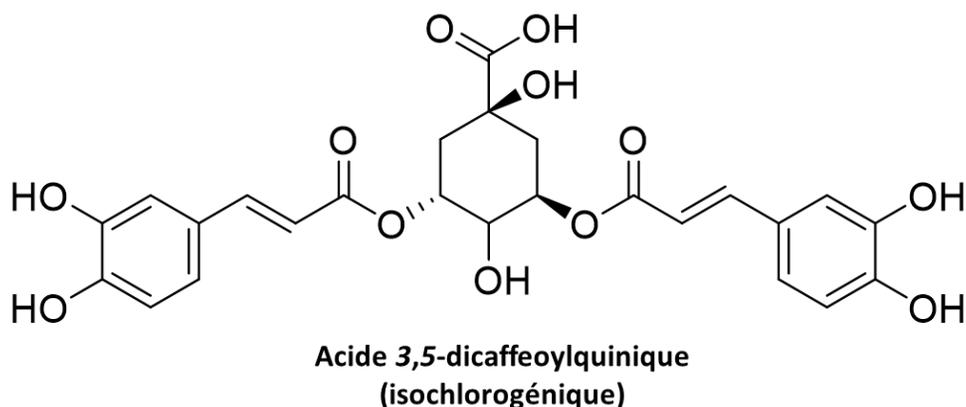


Figure 37 Structure de l'acide isochlorogénique

L'autre lipase que nous avons testée dans ce contexte est la lipase *Rhizomucor miehei*. Contrairement à la précédente, il s'agit d'une lipase commerciale connue pour être capable de réaliser des réactions d'acylation sur des terpénoïdes et sur d'autres molécules naturelles.^[147] Puisqu'il s'agit aussi d'une lipase non immobilisée, elle nous a servi de base de comparaison pour la lipase végétale. Nous aurions également souhaité comparer la CAL-B immobilisée (Novozym 435) à sa forme soluble (non immobilisée), cependant, en partie pour des raisons budgétaires, nous n'avons pas été en mesure de justifier l'achat de cette lipase dans le contexte de ce projet.

Avant de procéder aux réactions, nous avons tout d'abord caractérisé la lipase végétale de *Ipomoea batatas* qui nous a été fournie. Dans un premier temps nous avons déterminé une concentration en protéines de $0,23 \pm 0,02$ mg/mL par la méthode de Bradford, à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée en parallèle avec de l'albumine de bœuf (BSA) dans des concentrations allant de 0,1 – 1 mg/mL.

Ensuite, nous avons vérifié que cette enzyme était active en mesurant son activité spécifique dans le sens de l'hydrolyse, avec un substrat couramment utilisé dans les méthodes spectrophotométriques : le *p*-nitrophényl butyrate (*p*-NPB). Dans les conditions standards du test, la formation du *p*-nitrophénol suite à l'hydrolyse du substrat peut être suivie efficacement *via* l'augmentation de l'absorbance de la solution à 400 nm (**Figure 38**).

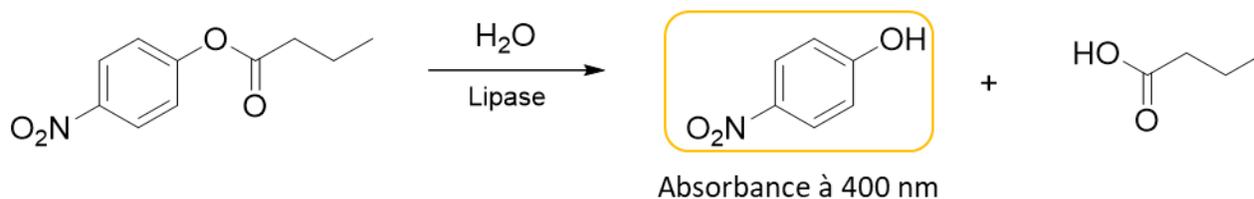


Figure 38 Principe du test d'activité des lipases basé sur l'hydrolyse du *para*-nitrophenyl butyrate

Pour ce test réalisé en triplicat dans une microplaque de 96 puits, nous avons testé des dilutions à 1/50^{ème} et 1/100^{ème} de l'extrait de la lipase Vg, cependant leur activité était trop faible pour être mesuré précisément. L'activité spécifique a donc été mesurée avec l'extrait non-dilué (20 µL = 4,6 µg de protéines par puits), en la comparant avec un témoin en absence d'enzyme et un témoin en absence de *p*-NPB mais avec la même quantité d'enzyme. Ces conditions ont donné une activité spécifique d'environ 73 mU/mg de protéines Concernant les témoins négatifs, ceux-ci ont donné des résultats négligeables, particulièrement le témoin avec lipase mais sans *p*-NPB qui n'a montré aucune variation. (**Tableau 8**)

Tableau 8 Activité spécifique mesurée pour la lipase Vg de la patate douce et le blanc sans enzyme dans l'hydrolyse de 0,5 mM de p-NPB (1 % ACN) dans 100 mM de tampon phosphate de sodium, 150 mM NaCl à pH 7,2 et 37 °C.

Calculs réalisés avec ϵ (p-NPB)_{400nm} = 14,8 mM⁻¹cm⁻¹

Concentration d'enzyme utilisée (mg/mL)	0,23	0
Substrat	0,5mM p-NPB	0,5mM p-NPB
Δ mDO/min	18,600 ; 18,890 ; 19,000	0,600 ; 0,620 ; 0,560
Ecart-type	0,207	0,031
Moyenne	18,745	0,610
μ M de produit/min	2,147	0,070
nmol de produit /min/puit	0,429	0,014
mU/mL d'enzyme	21,467	N/A
mU/mg de protéines	93,335	N/A

Une fois que nous avons confirmé que la lipase Vg était capable de réaliser de réactions d'hydrolyse, nous l'avons testée dans l'acylation avec 20 mM de géranol. Pour cela, la transestérification avec 60 mM d'acétate de vinyle, ainsi que l'estérification avec 60 mM d'acide hexanoïque ont été évaluées. Étant donné que le spectre d'activité de la lipase Vg est inconnu, nous avons sélectionné arbitrairement l'acide hexanoïque au cas où des chaînes plus longues que l'acétate seraient préférées par l'enzyme (**Figure 39**). Ces premiers tests ont également été réalisés en parallèle avec les lipases Novozym 435 (N435) et de *Rhizomucor miehei* (RM) mentionnées auparavant, ainsi qu'avec les témoins négatifs correspondants en absence de lipases.

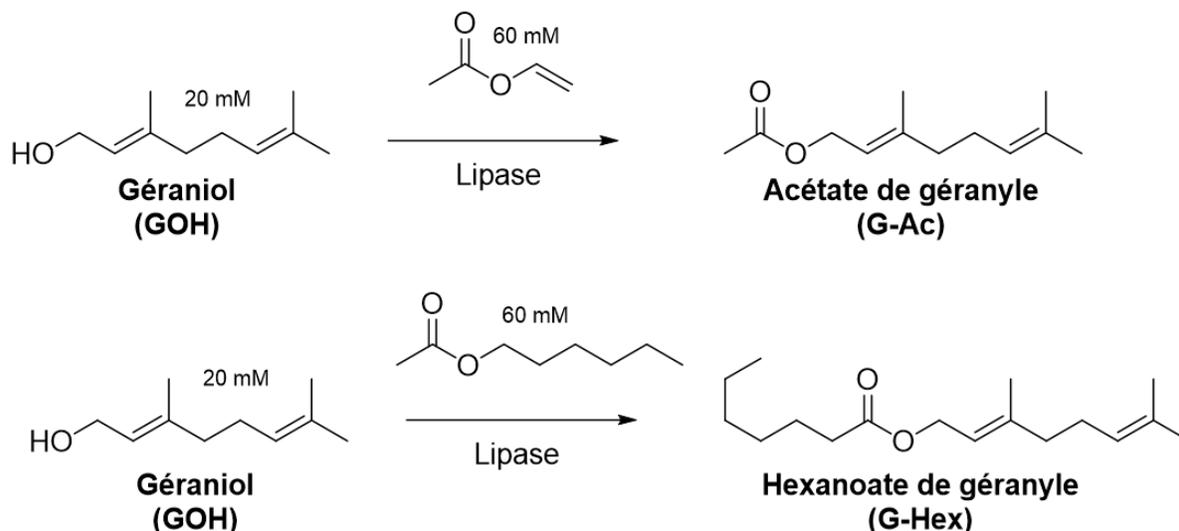


Figure 39 Illustration de la synthèse d'esters du géranol

Une mesure par chromatographie phase gazeuse (GC) après 24 h de réaction à 37 °C a montré une conversion >99 % avec Novozym 435 pour les deux réactions. Concernant la lipase RM, celle-ci a donné des conversions de 40 % pour la transestérification et de 44 % pour l'estérification avec l'acide hexanoïque. Néanmoins, la lipase Vg n'a pas été capable de catalyser la formation des esters d'intérêt, une conversion de 1,4 % a été observée pour la transestérification avec l'acétate de vinyle et de 0 % pour l'estérification avec l'acide hexanoïque) (**Figure 40**).

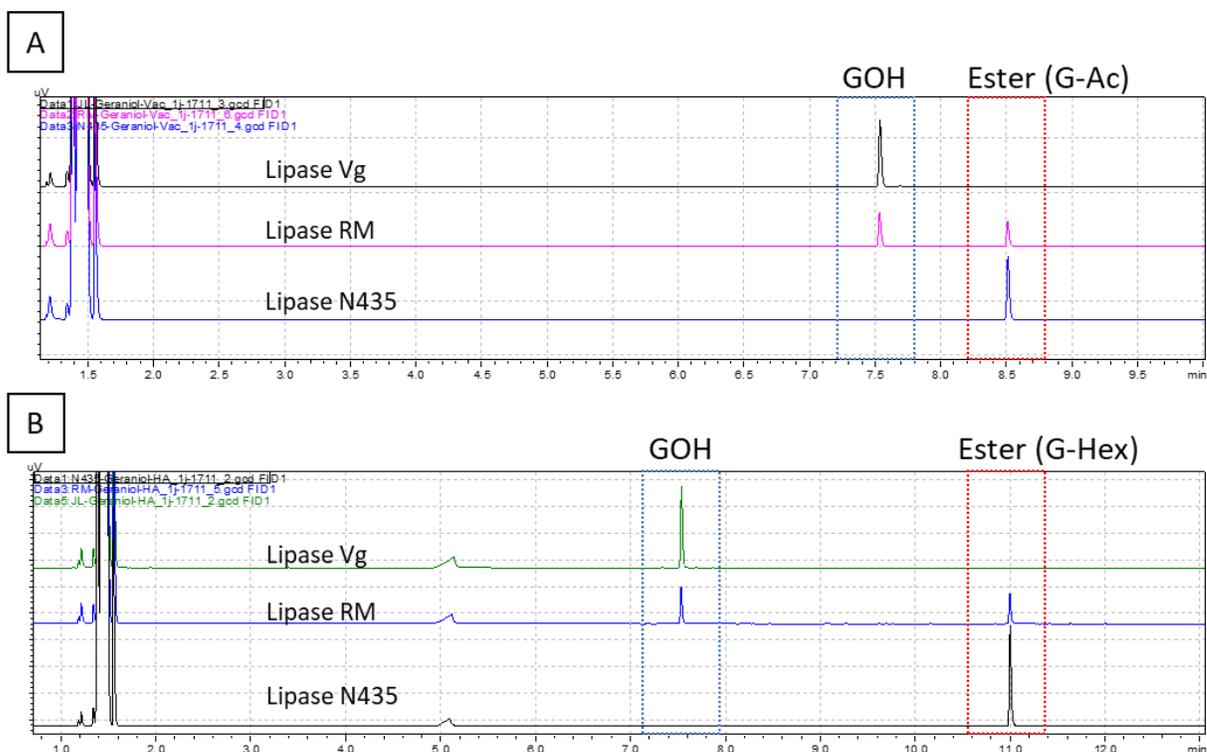


Figure 40 Spectres GC-FID de l'acylation du géraniol (GOH) catalysée par les lipases Vg (4,6 μg de protéines), RM (4,72 μg de protéines) et N435 (10 mg de solide) après 24 h. A) Transesterification avec 20 mM de GOH, 60 mM d'acétate de vinyle dans 1 mL de MTBE:ACN (3:1), en présence de 3 sphères de tamis moléculaire 5 Å à 37 °C et 35 RPM ; B) Esterification avec 20 mM de GOH, 60 mM d'acide hexanoïque dans 1 mL de MTBE:ACN (3:1) en présence de 3 sphères de tamis moléculaire 5 Å à 37 °C et 35 rpm

Même si l'utilisation de la lipase Vg semble avoir permis la formation d'une légère quantité de géranyl acétate, le taux de conversion est très proche de 0 dans ces conditions. Afin de limiter la quantité d'eau introduite dans le milieu réactionnel, nous avons décidé d'utiliser 4,6 μg de lipase Vg (20 μL d'extrait). En effet, la limite de cette étude était la quantité et la concentration de lipase Vg disponibles, puisque même l'échantillon concentré qui nous a été fourni n'avait que 0,23 mg de protéines dans 1 mL de solution. On peut supposer que les rendements pourraient être améliorés avec une quantité bien plus importante de lipase Vg, cependant pour cela il serait probablement nécessaire de lyophiliser ou éventuellement d'immobiliser l'enzyme. Or, ceci nécessiterait d'une étude plus approfondie afin de connaître la stabilité de cette enzyme. Par conséquent, en prenant en considération la faible quantité d'extrait d'enzyme disponible, et les rendements très inférieurs à ceux obtenus avec les deux autres lipases commerciales, nous n'avons pas poursuivi cette étude.

Inversement, l'excellente performance de la CAL-B dans ces deux types de réactions a d'avantage conforté notre choix pour la suite des études présentées dans ce manuscrit.

3. Utilisation de la lipase Novozym 435 dans l'acylation de l'alcool périllique avec l'acide acétique et l'acetate de vinyle

Après les premiers tests réalisés sur le géraniol, nous nous sommes intéressés à l'acylation de l'alcool périllique. Curieusement, la synthèse enzymatique de l'acétyl ester de l'alcool périllique (perillyl acetate) n'a jamais été décrite, même si celui-ci est un produit d'intérêt pour l'industrie cosmétique.^[148] S'agissant de l'ester aliphatique le plus simple pouvant être synthétisé (à l'exception de l'ester formé à partir de l'acide formique), celui-ci a constitué un modèle intéressant pour mettre au point un premier panel de conditions d'estérification.

Pour cette première synthèse, nous avons explorés deux donneurs d'acyle : l'acide acétique et l'acétate de vinyle (**Figure 41**). Dans la réaction catalysée par la lipase, ces deux donneurs jouent le même rôle qui est d'apporter la chaîne alkyle d'intérêt. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, les acides carboxyliques et les esters vinyliques sont deux types de donneurs d'acyle couramment utilisés. Malgré le fait que la diversité structurelle des acides carboxyliques commerciaux soit très importante, leur utilisation dans le cadre des réactions d'acylation présente plusieurs inconvénients. En effet, la production d'eau défavorise l'équilibre thermodynamique de la réaction puisque celle-ci peut à son tour dégrader l'ester d'intérêt. C'est pour cette raison que l'utilisation d'outils tels que des tamis moléculaires est souvent nécessaire afin de limiter l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel. En plus, l'acidification du milieu peut également contribuer à une diminution de l'activité de l'enzyme. Inversement, la diversité structurelle des esters vinyliques commerciaux est beaucoup plus restreinte, mais leur utilisation ne présente pas les inconvénients mentionnés précédemment. En plus, l'alcool vinylique libéré au cours de la réaction se réarrange en acétaldéhyde (équilibre céto-énolique) qui est à la fois volatil et incapable de dégrader le produit d'intérêt. Pour ces raisons, les réactions de transestérification avec les esters vinyliques sont considérées comme irréversibles.

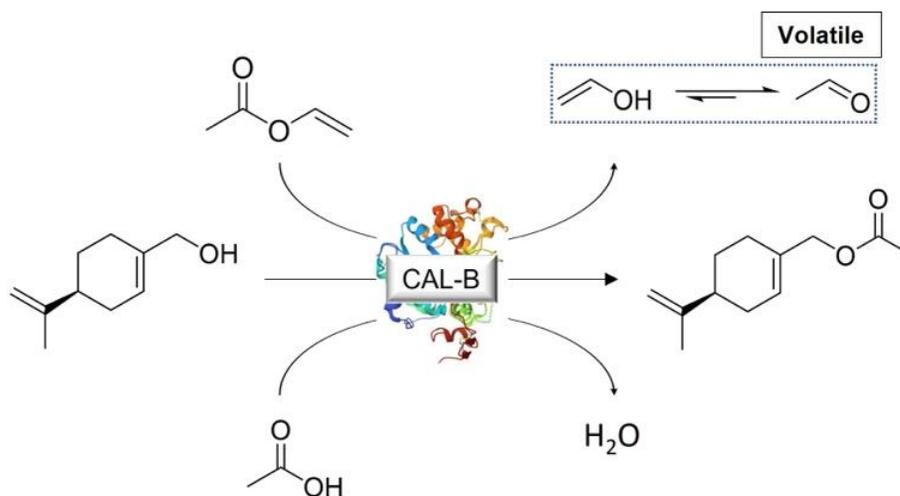


Figure 41 Réaction d'acylation de l'alcool périllique catalysée par la CAL-B; via la transestérification avec l'acétate de vinyle ou l'estérification avec l'acide acétique

Les réactions d'acylation ont été réalisées à petite échelle dans des flacons en verre de 2 mL contenant 1 mL de solvant (3/1:MTBE/ACN) avec 3 particules de tamis moléculaires (5 Å). Concernant les réactifs, nous avons maintenu un excès de 3 équivalents de donneur d'acyle par rapport à l'alcool. Des témoins

négatifs ont également été réalisés en l'absence de l'enzyme. La formation d'acétate a été suivie par GC-FID et les structures correspondantes ont été confirmée par RMN (^1H , ^{13}C et HSQC).

Dans un premier temps, nous pouvons déjà confirmer qu'en absence d'enzyme, l'acylation de l'alcool périllique n'a pas lieu avec aucun des deux donneurs d'acyle, étant donné qu'aucun produit n'a été identifiée dans ces conditions. Ensuite, lors de la transestérification avec 10 mg de Novozym 435, 100 mM de POH et 300 mM d'acétate de vinyle, une conversion remarquable de >99 % a été observée après seulement 1 h de réaction à 37 °C. En revanche, l'estérification avec 300 mM d'acide acétique n'a permis d'atteindre que 12 % de conversion dans le même laps de temps, et 24 % après 2 h (**Figure 42**). Cela dit, si on pousse la réaction plus loin, il nous a été possible de mesurer par RMN ^1H au bout de 5 jours de réaction une conversion de 90 % \pm 5 %.

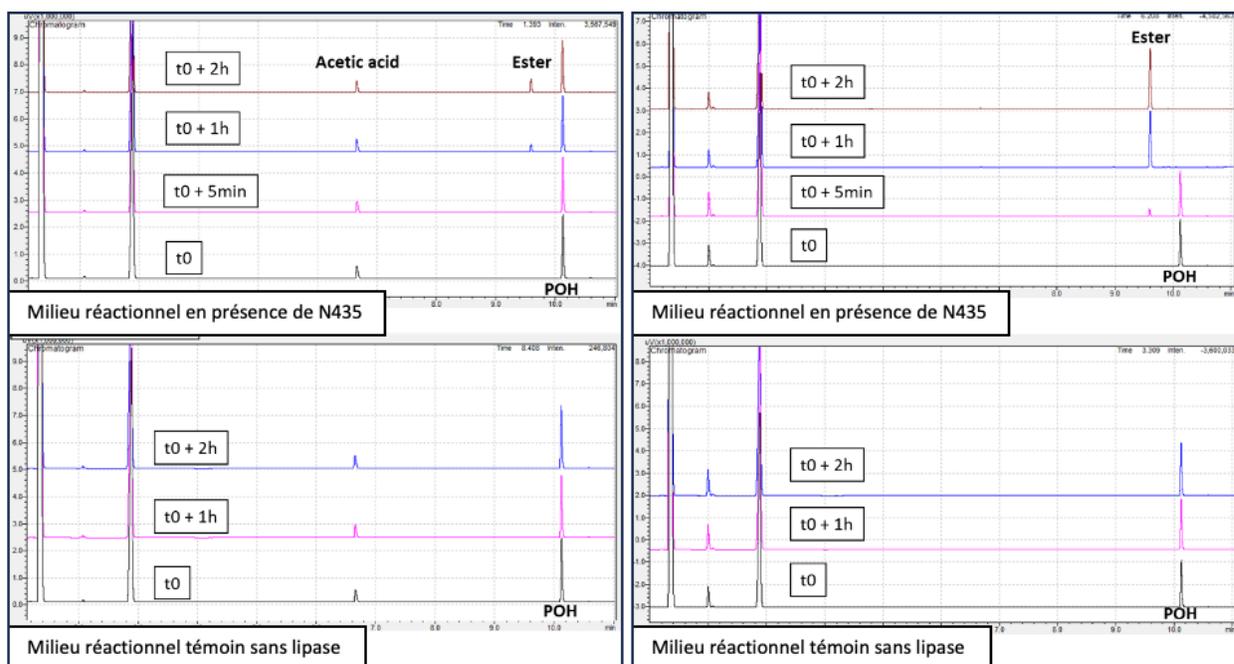


Figure 42 Chromatogrammes des réactions d'acylation de l'alcool périllique avec l'acide acétique (à gauche) et l'acétate de vinyle (à droite)

Concernant la RMN, les spectres proton révèlent un comportement intéressant lors de l'estérification d'un alcool primaire allylique (**Figure 43**). Deux caractéristiques indiquent clairement l'apparition de l'ester. Premièrement, les hydrogènes en position α de la fonction alcool ($n^\circ 7$) de l'alcool périllique subissent un déblindage significatif dû à l'effet électroattracteur de la nouvelle fonction ester. Alors que dans l'alcool périllique, ils se manifestent sous forme d'un singulet à 3,77 ppm, dans le perillyl acétate, ils apparaissent sous forme d'un nouveau singulet à 4,40 ppm. De même, l'hydrogène situé sur la double liaison allylique ($n^\circ 2$) subit un effet similaire, mais moins marqué. Ce dernier apparaît sous forme d'un singulet à 5,58 ppm dans l'alcool périllique et à 5,72 ppm dans l'ester. Cette caractéristique spectrale est retrouvée dans tous les nouveaux esters allyliques décrits dans cette étude.

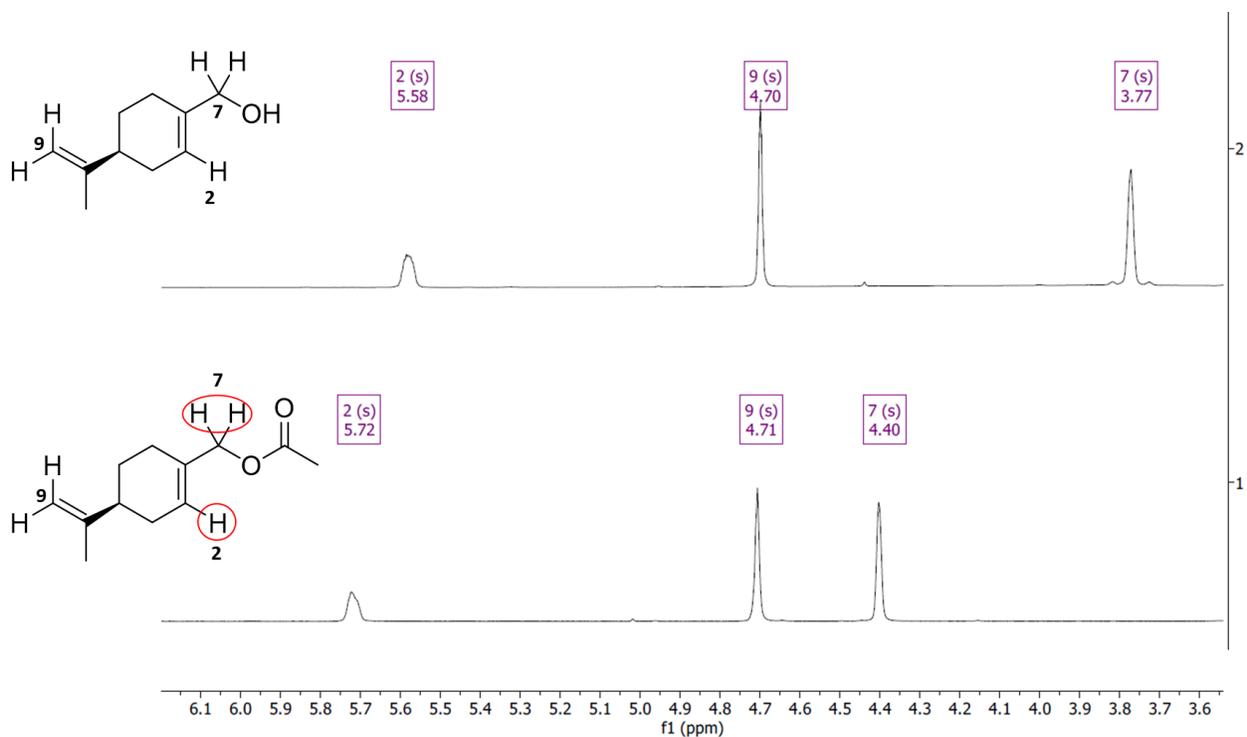


Figure 43 ^1H RMN (DMSO- D_6) temoignant la formation du périllyl acétate. (1) Spectre du produit de la réaction d'acylation et (2) spectre du témoin contenant l'alcool périllique

Cette série de manipulations ont permis de mettre en évidence deux points importants. Premièrement, la CAL-B immobilisée (N435) est en effet capable de réaliser l'acylation de l'alcool périllique avec les deux types de donneur d'acyle, et avec des taux de conversion très élevés (>90 %). Cependant, l'utilisation de l'ester vinylique permet d'accélérer considérablement la vitesse réactionnelle de plusieurs ordres de grandeurs et d'atteindre une conversion totale en moins d'une heure. Leur utilisation serait donc à privilégier lorsque l'on souhaite maximiser à la fois le taux de conversion du terpène et la vitesse réactionnelle.

II. Introduction de chaînes cétoester sur des monoterpénoïdes

1. Synthèse d'un dérivé α -cétoester de l'alcool périllique

Après avoir mis au point les conditions réactionnelles permettant la synthèse d'esters avec des chaînes aliphatiques de l'alcool périllique et du géraniol. Nous nous sommes intéressés à la possibilité d'introduire d'autres types de chaînes, en se tournant vers la nature comme source d'inspiration. Dans le contexte de ce projet, on sait qu'il y existe plusieurs dérivés acylés de LST retrouvés au niveau naturel dans la chicorée, notamment les dérivés à base d'oxalate. L'introduction d'un motif α -cétoester au niveau d'un terpénoïde tel que l'alcool périllique est intéressante puisqu'il contribue à rendre la molécule plus amphiphile, avec une chaîne ester polaire et une structure terpénique très hydrophobe. Nous avons donc décidé dans un premier temps d'explorer la réaction d'estérification entre l'alcool périllique et l'acide pyruvique, un acide carboxylique simple pouvant apporter ce motif (**Figure 44**).

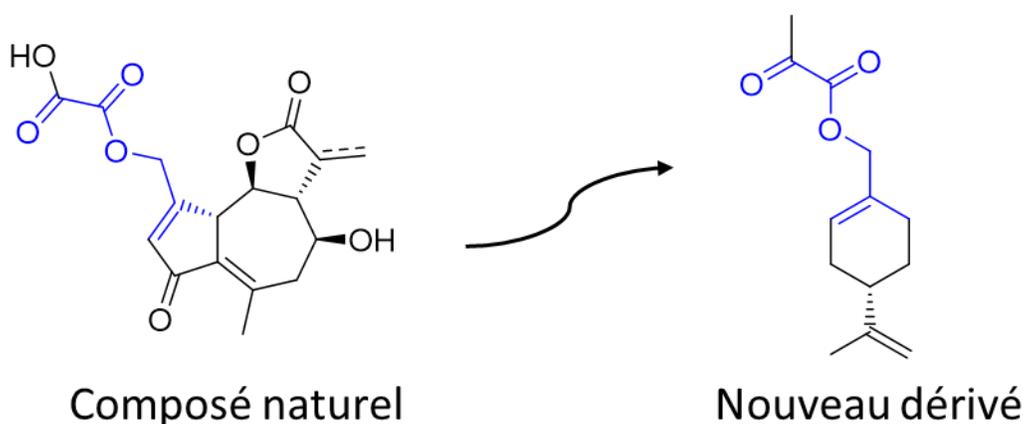


Figure 44 Illustration du dérivé oxalate de la DHLc et Lc retrouvé naturellement dans la racine de chicorée (à gauche) servant d'inspiration pour la synthèse de nouveaux terpènes (à droite)

La synthèse de dérivés α -cétoesters terpéniques ne semble pas avoir été décrite dans la littérature, de même pour l'estérification enzymatique de l'acide pyruvique catalysée par une lipase. A titre informatif, l'estérification de l'acide lactique, un substrat similaire, catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* sous forme de Novozym 435 a été décrite.^[149,150] Dans une autre publication, l'estérification de l'acide lactique (1 M) catalysée par la lipase N435 avec différents alcools primaires linéaires (200 mM) dans l'hexane donne des rendements de 89 % (avec butanol), 68 % (hexanol), 28 % (octanol) et 11 % (décanol) au bout de 100 h de réaction à 25 °C. Ces résultats montrent que la CAL-B serait capable d'utiliser un substrat similaire à l'acide pyruvique.^[151]

Une première série de réactions ont été menées à petite échelle dans l'acétonitrile (1 mL de volume réactionnel, 100 mM d'alcool périllique, 300 mM d'acide pyruvique) en parallèle du témoin sans enzyme (**Figure 45**).

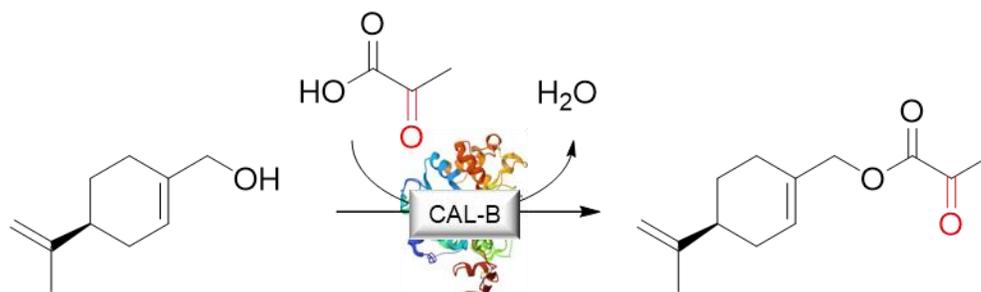


Figure 45 Illustration de la réaction d'estérification entre l'alcool périllique et l'acide pyruvique

La réaction a été suivie par GC-FID et le produit caractérisé par RMN et spectrométrie de masse. Dans ces conditions, un plateau semble avoir été atteint autour de 50 % de conversion au bout de 72 h de réaction, avec un ralentissement de cette dernière après 48 h (**Figure 46**).

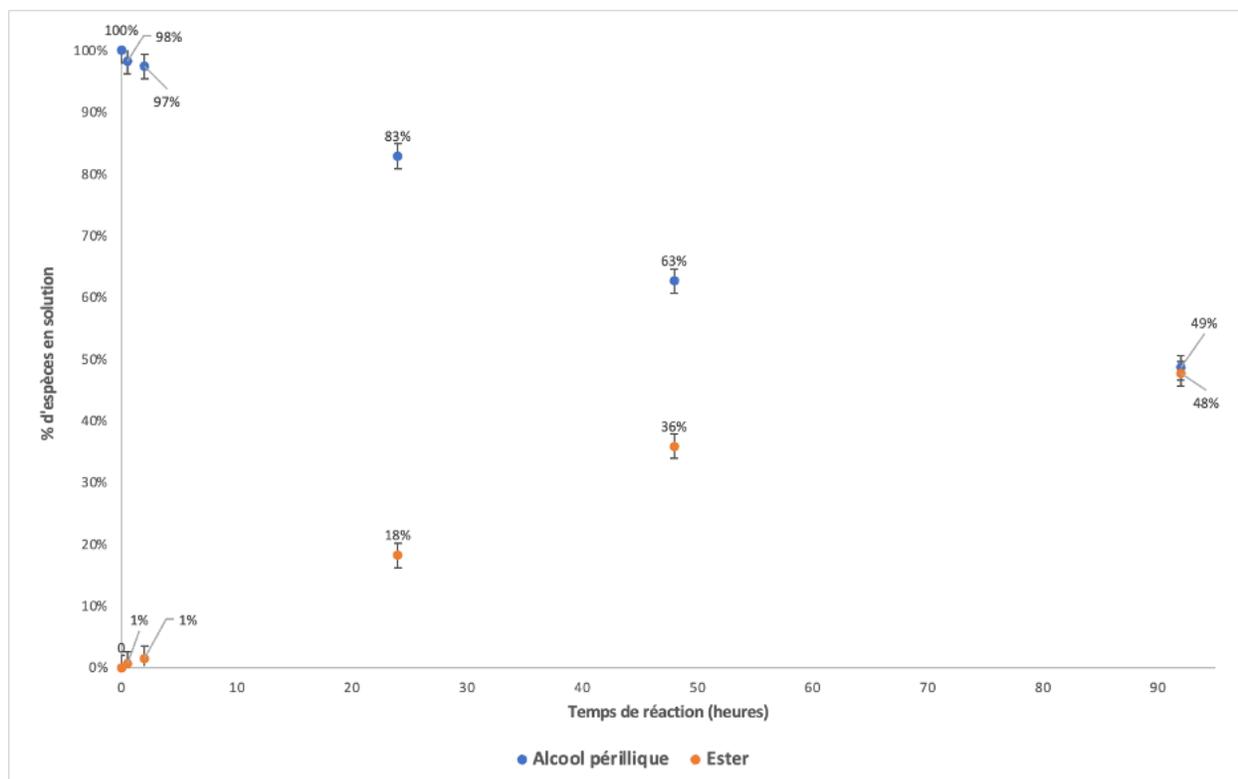


Figure 46 Suivi réactionnel par GC-FID montrant la consommation de l'alcool périllique et la formation de l'ester d'intérêt via la réaction d'estérification avec l'acide pyruvique catalysée par N435

Pour confirmer la structure de ce nouveau composé n'ayant jamais été décrit dans la littérature, les spectres ¹H RMN (**Figure 47**) et de masse (**Figure 48**) ont été réalisés. Dans le cas du milieu réactionnel en présence de la lipase N435, on remarque l'apparition de nouveaux pics (en rouge), absents pour le témoin sans enzyme. Comme nous l'avons observé pour la formation du perillyl acétate, le singulet à 3.77 ppm correspondant aux deux hydrogènes du groupement CH₂ situés en α de la fonction alcool subit un effet de déblindage lors de l'estérification. Dans l'ester d'intérêt, ces deux hydrogènes apparaissent sous forme d'un

nouveau singulet à 4.58 ppm. De même, un nouveau singulet à 5,81 ppm correspondant à l'hydrogène du carbone #2 est présent pour le milieu réactionnel contenant l'ester.

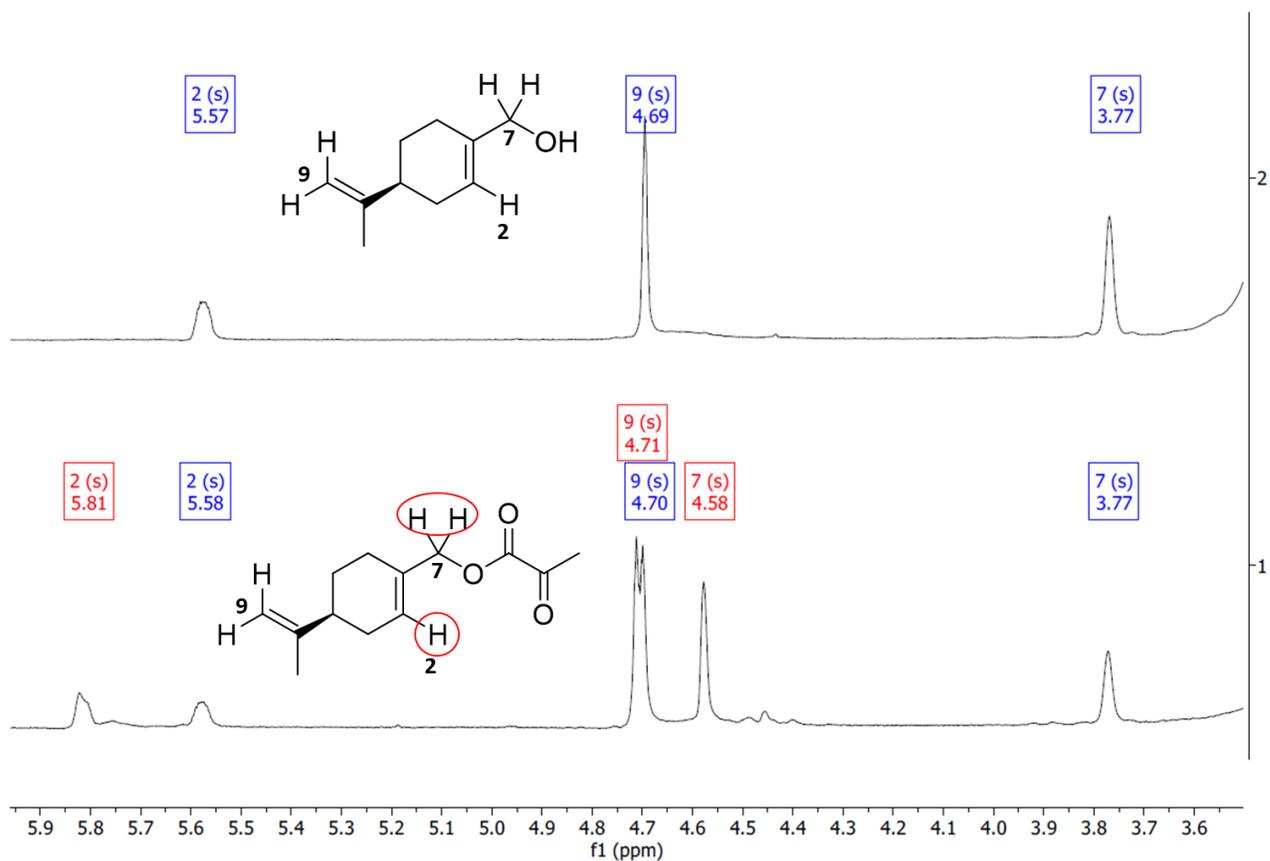


Figure 47 ¹H RMN (DMSO-D₆) des milieux réactionnels de l'estérification de l'alcool périllique avec l'acide pyruvique. (1) Spectre du milieu réactionnel avec le produit de la réaction ; (2) Spectre du témoin sans lipase. Les déplacements correspondant aux hydrogènes de l'alcool périllique sont représentés en bleu et ceux du produit de la réaction en rouge.

Malgré le fait que le spectre de masse du produit de la réaction ne montre pas le pic de l'ion moléculaire (222,126 g/mol), deux fragments issus de la fragmentation d'un ester de l'acide pyruvique sont présents. Le premier ($m/z = 207$) correspond à la perte d'un groupement méthyle en α de la fonction cétone du produit d'intérêt. Le deuxième ($m/z = 135$) serait issu d'une coupure en α de l'oxygène impliqué dans la liaison ester (**Figure 48**).

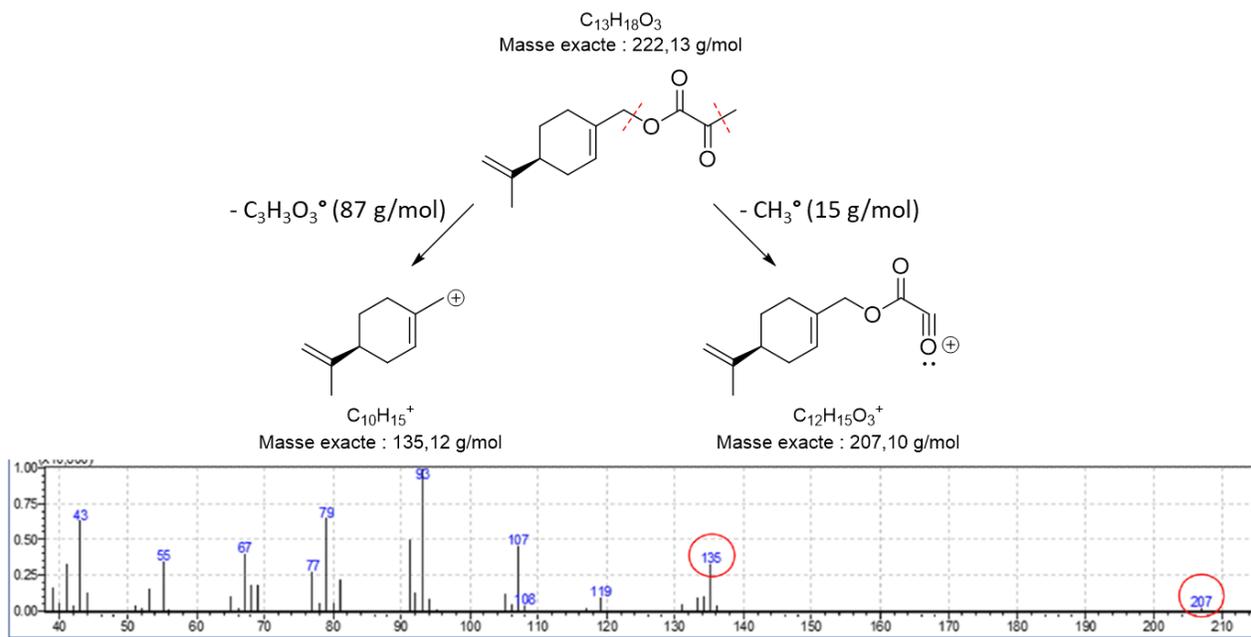


Figure 48 Spectre de masse de l'ester pyruvique de l'alcool périllique et principales fragmentations caractéristiques. Produit de la réaction sortant a un temps de rétention de 10,6 min

2. Synthèse de dérivés α -cétoester d'autres monotérpénoïdes courants

Nous avons ensuite décidé de tester la capacité de la CAL-B à former des dérivés α -cétoesters d'autres monotérpénoïdes connus. Dans ce contexte, le géraniol, le β -citronellol, l'alcool périllique, l'alcool isopropyl-4-benzylique (4-IBA) et le myrténol ont été acylés. Ceci nous a permis d'explorer la réactivité pour différents types de structures (chaîne linéaire, cyclique, bi-cyclique et benzylique) (**Figure 49**).

