

Époxydes énantiopurs : obtention par voie chimique ou par voie enzymatique

Sandrine Pedragosa-Moreau, Alain Archelas, Roland Furstoss*

Groupe de chimie organique et bio-organique, URA CNRS 1320, Faculté des sciences de Luminy,
Case 901, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France

(reçu le 7 mars 1995, accepté le 20 juin 1995)

Summary – Enantiopure epoxides: access via chemical or enzymatic routes. Because of their high chemical versatility, epoxides are synthetic intermediates of utmost importance for chemical synthesis. Furthermore, the preparation of such intermediates in an “enantiopure” form has been a highly important goal over the last decade, essentially because of the growing demand for optically active compounds in the area of biologically active pharmaceuticals. In this review we describe the “state of the art” of chemical- or biocatalyst-based procedures allowing the synthesis of these epoxide intermediates in an optically pure form.

epoxide / asymmetric synthesis / enantiopure epoxide / stereospecific epoxidation / dihydroxylation / biotransformation / enzymatic approach / epoxide hydrolase

Introduction

Synthèse asymétrique d'époxydes par voie chimique

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un réactif chiral (Voies A-D)

- Utilisation de peracides chiraux (Voies A-B)
- Utilisation de dioxiranes chiraux
- Utilisation d'oxaziridines chirales
- Utilisation de borates chiraux (Voie D)

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un auxiliaire chiral (Voie E)

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un catalyseur chiral (Voies F-K)

- Catalyseurs non métalliques (Voie F)
- Catalyse par les métaux de transition
 - Epoxydation catalysée par des métalloporphyrines (Voie G)
 - Réaction d'époxydation avec des complexes chiraux du molybdène (VI) (oxodiperoxo) (Voie H)
 - Utilisation de l'hydroperoxyde de *t*-butyle en présence de métaux de transition (voie I)
 - La réaction de Sharpless. Aspect général (Voie J)
 - Epoxydation catalysée par des complexes de (salen) manganèse (III).
 - Epoxydations de Jacobsen et Katsuki (Voie K)

Obtention d'époxydes chiraux par voie biologique

Voies indirectes

- Réduction microbiologique d' α -halocétones
- Dégradation énantiosélective d'halohydrines (Voie B)

Epoxydation microbiologique stéréosélective

- Monooxygénases à fer héminique
- Monooxygénases à fer non héminique
- Autres monooxygénases microbiennes
- Epoxydation par les chloroperoxydases

Dédoublage enzymatique d'époxydes

Dédoublage par les lipases

Métabolisme et détoxication des époxydes

- Généralités
- Dégradations énantiosélectives
- Action d'une glutathione transférase
- Hydrolyses énantiosélectives

Les époxyde hydrolases de mammifères

- Spécificité de substrat
- Régiosélectivité
- Mécanisme
- Énantiosélectivité
- Cas particuliers : époxydes *méso*

Les époxyde hydrolases de végétaux

Les époxyde hydrolases de microorganismes

- Les EH de bactéries
- Les EH de champignons microscopiques

Conclusion

Références

* Correspondance et tirés à part

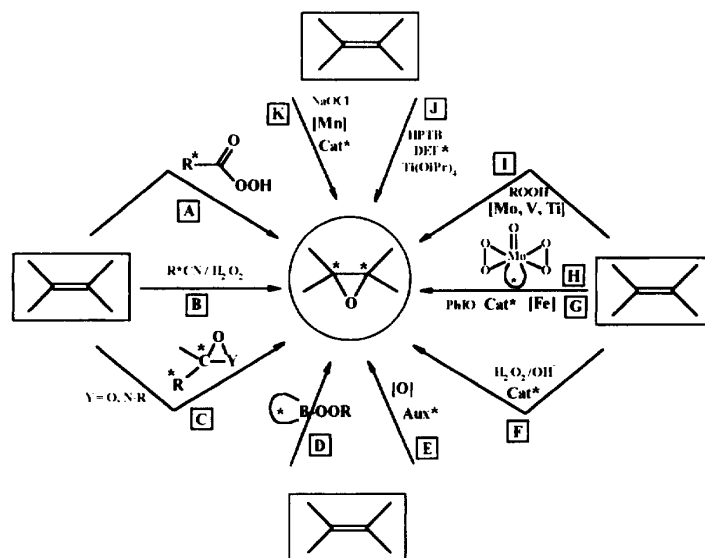


Fig 1

Introduction

Etant donnée leur versatilité chimique, les époxydes constituent l'une des classes les plus importantes d'intermédiaires réactionnels, et sont souvent utilisés comme synthons dans des synthèses chimiques multiétapes. Ceci est vrai, entre autres, lors de la synthèse de molécules douées de propriétés biologiques diverses (domaines pharmaceutique, phytosanitaire, arômes et parfums, etc...). Dans ce contexte, l'obtention d'époxydes «énantiopurs» a pris de plus en plus d'importance vu la diversité des activités biologiques que présentent très souvent les deux énantiomères d'une même molécule. L'objectif de cette revue est de faire le point sur l'état actuel des possibilités de synthèse de ces intermédiaires et d'illustrer la complémentarité existant entre les approches de chimie conventionnelle (impliquant essentiellement des catalyseurs organométalliques) et les approches de bioconversions (impliquant des catalyseurs enzymatiques) qui se sont développées récemment.

Synthèse asymétrique d'époxydes par voie chimique

Il existe plusieurs voies de synthèse chimique conventionnelle permettant l'obtention d'époxydes chiraux (non racémiques*) et de nombreux travaux sur ces méthodes de synthèse sont décrits dans la littérature. Dans la présentation qui va suivre nous nous limiterons aux voies essentielles conduisant à ces synthons par voie de **synthèse asymétrique**. Sans chercher à faire une description exhaustive de ces diverses possibilités, nous citerons pour chacune des diverses voies, les exemples qui nous paraissent les plus intéressants et qui sont souvent utilisés en synthèse organique fine.

* Par souci de simplification, tout au long de cet article le terme chiral sera utilisé dans le sens de chiral non racémique.

Les différentes voies d'accès directs aux époxydes chiraux à partir d'oléfines prochirales sont représentées dans la figure 1.

Synthèse asymétrique d'époxydes par voie chimique

Il existe également d'autres voies directes [1,2] ou indirectes [3] (nécessitant plusieurs étapes) conduisant à des époxydes chiraux qui ne seront que peu évoquées dans cette revue. La synthèse asymétrique implique la création d'un ou plusieurs centres chiraux à partir d'un composé prochiral. Il y a induction chirale provenant de l'influence :

- soit d'un réactif chiral,
- soit d'un auxiliaire chiral,
- soit d'un catalyseur chiral.

Nous adopterons cette classification dans la suite de cette monographie.

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un réactif chiral (Voies A-D)

Dans cette approche, un substrat achiral est traité en présence d'un réactif chiral pour conduire à un produit optiquement actif. Divers types de réactifs chiraux ont ainsi été étudiés et nous décrivons ci-dessous les résultats obtenus.

• Utilisation de peracides chiraux (Voies A-B)

La réaction d'époxydation d'une oléfine (non asymétrique) par un peracide décrite par Prilezhaev dès 1909 [4], est une réaction d'addition électrophile faisant intervenir une entité nucléophile : un alcène, et une entité électrophile : un peracide. Cette réaction a été largement utilisée étant donné son efficacité et sa simplicité et a été décrite dans de nombreux articles et revues [5,6]. Les oléfines riches en électrons sont préférentiellement époxydées (fig 2).

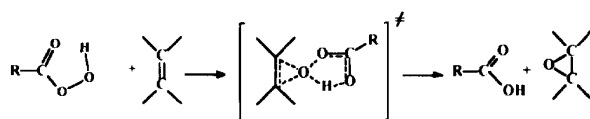


Fig 2

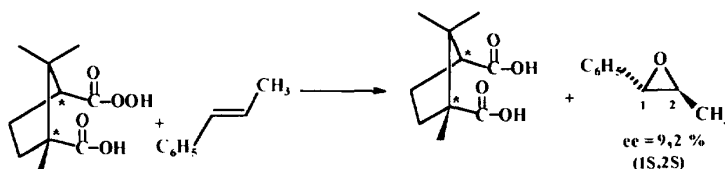


Fig 3

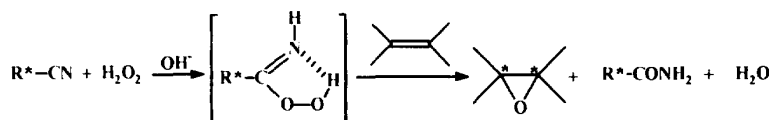


Fig 4

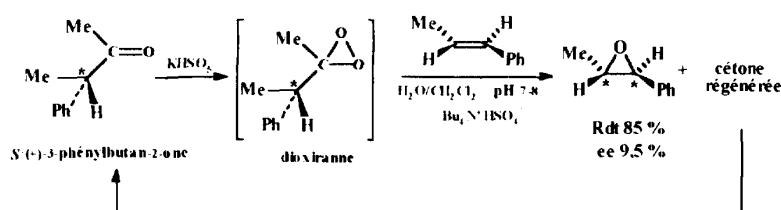


Fig 5

Dans les années 60, les premiers résultats concernant les époxydations asymétriques mettant en œuvre des peracides chiraux (tels que l'acide (+) moncamphorique) (Voie A) ont été décrits pour la préparation d'époxydes chiraux [7,8]. Cependant, les excès énantiomériques (ee) des époxydes formés sont inférieurs à 10% (fig 3).

Une augmentation de la stéréosélectivité de l'époxydation a pu être obtenue par Rebek [9] avec des imino-peracides chiraux (Voie B). Cependant les excès énantiomériques n'excèdent pas 31% dans le meilleur des cas (époxyde de *trans*-stilbène) (fig 4).

Toutefois, en utilisant un cyanoheptahélicène optiquement actif dans l'époxydation du (*E*)-stilbène et de l' α -méthylstyrène avec H_2O_2 à température ambiante, les époxydes ont été obtenus avec des excès énantiomériques très élevés (> 98%) [10] (tableau I).

Cette méthode nécessite l'utilisation en quantité stœchiométrique de l'inducteur chiral. Néanmoins, ce dernier qui est récupéré sous forme d'amide en fin de réaction, peut être régénéré en nitrile par l'action de $SOCl_2$ à reflux.

• Utilisation de dioxiranes chiraux

Dans les années 1980, Curci *et al* [11], ont démontré que des dioxiranes (Voie C, Y = O) obtenus en solution par réaction de cétones chirales avec du peroxomonosulfate de potassium, étaient des agents oxydants puissants et sélectifs. En utilisant des cétones chirales comme précurseurs de dioxiranes chiraux dans l'époxydation

Tableau I.

Inducteur chiral	Produit	Rdt (%)	ee (%)	Conf.
		92	> 99	(<i>R,R</i>)
		84	98	(<i>R</i>)

du 1-méthylcyclohexène et du (*E*)- β -méthylstyrène [12], ces auteurs ont obtenu les époxydes correspondants présentant des excès énantiomériques compris entre 9 et 12,5% avec des rendements d'environ 80-90%. L'avantage de cette méthode, utilisant des dioxiranes formés *in situ*, réside dans le fait que seulement des quantités catalytiques de cétone chirale sont nécessaires. Cependant, elle conduit à des époxydes présentant de faibles excès énantiomériques (fig 5).

• Utilisation d'oxaziridines chirales

Toujours dans les années 80, Davis [13] a réalisé l'époxydation asymétrique d'alcènes non fonctionnalisés en utilisant des 2-sulfonyloxaziridines chirales (Voie C, Y = N) dérivées du bromocamphre comme agent oxydant. Cette réaction conduit à des époxydes chiraux présentant des excès énantiomériques faibles (12-35%) avec des rendements chimiques modérés à très bons

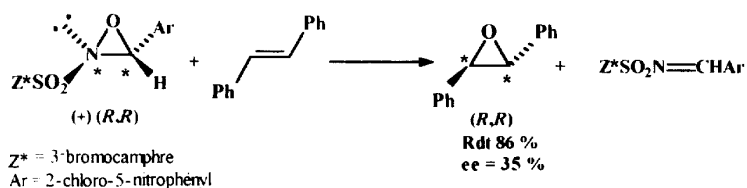


Fig 6

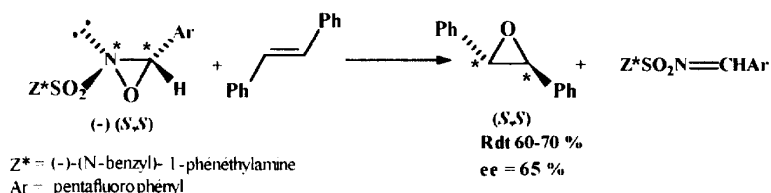


Fig 7

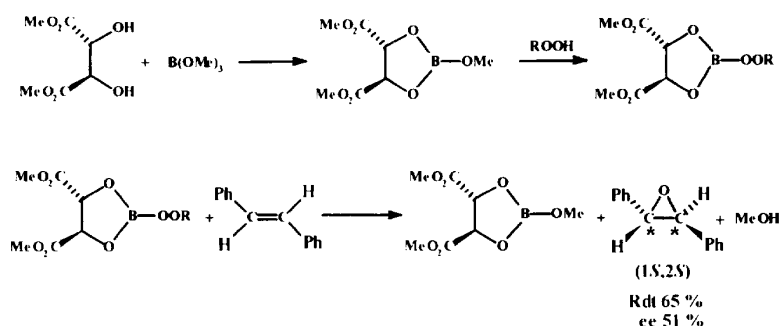


Fig 8

(50-90%). La configuration absolue du produit est contrôlée par celle de l'oxaziridine *via* un état de transition plan, tandis que l'induction chirale est due aux facteurs stériques (fig 6).

