

## Procédé de déracémisation des acides $\alpha$ -aminés via le pyridoxal. II [1]. Etude de la copolymérisation des formes polymérisables du pyridoxal. Réactivité des polymères obtenus

Anne-Marie Honnoraty, Louis Mion\*, Alain Rousset, Jacques Taillades, Auguste Commeyras

*Laboratoire de chimie organique «Hétérochimie et aminoacides»,  
URA 1097, Université Montpellier II, place E Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

(reçu le 19 janvier 1995, accepté le 14 mai 1995)

**Summary – Deracemization of  $\alpha$ -aminoesters via pyridoxal. II [1].** – Study of copolymerization of polymerizable forms of pyridoxal. Reactivity of corresponding polymers. We studied the copolymerization of pyridoxal (PL) polymerizable forms, in the presence of two different comonomers (a diluting and crosslinking agent) and the catalytic activity of the corresponding polymers on the  $\alpha$ -aminoester racemization. We discuss the choice of these comonomers in the polymerization and also their concentration. Thus, using 4-acryloylmorpholine as a diluting agent, we obtained a sufficiently hydrophilic polymer in an aqueous medium, and the partition coefficient of the substrate was more favorable. In addition, polymer IV, in which the arm allowing immobilization of PL is most distant from the catalytic site, had the highest activity.

racemization /  $\alpha$ -aminoester / pyridoxal analogues / covalent immobilization / polyacrylamide support / radical polymerization

### Introduction

Dans les mémoires précédents [2, 3] nous avons montré que le pyridoxal (PL) est un excellent catalyseur de racémisation des  $\alpha$ -aminoesters capable d'intervenir dans la première étape essentielle d'un processus de déracémisation des acides  $\alpha$ -aminés. Nous avons fonctionnalisé le pyridoxal [1] de façon à créer les premières formes polymérisables de ce cofacteur.

Nous étudions dans ce mémoire la copolymérisation de ces formes polymérisables ainsi que la réactivité des polymères obtenus.

Le pyridoxal est en fait un cofacteur enzymatique biologiquement impliqué dans des transformations diverses énantiosélectives ou non (transamination, décarboxylation, désamination, désaldolisation, racémisation...). De telles réactivités ont été reproduites d'une part en phase homogène, à partir du pyridoxal non modifié [4] ou modifié (soit en introduisant un élément chiral entre les carbones 2 et 5 [5], soit en le fixant à une  $\beta$ -cyclodextrine [6]) et d'autre part en phase hétérogène, en utilisant un PL covalentiellement fixé à des supports préalablement formés (polystyrène [7] ou polyacrylique [8]).

A notre connaissance, aucune tentative n'a été faite pour incorporer ce cofacteur par copolymérisation dans

un environnement polymère. La méthode de copolymérisation nous paraît pourtant beaucoup plus performante que les précédentes. En modulant la concentration du cofacteur, l'hydrophilie et la chiralité des comonomères, le pourcentage et la nature du réticulant employé, elle devrait en effet pouvoir permettre, d'obtenir un matériau fini d'activité proche de celle désirée.

Dans cet esprit, notre laboratoire a précédemment étudié les potentialités de catalyseurs cétoniques immobilisés sur support polymère de type acrylamide [9], pour réaliser l'hydratation énantiosélective d' $\alpha$ -aminonitriles. Il a été notamment montré que dans le cas de résines supportant des motifs pipéridin-4-one, l'utilisation d'un taux de réticulant faible (5%) garantit une meilleure accessibilité du substrat ( $\alpha$ -aminonitrile) au site catalytique. En espaçant les motifs cétoniques au sein du polymère par un motif chimiquement inerte (la morpholine), il s'est avéré possible de minimiser la dégradation du catalyseur tout en augmentant son activité. Une modification chirale du microenvironnement du site cétonique, a permis en outre de mettre en évidence l'existence d'un phénomène de reconnaissance énantiosélective du substrat [10, 11].

C'est en nous inspirant de ces résultats que nous avons étudié la copolymérisation des monomères du pyridoxal précédemment synthétisés [1]. Nous présentons également dans ce mémoire, les premiers résultats de

\* Correspondance et tirés à part

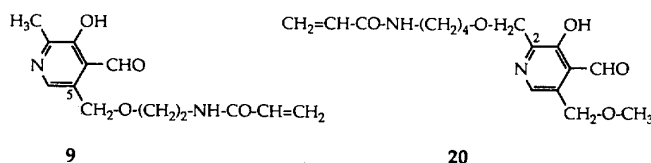


Fig 1

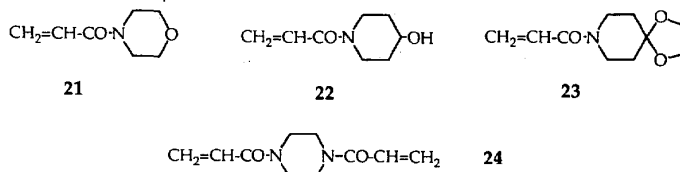


Fig 2

l'activité catalytique de ce cofacteur dans la racémisation d' $\alpha$ -aminoesters, lorsqu'il est lié de façon covalente à un support polymère.

## Résultats et discussion

### Analyse des conditions de polymérisation

Ainsi que nous l'avons montré [9, 10, 11], l'activité d'un catalyseur cétonique immobilisé sur un support polymère de type acrylamide est optimale lorsqu'il se trouve dilué au sein d'une matrice macromoléculaire faiblement réticulée (5 à 10%). Ce support, tout en présentant une bonne tenue mécanique, garantit au substrat une meilleure accessibilité, par une plus grande mobilité des chaînes macromoléculaires. Ces résultats ont évidemment été pris en considération pour tenter de placer le PL dans des conditions (de concentration et d'environnement) qui pourraient se rapprocher de celles dans lesquelles ils se trouvent dans les catalyseurs biologiques.