Chaque réaction a été réalisée avec 100 mM de terpène, 300 mM d'acide pyruvique et 10 mg de N435 dans 1 mL de MTBE en présence de deux billes de tamis moléculaire (5 Å) à 40 °C et 30 rpm.

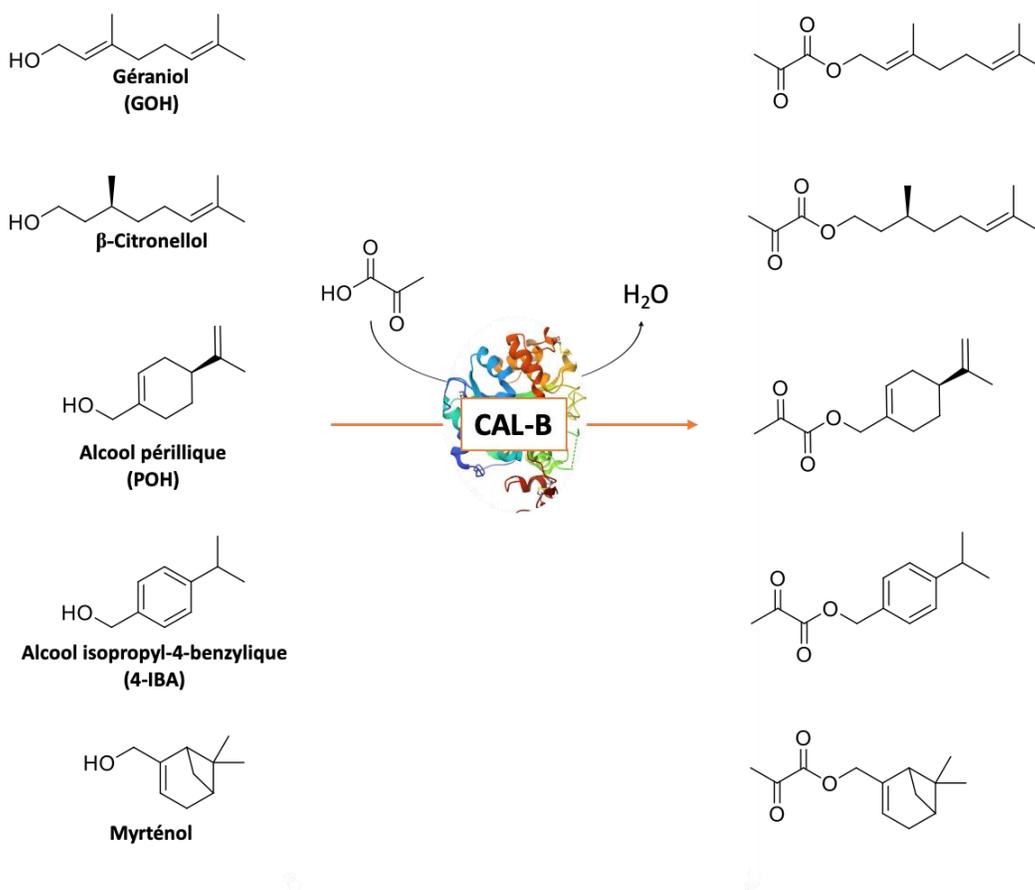


Figure 49 : Bilan des monotérpénoïdes et leurs dérivés α -cétoester synthétisés *via* l'estérification avec l'acide pyruvique catalysée par la CAL-B immobilisée

Cette série de réactions nous a permis de mettre en évidence un lien entre la structure des terpénoïdes et leur réactivité avec la lipase. La CAL-B a montré la meilleure performance avec les substrats à chaîne linéaire (géraniol et citronellol). Après 28 h de réaction, 26 ± 2 % du géraniol et 32 ± 3 % du citronellol ont réagi. Au bout de 96 h de réaction, un taux de conversion de 85 ± 2 % est atteint pour les deux, suggérant un même équilibre thermodynamique mais une cinétique légèrement plus rapide pour le citronellol. Concernant l'alcool périllique, le changement de solvant a permis d'augmenter le taux de conversion de 50 ± 2 % dans l'acétonitrile à 68 ± 1 % dans le MTBE après 4 jours de réaction. Concernant le 4-IBA, le

taux de conversion a été plus modeste, avec $53 \pm 2 \%$. Ceci laisse penser que le cycle benzylique au niveau de l'accepteur d'acyle (alcool) aurait un effet défavorable sur la réactivité. Pour finir, le substrat le moins réactif s'est révélé être le myrténol, pour lequel le taux de conversion avoisine à peine les 7 %. On suppose que ce manque de réactivité est dû au fort encombrement stérique de ce dernier (**Figure 50**).

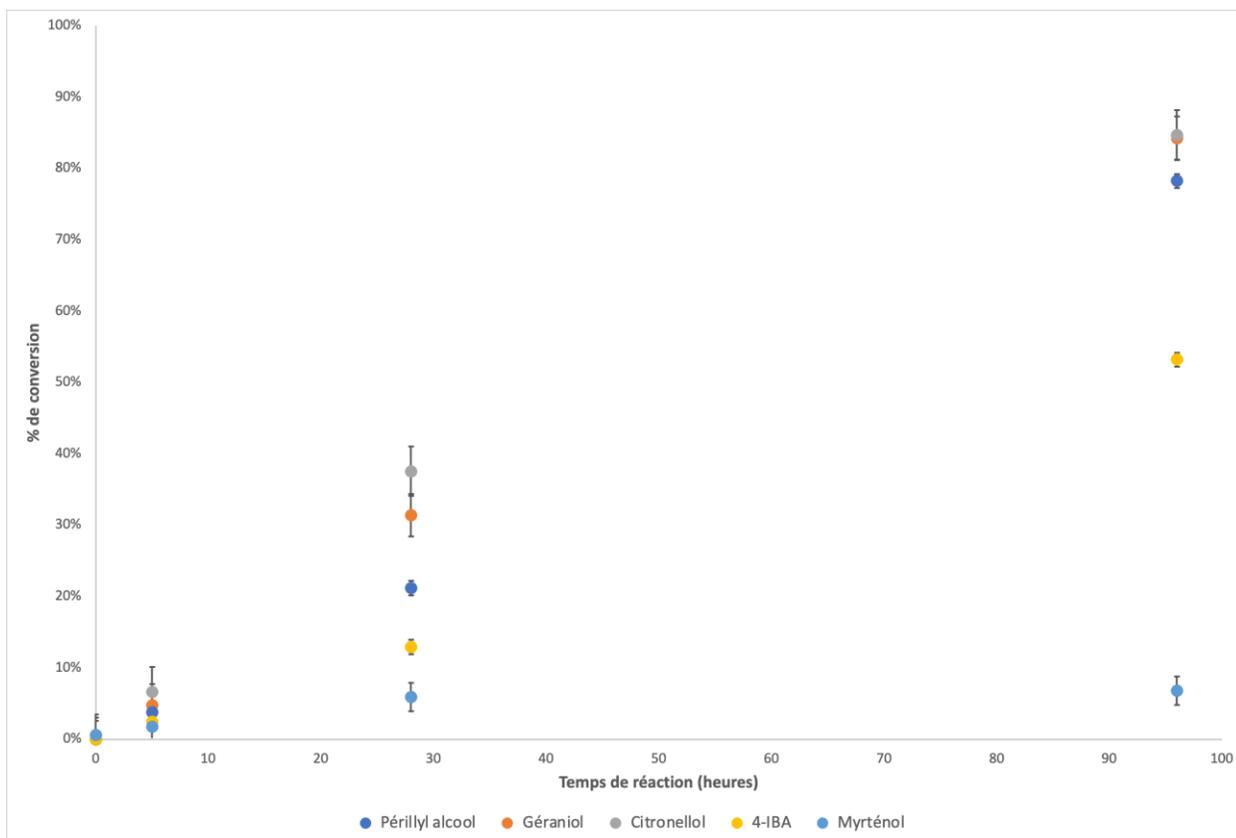


Figure 50 Suivi réalisé par GC-FID de la formation des différents esters monoterpéniques issus de l'esterification avec l'acide pyruvique catalysée par N435 à 40 °C dans le MTBE

A la suite de ces expériences, nous avons réussi à synthétiser des dérivés α -cétoester de plusieurs monoterpénoïdes, formant ainsi des nouvelles structures n'ayant pas encore été décrites dans la littérature. On peut supposer que l'introduction de la chaîne céto-ester, à caractère polaire, pourrait transformer ces monoterpénoïdes en molécules amphiphiles. Il est donc possible qu'elles puissent voir des potentielles applications en tant que surfactants. Or, cette hypothèse annexe n'a pas encore été testée dans le cadre de ce travail. D'autre part, le groupement carbonyle pourrait permettre d'autres modifications par la suite, dont l'introduction d'une fonction amine. Ce dernier point sera évoqué dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

3. Synthèse du dérivé β -céto ester de l'alcool périllique via la transestérification avec l'acétoacétate de méthyle

Les β -cétoesters sont des composés 1,3-dicarbonylés couramment utilisés comme précurseurs dans la synthèse de médicaments ou de produits naturels.^[152] Ils ont la particularité de pouvoir réagir à la fois comme des électrophiles (carbone porteur du carbonyle) et des nucléophiles (carbone entre les deux carbonyles). De façon similaire aux α -cétoesters, les β -cétoesters sont donc des potentiels produits et/ou précurseurs d'intérêt.

La réaction de formation du β -cétoester a été étudiée avec l'alcool périllique et l'ester méthylique de l'acide acétoacétique (3-oxobutanoate de méthyle ; acétoacétate de méthyle ou MeAcAc). Ce dernier étant le composé le plus simple comportant un motif 1,3-dicarbonylé et pouvant être estérifié.

L'acide acétoacétique n'a pas été utilisé puisqu'il n'est pas disponible commercialement dû à son instabilité. En effet, les β -cétoacides non substitués sont des composés instables qui subissent une réaction de décarboxylation même dans des conditions douces, particulièrement en milieu acide ou sous des conditions qui favorisent la formation de CO_2 (i.e. chauffage). En présence d'eau, l'acide acétoacétique possède une demi-vie de 140 min à 37 °C (**Figure 51**).^[153]

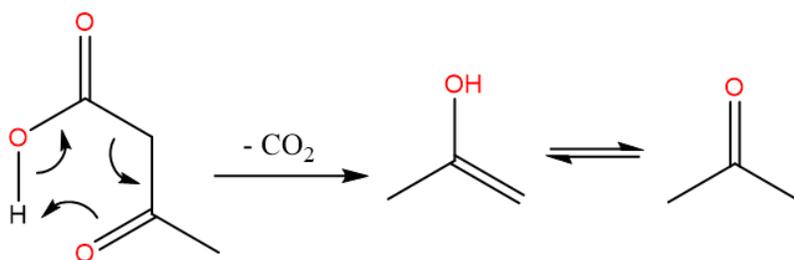


Figure 51 Décarboxylation de l'acide acétoacétique

La transestérification entre l'alcool périllique (POH) et le MeAcAc s'est avérée plus complexe à réaliser que celle avec l'acide pyruvique. Bien que d'autres lipases, comme celle de *Thermomyces lanuginosus* (sous forme libre et immobilisée) et celle de *Rhizomucor miehei* (également libre et immobilisée), aient été testées, elles n'ont pas donné de résultats satisfaisants avec différents ratios de substrats. De la même manière, d'autres solvants comme le toluène et le cyclopentyl méthyl éther (CPME) ont été utilisés, mais ont été écartés à ce stade en raison de la présence d'impuretés non identifiées, compliquant l'étude. Toutefois, en utilisant la N435 avec 300 mM de MeAcAc et 20 ou 50 mM d'alcool périllique dans 1 mL de MTBE à 40 °C, nous avons réussi à synthétiser le produit souhaité (**Figure 52**).

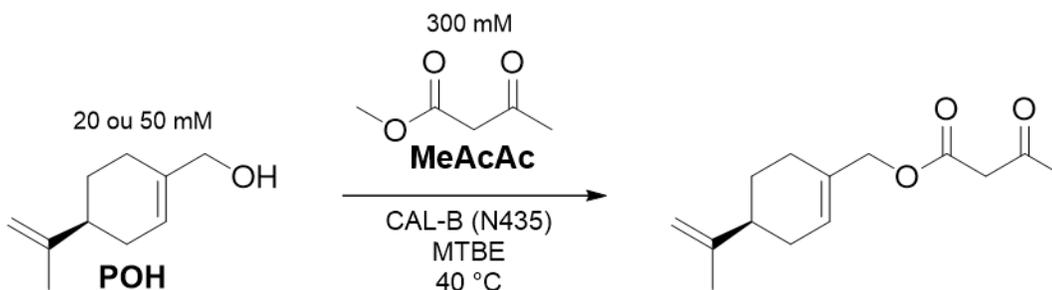


Figure 52 Illustration de la synthèse du β -cétoester de l'alcool périllique

Dans le cadre de cette étude, les analyses par GC n'ont pas permis d'identifier un produit de réaction. Cela suggère une possible instabilité thermique des β -cétoesters allyliques, qui pourraient se dégrader au niveau de l'injecteur ou dans la colonne. Nous avons donc eu recours à la RMN (Bruker 300 MHz). Pour ceci, les milieux réactionnels ont été concentrés sous une pression réduite (8 mbar) pendant 1 heure avant de resolubiliser le brut réactionnel dans du chloroforme deutéré (CDCl_3).

Tout comme pour l' α -cétoester de l'alcool périllique, la formation du β -cétoester, observée par RMN ^1H , est caractérisée par un déplacement chimique au niveau des hydrogènes en α de l'alcool et de l'hydrogène du carbone #2 du substrat. Dans l'alcool périllique non modifié, ces deux pics apparaissent sous forme de 2 singulets à 4 et 5,7 ppm respectivement. Dans cette étude, deux nouveaux singulets à 4,53 et 5,78 ppm sont observés (**Figure 53**). Dans le spectre du milieu réactionnel, le ratio des aires entre le singulet à 4 ppm de l'alcool périllique non réagi et le nouveau singulet à 4,53 ppm du produit permet d'estimer le pourcentage de conversion. Une première réaction réussie avec 20 mM d'alcool périllique et 300 mM de MeAcAc a donné un taux de conversion de $62 \pm 5\%$ au bout de 24 h à 40 °C. Néanmoins, la quantité de MeAcAc n'ayant pas réagi était très minoritaire dans le milieu, suggérant la présence d'une réaction parasite très majoritaire. Étonnamment, la même réaction réalisée avec 50 mM de POH et avec 300 mM de MeAcAc montre une conversion de $43 \pm 5\%$ après 24 h.

De plus, des observations intéressantes ont été faites concernant le comportement du MeAcAc lors de la transestérification. Lors de l'ouverture des vials pour effectuer des prélèvements, un léger dégagement gazeux a parfois été observé. Une analyse RMN d'un échantillon témoin sans enzyme, dont le vial a été ouvert à plusieurs reprises pendant la réaction, a révélé une diminution presque complète du MeAcAc. En revanche, un autre témoin, traité simultanément mais dont le vial est resté hermétiquement fermé pendant 24 heures, a montré une abondance de MeAcAc, ainsi qu'un proton détecté à 12 ppm, indicatif de la présence d'un acide carboxylique. Ces observations suggèrent que le gaz libéré pourrait être du CO_2 , résultant de la dégradation de l'acide acétoacétique (un produit d'hydrolyse). Il semble que la libération de ce gaz pourrait favoriser la réaction d'hydrolyse en présence de faibles quantités d'eau dans le milieu, même en l'absence d'enzyme. Il semble donc que certaines conditions non maîtrisées peuvent influencer considérablement cette réaction.

Le β -cétoester de l'alcool périllique, ainsi que l' α -cétoester mentionné précédemment, ont été soumis à une réaction de transamination, détaillée dans le Chapitre 2. Toutefois, contrairement à l' α -cétoester, le β -cétoester n'a pas montré de résultats prometteurs. En raison des défis mentionnés précédemment, la synthèse du β -cétoester n'a pas été poursuivie.

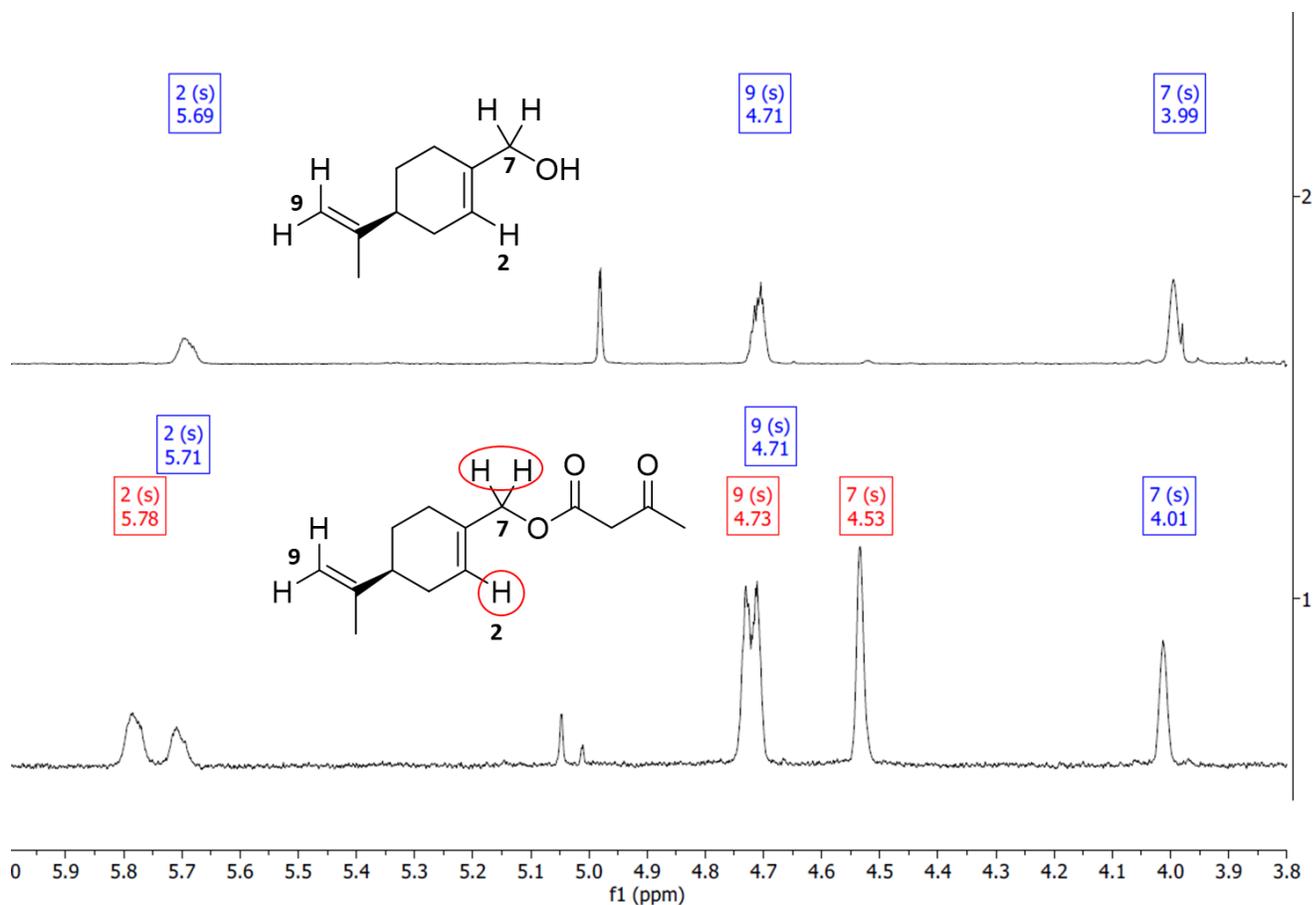


Figure 53 ¹H RMN (CDCl₃) des milieux réactionnels de l'acylation de l'alcool périllique avec le MeAcAc. (1) Spectre du milieu réactionnel avec le produit de la réaction ; (2) Spectre du témoin sans lipase. Les déplacements correspondant aux hydrogènes de l'alcool périllique sont représentés en bleu et ceux du produit de la réaction en rouge. (Conditions : 50 mM alcool périllique, 300 mM MeAcAc, 10 mg N435, t₀+ 24 h)

Chapitre 2 : Acylation des lactones sesquiterpéniques retrouvées dans la racine de chicorée

I. Modification de la 11 β ,13-dihydrolactucine

1. Introduction

Cette section du projet se concentre sur la modification des lactones sesquiterpéniques, en particulier celles présentes dans la racine de chicorée industrielle cultivée dans la région des Hauts-de-France. Nous avons sélectionné quatre lactones sesquiterpéniques, disponibles commercialement comme standards analytiques, pour nos études : la lactucine (Lc), la 11 β -dihydrolactucine (DHLc), la lactucopicrine (Lp) et la 11 β -dihydrolactucopicrine (DHLp).

Bien que nous disposions initialement de seulement 20 mg de chaque composé, nous avons obtenu une quantité plus conséquente de DHLc provenant d'une poudre de racine de chicorée industrielle lyophilisée, fournie par la société Florimond-Deprez. Cette extraction a été réalisée dans le cadre du projet de thèse de Mme Francesca RUGGIERI, supervisé par le Pr. Jean-Louis HILBERT et Philippe HANCE, ainsi que par le Pr Nicolas WILLAND de la faculté de pharmacie de Lille.

Suite à des résultats encourageants obtenus lors de l'acylation de différents monoterpénoïdes, dont l'alcool périllique, nous avons envisagé d'appliquer notre méthodologie à l'acylation des LST concernées. Dans cette optique, la DHLc a été retenue comme substrat modèle, en prévision d'étendre les réactions aux autres LST, puis à des mélanges plus complexes, tels que les extraits de chicorée.

- Solubilité des lactones sesquiterpéniques

Avant de commencer la partie biotransformation, il était important d'avoir une vision claire de la solubilité de nos composés d'intérêt, principalement les lactones sesquiterpéniques, dans différents solvants. Ceci a donc été exploré de manière qualitative. Pour ceci, 1 mL de solvant a été introduit dans un tube Eppendorf contenant 5.6 mg de DHLc (pour environ 20 mM finales) et le milieu a été vortexé pendant au moins 20 secondes. Les solvants volatiles ont ensuite été évaporés à pression réduite afin de récupérer la DHLc utilisée (sauf pour H₂O et DMSO-D₆) (**Tableau 9**).

Tableau 9 Solubilité de la 11 β ,13-dihydrolactucine (20 mM) dans différents solvants

Solvant/mélange de solvants	Solubilité de la DHLc (5.6 mg soit 20 mM)
H ₂ O (ultra pure)	Soluble après bain à ultrason pendant 10 min
Méthanol	Soluble
Éthanol	Soluble
Hexane	Insoluble
Dichlorométhane (DCM)	Insoluble
Hexane : DCM (1 :1)	Insoluble
Acétate d'éthyle	Soluble
Acétonitrile	Soluble
Diméthylsulfoxyde (DMSO-D ₆)	Soluble
Tert-butyl-méthyléther (MTBE)	Partiellement soluble
MTBE : ACN (3 :1)	Soluble
MTBE : DMSO (3 :1)	Soluble

2. Première synthèse de la 11 β ,13-dihydrolactucine acétate

2.1. Transestérification enzymatique entre la DHLc et l'acétate de vinyle

Nous avons d'abord exploré la possibilité de former un ester de la DHLc en utilisant les conditions optimisées pour l'alcool périllique. En examinant la structure de la DHLc, plusieurs aspects méritent attention dans le contexte d'une réaction catalysée par des lipases. La DHLc présente une fonction alcool primaire de type allylique (similaire à l'alcool périllique), une fonction alcool secondaire, et une fonction ester cyclique (lactone). Théoriquement, ces trois fonctions pourraient être modifiées en présence d'une lipase. Les fonctions alcool peuvent subir des réactions d'acylation, tandis que la lactone pourrait s'ouvrir par hydrolyse ou attaque nucléophile.

Un autre aspect crucial est la structure tridimensionnelle de la DHLc. Contrairement à l'alcool périllique qui a une structure monocyclique, la DHLc comporte trois cycles distincts avec plusieurs carbones asymétriques. Ces éléments pourraient influencer la réactivité, tant en raison de l'encombrement stérique que des facteurs électroniques (**Figure 54**).

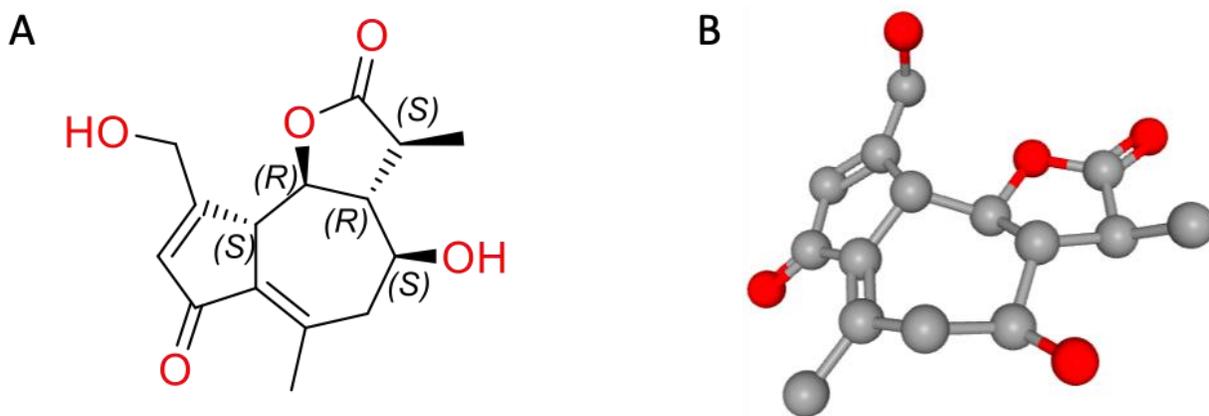


Figure 54. Structure de la DHLc : A) représentation planaire de la molécule et B) Représentation stick de la structure 3D

L'objectif de cette étude était de montrer, pour la première fois, qu'il serait possible de modifier la DHLc par voie enzymatique dans une réaction d'acylation catalysée par une lipase. Nous avons également posé l'hypothèse que l'acylation pourrait se faire de manière régiosélective au niveau d'un des deux alcools, et que l'hydrolyse de la lactone ne devrait pas avoir lieu en absence d'une quantité importante d'eau dans le milieu.

Dans cette première étude, nous nous sommes basés sur les conditions préalablement mises au point sur l'acétylation de l'alcool périllique. Nous avons donc commencé par tester la formation de l'acétate catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435). Nous avons utilisé l'acide acétique et l'acétate de vinyle en tant que donneurs d'acyle. En vue des quantités limitées de DHLc disponibles, nous avons commencé par tester la réaction de transestérification avec l'acétate de vinyle, puisque ce donneur d'acyle a permis d'atteindre une conversion de 100 % avec l'alcool périllique

La réaction a été réalisée à petite échelle (vial de 2 mL) avec 1 mL de solvant (3:1 MTBE :ACN), 10 mM de DHLc, 100 mM d'acétate de vinyle, 3 billes de tamis moléculaire 5 Å, en présence de 20 mg de N435 à 37 °C et 35 rpm. Un témoin sans lipase est également réalisé en parallèle afin de pouvoir comparer directement les deux milieux réactionnels. Nous avons choisi d'utiliser un large excès de donneur d'acyle (10 équivalents) afin de maximiser les chances d'atteindre un taux de conversion le plus élevé possible. En effet, l'acétate de vinyle est un produit de commodité qui peut être acheté à des prix très abordables de l'ordre de 34 \$/kg (Sigma-Aldrich ; référence V1503), il représente donc un coût négligeable dans cette réaction.

Afin de tester nos hypothèses, nous avons d'abord eu recours à la RMN du proton, qui permet de confirmer directement la présence d'une réaction, ainsi que des éventuelles modifications structurales au niveau des liaisons.

La réaction a été arrêtée après 48 h et le mélange résultant a été analysé par RMN du proton après filtration et concentration (8 mbar, 35 °C, 2 h) comme décrit dans la partie expérimentale. Pour le mélange réactionnel en présence de l'enzyme, on remarque que les signaux des deux hydrogènes adjacents au groupe hydroxy primaire de DHLc (15a et 15b) ont été décalés vers des valeurs ppm plus élevées. Chacun d'eux apparaissant initialement comme un doublet de doublets avec un fort effet de toit à 4,23 ppm ($J = 18,8$ Hz, 4,9 Hz) et 4,65 ($J = 18,8$ Hz, 5,7 Hz). En remplacement, deux nouveaux pics avec des caractéristiques de couplage similaires sont apparus à 4,83 et 5,22 ppm, respectivement. Ce décalage est probablement attribuable à l'effet de déblindage causé par la formation d'un groupe ester, qui possède un effet électro-attractif plus important que l'alcool d'origine. Ceci a été confirmé par la réaction témoin en l'absence de l'enzyme, où aucun décalage n'est apparu. De plus, aucun décalage n'a été observé pour l'hydrogène adjacent au groupe alcool secondaire, ni pour ceux liés au motif lactone (**Figure 55**).

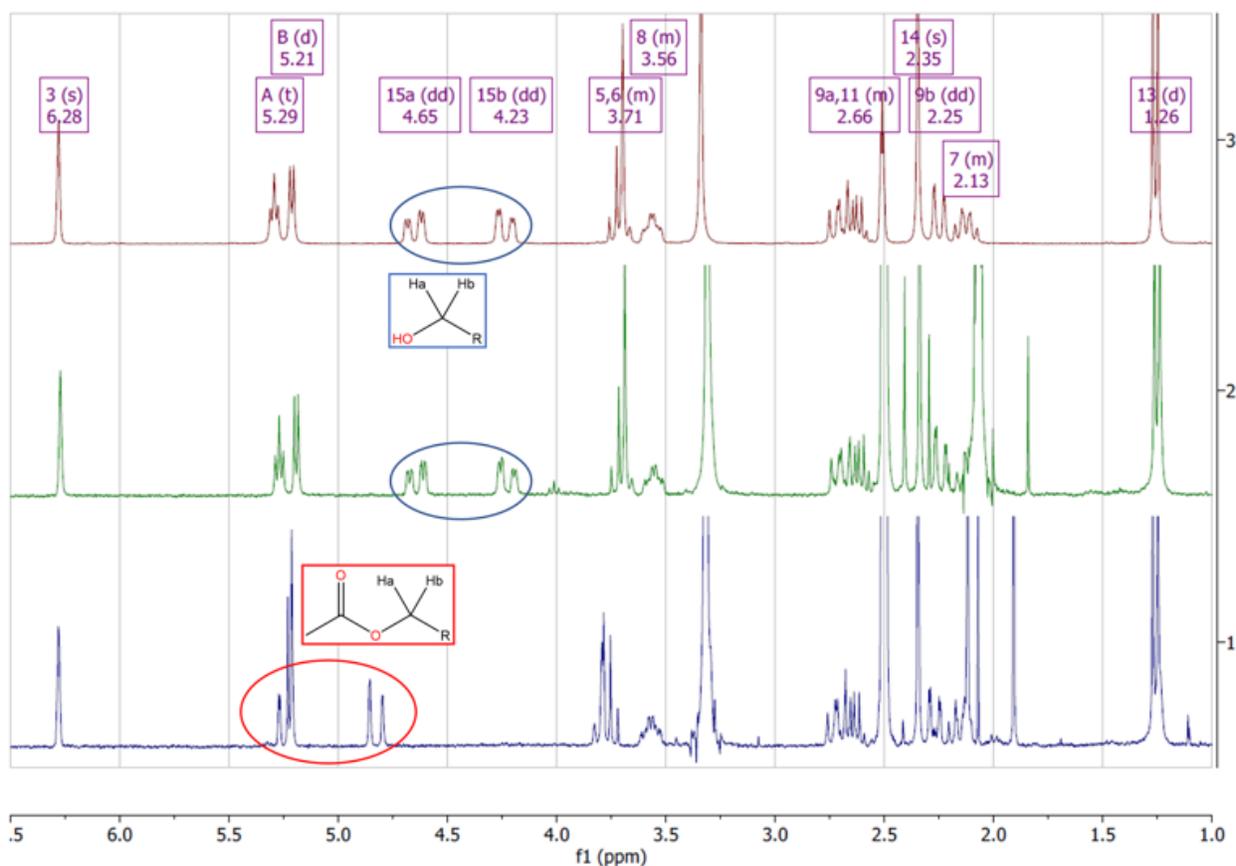


Figure 55. Comparaisons des milieux réactionnels par RMN 1H (DMSO-D6). 1) Milieu réactionnel avec 10 mM de DHLc, 100 mM d'acétate de vinyle, 20 mg de N435 après 48 h ; 2) Milieu réactionnel témoin en absence de lipase après 48 h ; 3) DHLc pure utilisée dans la réaction

Un spectre RMN ^{13}C (APT) du milieu réactionnel a également été obtenu, et nous a permis de proposer une attribution cohérente de l'ensemble des carbones de la molécule qui correspond à la DHLc acétate. De plus, un spectre de masse (QTOF, mode ESI+) du composé a montré la présence d'un fragment d'une valeur de $m/z = 321,12$ qui correspond à l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la DHLc acétate, cette dernière ayant une masse molaire de 320,12599 g/mol.

L'ensemble des données permettent de confirmer nos hypothèses, on remarque que : (1) La réaction d'acylation catalysée par Novozym 435 est très sélective pour l'alcool primaire ; (2) L'enzyme n'est pas capable d'hydrolyser la lactone dans ces conditions. Ces résultats remarquables montrent que nous avons pu mettre en place un protocole enzymatique permettant la formation d'un ester de la DHLc, avec un taux de conversion >99 % après 48 h et avec une régiosélectivité totale pour l'alcool primaire (**Figure 56**).

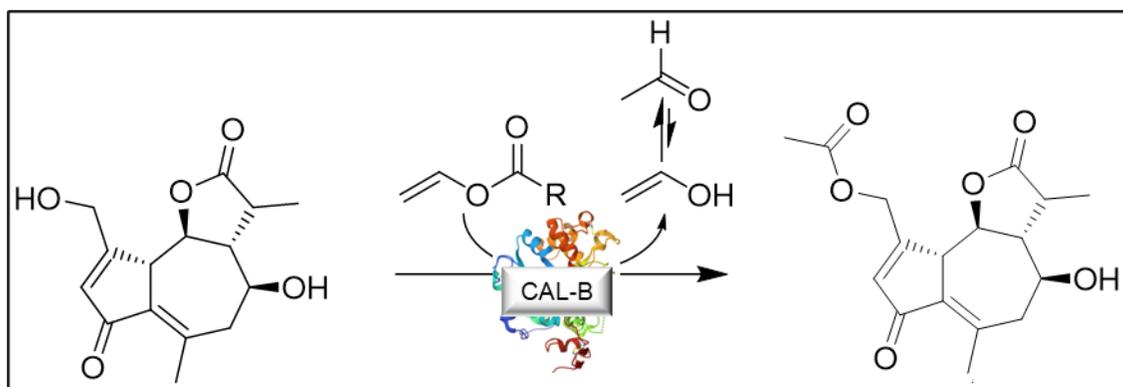


Figure 56 Illustration de la réaction d'acétylation de la DHLc catalysée par la CAL-B

Le spectre RMN du proton est particulièrement intéressant puisqu'il montre qu'il est possible de suivre la réaction en observant les signaux des protons 15a et 15b mentionnés auparavant. En effet, ceux-ci subissent un décalage lors de l'acylation de l'alcool primaire, similaire à l'effet observé pour les monoterpénoïdes. Ceci sera particulièrement utile pour la suite de l'étude.

Nous avons également reproduit la réaction en divisant par 10 la quantité d'enzyme utilisée, c'est-à-dire avec uniquement 2 mg de N435. L'idée étant d'avoir une meilleure vision de la performance de cette enzyme dans l'acylation de la DHLc avec l'acétate de vinyle. Ici nous avons opté pour faire des prélèvements au bout de 5 min et de 24 h de réaction. Les analyses par HPLC-MS ont montré que la réaction avait atteint une conversion de 100 % pour le prélèvement à 24 h, faisant preuve de l'excellente performance de l'enzyme dans le cadre de cette réaction.

2.2. Analyse infrarouge

Afin de poursuivre la caractérisation de l'ester, le milieu réactionnel et le témoin sans lipase ont été analysés par infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) dans une microplaque de 96 puits en mode transmission selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. La méthode que nous avons mise en place consiste à déposer 10 μL du milieu réactionnel (après filtration, concentration à 2 mbar et reprise dans 100 μL d'acétonitrile) dans le puits. Après quelques minutes, l'acétonitrile s'évapore et le précipité blanc résultant peut être analysé. Nous avons également vérifié que la même analyse peut être réalisée à partir des milieux réactionnels filtrés sans passer par l'étape de concentration sous vide. Ceci est dû au fait que l'acétate de vinyle est suffisamment volatil et n'est plus présent au moment de l'analyse. Or il peut être nécessaire d'ajuster le volume déposé afin d'obtenir une quantité suffisante de solide permettant la bonne identification des bandes des molécules d'intérêt.

L'analyse FTIR en microplaque nous a permis d'obtenir le spectre infrarouge de la DHLc et de la DHLc-Ac, à partir du milieu réactionnel contenant la lipase et du témoin sans cette dernière, respectivement (spectres en annexe). Sur le spectre du témoin (**A – Figure 57**) on note la présence des bandes caractéristiques que l'on peut attribuer avec une bonne certitude : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du cycle lactone à 1780 cm^{-1} , $\nu(\text{C}=\text{O})$ de la cyclopentenone à 1686 cm^{-1} et deux bandes $\nu(\text{C}=\text{C})$ des doubles liaisons vers $1617\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$. On peut considérer ces bandes comme étant une « signature spectrale » de la DHLc. Concernant le spectre du milieu réactionnel (**B – Figure 57**) on confirme la présence des bandes décrites précédemment, ainsi

que deux nouvelles bandes : $\nu(\text{C}=\text{O})$ à $\pm 1746 \text{ cm}^{-1}$, et $\nu(\text{C}-\text{O}) = 1229 \text{ cm}^{-1}$. Les caractéristiques de ces dernières sont cohérentes avec la formation d'une nouvelle liaison ester.