L'utilisation de pentafluorophényl-2-sulfamoyloxaziridine permet d'améliorer la stéréosélectivité de l'époxydation (ee \approx 65%) [14] (fig 7).

• Utilisation de borates chiraux (Voie D)

Les orthoborates sont utilisés comme réactifs dans les réactions d'époxydation d'oléfines en présence d'hydroperoxydes d'alkyle (depuis le début des années 60). Très récemment (1993), Manoury *et al* [15] ont réalisé l'époxydation stéréosélective d'alcènes prochiraux en utilisant des borates d'alcools chiraux. L'espèce réactive est supposée être un perborate qui, en présence d'une oléfine, conduit à l'obtention d'époxydes chiraux. Dans le meilleur des cas (*trans*-stilbène), l'époxyde est obtenu avec un excès énantiomérique de 51%. Des stéréosélectivités plus faibles sont observées dans le cas d'oléfines non aromatiques (fig 8).

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un auxiliaire chiral (Voie E)

Il existe peu d'exemples dans la littérature décrivant l'utilisation d'un auxiliaire chiral pour la synthèse d'époxydes chiraux. Toutefois, en 1986 [16], cette méthode a été utilisée pour l'époxydation asymétrique

de la double liaison terminale de terpènes tels que l'acide farnésique. Ainsi, par couplage du terpène avec des composés capables de former une hélice tels que les polypeptides, une seule conformation spatiale est favorisée permettant une attaque préférentielle d'une face par le réactif oxydant.

Le polypeptide joue le rôle d'auxiliaire chiral et contrôle la stéréosélectivité de la réaction d'époxydation. L'induction asymétrique observée au cours de cette réaction est cependant faible et dépend de l'agent oxydant utilisé (ee = 12% avec *m*-CPBA et ee = 25% avec NBS). Les polypeptides ont été choisis dans cette approche étant donné leur facilité de préparation à grande échelle et la stabilité de leurs structures secondaires (hélice) dans la majorité des solvants. Récemment, Charette *et al* [17] ont montré que certains sucres pouvaient aussi être utilisés en tant qu'auxiliaires chiraux dans l'époxydation asymétrique d'éthers allyliques (fig 9).

L'optimisation des conditions de réaction a conduit à l'obtention des deux diastéréoisomères dans un rapport de 9/1 avec un rendement global de 80%. Chacun de ces deux diastéréoisomères peut ensuite être hydrolysé en milieu acide pour conduire à l'époxyde correspondant. L'inconvénient majeur de ce type d'approche est souvent le nombre d'étapes supplémentaires dans la synthèse d'une molécule cible, dû à l'introduction puis élimination de l'auxiliaire chiral.

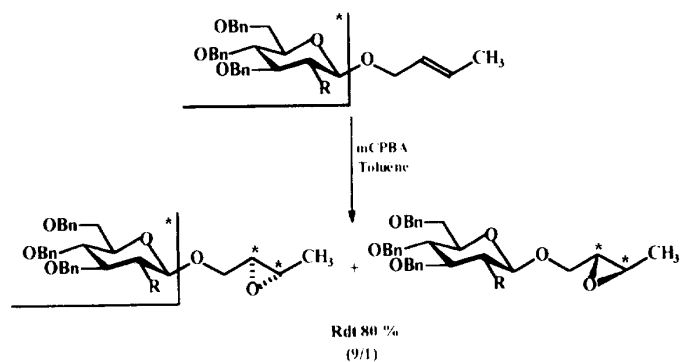


Fig 9

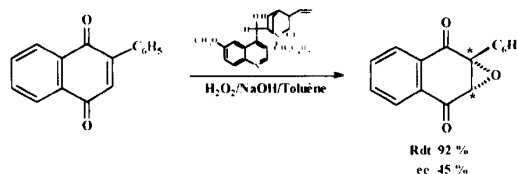


Fig 10

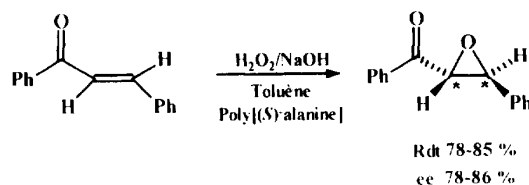


Fig 11

Synthèse asymétrique d'époxydes utilisant un catalyseur chiral (Voies F - K)

• Catalyseurs non métalliques (Voie F)

L'époxydation d'oléfines pauvres en électrons, telles que les cétones α , β -insaturées, (par exemple les chalcones et les quinones) peut être réalisée par action du peroxyde d'hydrogène en présence de bases. Par exemple, Wynberg *et coll* [18] ont utilisé des sels d'ammonium quaternaires dérivés d'alcaloïdes optiquement actifs comme catalyseurs de transfert de phase dans l'époxydation de cétones α , β -insaturées. Ils ont ainsi obtenu des époxydes avec de bons rendements chimiques et des excès énantiomériques moyens ($\approx 50\%$) et ont observé que la nature du solvant organique joue un rôle important dans la stéréosélectivité de ces réactions [19] (fig 10).

Julia *et al* [20-22] ont utilisé des polypeptides chiraux (synthétiques) tels que la poly(*S*)-alanine, en tant qu'auxiliaires chiraux à la place de sels d'alcaloïdes. Les polypeptides possédant des longueurs de chaînes variables et des groupements terminaux différents sont synthétisés *via* la polymérisation des *N*-carboxyanhydrides correspondants. La longueur de la chaîne du polymère doit être d'au moins 10 unités amino-acides pour obtenir une bonne stéréosélectivité [23]. Ainsi l'utilisation de ce type de templates a permis l'obtention d'époxychalcones présentant de bons excès

énantiomériques par oxydation avec H_2O_2 en milieu basique (NaOH) à température ambiante (fig 11).

Récemment Flisak *et coll* [24] ont décrit une application de cette réaction. En utilisant une poly-*L*-leucine commerciale, ils ont réalisé l'époxydation de chalcones substituées avec des excès énantiomériques élevés (jusqu'à 92%) par la méthode de Julia. Le catalyseur peut être recyclé sans perte d'activité et réutilisé dans une autre réaction d'époxydation asymétrique.


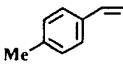
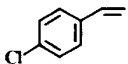

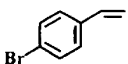
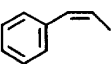
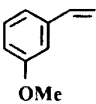
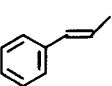


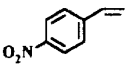

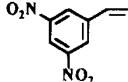
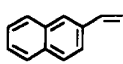
• Catalyse par les métaux de transition

Epoxydation catalysée par des métalloporphyrines (Voie G)

Ces dix dernières années, diverses métalloporphyrines ont été utilisées dans le but de catalyser des réactions d'oxydation stéréosélective d'oléfines non fonctionnalisées [25]. La sélectivité est variable en fonction du métal de transition (Fe, Mn, Mo, Cr...) coordonné à la porphyrine ainsi qu'aux substituants portés par les groupements aryles de celle-ci. Au cours de cette réaction de transfert d'oxygène catalysée par une métalloporphyrine, il y a passage par un intermédiaire réactif du type Fer-oxo.

En 1979, Groves *et al* [26] ont publié le premier article concernant l'utilisation de l'iodosylbenzène comme source d'oxygène dans l'époxydation d'alcènes cata-

Tableau II. Réactions catalysées par des métalloporphyrines, excès énantiomériques et rendements en époxydes.

SUBSTRATS	ee (%)	Rdt (%)	Réf.	SUBSTRATS	ee (%)	Rdt (%)	Réf.
	69	86	[35]		47	56	[31]
	70	82	[35]		79	65	[35]
	51	non décrit	[32]		80	76	[35]
	73	non décrit	[32]		21	81	[35]
	89	non décrit	[32]		88	26	[35]
	67	non décrit	[32]		70	non décrit	[32]
	96	non décrit	[32]		63	26	[30]

lysée par Fe(TPP)Cl (chloro-ferri-tétraphénylporphyrine). Suite à ce résultat, ces auteurs ont introduit des groupements optiquement actifs sur le catalyseur et obtenu ainsi des métalloporphyrines chirales [27]. Ces catalyseurs sont capables de mimer la catalyse et l'induction chirale des cytochromes P-450 (enzyme héminique). L'époxydation asymétrique d'oléfines prochirales avec ces porphyrines chirales complexées à un atome de fer a conduit, dans un premier temps, à des époxydes présentant des excès énantiomériques très moyens variant de 0% (pour l'oxyde de 1-méthylcyclohexène) à 51% pour l'oxyde du 4-chlorostyrène. Cependant, en 1985, Mansuy *et al* [28] ont montré que la stéréosélectivité induite par une métalloporphyrine en «anse de panier» (ee 50% pour l'oxyde de 4-chlorostyrène) était supérieure à celle induite par une métalloporphyrine «à piquet» (ee 10-20%).

De nombreux autres complexes de métalloporphyrines ont été étudiés ces dernières années pour réaliser l'époxydation asymétrique d'oléfines non fonctionnalisées. Ces catalyseurs ne conduisent qu'à des excès énantiomériques moyens. C'est le cas, par exemple, des métallo-tétraphénylporphyrines de symétrie D₄ [29] (41 < ee < 76%), des binaphtyl ferroporphyrines à «anse de panier» [30] (14 < ee < 76%), ou encore des complexes de porphyrines de manganèse comportant une «sangle» [31] (42 < ee < 58%). Très récemment, Naruta *et al* [32] ont décrit une porphyrine avec un groupement bitétraline capable de catalyser l'époxydation

stéréosélective d'oléfines avec de très bons excès énantiomériques (54 < ee < 96%).

L'étude de l'influence de groupements électrodonneurs ou électroattracteurs portés par les oléfines de départ a permis de montrer que le degré de stéréosélectivité dépendait essentiellement des facteurs électroniques du substrat et non de facteurs stériques [33]. L'ensemble de ces époxydations a été réalisé sur de faibles quantités de substrat (500 μ moles) et le rapport catalyseur/substrat utilisé est de 1/500. Les rendements chimiques ne sont pas toujours indiqués. L'ensemble des meilleurs résultats obtenus par époxydation avec les divers types de métalloporphyrines est rassemblé dans le tableau II.

Il apparaît donc que les métalloporphyrines sont non seulement d'importants modèles mimant le transfert d'oxygène qui a lieu dans les cytochromes P-450, mais également des catalyseurs efficaces permettant de réaliser des réactions d'oxydation asymétriques [34,35]. Il est important de souligner qu'il s'agit là, à notre connaissance, de l'un des premiers exemples (qui a été particulièrement développé) d'approche «biomimétique» pour la conception d'un nouveau type de catalyseur chimique. Cependant, cette approche souffre de façon évidente – en particulier en ce qui concerne la catalyse asymétrique – du fait que les catalyseurs chiraux utilisés sont particulièrement difficiles à synthétiser. Il semble peu probable que des applications

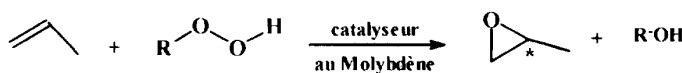


Fig 12

industrielles puissent utiliser ce type d'approche pour la préparation de quantités importantes d'époxydes chiraux.

Réaction d'époxydation avec des complexes chiraux du molybdène (VI) (oxodiperoxo) (Voie H)

Des complexes peroxy du molybdène (préparés à partir d'oxyde de molybdène et de peroxyde d'hydrogène) peuvent aussi être utilisés comme agents époxydants. Kagan, Mimoun et Schurig ont obtenu un complexe du molybdène optiquement actif en utilisant le (*S*)-*N,N*-diméthyllactamide (DMLA) comme ligand. Le mécanisme de cette époxydation n'est pas encore bien connu et plusieurs hypothèses ont été émises. Ainsi, certains auteurs pensent qu'il y aurait une coordination entre l'oléfine et le molybdène, alors que d'autres supposent une époxydation directe par attaque électrophile du groupement peroxy en analogie avec l'époxydation des alcènes par les peracides. En utilisant cette méthodologie, des oléfines prochirales simples telles que le *trans*-but-2-ène ont été époxydées avec de bons rendements chimiques et avec les excès énantiomériques décrits ci-dessous [36]. Avec le complexe du molybdène/(*S*)-pipéridine lactamide et en additionnant des quantités équimolaires d'autres additifs tel que le (*2R,3R*)-butane-2,3-diol, il est possible d'obtenir des excès énantiomériques de l'ordre de 90% [37] (tableau III).

Tableau III.

<i>trans</i> -2-butène	ee (%)
MoO(O ₂) ₂ .DMLA	35
MoO(O ₂) ₂ .PLA	55
MoO(O ₂) ₂ .PLA-(<i>2R,3R</i>)-butanediol	90

PLA=(*S*)-pipéridine lactamide

*Utilisation de l'hydroperoxyde de *t*-butyle en présence de métaux de transition (voie I)*

L'utilisation de dérivés des métaux de transition (molybdène, vanadium ou titane) comme catalyseurs dans les réactions d'époxydation d'alcènes en présence d'hydroperoxydes date des années 1960 [38]. Cette réaction a été développée industriellement et utilisée pour la production d'oxyde de propylène racémique selon le procédé HALCON [39] (fig 12).

A la fin des années 70, l'époxydation avec l'hydroperoxyde de *t*-butyle (HPTB) en présence de Mo(VI) et de diols optiquement actifs (dialkyl tartrates) a également été étudiée [40]. Les rendements chimiques en époxydes sont excellents, cependant l'induction chirale reste faible (0 < ee < 10%).