Nous avons choisi de copolymériser les analogues du pyridoxal **9** et **20\*** (fig 1), en présence de deux autres comonomères différents :

- un premier type monofonctionnel présent de façon majoritaire sert de motif diluant. Il peut être soit la 4-acryloylmorpholine **21**, soit le 1-acryloylpipéridin-4-ol **22**, soit le 1-acryloylpipéridin-4-one-éthylèneacétal **23** (fig 2).

- un deuxième type difonctionnel, la 1,4-diacryloylpipérazine **24** (fig 2), permet de réticuler les chaînes entre-elles.

D'une façon générale, le choix de ces comonomères a été guidé par les critères suivants : être inactifs vis-à-vis du substrat, présenter des propriétés hydrophiles, avoir une structure proche de celle des analogues du pyridoxal. Ce dernier point est particulièrement important car il permet d'espérer un comportement semblable de toutes les espèces au cours de la polymérisation. En effet, des vitesses de polymérisation similaires

devraient permettre d'assurer une répartition statistique du catalyseur au sein du polymère. En particulier, nous avons choisi d'utiliser comme réticulant la 1,4-bis-acryloylpipérazine **24** dont la structure proche de celles des autres comonomères, devrait permettre une réticulation homogène du polymère. De plus, le cycle pipérazine, en limitant les conformations possibles par rapport à un réticulant linéaire, devrait contribuer à augmenter la rigidité du polymère.

Nous avons choisi d'effectuer une polymérisation en masse des analogues du PL car elle est de mise en œuvre facile et conduit directement au polymère final après des étapes de broyage et de tamisage. Le degré de polymérisation est maîtrisé en contrôlant la température de polymérisation (18°C). La diffusion des espèces pendant la polymérisation est favorisée en utilisant un réacteur à large base et en réalisant une bonne homogénéisation avant et après l'amorçage. L'amorçage radicalaire est initié par le système persulfate d'ammonium/*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) [12, 13].

### Immobilisation de l'analogue **9** du pyridoxal, le 5-{[2-(acryloylamino)éthoxy]méthyl}-3-hydroxy-2-méthylpyridine-4-carbaldéhyde

Dans un premier temps, la copolymérisation de l'analogue **9** du pyridoxal dont la synthèse est plus rapide que celle de l'analogue **20**, a été étudiée en présence des comonomères **21** et **24**, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I. Ainsi en faisant varier indépendamment les proportions molaires en **9** (X%) et en réticulant **24** (Y%), nous avons pu déterminer les conditions correspondant aux meilleurs taux d'incorporation du PL (représenté par le rapport *R* : qté intégrée\*/qté initiale × 100) et pour lesquelles le rendement de polymérisation est satisfaisant; le motif di-

\* La numérotation des molécules de ce mémoire est la même que celle utilisée dans [1].

\* La quantité de pyridoxal intégrée dans le polymère a été déterminée de manière indirecte, par différence entre la quantité d'analogue du pyridoxal introduite au début de la réaction de polymérisation et celle récupérée dans les eaux de lavage, qui est évaluée par dosage UV à 400 nm. Cette longueur d'onde correspond à la zone d'absorption maximale de **9** et **20** et dans laquelle les autres réactifs intervenant dans la polymérisation n'absorbent pas.

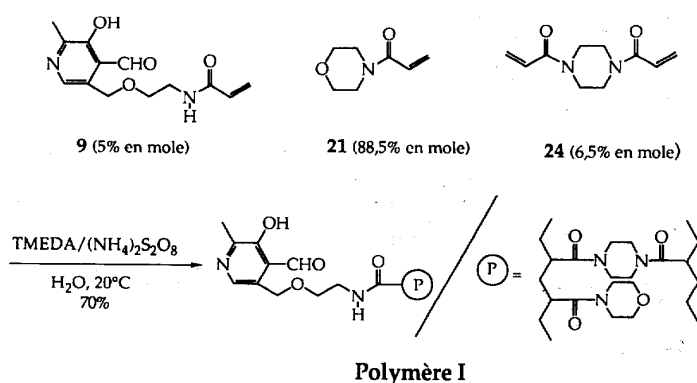


Fig 3

luant la 4-acryloylmorpholine est présent à un taux  $100 - (X + Y)\%$ .

**Tableau I.** Influence des proportions molaires en cofacteur **9**, en comonomères diluant **21** et réticulant **24**, sur la polymérisation.