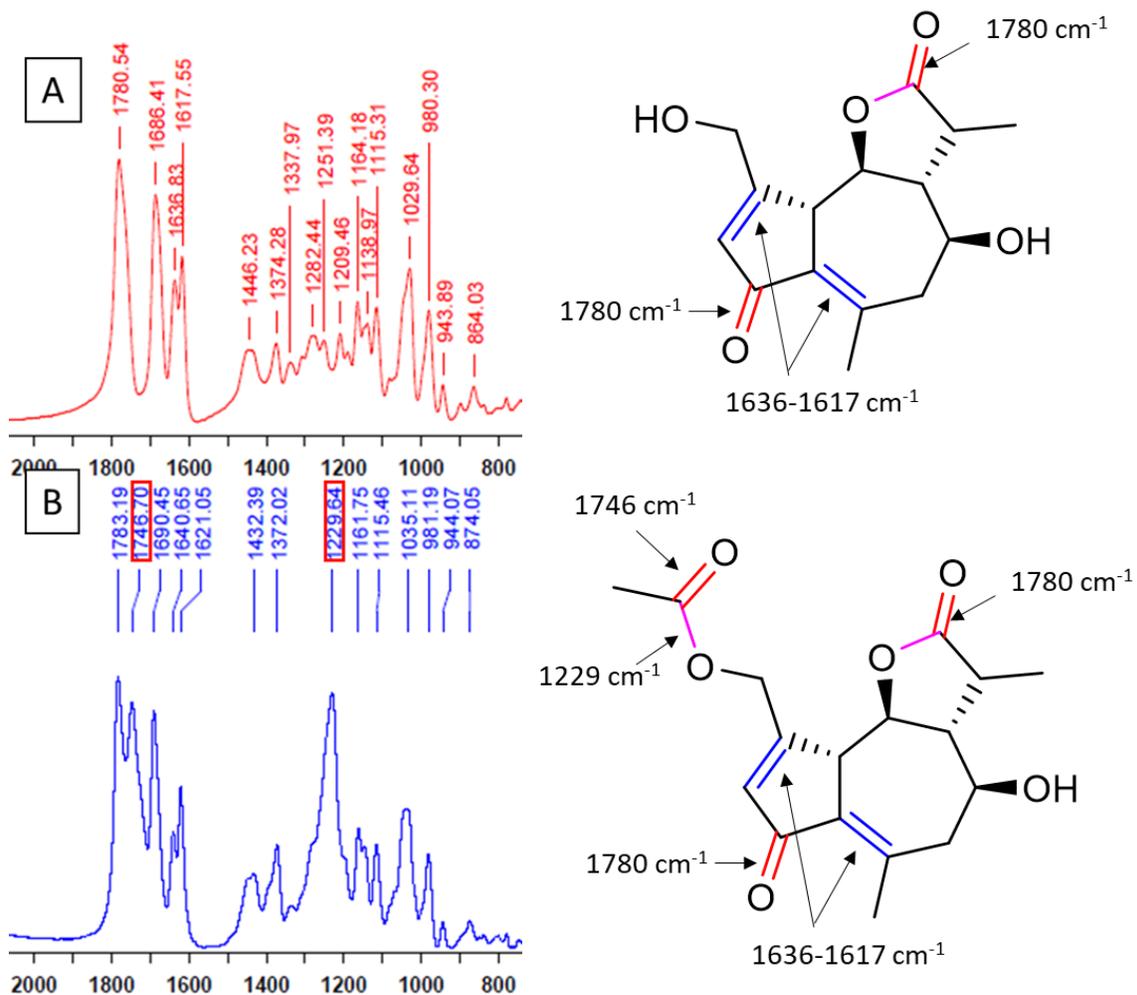


Figure 57 FTIR de la réaction de transestérification de la DHLc après 48h avec (A) Témoin sans lipase et (B) Milieu réactionnel avec lipase

2.3. Estérification enzymatique entre la DHLc et l'acide acétique

Les expériences précédentes nous ont montré que la DHLc était un très bon substrat de la CAL-B et que, en utilisant le bon donneur d'acyle dans les bonnes conditions, il était possible d'atteindre une conversion totale pour l'ester d'intérêt, et ceci de manière sélective pour la fonction alcool primaire.

Ici la réaction s'adapte très bien à l'utilisation de l'acétate de vinyle, cependant on peut également se poser la question de son remplacement par l'acide acétique. Dans ce contexte, l'hypothèse la plus logique est que la réaction devrait fonctionner avec l'acide acétique, mais probablement avec un rendement et/ou une vitesse inférieure comparée à l'acétate de vinyle. Étant donné qu'aucune réaction d'estérification avec la DHLc ni avec les autres LST présents dans la chicorée n'est décrite dans la littérature, nous avons opté pour « sacrifier » un peu de notre précieuse DHLc afin de tester cette hypothèse.

Pour ceci, la réaction a été faite dans les mêmes conditions que précédemment, avec 10 équivalents d'acide acétique et 20 mg de N435. Nous avons effectué des prélèvements de 25 µL au bout de 5 min, 24 h, 48 h et 144 h (6 jours). Ces prélèvements ont été analysés par HPLC-MS, avec la même méthode utilisée pour la réaction avec l'acétate de vinyle. Au bout du 6^{ème} jour, le milieu réactionnel a également été analysé par RMN ¹H pour confirmer la structure des composés.

Comme prévu, l'estérification avec l'acide acétique est moins efficace que la transestérification avec l'acétate de vinyle. En effet, un taux de conversion maximale de 76 ± 1 % est atteint au bout de 48 h. Or, on remarque que la réaction n'évolue quasiment plus après 24 h d'agitation. Il est probable qu'un équilibre thermodynamique soit atteint sous ces conditions réactionnelles (**Tableau 10**). Dans un futur, si l'on souhaite optimiser la réaction avec l'acide acétique, il serait important de réaliser une étude des paramètres cinétiques avec différentes concentrations de DHLc et d'acide, ainsi que de doser la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel. Il est probable que des taux de conversion plus élevés puissent être atteints avec une concentration plus importante de DHLc.

Temps de réaction	5 min	24 h	48 h	144 h
Conversion	0 %	74 %	76 %	72 %

Tableau 10. Taux de conversion obtenus lors de l'estérification entre la DHLc et l'acide acétique, estimé par HPLC-MS et RMN ¹H. Conditions : 10 mM DHLc, 100 mM acide acétique, 20 mg N435, 37 °C, 35 rpm dans 1 mL de MBTE : ACN (3 : 1). Les % de conversion sont calculés à partir du ratio des aires entre la DHLc et la DHLc-A formée au cours de la réaction.

3. Synthèse d'autres esters aliphatiques de la 11 β ,13-dihydrolactucine

3.1. Mise en œuvre des réactions

À la suite de la synthèse de l'ester acétyle initial, nous avons exploré la possibilité d'élargir le champ d'application de la réaction, afin de créer des composés plus apolaires avec une réactivité accrue (par exemple, cytotoxicité envers les cellules malignes), comme démontré précédemment dans la littérature avec des substrats similaires. Nous avons remarqué que les articles décrivant des réactions de transestérification impliquant des lipases et des esters vinyliques s'intéressent majoritairement à l'introduction de chaînes alkyle de différentes tailles (de 2 à 18 carbones). Et de la même manière, ces esters vinyliques aliphatiques sont les plus facilement retrouvés chez les fournisseurs de produits chimiques. Nous avons donc commandé certains d'entre eux pour étudier la réaction d'acylation de la DHLc lors de l'introduction de chaînes alkyle de taille croissante. Le propionate, l'hexanoate et l'octanoate de vinyle ont alors été utilisés dans ce contexte. De plus, le vinyl chloroacétate a également été testé afin d'explorer l'introduction d'un halogène *via* cette même réaction (**Figure 58**).

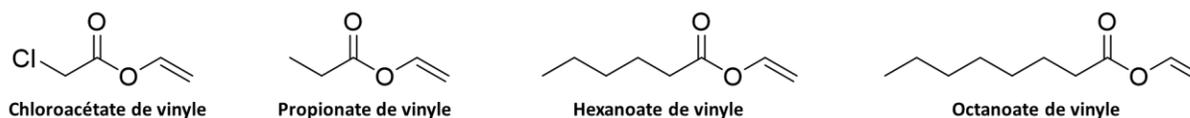


Figure 58 Structure des esters vinyliques utilisés comme donneur d'acyle

Les mêmes conditions que ci-dessus ont été appliquées en utilisant différents donneurs d'acyle (20 mg de Novozym 435, 10 mM de DHLc et 100 mM de donneur d'acyle). Comme pour l'acétate de vinyle, le propionate de vinyle a conduit à une conversion de 100 % en 48 h (**Tableau 11**). Fait intéressant, une conversion légèrement inférieure a été obtenue avec le chloroacétate de vinyle par rapport au propionate de vinyle, suggérant que la présence de l'atome de chlore plus grand semble limiter la capacité de l'enzyme à réaliser la réaction. Il reste plausible qu'une conversion quasi complète pourrait être atteinte avec un temps de réaction plus long. Cette hypothèse n'a pas été étudiée dans la présente étude.

Cependant, la conversion a légèrement diminué avec des chaînes plus longues, atteignant 74 % et 69 % avec l'hexanoate de vinyle et l'octanoate de vinyle, respectivement. Enfin, il convient de noter qu'aucune acylation n'a eu lieu sur l'alcool secondaire dans ces expériences. Les différents taux de conversion obtenus avec les donneurs d'acyle évoqués précédemment est résumée dans le tableau ci-dessous.

	Acide acétique	Acétate de vinyle	Propionate de vinyle	Hexanoate de vinyle	Octanoate de vinyle	Chloroacétate de vinyle
DHLc	76 %	>99 %	>99 %	74 %	69 %	92 %

Tableau 11 Taux de conversion obtenus après 48 h pour les différents donneurs d'acyle dans la réaction d'acylation entre la DHLc avec 20 mg de N435 à 37 °C. 10 équivalents de donneur d'acyle sont utilisés par rapport à la DHLc

Par ailleurs, après avoir validé les structures par RMN et LC-MS, nous avons exploré les propriétés physico-chimiques potentielles de ces nouvelles entités (**Figure 59**). À cette fin, nous avons fait appel à SwissADME, un outil gratuit développé par le Swiss Institute of Bioinformatics.^[154] Cet outil est spécialement conçu pour prédire les propriétés physico-chimiques, les paramètres ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion), les propriétés pharmacocinétiques, ainsi que la compatibilité d'une molécule avec les critères de "drug-likeness" et de chimie médicinale. Parmi ces facteurs, un des paramètres clés à considérer est la lipophilie d'une molécule, représentée par le $\log(P)$. Dans ce contexte, la "rule of five", postulée par le chimiste Christopher A. LIPINSKI, est un guide qui postule qu'une molécule ayant un potentiel d'être un médicament administré par voie orale devrait respecter certaines limites.^[155] Parmi ces limites, Lipinski postule que le $\log(P)$ calculé du composé ne devrait pas excéder la valeur de 5. Cette limite est établie pour assurer une absorption et une solubilité optimales de la molécule. La lipophilie, mesurée par le $\log(P)$, est un indicateur de la solubilité d'une molécule dans les lipides, et par conséquent, de sa capacité à traverser les membranes biologiques.

Selon les données obtenues *via* SwissADME, aucune des molécules étudiées ne présente un $\log(P)$ supérieur à 5, ce qui est prometteur pour leur potentiel d'absorption par voie orale. De plus, les autres critères de la règle de Lipinski sont également respectés par ces molécules, c'est-à-dire pas plus de 5 donneurs de liaisons hydrogène, pas plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogène et une masse moléculaire inférieure à 500 g/mol.

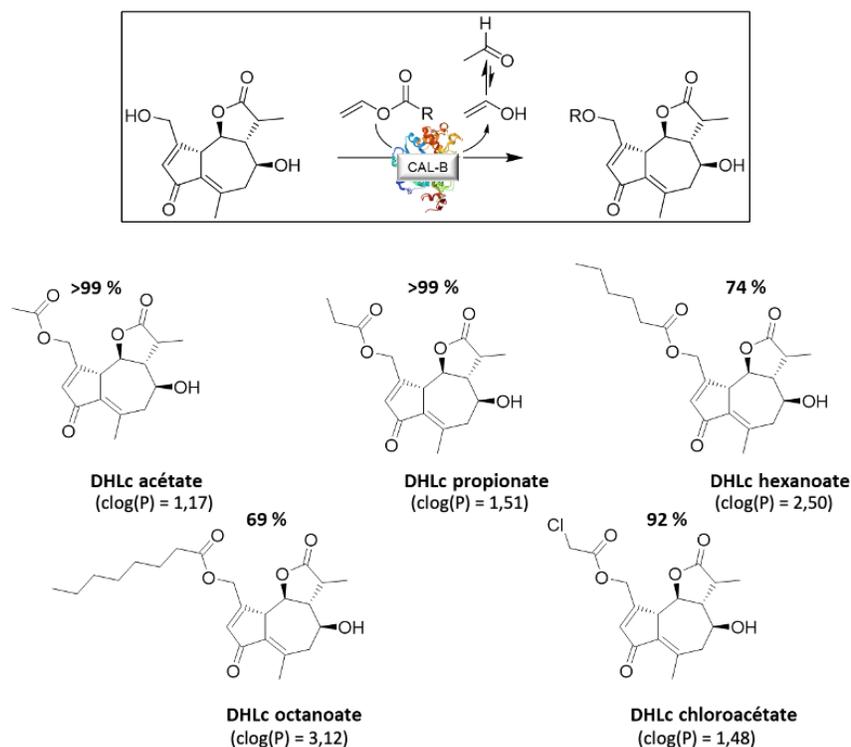


Figure 59 Représentation de la réaction d'acylation de la DHLc catalysée par la CAL-B immobilisée (Novozym 435). Structure des différents dérivés synthétisés avec le % de conversion associé après 48 h. Entre parenthèse figurent les valeurs du $\log(P)$ calculées sur l'algorithme de SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics)

Il semblerait que la différence dans les taux de conversion obtenus pour les différentes chaînes pourrait être due à des facteurs d'encombrement stérique. En effet, les chaînes hexyle et octyle peuvent théoriquement entraîner un encombrement stérique plus important que les chaînes courtes (acétyle et propionyle) au niveau du site actif de la lipase, après la formation du complexe acyl-enzyme. Ceci sera développée à continuation.

3.2. Explication de la régiosélectivité observée

Pour affiner notre compréhension de cette réaction, et d'essayer d'apporter une réponse aux différences de réactivité et de régiosélectivité observées, nous avons eu l'idée de réaliser une étude de modélisation moléculaire. Dans cette optique, nous avons collaboré avec le Pr Catherine HUMEAU de l'Université de Lorraine. Elle dispose non seulement des logiciels nécessaires pour ce type d'étude, mais aussi d'une expertise reconnue dans les simulations de docking spécifiques aux lipases. Grâce à son intervention, des calculs de docking ont été effectués, explorant divers modes de liaison entre différents complexes acyl-enzyme et les LST, en se basant sur les structures 3D des molécules pertinentes à notre étude. Ces calculs ont mis en évidence les modes de liaison les plus favorables du point de vue énergétique entre la DHLc et les donneurs d'acyle différents en fonction de la longueur de la chaîne alkyle :

- Chaînes courtes (C2 et C3)

Lors de la transestérification avec l'acétate de vinyle, les calculs de docking flexible ont indiqué que les effets stériques à eux seuls étaient insuffisants pour expliquer la sélectivité envers l'alcool primaire. En effet, deux orientations principales ont été observées : soit avec le groupe alcool primaire, soit avec le groupe alcool secondaire orienté vers les résidus catalytiques. Une analyse détaillée des distances a montré que 30 % des poses présentaient soit le groupe alcool primaire, soit le groupe alcool secondaire proche de la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme. Parmi ces poses, les deux groupes hydroxy se trouvaient à une distance inférieure à 4 Å, celle-ci étant la distance nécessaire pour l'attaque nucléophile et la formation de la liaison ester. L'interaction de l'alcool primaire de la DHLc avec l'intermédiaire acyl-enzyme lors de la réaction avec l'acétate de vinyle peut être visualisée dans la **Figure 60**. Une distance de 3,881 Å entre l'oxygène et le carbonyle de l'acyl enzyme est observée, permettant l'attaque nucléophile vers cette dernière (**Figure 60**). Un résultat similaire a été obtenu avec la chaîne du propionate de vinyle. Dans le cas de chaînes acyles courtes, ces résultats suggèrent que la sélectivité observée est due à la réactivité intrinsèque des deux groupes hydroxy, plutôt qu'à un encombrement stérique ou à une mauvaise orientation des substrats.

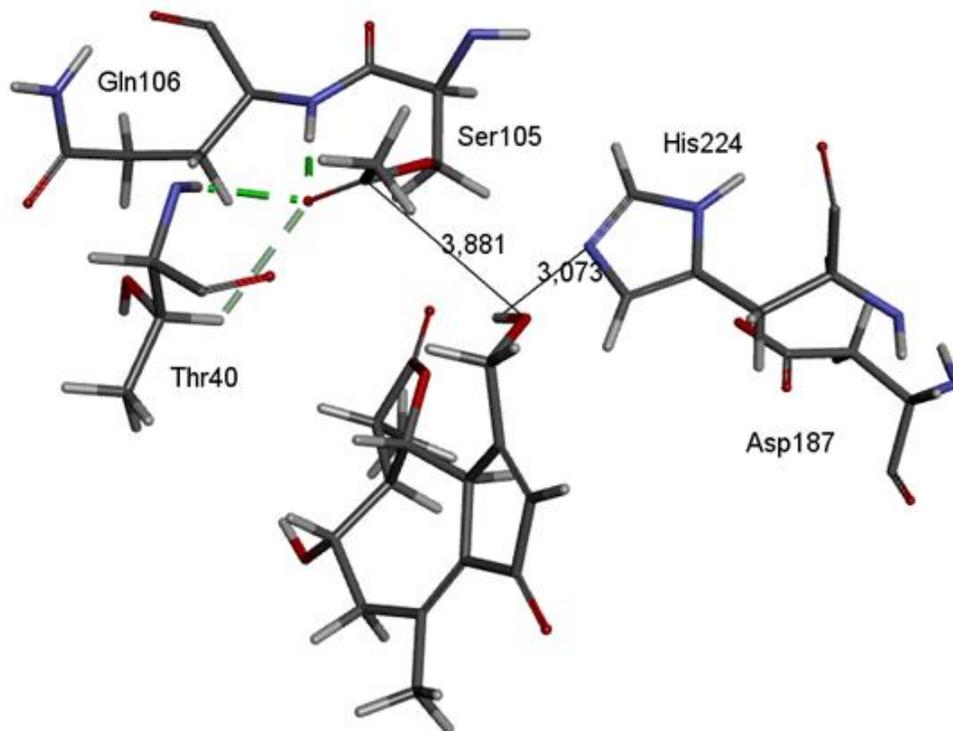


Figure 60 Proximité du groupement OH primaire de la DHLc aux résidus catalytiques de l'intermédiaire acyl-enzyme (formé via l'acylation avec l'acétate de vinyle). Stabilisation de l'intermédiaire par liaisons hydrogène avec les acides aminés de la poche oxyanionique

- Chaînes moyennes (C6 à C8)

D'autre part, lorsqu'on traite avec des chaînes alkyles plus longues, comme celles présentes dans l'hexanoate et l'octanoate de vinyle, l'encombrement stérique devient plus significatif. Cela conduit à des poses moins enfouies et à des distances accrues entre le DHLc et les résidus catalytiques. Seuls 3 % et 1 % des poses se rapprochaient des résidus catalytiques en présence de la chaîne hexanoyle et de la chaîne octanoyle, respectivement. De plus, seul l'alcool primaire du DHLc pouvait atteindre la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme. Ces résultats suggèrent qu'à mesure que la longueur de la chaîne du donneur d'acyle augmente, les modes de liaison du complexe enzyme-substrat deviennent moins favorables et l'effet stérique joue un rôle plus déterminant dans la sélectivité. Cela est également en corrélation avec une réactivité réduite par rapport aux esters de vinyle avec une chaîne latérale plus courte, résultant en une conversion plus faible.

Il semble donc que, pour les donneurs d'acyle possédant une petite chaîne alkyle latérale, les facteurs stériques ne peuvent expliquer la sélectivité totale envers le groupe alcool primaire. Cela implique, comme discuté, que cet effet pourrait être partiellement médié par d'autres facteurs, par exemple la nucléophilie supérieure des groupes hydroxy primaires, liée à des effets électroniques plus favorables. Cependant, lorsqu'il s'agit de chaînes plus longues, la régiosélectivité vis-à-vis de l'alcool primaire s'explique par des facteurs stériques puisqu'uniquement celui-ci peut réagir avec le complexe acyl-enzyme.

4. Synthèse d'esters non-aliphatiques de la 11 β ,13-dihydrolactucine

Nous avons pu montrer qu'il était possible d'acyler la fonction alcool primaire de la DHLc de façon sélective. En utilisant la CAL-B il est en effet possible de synthétiser des esters hydrophobes avec des pourcentages de conversion assez élevés. Nous voulions savoir s'il était possible d'élargir notre approche à la synthèse de dérivés d'autres types d'ester de la DHLc. Parmi les potentiels dérivés, nous avons considéré la famille des esters portant des cycles aromatiques, pour lesquels on peut s'inspirer des dérivés naturels : 11 β ,13-dihydrolactucopicine (DHLp) et lactucopicine (Lp). Or, il convient de souligner que sur les dérivés naturels la chaîne aromatique est uniquement présente au niveau de l'alcool secondaire. Alors, pourquoi ne pas essayer de synthétiser des dérivés similaires au niveau de l'alcool primaire ?

Pour ceci nous avons besoin des donneurs d'acyle correspondants, mais malheureusement la disponibilité des aryl vinyl esters dans le commerce est très limitée. Nous avons profité de cette contrainte pour proposer une collaboration avec le Pr Nicolas Willand, encadrant de la thèse de Mme Francesca Ruggieri à la faculté de pharmacie de Lille. Ils ont été en mesure de nous fournir un panel de plusieurs aryl vinyl esters pouvant apporter des activités biologiques d'intérêt (**Figure 61**).

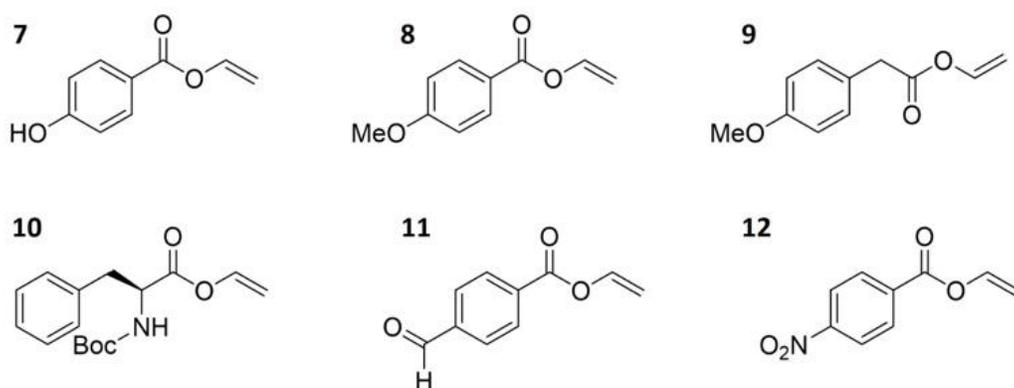


Figure 61 Aryl vinyl esters testés dans la réaction d'acylation de la DHLc catalysée par Novozym 435

Nous avons testé ces donneurs d'acyle aromatiques dans l'acylation de la DHLc dans les mêmes conditions mises au point précédemment. C'est-à-dire avec 10 équivalents de donneur d'acyle, 20 mg de N435 et du tamis moléculaire dans 1 mL de MTBE:ACN (3:1) à 37 °C.

Malgré l'utilisation de conditions identiques, aucun de ces nouveaux donneurs d'acyle aromatique ne s'est avéré efficace pour l'acylation du DHLc, puisque aucun produit d'intérêt n'a été détecté. Cependant, certains d'entre eux ont subi une hydrolyse en leurs acides carboxyliques correspondants, probablement due à l'eau résiduelle dans le milieu réactionnel. Cela a été particulièrement prononcé pour l'acétate de vinyle-2-(4-méthoxyphényl) (**9**) qui a subi une hydrolyse complète, et dans une moindre mesure pour le 4-formylbenzoate de vinyle (**11**) et le 4-nitrobenzoate de vinyle (**12**), présentant plus de 50 % d'hydrolyse.

D'après la littérature, il semblerait que la CAL-B présente des difficultés pour catalyser des acylations avec des aryl vinyl esters, notamment avec le vinyl benzoate. En effet, le même comportement a été observé dans notre étude avec la DHLc. Deux hypothèses peuvent être postulées :

- 1) La réaction avec des aryl vinyl esters n'est pas favorable à cause de l'interaction du cycle aromatique avec le groupement carbonyle. Particulièrement lorsque le cycle aromatique apporterait de la densité électronique à ce dernier, le rendant moins susceptible à l'attaque avec le résidu sérine catalytique.
- 2) La réaction avec des aryl vinyl esters n'est pas favorable à cause de facteurs stériques et/ou électroniques liés à la présence d'un cycle aromatique dans la chaîne.

Le fait d'avoir utilisé des donneurs d'acyle avec des chaînes aryliques portant des substituants avec des comportements chimiques différents nous a permis de trier plus facilement parmi les deux hypothèses. De même, la présence d'eau résiduelle dans le milieu, ayant donné lieu à des réactions d'hydrolyse, nous montre que certains d'entre eux peuvent être pris en charge par la lipase. Les substrats (11) et (12) portent un cycle aromatique déficient en électrons, et donc un groupement carbonyle bien plus électrophile que les substrats (7) et (8). De même, le carbonyle du substrat (9) n'est pas conjugué avec le cycle aromatique, ceci a pour conséquence de le rendre plus flexible mais surtout plus électrophile que le substrat (8). C'est donc pour ces raisons que les substrats (9), (11) et (12) sont plus réactifs et plus susceptibles à l'hydrolyse. Néanmoins, malgré leur réactivité, cela n'est pas suffisant pour permettre la réaction d'acylation avec la DHLc. Ces observations permettent de rejeter l'hypothèse 1). Il semble donc que l'hypothèse 2) soit la plus proche de la réalité.

En essayant de trouver l'explication à cette absence de réactivité dans la réaction d'acylation, nous avons eu l'idée de comparer le composé (8), ayant un cycle phénylique, avec le composé (9), ayant un cycle benzylique (sans conjugaison entre le carbonyle et le noyau aromatique). Pour cela, des simulations de docking moléculaire réalisés par le Pr Catherine Humeau sur les modes de liaison les plus probables entre la DHLc et les deux substrats mentionnés nous ont apporté des éléments de réponse.

Finalement, des simulations de docking entre les complexes acyl-enzyme correspondant aux substrats (8) et (9) et la DHLc ont montré que toutes les poses montraient la DHLc à des distances supérieures à 5 Å de la fonction carbonyle. Ces distances sont beaucoup trop importantes et ne permettent pas la formation de l'ester d'intérêt. Les calculs suggèrent que les chaînes aliphatiques sont généralement préférées dans la réaction d'acylation avec la DHLc et d'autres LST similaires. En particulier, les chaînes présentant un haut degré de flexibilité sont d'avantage favorisées. Leur caractère lipophile et leur flexibilité facilitent leur positionnement le long de la paroi hydrophobe de la cavité catalytique de la CAL-B. Par conséquent, ce positionnement optimise l'espace disponible dans la cavité et favorise la formation des états de transition et intermédiaires clés dans la réaction d'acylation. Ceci peut être visualisé via le docking avec la DHLc avec l'intermédiaire acyl-enzyme formé avec une chaîne alkyle longue (ici octanoyle). Dans un premier temps, on remarque que les principales interactions entre la DHLc et les complexes enzyme-substrat sont de nature hydrophobe. En particulier, ce sont les résidus Ile189, Ile285 et Val154 localisés aux deux côtés de la cavité qui interagissent avec le cycle central à 7 chaînons et les groupements méthyle de la molécule (**Figure 62-A**). On remarque également que l'espace occupé par la DHLc à l'intérieur de la cavité est déjà assez conséquent, même en absence de donneur d'acyle. Or, dans la **Figure 62-B** on observe en effet qu'une chaîne alkyle flexible (dont l'octanoyle) peut profiter de l'espace disponible dans la cavité en se collant contre la paroi hydrophobe, chose qu'une chaîne rigide ne serait pas capable de faire en présence d'une molécule encombrante comme la DHLc

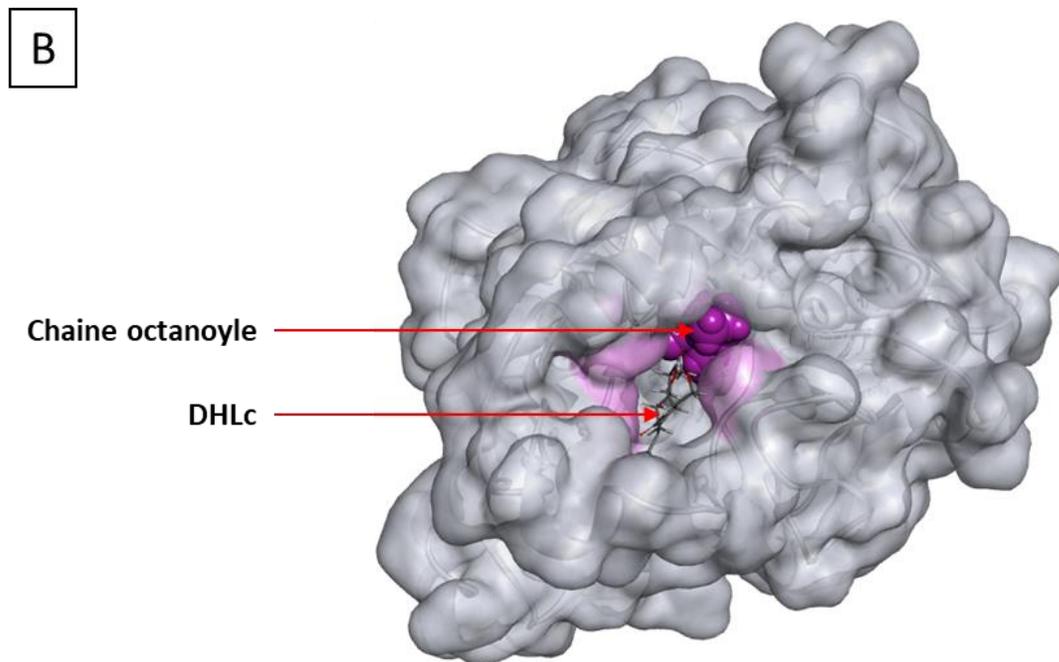
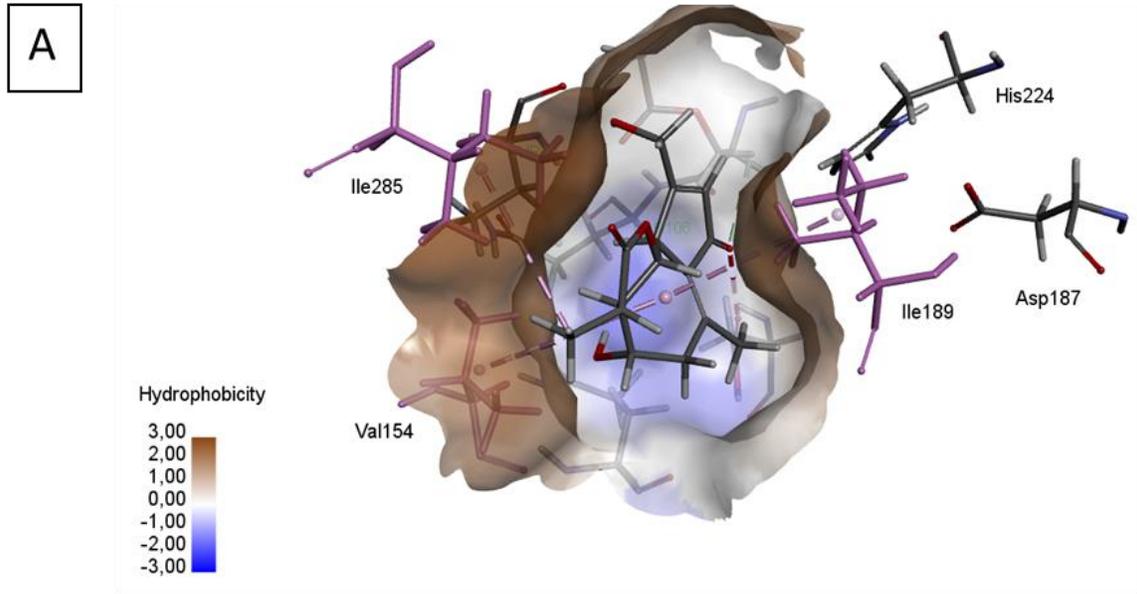


Figure 62 Représentation des interactions entre la DHLc et la cavité catalytique de la CAL-B. A) Interactions majoritairement hydrophobes entre la DHLc et les résidus Ile189, Ile285 et Val154, avec les régions plus hydrophiles de la cavité (bleu) et les plus hydrophobes (marron) ; B) Mode de liaison entre la DHLc et l'intermédiaire acyl-enzyme de la CAL-B en présence de la chaîne octanoyle (molécule en violet). La surface accessible au solvant est représentée en gris, et les résidus hydrophobes Ile189 et Ile285 en violet

Suite à ces résultats, la lipase A de *Candida antarctica* et une lipase de *Pseudomonas cepacia* ont également été testées avec les composés (**9**) et (**12**), mais toutes deux ont échoué à catalyser la réaction d'acylation désirée dans ces conditions. L'introduction de chaînes ester avec des noyaux aromatiques est actuellement une limite de notre méthode. Il existe sans doute une lipase et un protocole permettant d'accomplir cet objectif, néanmoins, dû aux quantités limitées de DHLc à notre disposition, nous avons décidé de ne pas poursuivre cette étude à ce stade.

II. Extension du procédé aux autres LST de la chicorée, synthèse des dérivés acétate de la lactucine, lactucopigrine et dihydrolactucopigrine

1. Acétylation de la lactucine, lactucopigrine et la 11 β ,13-dihydrolactucopigrine

Nous avons démontré que notre méthodologie permettait l'acylation enzymatique régiosélective du groupe alcool allylique primaire dans le DHLc. En utilisant divers esters aliphatiques comme donneurs d'acyle, nous avons réussi à obtenir des taux de conversion très élevés.

Étant donné que la lactucine (Lc) présente des caractéristiques structurales similaires au DHLc, à l'exception de la présence d'une fraction α -méthylène-gamma lactone (α -MGL), et compte tenu de son abondance en tant que STL dans la chicorée, nous nous sommes demandé si nous pouvions estérifier son alcool primaire en utilisant la même approche que pour le DHLc. Pour cette expérience, nous avons choisi l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle car il a montré une conversion complète avec le DHLc, et les mêmes conditions que celles décrites dans la section précédente ont été appliquées (**Figure 63**).

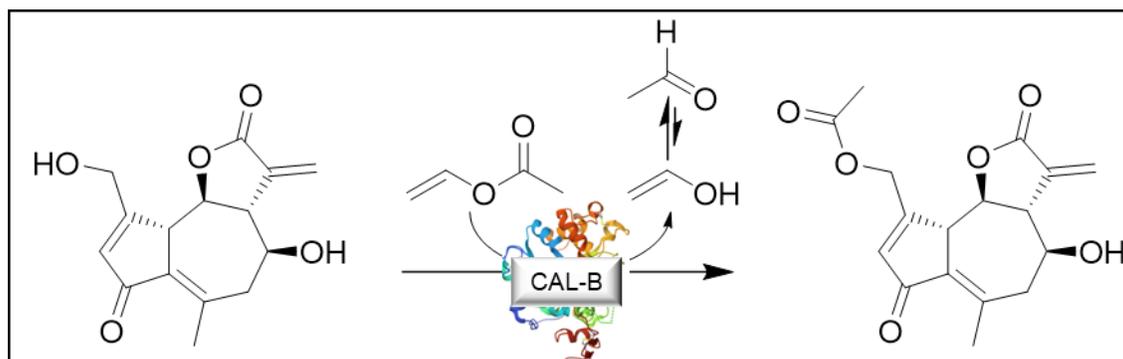


Figure 63 Illustration de l'acétylation de la lactucine avec l'acétate de vinyle

L'analyse ^1H RMN du mélange réactionnel après 48 h a montré les résultats attendus. Comme pour la DHLc, les hydrogènes en alpha de l'alcool primaire, initialement représentés par un doublet de doublets avec un fort effet de toit à 4,25 ppm ($J= 18,8$ Hz, 4,9 Hz) et 4,65 ($J= 18,8$ Hz, 5,7 Hz), sont remplacés par deux nouveaux pics avec des caractéristiques de couplage similaires à 4,87 et 5,25 ppm, respectivement. De plus, les deux doublets à 6,04 et 6,15 ppm correspondant aux deux hydrogènes du carbone n°13 engagés dans la double liaison exocyclique ne sont pas modifiés lors de la réaction (**Figure 64**). Ces résultats montrent une conversion proche de 100 % et une sélectivité parfaite envers l'alcool primaire. Au même temps, la fraction α -MGL est restée inchangée comme le montre le spectre ^1H RMN (**Figure 64**) par rapport au témoin négatif réalisé en l'absence de lipase.

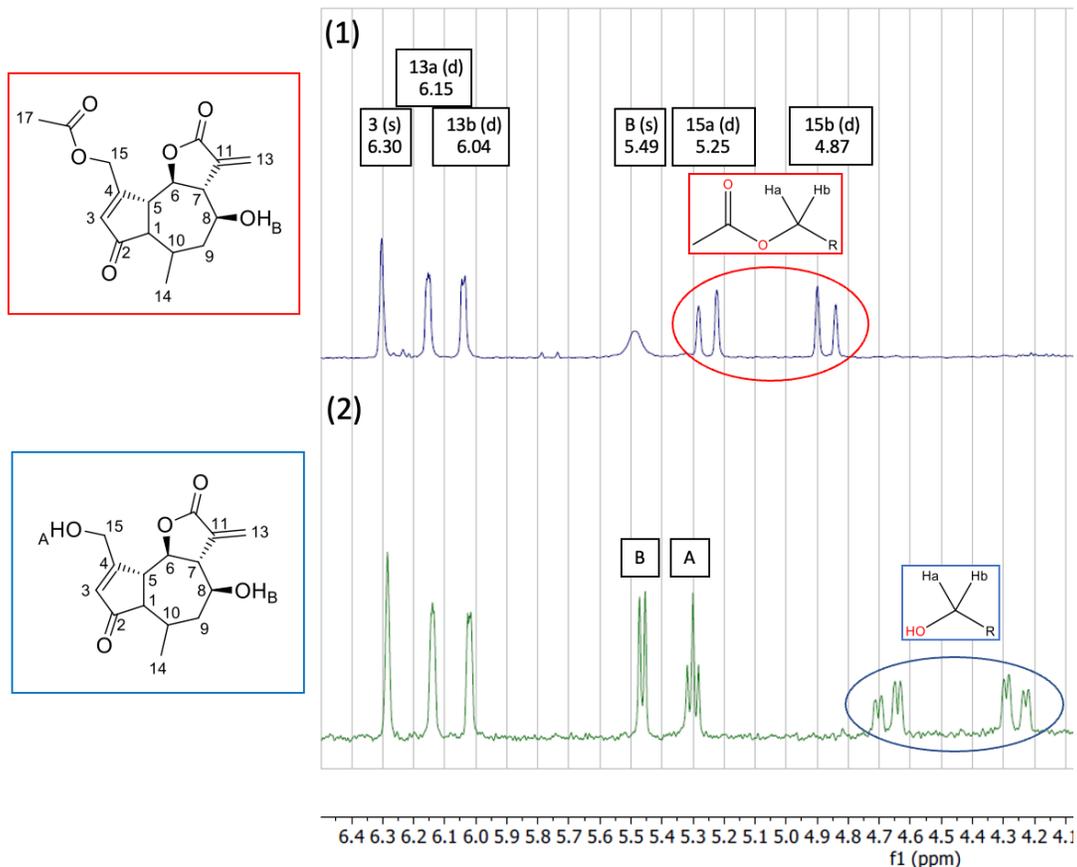


Figure 64 . Spectres ^1H NMR (DMSO-D_6) des milieux réactionnels issus de la transesterification entre la Lc et l'acétate de vinyle. (1) Milieu réactionnel après 48 h avec 10 mM de Lc, 100 mM d'acétate de vinyle, 20 mg de N435; (2) Milieu réactionnel du témoin négatif en absence de lipase

Forts de ces résultats prometteurs et dans le but d'étendre ce concept à la majorité des STLs trouvées dans la racine de chicorée, nous avons finalement répliqué l'expérience précédente avec la lactucopicrine (Lp) et la $11\beta,13$ -dihydrolactucopicrine (DHLp). Ces deux molécules correspondent aux analogues ester de Lc et DHLc, respectivement, formés sur leurs sites d'alcool secondaire avec l'acide 4-hydroxyphénylacétique (**Figure 65**). La haute sélectivité de Novozym 435 nous intéressait particulièrement dans ce cas, car elle ouvrait la perspective d'une estérification sélective de l'alcool primaire, sans risque de transestérification de l'ester préexistant de ces deux substrats. De plus, nous souhaitions évaluer la faisabilité de la réaction, étant donné que ces deux dérivés sont nettement plus encombrants que les substrats précédents en raison de leurs groupes ester aromatiques supplémentaires.

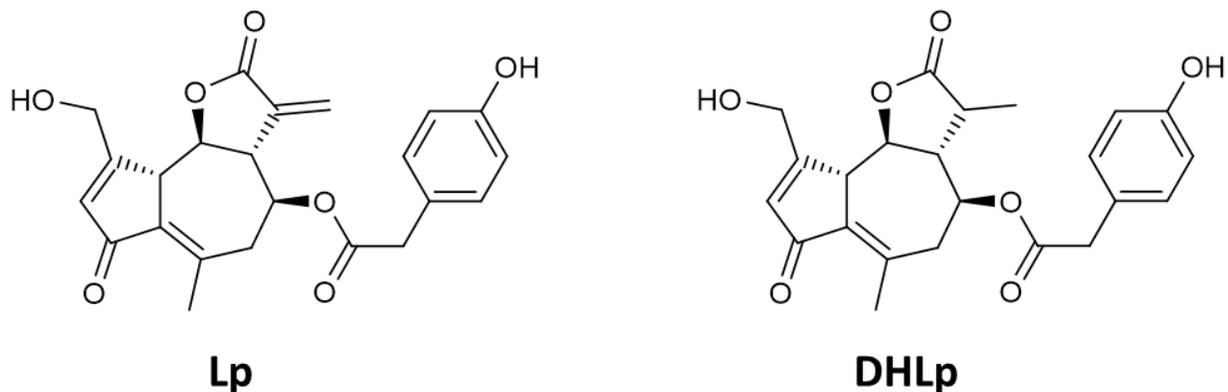


Figure 65 Structure de la lactucopicrine (Lp) et de la dihydrolactucopicrine (DHLp)

En suivant les mêmes conditions utilisées pour la réaction entre Lc et l'acétate de vinyle, nous avons une fois de plus observé une conversion >99 % et une régiosélectivité complète envers le groupe alcool primaire. Les structures de ces nouveaux dérivés semi-synthétiques sont illustrées ci-dessous (**Figure 66**).