La réaction de Sharpless. Aspect général (Voie J)

La méthode d'époxydation asymétrique développée en 1980 par Katsuki et Sharpless [41] est l'une des plus

importantes transformations asymétriques connues de nos jours. Les premiers résultats concernant l'époxydation asymétrique ont été obtenus avec un catalyseur au vanadium [42]. La meilleure induction asymétrique (ee ≈ 80%) a été obtenue en présence d'un dérivé de la L-proline comme ligand.

Cette méthodologie permet l'époxydation d'alcools allyliques avec de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (HPTB) et du tétraisopropanolate de titane en présence de L-(+)- ou de D-(-)-tartrate (DET) de diéthyle. Sharpless a montré ultérieurement que l'adjonction de tamis moléculaires (zéolithes) dans le milieu réactionnel rendait le système catalytique plus performant [43]. La stéréosélectivité de l'attaque dépend de la configuration absolue du tartrate de diéthyle utilisé dans la réaction et peut être prévue à l'avance selon que l'on utilise le (+) ou le (-)-tartrate de diéthyle. L'espèce catalytique correspondrait à un dimère cyclique dans lequel deux atomes de titane sont reliés par deux molécules de tartrate de diéthyle [44, 45]. Grâce à cette méthodologie de nombreux alcools allyliques différemment substitués ont été époxydés avec de très bons rendements et d'excellents excès énantiomériques (> 90%) (fig 13).

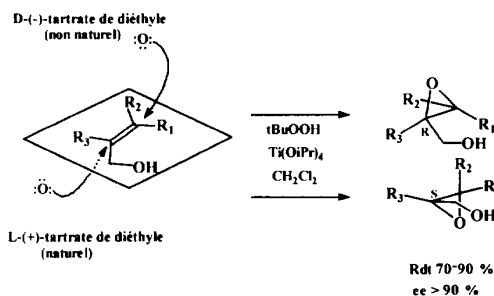


Fig 13

Certains des époxydes chiraux ainsi obtenus ont été utilisés comme synthon dans l'élaboration de nombreux composés doués de propriétés biologiques. Par exemple, la production commerciale du (+)-disparlure [46] (phéromone du Bombyx disparate) utilisable dans le contrôle biologique d'insectes, fait appel à la méthode de Sharpless pour l'obtention de l'époxyalcool intermédiaire (fig 14).

Toujours en ce qui concerne la synthèse de molécules biologiquement actives, une voie originale impliquant cette époxydation asymétrique comme étape cruciale dans la préparation d'un β -bloquant : le (*S*)-Propranolol® a été décrite [47] (fig 15).

Un exemple industriel illustrant l'utilisation de la réaction de Sharpless à une échelle préparative est la production d'époxyoctanols par la société Upjohn (USA) [48]. Cet époxyde est obtenu à partir de 18,8 kg d'alcool allylique avec un rendement de 81% et un excès énantiomérique de 98% (fig 16).

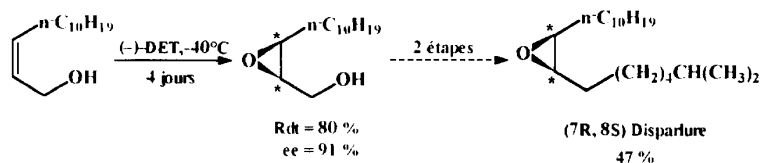


Fig 14

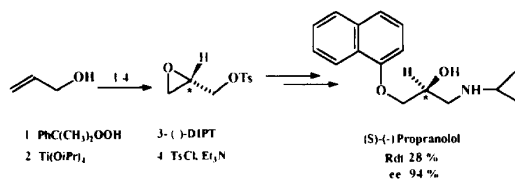


Fig 15

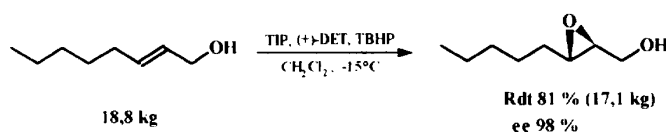


Fig 16

Epoxidation catalysée par des complexes de (salen) manganèse (III)-Epoxidations de Jacobsen et Katsuki (Voie K)

Dans la course au développement de nouveaux catalyseurs pour l'oxydation asymétrique d'oléfines non fonctionnalisées, les complexes chiraux de (salen) manganèse ont été récemment très étudiés. Ainsi en 1990, Jacobsen [49] a remplacé certains atomes de carbone d'un complexe initialement décrit par Kochi [50] par des atomes de carbone stéréogéniques et a montré qu'il obtenait une bonne stéréosélectivité dans le cas de systèmes oléfiniques non fonctionnalisés (fig 17).

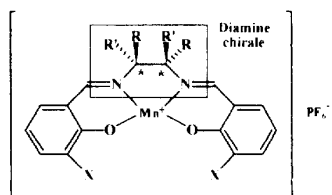


Fig 17

Ces catalyseurs d'époxydation sont préparés en trois étapes et avec des rendements globaux d'environ 68-74% à partir de (R,R)- ou (S,S)-1,2-diamino-1,2-diphényléthane et d'un dérivé approprié du salicylaldéhyde. L'époxydation est réalisée par un agent oxydant qui est soit l'hypochlorite de sodium soit l'iodosylmésitylène en quantités stœchiométriques. Ainsi, avec le complexe de (salen) manganèse dans lequel R = H, R' = Ph et X = t-Bu, Jacobsen a réalisé l'époxydation d'oléfines mono- di- et trisubstituées avec une bonne induction asymétrique (20 < ee < 93%) (fig 18).

Parallèlement aux études menées par Jacobsen, Katsuki *et coll* [51] ont développé d'autres complexes

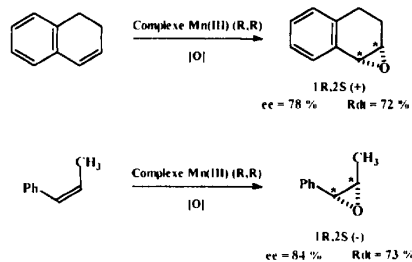


Fig 18

de (salen) manganèse capables d'induire une certaine stéréosélectivité au cours de l'époxydation d'oléfines non fonctionnalisées. Ces auteurs ont remplacé les groupes X = t-Bu du complexe de Jacobsen par des groupements chiraux (tels que le (1R)-1-phénylpropyl) (fig 19).

Les études menées par Katsuki ont montré que, pour ces catalyseurs, le sens et le degré de la stéréosélec-

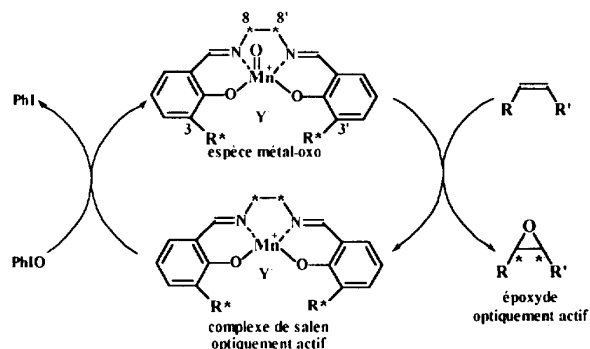

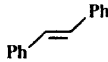
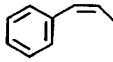


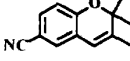

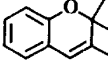


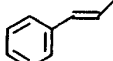
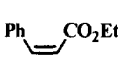
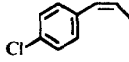



Fig 19

Tableau IV. Réactions catalysées par des complexes de (salen) manganèse, excès énantiomériques et rendements en époxydes.

SUBSTRATS	ee (%)	Rdt (%)	Réf.	SUBSTRATS	ee (%)	Rdt (%)	Réf.
	86	88	[58]		62	65	[56]
	92	84	[59]		59	50	[49]
	88	80	[59]		97	96	[59]
	92	96	[55]		98	72	[59]
	30	36	[49]		94	63	[59]
	56	32	[53]		89	65	[59]
	92	67	[59]		92	75	[59]

tion faciale des oléfines dépendaient à la fois des substituants sur les centres stéréogéniques de la partie aromatique (C-3 et C-3') et de ceux appartenant à la partie éthylènediamine (C-8 et C-8'). Afin d'obtenir une meilleure stéréosélectivité, la présence de groupements encombrants tels que le *t*-butyle en C-3 et C-3' s'est avérée essentielle. Leur interaction avec la face la plus encombrée d'une oléfine non symétrique détermine l'orientation du substrat au cours de l'approche vers la liaison oxo-métallique et ainsi la sélectivité stéréofaciale du transfert d'oxygène. En règle générale, les oléfines *cis*-disubstituées, ainsi que les oléfines conjuguées soit à des groupements aryle soit à des doubles et des triples liaisons, apparaissent comme les meilleurs substrats pour l'époxydation asymétrique.

Au cours de ses récents travaux, Katsuki [52-54] a montré, en synthétisant plusieurs complexes différemment substitués, que la stéréosélectivité faciale des oléfines *trans* au cours de l'époxydation était préférentiellement contrôlée par la chiralité des substituants en C-3(-3') et celle des oléfines *cis* par la chiralité de la partie éthylène diamine (C-8(-8')). Le remplacement du groupement *t*-butyle par d'autres substituants optiquement actifs et l'addition de ligands donneurs dans le milieu réactionnel (tels que le 2-méthylimidazole ou la *N*-oxyypyridine) conduisent dans certains cas à une augmentation de l'induction asymétrique et du rendement chimique. Le changement de conformation du complexe de (salen) manganèse et des substituants en C-3 et C-3' au cours de la coordination avec le ligand donneur, permet d'expliquer la meilleure stéréosélectivité observée après addition d'un ligand donneur.

Les complexes de (salen) manganèse présentent différents avantages par rapport aux métalloporphyrines chirales précédemment décrites. Leur meilleure stéréosélectivité peut être attribuée au fait que le complexe porte des atomes de carbone stéréogéniques au voisinage du métal, permettant ainsi une meilleure induction asymétrique au cours de l'époxydation. De plus, la synthèse des complexes de (salen) manganèse est relativement aisée et leurs propriétés stériques peuvent être facilement modifiées en choisissant les précurseurs diamine et aldéhyde salicylique appropriés. Cependant, bien que les complexes de (salen) manganèse optiquement actifs catalysent l'époxydation d'oléfines *cis* avec des excès énantiomériques élevés (> 90%) [55], l'époxydation d'oléfines *trans* avec ces complexes conduit encore à des excès énantiomériques très moyens (40-60%) [56]. Toutefois, très récemment, Jacobsen *et coll* ont montré qu'il était possible de contrôler l'induction asymétrique dans les réactions d'époxydation et d'obtenir un mélange d'époxydes *cis/trans* à partir d'oléfines *cis*. Les époxydes *trans* ainsi obtenus présentent de bons excès énantiomériques (66-98%) [57]. Les meilleurs résultats obtenus par époxydation avec les complexes de (salen) manganèse sont rassemblés dans le tableau IV.

Dans ce contexte, et bien qu'il ne s'agisse pas d'une méthode d'époxydation directe, il convient de commenter ici une méthode récente et très intéressante permettant d'obtenir des époxydes chiraux en plusieurs étapes (fig 20).

Cette nouvelle approche, récemment décrite par Sharpless *et coll* consiste à oxyder, de façon stéréosélective, une double liaison portée par une oléfine prochirale

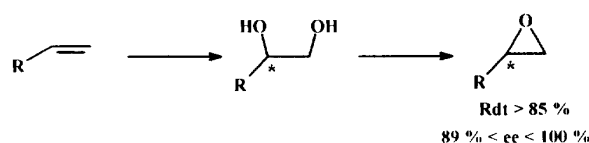


Fig 20

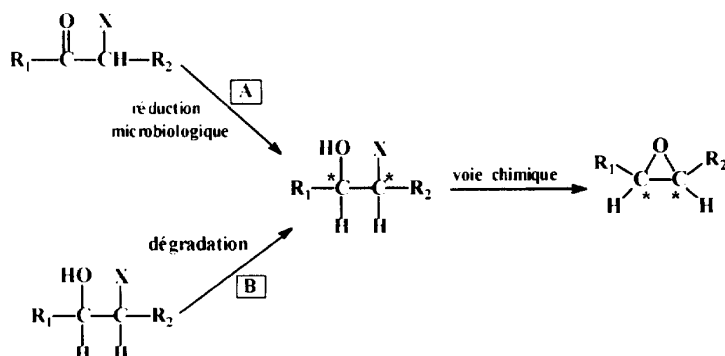


Fig 21

à l'aide d'un catalyseur au tétr oxyde d'osmium [60]. Ce catalyseur est en fait un complexe entre le tétr oxyde d'osmium et un dérivé d'une amine naturelle chirale qui est soit la dihydroquinine, soit la dihydroquinidine. Chacun de ces deux catalyseurs, baptisés ADMix α ou ADMix β , conduit à une dihydroxylation stéréosélective de l'oléfine, et permet donc d'obtenir soit l'un, soit l'autre, des énantiomères du diol correspondant et ceci avec un degré de pureté énantiomérique élevé. L'obtention des époxydes correspondants est réalisée, dans une deuxième étape, par cyclisation de ces diols sans racémisation dans la plupart des cas [3].