N° d'expériences	1	2	3	4	5	6
<b>9</b> (X% en mol)	3	5	5	10	10	5
<b>24</b> (Y% en mol)	5	6,5	5	5	10	10
<b>21</b> ( $100 - (X + Y)\%$ en mol)	92	88,5	90	85	80	85
Rdt de polymérisation (%)	81	70	79	46	32	51
$R = \frac{\text{qté intégrée}}{\text{qté initiale}} (\%)$	90	89	87	63	43	69

Les résultats de cette étude montre que pour un taux de réticulant fixe ( $Y\% = 5$ ; expériences 1, 3, 4), lorsque le taux de pyridoxal  $X\%$  augmente, non seulement le rendement de la polymérisation décroît (environ 80% pour  $X = 3$  et 5% et seulement 46% pour  $X = 10\%$ ) mais aussi le taux d'incorporation en pyridoxal  $R\%$  diminue ( $R$  est de l'ordre de 90% pour  $X = 3$  et 5% et de seulement 63% pour  $X = 10\%$ ). De plus, pour un taux de pyridoxal constant ( $X = 5\%$ ; expériences 2, 3, 6) le rendement de polymérisation augmente lorsque le pourcentage en réticulant  $Y\%$  diminue, idem pour  $X = 10\%$  (expériences 4, 5). D'une façon générale, ces résultats pourraient s'expliquer par une différence importante de réactivité des comonomères, lors de la polymérisation. Quoiqu'il en soit, les meilleurs résultats ont été obtenus à partir de résines faiblement réticulées ( $5 < Y < 6,5\%$ ) et présentant un taux de pyridoxal n'excédant pas 5%. Nous avons choisi d'utiliser le polymère ayant un taux de réticulant de 6,5% (expérience 2) parce qu'il présente une rigidité convenable, facilitant les différentes étapes intervenant dans son conditionnement (filtration, lavages, recyclage...) et permettant d'envisager son utilisation en continu dans un réacteur.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de deux autres motifs diluants, le 1-acryloylpipéridin-4-ol **22** et le 1-acryloylpipéridin-4-one éthylèneacétal **23**, sur le caractère hydrophile des polymères obtenus, en évaluant leur taux de gonflement  $G$ , dans l'eau.

Les résultats (tableau II) montre que le polymère **I** à motif morpholine présente un taux de gonflement d'environ 2,5 fois celui des deux autres polymères (**II** et **III**).

**Tableau II.** Influence de la nature du motif diluant sur le taux de gonflement des polymères contenant l'analogue **9** du pyridoxal.

Nature du motif diluant	N° polymère	Rdt de polymérisation	Taux de gonflement $G$ (mL/g)
 <b>21</b>	<b>I</b>	79%	2,56
 <b>22</b>	<b>II</b>	77%	0,94
 <b>23</b>	<b>III</b>	88%	0,99

Le motif diluant morpholine a donc été retenu, les polymères correspondants présentant la meilleure affinité pour l'eau. Nous obtenons le polymère **I** (fig 3), en copolymérisant 5% d'analogue **9** du pyridoxal en présence de 6,5% de 1,4-diacryloylpipérazine et de 88,5% de 4-acryloylmorpholine.

#### Immobilisation de l'analogue **20** du pyridoxal, le 2-{[4-(acryloylamino)butoxy]méthyl}-3-hydroxy-5-(méthoxyméthyl)pyridine-4-carbaldéhyde

La polymérisation de l'analogue **20** du pyridoxal a été réalisée en appliquant les conditions précédemment définies pour l'analogue **9**. Le polymère **IV** (fig 4) est obtenu avec un rendement de 69%. Il présente des caractéristiques tout à fait similaires au polymère **I** à savoir, un taux de gonflement dans l'eau élevé ( $G = 2,65$ ) et un taux d'incorporation en pyridoxal satisfaisant (91%). Les lots de polymères (**I** et **IV**) correspondant à l'immobilisation covalente du PL en des points différents du cycle pyridinique ont été testés comme catalyseur de racémisation des  $\alpha$ -aminoesters.

#### Activité catalytique des polymères **I** et **IV** dans la racémisation des $\alpha$ -aminoesters

L'évolution du pouvoir rotatoire en fonction du temps a été choisie pour suivre, quantitativement, la réaction de racémisation de l'ester méthylique de la *S*-phénylalanine. La différence entre le modèle homogène [1] et

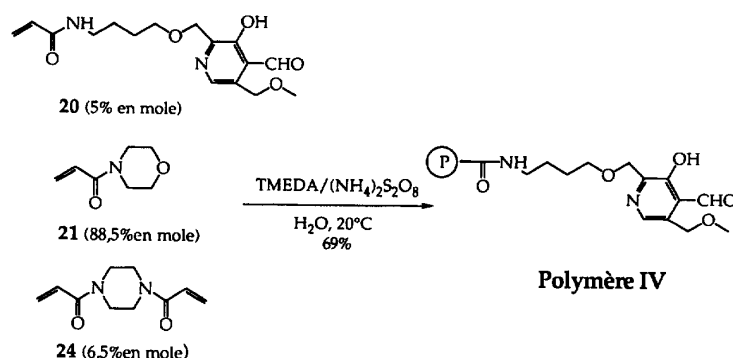


Fig 4

supporté est que dans ce dernier cas, la base de Schiff est immobilisée sur le polymère. Dans ces conditions, la solution ne contient que l' $\alpha$ -aminoester, dont la rotation spécifique est beaucoup plus faible que celle des bases de Schiff correspondantes.

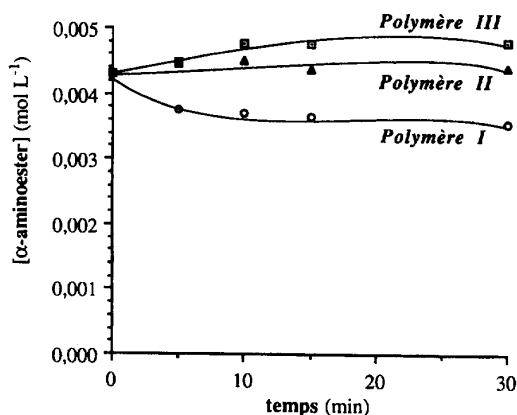


Fig 5. Etude du comportement de solutions aqueuses d'ester méthylique de la *S*-phénylalanine ( $4,3 \cdot 10^{-3}$  M) en présence de polymères I, II et III (100 mg) qui ont des motifs diluants différents : pipéridin-4,4-éthylèneacétal (■-), pipéridin-4-ol (-Δ-), morpholine (-○-).