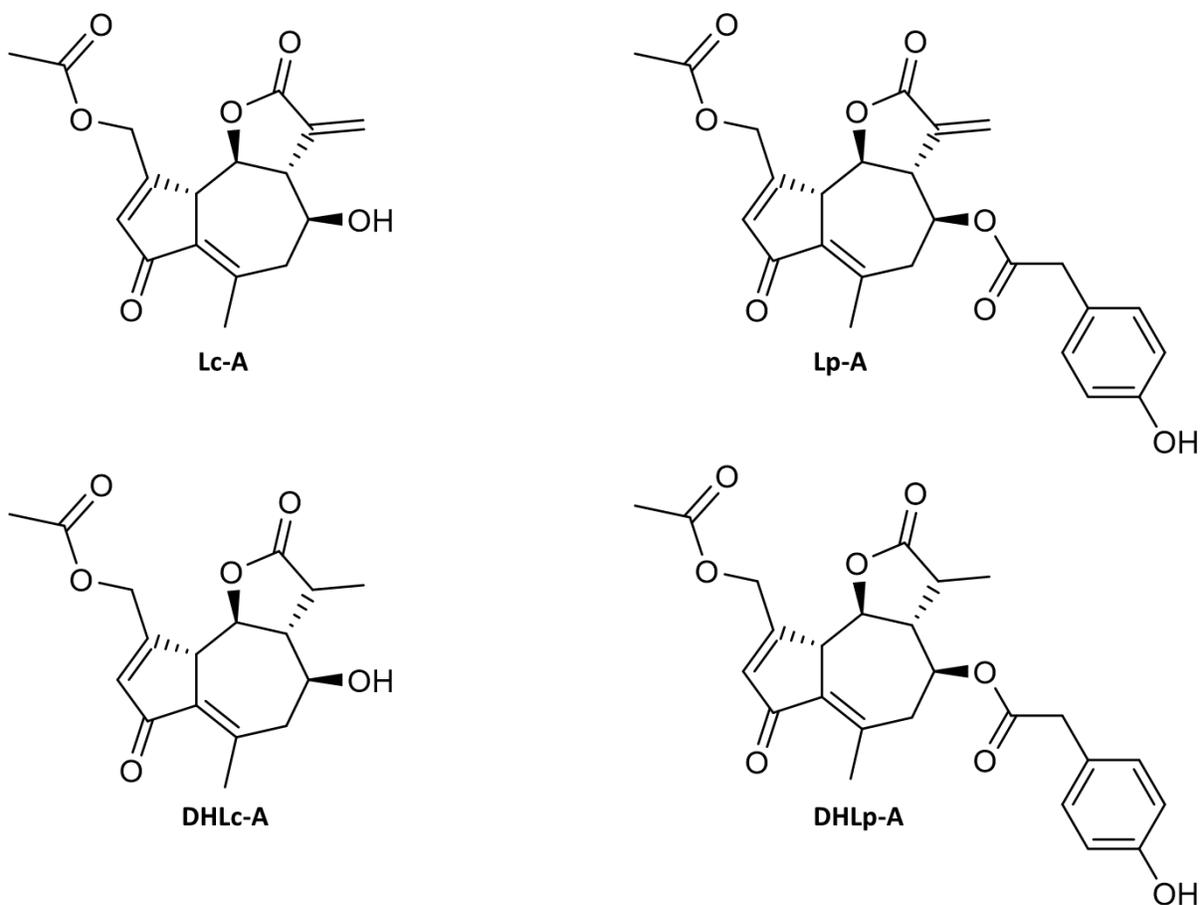


Figure 66 Acétyl esters de quatre LST retrouvés dans la racine de chicorée ayant été synthétisés *via* la transesterification avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase CAL-B

Chapitre 3 : Acylation d'extraits de racine de chicorée riches en lactones sesquiterpéniques d'intérêt

I. Obtention et caractérisation des extraits

1. Introduction

Nous avons montré qu'il est possible d'acétyler sélectivement la fonction alcool primaire de quatre lactones sesquiterpéniques retrouvées dans la racine de la chicorée industrielle. L'utilisation d'un excès d'acétate de vinyle et la CAL-B immobilisée (Novozym 435) permet d'obtenir des conversions proches de 100 % pour les esters d'intérêt.

Un autre objectif de ce projet était de mettre en place une méthode permettant de modifier directement un extrait de racine de chicorée riche en LST. L'idée étant d'étudier le potentiel effet antimicrobien des extraits avant et après modification. Dans ce contexte, travailler avec des extraits de plantes enrichis présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation de molécules pures. Tout d'abord, l'extraction et la purification complète d'une molécule spécifique peuvent être coûteuses et chronophages. De plus, les extraits contiennent souvent une gamme de composés qui peuvent agir en synergie. Cette synergie potentielle, ou "effet d'entourage", peut amplifier l'efficacité biologique de l'extrait par rapport à une molécule isolée.^[156,157] Par exemple, certains composés peuvent améliorer la solubilité ou la biodisponibilité d'autres composés, ou ils peuvent agir sur des cibles biologiques différentes mais complémentaires. En outre, l'utilisation d'extraits enrichis peut également réduire le risque de résistance bactérienne, car les bactéries doivent développer une résistance à plusieurs composés actifs simultanément.^[158,159] Enfin, les extraits de plantes reflètent plus fidèlement le contexte naturel dans lequel les molécules interagissent.

Le défi du était maintenant d'essayer d'appliquer la méthode enzymatique à un extrait de chicorée, dans le but de modifier les composés présents dans le mélange.

2. Obtention d'un extrait de racine par macération

Pour cette étude, nous avons utilisé un échantillon de racine de *Cichorium intybus* var. sativum lyophilisée et transformée en poudre.

Nous avons commencé par une extraction à partir de cette poudre de racine, avec l'objectif d'obtenir un extrait aqueux et une fraction organique riche en LST d'intérêt. Nous avons procédé à une macération de 20g de poudre dans 200 mL d'eau ultra pure (EUP) à 25 °C pendant 24 h, à l'abri de la lumière. Suite à cela, l'extrait a été soumis à un choc thermique à 100 °C pendant 5 minutes pour inactiver les enzymes susceptibles de dégrader nos composés d'intérêt. Après centrifugation, le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre en polytetrafluoroéthylène (PTFE) de 0,2 µm pour éliminer les résidus végétaux. Cette procédure nous a permis de récupérer environ 140mL de solution. Nous avons ensuite fractionné cet extrait brut. Une portion a été extraite trois fois avec un volume équivalent d'acétate d'éthyle, donnant lieu à une fraction organique (PO) qui est ensuite séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et concentrée à pression réduite (8 mbar) jusqu'à obtenir un résidu sec (PO). L'autre portion de l'extrait aqueux brut a été lyophilisée pendant

72 heures afin d'obtenir un extrait brut sec (EB) (**Figure 67**). Au bout de cette procédure, nous avons pu récupérer environ 5,5 mg d'extrait organique sec (PO) par gramme de racine lyophilisée, ainsi que plusieurs grammes d'extrait brut ayant un aspect légèrement visqueux et difficile à manipuler dû à sa haute teneur en inuline.

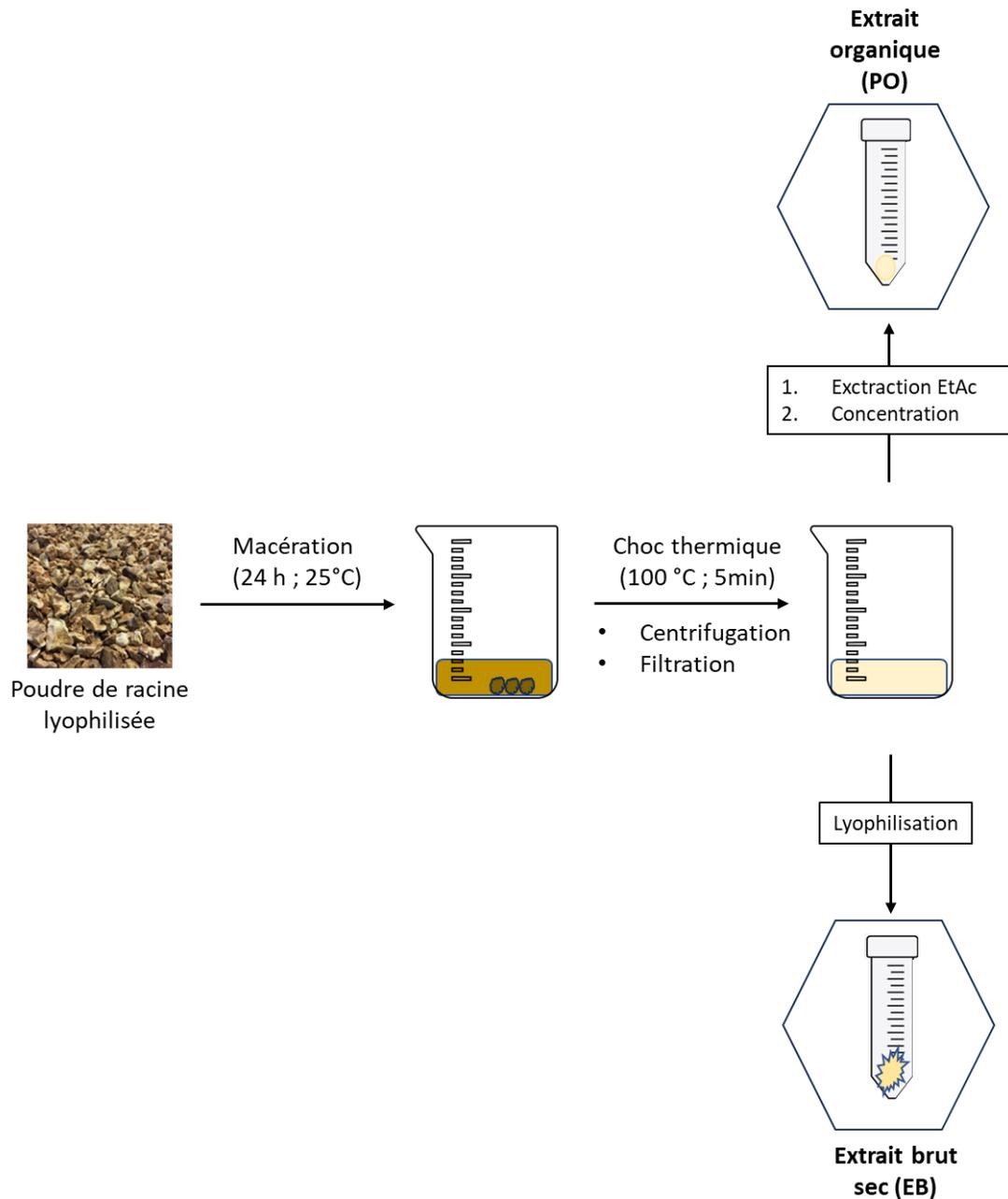


Figure 67 Schéma simplifié du protocole de préparation des extraits de racine de chicorée

Dans un premier temps, nous avons réalisé une première analyse afin de comparer deux durées de macération. Pour cela, les extraits aqueux obtenus après 2 ou 24 heures de macération ont été analysés par HPLC équipé d'un détecteur UV à 254 nm. Cette analyse a permis d'identifier plusieurs LST grâce à la base de données locale mise en place au laboratoire. En se basant sur les aires relatives des pics du chromatogramme, nous avons déterminé les pourcentages relatifs de chaque composé identifié (**Figure 68**). Parmi ces composés, nous avons identifié la lactucine (Lc), la 11 β ,13-dihydrolactucine (DHLc), la lactucopicrine (Lp), la 8-deoxylactucine (8-dLc) et la dihydro-8-deoxylactucine (DH-8-dLc).

Lors d'une courte période de macération (2 h), les composés sont majoritairement présents sous forme conjuguée, associés à des groupements oxalate (ox) ou glycosyle (gly). Cependant, avec une durée de macération plus longue, la proportion de LST sous forme libre augmente, suggérant une dégradation des formes conjuguées au cours du temps. Pour les étapes expérimentales suivantes, nous avons opté pour une macération de 24 h, afin d'extraire davantage de composés et d'augmenter la proportion de LST sous leur forme libre, qui sont plus stables. Il est à noter que l'extrait organique obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle (PO) contient principalement des LST sous forme libre. Comme nous le reverrons ultérieurement, dans la section suivante, les formes conjuguées n'ont pas été détectées par LC-MS dans cet extrait organique.

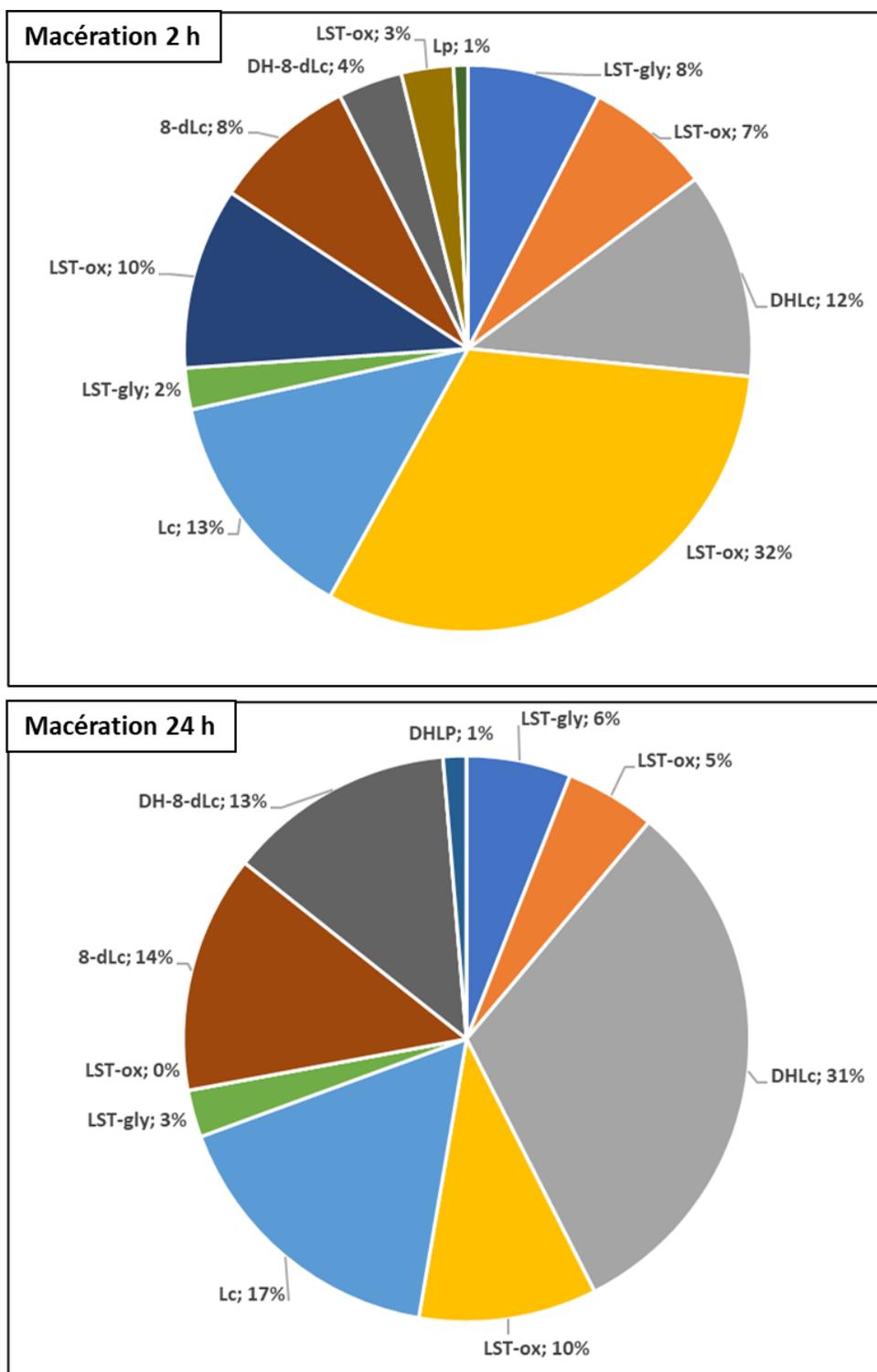


Figure 68 Pourcentage relatif des différents LST retrouvées dans l'extrait brut obtenue par macération à 25 °C pendant 2 h ou 24 h, d'après le chromatogramme analysée à 254 nm. L'annotation LST-gly ou LST-ox signifie la présence d'une LST sous forme de conjuguée glycosyle ou oxalate mais dont la structure n'a pas pu être identifiée précisément avec la base de données utilisée.

II. Utilisation de Novozym 435 dans la transestérification d'un extrait avec l'acétate de vinyle

1. Mise en œuvre de la réaction et analyse des extraits par infrarouge

Précédemment nous avons démontré la possibilité d'acétyler de manière sélective la fonction alcool primaire de lactones sesquiterpéniques, comme la lactucine et la dihydrolactucine, présentes dans les plantes du genre *Cichorium*. Cette acétylation a été réalisée en utilisant un excès d'acétate de vinyle et la CAL-B immobilisée (Novozym 435). De plus, nous avons identifié la présence de LST dans l'extrait obtenu par macération aqueuse de la racine de chicorée.

Nous avons ensuite appliqué notre méthodologie d'acylation enzymatique directement sur ces extraits pour examiner la modification potentielle des LST et d'autres composés acylables non identifiés. Pour ce faire, nous avons utilisé l'extrait brut lyophilisé (EB) et la fraction organique (PO) obtenue après extraction à l'acétate d'éthyle. Ces extraits ont été mélangés à de l'acétonitrile, le solvant de la réaction. Si la fraction organique (PO) s'est solubilisée sans difficultés, l'extrait brut s'est révélé majoritairement insoluble, probablement en raison de sa forte teneur en inuline, une substance hydrosoluble de la racine non soluble dans l'acétonitrile. Pour tenter de pallier ce problème dans la mesure du possible, nous avons soumis le mélange à un bain à ultrasons pendant 30 minutes. Malgré cela, un précipité insoluble était encore présent dans le milieu contenant de l'acétonitrile, néanmoins, nous avons quand-même opté pour réaliser la réaction enzymatique sur cet échantillon (**Figure 69**).

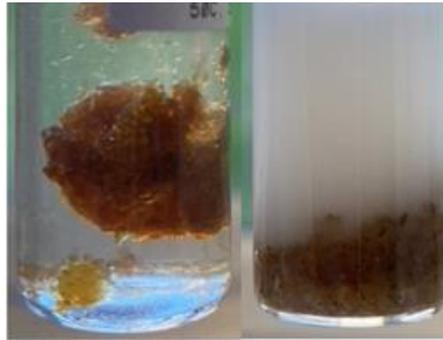


Figure 69 Photographie de l'échantillon contenant l'extrait brut aqueux dans l'acétonitrile ; avant et après bain à ultrasons

La prochaine étape a consisté à ajouter des billes de tamis moléculaire (5 angströms) et l'enzyme immobilisée, les réactions ont été initiées par l'ajout d'un large excès d'acétate de vinyle. Afin de limiter la possible dégradation des molécules de l'extrait, les vials ont été protégés de la lumière avec du papier aluminium et placés dans une étuve à 35 °C avec agitation rotative à 35 rpm. Des témoins sans enzyme ont également été préparés.

Des échantillons ont été prélevés après 24 et 48 heures de réaction pour analyse en infrarouge (FTIR en microplaque) et nous ont permis d'identifier plusieurs bandes. Les milieux réactionnels contenant l'extrait organique (PO et POm) ont offert la meilleure résolution spectrale, révélant des bandes caractéristiques à 1737 et 1235 cm^{-1} , pouvant correspondre aux bandes $\nu(\text{C}=\text{O})$ et $\nu(\text{C}-\text{O})$ d'une nouvelle fonction ester. Ces bandes sont cohérentes avec celles observées lors de la réaction avec la DHLc pure dans la synthèse du dérivé acétate (**Figure 70**).

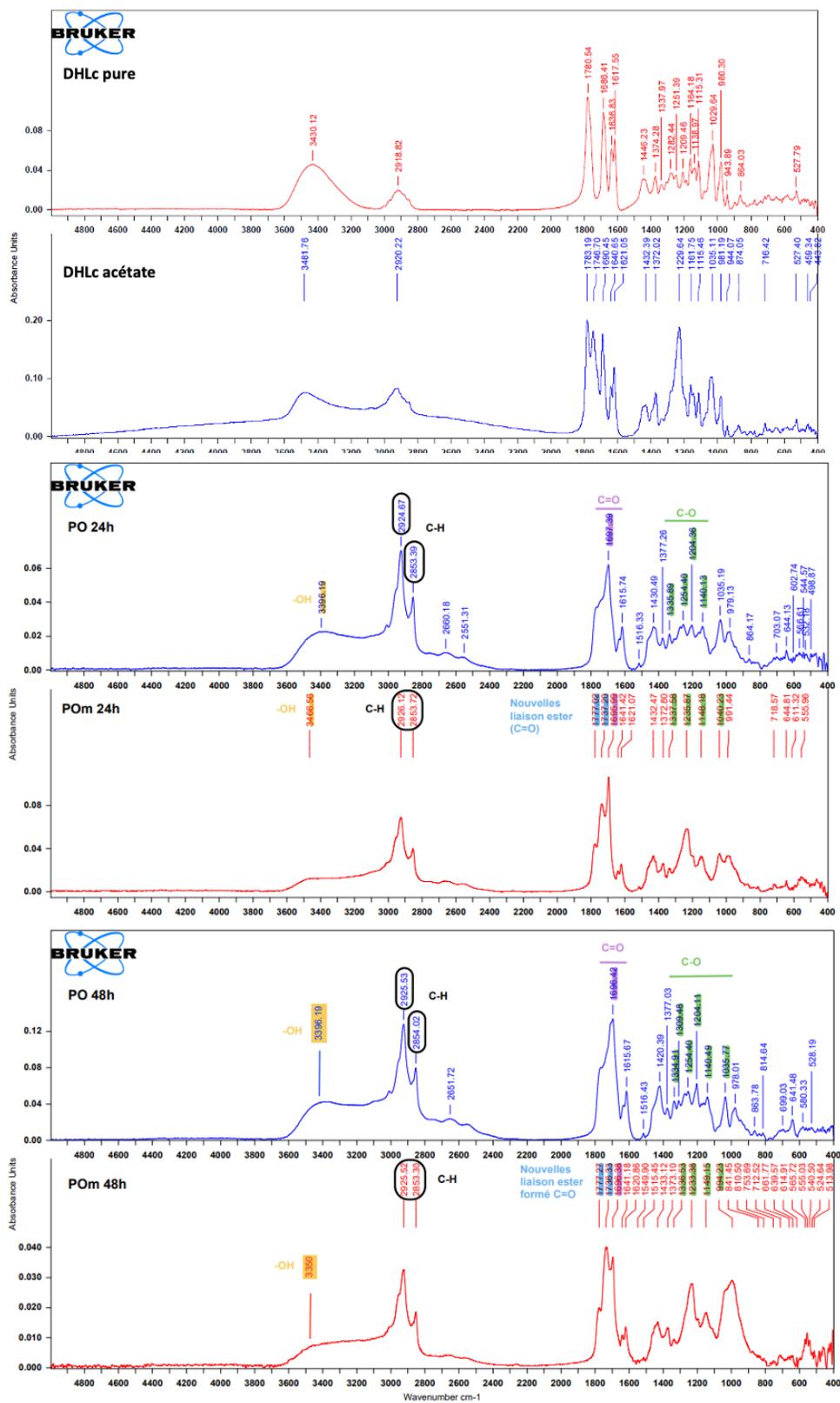


Figure 70 Spectres FTIR de la DHLc non modifiée, de la DHLc-A, de l'extrait organique (POm) et de son témoin sans lipase (PO) après 24 et 48 h de réaction

Concernant l'analyse par infrarouge des extraits bruts (EB) et extraits bruts modifiés (EBm), une étape préalable de centrifugation ou de filtration était nécessaire afin de conserver uniquement le surnageant avec les composés solubles. En absence de cette étape, les spectres infrarouges sont dominés par les bandes caractéristiques de l'inuline, et les bandes propres à ce polymère semblent cacher les bandes de nos composés d'intérêt. En effet, la présence de l'inuline a été confirmée en comparant les spectres infrarouges de l'échantillon 'EBm' non centrifugé à ceux du culot obtenu après centrifugation (contenant la substance insoluble). Comme illustré dans la **Figure 71**, ces deux spectres sont identiques. En analysant le surnageant post-centrifugation, de nouvelles bandes apparaissent aux alentours de 1720 cm^{-1} et 1264 cm^{-1} . Ces bandes sont caractéristiques des liaisons ester, confirmant la présence de composés estérifiés dans l'échantillon. Toutefois, il est à noter que même après une centrifugation à 10000 rpm pendant 10 minutes, le spectre de l'extrait brut présente des bandes moins nettes par rapport à celles observées dans l'extrait organique (POm) que l'on peut voir dans la **Figure 70** de la page précédente. Cette observation suggère la présence d'autres composés ou impuretés dans l'extrait brut qui peuvent interférer avec l'analyse infrarouge.

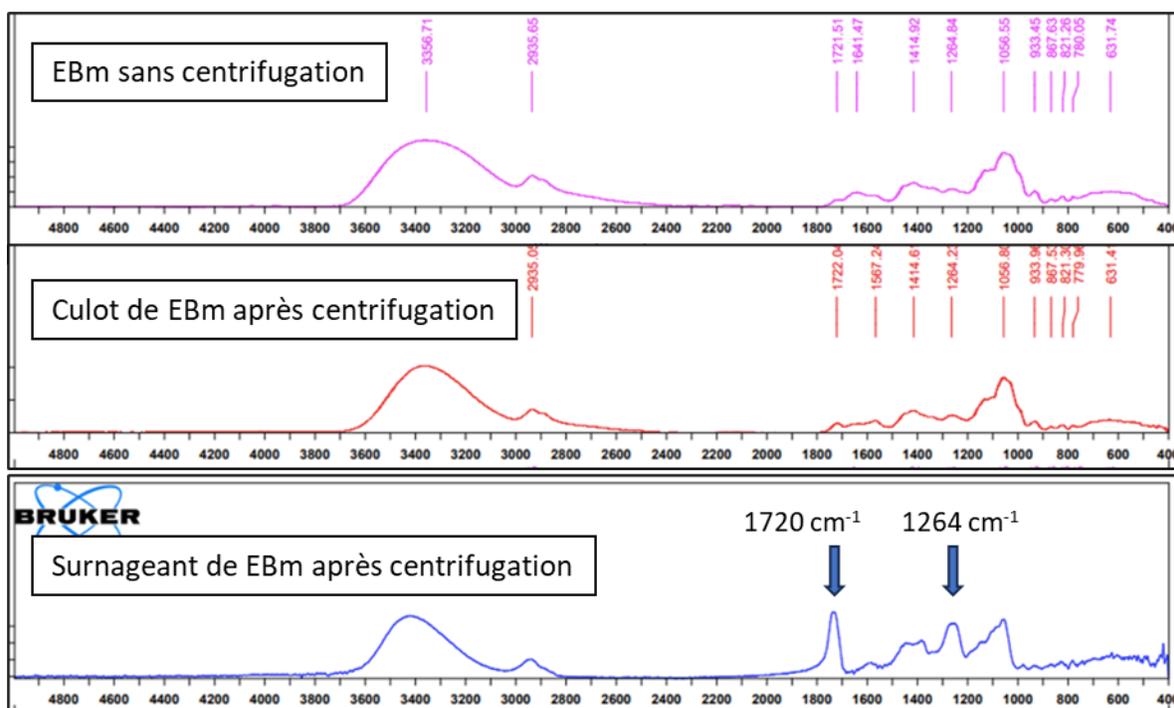


Figure 71 Spectres FTIR de l'échantillon EBm après 48h de réaction. Echantillon sans centrifugation, culot de centrifugation repris dans l'eau, et surnageant après centrifugation

Nous avons donc pu montrer qu'il est possible de transposer la réaction de transestérification en utilisant l'acétate de vinyle sur un mélange plus complexe. Et, d'après les résultats obtenus en IR, la réaction permettrait de former un ou plusieurs esters. Dans la prochaine section nous allons réaliser une analyse plus fine des composés présents dans le mélange.

2. Identification des composés par LC-MS

Après avoir obtenu des résultats très prometteurs lors de l'analyse par FTIR, le prochain objectif était de réaliser une caractérisation plus fine des différents composés présents. Pour cela, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse à l'aide d'un appareil UHPLC-QTOF équipé du logiciel MetaboScape® (Bruker) qui permettait de faciliter l'identification des composés dans un mélange complexe. Dans un premier temps, nous avons décidé de nous focaliser principalement sur la phase organique (PO) issue de l'extraction liquide-liquide de l'extrait brut (obtenu par macération) avec l'acétate d'éthyle. En effet, l'absence d'inuline (polymère avec une variabilité importante) dans cet extrait facilite les démarches analytiques.

Pour cela, nous avons réalisé la série de réactions décrite dans le tableau ci-dessous avec une phase organique fraîchement récupérée. L'ensemble des milieux sont laissés pendant 48 h sous agitation, sauf pour 'POm' et le 'Témoin A' (en absence de lipase), pour lesquels un temps de réaction de 24 h a également été étudié en parallèle. Des triplicats sont réalisés pour les milieux 'POm' et 'Témoin A' dans les deux conditions (24 et 48 h) (**Tableau 12**).

Tableau 12 Résumé des milieux réactionnels préparés pour l'analyse LC-MS. Conditions générales : 2 billes de tamis moléculaire 5 A, 1 mL d'acétonitrile, 35 °C et 30 rpm dans des vials en verre de 2 mL recouverts de papier aluminium

Acronyme	Définition	Quantité d'extrait organique (mg)	Quantité de lipase (mg de Novozym 435)	Quantité d'acétate de vinyle (mM)
POm	Réaction d'acylation enzymatique	3	10	200
Témoin A	Témoin négatif en absence de lipase	3	0	200
Témoin B	Témoin négatif en absence de donneur d'acyle	3	10	0
Témoin C	Témoin négatif en absence de lipase et de donneur d'acyle	3	0	0

Des prélèvements de 450 uL sont ensuite réalisés pour l'ensemble des milieux, filtrés à 0,2 um (filtre PTFE) et concentrés à 2 mbar (35 °C / 1 h) avant d'être repris dans 50 uL de phase mobile (90/10 H₂O/ACN).

Le spectre UV à 254 nm (longueur d'onde d'absorption des LST) des différents milieux a permis de constater rapidement la présence de plusieurs composés et des différences significatives entre les milieux. Le spectre du milieu réactionnel 'POm' témoigne de la modification de plusieurs composés. En effet, il est

possible de constater qualitativement l'apparition de nouveaux pics, absents chez l'ensemble des témoins. Quant aux milieux témoins A (sans lipase) et B (sans donneur), les spectres sont visuellement identiques. Ceci nous montre que les modifications observées sont uniquement issues de réactions enzymatiques catalysées par la CAL-B (**Figure 72**). Concernant les milieux 'POm' après 24 et 48 h, leurs spectres UV sont très similaires, avec uniquement quelques différences au niveau des aires relatives. On peut donc considérer que la réaction enzymatique est certainement bien avancée au bout de 24 h (**Figure 73**).

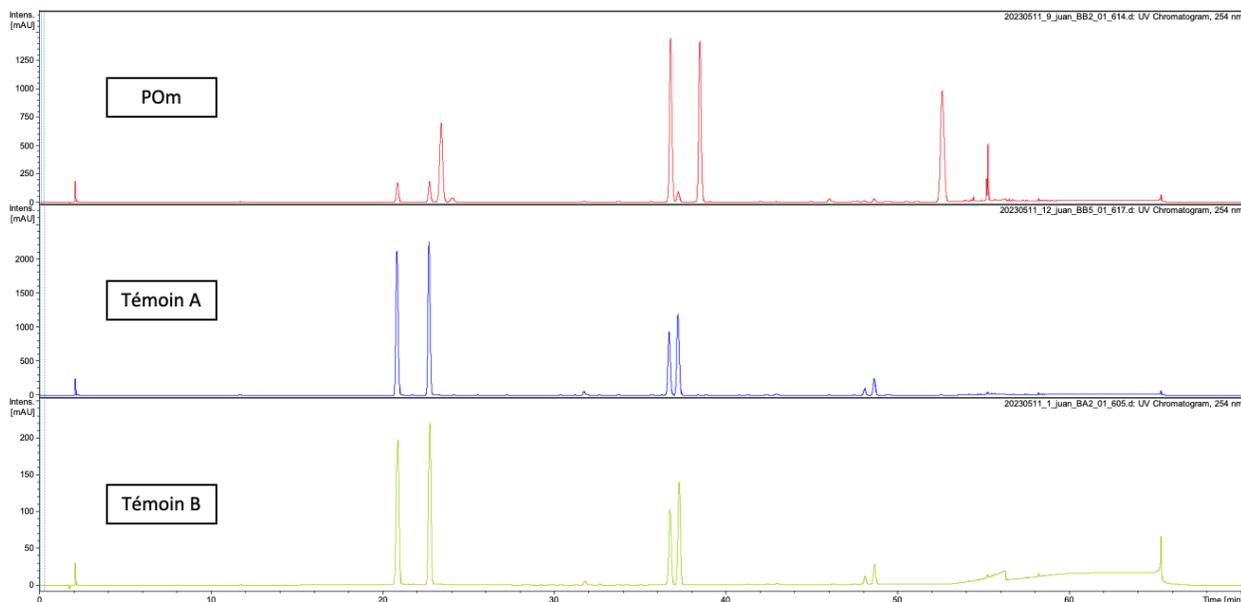


Figure 72 Chromatogrammes (UV 254 nm) obtenus pour les différents milieux réactionnels contenant l'extrait organique (PO) après 48 h de réaction. POM = milieu réactionnel avec lipase et donneur d'acyle ; Témoins A = témoin négatif sans lipase ; Témoins B = témoin négatif sans donneur d'acyle

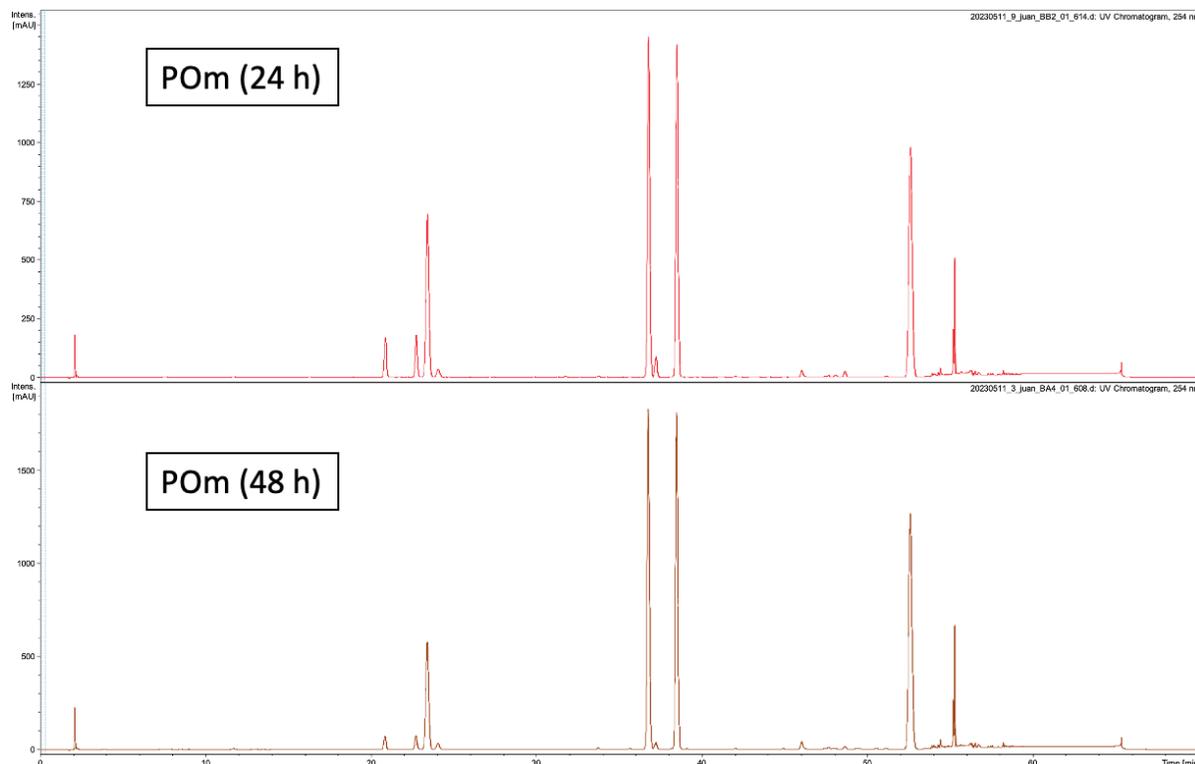


Figure 73 Chromatogrammes (UV 254 nm) obtenus pour les différents milieux réactionnels contenant l'extrait organique (PO) après 24 ou 48 h de réaction. POM = milieu réactionnel avec lipase et donneur d'acyle

Ensuite, les différentes masses obtenues nous ont permis d'approfondir sur ces résultats. Lors de l'analyse des masses identifiées, un premier traitement des données *via* le logiciel MetaboScape a révélé 11 correspondances associées à différentes formules brutes. (**Tableau 13**) Pour confirmer de manière fiable les structures de certains de ces composés, nous avons confronté les spectres de fragmentation des extraits à ceux des standards analytiques de la Lc, DHLc, Lp, DHLp, ainsi qu'à leurs dérivés acétate synthétisés enzymatiquement. Cette démarche a confirmé la présence de tous les standards non modifiés dans les témoins et de tous les dérivés acétate dans l'échantillon 'POM'. Notons que ni la Lp ni la DHLp n'ont été détectées dans ce dernier. Cela s'explique par le fait que ces deux LST, initialement présentes en faibles quantités dans l'extrait, ont été entièrement transformées après 24 h de réaction. Les intensités associées aux différentes molécules détectées, ayant été mesurées par rapport à l'ensemble d'ions détectés sur les différentes échantillons, sont illustrées dans la **Figure 74**.

Tableau 13 Récapitulatif des structures détectées en LC-MS sur l'extrait modifié (POM) et le témoin sans enzyme (Témoin A) à l'aide de MetaboScape. Vert = présence des molécules ayant été confirmées avec des standards analytiques

Masse moyenne mesurée	Formule brute	Attribution	Présence significative dans POM	Présence significative dans Témoin A
278,11556	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	DHLc	X	X
320,12627	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	DHLc-A	X	
276,09976	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	Lc	X	X
318,11063	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	Lc-A	X	
412,15241	C ₂₃ H ₂₄ O ₇	DHLp		X
410,13663	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	Lp		X
454,16277	C ₂₅ H ₂₆ O ₈	DHLp-A	X	
452,14712	C ₂₅ H ₂₄ O ₈	Lp-A	X	
392,21799	C ₂₂ H ₃₂ O ₆	Isodomedine/Excisanine B	X	
302,11562	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	8-deoxylactucin acetate	X	
304,13122	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	11β,13-Dihydro-8-deoxylactucin acetate	X	

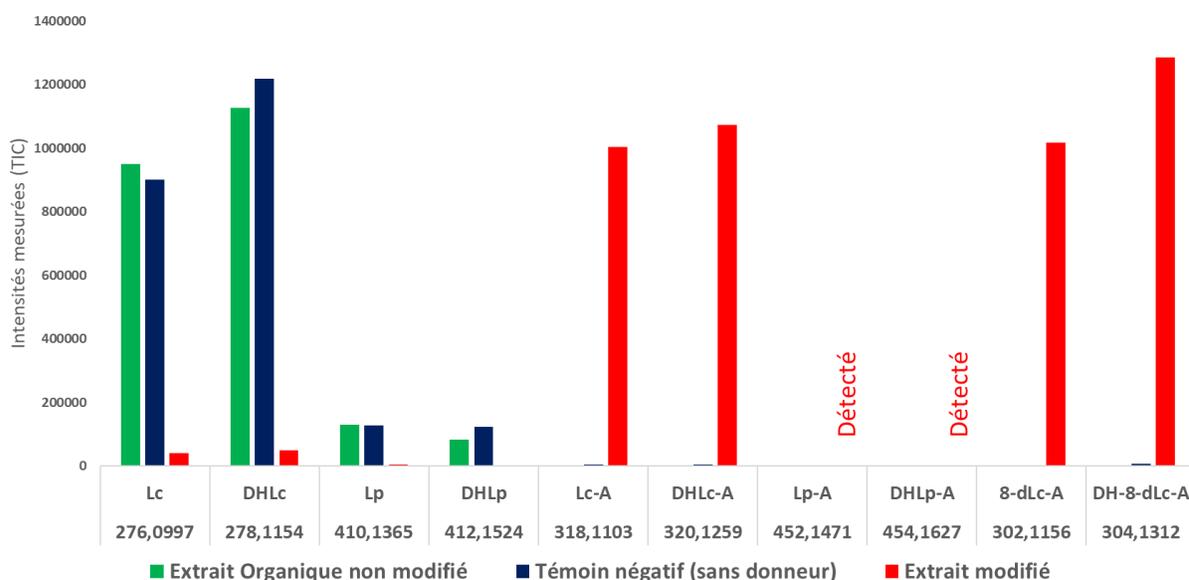


Figure 74 Intensités mesurées correspondant aux différents composés détectés dans l'extrait non modifié, le témoin négatif et l'extrait modifié après 24 h

Étonnamment, nous avons identifié trois nouvelles formules brutes. Deux d'entre elles présentent des formules brutes et des masses moléculaires moyennes similaires aux dérivés Lc-A et DHL-A, mais montrent l'absence d'un groupement OH. Sachant que la racine de chicorée peut également contenir de la

8-deoxylactucine ainsi que son dérivé insaturé 11 β ,13-dihydro-8-deoxylactucine, il est tout à fait plausible que ces deux molécules naturelles aient été acylées au cours de la réaction enzymatique pour former les dérivés acétates correspondants. Quant à la troisième molécule, nous n'avons pas encore réussi à l'identifier avec certitude. Le logiciel semble indiquer que cette nouvelle molécule pourrait être l'excisanine B ou l'isodomedine, or il est également possible qu'il s'agisse d'un dérivé acétate d'une autre molécule n'ayant jamais été décrit (**Figure 75**).