Obtention d'époxydes chiraux par voie biologique

Il existe trois types de voies d'approche conduisant à l'obtention d'époxydes chiraux par catalyse enzymatique. Le premier type d'approche est basé sur une stratégie indirecte et fait appel à plusieurs étapes dont certaines peuvent être des étapes chimiques. Les deux autres approches, directes, sont celles concernant d'une part l'époxydation microbiologique stéréosélective d'oléfines prochirales et, d'autre part, le dédoublement enzymatique d'époxydes racémiques. Compte tenu du caractère asymétrique intrinsèque des catalyseurs biologiques, de leur caractère ubiquitaire et de la variété de substrats qu'ils semblent aptes à transformer, leur utilisation à des fins de synthèse organique constitue de façon évidente une voie d'approche particulièrement intéressante pour l'obtention d'époxydes chiraux.

Voies indirectes

Diverses méthodes indirectes permettent l'obtention d'époxydes chiraux. Ces dernières font généralement intervenir deux étapes dont l'une au moins est une biotransformation, l'autre pouvant être biologique ou chimique.

Parmi les méthodes existantes, la plus intéressante semble être celle faisant intervenir les halohydrines comme intermédiaires chiraux.

Les halohydrines optiquement actives peuvent être obtenues par voie biologique. Les biotransformations qui interviennent alors sont

- soit la réduction stéréosélective de cétones α -halogénées (Voie A),
- soit la dégradation énantiosélective d'une halohydrine racémique (Voie B). Les halohydrines obtenues sont ensuite transformées en époxydes chiraux par cyclisation intramoléculaire (fig 21).

• Réduction microbiologique d' α -halocétones

La réduction microbiologique d' α -halocétones a été très peu développée (Voie A). Cependant, des travaux relativement anciens ont montré que la réduction asymétrique de la bromo- et de la chloroacétophénone par la bactérie *Cryptococcus macerans* conduit aux (*R*)-2-halohydrines correspondantes à partir desquelles l'oxyde de styrène optiquement pur a été préparé [61]. Plus récemment, Weijers *et al* [62] ont étudié la réduction microbiologique de la chloroacétone en 1-chloropropan-2-ol chiral avec comme objectif l'obtention des énantiomères du 1,2-époxypropane optiquement purs. Ces auteurs ont observé que le (*S*)-1,2-époxypropane optiquement pur pouvait être obtenu en utilisant différentes souches de bactéries et de levures. L'enzyme impliquée dans cette réduction est une alcool déshydrogénase NAD(P)H dépendante (fig 22).

De la même manière, la réduction de la 3-chlorobutan-2-one racémique conduit à un mélange 50/50 des deux diastéréoisomères (2*S*,3*R*)-3-chlorobutan-2-ol et (2*S*,3*S*)-3-chlorobutan-2-ol, chacune de ces deux halohydrines présentant des excès énantiomériques supérieurs à 97%. La réaction de réduction s'avère donc être stéréosélective, mais cette stéréosélectivité étant indépendante de la configuration absolue de l'atome de carbone qui porte le chlore, la réaction conduit à un mélange de diastéréoisomères. Dans ce même

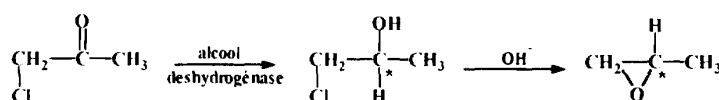


Fig 22

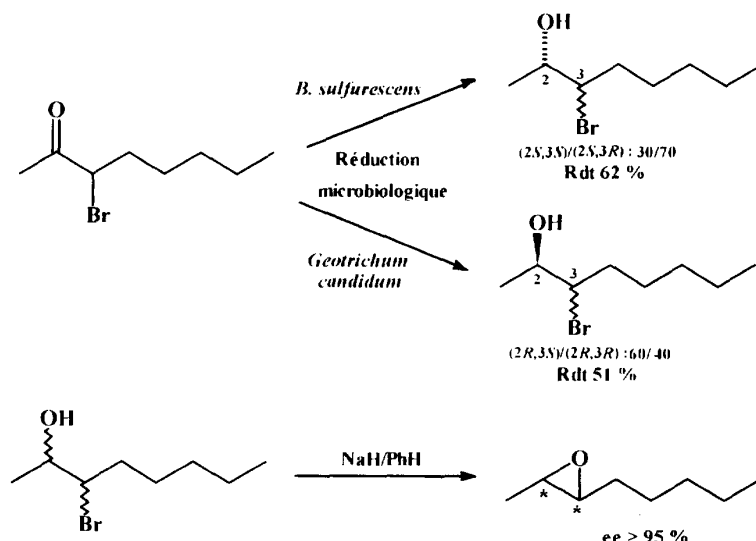


Fig 23

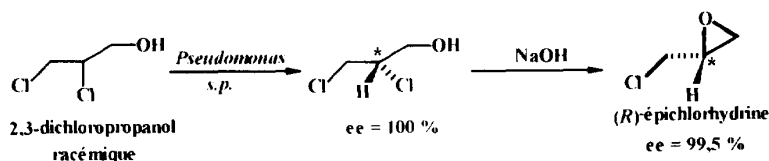


Fig 24

contexte, Veschambre *et al* [63] ont testé de nombreux microorganismes permettant la réduction sélective des α -halocétone et ont ainsi trouvé différentes souches capables de conduire, à volonté, aux deux couples de diastéréoisomères du 3-bromooctan-2-ol ($2R,3SR$) et ($2S,3SR$). Ces diastéréoisomères sont ensuite séparés par voie chimique classique. Les quatre isomères du 2,3-époxyoctane sont alors accessibles en trois étapes à partir de l'octan-2-one avec de bons rendements et des excès énantiomériques élevés (fig 23).

Au cours de leurs travaux, ces auteurs ont montré que l'utilisation du champignon *Aspergillus niger* permet l'obtention, avec un rendement de 48%, d'un seul stéréoisomère ($2R,3R$) présentant un excès énantiomérique $> 98\%$. Le substrat résiduel est alors optiquement pur. Dans ce cas particulier, la réaction s'avère être stéréo- et énantiosélective. Très récemment, ces mêmes auteurs ont montré que la synthèse chimioenzymatique de 2,3-époxydes est une méthode générale et qu'elle peut être réalisée à partir de cétones variées [64]. Ils ont ainsi obtenu, en trois étapes, les quatre stéréoisomères du 4-phényl-2,3-époxybutane et de l'oxyde de *trans*- β -méthylstyrene à partir de la 4-phénylbutan-2-one et de la 1-phénylpropan-2-one, ceci avec des rendements

modérés mais avec d'excellents excès énantiomériques ($> 95\%$).

• Dégradation énantiosélective d'halohydrines (Voie B)

Au cours de la dégradation de certaines halohydrines par une souche du type *Pseudomonas*, il est apparu que l'enzyme impliquée était énantiosélective. Ainsi, Kasai *et al* [65] ont utilisé des cellules immobilisées de ce microorganisme pour obtenir de la (*R*)-épichlorohydrine optiquement pure ($ee = 99,5\%$) à partir du (*S*)-2,3-dichloropropan-1-ol résiduel ($ee = 100\%$) obtenu par dégradation énantiosélective du mélange racémique (fig 24).

Cependant, cette méthode est limitée à un rendement théorique maximum de 50% car il s'agit d'une réaction énantiosélective effectuée sur un mélange racémique. Par contre, ceci n'est plus vrai dans le cas où le substrat est un composé *méso* tel que le 1,3-dichloropropan-2-ol. Il est alors possible d'obtenir un rendement théorique de 100%. Ce type de substrat a été étudié par Watanabe [66,67] qui a décrit l'obtention de l'épichlorohydrine avec

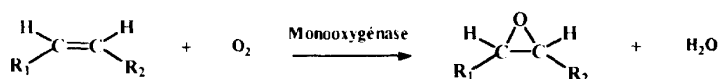


Fig 26

un rendement de 62% et une pureté optique maximale de 75% (fig 25).

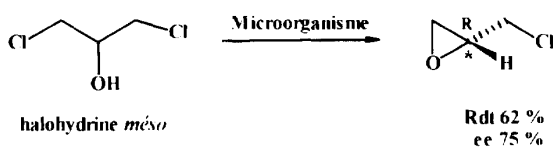


Fig 25

Époxydation microbologique stéréosélective

L'époxydation biologique est réalisée par des enzymes appelées monooxygénases. Ce type d'enzyme – qui constitue une sous-classe du groupe des oxydoréductases – est présent dans pratiquement toutes les cellules vivantes où elles sont impliquées dans la biooxydation de composés xénobiotiques. Ces enzymes sont capables d'incorporer l'oxygène moléculaire directement sur des composés organiques, transformant ainsi par exemple des alcènes en époxydes correspondants (fig 26).

Étant donné le grand nombre de publications où des époxydes chiraux sont obtenus par biooxydation d'oléfines diverses [68], nous nous limiterons dans cette partie à la description des résultats permettant l'oxydation directe d'oléfines en époxydes par des cellules microbiennes. Cependant, dans la mesure où le véritable biocatalyseur est évidemment un système enzymatique, il est intéressant de préciser quelques caractéristiques essentielles de ces systèmes. Nous allons donc décrire succinctement ces systèmes enzymatiques ainsi que, pour chacun d'entre eux, certains exemples de biooxygénation de doubles liaisons présentant un intérêt d'un point de vue synthétique.

• Monooxygénases à fer héminique

L'un des groupes les plus importants de ce type d'enzyme est la famille des cytochromes P-450. Ces hémoprotéines se trouvent pratiquement dans tous les organismes. Cette famille regroupe un certain nombre de ferroporphyrines (hème) dans lesquelles l'atome de fer central est ligandé à un atome de soufre de la protéine. Leur rôle essentiel, parmi d'autres fonctions, est d'intervenir dans les processus de détoxication en hydroxylant les composés exogènes de façon à rendre possible, dans une deuxième étape, leur conjugaison avec divers substrats naturels (glutathione, glycosides, sulfates, etc..) puis l'excrétion des produits hydrosolubles ainsi formés [69]. À cause de leur rôle essentiel dans le métabolisme de certains médicaments, les monooxygénases de mammifères ont été largement étudiées et de nombreux articles et revues de la littérature ont été consacrés à ces enzymes [70-72].

Les monooxygénases microbiennes ont été beaucoup moins étudiées. Cependant, la première monooxygénase de type cytochrome P-450 à avoir été caractérisée par cristallographie aux rayons X provient de la bactérie

Pseudomonas putida. Cette enzyme catalyse en particulier l'hydroxylation en position 5-*exo* du D-camphre, son substrat naturel, d'où sa dénomination CytP-450_{cam} [73] (fig 27).

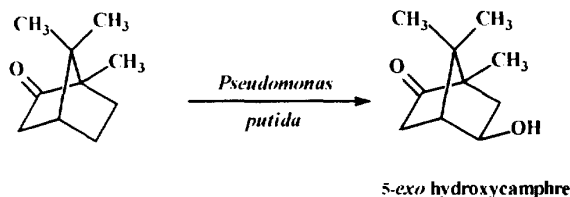


Fig 27

La plupart des systèmes à cytochrome P-450 décrits jusqu'à présent sont des systèmes impliquant une chaîne multi-enzymatique qui assure le transport des électrons à partir du NAD(P)H jusqu'au P-450 terminal. Le mécanisme par lequel le cytochrome P-450 agit est actuellement bien connu [70], et il a été démontré qu'il implique sept étapes successives [74].

Exemple d'époxydation par les cytochromes P-450 de microorganismes

L'époxydation de divers types d'oléfines par les cytochromes P-450 a été étudiée surtout dans le cas de cytochrome P-450 isolés de microsomes de foie de rat [75,76]. Toutefois, divers exemples d'époxydation réalisée par des cytochromes P-450 de microorganismes sont apparus également dans la littérature. Par exemple, Ruettlinger et Fulco [77] ont décrit l'époxydation d'acides gras insaturés tel que l'acide palmitoléique par un système à cytochrome P-450 de *Bacillus megaterium*. Leurs expériences montrent que l'époxydation et l'hydroxylation sont catalysées par la même monooxygénase NADPH dépendante. Un exemple assez récent [78] indique également que le cytochrome P-450_{cam} de *Pseudomonas putida* est capable de réaliser l'époxydation du *cis*-β-méthylstyrène de façon stéréosélective. L'époxyde ainsi obtenu présente un excès énantiomérique de 78% en isomère (1*S*,2*R*) (fig 28).

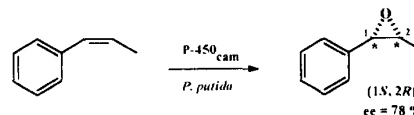


Fig 28

• Monooxygénases à fer non héminique

D'autres enzymes, qui ne sont pas des cytochromes P-450, sont également capables d'insérer un atome d'oxygène dans une liaison C-H ou de l'additionner sur une double liaison oléfinique. Ces enzymes sont essentiellement des monooxygénases non hémiques comme

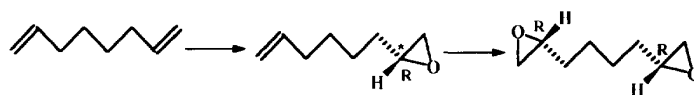


Fig 29

par exemple les ω -hydroxylases qui sont notamment impliquées dans l'oxydation des groupements CH_3 terminaux (carbone- ω) des alcanes et qui ont été détectées dans différents microorganismes [79], ou bien encore les méthane monooxygénases qui interviennent dans l'oxydation du méthane par les organismes méthanotrophes.

Les ω -hydroxylases

En 1973, May [80] et Abbott [81] ont établi de façon univoque que des époxydes étaient produits à partir d'oléfines terminales par la souche bactérienne *Pseudomonas oleovorans*. Ces auteurs ont montré que le octa-1,7-diène était transformé exclusivement en 7,8-époxyoct-1-ène par *Pseudomonas oleovorans*, ce produit pouvant à son tour subir une deuxième époxydation pour conduire au diépoxyde [82] (fig 29).