Dans un premier temps, nous avons étudié (fig 5) le comportement des polymères I, II et III obtenus par polymérisation de l'analogie 9 et des motifs diluants précédemment cités (21, 22, 23) en présence d'une solution aqueuse d' $\alpha$ -aminoester. Ainsi une quantité donnée de ces polymères secs est introduite dans une solution aqueuse d' $\alpha$ -aminoester et nous déterminons par CLHP, la concentration en  $\alpha$ -aminoester de la solution restante. D'une façon générale, ces polymères en présence d'eau ont tendance à gonfler, c'est-à-dire à adsorber un certain volume d'eau. Toutefois, un comportement différent de ces trois polymères est observé qui se traduit par la variation de la concentration en aminoester dans la solution restante. Ainsi, en présence des polymères II et III, ayant respectivement les motifs diluants pipéridin-4-ol et pipéridin-4-one éthylèneacétal, on constate une augmentation de la concentration en  $\alpha$ -aminoester par rapport à la concentration initiale, alors qu'en présence

de polymère I (motif diluant morpholine) une diminution est notée. Dans le cas des polymères II et III, l'augmentation de concentration observée rend compte du phénomène d'adsorption des molécules d'eau. Par contre en présence de polymère à motif morpholine qui présente un taux de gonflement 2,5 fois supérieur aux polymères précédents, l'adsorption d'eau par ce polymère est plus importante et donc la diminution de concentration notée ne peut s'expliquer que par un meilleur coefficient de partage de l'aminoester dans la matrice du polymère I que dans les matrices des polymères II et III. La rétention d' $\alpha$ -aminoester dans la matrice macromoléculaire du polymère I a été évaluée à 20% de la concentration corrigée d' $\alpha$ -aminoester (concentration calculée en tenant compte du volume d'eau adsorbé par le polymère). Ce résultat a été confirmé en suivant le relargage de l' $\alpha$ -aminoester au cours du temps.

Les polymères ayant le motif diluant morpholine présentent donc la plus grande affinité pour les  $\alpha$ -aminoesters. Ce phénomène, assurant un meilleur contact entre les substrats et les centres catalytiques, va favoriser la réactivité de ces polymères comme catalyseur de racémisation.

Dans un second temps, l'activité catalytique des polymères I et IV dans la racémisation d' $\alpha$ -aminoesters a été étudiée en se plaçant dans des conditions d'état stationnaire obtenues en faisant fonctionner en continu ce catalyseur dans un réacteur tubulaire. Le réacteur ( $\varnothing = 1$  cm,  $l = 20$  cm, thermostaté à 25°C) est chargé par des préparations de polymères I ou IV de granulométrie parfaitement définie. Le fort gonflement des polymères, à motif morpholine, dans l'eau diminue la perte de charge, facilitant ainsi la circulation de la solution aqueuse d' $\alpha$ -aminoester à travers le réacteur. Ainsi une solution aqueuse d'ester méthylique de la *S*-phénylalanine, à la concentration de  $1,7 \cdot 10^{-2}$  M maintenue à pH 7 et à 0°C pour éviter l'hydrolyse chimique, puis ramenée à une température de 25°C est pompée à un débit de 2 mL/min à travers le réacteur jusqu'à ce que la concentration en  $\alpha$ -aminoester, déterminée par CLHP soit la même à l'entrée et à la sortie du réacteur. Le temps nécessaire à l'établissement de cet équilibre ( $\sim 20$  min) correspond au chargement de tous les sites accessibles du pyridoxal en bases de Schiff correspondantes.

A un débit de 2 mL/min, correspondant à un temps de contact de 7,8 min dans le réacteur, l'analyse de l'effluent par polarimétrie ne montre qu'une évolution trop

faible du milieu pour être significative. En diminuant alors le débit jusqu'à 0,2 mL/min (temps de contact de 78 min dans le réacteur) la mesure du pouvoir rotatoire, complétée par la détermination de la concentration en  $\alpha$ -aminoester et  $\alpha$ -aminoacide par CLHP, devient significative. La stabilité dans le temps de ces mesures (8 mesures en 400 minutes) démontre clairement que l'on a atteint un état stationnaire. Durant cette expérimentation, la stabilité chimique de l' $\alpha$ -aminoester n'est pas totale, nous avons évalué à 8% sa transformation en  $\alpha$ -aminoacide. Cette stabilité pourra être renforcée en utilisant ultérieurement des solvants aquo-organiques compatibles avec le fonctionnement des systèmes enzymatiques [14]. Dans nos conditions nous avons néanmoins pu étudier le comportement racémisant de nos catalyseurs dans le cas particulier de la phénylalanine.