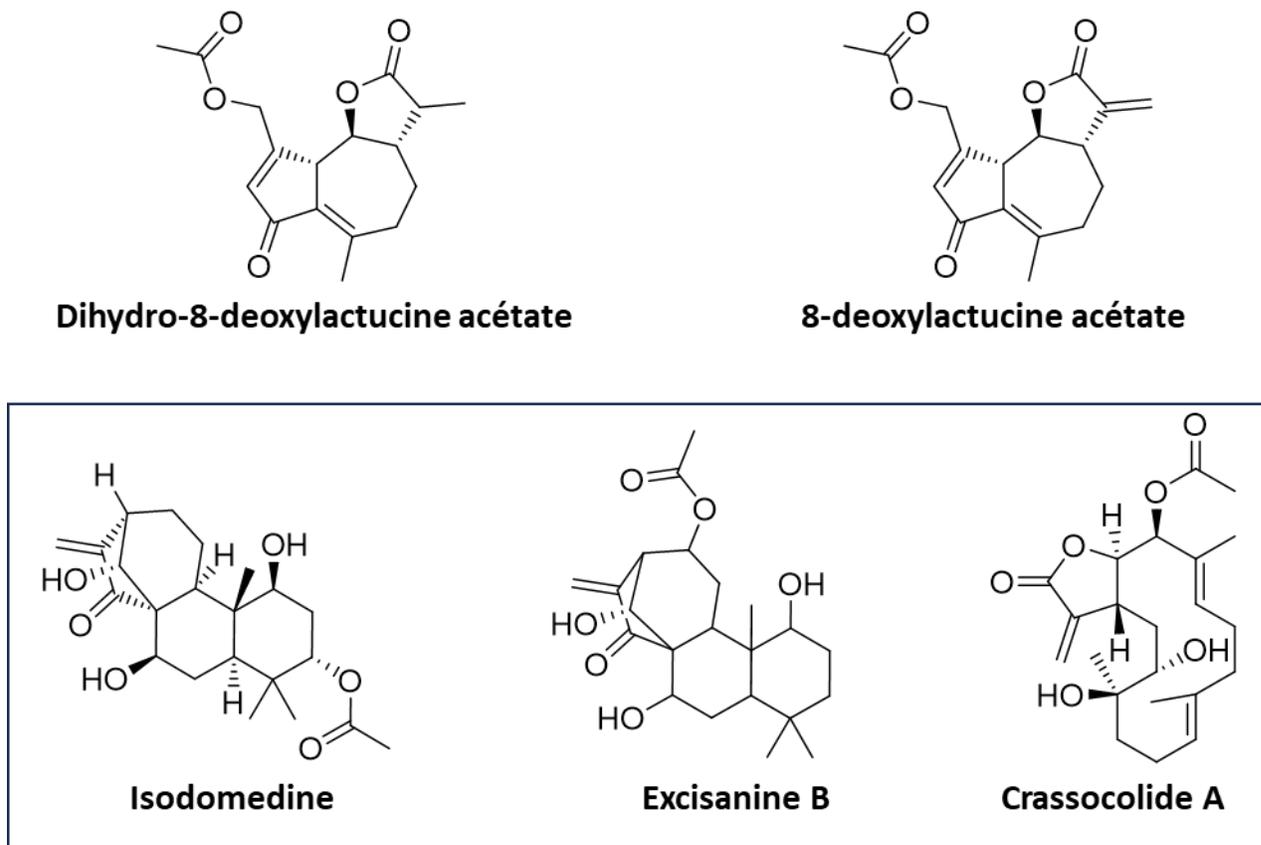


Figure 75 Dérivés '8-deoxy' identifiés dans l'extrait modifié et potentielles structures pouvant correspondre au nouveau produit identifié dans l'extrait modifié

En conclusion, nous avons établi une première preuve de concept pour la modification d'un extrait de racine de chicorée riche en LST. Après avoir développé une méthode enzymatique ciblant la modification de quatre lactones sesquiterpéniques purifiées, nous avons réussi à adapter cette méthode à la modification d'un mélange complexe contenant ces mêmes molécules, ainsi que d'autres molécules de la même famille. Dans cet extrait, nous avons pu acyler de manière sélective les fonctions alcool primaire des LST ciblées, tout en couvrant un large éventail de molécules qui partagent ce même motif structural. Accessoirement, l'analyse de l'extrait modifié nous a orienté vers l'identification de nouvelles molécules.

Chapitre 4 : Evaluation des activités biologiques des extraits obtenus

I. Premiers tests d'activité antifongique sur extraits de racine avant et après modification

1. Tests antifongiques sur *Rhizoctonia solani* via la méthode de diffusion par puits

Suite à la mise au point de notre méthode enzymatique d'acétylation des molécules extraites de la racine de chicorée, l'objectif suivant était d'évaluer leur potentiel antimicrobien. Nous avons choisi de débiter par une évaluation antifongique sur des souches disponibles en laboratoire.

Des études antérieures ont déjà mis en évidence l'activité antimicrobienne des extraits de racines de chicorée. Par exemple, des effets antifongiques ont été observés sur les souches phytopathogènes d'*Aspergillus niger*, *Pythium ultimum* et sur des spores du genre *Alternaria*.^[70,160]

Rhizoctonia solani est un pathogène connu pour attaquer diverses plantes, notamment la pomme de terre, affectant ses racines, tiges et stolons, ce qui réduit le rendement et la qualité des tubercules. Ainsi, démontrer une activité antifongique de nos extraits sur ce pathogène serait une piste pertinente pour une éventuelle utilisation dans l'agriculture de la pomme de terre.

Nous avons initié une série de tests sur *Rhizoctonia solani* en utilisant la méthode de diffusion par puits dans des boîtes de Pétri. Cette méthode visuelle permet d'observer l'effet de l'extrait sur la croissance du mycélium du champignon. Bien que cette méthode soit visuellement informative, elle est chronophage. En effet, après la culture initiale des spores, qui peut durer de quelques jours à plus d'une semaine, un fragment du mycélium est ré-inoculé sur une nouvelle boîte préparée avec les extraits et témoins, ensuite, il est nécessaire d'attendre plusieurs jours pour évaluer l'effet des composés testés.

Pour nos tests, 100 µL de chaque extrait, solubilisé dans du DMSO à 2,5 %, ont été déposés dans un puits. Le DMSO à 2,5 % a servi de témoin négatif, tandis que le cycloheximide (un antifongique de référence) à 10 µg/mL a été utilisé comme témoin positif. Cependant, les essais visant à inhiber la croissance de *R. solani* n'ont pas révélé des résultats positifs. En effet, aucun des extraits testés n'a montré d'activité antifongique contre ce champignon. La croissance du champignon est restée inchangée sur les boîtes traitées avec les extraits (A), (B) et (D). Ces boîtes affichent un diamètre de croissance similaire à celui observé avec le champignon seul (F) et le témoin négatif (E). En revanche, le témoin positif (C), traité avec du cycloheximide à 10 µg/mL, a montré une inhibition d'environ 55 % du diamètre de croissance de *R. solani* par rapport au champignon seul (F) (**Figure 76**).

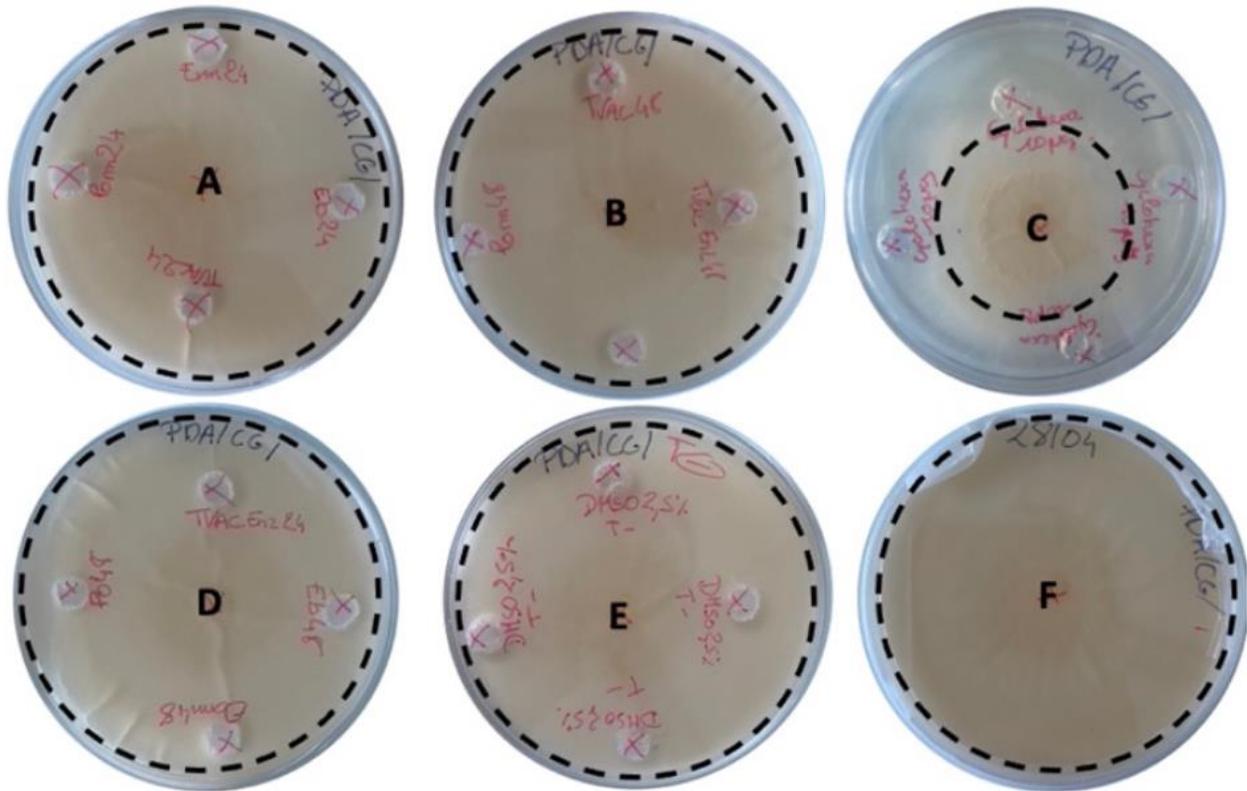


Figure 76 Résultats des tests antifongiques sur *Rhizoctonia solani* après 3j d'incubation. (A) Dépôts EB_{24h}, EBm_{24h}, TC_{24h} et POM_{24h} ; (B) Dépôts TC_{48h}, TB_{48h} et POM_{48h} ; (C) Quatre dépôts de Cycloheximide 10 µg ; (D) Dépôts TB_{24h}, EB_{48h}, EBM_{48h} et PO_{48h} ; (E) Quatre dépôts de DMSO 2,5 % ; (F) *R. solani* seul. Le diamètre de croissance de *R. solani* est indiqué par le cercle en pointillé noir.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence d'effet inhibiteur. La concentration des composés actifs dans nos échantillons pourrait ne pas être suffisamment élevée pour exercer un effet. Si l'action de l'extrait sur *R. solani* était dose-dépendante, alors le test de diffusion par puits pourrait ne pas être le plus approprié, car la diffusion de l'extrait dans la gélose réduit sa concentration effective. Mares *et al.* (2005) ont démontré un effet antifongique sur *Pythium ultimum* et des spores d'*Alternaria* en intégrant directement l'extrait dans le milieu de culture à différentes concentrations, afin de déterminer si l'effet était dose-dépendant, ceci pourrait être une piste à suivre dans el futur. D'autre part, il est tout à fait possible que l'extrait ne possède aucune action antifongique sur cette cible.

2. Développement du test antifongique à haut-débit basé sur la réduction de la résazurine

2.1. Le principe du test

Face aux résultats obtenus, nous avons jugé pertinent de rediriger nos tests vers l'activité antifongique sur des spores. L'idée était d'adopter une approche de test en microplaque, permettant une exécution à haut débit. Nous nous sommes inspirés d'un protocole décrit par *Monteiro* et ses collaborateurs qui mesurent l'activité antifongique en se basant sur la capacité des spores fongiques à convertir la résazurine en résorufine, une substance hautement fluorescente.^[161] Ce test de viabilité cellulaire repose sur le métabolisme de la résazurine, catalysé par des enzymes oxydoréductases présentes dans les cellules vivantes, principalement au niveau de la mitochondrie. Ainsi, des cellules non viables réduisent moins efficacement la résazurine, ce qui se manifeste par une fluorescence moindre par rapport à des témoins contenant des cellules viables (**Figure 77**).

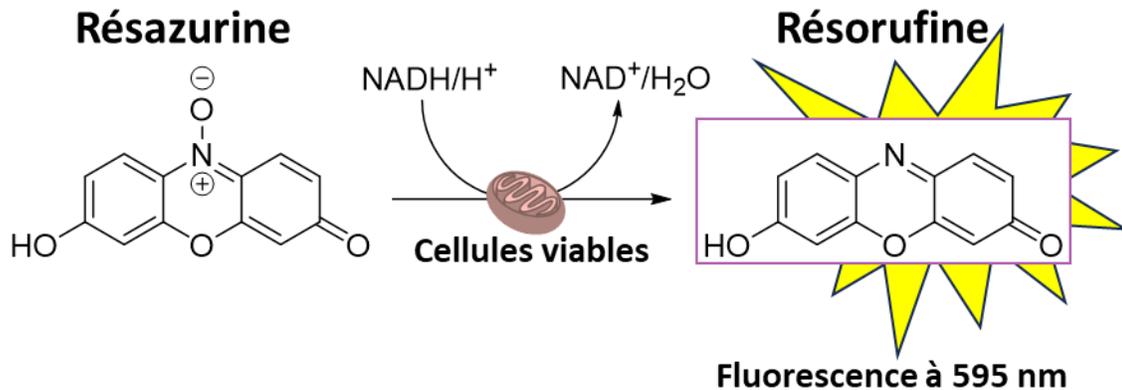


Figure 77 Principe du test de viabilité cellulaire basée sur la réduction de la résazurine (non fluorescente) en résorufine (fluorescente)

2.2. Étude du comportement d'une solution de spores de *Fusarium 2DA63* en présence de résazurine

Nous avons commencé par des analyses par fluorimétrie pour observer le comportement d'une solution de résazurine en présence de différents éléments : le milieu de culture Mueller-Hinton, l'eau physiologique, les spores fongiques de *Fusarium* dans le milieu de culture et les spores dans l'eau physiologique.

Le protocole est le suivant : dans des puits d'une plaque FluoBlack (Greiner), nous avons introduit 50 μ L d'une suspension de spores à une concentration de 10^8 spores/mL, combinée soit à 50 μ L d'eau physiologique, soit à 50 μ L de milieu Mueller-Hinton. D'autres combinaisons incluaient 50 μ L de milieu MH avec 50 μ L d'eau physiologique, et un témoin de 100 μ L d'eau physiologique seule. Après une incubation de 24 h à 30 °C, 100 μ L de résazurine (à des concentrations de 10 μ M ou 100 μ M) étaient ajoutés à chaque puits. La fluorescence était ensuite suivie pendant une heure (avec une mesure par minute) à 30 °C, en utilisant des longueurs d'onde d'excitation de 535 nm et d'émission de 595 nm. Chaque mesure

a été réalisée en triplicata, et la pente a été déterminée automatiquement par le logiciel sur 31 points correspondant à une vitesse constante.

Premièrement, le témoin contenant de l'eau physiologique et de la résazurine n'a pas généré une pente de fluorescence sous ces conditions. Cependant, le milieu de culture (MC + Eau) a donné une augmentation de la fluorescence. Cette augmentation pourrait être attribuée à la réduction de la résazurine par des molécules du milieu ou à la présence d'autres microorganismes. Toutefois, la cinétique observée pour les spores dans l'eau physiologique est similaire à celle du milieu de culture sans spores (milieu MC + Eau). Ceci laisse penser qu'une majorité des spores n'ont pas survécu en absence de milieu de culture (milieu SP + Eau) et que l'augmentation de la fluorescence pourrait être due à une légère contamination par un autre microorganisme. Concernant les spores, leur incubation dans le milieu de culture entraîne une augmentation régulière de la fluorescence à 595 nm, ce qui est conforme à la réduction attendue de la résazurine en résorufine par voie enzymatique (**Figure 78**).

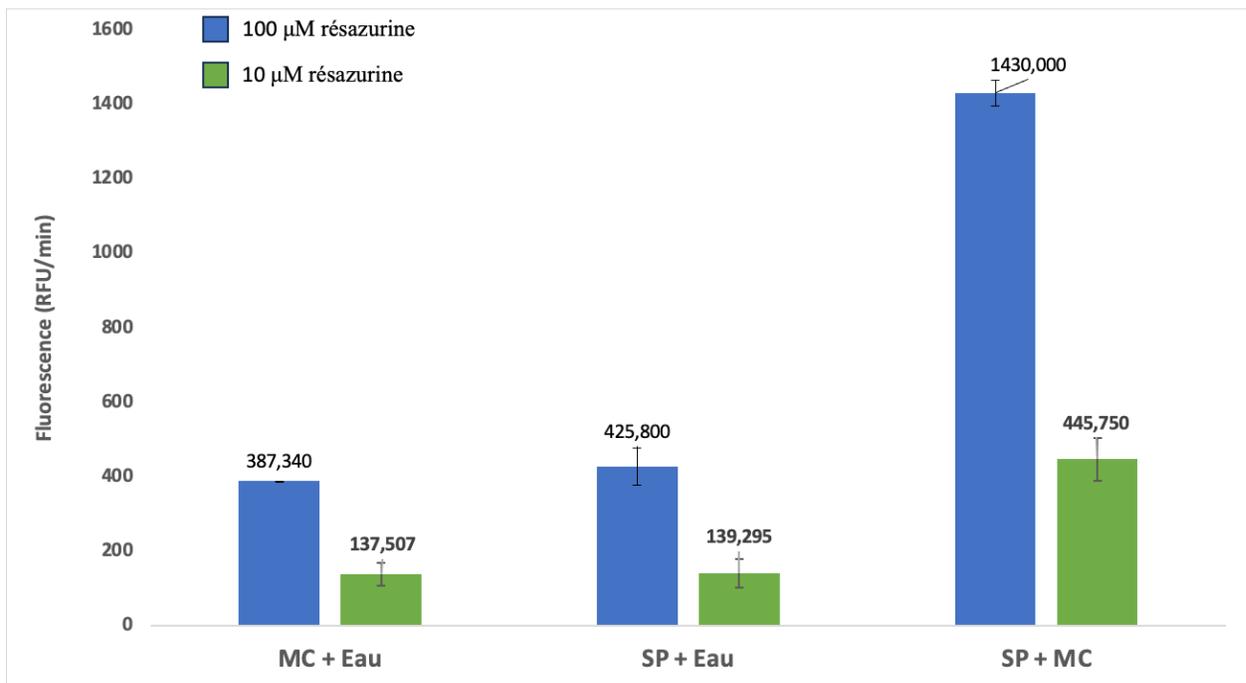


Figure 78 Détermination de la fluorescence mesurée pour des spores et/ou du milieu de culture (MH) incubés pendant 24 h à 30 °C après l'ajout de résazurine (10 ou 100 µM)

2.3. Étude de la viabilité de spores de Fusarium en présence de différents extraits de racine

La phase précédente nous a permis d'obtenir les cinétiques de fluorescence pour la réduction de la résazurine dans des conditions standard du test que nous souhaitons mettre en place. Dans cette étape, nous avons réalisé un nouveau test de viabilité cellulaire sur des spores après incubation en présence des différents extraits de racine obtenus après 24 h de réaction.

Après la réaction enzymatique, les échantillons secs (après concentration à 8 mbar) ont été solubilisés dans une solution aqueuse de DMSO à 0,1 % et filtrés à 0,2 µm sous conditions stériles. De même, un témoin négatif contenant uniquement du DMSO à 0,1 % et deux témoins positifs avec deux concentrations différentes d'un antifongique de référence (cycloheximide) ont été préparés.

Une fois les échantillons préparés, nous avons introduit 50 µL de spores F. 2DA63 (10^8 spores/mL) solubilisés dans du milieu de culture Muller-Hinton, ainsi que 50 µL de l'échantillon respectif dans une microplaque 96 puits (FluoBlack, Greiner). Des blancs en absence de spores (avec de l'eau physiologique), ainsi qu'en absence d'extrait, ont également réalisés pour toutes les conditions. La plaque a ensuite été placée dans un sac plastique hermétique et incubée pendant 24 h afin de permettre la croissance du champignon.

A la fin de la période d'incubation, 100 µL de résazurine (10 µM dans du tampon phosphate de sodium 200 mM pH 7). Des mesures de cinétique pendant 1 heure ont donné lieu aux pentes d'émission de fluorescence (RFU/min) représentées dans la **Figure 79**.

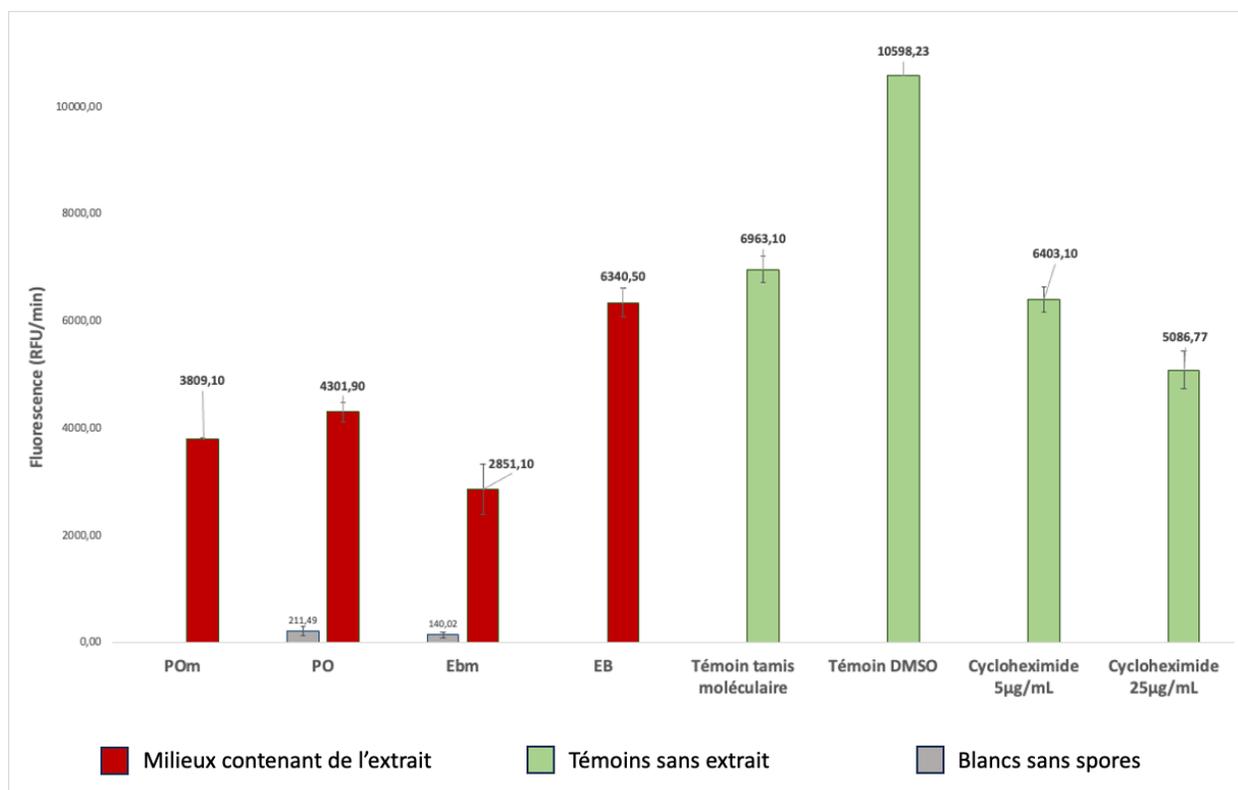


Figure 79 Pentés d'émission de fluorescence obtenues pour le test de viabilité cellulaire à la résazurine en présence de différents extraits et témoins. Pour les blancs réalisés en absence de spores, uniquement les pentés positives figurent sur le graphique.

Dans un premier temps, on peut constater que les cinétiques de fluorescence obtenues pour le témoin négatif (DMSO 0,1 %) et les témoins positifs avec la cycloheximide sont bien différenciées. Les résultats sont cohérents puisque la présence de l'antifongique provoque une diminution de l'ordre de 55 % par rapport au témoin négatif, cela signifie que le nombre de spores viables capables de catalyser la réduction de la résazurine a certainement diminué en présence de l'antifongique. Pour les échantillons contenant de l'extrait, on s'aperçoit que les valeurs de fluorescence sont toujours nettement inférieures à ceux obtenus avec le témoin négatif, et similaires à ceux des milieux incubés en présence de l'antifongique. De plus, les échantillons modifiés enzymatiquement (P0m et EBm) semblent donner un effet antifongique plus important que les témoins sans enzyme correspondants qui n'ont donc pas été modifiés (PO et EB).

Les résultats obtenus à partir des tests de viabilité cellulaire à la résazurine sont prometteurs et démontrent clairement une efficacité potentielle des extraits de racine en tant qu'antifongiques, au moins en ce qui concerne les spores de *Fusarium*. D'une part, nous avons réussi à mettre en place un test relativement fiable basé sur la viabilité des spores et pouvant être réalisé à haut débit. De plus, le fait que les échantillons modifiés par voie enzymatique semblent présenter un effet antifongique plus prononcé que leurs homologues non modifiés est particulièrement intéressant, suggérant que la modification enzymatique pourrait jouer un rôle crucial dans l'amplification de l'effet antifongique. Cependant, bien que ces résultats soient encourageants, il sera essentiel d'approfondir ces recherches. Notamment, une normalisation des

différents échantillons d'extraits serait pertinente, étant donné que les masses des échantillons étaient légèrement différentes, ce qui pourrait influencer les résultats.

En conclusion, nous avons pu valider une preuve de concept pour la modification d'extraits de racine de chicorée en ciblant principalement la fonction alcool primaire des lactones sesquiterpéniques. Par la suite, des analyses LC-MS nous ont permis d'identifier un nombre de molécules ayant été modifiées dans ces extraits. Finalement, les premiers résultats des tests biologiques révèlent un potentiel de valorisation de notre approche, notamment dans l'utilisation d'un extrait enrichi, ou éventuellement de molécules isolées, en tant qu'agents antifongiques.

Chapitre 5 : Extension du contexte à des nouveaux types de réactions biocatalytiques

I. Introduction

Cette partie concerne l'exploration d'autres voies de fonctionnalisation pouvant être appliquées aux terpènes. Parmi celles-ci, la formation d'aminoterpènes par voie enzymatique est une approche qui n'a jamais été décrite dans la littérature. Compte tenu de la rareté des aminoterpènes naturels, nous avons considéré que cette voie méritait d'être explorée. Dans cette perspective, les enzymes de la famille des transaminases (EC 2.6. 1. X) pourraient être particulièrement utiles. Elles ciblent spécifiquement les groupements carbonyle (cétone, aldéhyde, cétoacide) et sont reconnues pour leur stéréosélectivité élevée, permettant la production d'amines chirales. Contrairement à d'autres enzymes, comme les amine déshydrogénases et les imine réductases, les réactions de transfert d'amine catalysées par les transaminases se déroulent généralement à des pH proches de la neutralité. Elles n'exigent donc pas l'utilisation d'un donneur d'amine hautement nucléophile.^[162] En envisageant la modification des LST, on pourrait supposer que les conditions réactionnelles avec les transaminases limiteraient également les réactions secondaires avec d'autres groupes réactifs, en particulier avec le motif α -méthylène- γ -lactone, fortement électrophile. De plus, notre laboratoire a une solide expertise avec les transaminases, et nous disposons de certaines d'entre elles, précédemment utilisées dans d'autres projets.

On remarque que le groupement carbonyle des LST trouvées dans les racines des plantes du genre *Cichorium* est sous forme de pentanone α,β -insaturée, conjuguée avec deux doubles liaisons distinctes. À ce jour, aucune étude ne semble avoir décrit des réactions d'amination enzymatiques sur une telle structure. Des recherches sur les réactions de transamination sur des cétones cycliques indiquent que les transaminases couramment utilisées ne fonctionnent pas bien lorsque cette fonction est conjuguée à une double liaison. Richter et ses collègues ont étudié plusieurs transaminases dans l'amination de cétones cycliques. Ils ont constaté que ces enzymes n'étaient pas efficaces sur un cycle de pentanone α,β -insaturée. C'est notamment le cas pour les transaminases de *Chromobacterium violaceum* (DSM3019137), *Vibrio fluvialis*, *Klebsiella pneumoniae* (KPN_0799), *Pseudomonas putida* (PP_3718), *Mycobacterium vanbaalenii* et *Anthrobacter sp.* (ArRMut11) (**Figure 80**).^[163]

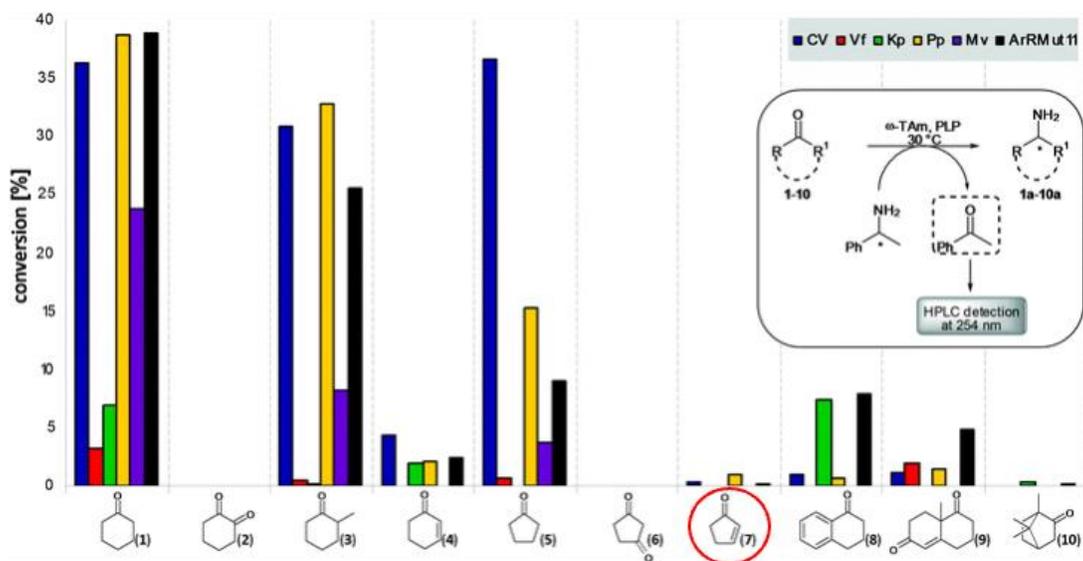


Figure 80 Performance de plusieurs transaminases dans la transamination de différentes cétones cycliques (figure de Richter et al.(2015))

Nous avons donc envisagé d'autres stratégies permettant d'introduire une fonction amine sur ce type de molécule. Une idée était d'ajouter, *via* une première étape enzymatique, un groupement qui pourrait ensuite être transaminé lors d'une seconde étape.

Une première approche repose sur l'introduction d'un motif céto-ester, que nous avons déjà réussi à incorporer dans certains monoterpénoïdes grâce à l'utilisation de lipases, comme décrit dans le Chapitre 1. Dans cette section, je vais vous détailler des premiers résultats prometteurs concernant la transamination des dérivés α et β -céto-ester de l'alcool périllique, que nous avons synthétisés précédemment.

Dans une deuxième approche, nous avons envisagé d'oxyder la fonction alcool primaire présente dans un grand nombre de terpénoïdes, y compris les LST de la chicorée. Pour ce faire, je vais vous présenter notre approche utilisant des oxydoréductases de la sous-famille des alcool déshydrogénases (ADH) (EC 1.1.1.1). Ces enzymes ont déjà été employées dans des cascades enzymatiques avec des transaminases pour valoriser des alcools primaires en amines.^[164] De plus, à cette époque, notre collègue, le Dr Antoine LANCIEN, avait réussi à établir une cascade hybride en deux étapes pour convertir le monoterpénoïde myrténol en myrténylamine. Cette cascade impliquait un catalyseur métallique pour oxyder le myrténol en myrténal, suivi d'une transaminase pour la transamination de ce dernier. Forts de cette réussite, nous avons trouvé pertinent d'explorer la mise en œuvre d'un protocole similaire purement biocatalytique.

II. Utilisation de transaminases dans l'amination de terpénoïdes d'intérêt

1. Transamination des cétoesters de l'alcool périllique

Le chapitre 1 a été consacré à la mise en place d'un processus biocatalytique innovant pour la synthèse de dérivés α -cétoesters de monoterpénoïdes. Grâce à l'utilisation de la lipase CAL-B, nous avons réussi à obtenir des dérivés α -cétoesters de monoterpénoïdes tels que l'alcool périllique, le géranol et le citronellol (parmi d'autres). De plus, un dérivé β -cétoester a pu également être produit à partir de l'alcool périllique.

Dans le contexte de notre recherche visant à introduire une fonction amine primaire sur les terpénoïdes, l'utilisation de ces intermédiaires céto-ester s'est avérée être une stratégie prometteuse et originale. Ainsi, nous avons décidé d'explorer davantage cette voie en étudiant l'amination de ces dérivés céto-ester. Deux molécules ont été choisies pour ces études : le dérivé α -cétoester obtenu à partir de l'estérification de l'alcool périllique avec l'acide pyruvique et le dérivé β -cétoester issu de la transestérification de l'alcool périllique avec l'acétoacétate de méthyle. L'objectif principal de cette étape était de déterminer si ces dérivés céto-ester pouvaient être efficacement aminés pour produire des aminoterpénoïdes. Si cela s'avérait possible, cela ouvrirait la voie à une nouvelle méthode de synthèse d'aminoterpénoïdes, élargissant ainsi le répertoire des molécules terpénoïdes fonctionnalisées disponibles pour diverses applications (**Figure 81**).

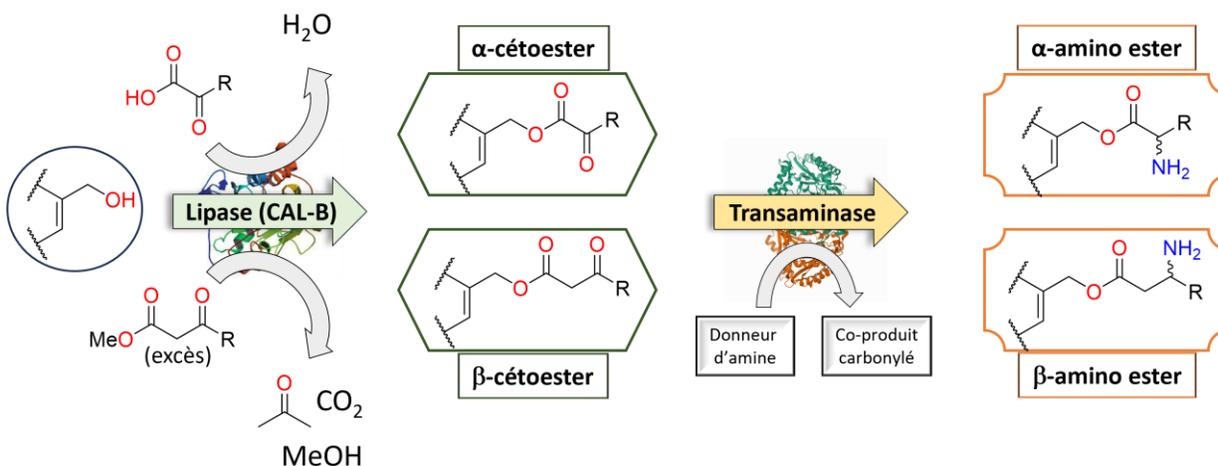


Figure 81 Schéma de la stratégie envisagée permettant la synthèse de nouveaux dérivés aminés de terpénoïdes tels que l'alcool périllique en passant par des intermédiaires α et β -cétoesters

Pour notre criblage initial, nous avons choisi deux transaminases, déjà éprouvées dans notre laboratoire pour leur capacité à traiter une variété de substrats. La première provient de *Chromobacterium violaceum* (Uniprot: Q7NWX4) et nous a été fournie par le Génoscope (Institut de Chimie de Clermont-Ferrand). Elle est exprimée à partir du plasmide pET22b(+). La seconde, provenant de *Burkholderia multivorans* (Uniprot: B9AZ94), nous a été fournie par le Pr. Matthias HÖHNE de l'Université de Greifswald et est exprimée à partir du plasmide pET24b.

Le test que nous avons utilisé est basé sur l'utilisation de la (*S*)-methylbenzylamine (MBA) comme donneur d'amine. Au cours de cette réaction, la transaminase transfère le groupe amine de la MBA au pyridoxal-5-phosphate (PLP), notre cofacteur, formant ainsi un intermédiaire, le pyridoxamine-5-phosphate (PMP), et produisant de l'acétophénone. Un second transfert d'amine a lieu entre le PMP et le substrat accepteur d'intérêt, régénérant le PLP et libérant une amine chirale (**Figure 82**). Un atout majeur de cette méthode est que la formation d'acétophénone ($\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) peut être suivie par spectrophotométrie à 245 nm.

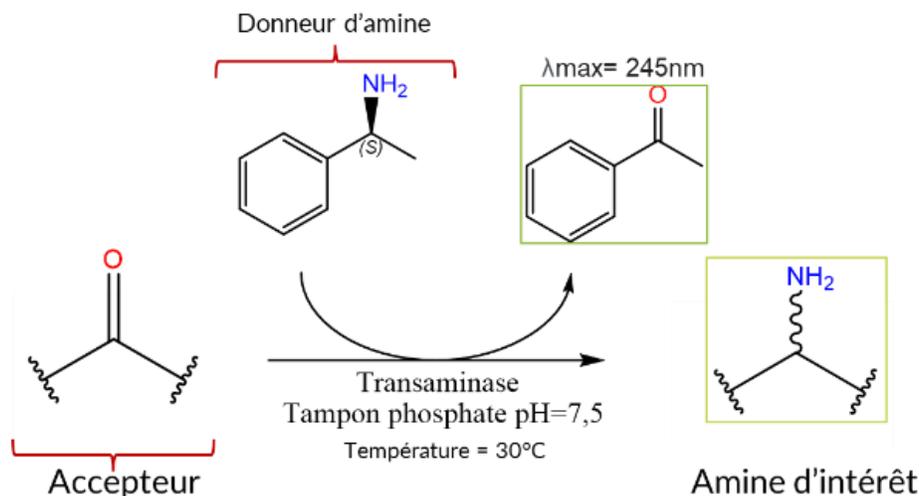


Figure 82 Principe du test d'activité pour les transaminases en utilisant la SMBA en tant que donneur d'amine

Avant de lancer les tests enzymatiques, nous avons préparé les milieux réactionnels contenant les α et β -cétoesters de l'alcool périllique. Notre objectif était d'éliminer tout composant susceptible d'inhiber l'activité enzymatique. Nous avons d'abord concentré les milieux sous vide pour retirer le solvant et d'autres impuretés volatiles, comme l'acétone produite par la décarboxylation de l'acide acétoacétique. Ensuite, les milieux ont été solubilisés dans de l'acétate d'éthyle (EtAc) et lavés à l'eau, en ne conservant que la phase organique (EtAc) pour éliminer les acides carboxyliques résiduels. Après évaporation de la phase organique à l'acétate d'éthyle, le résidu a été solubilisé dans du DMSO, puis dilué dans un tampon phosphate pour obtenir une concentration d'environ 8 mM du cétoester et 8 % de DMSO. Bien que les transaminases nécessitent un milieu aqueux, elles peuvent tolérer le DMSO comme cosolvant.^[165] Cette préparation a permis d'éliminer l'acide pyruvique, une impureté de la synthèse de l' α -cétoester, qui est un substrat accepteur universel pour les transaminases. Cependant, des traces d'alcool périllique non transformé ont été détectées, mais nous avons estimé qu'elles ne perturberaient pas significativement la réaction.