Il a été établi que la mono-époxydation était stéréosélective et conduisait au (*R*)-(+)-7-époxyde présentant un excès énantiomérique d'environ 80%. Le diépoxyde formé est essentiellement de configuration (*R,R*), ce qui montre que la configuration du monoépoxyde déjà formé influence la stéréochimie de la deuxième époxydation. En effet, lorsque des cellules de *Pseudomonas oleovorans* sont placées en présence d'un mélange racémique de 7,8-époxyoct-1-ène, le diépoxyde formé est composé de 59% de (2*R*,7*R*) et de 41% de (2*S*,7*S*), soit un excès diastéréoisomérique faible de 18%.

Le système enzymatique impliqué dans la réaction d'hydroxylation d'alcanes par *P. oleovorans* a été mis en évidence par Coon *et al* [83], qui ont isolé un système enzymatique capable de catalyser les ω -hydroxylations d'alcanes et d'acides gras. Les études réalisées dans ce domaine ont montré que ce même système enzymatique était responsable de la conversion d'oléfines terminales en 1,2-époxydes correspondants [84,85]. Ainsi, il époxyde les alcènes linéaires en C_6 jusqu'en C_{12} (pour des chaînes plus courtes, le produit d'hydroxylation est obtenu). L'utilisation du même système enzymatique pour l'hydroxylation et l'époxydation conduit à une compétition entre ces deux types de biotransformations qui dépend de chacun des substrats utilisés. L'hydroxylation est prédominante pour les substrats à courte chaîne tels que le but-1-ène ou le propène alors que, pour les substrats de longueur «moyenne», comme par exemple l'oct-1-ène, les deux réactions se produisent. Ainsi ce substrat est – soit époxydé en 1,2-époxyoctane – soit hydroxylé en oct-7-én-1-ol. Dans le cas du déc-1-ène, l'époxydation prédomine largement. En revanche, les alcènes cycliques et non terminaux ne sont ni hydroxylés, ni époxydés [86].

Tous ces résultats ont conduit récemment à une application intéressante en synthèse organique asymétrique. Ainsi *P. oleovorans* a été utilisé parmi d'autres microorganismes pour réaliser l'oxydation stéréospécifique d'aryllalyléthers en (+)arylglycidyl éthers. Ces intermédiaires sont ensuite transformés chimiquement

en (*S*)-(-)-3-aryloxy-1-alkylaminoprop-2-anols qui sont des composés utilisés comme β -bloquants. Cette méthode a, par exemple, été utilisée pour synthétiser le (*S*)-(-)-Metoprolol® et le (*S*)-(-)-Atenolol® qui sont ainsi obtenus avec des puretés énantiomériques de 95 à 98% [87]. Ces applications sont d'un grand intérêt puisqu'il a été démontré que le (*S*)-(-)-Metoprolol était 270-380 fois plus actif que son antipode [88] (fig 30).

Organisme <i>M</i>	Metoprolol p.o. (%)
<i>R. equi</i> NCIB 12035	95.4
<i>P. putida</i> NCIB 9571	98
<i>P. oleovorans</i> ATCC 29347	98.4
<i>P. aeruginosa</i> NCIB 8704	98.8

$\text{R} = \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$: Metoprolol $\text{R} = \text{NH}_2\text{COCH}_2$: Atenolol (<i>M</i> : <i>P. oleovorans</i> p.o. = 97%)
--

Fig 30

Les méthane monooxygénases (MMO)

Un autre exemple intéressant de monooxygénases est celui des méthane monooxygénases. En effet, ces enzymes sont capables de transformer le méthane en méthanol, une réaction extrêmement difficile à réaliser chimiquement.

Les MMO sont des enzymes isolées à partir d'un certain nombre de microorganismes méthanotrophes tels que *Methylosinus trichosporium*, *Methylococcus capsulatus* et *M. organophilum*. Elles incorporent l'oxygène dans une large variété de substrats hydrocarbonés, tels que les alcanes, les alcènes et les hydrocarbures alicycliques ou aromatiques [89-91]. Ces bactéries méthanotrophes, décrites par Hou *et al* [92], sont capables d'oxyder des alcènes linéaires gazeux (C_2 - C_4) en 1,2-époxydes qui s'accumulent extracellulairement. Ceux-ci s'avèrent être optiquement actifs dans certains cas. Les MMO de *Methylococcus capsulatus* et de *Methylosinus trichosporium* ont été purifiées et leurs propriétés enzymatiques étudiées. Cependant le mécanisme de cette réaction et la structure du site actif ne sont pas encore clairement déterminés. Les résultats d'études sur l'inhibition de ces enzymes ont indiqué que, comme dans le cas de l' ω -hydroxylation de *P. oleovorans* discuté précédemment, la même monooxygénase était responsable de l'hydroxylation du méthane et de l'époxydation d'oléfines.

Très récemment [93], Seki *et al* ont étudié l'époxydation de composés allyle halogénés (fluorure d'allyle, chlorure d'allyle et bromure d'allyle) par la bactérie *Methylosinus trichosporium* (OB3b). Ils ont observé que cette bactérie avait la particularité d'inverser sa stéréosélectivité en fonction de la structure des différents substrats étudiés. En effet, le propène et le fluorure d'allyle sont époxydés par une attaque sur la face *Re* de l'oléfine tandis que, pour le chlorure d'allyle, le bromure d'allyle, le but-1-ène et le buta-1,3-diène, la réaction a lieu sur la face *Si*. Cependant, les excès énantiomériques observés sont faibles (tableau V).

Tableau V.

Substrats	Produits	ee (%)	Conf (face d'attaque)	Réf
propène	époxypropane	14	R (<i>Re</i>)	[94]
fluorure d'allyle	1,2-époxy-3-fluoropropane	54	S (<i>Re</i>)	[93]
chlorure d'allyle	1,2-époxy-3-chloropropane	4	R (<i>Si</i>)	[93]
bromure d'allyle	1,2-époxy-3-bromopropane	10	R (<i>Si</i>)	[93]
but-1-ène	1,2-époxybutane	28	S (<i>Si</i>)	[94]
buta-1,3-diène	1,2-époxybut-3-ène	28	S (<i>Si</i>)	[94]

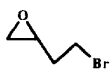
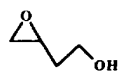

• Autres monooxygénases microbiennes

Dans le but de préparer des époxydes chiraux, De Bont *et al* [95,96] ont isolé, à partir de divers échantillons de sol, une quinzaine de bactéries capables d'utiliser pour leur croissance de l'éthylène, du propène, du but-1-ène ou du butane comme seule source de carbone. Grâce aux progrès réalisés par la CPG chirale, la stéréosélectivité d'un grand nombre de microorganismes a pu être étudiée en analysant directement la phase gazeuse surmontant le milieu de culture [97,98]. Ainsi, il a été observé que des bactéries du genre *Mycobacterium* sont capables de former de l'oxyde d'éthylène lorsqu'elles sont cultivées sur de l'éthylène. Une étude plus approfondie, réalisée avec cette bactérie [95] en présence d' $^{18}\text{O}_2$ a permis de montrer que l'atome d'oxygène de l'époxyéthane provenait de l'oxygène moléculaire (marquage isotopique) et que, d'autre part, la monooxygénase impliquée dans cette oxydation était différente de celle qui catalyse l'hydroxylation de l'éthane dans ce même microorganisme. Le système enzymatique de *Mycobacterium* comporte donc deux monooxygénases distinctes : une alcane et une alcène monooxygénases. Cette souche permet d'obtenir le (*R*)-1,2-époxypropane présentant un excès énantiomérique de 80%. Cependant, la production de 1,2-époxyalcènes est très lente. De plus une concentration forte en époxyde inhibe l'alcène monooxygénase [99]. L'immobilisation des cellules de différentes mycobactéries a permis d'augmenter le rendement de la réaction tout en conservant la stéréosélectivité [100].

Dans ce même contexte, Archelas *et al* [101] ont étudié la bioépoxydation du 4-bromobut-1-ène, du 1-hydroxybut-3-ène et du but-1-ène avec trois microorganismes isolés précédemment par de Bont *et al* [95].

Ces auteurs ont observé que la présence d'un atome de brome ou d'un groupement OH en position homoallylique provoque quelques variations sur la stéréosélectivité de l'époxydation mais que les époxydes de configuration absolue (*R*) étaient toujours préférentiellement formés. D'un point de vue synthétique, le (+)(*R*)-4-hydroxy-1,2-époxybutane (ee = 84%), obtenu avec la bactérie *Nocardia* IP1, est un précurseur possible du (-)-GABOB qui présente des propriétés antiépileptiques et hypotensives (tableau VI).

Tableau VI.

Souches			
	ee	ee	ee
L1	64	41	80
E3	87	58	68
IP1	80	84	98

Mamouhdian [102,103] a également testé différents types de bactéries utilisant de l'éthylène ou du propène. Il a montré que les réactions sont très stéréosélectives. Il obtient ainsi, avec 18 souches de bactéries du genre *Aerococcus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* et *Staphylococcus*, divers époxydes optiquement actifs. Par exemple, il obtient le (*R*)-1,2-époxypropane (ee = 90-96%), le (*R*)-1,2-époxybutane (ee = 90-98%) et le *trans*-(2*R*,3*R*)-époxybutane (ee = 64-88%). Alors que, dans les deux premiers cas, il y a formation stéréosélective de 1,2-époxydes de configuration (*R*), dans le cas du 2,3-époxyde, l'époxydation n'est pas énantiosélective (c'est-à-dire que l'époxydation a lieu sur chacune des deux faces énantiotopiques de l'oléfine). Les résultats montrent que l'époxyde formé initialement est racémique et qu'il y a ensuite hydrolyse énantiosélective de l'énantiomère (2*S*,3*S*), laissant en conséquence l'énantiomère (2*R*,3*R*) majoritaire.

D'autres souches, telles que *Xanthobacter* Py 10 ou Py 2 ont été testées. Dans ce cas, la vitesse d'époxydation est plus grande qu'avec *Mycobacterium* mais la spécificité de substrat est similaire. La souche *Xanthobacter* permet l'accumulation de 2,3-époxybutane à partir de *cis* ou de *trans*-but-2-ène mais les rendements obtenus restent faibles, et dépendent du milieu de culture utilisé et surtout de la source de carbone (alcènes) [104]. La souche *Rhodococcus rhodochrous*, permet également l'obtention de 1,2-époxyalcènes à partir d'oléfines terminales à courte chaîne. Dans ce cas, l'enzyme responsable de l'oxygénation apparaît, curieusement, comme étant résistante aux fortes concentrations de ce produit (époxyde) sans présenter d'inhibition apparente [105]. Les excès énantiomériques ne sont pas mentionnés dans les deux derniers exemples. De façon similaire, des cellules de *Nocardia corallina*, cultivées sur des alcènes à longue chaîne (C_{13} à C_{18}), ont été décrites [106] comme étant capables de réaliser l'époxydation d'oléfines à chaîne terminale de façon stéréosélective. Ainsi les époxydes de configuration (*R*) sont obtenus avec des excès énantiomériques de 76 à 90% selon la longueur de la chaîne. Ces époxydes peuvent être utilisés comme synthons dans la synthèse de chaînes ω des prostaglandines (fig 31).

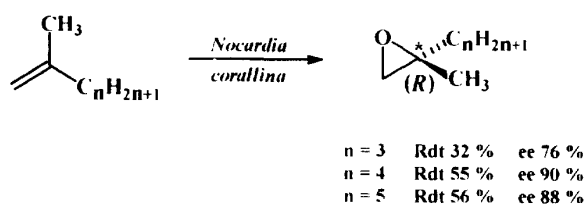


Fig 31

Les cellules de *Corynebacterium equi* IFO 3730 cultivées sur un milieu contenant de l'hexadéc-1-ène comme seule source de carbone réalisent également l'époxydation stéréosélective d'alcènes linéaires contenant plus de 14 atomes de carbone et possédant une double liaison terminale. Ainsi les (*R*)-(+)-1,2-époxyalcanes sont obtenus avec une pureté optique de 100% [107]. Les résultats décrits font ressortir le fait que les bactéries dont le substrat de croissance est un alcane (méthane, éthane, etc...) forment préférentiellement des époxydes racémiques. Par contre, dans le cas de bactéries dont la source de carbone est un alcène, la composition énantiomérique dépend à la fois du microorganisme et de l'oléfine étudiés, des excès énantiomériques de 99% pouvant être observés. Les époxydes formés présentent préférentiellement une configuration absolue (*R*). Cependant, une stéréosélectivité inverse a pu être observée dans le cas de la bactérie *Nitrosomas europaeae* [108]. Cette bactérie, qui possède une ammonium monooxygénase, conduit à la formation préférentielle de l'énantiomère (*S*) du 1,2-époxypropane et du 1,2-époxybutane, et à l'énantiomère (*R*) du 1-chloro-2,3-époxypropane à partir des oléfines correspondantes.

Les monooxygénases de champignons peuvent également donner lieu à des réactions d'oxygénation de doubles liaisons. Toutefois dans de nombreux cas, les champignons conduisent directement au diol provenant du catabolisme ultérieur (hydrolyse) de l'époxyde. Ainsi, Furstoss *et coll* ont montré qu'il est possible d'obtenir des diols présentant des excès énantiomériques d'environ 80-95% par oxydation stéréosélective du *N*-phénylcarbamate de citronellol [109] ou de géraniol [110]. Cette approche constitue un parallèle fort intéressant de la réaction de dihydroxylation de Sharpless citée précédemment [58]. Il a été montré en particulier que le mécanisme impliqué est un processus en deux étapes

- la première étape étant une époxydation stéréosélective de la double liaison (qui conduit à l'époxyde de configuration absolue (*S*), lequel est
- dans une deuxième étape, hydrolysé en diol.