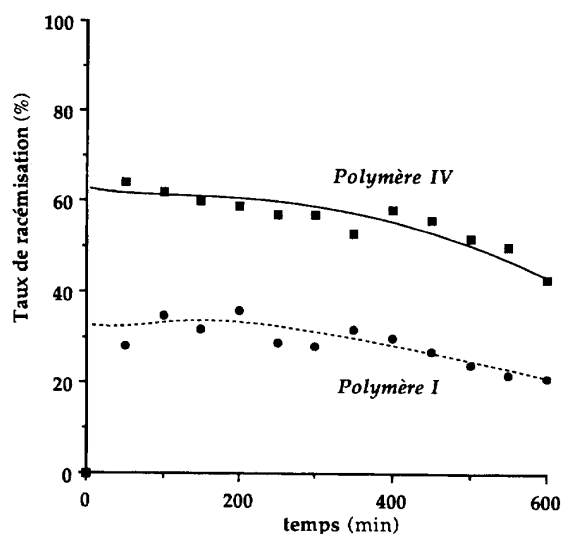
Le pouvoir rotatoire ( $\alpha_{lu}$ ) de la solution d'aminoester, à la sortie du réacteur, s'est avéré plus faible que celui de la solution initiale. Il correspond à la somme des pouvoirs rotatoires de l'ester méthylique de la *S*-phénylalanine et de l'acide aminé correspondant formé par hydrolyse chimique en négligeant *a priori* la quantité de *R,S*-phénylalanine formée par hydrolyse des substrats après racémisation. On a donc :  $\alpha_{lu} = [\alpha_E] \times [\text{Phe ester}]_S + [\alpha_A] \times [\text{Phe}]_S$ ;  $[\alpha_A]$  et  $[\alpha_E]$  sont les pouvoirs rotatoires spécifiques respectifs de la *S*-phénylalanine et de son ester méthylique, la concentration en phénylalanine  $[\text{Phe}]_S$  est déterminée par CLHP. La concentration en ester *S*  $[\text{Phe ester}]_S$  est donnée par la relation :  $[\text{Phe ester}]_S = \frac{\alpha_{lu} - [\alpha_A] \times [\text{Phe}]_S}{[\alpha_E]}$ . La concentration en ester *R,S* est, quant à elle, obtenue par différence avec la concentration totale en ester déterminée par CLHP :  $[\text{Phe ester}]_{R,S} = [\text{Phe ester}]_{\text{Total}} - [\text{Phe ester}]_S$ . On peut ainsi calculer le taux de racémisation *T* (%) par la relation :

$$T = \frac{[\text{Phe ester}]_{R,S}}{[\text{Phe ester}]_{\text{Total}}} \times 100 \text{ (avec une précision de } \pm 15\%).$$

Les taux de racémisation (fig 6) atteints à l'état stationnaire défini ci-dessus (débit 0,2 mL/min, 25°C) sont déterminés pour des échantillons de même masse de polymères **I** et **IV** et ayant des taux d'incorporation en analogues du pyridoxal équivalents.

D'une façon générale, l'évolution du taux de racémisation en fonction du temps pour les deux polymères est similaire. Pendant les 7 premières heures, le taux de racémisation *T* (%) est pratiquement constant : dans le cas du polymère **I**, *T* oscille entre 30 et 35%, en présence de polymère **IV**, il est de 58% en moyenne. De plus, il faut préciser que les taux de racémisation mesurés, dans les deux cas, varient en fonction du temps de contact, entre le polymère et la solution d' $\alpha$ -aminoester. En effet, des taux de racémisation doubles (tableau III) sont obtenus lorsque le débit à travers la colonne est diminué de moitié (débit = 0,1 mL/min).

Par ailleurs, comme observé précédemment en phase homogène, l'analogue **20** dans le polymère **IV**, présente une plus grande activité catalytique que l'analogue **9** dans le polymère **I**. Les taux de racémisation mesurés en présence de polymère **IV** sont pratiquement le double de ceux obtenus avec le polymère **I**. Ce phénomène



**Fig 6.** Efficacités catalytiques comparées des polymères **I** et **IV** dans la racémisation de l'ester méthylique de la *S*-phénylalanine, à l'état stationnaire. Réacteur ( $\varnothing = 1$  cm,  $h = 20$  cm); polymère **I** (2 g), polymère **IV** (2,17 g) de granulométrie 60-115 mesh; débit = 0,2 mL/min;  $[S\text{-aminoester}] = 1,7 \cdot 10^{-2}$  M, à pH 7 et à 25°C.

**Tableau III.** Influence du temps de séjour dans le réacteur, sur le taux de racémisation d'une solution d'ester méthylique de la *S*-phénylalanine ( $C = 1,7 \cdot 10^{-2}$  M) en contact avec un polymère **I** «recyclé» ( $m = 2$  g).

Temps (min)	50	100	150
Tx de racémisation (%)	14 ± 2	17 ± 2,5	18 ± 2,7
débit 0,2 mL/min			
Temps (min)	100	200	300
Tx de racémisation (%)	37 ± 5,5	37 ± 5,5	34 ± 5
débit 0,1 mL/min			

peut être expliqué par une meilleure accessibilité de l' $\alpha$ -aminoester au centre catalytique, en raison du point de fixation en 2 plus éloigné du centre catalytique que le point de fixation en 5 et de la différence de gêne stérique qui peut en résulter. La plus grande longueur du bras de fixation sur 2 peut également assurer une meilleure mobilité de la chaîne, permettant au cycle du pyridoxal de se dégager de la matrice polymère et amplifier le phénomène précédent.

## Conclusion

Il est montré qu'un cofacteur modifié, dans le cas présent le pyridoxal, peut être placé par copolymérisation au cœur d'une matrice polymère tout en gardant une activité catalytique constante et très élevée sur la réaction de racémisation des  $\alpha$ -aminoesters. Une telle activité d'un cofacteur covalentiellement lié au cœur d'une matrice n'a pu être obtenue qu'en modulant l'hydrophilie et la concentration des agents de dilution et de réticulation.