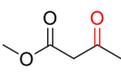
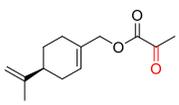
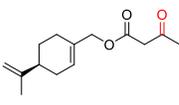
En surveillant la formation d'acétophénone à 245 nm, nous avons déterminé l'activité spécifique des deux enzymes pour chaque substrat pendant la période stationnaire de la réaction. Outre les milieux contenant les cétoesters de l'alcool périllique, nous avons également testé l'acétoacétate de méthyle pur et effectué des contrôles sans transaminase et sans accepteur. Les réactions ont été suivies pendant 40 minutes, pendant lesquelles la vitesse s'est maintenue constante.

Premièrement, le milieu avec l'acétoacétate de méthyle (MeAcAc) n'a donné aucune augmentation de l'absorbance, cela nous montre que celui-ci n'est pas un substrat d'aucune des deux transaminases. Le même

comportement est noté pour le milieu avec le β -cétoester de l'alcool périllique. En revanche, le milieu avec l' α -cétoester de l'alcool périllique a montré une activité, indiquant que cette molécule peut être efficacement transaminée par ces enzymes. Une activité spécifique d'environ 53 et 67 mU/mg de protéines a été mesurée pour les transaminases Cv-TA et Bm-TA respectivement. D'après nos résultats, il semblerait que les transaminases rencontrent une difficulté pour transaminer des β -cétoesters, puisque même le MeAcAc, qui présente une structure linéaire et relativement simple, n'a pas été transformé. Néanmoins, les α -cétoesters de l'alcool périllique ont été transaminés sans difficultés, probablement à cause de leur similarité avec le pyruvate (substrat naturel des transaminases) (**Tableau 14**).

Cette observation suggère que l'approche d'amination des terpénoïdes *via* un intermédiaire α -cétoester serait prometteuse. Or, dans le cas des β -cétoesters, d'autres transaminases devraient être criblées pour donner accès aux dérivés β -aminoesters correspondants. Parmi les possibles transaminases, la ATA117 11Rd de Codexis ayant été utilisé dans la synthèse de la sitagliptine, semble pouvoir réaliser cette transformation.

Tableau 14 Activité spécifique calculée pour la transamination des cétoesters. Mesure à 245 nm tous les 30 secondes pendant 40 min dans une microplaque de 96 puits (Greiner UVstar) avec 200 μ L de volume réactionnel. Conditions : 1 mM d'accepteur (2 et 4 mM pour le MeAcAc), 10 mM de S-MBA, 100 μ M de pyridoxal-5-phosphate (PLP) et 20 μ g de Cv-TA ou 9,6 μ g de Bm-TA, dans du tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,5)

Substrat d'intérêt	Acétoacétate de méthyle 	Perillyl pyruvate 	Perillyl acétoacétate 	Témoin sans transaminase	Témoin sans accepteur
Activité spécifique Cv-TA (mU/mg de protéines)	0	52,935 \pm 2,631	0	0	0
Activité spécifique Bm-TA (mU/mg de protéines)	0	67,077 \pm 8,628	0	0	0

2. Transamination du monoterpénoïde myrténol

2.1. Contexte

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce chapitre, une autre piste de valorisation des terpénoïdes que nous avons poursuivie est celle de la valorisation des fonctions alcool en amine. Le monoterpénoïde myrténol a été choisi comme molécule modèle, s'appuyant sur les travaux préliminaires du Dr Antoine Lancien. Celui-ci avait réussi à aminer le myrténol grâce à une cascade hybride en deux étapes (**Figure 83**). La première étape impliquait l'utilisation de catalyseurs métalliques (Au@TiO₂ et Au@CeO₂) pour convertir le myrténol en myrténal en 24 h à 50 °C. Dans la seconde étape, la transaminase de *Burkholderia multivorans* (Bm-TA) était ajoutée au milieu avec le donneur d'amine (MBA) et des quantités catalytiques de PLP. Cette étape permettait la transamination *in-situ* du myrténal pour former la myrténylamine.

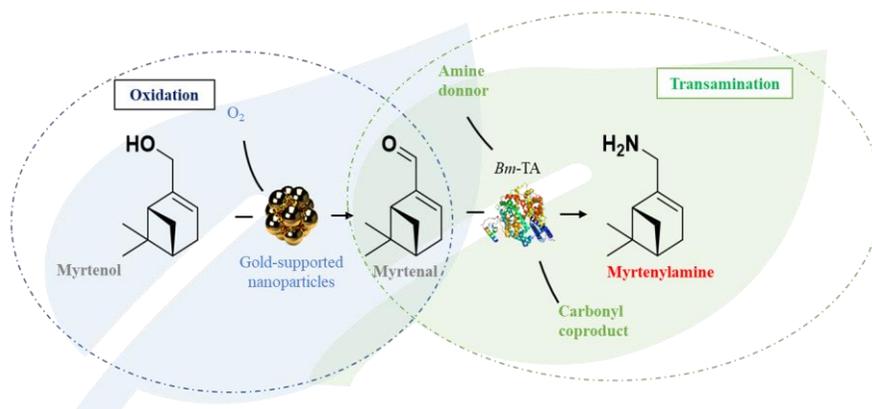


Figure 83 Schéma de la cascade hybride en deux étapes permettant de produire de la myrténylamine à partir du myrténol

Fort de ces résultats encourageants, notre objectif était d'adapter cette méthode pour créer une cascade entièrement enzymatique. Nous avons commencé par étudier l'étape de transamination du myrténal. Pour cela, nous avons réalisé un criblage initial avec différentes transaminases produites en interne. Outre la Bm-TA, déjà connue pour sa capacité à réaliser cette réaction, nous avons également testé la transaminase de *Chromobacterium violaceum* (Cm-TA) et une transaminase de *Vibrio fluvialis* (identifiée par Uniprot : F2XBU9). Ces enzymes ont été choisies pour leur potentiel à catalyser des réactions similaires et pour élargir la gamme des enzymes testées, augmentant ainsi nos chances de succès dans cette voie de valorisation enzymatique des terpénoïdes.

2.2. Gamme d'absorbance du myrténol et du myrténal

Avant de lancer nos tests en microplaque, nous avons établi une gamme d'absorbance pour le myrténol et le myrténal à différentes longueurs d'onde. Cela nous a permis de déterminer la longueur d'onde optimale pour suivre nos réactions enzymatiques (**Figure 84**).

Nos observations ont révélé que le myrténal présente une absorbance élevée entre 235 et 260 nm, même à des concentrations aussi faibles que 125 μM . Nous avons déduit un coefficient d'extinction molaire pour le myrténal de $\epsilon = 6870 \text{ L/mol/cm}$ à un λ_{max} de 250 nm. Cette forte absorbance est probablement due à la conjugaison de la double liaison présente dans le cycle du myrténal, ainsi qu'à une possible hyperconjugaison du squelette carboné, provoquant un effet bathochrome. En revanche, le myrténol, étant un alcool allylique, présente une absorbance nettement inférieure, avec un pic à 230 nm. Cela s'explique par l'absence de conjugaison. Pour cette molécule, nous avons déterminé un coefficient d'extinction molaire de $\epsilon = 1655 \text{ L/mol/cm}$ à un λ_{max} de 230 nm.

La forte absorbance du myrténal a posé quelques défis lors de nos tests de transamination, qui se basaient sur la formation d'acétophénone ($\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ nm}$). D'une part, le spectromètre de notre laboratoire ne peut mesurer des valeurs d'absorbance supérieures à 4. Par conséquent, nous ne pouvions pas utiliser une concentration de myrténal supérieure à 1 mM sans atteindre rapidement la saturation. D'autre part, la formation d'acétophénone entraîne une augmentation de l'absorbance à 245 nm, tandis que la consommation de myrténal provoque une diminution. Ces deux phénomènes interfèrent, compliquant le suivi de la réaction. Face à ces défis, nous avons décidé d'explorer d'autres méthodes pour suivre la réaction, dont le test couplé avec le lactate déshydrogénase, que nous discuterons dans la section suivante.

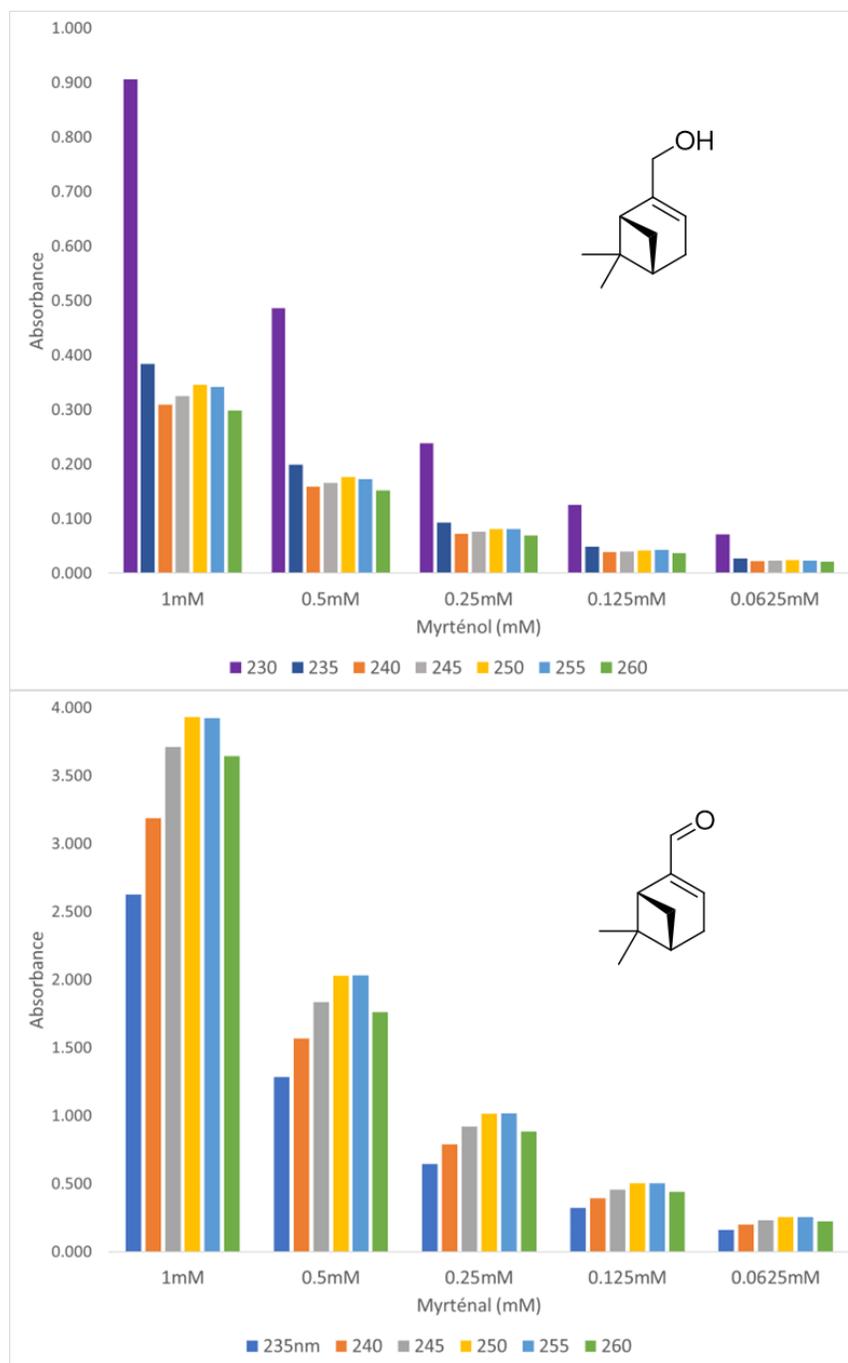


Figure 84 Gamme d'absorbance du myrténol et du myrténal pour une concentration entre 62,5 μ M et 1 mM ; avec 100 mM de tampon NaP à pH 7,5 ; 30 °C

2.3. Test de transamination basé en utilisant la L-alanine et la lactate déshydrogénase

Une alternative pour évaluer l'activité des transaminases est d'utiliser un test basé sur la combinaison de la L-alanine et de la lactate déshydrogénase (LDH). Dans ce test, la L-alanine sert de donneur d'amine, produisant du pyruvate de manière stœchiométrique. Ce pyruvate est ensuite réduit par la LDH, une oxydoréductase, en L-lactate. Ce processus utilise le co-enzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), qui est à son tour oxydé en NAD⁺. L'oxydation du NADH ($\epsilon = 6220 \text{ L/mol/cm}$) entraîne une diminution de l'absorbance à 340 nm. Cette baisse d'absorbance peut donc être suivie pour évaluer indirectement l'activité de la transaminase. De plus, la transformation du pyruvate en lactate favorise également la formation du produit aminé, en déplaçant l'équilibre réactionnel vers la production de ce dernier. Il est important de noter que, étant donnée la réversibilité des deux réactions enzymatiques, le test doit être réalisé dans des conditions les plus favorables possibles. Cela implique l'utilisation d'une quantité adaptée de LDH et d'un excès significatif de L-alanine (**Figure 85**).

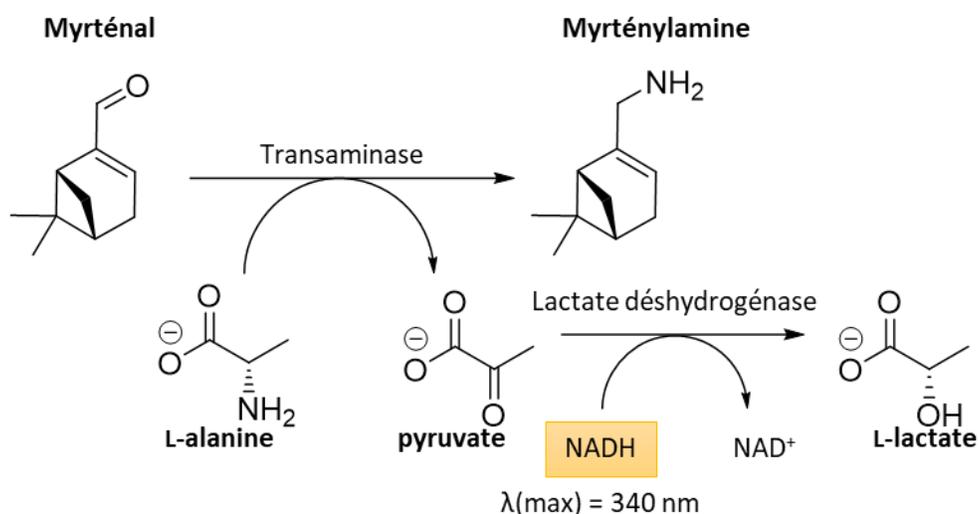


Figure 85 Schéma du test de transamination du myrténal couplé avec la L-alanine et l'enzyme lactate déshydrogénase.

Nous avons donc procédé à tester l'activité des trois transaminases avec le myrténol en utilisant la L-alanine et la LDH. Pour confirmer la fiabilité de notre test, en particulier face aux éventuels problèmes que pourrait poser le myrténal, nous avons également mesuré l'activité des enzymes en présence d'un aldéhyde plus simple : le propanal. Il était également essentiel de réaliser des témoins pour s'assurer de la fiabilité de nos résultats. Ainsi, des tests sans transaminase et sans LDH ont été effectués. Ces témoins nous ont permis de confirmer que la diminution observée de la concentration de NADH était bien due à l'action conjointe des deux enzymes. De plus, pour éliminer tout doute sur l'origine de l'activité observée, des témoins négatifs, sans substrat accepteur, ont également été réalisés. A chaque fois, le test démarre avec l'addition du donneur L-alanine, après laquelle l'absorbance de la solution est suivie à 340 nm est suivie pendant 20 minutes, correspondant à la phase stationnaire de la réaction, à 30 °C sans agitation (**Figure 86**).

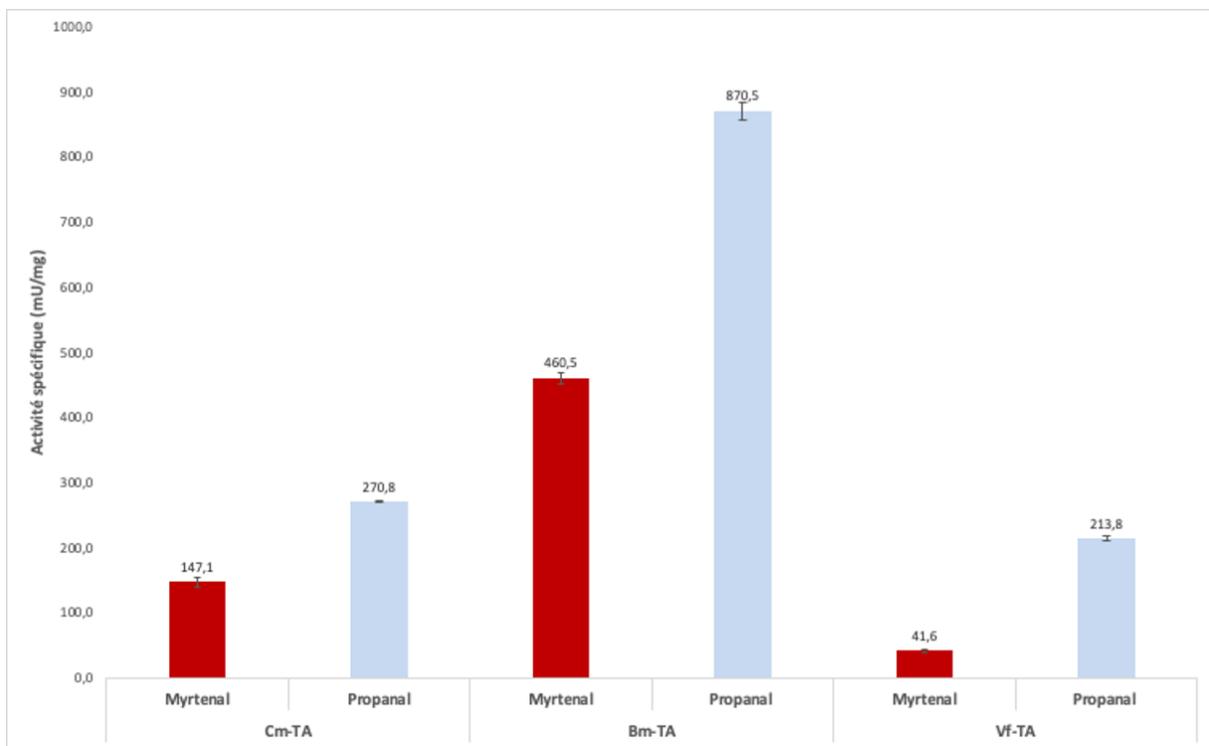


Figure 86 Activité spécifique des transaminases en présence de myrténal ou de propanal avec 1 % DMSO tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7,5) réalisé à 30 °C. Concentrations finales : 20 mM L-alanine, 2 mM myrténal ou propanal, 0.8 mM NADH, 100 μ M PLP, 0.2 U LDH et 40 μ g de *Cv*-TA, 20 μ g de *Bm*-TA ou 79 μ g de *Vf*-TA.

Les tests décrits précédemment nous ont permis de calculer l'activité spécifique des trois transaminases en présence du myrténal ou de propanal. Lorsque le propanal est utilisé comme substrat, toutes les transaminases montrent une activité notable. La *Bm*-TA se distingue particulièrement avec une activité spécifique de 870 mU/mg de protéines. Cela démontre sa capacité à transaminer efficacement des aldéhydes simples. En ce qui concerne le myrténal, un substrat plus complexe, les trois transaminases ont montré une capacité à le transaminer, mais à des degrés différents. La *Bm*-TA est à nouveau en tête avec une activité spécifique de 460 mU/mg, suivie de la *Cm*-TA à 147 mU/mg. La *Vf*-TA, quant à elle, montre une activité plus limitée pour ce substrat, avec seulement 41 mU/mg. Les témoins négatifs ont joué un rôle crucial pour valider ces résultats. Ils ont montré de très faibles diminutions d'absorbance à 340 nm, suggérant que le NADH n'est pas oxydé en l'absence d'enzymes ou d'aldéhyde. Ces observations ont donc renforcé la fiabilité de nos mesures.

En conclusion, parmi les enzymes testées, la *Bm*-TA semble en effet être la plus prometteuse pour la transamination du myrténal, offrant une voie potentielle pour la valorisation de ce monoterpénoïde.

III. Utilisation d'alcool déshydrogénases dans des réactions d'oxydoréduction

1. Sélection et production de deux alcool déshydrogénases (ADH)

1.1. Généralités sur le choix des ADH

D'après les informations disponibles dans la littérature, nous avons choisi deux gènes codant pour des alcool déshydrogénases (ADH) pour débiter nos expériences.

La première ADH provient de la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus* (ADH-Gs). Cette enzyme est connue pour sa capacité à fonctionner à des températures élevées, allant jusqu'à 60-70 °C. Elle est également réputée pour sa capacité à oxyder des alcools primaires à longue chaîne, tels que le butanol, ainsi que certains alcools secondaires.^[166,167] Cette enzyme est un homotétramère avec un poids moléculaire de 149,352 kDa. La deuxième ADH est issue de *Rhodococcus Ruber* (ADH-Rr). Elle est reconnue pour sa grande promiscuité envers les substrats, acceptant à la fois des alcools primaires et secondaires.^[168,169] De plus, certains travaux ont montré qu'elle présente une certaine thermostabilité et une tolérance aux co-solvants organiques.^[170] Cette enzyme est également un homotétramère, avec un poids moléculaire de 141,796 kDa. Ces données sont résumées dans le **Tableau 15**.

Pour nos expériences, les gènes codant pour ces enzymes ont été commandés chez la société Twist Bioscience (USA). Les gènes codant pour les ADH ont été insérés dans un plasmide pET-22b(+) afin que la protéine recombinante d'intérêt, portant une étiquette 6-Histidine en N-terminale, puisse être exprimée dans la bactérie *Escherichia coli* (BL21DE3).

Tableau 15 Poids moléculaire de ADH-Gs et ADH-Rr sans et avec le tag d'affinité composé de 6 histidines

	Monomère / avec 6-His	Dimère / avec 2x 6-His	Tétramère / avec 4x 6-His
ADH-Gs (kDa)	36,338 / 37,161	73,338 / 74,676	149,352 / 148,644
ADH-Rr (kDa)	35,449 / 36,272	70,898 / 72,544	141,796 / 145,088

1.2. Production de l'alcool déshydrogénase de *Geobacillus stearothermophilus* (ADH-Gs)

Afin de mieux comprendre et caractériser les enzymes que nous avons produites, nous avons réalisé des analyses par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

1.2.1. Production de ADH-Gs

Ces analyses ont été effectuées pour deux productions distinctes de l'enzyme ADH-Gs, tout en maintenant constantes les conditions de culture cellulaire, d'induction et de récupération de l'enzyme.

- ADH-Gs-(A) : Cette production est issue de la première tentative de production de cette enzyme dans notre laboratoire. Elle provient d'une colonie isolée (sur boîte de Pétri) directement dérivée des cellules transformées par le plasmide le jour précédent.
- ADH-Gs-(B) : Cette production provient d'un stock de cellules transformées, conservées dans un milieu contenant 50 % de glycérol à -80 °C.

Sur le gel correspondant à la production (A), nous avons analysé l'échantillon obtenu après une dialyse réalisée au sulfate d'ammonium, ayant pour but de stabiliser l'enzyme et éliminer des molécules organiques solubles restantes du milieu de culture. Cet échantillon a ensuite été soumis à un choc thermique à 65 °C, et le surnageant résultant a également été analysé. Pour la production (B), des échantillons similaires ont été étudiés, avec en plus l'échantillon du lysat. Ce dernier représente le surnageant récupéré après la lyse cellulaire (*via* french-press) et une centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes (**Figure 87**).

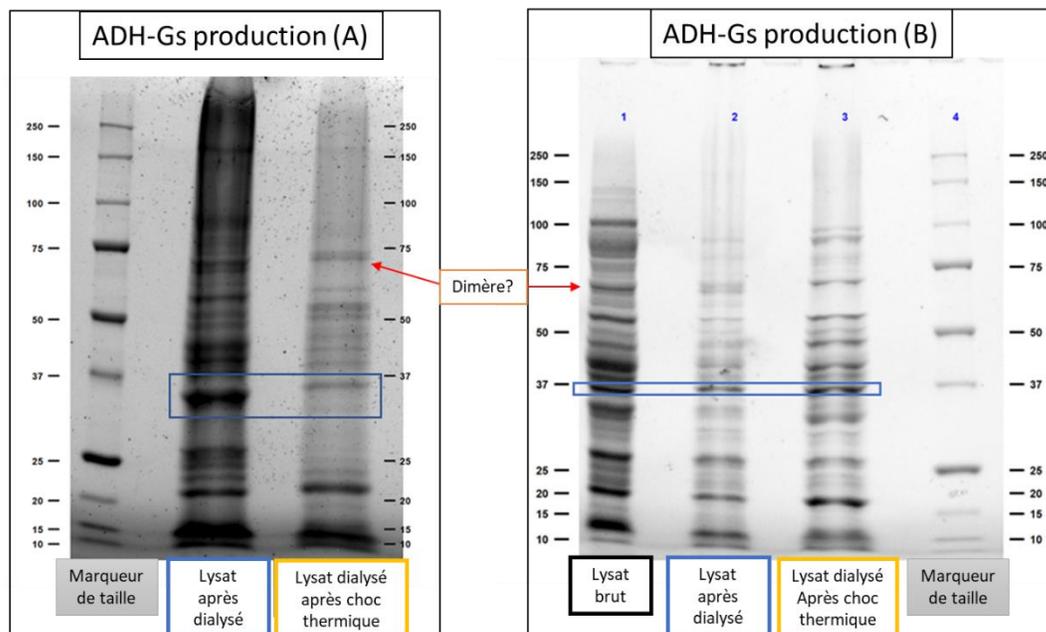


Figure 87 Gels-SDS PAGE BioRad strain-free (8 % acrylamide). Le gel de gauche montre des échantillons du lysat dialysé avant et après choc thermique de la première production de ADH-Gs. Le gel de droite montre les échantillons du lysat et de lysats dialysés avant et après choc thermique pour une deuxième production de ADH-Gs

Nos analyses par électrophorèse SDS-PAGE semblent avoir confirmé la présence du monomère de la protéine d'intérêt à une masse d'environ 37 kDa. Pour la production étiquetée ADH-Gs-(B), l'échantillon post-dialyse a montré une réduction des protéines bactériennes par rapport au lysat initial. Cette observation est cohérente avec les mesures protéiques obtenues par le test de Bradford, indiquant 15,3 mg/mL pour le lysat brut (après sonication des bactéries et récupération du surnageant) et 11 mg/mL après une nuit de dialyse. La dialyse, bien que provoquant la précipitation de l'enzyme, ne semble pas induire de dénaturation irréversible. Cette méthode, couramment utilisée dans notre laboratoire avec les transaminases, a démontré des propriétés stabilisantes. L'objectif principal de cette dialyse était d'éliminer les résidus organiques persistants du milieu de culture, malgré les lavages (**Tableau 16**).

Un choc thermique à 65 °C pendant 10 minutes a joué un rôle intéressant. En effet celui-ci semble avoir éliminé certaines protéines bactériennes non thermostables, une observation soutenue par d'autres études.^[171,172] Pour la production ADH-Gs-(A), les mesures post-choc thermique indiquent que la majorité des protéines d'*E.coli* n'étaient pas thermostables, suggérant que la protéine d'intérêt était en minorité. Ces données suggèrent une surexpression suboptimale ou une éventuelle dénaturation lors de la préparation. Une étude a également signalé que l'alcool déshydrogénase de *Geobacillus stearothermophilus* peut être instable, en particulier en présence d'oxydants, se précipitant sous forme de dimères inactifs.^[173] Bien que l'électrophorèse SDS-PAGE soit un outil puissant, elle ne révèle pas la proportion de l'enzyme active sous forme tétramérique. Une étude complémentaire utilisant la spectrophotométrie de masse, comme le MALDI-TOF, pourrait fournir des informations supplémentaires.

Tableau 16 Bilan des productions (A) et (B) de ADH-Gs

	Production (A)	Production (B)
Masse cellulaire récupérée	0,73 g/100 mL (5,45 g total)	0,8 g/100 mL (2 g total)
[Protéines] après dialyse (mg/mL)	5,1	11
[Protéines] après choc thermique (mg/mL)	1,24	1,31

1.2.2. Production de ADH-Rr

L'enzyme ADH-Rr a été produite simultanément avec la production ADH-Gs-(B) et dans des conditions identiques. L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE révèle une bande distincte d'une masse moléculaire légèrement inférieure à 37 kDa. Cette observation est en accord avec la masse attendue du monomère de notre protéine d'intérêt, qui est prévue à 35,449 kDa sans le tag 6-histidine et 36,272 kDa avec le tag. Une autre bande, d'une masse moléculaire légèrement inférieure à 75 kDa, est également visible. Cette dernière pourrait représenter la forme dimérique de l'ADH-Rs, avec des masses attendues de 70,898 kDa sans les tags et 72,544 kDa avec deux tags 6-His.

Ces observations suggèrent une surexpression réussie, mais imparfaite, de la protéine chez la bactérie *E.coli*. De plus, la dialyse au sulfate d'ammonium semble avoir réduit la présence de protéines non désirées. Cependant, une bande très prédominante dans la plage de 25- 30 kDa est également visible sur le gel. Étonnamment, la ou les protéines associées à cette bande semblent avoir été surexprimées. À ce stade, l'identité exacte de cette bande demeure inconnue (**Figure 88**).

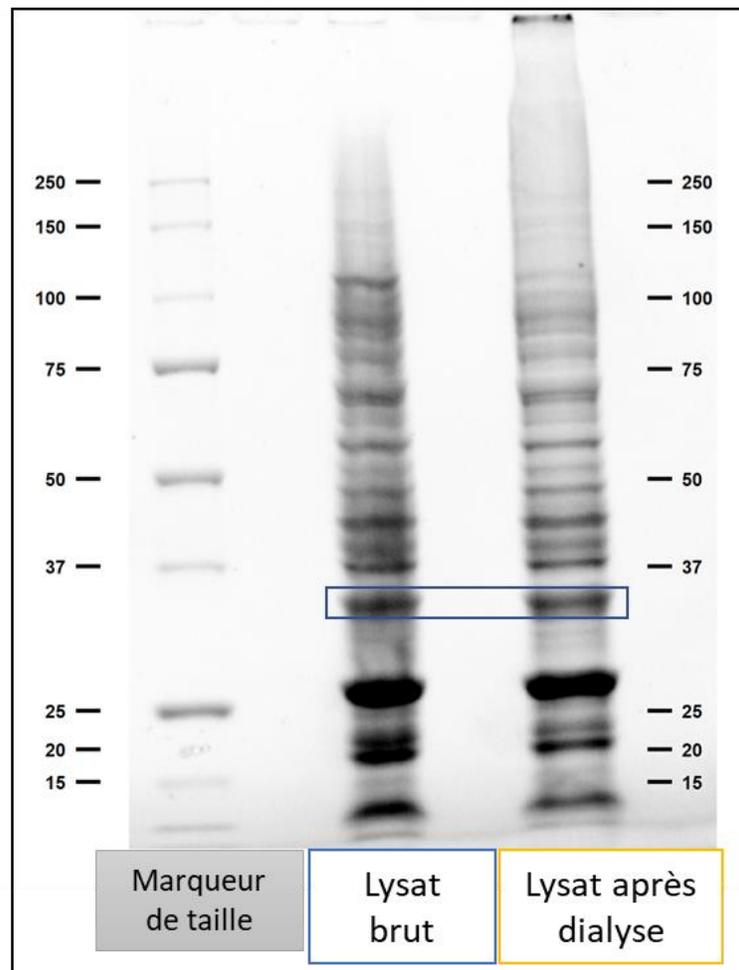


Figure 88 Gel SDS-PAGE BioRad strain-free (8 % acrylamide). Les échantillons correspondent au lysat cellulaire avant et après dialyse pour ADH-Rr

2. Utilisation des alcool déshydrogénases sur différents substrats

2.1. Tests d'activité sur des substrats possédant des fonctions alcool primaire et secondaire

Nous avons entrepris des tests d'activité avec les deux ADH en présence de divers alcools pouvant être oxydés. Nous avons notamment examiné le 1-butanol, le 2-butanol, le 2-phényléthanol, ainsi que certains terpénoïdes d'intérêt comme le myrténol, l'alcool périllique et la dihydrolactucine. Les trois objectifs principaux de cette étape étaient :

1. Confirmer le bon fonctionnement des enzymes ;
2. Évaluer la possibilité d'oxydation des LST de la chicorée, y compris la DHLc ;
3. Examiner l'oxydation du myrténol en myrtenal, en vue de sa transformation ultérieure en myrténylamine grâce à une transaminase.

Dès les premières expérimentations, nous avons observé des comportements surprenants de ces enzymes. Le plus étonnant était que leur forme en extrait cellulaire libre (CFE), que ce soit le lysat brut post-sonication ou après dialyse au sulfate d'ammonium, ne montrait aucune activité détectable. Toutefois, en soumettant cet extrait enzymatique à un choc thermique (65 °C pendant 10 minutes) puis à une centrifugation, nous avons constaté que l'activité catalytique attendue était restaurée dans le surnageant. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer ce phénomène, comme la présence potentielle d'une autre enzyme non thermostable inhibant l'activité, ou un éventuel réarrangement de la structure tridimensionnelle du tétramère. Malheureusement, aucune de ces théories n'a été confirmée. Par conséquent, dans le cadre de ce projet, seuls des résultats obtenus après le choc thermique seront discutés dans la suite de ce chapitre.

Dans la réaction d'oxydation, les ADH utilisent le coenzyme NAD^+ pour oxyder un alcool primaire en aldéhyde ou un alcool secondaire en cétone. Au cours de cette réaction, le NAD^+ est réduit en NADH, molécule pouvant être suivie à 340 nm. Les conditions générales du test sont résumées ci-dessous (**Figure 89**).

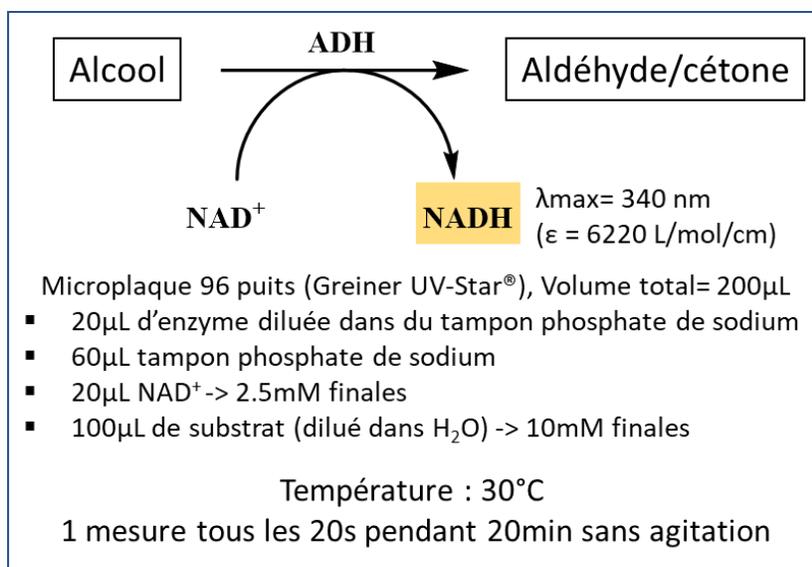


Figure 89 Principe et conditions générales du test spectrophotométrique pour les ADH basé sur la formation de NADH

Suite à notre criblage de divers alcools, les enzymes ADH-Gs et ADH-Rr ont été testées selon la méthode précédemment décrite. Les résultats ont révélé une nette préférence des deux enzymes pour l'alcool secondaire, le 2-butanol, par rapport au 1-butanol. Ces observations sont en accord avec les données existantes dans la littérature.^[174] Plus précisément, l'ADH-Rr, provenant de *Rhodococcus*, a montré une activité sept fois supérieures pour le 2-butanol comparativement au 1-butanol. De même, l'ADH-Gs a également manifesté une préférence pour le 2-butanol, avec une activité trois fois plus élevée que celle observée pour le 1-butanol. Cependant, son activité reste nettement inférieure à celle de l'ADH-Rr. En ce qui concerne les autres substrats testés, le 2-phényléthanol a été oxydé par les deux enzymes. Toutefois, l'ADH-Rr s'est avérée nettement plus efficace. Malheureusement, aucune des enzymes n'a montré d'activité pour les terpénoïdes d'intérêt (**Figure 90**).

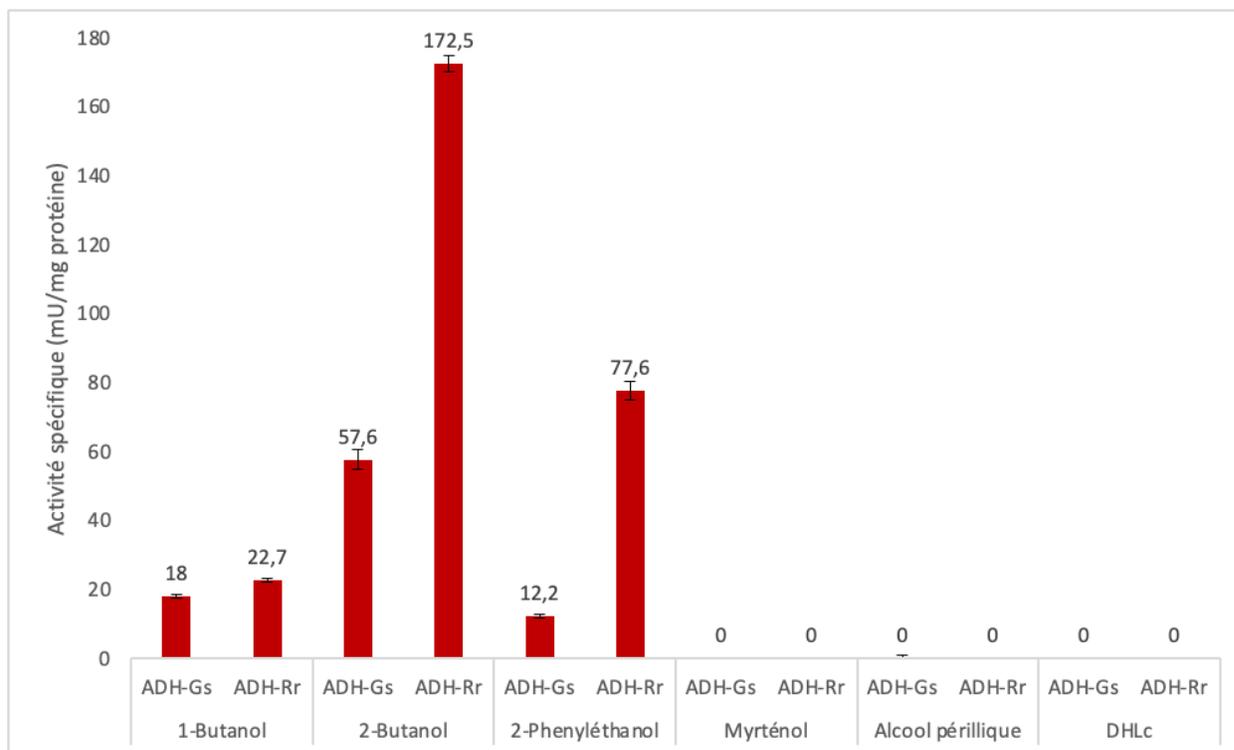


Figure 90 Activité spécifique mesurée pour 26 μg d'ADH-Gs et 41 μg d'ADH-Rr avec 10 mM d'alcool, 2.5 mM NAD^+ , 60 mM tampon phosphate de sodium à pH 8, 30 °C

Les ADH sont réputées pour leur préférence pour des conditions alcalines lorsqu'il s'agit d'oxyder un alcool en aldéhyde ou en cétone. Selon la littérature, l'oxydation est optimale à un pH supérieur à 8, tandis que la réduction est favorisée dans une plage de pH de 7 à 8.^[173,175] Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à caractériser davantage ces enzymes en mesurant leur activité face à l'oxydation du 2-butanol (le substrat le plus réactif) à différents pH, comme illustré à la **Figure 91**.

Les résultats montrent clairement que les deux enzymes sont plus efficaces pour l'oxydation à un pH supérieur à 7,5. De plus, elles conservent leur activité même à un pH de 9,5. L'optimum d'activité pour l'ADH-Gs est à un pH de 8,5, tandis que pour l'ADH-Rr, il est à un pH de 9.