L'étude détaillée de la régiosélectivité de cette hydrolyse a clairement démontré que la régiosélectivité de cette hydrolyse peut être contrôlée en jouant sur le pH du milieu réactionnel. Ainsi, à pH 2, l'hydrolyse acidocatalysée de cet époxyde conduit à un diol de configuration absolue 6(*S*) alors que, à pH 6, cette hydrolyse est réalisée par voie enzymatique et conduit au diol de configuration absolue opposée 6(*R*). Ceci signifie donc que, en jouant simplement sur le pH de cette bioconversion, il est possible d'obtenir, à volonté, soit l'un soit l'autre de ces énantiomères (fig 32).

Il est intéressant de souligner que ces réactions ont été conduites sur plusieurs grammes de substrat, ce qui

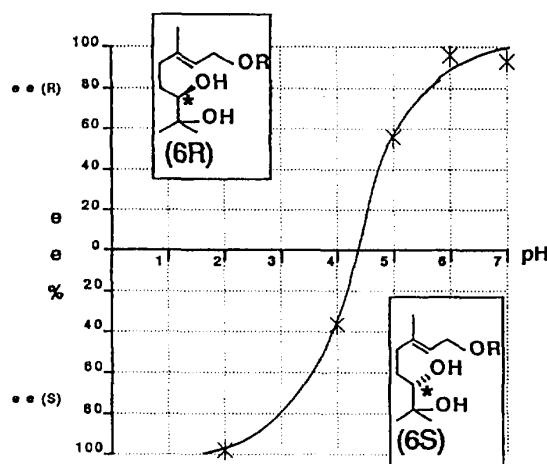


Fig 32

permet donc l'usage ultérieur de ces produits optiquement purs en synthèse organique.

Dans certains cas, il est possible de s'arrêter à la première étape de cette oxydation. Ainsi, Furstoss *et coll* [111] ont montré que, en présence du champignon *A. niger*, le phénylcarbamate de sulcatol conduit à l'époxyde correspondant, qui a été utilisé comme un précurseur chiral dans la synthèse d'une phéromone : le pityol.

D'autres champignons filamenteux ont aussi été étudiés dans le contexte des époxydations stéréosélectives. Ainsi, Cerniglia *et al* [112] ont décrit l'oxydation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons *Cunninghamella elegans* et *Syncephalastrum racemosum*. Les substrats étudiés sont du type biphenyle, dibenzofurane, naphthalène, anthracène, phénanthrène et dérivés. Les champignons produisent alors les *trans*-dihydrodiols. Les enzymes impliquées dans ces oxydations sont, là encore, des monooxygénases de type cytochrome P-450 NADPH-dépendantes, qui présentent une stéréosélectivité et une régiosélectivité différente par rapport aux monooxygénases de mammifères [113].

Dans ce même contexte une époxydation intéressante qui semble être l'objet d'une application industrielle, a été décrite par White *et al* [114]. Ces auteurs rapportent en effet la transformation, par une série de souches de *Penicillium*, de l'acide *cis*-propénylphosphonique en acide *cis*-(-)-1,2-époxypropylphosphonique (fosfomycine, antibiotique à large spectre) [115] (fig 33).

• Epoxydation par les chloroperoxydases

La chloroperoxydase de *Caldariomyces fumago* est capable de transformer des alcènes en époxydes en l'absence d'ions halogénure. Par exemple en présence de *t*-BuOOH des dérivés du styrène sont époxydés par cette enzyme en époxydes de configuration (*R*) présentant des excès énantiomériques de 28 à 68% [116]. Récemment Hager et Jacobsen [117] ont obtenu des époxydes chiraux avec de bons excès énantiomériques (66 à 96%) à partir d'alcènes disubstitués par action d'une chloroperoxydase (en présence de H₂O₂) sur l'oléfine correspondante. Ils ont cependant observé,

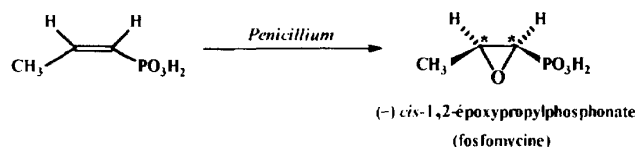


Fig 33

comme dans le cas des protéines héminiques ou de leurs modèles synthétiques, que les oléfines *cis* étaient oxydées stéréospécifiquement alors que leurs analogues *trans* n'étaient pas de bons substrats. Toutefois, l'utilisation de ces enzymes est limitée en raison de leur sensibilité à l'eau oxygénée (tableau VII).

Tableau VII.

Substrats	ce époxydes (%)	Conf. abs. (époxyde)	Rdt en époxyde (%)
	96	2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>	78
	92	2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>	82
	96	1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>	67
	97	1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>	85

Certains microorganismes, qui se développent sur des substrats du type alcanes ou alcènes, permettent d'obtenir des 1,2- ou 2,3-époxydes avec de bons excès énantiomériques par époxydation directe de l'oléfine correspondante. Cependant, les rendements observés sont moyens et plusieurs problèmes non négligeables limitent largement l'utilisation possible de ces méthodologies. Tout d'abord, l'implication de cofacteurs dans le fonctionnement des systèmes enzymatiques mis en jeu ne permet que l'utilisation de cellules entières pour ce type de réaction (afin d'éviter les problèmes de régénération des cofacteurs). D'autre part, les époxydes étant des intermédiaires réactifs, cela conduit à un phénomène d'inhibition du système enzymatique par le produit. Il en résulte que seules de faibles concentrations en époxyde peuvent être accumulées dans le milieu aqueux environnant. C'est pourquoi, afin d'essayer de minimiser ces problèmes, de nombreuses études utilisant des solvants organiques (milieu biphasique) ont été réalisées que ce soit dans le but d'obtenir des époxydes « courts » [118] ou pour la production d'époxydes à partir d'alcènes à longue chaîne [119].

Dédoublément enzymatique d'époxydes

L'utilisation d'enzymes qui transforment sélectivement les énantiomères d'un mélange racémique constitue une autre méthode biologique directe permettant d'obtenir des époxydes optiquement actifs. Une telle méthode implique la transformation (ou la dégradation) complète de l'un des antipodes alors que l'autre n'est pas affecté. Il s'agit alors du dédoublément enzymatique d'un mélange racémique. Nous allons, dans ce chapitre nous intéresser aux enzymes provenant de divers organismes vivants impliqués dans ce type de réactions.

Dédoublément par les lipases

Les réactions catalysées par les lipases sont relativement familières au chimiste organicien car il n'est pas nécessaire d'utiliser un microorganisme entier. Le biocatalyseur est disponible dans le commerce et l'isolement des produits de réaction se fait par des techniques courantes de laboratoire. Les lipases ont été utilisées pour le dédoublément d'esters de glycidols (époxy-alcools) racémiques tels que l'ester *trans*-phénylglycidate de méthyle utilisé comme synthon dans la synthèse de la chaîne latérale du Taxol [120] (anticancéreux). Ce dédoublément a été réalisé à l'échelle de plusieurs dizaines de grammes avec un recyclage de l'époxyde (2*R*,3*S*)-*trans*-phénylglycidate de méthyle résiduel afin d'atteindre un excès énantiomérique de 95% (fig 34).

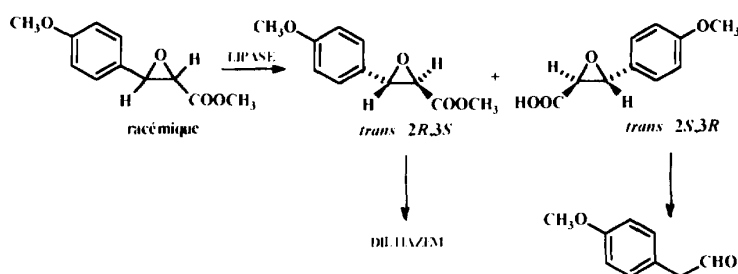
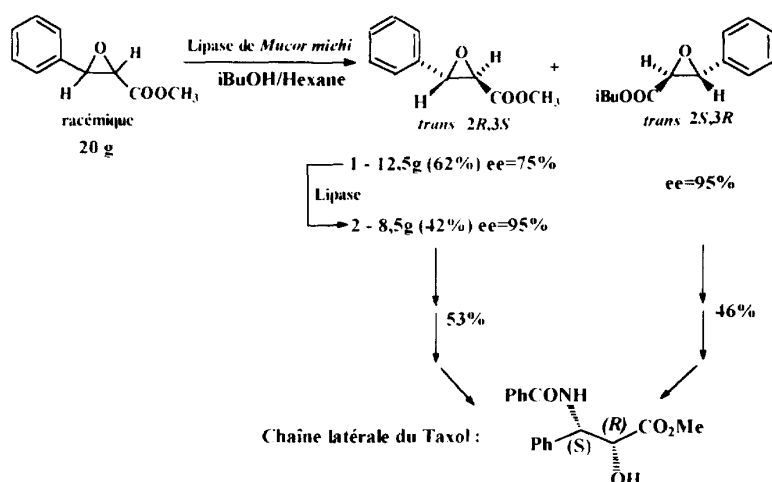
Un autre exemple intéressant impliquant le dédoublément par les lipases est celui permettant l'obtention de l'acide (2*R*,3*S*) *trans*-4-(méthoxyphényl)glycidique, synthon chiral utilisé dans la synthèse du (2*S*,3*S*) Diltiazem® [121]. Cette molécule présente une activité d'antagoniste calcique et constitue l'un des produits importants de l'industrie pharmaceutique au niveau mondial. Il est produit, selon cette méthodologie, par diverses sociétés telles Tanabé Sayacou au Japon, DSM Andéno en Hollande et Synthelabo en France.

Le dédoublément est réalisé avec la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) ou par action de la lipase pancréatique de porc (PPL), et conduit à l'énantiomère (2*R*,3*S*) avec de très bons excès énantiomériques (96-99%) et des rendements de 35-40%. Le système a été amélioré en utilisant la transestérification plutôt que l'hydrolyse afin d'éviter la décomposition de l'acide en aldéhyde. Cependant les excès énantiomériques obtenus sont plus faibles dans ce cas (fig 35).

Métabolisme et détoxification des époxydes

• Généralités

Les époxydes sont formés, dans la cellule, par biotransformation de composés contenant une insaturation. Nous avons signalé dans le chapitre précédent que le système à cytochrome P-450 était la voie la plus fréquente dans les microsomes. Ces métabolites oxydés ainsi formés présentent une grande toxicité car, de part leur réactivité chimique, ils peuvent être attaqués par divers nucléophiles et donc se lier d'une manière covalente à diverses molécules biologiques, en particulier à des macromolécules nécessaires pour le bon fonctionnement de la cellule, telles que l'ARN ou l'ADN. L'observation directe des époxydes intermédiaires est souvent impossible. En effet, grâce aux processus de détoxification existant dans les cellules, ces époxydes sont rapidement métabolisés par voie enzymatique en produits moins réactifs et donc moins toxiques. Les



enzymes impliquées dans le métabolisme des époxydes ont été très étudiées et il est apparu qu'elles pouvaient être métabolisées selon deux voies, à savoir soit par action d'époxyde hydrolases, soit par action de glutathione *S*-transférases [122-124]. L'abondance et la localisation cellulaire de ces enzymes, la concentration en substrat, le type d'époxyde et le taux de glutathione déterminent la contribution relative de ces deux réactions. Les diols vicinaux formés lors de l'action des époxyde hydrolases sont généralement, dans un deuxième temps, transformés en produits hydrosolubles, ce qui permet leur élimination [125] (fig 36).

D'autres réactions métaboliques ont également été décrites comme intervenant dans la dégradation des époxydes par les microorganismes. Ainsi, des études réalisées avec la bactérie *Mycobacterium E20* poussant sur de l'éthylène, ont montré que l'époxyéthane formé était converti directement en AcylCoA en présence de NAD⁺, de CoA et d'un cofacteur inconnu [126]. Hisatsuka et Shirai ont trouvé que la dégradation de l'oxyde de styrène par *Pseudomonas* 305 STR en 2-phényléthanol était catalysée par une styrène oxyde réductase [127].

• Dégradations énantiosélectives

Chacune des voies de dégradation d'époxydes décrite ci-dessus peut conduire à des époxydes optiquement actifs si cette dégradation s'applique à un époxyde racémique. En effet, dans la mesure où une enzyme est par

nature un catalyseur asymétrique, il est vraisemblable que la vitesse de dégradation sera différente pour chacun des deux énantiomères. Dans ce cas, l'autre énantiomère n'est que peu (ou pas) transformé et peut être récupéré sous sa forme optiquement active. Bien qu'une telle méthodologie ne puisse conduire en principe qu'à un rendement maximum de 50%, elle reste cependant très intéressante car les époxydes racémiques sont peu coûteux et s'avèrent être facilement accessibles par différentes méthodes chimiques (fig 37).

Il a été montré que la bactérie *Xanthobacter* Py2, qui pousse sur propène, réalise le dédoublement enzymatique de mélanges racémiques de 2,3-époxyalcanes [128]. Seules les formes (2*S*) sont métabolisées par la bactérie, résultant en l'accumulation des formes (2*R*)-2,3-époxyalcanes. Par exemple, dans le cas des *cis* et *trans* 2,3-époxy-pentanes, les isomères résiduels après dédoublement par *Xanthobacter* Py2 sont les formes (2*R*) (fig 38).