Le coefficient de partage de l'aminoester entre le solvant aqueux et la matrice du polymère, favorable à cette dernière, n'est pas sans rappeler un des paramètres de la catalyse enzymatique, à savoir le partage existant entre une protéine et son substrat d'une part, et cette protéine et son produit d'autre part qui sont une des forces motrices de ces catalyseurs biologiques.

Certes des progrès restent à réaliser pour mimer la synthèse de ces catalyseurs biologiques et atteindre leur performance. Ces progrès passent probablement en partie par la création d'environnements chiraux autour des cofacteurs choisis, mais aussi par la mise au point de méthodes de synthèse de macromolécules chirales au cœur desquelles on saura placer le cofacteur de son choix, ainsi que par la modulation aquo-organique des solvants utilisés. Au moins certaines de ces méthodes devraient à court terme s'inspirer des travaux en développement rapide dans notre laboratoire qui découlent de la chimie prébiotique [15] et permettent d'imaginer des conditions de synthèse de protoenzymes à cofacteur. C'est en tout cas dans cette direction que nous souhaitons développer ces recherches.

## Partie expérimentale

### Généralités

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur des spectromètres de type Varian EM 360 (60 MHz) et Bruker AC 250 (250 MHz). Les valeurs de déplacements chimiques  $\delta$  sont données en parties par million (ppm) avec le tétraméthylsilane comme référence interne. Les constantes de couplage  $J$  sont exprimées en Hertz. Les points de fusion (PF), non corrigés, ont été mesurés en capillaire sur un appareil Büchi 510. Les spectres ultraviolet ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Kontron modèle Uvikon 860. Les analyses en CLHP ont été réalisées sur un appareil Varian équipé d'un détecteur UV 2550, d'une pompe Varian 2510 et d'un intégrateur Varian 4290. La colonne utilisée est une Nucléosil RP C18 (granulométrie 100 Å, longueur 25 cm). Les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 à 365 nm (lampe de mercure), dans une cellule polarimétrique de 1 dm de trajet optique et de 6,5 mL de contenance.

### Protocole général de synthèse des comonomères :

4-acryloylmorpholine **21** ; 1-acryloylpipéridin-4-ol **22** ; 1-acryloylpipéridin-4-one éthylèneacétal **23**

Ces synthèses résultent d'une modification du mode opératoire proposé par Epton *et al* [16]. A une solution du chlorhydrate de la morpholine (0,4 mol, 35 mL), ou du chlorhydrate du pipéridin-4-ol (0,4 mol, 40,5 mL), ou du chlorhydrate de pipéridin-4-one éthylèneacétal (0,4 mol, 51 mL), dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (600 mL) est additionnée lentement (débit = 1,5 mL/min) à 0°C, une solution de chlorure d'acryloyle (16,2 mL, 0,2 mol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 mL). L'agitation est maintenue 1 h à 0°C et 1 h supplémentaire à 25°C. Les sels sont filtrés et abondamment lavés au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique est concentrée sous pression réduite à 30°C en présence de quelques cristaux d'hydroquinone. Les différents comonomères sont conservés à -20°C.

**21**, une huile fluide jaune.

Rendement : 76%.

$R_f = 0,72$  ( $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1) : tache unique.

RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3,65 (s, 8H,  $\text{CH}_2$  cycle); 5,8 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{cis}} = 9$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{cis}}$ ); 6,3 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$ ); 6,7 (dd,  $J_{\text{cis}} = 9$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

**22**, un solide jaune collant.

Rendement : 72%.

PF : 36-38°C.

$R_f = 0,67$  ( $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1) : tache unique.

RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,8 (m, 4H,  $\text{HO}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2$  cycle); 3,1 à 4,25 (m, 6H,  $\text{CO}-\text{N}-(\text{CH}_2)_2$  cycle,  $\text{CH}-\text{OH}$ ); 5,7 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{cis}} = 10$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{cis}}$ ); 6,2 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{trans}} = 17$ ; 1H,  $\text{CO}-\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$ ); 6,65 (dd,  $J_{\text{cis}} = 10$ ;  $J_{\text{trans}} = 17$ ; 1H,  $\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

**23**, un solide blanc.

Rendement : 78%.

PF : 41-42°C; [14] : 37-42°C.

$R_f = 0,78$  ( $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1) : tache unique.

RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2,15 (t, 4H,  $(\text{O})_2-\text{C}-(\text{CH}_2)_2$  cycle); 4,1 (m, 4H,  $\text{CO}-\text{N}-(\text{CH}_2)_2$  cycle); 4,45 (s, 4H,  $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ ); 6,15 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{cis}} = 10$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{cis}}$ ); 6,7 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$ ); 7,15 (dd,  $J_{\text{cis}} = 9$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

### 1,4-diacryloylpipérazine **24**

A une solution de pipérazine (8,61 g, 0,1 mol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (700 mL), sous atmosphère d'azote, est ajoutée de la triéthylamine (27,9 mL, 0,2 mol). A 0°C une solution du chlorure d'acryloyle (17,9 mL, 0,22 mol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) est additionnée lentement (débit = 0,1 mL/min). L'agitation est maintenue 1 h à 0°C, puis 1 h supplémentaire en laissant revenir à température ambiante. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau ( $2 \times 15$  mL), avec de l'HCl 0,5 N ( $1 \times 15$  mL) et à nouveau à l'eau ( $1 \times 20$  mL). La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentrée sous pression réduite en présence de quelques cristaux d'hydroquinone. Le produit solide obtenu est purifié par recristallisation dans un mélange  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  85:15. Il est conservé à +4°C.

Rendement : 65%.