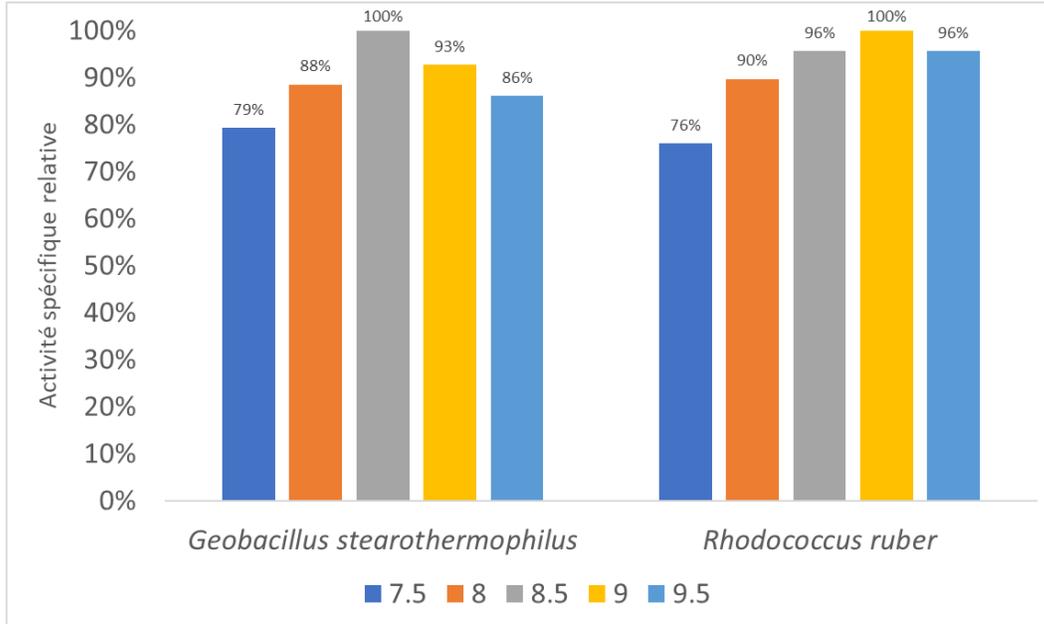


Figure 91 Activité spécifique relative des alcools déshydrogénases à différents pH, en présence de 10 mM de 2-butanol dans les conditions standards du test

Nos expériences ont démontré que les ADH que nous avons produites sont aptes à oxyder certains alcools, avec une nette préférence pour les alcools secondaires comme le 2-butanol. De plus, cette oxydation est optimisée dans des conditions alcalines, avec un pH situé entre 8,5 et 9. Cependant, malgré nos efforts, ces enzymes n'ont pas réussi à oxyder les molécules que nous ciblions, notamment le myrténol et les LST comme la DHLc. En conséquence, ces enzymes ne correspondent pas aux besoins de notre projet et nous avons décidé de ne pas poursuivre leur utilisation.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était d'explorer la modification de terpènes en utilisant des réactions de catalyse enzymatique pour créer de nouveaux composés d'intérêt. Bien que nous ayons exploré plusieurs réactions et différentes classes d'enzymes, notre attention s'est principalement portée sur l'utilisation de lipases pour synthétiser de nouveaux esters de terpénoïdes. Grâce à l'emploi de monoterpénoïdes simples, nous avons réussi à déterminer les conditions réactionnelles optimales pour ces transformations. La CAL-B, une lipase commerciale largement étudiée, a démontré une fois de plus son efficacité remarquable dans la fonctionnalisation des terpènes. Nous avons notamment réussi à introduire des chaînes alkyles sur des monoterpénoïdes tels que le géraniol et l'alcool périllique, avec des rendements (>99 % avec l'acétate de vinyle et l'acide hexanoïque) au moins équivalents ou supérieurs à ceux rapportés dans la littérature pour des procédés optimisés. De plus, nous avons innové en synthétisant des dérivés de terpénoïdes n'ayant jamais été décrits par voie enzymatique : les cétoesters. Parmi ces derniers, les alpha-cétoesters pyruviques issus du géraniol, du citronellol, de l'alcool isopropylbenzylique, de l'alcool périllique et du myrténol, ainsi que le bêta-cétoester formé par couplage entre le méthyl acétoacétate et l'alcool périllique, ont été synthétisés pour la première fois.

Dans la continuité de nos travaux, nous avons abordé des molécules plus complexes, à savoir les lactones sesquiterpéniques (LST), en particulier celles présentes dans la racine de chicorée cultivée dans la région des Hauts-de-France. Nous avons réussi à adapter la réaction d'acylation, initialement mise au point sur des composés modèles, à ces molécules plus élaborées. En conséquence, des chaînes acétyles ont été introduites de manière régiosélective au niveau de l'alcool primaire des quatre LST disponibles issues de la chicorée, aboutissant à la création de nouveaux dérivés avec des rendements proches de 100 %. Par ailleurs, l'une de ces LST, la dihydro lactucine, extraite en quantités plus significatives dans le cadre de la thèse jumelle menée par Mme Francesca Ruggieri, nous a permis d'élargir la gamme des chaînes introduites. Suite à cette recherche, nous avons pu synthétiser pour la première fois les dérivés acétate, propionate, hexanoate, octanoate et chloroacétate de la DHLc. Au cours de nos expérimentations, nous avons pu observer que la voie enzymatique offrait certains avantages par rapport aux méthodes chimiques traditionnelles, en particulier en ce qui concerne la sélectivité. La synthèse sélective d'esters de LST au niveau de leur alcool primaire a émergé comme une alternative complémentaire efficace à la synthèse chimique. En effet, cette dernière permet de produire des esters semi-synthétiques au niveau de l'alcool secondaire, notamment *via* l'utilisation de groupements protecteurs pour l'alcool primaire, mais rencontre des difficultés à acyler de façon sélective l'alcool primaire. Ce constat a mené à une collaboration fructueuse avec le Pr. Catherine Humeau. Dans ce cadre, des études de docking moléculaire ont permis d'apporter des éléments de réponse aux comportements observés lors des réactions d'acylation des LST de la chicorée, et d'approfondir la compréhension des interactions de la CAL-B avec ce type de composés. Cette recherche sur l'acylation enzymatique des LST a abouti à la publication du premier article dédié à la modification enzymatique de ces molécules dans la revue ChemBioChem.

Une fois la méthodologie validée sur des lactones sesquiterpéniques (LST) purifiées, nous nous sommes tournés vers une cible encore plus complexe : un extrait de racine de chicorée riche en LST préparé dans notre laboratoire. Dans cette partie de l'étude, nous avons démontré la faisabilité d'acyler les LST présentes dans ce mélange *via* une méthodologie similaire à celle utilisée pour les molécules pures. En plus de l'identification des nouveaux produits acylés attendus, nous avons également observé l'émergence de

nouvelles molécules, potentiellement inconnues jusqu'alors dans ce contexte. Enfin, pour commencer à évaluer l'activité biologique des extraits avec ou sans modification enzymatique, nous avons mené des premiers tests sur des champignons, en utilisant une méthodologie spécialement développée pour ce but dans notre laboratoire.

En complément, nous avons également exploré d'autres types de réactions biocatalytiques, notamment en produisant plusieurs transaminases et alcools déshydrogénases, avec pour objectif de poursuivre l'exploration des voies de fonctionnalisation des terpènes. Bien que certains essais n'aient pas abouti aux résultats souhaités, d'autres ont révélé des pistes de valorisation prometteuses. Par exemple, l'alpha-céto ester de l'alcool périllique, préalablement synthétisé, a été utilisé comme substrat pour l'introduction d'une fonction amine *via* des transaminases. Les transaminases ont également montré des résultats encourageants pour la production de myrténylamine à partir du myrténal. Ces avancées, permettant de produire des aminoterpènes innovants, ouvrent des perspectives intéressantes pour de futures valorisations dans ce domaine.

Sur la base des résultats prometteurs de cette thèse, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées. D'autre part, la synthèse d'esters de LST est une voie à valoriser davantage. Il serait pertinent de tester d'autres donneurs d'acyle et de rechercher une lipase permettant d'introduire des groupements portant des noyaux aromatiques avec différents substituants. Comme nous l'avons vu dans la littérature, l'introduction de ce type de chaînes peut également avoir un effet favorable sur leurs activités biologiques.

D'autre part, les tests de transamination pourraient être poursuivis sur les dérivés cétoesters, dans un premier temps en criblant aussi d'autres transaminases maintenant disponibles au laboratoire avec la méthode en microplaque, et ensuite sur des volumes plus importants afin de permettre la caractérisation des produits par RMN.

L'évaluation des activités biologiques de l'ensemble des nouveaux dérivés est aussi un point important. Concernant les cétoesters et les éventuelles cétoamines monoterpéniques, leurs spectres d'activités biologiques sont encore inconnus à ce stade, étant donné qu'il s'agit d'un nouveau type de dérivés. De même, il serait intéressant d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques en tant que potentiels agents surfactants. Concernant les alkyl-esters de LST, leur évaluation sur des cellules cancéreuses, ainsi que sur différentes bactéries ou champignons pathogènes, serait pertinent afin d'avoir plus d'informations sur l'influence de ces modifications.

Enfin, la modification et la caractérisation fine des extraits modifiés pourrait être poursuivie d'avantage. Notamment en utilisant également les autres donneurs d'acyle ayant déjà été validés sur les composés purs.

Partie expérimentale

Biologie Moléculaire et Biochimie

1. Production de protéines recombinantes

Tableau 17 Récapitulatif des enzymes produites

Type d'enzyme	Uniprot	Organisme d'origine	Plasmide et résistance	Tampon de lyse
Amine-transaminase	Q7NWG4	<i>Chromobacterium violaceum</i>	pET22b(+) Ampicilline	10 mM NaP, 50 µM PLP, pH 7,5
Amine-transaminase	B9AZ94	<i>Burkholderia multivorans</i>	pET24b Kanamycine	10 mM NaP, 50 µM PLP, pH 7,5
Amine-transaminase	F2XBU9	<i>Vibrio fluvialis</i>	pET21(+)-NHT ampicilline	10 mM NaP, 50 µM PLP, pH 7,5
Alcool déshydrogénase	P42328	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	pET21(+)-NHT ampicilline	10 mM NaP, 10 µM ZnCl ₂ , pH 7,5
Alcool déshydrogénase	Q8KLT9	<i>Rhodococcus ruber</i>	pET21(+)-NHT ampicilline	10 mM NaP, 10 µM ZnCl ₂ , pH 7,5

1.1. Transformation

Une première transformation est faite à partir du plasmide d'intérêt dans des cellules d'*Escherichia coli* JM109 pour le stockage du plasmide et dans des cellules d'*Escherichia coli* BL21-DE3 pour la production de la protéine recombinante.

Des prélèvements de 50 µL des cellules JM109 et BL21-DE3 sont réalisés sous conditions stériles et introduits dans des tubes Eppendorf respectifs. Les tubes sont maintenus dans la glace à 4°C. 0,4 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés aux cellules JM109 (0,8 µL/100 µL de cellules).

Le plasmide d'intérêt, est dilué à une concentration de 50 ng/µL avec de l'eau ultra-pure (EUP). 1 µL de cette solution est ensuite introduite dans les tubes Eppendorf contenant les bactéries compétentes. La transformation est réalisée *via* un choc thermique selon le protocole suivant :

1. 20 min à -4 °C
2. 42 secondes à 42 °C
3. 2 min à 4 °C
4. 500 µL de milieu de régénération SOC (2 % tryptone, 0,5 % 'yeast extract', 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucose) sont introduits et le mélange est incubé à 37 °C pendant 1h30 à 200 rpm.

1.2.Étalement sur boîte de pétri :

Une fois la transformation terminée, deux boîtes de petri par bactérie sont préparées. Les boîtes sont préparées avec de l'agar (15 %) mélangé à du milieu Luria-Bertani(10 g/L tryptone, 5 g/L 'yeast extract' et 10 g/L de NaCl) et 100 µg/µL d'ampicilline sodium. La première boîte est inoculée avec 100 µL de bactéries transformées et la deuxième avec 200 µL. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 1 nuit sans agitation.

Pour la première production à partir du plasmide, des nouvelles boîtes de petri sont préparées pour les cellules BL21-DE3 et JM109, chacune à partir d'une colonie bien isolée récupérées des boîtes de pétri précédentes. Une incubation d'une nuit à 37 °C est à nouveau réalisée.

1.3.Préculture

1.3.1. A partir d'une colonie

Une colonie isolée est remise en suspension dans 5 mL de milieu Luria-Bertani supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline sodium dans un tube Falcon de 15 mL avec un bouchon adapté permettant une circulation d'oxygène. Le milieu est incubé à 37 °C pendant une nuit à 220 rpm pour atteindre une densité optique d'environ 0,6-0,7 mesurée à 600 nm (DO₆₀₀) le lendemain.

1.3.2. Préparation de 'glycérol stock' pour la conservation des cellules transformées

100 µL de préculture préparée à partir d'une colonie isolée sont mélangés avec un volume équivalent d'une solution aqueuse contenant 80 % de glycérol stérile (préalablement passée par l'autoclave) dans un cryotube adapté à la congélation maintenue dans la glace à 4 °C. Les cryotubes préparés sont ensuite congelés rapidement à l'aide d'azote liquide et rangés au congélateur à -80 °C dans une boîte adaptée et étiquetée.

1.3.3. Préculture à partir de 'glycérol stock'

Dans des productions suivantes, les pré-cultures peuvent être réalisées avec des cellules déjà transformées conservées dans le glycérol. 1 cryotube contenant des cellules transformées avec le plasmide d'intérêt est sorti du congélateur à -80 °C et placé immédiatement dans la glace à 4 °C. Au bout de 1-2 min, 50 µL de cellules glycérol stock sont introduits dans 3mL de milieu Terrific-Broth supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline sodium selon le protocole décrit précédemment. Le tube contenant le « glycérol stock » est identifié (date d'utilisation) et remis au congélateur à -80 °C.

1.4.Culture

La culture est faite avec 2 mL de préculture dans 200 mL de milieu Terrific Broth (12 g/L de tryptone, 24 g/L de yeast extract, 4 g/L de glycérol, 2.3 g/L de KH₂PO₄ et 16,4 g/L de K₂HPO₄) avec 100 µg/mL d'ampicilline sodium dans un erlenmeyer de 500 mL muni un bouchon adapté permettant la circulation d'oxygène. Le milieu est incubé à 37°C à 220 rpm et la densité optique à 600 nm est mesurée régulièrement afin de suivre la croissance bactérienne.

1.5.Induction

L'induction est réalisée avec 1mM d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) lorsque la culture atteint une densité optique convenable. Typiquement, l'induction est réalisée pendant la phase exponentielle de croissance, correspondant à une DO₆₀₀= 0,6-0,8. Le milieu est ensuite incubé à 30°C pendant 1 nuit à 220 rpm.

1.6.Récupération des cellules

Les milieux de culture sont récupérés et centrifugés à 4000 G pendant 20 min à 4 °C dans des tubes Falcon de 50 mL, les culots sont récupérés et remis en suspension dans 20 mL de tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7.5). La suspension est centrifugée à 4000 g/20 min/4 °C et les culots sont récupérés, cette étape de lavage est réalisée 3 fois. Au bout du 3^{ème} lavage le culot est remis en suspension dans 30 mL de tampon de lyse froid (sorti du réfrigérateur à 4 °C), en fonction de la protéine produite. La lyse cellulaire est réalisée à l'aide d'une french-press à 2400 bar. Le lysat est ensuite centrifugé à 16000 G pendant 10 min afin de récupérer le surnageant contenant la protéine d'intérêt.

1.7. Dialyse au sulfate d'ammonium

Le lysat cellulaire est introduit dans un boudin de dialyse et placé dans un cristalliseur avec une solution* contenant 50 mM de tampon phosphate, 3 M de sulfate d'ammonium (>99 % pureté) à pH 7.2. La dialyse est faite dans bain de glace sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté. Au bout de 4 h sous agitations, le montage est placé au réfrigérateur à 4 °C pendant 1 nuit. Le lysat précipité est ensuite récupéré à l'aide d'une pipette et conservé au réfrigérateur à 4 °C dans un tube Falcon** de 15 mL jusqu'à utilisation.

*La solution saturée au sulfate d'ammonium contient 50 µM de PLP (utilisé pour les transaminases) ou 40 µM de ZnCl₂ (utilisé pour les ADH)

**Dans le cas des alcool déshydrogénases : du gas inerte (Argon) est introduit dans le tube Falcon afin de limiter la présence de dioxygène dans le milieu.

1.8. Détermination de la quantité de protéines totale

La détermination de la concentration massique de protéines totales dans les échantillons est faite par la méthode de Bradford. Un échantillon de 20 µL est dosé par addition de 180 µL de solution de Bradford (100 mg de bleu de Coomassie brillant G dans 50 mL d'EtOH, 100 mL d'acide phosphorique à 85 %, eau qsp 1 L). Après agitation et incubation à 30 °C pendant 15 min, la DO est mesurée à 595 nm. Une gamme étalon de 0,1 à 1 mg/mL est réalisée avec une solution titrée d'albumine de sérum bovin (BSA). La concentration en protéines de l'échantillon (mg/mL) est déterminée en reportant les valeurs d'absorbance obtenues sur la courbe étalon.

Un test d'activité enzymatique est également effectué avec les enzymes fraîchement préparées, le protocole est décrit dans la partie correspondante.

1.9. Purification de la transaminase issue de *Burkholderia multivorans* (Bm-TA)

La purification de la Bm-TA est réalisée à l'aide d'une colonne d'affinité pour le tag histidine : IMAC (Cellu Sep H11). 20 mL de colonne ont été préparés, avec une capacité totale de fixation de 800 mg d'enzymes (40 mg/mL de colonne mouillée). Le suivi de la purification a été effectué par le dosage de Bradford. Pour cela, 5 µL de chaque fraction récoltée a été prélevé et ajouté à 195 µL de réactif de Bradford dans des plaques de 96 puits à fond plat.

Premièrement, la colonne a été équilibrée avec deux volumes de colonne d'une solution à 25 mM d'imidazole (pH 7 avec 50 mM de tampon phosphate de sodium et 50 mM de NaCl). Le lysat cellulaire a ensuite été introduit sur la colonne, et environ 2-3 volumes de colonne de solution à 25 mM d'imidazole ont été passés à travers jusqu'à la disparition de la coloration bleue, indiquant que les enzymes constitutives d'*E. coli* ont traversé la colonne, et la réapparition de la coloration naturelle du Bradford. Environ 3 volumes de colonne d'une solution à 250 mM d'imidazole ont ensuite été passés à travers la colonne jusqu'à la récupération complète de l'enzyme purifiée, marquée par la fin de la deuxième coloration bleue. Les

fractions contenant l'enzyme purifiée ont été regroupées et dialysées deux fois : la première dans un tampon phosphate de sodium 10 mM à pH 7, et la seconde dans un tampon phosphate de sodium 10 mM à pH 7 contenant 3 M de sulfate d'ammonium. Le précipité au sulfate d'ammonium est conservé à 4 °C dans un tube Falcon adapté jusqu'à utilisation.

1.10. Réalisation des gels SDS-page pour l'identification des protéines

Les gels de protéine permettant de vérifier la présence de la protéine d'intérêt sont réalisés avec des gels précoulés « Mini-PROTEAN® TGC Stain-free » à 8 % d'acrylamide. La migration est réalisée dans une cassette Mini-PROTEAN® Tetra Cell à 200 V à voltage constant avec un tampon de migration contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0.1 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS).

Les échantillons contenant les protéines sont dilués dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7 de façon à obtenir une concentration en protéines d'environ 10 µg/µL (déterminé *via* le test de Bradford). 15 µL de chaque échantillon sont mélangés avec 5 µL de tampon Laemmli 4X (62,5 mM Tris-HCL, 10 % glycérol, 1 % SDS, 0,005 % bleu de bromophénol à pH=6,8) et chauffés à 90 °C pendant 10 minutes dans un bain marie.

10 µL d'échantillon et 5 µL de marqueur de taille (Precision Plus Protein Standard Unstained, catalogue n° 1610396 de Bio-Rad®) sont déposés dans chaque puits et la migration est réalisée selon un programme classique décrit par le fabricant. Le gel est analysé dans un appareil ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad®).

2. Tests d'activité enzymatique

2.1. Généralités

Les mesures d'activités sont effectuées à 30 °C ou 37 °C dans un volume total de 200 µL dans une microplaque de 96 puits de la marque Greiner Bio-One UV-Star™ ayant un trajet optique 0.59 cm (des plaques absorbant dans la gamme UV peuvent être utilisées pour les tests basés sur le NADH). Les mesures d'absorbance sont réalisées toutes les 20 secondes pendant 20min en mode cinétique. Les pentes maximales sont mesurées sur la partie linéaire de la courbe, représentative des conditions de vitesse initiale pour une enzyme dite Michaelienne, avec un minimum de 20 points. Toutes les mesures sont réalisées en triplicat.

L'activité enzymatique de 1 U (unité internationale) représente 1 µmol de substrat transformé par minute par millilitre de solution contenant la protéine ou par milligramme de protéines totales.

Les enzymes disponibles sous la forme d'une suspension dans du sulfate d'ammonium 3M sont centrifugées (10 min à 12000 rpm) et les culots sont solubilisés dans du tampon phosphate avant utilisation. Les solutions contenant les enzymes sont maintenues dans la glace à 4°C. Le tampon et les substrats utilisés sont préalablement chauffés afin d'attendre la température souhaitée pour le test d'activité enzymatique.

2.2. Tests d'activité pour les ADH

Avant utilisation, un tube Eppendorf de 2 mL contenant la solution avec l'enzyme d'intérêt (dans du tampon phosphate 50 mM pH 8) est chauffé à 65°C dans un bain sec pendant 10 minutes, le surnageant obtenu après centrifugation (10 min à 10000 rpm) est récupéré dans un autre tube Eppendorf et placé dans la glace à 4°C.

Les solutions contenant du NAD⁺ ou du NADH sont préparés dans l'eau ultrapure et conservées à -20 °C pendant une période maximale de 2 mois (1 mois pour NADH), les solutions sont maintenues dans la glace à 4°C immédiatement avant utilisation.

Les mesures d'absorbance sont réalisées à 340 nm, un coefficient d'extinction molaire de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ est utilisé pour le NADH.

2.2.1. Tests d'oxydation des alcools

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL d'ADH (solubilisée dans du tampon phosphate à 50 mM pH 8 ou au pH indiqué pour le test), 60 µL de tampon phosphate de sodium à 200 mM [50 mM], 20 µL de NAD⁺ à 20 mM dans H₂O [2 mM] et 100 µL d'alcool à 20 mM dans H₂O [10 mM].

Le témoin sans enzyme est réalisé en remplaçant 20 µL d'ADH par 20 µL de tampon en utilisant le butanol et/ou le 2-butanol en tant que substrat. Le témoin sans substrat est réalisé en remplaçant les 100 µL d'alcool par 100 µL d'H₂O. Un témoin sans NAD⁺ est également judicieux de réaliser après la production de l'enzyme afin de vérifier que la différence d'absorbance observée soit issue de la consommation du NAD⁺ introduit dans la solution.

2.2.2. Test de réduction des carbonyles

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 µL d'ADH (50 mM tampon phosphate, pH 7.5), 60 µL de tampon phosphate de sodium à 200 mM [50 mM], 20 µL de NADH à 8 mM dans H₂O [0.8 mM] et 100 µL de substrat (aldéhyde/cétone) à 20 mM dans H₂O.

Les témoins respectifs sont effectués *via* la même démarche décrite lors des tests d'oxydation des alcools.

2.3. Tests d'activité des transaminases

2.3.1. Généralités

Les solutions contenant les réactifs sont stockées à -20 °C jusqu'à utilisation. La solution de (S)-MBA est préparée dans du tampon phosphate de sodium à partir de phosphate monobasique, une solution de NaOH à 5 M est utilisée pour ajuster le pH à 7.5.

Les enzymes sont diluées par 5 ou par 10 dans leur tampon correspondant de façon à avoir une activité de l'ordre de 20-30 mDO/min par puits.

2.3.2. Test utilisant la (S)-MBA comme donneur d'amine

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 μL de transaminase, 20 μL de PLP à 1 mM dans l'eau [100 μM], 60 μL d' H_2O , 50 μL de d'accepteur à 8 mM dans l'eau à 8 % DMSO [2 mM, 2 % DMSO] et 50 μL de SMBA à 40 mM [10 mM] dans du tampon phosphate à 400 mM [100 mM].

Des témoins en absence de transaminase et sans accepteur sont également réalisés. L'absorbance est mesurée à 245 nm (1 mesure tous les 20 secondes pendant 20 min sans agitation). Un coefficient d'extinction molaire de 12 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ est utilisé pour la formation de l'acétophénone.

2.3.3. Test utilisant la L-alanine couplé à la lactate déshydrogénase

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 μL de transaminase, 20 μL de LDH à 5 U/mL [0,5 U/mL], 50 μL de tampon phosphate à 50 mM pH 7,5, 20 μL de PLP à 1 mM [100 μM], 20 μL de NADH à 8 mM [0,8 mM], 20 μL d'accepteur (myrténal ou propanal dans 10% DMSO) [2 mM, 1 % DMSO] et 50 μL de L-alanine à 80 mM dans le même tampon phosphate à pH 7,5 [25 mM].

Des témoins sans transaminase, sans transaminase ni LDH, et sans accepteur sont également réalisées. L'absorbance est mesurée à 340 nm et 30 °C selon les conditions décrites antérieurement. Un coefficient d'extinction molaire de 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ est utilisé pour le NADH.

2.4. Test d'activité des lipases basés sur l'hydrolyse du p-nitrophenylbutyrate

Dans un puits sont ajoutés successivement 20 μL de lipase dans du tampon phosphate (100 mM, 150 mM NaCl et pH 7,2), 160 μL de tampon phosphate et 20 μL de p-NPB à 5 mM dans l'eau à 10 % d'acétonitrile [0,5 mM, 1 % ACN]

Des témoins en absence de lipase et en absence de p-NPB sont réalisés en parallèle. L'absorbance de la solution est mesurée à 400 nm et 37 °C sans agitation. Un coefficient d'extinction molaire de 14,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ est utilisé pour le p-NPB

Synthèses enzymatiques

1. Réactions d'acylation de monoterpénoïdes

1.1. Généralités

Des billes de tamis moléculaire de 3 et 5 angström sont utilisés dans le cadre des réactions d'acylation. Avant utilisation, le tamis moléculaire est séché dans un four à 250 °C pendant 24 h à l'intérieur d'un récipient en verre de 50 mL recouvert de papier aluminium. De façon à permettre l'évaporation de l'eau pouvant être présente dans le tamis moléculaire, le papier aluminium est percé plusieurs fois avec une aiguille fine.

Concernant les solvants, l'acétonitrile (grade HPLC) et le tert-butyl-methyl-ether sont conservés dans des flacons en verre en présence de tamis moléculaire activé (3 angström) afin de limiter la présence d'eau. Les solutions contenant les réactifs sont ensuite préparées dans ces solvants.

Les réactions sont réalisées dans des flacons en verre de 2 mL de type HPLC munis d'un bouchon à vis non-percé de PTFE/silicone. Les flacons sont recouverts d'une couche de papier aluminium et placés à l'étuve à la température indiquée dans un carrousel à tubes (agitateur rotatif) Thermo Scientific™.

L'enzyme 'lipase-like' de *Ipomoea batatas* (lipase Vg) nous a été fournie sous forme d'un extrait aqueux par le Pr. Frédéric Bourgaud de la société Plant Advanced Technologies. L'enzyme est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

1.2. Mise en œuvre des réactions de synthèse d'esters aliphatiques du géraniol

La lipase de *Rizomucor miehei* (Lipozyme RM, Novozymes®) à une concentration en protéines de 5,9 mg/mL mesurée par le test de Bradford a été diluée par 5 dans l'eau ultra-pure de façon à obtenir une quantité de 4,72 µg dans les 20 µL utilisés pour la réaction.

20mM de géraniol et 60mM d'acétate de vinyle ou d'acide hexanoïque ont été dissous dans le solvant (3/1 :MTBE/ACN) en présence de tamis moléculaires de 3 Å. La solution contenant les réactifs a été introduite dans des flacons de 2 mL contenant 10 mg de Novozym 435, 20 µL de lipase de *Rizomucor miehei* (4,72 µg de protéines) ou 20 µL de lipase Vg (4,6 µg de protéines) et 3 sphères de tamis moléculaires de 5 Å de façon à obtenir un volume total de 1 mL par milieu réactionnel. Des contrôles ont été effectués dans les mêmes conditions en l'absence de l'enzyme. La réaction est réalisée à 37°C et 35 rpm pendant 24 h. Les milieux réactionnels ont ensuite été filtrés sur un filtre PFTE de 0,2 µm et introduits dans des flacons pour analyse par GC. Les analyses ont été réalisés avec une colonne Phenomenex® ZB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

1.3.Synthèse du (S)-perillyl acetate

100 mM d'alcool périllique et 300 mM d'acide acétique ou d'acétate de vinyle ont été dissous dans le solvant (3/1 :MTBE/ACN) en présence de tamis moléculaires de 3 Å. 1 mL de la solution obtenue a été introduite dans un flacon de 2 mL contenant 10 mg de Novozym 435 et 3 sphères de tamis moléculaires de 5 Å. Des contrôles ont été effectués dans les mêmes conditions en l'absence de l'enzyme. Les réactions ont été réalisées à 37°C et 35 rpm. Des échantillons de 25 µL ont été prélevés à différents intervalles de temps et dissous dans 225 µL d'acétonitrile (qualité LCMS). Ils ont ensuite été filtrés sur un filtre PFTE de 0,2 µm et introduits dans des flacons pour analyse par GC avec une colonne Phenomenex® ZB-1HT (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

1.4.Synthèse de l'ester pyruvique de l'alcool périllique

Le (S)-(4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl-2-oxopropanoate a été synthétisé *via* une réaction d'estérification entre le (S)-alcool périllique et l'acide pyruvique.

10 mg de lipase Novozym® 435 et deux billes de tamis moléculaire (5 angström) sont introduits dans un flacon en verre préalablement taré. Les réactions décrites dans ce manuscrit sont réalisées avec 100 mM d'alcool périllique et 300 mM d'acide pyruvique solubilisés dans 1 mL de solvant sec (acétonitrile ou MTBE). Les réactions ont lieu à 40 °C et 35 rpm. Les réactions ont été réalisées à 45 °C et 35 rpm en triplicat, avec un témoin sans lipase ayant également été réalisé en parallèle.

Le suivi de la réaction est réalisé à partir de prélèvements de 25 µL à l'aide d'une seringue en verre Hamilton® de 50 µL et mélangés avec 225 µL d'acétonitrile. Le mélange est ensuite vortexé pendant 20-30 secondes, filtré à 0,2 µm (filtre en PFTE non stérile) et introduit dans des flacons pour l'analyse en chromatographie phase gazeuse (GC).

Les analyses GC sont effectuées dans un appareil GC/MS QP2010 Shimadzu® équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un spectromètre de masse de type quadropôle à ionisation électronique (QP2010 Ultra EI) sur une colonne Phenomenex® ZB-1HT (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) selon les paramètres suivants :

Température de l'injecteur : 280°C

Gradient de température : 50 °C/2min ; 20 °C/min jusqu'à 310 °C pendant 5 min

1.5.Synthèse des esters pyruviques d'autres monoterpénoïdes

10 mg de lipase Novozym® 435 et deux billes de tamis moléculaire (5 angström) sont introduits dans des flacons en verre préalablement tarés. Les réactions décrites dans ce manuscrit sont réalisées avec 100 mM d'alcool (géraniol, β-citronellol, alcool isopropyl-4-benzylrique ou myrténol) et 300 mM d'acide pyruvique solubilisés dans 1 mL de MTBE sec. Les réactions ont été réalisées à 45 °C et 35 rpm en triplicat, avec des témoins sans lipase ayant également été réalisés en parallèle. Le suivi de la réaction est réalisé selon le même protocole décrit précédemment.

1.6.Synthèse de l'ester acétoacétique de l'alcool périllique

10 mg de lipase Novozym® 435 et une bille de tamis moléculaire sont introduits dans flacon en verre préalablement taré. Les réactions décrites dans ce manuscrit sont réalisées avec 20 mM ou 50 mM d'alcool périllique, un excès de MeAcAc (300 mM). Les flacons sont placés à l'étuve à 40 °C sous agitation à 35 rpm. Des témoins sans de lipase sont réalisés en parallèle, d'autres témoins sans alcool périllique ou sans donneur d'acyle ont également été réalisés.

Analyse RMN ¹H : Après 24 h de réaction, de milieu réactionnel est filtré à 0,2 µm en (filtre en PTFE non stérile), introduit dans des tubes Eppendorf de 2 mL et concentré sous vide à 37 °C dans un appareil de type SpeedVac™ (pendant un temps minimum de 1 h) et solubilisé dans 700 µL de chloroforme deutéré (CDCL₃). Les analyses sont réalisées dans des tubes à RMN dans un appareil de 300 MHz.

2. Réactions d'acylation des lactones sesquiterpéniques

2.1.Généralités

Le propionate de vinyle (98 %, stabilisé avec MEHQ), l'hexanoate de vinyle (99 %, stabilisé avec MEHQ), l'octanoate de vinyle (99 %, stabilisé avec MEHQ) et le chloroacétate de vinyle (99 %, stabilisé avec MEHQ) ont été achetés chez TCI Chemicals. L'acétate de vinyle (99 %, stabilisé avec hydroquinone) a été acheté chez Alfa Aesar. Les solvants MTBE (99 %) et acétonitrile (99,9 %, qualité LCMS) ont été obtenus respectivement chez Alfa Aesar et Sigma-Aldrich. Les standards de référence lactucine (# 3809), 11β,13-dihydrolactucine (# 3810), lactucopicrine (# 3813) et 11β,13-dihydrolactucopicrine (# 3811) ont été achetés chez ExtraSynthese avec une pureté de 95 %.

La DHLc utilisée dans cette étude a été extraite dans le cadre de la thèse de Mme. Francesca Ruggieri à partir de racine de chicorée lyophilisée et purifiée par chromatographie sur colonne flash. Le protocole d'extraction complet a été spécialement mis en place pour cette occasion et est décrit par *Ruggieri et al.*(2023).

2.2.Synthèse des acétates de DHLc, DHLp, Lc et Lp en utilisant la CAL-B

10 mM de Lc (2,76 mg), DHLc (2,78 mg), Lp (4,10 mg) ou DHLp (4,12 mg) et 100 mM d'acétate de vinyle (8,60 mg, 9,22 µL) ont été dissous dans le solvant sec (3/1 :MTBE/ACN ou ACN) en présence de tamis moléculaires de 3 Å. 1 mL de la solution obtenue a été introduit dans un flacon de 2 mL contenant 20 mg de Novozym 435 et 3 particules de tamis moléculaires de 5 Å. Les flacons ont été placés dans un agitateur rotatif orbital (Thermo Scientific Tube Revolver) à 35 rpm dans une étuve à 37 °C pendant 48 h. Les mélanges réactionnels ont ensuite été filtrés sur un filtre PFTE de 0,2 µm dans des tubes Eppendorf de 2 mL et concentrés sous 8 mbar à 35 °C dans un système SpeedVac de Thermo Scientific pendant 2 heures jusqu'à séchage complet.

2.3.Synthèse d'esters de la DHLc avec des donneurs d'acyle commerciaux en utilisant la CAL-B

10 mM de DHLc (2,76 mg) et 100 mM des esters de vinyle correspondants ont été dissous dans le mélange de solvants en présence de tamis moléculaires de 3 Å. 1 mL de la solution résultante a été introduit dans un flacon de 2 mL contenant 20 mg de Novozym 435 et 3 particules de tamis moléculaires de 5 Å. Les flacons ont été placés dans un agitateur rotatif orbital (Thermo Scientific Tube Revolver) à 35 rpm dans une étuve à 37 °C pendant 48 h. Les mélanges réactionnels ont ensuite été filtrés sur un filtre PFTE de 0,2 µm dans des tubes Eppendorf de 2 mL et concentrés sous 8 mbar à 35 °C dans un système SpeedVac de Thermo Scientific pendant 2 h.

2.4.Tentative de synthèse d'esters de la DHLc avec des aryl vinyl esters

Les esters vinyliques portant des cycles aromatiques ont été fournis par le groupe du Pr. Nicolas Willand de l'Institut Pasteur de Lille (UMR 1177). Ceux-ci ont été synthétisés à partir des acides carboxyliques correspondant selon les protocoles décrits dans la publication de *Mosheim et al. (2024)* : <https://doi.org/10.1002/cbic.202300722>

Le protocole décrit dans la partie 2.3 (Synthèse d'esters de la DHLc avec des donneurs d'acyle commerciaux) a été appliqué.

2.5.Etudes de modélisation des interactions entre les LST et la CAL-B

Les molécules ont été construites en 3D à l'aide des logiciels ChemDraw et Chem3D (PerkinElmer) version 16.0.

L'étape de docking a été réalisée par le Pr. Catherine Humeau (Université de Lorraine). La structure cristalline de la CAL-B (entrée PDB : 1LBS) contenant l'inhibiteur éthylhexylphosphonate (HEE) lié de manière covalente à la sérine catalytique a été choisie comme structure de départ. L'inhibiteur a été retiré et des systèmes acyle-enzyme ont été construits en liant les différents donneurs d'acyle à la sérine catalytique. La stratégie de construction consiste à suivre le placement de la chaîne hexyle de l'inhibiteur qui était supposé indiquer la localisation de la fraction acyle de l'acyle-enzyme. Ensuite, une procédure de relaxation de la structure a été effectuée avec des contraintes et des restrictions qui ont été progressivement retirées afin de préserver l'organisation des atomes de la protéine. Les simulations de docking ont été exécutées en utilisant le module Flexible Docking du logiciel Discovery Studio 4.5. La zone flexible a été définie par les résidus 40, 105, 106, 134, 140, 141, 144, 149, 154, 157, 187, 189, 224, 278, 281, 282, 285 et 286.

Études sur les extraits de racine de chicorée

1. Préparation des extraits de racine de *Cichorium intybus*

La racine de *Cichorium intybus* var. sativum a été fournie par la société Florimond-Desprez. Celle-ci a été lyophilisée dans un appareil Genesis Pilot Lyophilizer (SP Scientific) et réduite en poudre par Philippe Hance (UMRt BioEcoAgro, laboratoire SN2). La poudre de racine a été conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

La préparation de l'extrait a été faite *via* une macération à partir de 20 g de poudre de racine dans 200 mL d'eau ultra-pure à 25 °C sous agitation à 250 rpm pendant 24 h dans un flacon en verre de 250 mL recouvert de papier aluminium de façon à protéger le milieu de la lumière. Le milieu est ensuite récupéré dans des tubes Falcon de 50 mL et soumis à un choc thermique à 100°C pendant 5min dans un bain marie. Par la suite, le milieu est centrifugé (4000 rpm/10 min) et le surnageant récupéré et filtré à l'aide d'une seringue de 50mL équipé d'un filtre en polytetrafluoroéthylène (PTFE) de 0,2 µm. A l'issue de cette étape, environ 140mL de surnageant sont récupérés. L'extraction liquide-liquide est réalisée avec 75 mL d'extrait aqueux, en utilisant un volume équivalent d'acétate d'éthyle. La fraction aqueuse est extraite 3 fois *via* cette méthode dans une ampoule à décanter et les fractions organiques sont rassemblées dans un erlenmeyer de 500 mL. La fraction organique est séchée avec du MgSO₄ et filtrée sur Büchner. Finalement, la phase organique est filtrée à 0,2 µm, répartie dans des tubes Falcon de 50 mL et concentrées à 8 mbar et 35 °C jusqu'à l'évaporation du solvant.

L'extrait organique sec est solubilisé dans l'acétonitrile et reparti dans des tubes Eppendorf de façon à obtenir une masse de 3 mg d'extrait par tube après l'évaporation du solvant via la méthode décrite précédemment.

La partie de l'extrait brut n'ayant pas subi d'extraction liquide-liquide a été lyophilisée à pression réduite pendant 48 h.

Les extraits secs sont conservés à -20 °C jusqu'à utilisation (maximum 2 semaines).

2. Réactions d'acylation catalysée par la CAL-B en utilisant l'acétate de vinyle

Les réactions avec l'extrait organique et leurs témoins respectifs (sans donneur d'acyle, sans enzyme ou sans enzyme ni donneur) ont été réalisées dans des flacons en verre de 2 mL. Les réactions avec l'extrait aqueux brut après lyophilisation (EB) ont été réalisées dans des flacons en verre de 5mL avec une quantité plus importante d'extrait dû à des difficultés de manipulation et à la solubilisation difficile de ce dernier.

800mg d'extrait brut (EB) sont introduits dans un flacon en verre avec 3,5 mL d'acétonitrile. Les flacons sont introduits dans un bain à ultrasons pendant 30 min. 10 mg de Novozym 435, 3 billes de tamis moléculaire (5 angström) et 200 mM d'acétate de vinyle sont introduits dans le milieu réactionnel. Un témoin en absence d'enzyme est réalisé en parallèle. Les milieux réactionnels sont mis à 35°C et 30rpm à l'abri de la lumière.

3 mg d'extrait organique (PO) solubilisés dans 1mL d'acétonitrile, 10 mg de Novozym 435, 2 billes de tamis moléculaire et 200 mM d'acétate de vinyle sont introduits dans un flacon de 2mL. Les témoins respectifs sont réalisés en parallèle. Les réactions en présence d'enzyme et le témoin sans enzyme sont réalisés en triplicat. Les milieux réactionnels sont mis à 35°C et 30 rpm à l'abri de la lumière pendant 24 h. Une deuxième série de réactions identiques ont été réalisées pendant une période de 48h

Des prélèvements de 450 µL et de 500 µL, destinés respectivement à la caractérisation (LC-MS et aux tests d'activité antifongique) sont réalisés. 50 µL sont conservés directement à -20 °C pour les analyses infrarouge. Les autres échantillons sont ensuite filtrés à 0,2 µm et concentrés sous vide (2 mbar, 35 °C, 1 h) et conservés à -20 °C.

3. Tests d'activité antifongique

3.1. Généralités

Rhizoctonia solani et *Fusarium 2DA63* (isolé du marc de café) ont été récupérés au sein du laboratoire (BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, Polytech Lille). Les souches fongiques ont été repiquées sur des boîtes de pétri avec du milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma-Aldrich) et placées à l'étuve à 25°C pendant 3 jours pour *R. solani* et 15 jours pour *F. 2DA63*. Les boîtes sont ensuite conservées à -4 °C jusqu'à utilisation.