Les 1,2-époxyalcanes sont également dégradés par cette bactérie mais elle n'est pas capable dans ce cas de différencier les deux énantiomères. Dans ce même contexte, plusieurs autres bactéries ont été étudiées dans le but de réaliser le dédoublement des 1,2-époxyalcanes. Parmi tous les microorganismes testés, isolés par culture sur alcènes à courte chaîne, très peu de cas se sont révélés énantiosélectifs [129]. Le meilleur résultat pour la dégradation énantiosélective de 1,2-époxyalcanes a été obtenu avec la souche *Nocardia* H8 qui

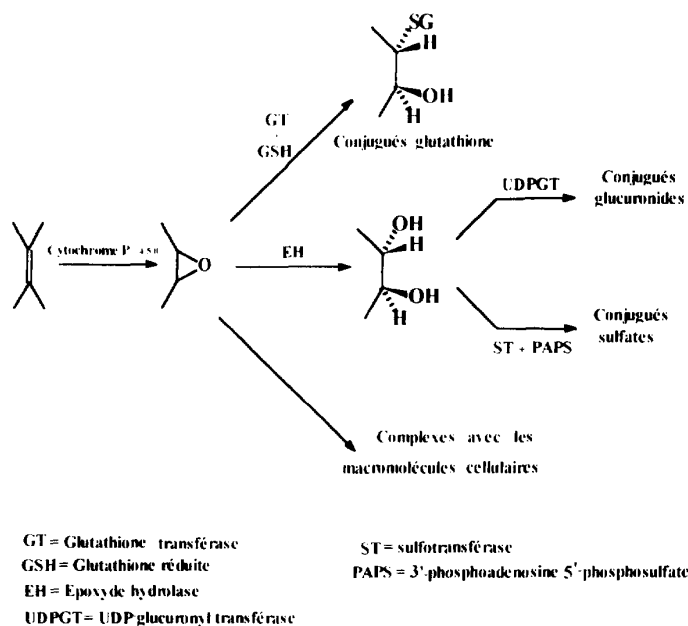


Fig 36

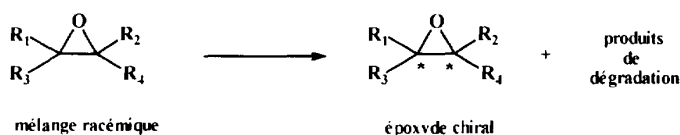


Fig 37

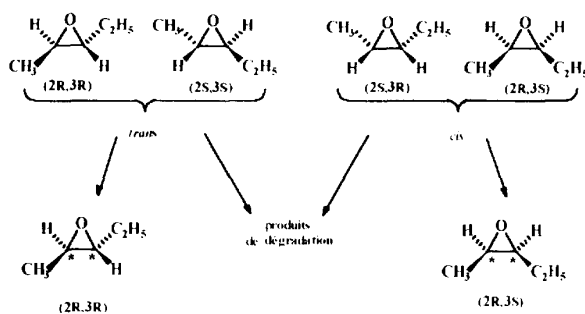


Fig 38

Tableau VIII.

Substrats	Conf abs	ee (%)	Rdt (%)
1,2-époxypropane	<i>S</i>	> 98	13
1,2-époxybutane	<i>S</i>	> 98	10
1,2-époxyhexane	<i>S</i>	> 98	2
épichlorhydrine	<i>R</i>	> 98	19
<i>trans</i> -2,3-époxybutane	<i>R, R</i>	> 98	49

l'action d'une glutathione transférase de foie de rat. L'énantiomère (1*R*,2*S*) est alors récupéré optiquement actif dans le milieu réactionnel.

dégrade à des vitesses différentes les formes (*R*) et (*S*) des 1,2-époxyalcanes mais également des 2,3-époxyalcanes. Ainsi, à un certain taux de conversion, il est possible d'accumuler dans le milieu les formes *S* des époxydes optiquement purs. Les rendements sont cependant faibles (tableau VIII).

• Action d'une glutathione transférase

La conjugaison d'époxydes avec la glutathione par action d'une glutathione *S*-transférase s'est avérée régiospécifique sur le carbone benzylique et énantiosélective dans certains cas. Ainsi, par exemple, Watabe *et al* [124] ont montré que l'énantiomère (1*S*,2*R*) de l'oxyde de 1,2-dihydronaphtalène se conjugue avec la glutathione plus rapidement que son antipode sous

• Hydrolyses énantiosélectives

Un autre type bien défini d'enzymes de dégradation énantiosélectives sont les Epoxyde Hydrolases (EH) [EC 3.3.2.X]. Les EH catalysent la formation de dihydrodiols par addition d'une molécule d'eau sur la fonction époxyde. En particulier, ces enzymes sont capables d'hydrolyser à des vitesses différentes les énantiomères de certains époxydes pour les transformer en diols. On rencontre les EH dans divers organes et chez beaucoup d'espèces animales [130] comme les poissons, les amphibiens, les oiseaux, les mammifères et notamment chez l'homme [131,132]. De même elles sont présentes dans les microorganismes [133] et chez les végétaux [134] (fig 39).

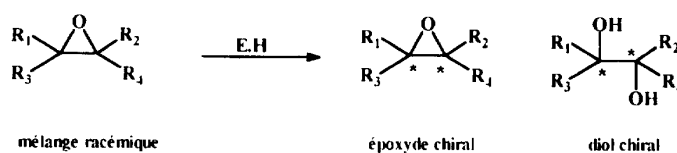


Fig 39

Etant donné le potentiel très intéressant de ces enzymes d'origines diverses, nous allons détailler ci-dessous les principaux résultats actuellement décrits dans la littérature.

Les époxyde hydrolases de mammifères

Trois types d'EH d'origine animale ont été identifiés à savoir les EH microsomales (EHm), les EH cytosoliques (EHc), et les hydrolases des leukotriènes A4. De nombreux articles de la littérature décrivent de façon détaillée les propriétés de ces diverses EH [135]. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux principales caractéristiques des EH microsomales et cytosoliques.

• Spécificité de substrat

Les EH agissent sur une grande variété de substrats, mais présentent des limitations selon leurs origines. De manière générale, les chaînes lipophiles alkyle ou aryle à proximité du cycle oxirane augmentent la vitesse de réaction, alors que les composés porteurs de groupes polaires tels que des fonctions hydroxyle, sont de mauvais substrats. Les EHm hydrolysent les époxydes mono- et *cis*-1,2-disubstitués [136,137]. Ainsi l'oxyde de styrène ou encore l'1,2-époxyoctane sont de bons substrats pour l'EHm. En revanche, les oxiranes *trans*-di-, tri- et tétrasubstitués sont généralement inactifs comme substrats ou inhibiteurs.

Les EHc hydrolysent les substrats cités pour les EHm mais de plus, les époxydes *trans*-1,2-di-, tri- et tétrasubstitués sont également de bons substrats. Par exemple, des études ont montré [138] que l'EHc purifiée de foie de souris était considérablement plus active avec le *trans*-oxyde de stilbène par rapport à l'isomère *cis*. Les valeurs rassemblées dans le tableau IX montrent que l'oxyde de *trans*- β -propylstyrène est le meilleur substrat parmi ceux testés.

Tableau IX. Spécificité de substrat de l'EHc isolée de foie de souris

Substrats	Concentrations	Activité spécifique (nmol/min × mg protéine)
oxyde de <i>trans</i> - β -propylstyrène	0,5 mM	15 600
oxyde de <i>trans</i> - β -éthylstyrène	0,5 mM	3 540
oxyde de <i>trans</i> -stilbène	50 μ m	939
oxyde de styrène	1,6 mM	475
oxyde de <i>cis</i> -stilbène	50 μ m	136

Ainsi, les mammifères possèdent deux systèmes enzymatiques (EHm et EHc) capables d'hydrolyser une grande variété d'époxydes.

• Régiosélectivité

Les EH catalysent l'hydrolyse d'époxydes en *trans*-dihydrodiols par addition d'une molécule d'eau. La réaction est régiosélective et l'eau est additionnée préférentiellement sur l'atome de carbone le moins encombré de l'époxyde. En utilisant de l'eau marquée à l'oxygène 18 ($H_2^{18}O$), Jerina *et al* ont montré que le diol obtenu par hydrolyse enzymatique de l'oxyde de styrène par l'EHm contenait 90% d' ^{18}O sur l'atome de carbone le moins encombré [139]. Hanzlik a ensuite confirmé cette régiosélectivité de l'EHm en étudiant une série de substrats époxydés dont l'oxygène du cycle oxirane était de l' ^{18}O [140]. En ce qui concerne les EHc, il semblerait que d'une manière générale on observe une régiosélectivité préférentielle d'attaque sur le carbone le moins substitué de l'oxirane [141]. Cependant, récemment, une étude comparative de la biohydrolyse de l'oxyde de styrène par des EHm et EHc, provenant de foie de lapin, a mis en évidence une absence totale de régiosélectivité dans le cas de l'EHc [142] (fig 40).

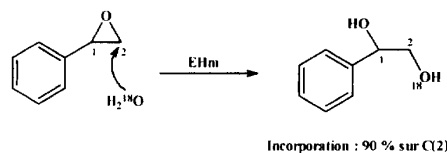


Fig 40

• Mécanisme

Les EH sont des enzymes qui ne nécessitent pas de cofacteurs pour leur fonctionnement, contrairement aux méthane oxydases, ce qui les rend très intéressantes du point de vue de leur mise en œuvre technologique. En effet, cet avantage permet d'envisager une utilisation aisée de ces biocatalyseurs par le chimiste organicien. Les EH catalysent une *trans*-addition d'eau sur le cycle oxirane avec inversion de configuration sur l'atome de carbone attaqué. Aucun cas de *cis*-addition n'a été décrit dans cette réaction catalysée par les EH d'origine animale. La question qui se pose est de savoir comment l'enzyme fixe et active l'eau dans le site actif, et comment elle parvient à déstabiliser le cycle oxirane pour favoriser l'attaque hydrolytique. Plusieurs mécanismes ont été successivement proposés [140,143-146] mais ce n'est que très récemment que Lacourcière et Armstrong [147] ont mis en évidence l'intervention d'un intermédiaire enzyme-substrat covalent. Le mécanisme proposé se décompose en deux étapes :

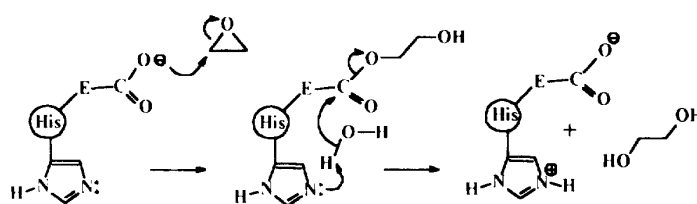


Fig 41

– dans un premier temps, une attaque de type S_N2 d'un carboxylate présent dans le site actif pour donner un ester intermédiaire

– une attaque subséquente de cet ester par une molécule d'eau (fig 41).

Bien que les EHM et les EHc possèdent des caractéristiques stéréochimiques similaires (addition nucléophile d'eau en *trans* par attaque sur le carbone le moins substitué conduisant aux diols *trans*), ces deux types d'enzymes semblent présenter des différences en ce qui concerne leur mécanisme intime. Les études concernant le mécanisme des EHc ont été peu développées mais il semblerait, qu'un résidu cystéine soit essentiel pour leur activité enzymatique et serve d'assistance basique (sous sa forme thiolate) dans le mécanisme de catalyse basique généralisée [148]. Une possibilité d'assistance complémentaire par catalyse acide au niveau de l'oxirane a également été évoquée.

• Enantiosélectivité

Origine de l'énantiosélectivité

De part leur spécificité et leur structure asymétrique, les enzymes sont capables de différencier les deux énantiomères d'un mélange racémique. Ces deux énantiomères sont alors considérés comme étant des inhibiteurs l'un par rapport à l'autre pour l'accès au site actif. L'équation de vitesse pour une réaction enzymatique impliquant un seul substrat, définie par Michaëlis-Menten, s'applique pour chacun des deux énantiomères et est donnée par la formule suivante :

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

dans laquelle V_{\max} représente la vitesse maximale, K_m la constante de Michaëlis-Menten, et $[S]$ la concentration en substrat. De manière surprenante, à partir d'un même mélange racémique dont l'énantiomère (*S*) est hydrolysé rapidement ($V_{\max} (S) > V_{\max} (R)$) on peut obtenir :

– soit un époxyde résiduel de configuration (*R*): dans ce cas l'énantiomère (*S*) (hydrolysé rapidement) possède un K_m inférieur ou équivalent à celui de son antipode,

– soit un époxyde résiduel de configuration (*R*): dans ce cas l'énantiomère (*S*) (hydrolysé rapidement) possède un K_m supérieur à celui de son antipode : on observe alors un phénomène d'inhibition de l'antipode (*R*) sur (*S*). Cela se traduit par un profil de cinétique biphasique au cours de l'hydrolyse du mélange racémique. Plusieurs cas d'inhibition ont été décrits dans la littérature [149-151].

Etant donnée la diversité des résultats décrits concernant les réactions d'hydrolyse d'époxydes par les EH de mammifères, nous avons choisi de les présenter en fonction du type de substrat étudié. Ainsi, nous allons considérer successivement :

- les époxydes monosubstitués
- les époxydes disubstitués
- les époxydes trisubstitués.