PF : 92°C (cristaux blancs).

$R_f = 0,64$  ( $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1) : tache unique.

RMN  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3,75 (s, 8H,  $\text{CH}_2$  cycle); 5,75 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{cis}} = 9$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{cis}}$ ); 6,25 (dd,  $J_{\text{gem}} = 3$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CH}=\text{CHH}_{\text{trans}}$ ); 6,8 (dd,  $J_{\text{cis}} = 9$ ;  $J_{\text{trans}} = 16$ ; 1H,  $\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

### Synthèse des polymères **I** et **IV** obtenus par copolymérisation en masse des analogues **9** et **20** du pyridoxal [1]

Dans un réacteur à large base, les divers monomères sont dissous dans de l'eau à raison de 1 mL par gramme de monomère. La quantité des différents comonomères, exprimée en pourcentage molaire, est la suivante : 88,5% de **21** ou **22** ou **23**; 6,5% de **24** et 5% de **9** ou **20**. Ainsi pour préparer le polymère **I**, les comonomères **21** (7,19 g, 0,05 mol), **24** (0,719 g,  $3,7 \cdot 10^{-3}$  mol) et l'analogue **9** (0,719 g,  $2,72 \cdot 10^{-3}$  mol) sont solubilisés dans l'eau (8,6 mL). L'oxygène dissous dans le milieu réactionnel est éliminé par circulation d'un courant d'azote, pendant 1 h. Après addition de  $N,N,N',N'$ -tétraéthylènediamine (4 mL, 0,026 mol), le réacteur est placé dans un bain d'eau à 18°C et la polymérisation est initiée par une solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 10% (2 mL,  $8,76 \cdot 10^{-4}$  mol), préalablement dégazée. Le milieu réactionnel est rapidement homogénéisé. Le réacteur est alors maintenu 1 h sous atmosphère d'azote, puis 10 h sous atmosphère normale. La gélification du milieu est observée après 1 à 15 min. Le

produit résultant, une masse compacte orangée, est dans un premier temps grossièrement broyé à une granulométrie comprise entre 1 et 2 mm. Les grains de polymères sont lavés à l'eau jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus coloré en jaune. Les eaux de rinçage sont rassemblées, complétées au volume le plus proche dans une fiole jaugée. Dans un second temps, les grains sont abondamment rincés au MeOH et à l'Et<sub>2</sub>O. Ils sont ensuite essorés et séchés sous pression réduite jusqu'à obtenir un poids constant. Le polymère sec est alors plus finement broyé au mortier et tamisé afin d'obtenir 3 lots de granulométrie homogène (48-60 mesh, 60-115 mesh > 115 mesh), qui sont conservés à +4°C.

Rendement polymère **I** : 70%.

Rendement polymère **IV** : 69%.

#### Détermination du taux de gonflement des polymères

Une suspension de polymère en solution aqueuse est filtrée sur verre fritté. L'air est aspiré pendant 3 min à travers le lit du polymère, ce qui permet d'éliminer la solution extérieure. Après avoir écarté la couche superficielle, un échantillon du cœur du lit de résine est recueilli, pesé puis séché jusqu'à poids constant. Le gonflement  $G$  est donné par l'expression suivante :  $G = \frac{m_1 - m_2}{m_2 d}$  avec  $m_1$  : masse de polymère gonflé,  $m_2$  : masse de polymère sec et  $d$  : densité du milieu gonflant (eau).

#### Evaluation des groupements aldéhydiques intégrés dans les polymères (**I** et **IV**) par mesure de l'absorption UV

La quantité d'analogue du pyridoxal intégré dans chaque polymère est déterminée en faisant la différence entre la quantité initiale d'analogue et la quantité évaluée par dosage UV à 400 nm dans les eaux de rinçage des polymères correspondants.

UV (H<sub>2</sub>O,  $4 \cdot 10^{-4}$  mol,  $\lambda = 400$  nm) : **9** :  $\epsilon = 3\,439 \text{ L mL}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  ( $\pm 2\%$ ); **20** :  $\epsilon = 1\,630 \text{ L mL}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  ( $\pm 2\%$ ).

#### Etude du partage de l'ester méthylique de la S-phénylalanine en solution aqueuse en présence de résines à motifs diluants variables

Cette étude est suivie en CLHP à une longueur d'onde de 220 nm, l'éluant est obtenu en mélangeant dans les proportions 50:50 du MeOH et une solution aqueuse d'hydrogénophosphate de potassium (0,05 M) ajustée à pH 6. Le phénol, dont la concentration en solution n'est pas affectée par la présence des polymères, est utilisé comme étalon interne. Les polymères secs **I**, **II**, **III** (100 mg) sont mis en suspension dans une solution aqueuse du chlorhydrate de l'ester méthylique de la S-phénylalanine (10 mL,  $4,3 \cdot 10^{-3}$  M) contenant du phénol ( $2 \cdot 10^{-4}$  g/mL) et ajustée à pH 7 par addition de NaOH 0,1 M. L'agitation du milieu réactionnel réalisée au moyen d'un vibreur IKA-Vibrax-VXR-type VX8 (Janke et Hunkle) est maintenue à 1000 tr/min tout au long de la cinétique. On effectue des prélèvements (0,1 mL) régulièrement qui sont placés dans environ 2 mL d'éluant avant d'être analysés par CLHP. Les temps de rétention des différentes espèces sont respectivement à un débit de 0,55 mL/min :  $tr_{\text{aminoacide}} = 5,9$  min (traces);  $tr_{\text{phénol}} = 9,1$  min;  $tr_{\text{aminoester}} = 12,5$  min.