3.2. Tests d'activité contre *Rhizoctonia solani*

Les échantillons après l'étape de réaction enzymatique sont traités et solubilisés dans du DMSO à 2,5 % et filtrés à 0,2 µm sous conditions stériles (PSM). La méthode de diffusion par puits a été utilisée pour tester l'activité antifongique des extraits. 7 boîtes Petri avec du milieu gélosé PDA ont été préparées, et 4 puits ont été découpés dans chaque boîte sous conditions stériles. 100 µL des échantillons respectifs sont déposés dans chaque puits ; le témoin négatif est réalisé avec un dépôt de 100 µL de DMSO 2,5 % ; le témoin positif est réalisé avec une solution de cycloheximide (10 µg/L), un antifongique de référence. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 3 jours à 25 °C.

3.3. Tests d'activité basés sur la méthode de la résazurine

3.3.1. Préparation des spores

8 mL d'eau physiologique stérile sont ajoutés dans une boîte contenant une souche de *Fusarium 2DA63* âgée de 15 jours, une agitation est réalisée afin de submerger le champignon. À l'aide d'un étaleur en forme de L, le dessus de la boîte est gratté afin de solubiliser la totalité des spores. La totalité du surnageant est prélevé puis filtré. La suspension est aliquotée dans des tubes Eppendorf de 1 mL. Une dilution au 1/10ème

est effectuée sur la suspension afin de déterminer la concentration en spores, celle-ci es déterminée *via* un comptage sur une cellule de Malassez. La concentration en spore est calculée selon la formule suivante :

$$C_{spore} = \frac{nb \text{ de spores comptées}}{V_{rectangle}} \times F$$

Soit F le facteur de dilution et $V_{rectangle} = 0,01 \text{ mm}^2$. Une concentration de $4,75 \times 10^7$ est calculée pour notre suspension. La suspension est concentrée afin d'obtenir une suspension à 10^8 spores par millilitre.

3.3.2. *Évaluation de la viabilité des spores de Fusarium*

Les échantillons des milieux réactionnels issus de l'étape de biocatalyse ont été solubilisés dans une solution aqueuse de DMSO à 0,1 % et filtrés à 0,2 μm sous conditions stériles. De même, un témoin négatif contenant uniquement du DMSO à 0,1 % et deux témoins positifs avec deux concentrations différentes d'un antifongique de référence (cycloheximide) ont été préparés.

Une fois les échantillons préparés, 50 μL de spores F. 2DA63 (10^8 spores/mL) solubilisés dans du milieu de culture Muller-Hinton, ainsi que 50 μL de l'échantillon respectif sont déposés dans une microplaque 96 puits (FluoBlack, Greiner). Des blancs en absence de spores (avec de l'eau physiologique), ainsi qu'en absence d'extrait, ont également réalisés pour toutes les conditions. La plaque a ensuite été placée dans un sac plastique hermétique et incubée pendant 24 h afin de permettre la croissance du champignon.

A la fin de la période d'incubation, un volume de 100 μL de résazurine (10 μM dans du tampon phosphate de sodium 200 mM pH 7) est introduit dans chaque puits. Les pentes d'émission de fluorescence (RFU/min) sont obtenues à la suite d'une cinétique de 1 h à 30°C en utilisant des longueurs d'onde de 534 nm et de 595 nm pour l'excitation et l'émission, respectivement.

Chimie analytique

1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à 25 °C à l'aide d'un spectromètre Bruker Advance 300. Les constantes de couplage ont été mesurées en Hertz (Hz) et les multiplicités pour le couplage RMN ^1H ont été présentées comme s (singulet), d (doublet), t (triplet) et m (multiplet). Les déplacements chimiques ont été déterminés en calibrant le spectre par rapport au déplacement caractéristique du solvant utilisé (2,50 ppm pour le DMSO- D_6 et 7,26 ppm pour le CDCl_3). Les spectres sont analysés à l'aide du logiciel MestReNova (version 14.2.3)

2. Chromatographie phase gazeuse

Les échantillons ont été analysés sur un chromatographe GC-2010 plus de Shimadzu équipé d'une colonne Phenomenex ZB-1HT (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) ou dans un chromatographe GCMS-QP2010 plus équipé d'un détecteur FID et d'un détecteur de masse à quadrupôle ainsi que d'une colonne Phenomenex ZB-5MS. Le programme de température suivant a été utilisé : démarrage à 50 °C pendant 2 min, puis augmentation de 20 °C/min jusqu'à 310 °C et maintien pendant 5 min. L'injecteur et le FID étaient tous deux réglés à une température de 320 °C. Un rapport de division de 10 avec un temps d'échantillonnage sans division de 1 min a été utilisé. Le débit total était de 21,6 mL/min avec une vitesse linéaire de 47,2 cm/s et un débit de purge de 3 mL/min.

3. Chromatographie liquide

Les chromatogrammes et les spectres de masse issus des réactions d'acylation de la Lc, de la Lp et de la DHLp avec de l'acétate de vinyle, ainsi que l'acylation de la DHLc avec du chloroacétate de vinyle, du propionate, de l'hexanoate et de l'octanoate ont été obtenus sur le système suivant : LC-MS Waters ACQUITY UPLC I-Class équipé d'un gestionnaire de solvant UPLC I BIN SOL MGR, d'un gestionnaire d'échantillons UPLC I SMP MGR-FTN, d'un détecteur à barrette de diodes photodiode ACQUITY UPLC I-Class eK PDA (210–400 nm) et d'un détecteur de masse ACQUITY QDa (Performance) (scan ESI+/- dans la plage de 30–1250). Une colonne Acquity BEH C18 (taille de particules de 1,7 μm , dimensions 50 mm x 2,1 mm) a été utilisée pour l'analyse UPLC. Le volume d'injection était de 0,5 μL . Pour une analyse de 5 min, l'élution a été réalisée à pH 3,8 de 100 % H_2O / 0,1 % formiate d'ammonium à 2 % H_2O / 98 % CH_3CN /0,1 % formiate d'ammonium sur 3,5 min. Un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ a été utilisé. Pour une analyse de 30 min, l'élution a été effectuée à pH 3,8 de 100 % H_2O / 0,1 % formiate d'ammonium à 100 % CH_3CN / 0,1 % formiate d'ammonium sur 25 min. Un débit de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ a été utilisé.

L'acétylation de la DHLc a été suivie par UPLC-QTOF en utilisant une colonne Phenomenex Luna Omega Polar C18 (50 x 2,1 mm x 1,6 μm) avec de l'eau et du CH_3CN contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique et un volume d'injection de 0,5 μL via le gradient suivant : démarrage à 40 % CH_3CN

pendant 2 min, augmentant progressivement à 100 % CH₃CN de 2 à 5 min, 100 % CH₃CN a été maintenu pendant 3 minutes supplémentaires. Le pourcentage de CH₃CN a ensuite été réduit à 40 % sur 2 minutes supplémentaires, pour un temps total de course de 10 min.

Les extraits de racine ont été analysés dans un système UHPLC-QTOF (MS et MS/MS) Maxis Impact (Bruker®) à l'aide d'une colonne Uptisphere® Strategy PHC4 (150 x 3mm x 2,2 µm) avec de l'eau et du CH₃CN contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique et un volume d'injection de 0,5 µL via le gradient suivant : démarrage à 2% CH₃CN jusqu'à 100% CH₃CN au bout de 55,5min, en descendant à 2% de CH₃CN au bout de 63 min afin pour le nettoyage de la colonne. Des échantillons de Lc, Lp, DHLc, DHLp et leurs esters acétiques respectifs purifiés ont été analysés afin d'obtenir les masses et les spectres de fragmentations de référence. Les résultats ont été analysés sur le logiciel MetaboScape® (Bruker) par Maxime de Sousa au laboratoire SN2.

4. Spectroscopie Infrarouge

Les milieux réactionnels sont analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FTIR) sur un appareil Tensor37 (Bruker) en déposant entre 10 µL et 20 µL sur une microplaque 96 puits. La plaque est ensuite laissée pendant quelques minutes sous une sorbonne afin de permettre l'évaporation du solvant et l'apparition d'un dépôt solide dans chaque puits. La plaque est lue par un lecteur de plaque (HTS-XT, Bruker) et les données récupérées sont analysées par le logiciel OPUSLAB (MIR – HTS Transmission).

Attribution RMN des principales molécules :

Myrténal : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 0.73 (s, 3H), 1.04 (d, 1H), 1.33 (s, 3H), 2.20 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.63 (m, 2H), 2.74 (m, 1H), 7.07 (s, 1H), 9.31 (s, 1H)

Myrténylamine : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 0.83 (s, 3H), 1.15 (d, 1H), 1.30 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 2.32 (m, 2H), 2.48 (m, 1H), 3.52 (s, 2H), 5.69 (s, 1H)

(S)-(4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl acetate (perillyl acetate) : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 5.72 (s, 1H, 2), 4.71 (s, 2H, 9), 4.40 (s, 2H, 7), 2.16 – 2.06 (m, 2H, 3b-4), 2.06 – 1.98 (m, 2H, 5), 2.00 (s, 3H, 13), 1.97 – 1.86 (m, 1H, 3a), 1.83 – 1.73 (m, 1H, 6a), 1.70 (s, 3H, 10), 1.49 – 1.30 (m, 1H, 6b). ^{13}C NMR, DEPT135 (75 MHz, DMSO-D_6) : 125 (C2), 109.28 (C9), 67.68 (C7), 40.49 (C13), 30.06 (C3), 27.10 (C6), 26.06 (C5), 20.97 (C10), 20.89(C4).

(S)-(4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl 2-oxopropanoate (perillyl pyruvate) : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 5.81 (s, 1H, 2), 4.71 (s, 2H, 9), 4.58 (s, 2H, 7), 2.38 (s, 3H, 14), 2.16 – 2.06 (m, 2H, 3b-4), 2.06 – 1.98 (m, 2H, 5), 2.00 (s, 3H, 13), 1.97 – 1.86 (m, 1H, 3a), 1.83 – 1.73 (m, 1H, 6a), 1.71 (s, 3H, 10), 1.49 – 1.30 (m, 1H, 6b).

(S)-(4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl 3-oxobutanoate (perillyl acetoacetate) : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : 5.78 (s, 1H, 2), 4.73 (s, 2H, 9), 4.53 (s, 2H, 7), 2.47 (s, 2H, 13), 2.28 (s, 3H, 15), 2.18 – 2.10 (m, 2H, 3b-4), 2.12 – 2.05 (m, 2H, 5), 1.98 (m, 1H, 3a), 1.86 (m, 1H, 6a), 1.74 (s, 3H, 10), 1.49 – 1.30 (m, 1H, 6b).

15-acétyl-lactucine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 6.30 (s, 1H, 3), 6.15 (dd, 1H, 13a, $J = 3.05$ Hz, 1.48 Hz), 6.04 (dd, 1H, 13b, $J = 3.25$ Hz, 1.48 Hz), 5.49 (d, 1H, OHb, $J = 5.56$ Hz), 5.25 (d, 1H, 15a, $J = 17.53$ Hz), 4.87 (d, 1H, 15b, $J = 17.50$ Hz), 3.99 – 3.67 (m, 3H, 5-6-8), 3.20 – 3.04 (m, 1H, 7), 2.84 – 2.68 (m, 1H, 9a), 2.38 – 2.31 (m, 3H, 14), 2.32 – 2.23 (m, 1H, 9b), 2.13 (s, 3H, 17).

15-acétyl-11 β ,13-dihydrolactucine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 6.28 (s, 1H, 3), 5.30 – 5.18 (m, 2H, 15a-OHB), 4.83 (d, 1H, 15b $J = 17.83$ Hz), 3.76 (m, 2H, 5-6), 3.57 (m, 1H, 8), 2.68 (m, 2H, 9a-11), 2.35 (s, 3H, 14), 2.32 – 2.13 (m, 2H, 7-9b), 2.12 (s, 3H, 17), 1.26 (d, 3H, 13, $J = 6.96$ Hz). ^{13}C APT NMR (75 MHz, $\text{ns} = 20480$, DMSO-D_6) : 194.49 (C2), 178.10 (C12), 170.44 (C16), 168.07 (C4), 148.64 (C10), 132.72 (C3), 131.84 (C1), 80.67 (C6), 68.29 (C8), 63.35 (C15), 60.40 (C7), 48.83 (C9), 48.65 (C5), 40.96 (C11), 21.65 (C17), 20.98 (C14), 15.67 (C13).

15-acétyl-lactuopicrine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 7.10 (d, 2H, 4B-8B, $J = 8.44$ Hz), 6.71 (d, 2H, 5B-7B, $J = 8.50$ Hz), 6.33 (s, 1H, 3), 5.91 (d, 1H, 13a, $J = 3.19$ Hz), 5.39 (d, 1H, 13b, $J = 2.96$ Hz), 5.23 (d, 1H, 15a, $J = 17.72$ Hz), 4.88-4.85 (m, 2H, 8-15b), 4.02 – 3.97 (m, 2H, 5-6), 3.66 (s, 2H, 2B), 3.56 (m, 1H, 7), 2.86 (m, 1H, 9a), 2.33 (m, 3H, 14), 2.27 (m, 1H, 9b), 2.12 (s, 3H, 17).

15-acétyl-11 β ,13-dihydrolactuopicrine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO-D_6) : 7.06 (d, 2H, 4B-8B $J = 8.31$ Hz), 6.71 (d, 2H, 5B-7B, $J = 8.50$ Hz), 6.31 (s, 1H, 3), 5.23 (d, 1H, 15a, $J = 17.40$ Hz), 4.85-4.77 (m,

2H, 15b-8), 3.90 (m, 2H, 5-6), 3.58 (s, 2H, 2B), 2.82 (m, 1H, 9a), 2.64 (m, 1H, 11), 2.33 (s, 3H, 14), 2.27 (m, 2H, 7-9b), 2.12 (s, 3H, 17), 1.09 (d, 3H, 13, $J = 6.61$ Hz).

15-propionyl-11 β ,13-dihydrolactucine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6) : 6.26 (s, 1H, 3), 5.31 – 5.17 (m, 2H, 15a-OHb), 4.85 (d, 1H, 15b, $J = 18.22$ Hz), 3.87 – 3.68 (m, 2H, 5-6), 3.56 (m, 1H, 8), 2.78 – 2.59 (m, 2H, 9a-11), 2.4 (t, 2H, 17, $J = 7.40$ Hz), 2.35 (s, 3H, 14), 2.31 – 2.09 (m, 2H, 7-9b), 1.26 (d, 3H, 13, $J = 6.95$ Hz), 1.06 (t, 3H, 18, $J = 7.52$ Hz).

15-chloroacétyl-11 β ,13-dihydrolactucine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6) : 6.35 (s, 1H, 3), 5.35 (d, 1H, 15a, $J = 17.50$ Hz), 4.97 (d, 1H, 15b, $J = 17.50$), 4.54 (s, 2H, 17), 3.88 – 3.70 (m, 2H, 5-6), 3.57 (m, 1H, 8), 2.70 (m, 2H, 9a-11), 2.35 (s, 3H, 14), 2.31 – 2.10 (m, 2H, 9b-7), 1.26 (d, 3H, 13, $J = 6.96$ Hz).

15-hexyl-11 β ,13-dihydrolactucine: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6) : 6.25 (s, 1H, 3), 5.31 – 5.16 (m, 2H, 15a-OHb), 4.85 (d, 1H, 15b, $J = 18.07$ Hz), 3.76 (m, 2H, 5-6), 3.56 (m, 1H, 8), 2.79 – 2.56 (m, 2H, 9a-11), 2.40 (t, 2H, 17, $J = 7.36$ Hz), 2.34 (s, 3H, 14), 2.31 – 2.09 (m, 2H, 9b-7), 1.64 – 1.41 (m, 2H, 18), 1.35 – 1.15 (m, 7H, 13-19-20), 0.86 (t, 3H, 21, $J = 6.91$ Hz).

15-octyl-11 β ,13-dihydrolactucine : ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6) : 6.25 (s, 1H, 3), 5.30 – 5.15 (m, 2H, 15a-OHb), 4.85 (d, 1H, 15b, $J = 17.52$ Hz), 3.85 – 3.66 (m, 2H, 5-6), 3.56 (m, 1H, 8), 2.77 – 2.59 (m, 2H, 9a-11), 2.40 (t, 2H, 17, $J = 7.30$ Hz), 2.34 (s, 3H, 14), 2.31 – 2.23 (m, 2H, 9b-7), 1.61 – 1.40 (m, 2H, 18), 1.33 – 1.15 (m, 9H, 13-19-20-21-22), 0.86(t, 3H, 23, $J = 7.00$ Hz).

Bibliographie

- [1] S. Krishna, L. Bustamante, R. K. Haynes, H. M. Staines, *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 520–527.
- [2] F. Liao, *Molecules* **2009**, *14*, 5362–5366.
- [3] R. Matsumi, H. Atomi, A. J. M. Driessen, J. van der Oost, *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 39–52.
- [4] H. S. Elshafie, I. Camele, *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 9268468.
- [5] T. Thomson, *Chemistry of Organic Bodies: Vegetables*, J.B. Baillière, **1838**.
- [6] H. Фролова, A. Ukrainets, I. Sylka, A. Nemirich, O. Kuzmin, *East.-Eur. J. Enterp. Technol.* **2019**, *2*, 32–36.
- [7] M. Christmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9580–9586.
- [8] E. Pichersky, R. A. Raguso, *New Phytol.* **2018**, *220*, 692–702.
- [9] A. Hemmerlin, J. L. Harwood, T. J. Bach, *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 95–148.
- [10] J. H. Langenheim, *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1223–1280.
- [11] T. C. J. Turlings, I. Hiltbold, Rasmann, Sergio, *Plant and Soil* **2012**, *358*, 51–60.
- [12] A. Kessler, R. Halitschke, I. T. Baldwin, *Science* **2004**, *305*, 665–668.
- [13] A. Kessler, M. Heil, *Funct. Ecol.* **2011**, *25*, 348–357.
- [14] D. Kessler, K. Gase, I. T. Baldwin, *Science* **2008**, *321*, 1200–1202.
- [15] H. Loza-Tavera, in *Chem. High. Plant Bioeng.* (Eds.: F. Shahidi, P. Kolodziejczyk, J.R. Whitaker, A.L. Munguia, G. Fuller), Springer US, Boston, MA, **1999**, pp. 49–62.
- [16] R. Paduch, M. Kandefer-Szerszeń, M. Trytek, J. Fiedurek, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **2007**, *55*, 315–327.
- [17] B. M. Fraga, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1350–1381.
- [18] B. Ivanescu, A. Miron, A. Corciova, *J. Anal. Methods Chem.* **2015**, *2015*, 1–21.
- [19] L. Moujir, O. Callies, P. M. C. Sousa, F. Sharopov, A. M. L. Seca, *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3001.
- [20] D. Chaturvedi, in *Discov. Dev. Ther. Nat. Prod. Neglected Trop. Dis.*, Elsevier, **2019**, pp. 49–85.
- [21] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357–367.
- [22] G. D. Braithwaite, T. W. Goodwin, *Biochem. J.* **1960**, *76*, 1–5.
- [23] T. Ramasarma, T. Ramakrishnan, *Biochem. J.* **1961**, *81*, 303–308.
- [24] E. Oldfield, F.-Y. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2012**, *51*, 1124–1137.
- [25] D. Tholl, in *Biotechnol. Isoprenoids* (Eds.: J. Schrader, J. Bohlmann), Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 63–106.
- [26] M. J. Theisen, I. Misra, D. Saadat, N. Campobasso, H. M. Miziorko, D. H. T. Harrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16442–16447.
- [27] K. Berthelot, Y. Estevez, A. Deffieux, F. Peruch, *Biochimie* **2012**, *94*, 1621–1634.
- [28] I. Zabin, *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 851–859.
- [29] S. Pandian, S. Saengchjan, T. S. Raman, *Biochem. J.* **1981**, *196*, 675–681.
- [30] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517–524.

- [31] H. K. Lichtenthaler, J. Schwender, A. Disch, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 271–274.
- [32] H. K. Lichtenthaler, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 47.
- [33] Y. Jin, Z. Liu, Y. Li, W. Liu, Y. Tao, G. Wang, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36379.
- [34] X. Wang, C. S. Dowd, *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 278–290.
- [35] C. C. Burke, M. R. Wildung, R. Croteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 13062–13067.
- [36] H. Ueoka, K. Sasaki, T. Miyawaki, T. Ichino, K. Tatsumi, S. Suzuki, H. Yamamoto, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, K. Yazaki, *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 1933–1945.
- [37] V. M. Sanchez, A. Crespo, J. S. Gutkind, A. G. Turjanski, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18052–18057.
- [38] F. Yu, R. Utsumi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3043–3052.
- [39] C. Sallaud, D. Rontein, S. Onillon, F. Jabès, P. Duffé, C. Giacalone, S. Thoraval, C. Escoffier, G. Herbette, N. Leonhardt, M. Causse, A. Tissier, *Plant Cell* **2009**, *21*, 301–317.
- [40] D. Rontein, S. Onillon, G. Herbette, A. Lesot, D. Werck-Reichhart, C. Sallaud, A. Tissier, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6067–6075.
- [41] Q. Wang, M. L. Hillwig, K. Okada, K. Yamazaki, Y. Wu, S. Swaminathan, H. Yamane, R. J. Peters, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6159–6168.
- [42] M. Mizutani, *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 824–832.
- [43] J.-W. Kraker, M. C. R. Franssen, M. C. F. Dalm, A. de Groot, H. J. Bouwmeester, *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1930–1940.
- [44] D. T. Nguyen, J. C. Göpfert, N. Ikezawa, G. Macnevin, M. Kathiresan, J. Conrad, O. Spring, D.-K. Ro, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16588–16598.
- [45] J.-W. de Kraker, The Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Chicory (*Cichorium Intybus* L.) Roots, [publisher not identified], **2002**.
- [46] Q. Wang, *African Journal of Biotechnology* **2011**, *10*, 1966–1977.
- [47] A. Al-Snafi, *IOSR J. Pharm.* **2016**, *6*, 41–56.
- [48] G. Barcaccia, A. Ghedina, M. Lucchin, *Agriculture* **2016**, *6*, 50.
- [49] R. A. Street, J. Sidana, G. Prinsloo, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, e579319.
- [50] A. K. Gupta, Mamta, I. S. Bhatia, *Phytochemistry* **1985**.
- [51] J. R. A. Baert, E. J. Van Bockstaele, *Ind. Crops Prod.* **1992**, *1*, 229–234.
- [52] “Chicory Market Report | Industry Growth, Size, Share & Trends,” can be found under <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/chicory-market-122013320.html>, **n.d.**
- [53] K. R. Niness, *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1402S-1406S.
- [54] T. Barclay, M. Ginic-Markovic, P. Cooper, N. Petrovsky, **2010**, 24.
- [55] I. C. Nwafor, K. Shale, M. C. Achilonu, *Sci. World J.* **2017**, *2017*, DOI 10.1155/2017/7343928.
- [56] S. Nandagopal, S. Physiology, *undefined* **2007**.
- [57] M. Bogdanović, K. Cankar, S. Todorović, M. Dragicević, A. Simonović, A. van Houwelingen, E. Schijlen, B. Schipper, D. Gagneul, T. Hendriks, M.-C. Quillet, H. Bouwmeester, D. Bosch, J. Beekwilder, *Ind. Crops Prod.* **2019**, *129*, 253–260.
- [58] Y.-L. Ren, Y.-W. Zhou, Y.-H. Ye, *Struct. Chem.* **2003**, *14*, 581–585.
- [59] F. Ruggieri, P. Hance, B. Gioia, A. Biela, P. Roussel, J.-L. Hilbert, N. Willand, *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 771.

- [60] R. A. Sessa, M. H. Bennett, M. J. Lewis, J. W. Mansfield, M. H. Beale, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26877–26884.
- [61] H. Willeman, P. Hance, A. Fertin, N. Voedts, N. Duhal, J.-F. Goossens, J.-L. Hilbert, *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–11.
- [62] S. Ilgün, E. Küpeli Akkol, M. Ilhan, D. Çiçek Polat, A. Baldemir Kılıç, M. Coşkun, E. Sobarzo-Sánchez, *Molecules* **2020**, *25*, 1587.
- [63] N. Ishihara, T. Miyase, A. Ueno, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1987**, *35*, 3905–3908.
- [64] A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Michalska, W. Kisiel, E. Chojnacka-Wójcik, *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 254–258.
- [65] M. Yakoot, S. Helmy, K. Fawal, *Int. J. Gen. Med.* **2011**, *4*, 451–456.
- [66] S. T. Häkkinen, M. Soković, L. Nohynek, A. Ćirić, M. Ivanov, D. Stojković, I. Tsitko, M. Matos, J. P. Baixinho, V. Ivasiv, N. Fernández, C. Nunes dos Santos, K.-M. Oksman-Caldentey, *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 941.
- [67] T. A. Bischoff, C. J. Kelley, Y. Karchesy, M. Laurantos, P. Nguyen-Dinh, A. G. Arefi, *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 455–457.
- [68] K. M. S. U. Imam, Y. Tian, F. Xin, Y. Xie, B. Wen, *Molecules* **2022**, *27*, 7358.
- [69] X. Wang, M. Liu, G. H. Cai, Y. Chen, X. C. Shi, C. C. Zhang, B. Xia, B. C. Xie, H. Liu, R. X. Zhang, J. F. Lu, M. Q. Zhu, S. Z. Yang, X. Y. Chu, D. Y. Zhang, Y. L. Wang, J. W. Wu, *Cells* **2020**, *9*, 331.
- [70] D. Mares, C. Romagnoli, B. Tosi, E. Andreotti, G. Chillemi, F. Poli, *Mycopathologia* **2005**, *160*, 85–91.
- [71] E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, N. Engl. *J. Med.* **1995**, *332*, 1004–1014.
- [72] N. Tsolakis, *Journal of Cleaner Production* **2019**, 802–822.
- [73] N. F. Salakhutdinov, K. P. Volcho, O. I. Yarovaya, *Pure Appl. Chem.* **2017**, *89*, 1105–1117.
- [74] W. Yang, X. Chen, Y. Li, S. Guo, Z. Wang, X. Yu, *Nat. Prod. Commun.* **2020**, *15*, 1934578X20903555.
- [75] M. Zielińska-Błajet, J. Feder-Kubis, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7078.
- [76] B. N. Paulino, G. N. S. Silva, F. F. Araújo, I. A. Néri-Numa, G. M. Pastore, J. L. Bicas, G. Molina, *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *128*, 188–201.
- [77] M. E. I. Badawy, G. I. Kh. Marei, E. I. Rabea, N. E. M. Taktak, *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *158*, 185–200.
- [78] D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2474–2478.
- [79] R. E. Hancock, *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 37–42.
- [80] Y. Inoue, A. Shiraishi, T. Hada, K. Hirose, H. Hamashima, J. Shimada, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *237*, 325–331.
- [81] I. Kubo, H. Muroi, H. Masaki, A. Kubo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1305–1308.
- [82] A. C. Guimarães, L. M. Meireles, M. F. Lemos, M. C. C. Guimarães, D. C. Endringer, M. Fronza, R. Scherer, *Molecules* **2019**, *24*, 2471.
- [83] S. Pattnaik, V. R. Subramanyam, M. Bapaji, C. R. Kole, *Microbios* **1997**, *89*, 39–46.
- [84] J. S. Raut, R. B. Shinde, N. M. Chauhan, S. M. Karuppayil, *Biofouling* **2013**, *29*, 87–96.
- [85] D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G.

- Bisignano, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2474–2478.
- [86] A. Ghantous, H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N. A. Saliba, N. Darwiche, *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 668–678.
- [87] M. A. Avery, M. Alvim-Gaston, C. R. Rodrigues, E. J. Barreiro, F. E. Cohen, Y. A. Sabnis, J. R. Woolfrey, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 292–303.
- [88] C. Ma, C.-W. Meng, Q.-M. Zhou, C. Peng, F. Liu, J.-W. Zhang, F. Zhou, L. Xiong, *Fitoterapia* **2019**, *138*, 104351.
- [89] C. Cantrell, S. Franzblau, N. Fischer, *Planta Med.* **2001**, *67*, 685–694.
- [90] C. Schomburg, W. Schuehly, F. B. Da Costa, K.-H. Klempnauer, T. J. Schmidt, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 313–320.
- [91] A. Jaskulska, A. E. Janecka, K. Gach-Janczak, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 4.
- [92] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 1–9.
- [93] K. Taniguchi, M. Karin, *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 309–324.
- [94] M. T. Scotti, M. B. Fernandes, M. J. P. Ferreira, V. P. Emerenciano, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2927–2934.
- [95] M. F. Beer, A. E. Bivona, A. Sánchez Alberti, N. Cerny, G. F. Reta, V. S. Martín, J. M. Padrón, E. L. Malchiodi, V. P. Sülsen, O. J. Donadel, *Molecules* **2019**, *24*, 1113.
- [96] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522–524.
- [97] A. T. M. e Silva, V. V. Pereira, J. A. Takahashi, R. R. Silva, L. P. Duarte, *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 1714–1720.
- [98] A. Jordan, K. D. Whymark, J. Sydenham, H. F. Sneddon, *Green Chem.* **2021**, *23*, 6405–6413.
- [99] M. Nesterkina, I. Kravchenko, *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 47.
- [100] “Fiche DIC - ECHA,” can be found under <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.007.914>, **n.d.**
- [101] “Fiche DMAP - ECHA,” can be found under <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.013.049>, **n.d.**
- [102] P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, in *Fundam. Aliphatic Chem.* (Eds.: P.W.G. Smith, A.R. Tatchell), Pergamon, **1965**, pp. 177–215.
- [103] R. J. Ouellette, J. D. Rawn, in *Org. Chem.* (Eds.: R.J. Ouellette, J.D. Rawn), Elsevier, Boston, **2014**, pp. 699–745.
- [104] A. Sakakura, K. Kawajiri, T. Ohkubo, Y. Kosugi, K. Ishihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14775–14779.
- [105] S. Xu, I. Held, B. Kempf, H. Mayr, W. Steglich, H. Zipse, *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11*, 4751–4757.
- [106] “Fiche SOC12 - ECHA,” can be found under <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.028.863>, **n.d.**
- [107] A. Amberg, J. S. Harvey, A. Czich, H.-P. Spirkel, S. Robinson, A. White, D. P. Elder, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1495–1506.
- [108] T. J. Schmidt, in *Stud. Nat. Prod. Chem.*, Elsevier, **2006**, pp. 309–392.
- [109] A. C. Beekman, H. J. Woerdenbag, W. van Uden, N. Pras, A. W. T. Konings, H. V. Wikström, T. J. Schmidt, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 252–257.
- [110] Y. Kitai, H. Nishiwaki, L. Yonekura, H. Tamura, *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 1569–1578.
- [111] F. A. Kabeer, G. B. Sreedevi, M. S. Nair, D. S. Rajalekshmi, L. P. Gopalakrishnan, S. Kunjuraman, R. Prathapan, *J. Integr. Med.* **2013**, *11*, 269–277.
- [112] Y.-Y. Zhang, H. Ren, Q.-L. Yan, Y.-L. Li, Q. Liu, G.-D. Yao, S.-J. Song, *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *925*, 174989.

- [113] J. T. Isaacs, W. N. Brennen, S. B. Christensen, S. R. Denmeade, *Molecules* **2021**, *26*, 7469.
- [114] T. Zimmermann, P. Drašar, S. Rimpelová, S. B. Christensen, V. A. Khripach, M. Jurášek, *Biomolecules* **2020**, *10*, 1640.
- [115] H. Alwaseem, S. Giovani, M. Crotti, K. Welle, C. T. Jordan, S. Ghaemmaghami, R. Fasan, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 841–857.
- [116] Y. Liu, X. WeiZhuo, X. Wei, *Food Chem. Adv.* **2022**, *1*, 100052.
- [117] A. Staudt, Y. Brack, I. I. Jr, I. C. R. Leal, *Mol. Catal.* **2022**, *528*, 112464.
- [118] M. H. Abraham, W. E. Acree, J. E. Cometto-Muñiz, *J. Chromatogr. A* **2020**, *1609*, 460428.
- [119] A. Manjón, J. L. Iborra, A. Arocas, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 339–344.
- [120] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, John Wiley & Sons, **2006**.
- [121] K. P. Dhake, D. D. Thakare, B. M. Bhanage, *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28*, 71–83.
- [122] L. Silvestrini, M. Cianci, *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *158*, 358–363.
- [123] L. Casas-Godoy, F. Gasteazoro, S. Duquesne, F. Bordes, A. Marty, G. Sandoval, *Lipases: An Overview*, **2018**.
- [124] A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 3331–3351.
- [125] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40*, 111–120.
- [126] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, “A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*,” DOI 10.1021/jo00008a016can be found under <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00008a016>, **2002**.
- [127] C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380–2420.
- [128] B. Stauch, S. J. Fisher, M. Cianci, *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2348–2358.
- [129] T. Artham, N. Mohanalakshmi, P. P. Paragi-Vedanthi, M. Doble, *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 71–79.
- [130] K. R. Jegannathan, S. Abang, D. Poncelet, E. S. Chan, P. Ravindra, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 253–264.
- [131] M. Paravidino, U. Hanefeld, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2651–2657.
- [132] S. Antoniotti, X. Fernandez, E. Duñach, *Biocatal. Biotransformation* **2008**, *26*, 228–234.
- [133] M. Martinelle, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1251*, 191–197.
- [134] E. Xanthakis, S. Magkouta, H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, F. N. Kolisis, *Biocatal. Biotransformation* **2009**, *27*, 170–178.
- [135] A. Carvalho, T. Fonseca, M. Mattos, M. Oliveira, T. Lemos, F. Molinari, D. Romano, I. Serra, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29682–29716.
- [136] S. Sharma, S. S. Kanwar, *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–15.
- [137] B. Yang, **n.d.**
- [138] A. Aljawish, E. Heuson, M. Bigan, R. Froidevaux, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *20*, 101221.
- [139] S. Hari Krishna, N. G. Karanth, *Catal. Rev.* **2002**, *44*, 499–591.
- [140] P. Priyanka, Y. Tan, G. K. Kinsella, G. T. Henahan, B. J. Ryan, *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 203–220.

- [141] P. Chandra, Enespa, R. Singh, P. K. Arora, *Microb. Cell Factories* **2020**, *19*, 169.
- [142] K. P. Dhake, D. D. Thakare, B. M. Bhanage, *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28*, 71–83.
- [143] B. K. De, T. Chatterjee, D. K. Bhattacharyya, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1501–1504.
- [144] W. Chulalaksananukul, J.-S. Condoret, D. Combes, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 691–698.
- [145] E. Xanthakis, E. Theodosiou, S. Magkouta, H. Stamatis, H. Loutrari, C. Roussos, F. Kolisis, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1–16.
- [146] S. Shojaei, A. Kiumarsi, A. R. Moghadam, J. Alizadeh, H. Marzban, S. Ghavami, in *The Enzymes* (Eds.: S.Z. Bathaie, F. Tamanoi), Academic Press, **2014**, pp. 7–32.
- [147] R. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *64*, 1–22.
- [148] M. Štekrová, I. Paterová-Dudková, E. Vyskočilová-Leitmannová, L. Červený, *Res. Chem. Intermed.* **2012**, *38*, 2075–2084.
- [149] K. R. Kiran, S. Divakar, *J. Biotechnol.* **2001**, *87*, 109–121.
- [150] Ž. Knez, S. Kavčič, L. Gubicza, K. Bélafi-Bakó, G. Németh, M. Primožič, M. Habulin, *J. Supercrit. Fluids* **2012**, *66*, 192–197.
- [151] M. From, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 315–318.
- [152] M. C. Hennessy, T. P. O’Sullivan, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 22859–22920.
- [153] R. W. Hay, M. A. Bond, *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 1823–1828.
- [154] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- [155] L. Z. Benet, C. M. Hosey, O. Ursu, T. I. Oprea, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *101*, 89–98.
- [156] S. Ben-Shabat, E. Fride, T. Sheskin, T. Tamiri, M. H. Rhee, Z. Vogel, T. Bisogno, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, R. Mechoulam, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *353*, 23–31.
- [157] E. B. Russo, *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1969.
- [158] M. S. Mahmud, M. S. Hossain, A. T. M. F. Ahmed, M. Z. Islam, M. E. Sarker, M. R. Islam, *Molecules* **2021**, *26*, 7216.
- [159] L. Schofs, M. D. Sparo, S. F. Sánchez Bruni, *Pharmacol. Res. Perspect.* **2021**, *9*, e00761.
- [160] D. A. E. Al-Snafi, **n.d.**, 16.
- [161] M. C. Monteiro, M. de la Cruz, J. Cantizani, C. Moreno, J. R. Tormo, E. Mellado, J. R. De Lucas, F. Asensio, V. Valiante, A. A. Brakhage, J.-P. Latgé, O. Genilloud, F. Vicente, *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17*, 542–549.
- [162] H. Gröger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 83–95.
- [163] N. Richter, R. C. Simon, H. Lechner, W. Kroutil, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8843–8851.
- [164] J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156–9159.
- [165] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254.
- [166] S. Kwon, J. H. Lee, C. M. Kim, H. Jang, H. Yun, J.-H. Jeon, I. So, H. H. Park, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6958.
- [167] E.-J. Shim, S.-H. Jeon, K.-H. Kong, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13*, 738–744.
- [168] T. R. Enugala, M. C. Morató, S. C. L. Kamerlin, M. Widersten, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 9115–9128.
- [169] M. Karabec, A. Łyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6314.

- [170] M. Giersberg, A. Degelmann, R. Bode, M. Piontek, G. Kunze, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1385–1396.
- [171] R. Cannio, M. Rossi, S. Bartolucci, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 345–352.
- [172] A. Guagliardi, M. Martino, I. Iaccarino, M. D. Rosa, S. BARTOLUCCI, *Int. J. Biochem. Cell. biol.* **1996**, *28*, 239–246.
- [173] L. Kirmair, D. L. Seiler, A. Skerra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 10501–10513.
- [174] W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402–406.
- [175] E. Hamnevik, C. Blikstad, S. Norrehed, M. Widersten, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *99*, 68–78.

Fonctionnalisation de terpènes biosourcés par biocatalyse enzymatique pour des applications en pharmacologie et en biocontrôle

Mots clés : Terpènes, Biocatalyse, Métabolites végétaux, Chicorée, Lipase

Cette thèse interdisciplinaire avait pour objectif d'explorer la fonctionnalisation de terpènes à travers la catalyse enzymatique pour la création de nouveaux composés d'intérêt, en mettant l'accent sur l'utilisation de lipases dans la synthèse de nouveaux esters de terpénoïdes. La recherche a impliqué une série de démarches diverses, débutant avec l'emploi de monoterpénoïdes simples pour établir des conditions réactionnelles optimales. L'utilisation de la CAL-B, une lipase commerciale largement étudiée, a permis d'introduire des chaînes alkyles sur des monoterpénoïdes comme le géraniol et l'alcool périllique, et d'innover en synthétisant des cétoesters de terpénoïdes jamais produits auparavant.

Le travail s'est ensuite étendu aux lactones sesquiterpéniques (LST) présentes dans la chicorée cultivée dans les Hauts-de-France, où la méthode d'acylation a été appliquée avec succès. Cette étape a abouti à la création de nouveaux dérivés de LST avec des rendements proches de 100%. Cette méthodologie a ensuite été extrapolée vers des extraits complexes de racine de chicorée, démontrant la faisabilité d'acyler les LST dans ces mélanges et révélant de nouvelles molécules potentiellement inconnues. En parallèle, l'étude a exploré d'autres réactions biocatalytiques, notamment avec la production de transaminases et d'alcools déshydrogénases, ouvrant des perspectives pour la production d'aminoterpènes innovants.

Cette thèse représente une avancée significative dans la compréhension des réactions de fonctionnalisation des terpènes par catalyse enzymatique, avec la possibilité de synthétiser des nouveaux dérivés valorisables en tant que principes actifs pour des applications futures en pharmacologie ou dans le biocontrôle.

Biocatalytic functionalization of bio-sourced terpenes for pharmaceutical and biocontrol applications

Keywords: Terpenes, Biocatalysis, Plant Metabolites, Chicory, Lipase

The aim of this interdisciplinary thesis was to explore the functionalization of terpenes through enzymatic catalysis for the creation of new compounds of interest, with particular emphasis on the use of lipases in the synthesis of new terpenoid esters. The research involved a series of diverse approaches, starting with the use of simple monoterpeneoids to establish optimal reaction conditions. Using the lipase B from *Candida antarctica*, it was possible to introduce alkyl chains onto monoterpeneoids such as geraniol and perillyl alcohol, and also to break new ground by synthesizing previously unproduced terpenoid ketoesters.

The work was then extended to sesquiterpene lactones (LST) present in chicory grown in the Hauts-de-France region, where the acylation method was successfully applied. This step led to the creation of new LST derivatives with excellent yields. This methodology was then extrapolated to complex chicory root extracts, demonstrating the feasibility of acylating LSTs in these mixtures and revealing new, potentially unknown molecules. In parallel, the study explored other biocatalytic reactions, notably with the production of transaminases and alcohol dehydrogenases, opening up prospects for the production of innovative aminoterpenes.

This thesis represents a significant advance in our understanding of the biocatalytic functionalization of terpenes, with the potential to synthesize new high-value derivatives for future applications in pharmaceuticals or as biocontrol agents.