#### Etude du relargage de l' $\alpha$ -aminoester par les résines à motif diluants variables

Les polymères précédemment utilisés sont essorés. Chaque lot est remis en suspension dans de l'eau (10 mL),

avec une agitation de 1000 tr/min. Des prélèvements réguliers (0,1 mL) sont effectués, placés dans 2 mL d'éluant (MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50:50 à pH 6) contenant du phénol (0,04 mg/mL) et analysés par CLHP.

#### Etude à l'état stationnaire, de la racémisation de l'ester méthylique de la S-phénylalanine catalysée par les polymères **I** et **IV**

Dans un réacteur tubulaire ( $\varnothing_{\text{int}} = 1$  cm) thermostaté à 25°C et à l'abri de la lumière, on introduit les polymères **I** (2 g) ou **IV** (2,17 g), de granulométrie 60-115 mesh, en suspension dans l'eau (15 mL). Après tassement, la hauteur de lit de polymère est de 20 cm. Une solution aqueuse du chlorhydrate de l'ester méthylique de la S-phénylalanine ( $1,7 \cdot 10^{-2}$  M), conservée à 0°C, est éluee à travers le réacteur au moyen d'une pompe Kontron LC 410. Le débit de la pompe est de 2 mL/min pendant le temps nécessaire pour établir l'état stationnaire, puis il est ramené à 0,2 mL/min. Le flux sortant est analysé toutes les 10 min et lorsque l'état stationnaire est atteint, toutes les 50 min. A chaque prélèvement, on détermine la valeur du pouvoir rotatoire à  $\lambda = 365$  nm et on contrôle le pH. La concentration en phénylalanine et en ester méthylique de la phénylalanine sont déterminées par CLHP : 0,1 mL du milieu réactionnel est introduit dans 2 mL d'éluant (MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50:50 à pH 6) qui contient du phénol (0,02 mg/mL).

Entre chaque utilisation, le polymère conditionné en colonne est «recyclé» en faisant circuler de l'eau (100 mL) et en vérifiant en CLHP, l'absence de l'aminoester et de l'aminoacide correspondant dans les eaux de rinçage; il est ensuite conservé à +4°C.

S-phénylalanine :  $[\alpha]_{365}^{20} = -95 \pm 4\%$  (c 0,04 dans H<sub>2</sub>O à pH 7).

Chlorhydrate de l'ester méthylique de la S-phénylalanine :  $[\alpha]_{365}^{20} = +47,5 \pm 3\%$  (c 0,5 dans H<sub>2</sub>O à pH 7) [17].

#### Références

- Partie I. Synthèse et activité de formes polymérisables du pyridoxal. Honnoraty A-M, Mion L, Collet H, Teissedre R, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1995) 132, 709-720
- Mion L, Honnoraty A-M, Rousset A, Préviero A, *Tetrahedron Lett* (1991) 32, 7401
- Pugnière M, Commeyras A, Préviero A, *Biotech Lett* (1983) 5, 447
- a) Metzler DE, Ikawa M, Snell EE, *J Am Chem Soc* (1954) 76, 648  
b) Metzler DE, Longenecker JB, Snell EE, *ibid* (1954) 76, 639  
c) Metzler DE, Olivard J, Snell EE, *ibid* (1954) 76, 644
- a) Iwata M, Kuzuhara H, *Bull Chem Soc Jpn* (1985) 58, 2502  
b) Ando M, Kuzuhara H, *ibid* (1989) 62, 244  
c) Ando M, Watanabe J, Kuzuhara H, *ibid* (1990) 63, 88
- a) Weiner W, Winkler J, Zimmerman SC, Czarnik AW, Breslow R, *J Am Chem Soc* (1985) 107, 4093  
b) Tabushi I, Kuroda Y, Yamada M, Higashimura H, Breslow R, *ibid* (1985) 107, 5545  
c) Breslow R, Czarnik AW, Lauer M, Leppkes R, Winkler J, Zimmerman S, *ibid* (1986) 108, 1969  
d) Breslow R, Chmielewski J, Foley D, Johnson B, Kumabe N, Varney M, Mehra R, *Tetrahedron* (1988) 44, 5515
- a) Toi K, Izumi Y, Akabori S, *Bull Chem Soc Jpn* (1963) 36, 734  
b) Toi K, *Ibid* (1963) 36 (6), 739

- 8 Pugnière M, San Juan C, Préviero A, *Biotech Lett* (1985) 7, 31
- 9 Taillades J, Garrel L, Lagriffoul PH, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1992) 129, 191
- 10 Garrel L, *Thèse de Doctorat*, Montpellier II (1993)
- 11 Tonnel J, *Thèse de Doctorat*, Montpellier II (1994)
- 12 Qiu Guo X, Yuan Qiu K, De Feng X, *Makromol Chem* (1990) 191, 577
- 13 Davis BJ, *Ann N Y Acad Sci* (1964) 121, 421
- 14 Chen S-T, Huang W-H, Wang K-T, *J Org Chem* (1994) 59, 7580
- 15 Commeyras A, Collet H, Mion L, Bénéfice S, Calas P, Choukroun H, Taillades J, *Brevet français n° 94 127 79* du 24.10.94
- 16 Epton R, Marr G, Shacley AT, *Polymer* (1981) 22, 553
- 17 La valeur de  $[\alpha_E]_{365}^{20}$  est corrigée, elle tient compte de la quantité de phénylalanine présente initialement dans le chlorhydrate de l'aminoester