Epoxydes monosubstitués

Les époxydes aromatiques ont été les premiers étudiés étant donné la possibilité de mise en œuvre de techniques d'analyse suffisamment sensibles (UV-HPLC) avec ces composés. L'oxyde de styrène est l'un des substrats le plus fréquemment utilisé pour l'étude de l'activité EH. Les premières études réalisées sur ce substrat sous forme racémique [137] n'ont fait apparaître aucune différence significative lors de l'hydrolyse de ses énantiomères (*R*) ou (*S*) par les microsomes de foie de rat. Plus récemment Watabe *et al* [149] ont montré qu'il existait cependant une différence d'affinité entre les deux énantiomères par rapport à l'EH de foie de rat. Le phénomène d'inhibition qui en résulte permet alors, à partir d'un mélange racémique, d'obtenir de l'oxyde de styrène de configuration (*S*) optiquement enrichi au cours de la réaction.

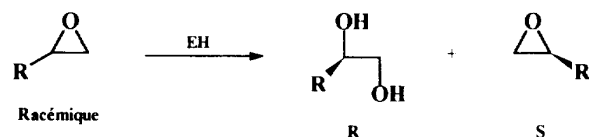
Bellucci *et al* [152] ont étudié l'hydrolyse de l'oxyde de styrène et de différents dérivés substitués en présence d'EH de foie de lapin. Ainsi, le (*S*)-oxyde de styrène est obtenu avec un excès énantiomérique supérieur à 98% pour un taux de conversion de 75%. En revanche, l'énantiosélectivité n'est plus observée lorsque l'oxyde de styrène est substitué en position *para* par un groupement méthyle ou un atome de chlore (tableau X).

Tableau X.

	Conversion (%)	ee époxyde (%)	ee diol (%)
R = H	30	30	76
	58	76	45
	75	> 98	26
R = <i>p</i> CH ₃ , <i>p</i> Cl	50	< 4	< 4

En ce qui concerne les époxydes aliphatiques monosubstitués, l'énantiosélectivité dépend du type de subs-

Tableau XI.

						
R	Conversion (%)	EHm ee diol (%)	Sélectivité (E)	Conversion (%)	EHc ee diol (%)	Sélectivité (E)
$n\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$	16	14	1	13	0	—
$n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{-}$	14	16	1,5	12	24	2
$(\text{CH}_3)_3\text{C-CH}_2\text{-}$	28	72	8	13	46	3
$(\text{CH}_3)_3\text{C-}$	38	92	42	45	100	>100

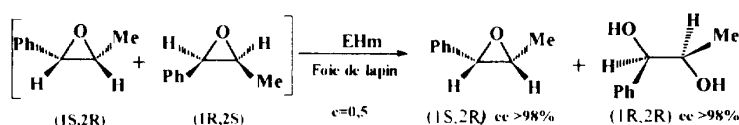
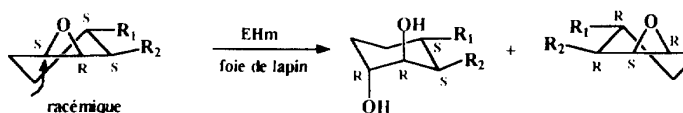


Fig 42

Tableau XII.

				
R ₁	R ₂	Conversion (%)	ee diol (%)	Sélectivité (E)
$t\text{-Bu (trans)}$	H	47	88	37
H	$t\text{-Bu (cis)}$	50	96	

titution. Les époxydes à chaîne linéaire conduisent aux diols avec une très faible énantiosélectivité [153]. Par contre, pour les époxydes à chaîne ramifiée, Bellucci *et al* [154] ont observé une attaque préférentielle de l'énantiomère de configuration (*R*) par l'EH de foie de lapin. Ceci permet d'isoler les (*R*)-1,2-diols avec de bons excès énantiomériques et d'obtenir des époxydes résiduels de configuration (*S*) optiquement purs. L'allure biphasique observée lors de l'étude cinétique de l'hydrolyse des époxydes racémiques laisse supposer l'intervention d'un mécanisme avec inhibition. Une étude comparative destinée à évaluer les spécificités de EHm et EHc a été réalisée en utilisant la même série de substrats [141]. Les résultats obtenus montrent que l'EHc présente une régio- et une énantiosélectivité similaires à celles de l'EHm (tableau XI).

Epoxydes disubstitués

Bellucci *et al* ont étudié et comparé l'hydrolyse de l'oxyde de styrène avec celle des oxydes de phénylpropène *cis* et *trans* en présence d'EH de microsomes de foie de lapin [151]. Ils ont observé une énantiosélectivité similaire à celle obtenue dans le cas de l'EH de foie de rat. Ainsi le *trans*-phénylpropène conduit à une réaction très peu énantiosélective. En revanche, l'isomère

cis (1*S*,2*R*) est obtenu avec un excès énantiomérique de 98% (fig 42).

Divers époxydes 1,2-disubstitués ont été étudiés par Bellucci *et al* [155-158]. Ainsi, ces auteurs ont montré que ces époxydes sont de bons substrats à condition qu'ils présentent une configuration *cis*. Dans la plupart des cas, on observe alors une attaque préférentielle sur l'atome de carbone (*S*) pour former les diols (*R,R*). Ceci est vrai par exemple lorsque le cycle oxirane se trouve sur un cycle hexanique ou encore dans le cas du 3,4-époxytétrahydropyrane [159] et ses dérivés (tableau XII).

Dans le même contexte, Wistuba et Schurig ont étudié le dédoublement du *cis*-2-éthyl-3-méthylloxirane racémique par l'EHm de foie de rat [160]. Cela conduit au (*R,R*)-*thréo*-pentane-2,3-diol et à l'époxyde résiduel de configuration (2*S*,3*R*) avec d'excellentes puretés optiques. La réaction se produit avec une régio- et une énantiosélectivité totale sur l'atome de carbone le moins encombré C-3 avec une préférence pour l'énantiomère (3*S*). Le diol (*R,R*) est alors formé par inversion de configuration sur C-3. L'isomère *trans* est hydrolysé beaucoup plus lentement et avec une énantiosélectivité faible en faveur de l'époxyde (2*R*,3*R*); cet isomère est,



Fig 43

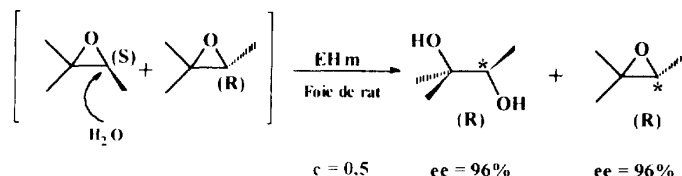


Fig 44

comme nous l'avons vu précédemment, un mauvais substrat (fig 43).

Ces auteurs ont aussi étudié des substrats tels que le *cis* et le *trans*-2-méthyl-3-(1-méthylpropyl)oxirane et également le *cis*-2-éthyl-3-propyloxirane [161]. Ils ont observé que les *cis* et *trans*-2-méthyl-3-(1-méthylpropyl)oxirane présentent une forte énantio- et régiosélectivité similaires à celles observées dans le cas du *cis*-2-éthyl-3-méthoxyloxirane. La configuration absolue de la chaîne alkyle n'a pas d'influence sur la réaction d'hydrolyse. Par contre, le *cis*-2-éthyl-3-propyloxirane présente un comportement différent des autres substrats *cis* disubstitués. Dans ce cas, une très nette diminution de l'énantio- et de la régiosélectivité est observée. Ce résultat a été expliqué par une mauvaise interaction entre le site actif de l'E_Hm et le substrat.

Époxydes trialkylsubstitués

Les époxydes trialkylsubstitués ont été décrits comme mauvais substrats pour l'E_Hm [136]. Cependant plusieurs cas particuliers, décrits récemment, semblent infirmer cette observation. Par exemple, au cours d'une étude comparative entre l'E_Hm et l'E_Hc, Bellucci *et al* ont montré que l'oxyde de 1-méthylcyclohexène était hydrolysé plus rapidement (5 fois) par l'E_Hm que par l'E_Hc de foie de lapin [162]. De plus, dans le cas de l'E_Hm la réaction est énantiosélective. De même, Wistuba et Schurig ont également observé que l'hydrolyse du triméthylloxirane par l'E_Hm se produisait avec une grande énantiosélectivité (hydrolyse préférentielle de l'énantiomère (S)) [161]. La régiosélectivité de la réaction est totale sur l'atome de carbone le moins substitué de l'oxirane et se fait avec inversion de configuration (fig 44).

• Cas particuliers : époxydes méso

Bien que l'on ne puisse obtenir des époxydes optiquement actifs à partir de composés *méso*, ces derniers sont des substrats intéressants pour les EH. Ces enzymes sont effectivement capables de reconnaître les deux carbones énantiotopiques d'un composé *méso* et d'en attaquer préférentiellement un seul pour conduire au diol optiquement enrichi. Ainsi, l'époxyde cyclohexane, composé *méso*, est hydrolysé par l'E_Hm de foie de lapin pour conduire au *trans*-cyclohexane-1,2-diol présentant

un excès énantiomérique de 70% en énantiomère (R,R) [139] (fig 45).

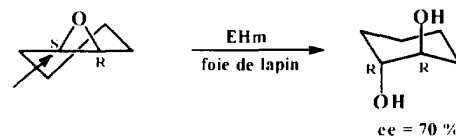


Fig 45

En 1989, Bellucci *et al*, ont étudié la sélectivité de l'hydrolyse d'époxydes *méso* par l'E_Hm et l'E_Hc de foie de rat [163]. Ils ont utilisé comme substrat les 1,2-époxy-cycloalcanes (C₅-C₈) et l'oxyde de *cis*-stylobène. Ces composés sont hydrolysés régiosélectivement en *trans*-diol de configuration (R,R). Comparée à l'E_Hm, l'E_Hc présente une plus faible régiospécificité (tableau XIII).

Tableau XIII.

n	Puretés optiques des diols (%)	
	EH microsomale	EH cytosolique
1	90	60
2	76	20
3	40	30
4	70	Pas de réaction
<i>cis</i> -oxyde de stilbène	88	70

L'ensemble de ces travaux fait apparaître l'intérêt des systèmes enzymatiques tels que les EH de mammifères en tant que catalyseurs biologiques énantiosélectifs. En effet, ces enzymes sont capables d'hydrolyser de nombreux époxydes de façon énantiosélective et de conduire à des diols optiquement purs. Toutefois, bien que les époxyde hydrolases de mammifères aient été très étudiées en raison de leur intervention dans le métabolisme des époxydes, leur utilisation à une échelle préparative reste encore peu envisageable pour une simple raison de disponibilité.

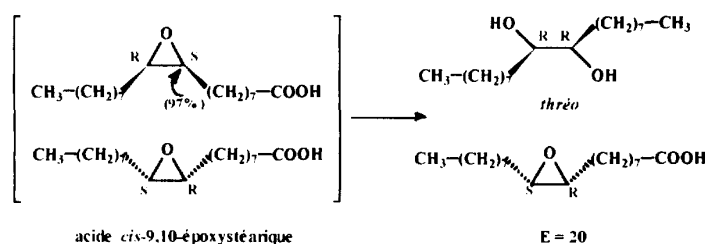


Fig 46

Certaines de ces EH ont été purifiées, isolées, séquencées, et des travaux de clonage ont été réalisés [164]. Il semblerait cependant que le clonage conduise à une perte non négligeable de l'activité enzymatique. Des travaux très récents de Hammock ont montré que l'infection de cellules d'insectes par un baculovirus cloné permet la surexpression d'une EH active [165]. Ce type d'approche est très intéressant car il pourrait conduire à l'obtention de plus grandes quantités d'enzyme et par conséquent, à l'obtention d'époxydes chiraux à plus grande échelle.

Les époxyde hydrolases de végétaux

Peu d'études concernant les EH de végétaux ont été décrites dans la littérature. Des activités époxyde hydrolases ont été mises en évidence dans les pommes [166], les graines de soja [167], les fèves [168], et les feuilles de pommes de terre [169]. Récemment, Blée *et al* ont montré que des graines de soja possèdent une EH capable de réaliser l'hydrolyse énantiosélective de l'acide *cis*-9,10-époxyatéarique, l'énantiomère (9*S*,10*R*) étant hydrolysé préférentiellement [167]. Un coefficient d'énantiosélectivité (*E*) de l'ordre de 20 a été déterminé à partir des paramètres cinétiques de chacun des énantiomères. Une étude à l'eau marquée ($H_2^{18}O$) a montré que la régiosélectivité au cours de cette biohydrolyse est totale mais différente pour chacun des deux énantiomères. L'hydrolyse a lieu systématiquement pour chacun des antipodes sur l'atome de configuration absolue (*S*) avec inversion de configuration. L'hydrolyse des deux énantiomères conduit donc au même diol (9*R*,10*R*) qui présente une stéréochimie *thréo*. Cette EH cytosolique a été purifiée et caractérisée [170] (fig 46).

Les époxyde hydrolases de microorganismes

Si la littérature est très riche en articles sur les EH de mammifères, il n'en est pas de même en ce qui concerne les EH de microorganismes [171]. Jusqu'à présent, peu de travaux rapportent la présence de ces enzymes dans les bactéries, ce qui a laissé supposer que, sauf cas particulier, ces organismes ne disposent pas de ce type d'enzymes. Ceci explique le fait que, comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries sont souvent capables d'accumuler les époxydes dans le milieu de culture. Les informations sur les EH de champignons sont encore plus restreintes. Cependant, quelques résultats intéressants relatifs aux EH de microorganismes ont été décrits.

• Les EH de bactéries

Plusieurs auteurs ont étudié l'activité EH dans différentes bactéries. Dès 1967, Niehaus *et al* [172] ont montré qu'un extrait soluble de *Pseudomonas* était capable de catalyser l'hydrolyse des acides *cis*- ou *trans*-9,10-époxyatéariques conduisant aux acides *thréo* et *érythro*-9,10-dihydroxystéariques. Ces réactions se sont avérées stéréospécifiques. Dans chacun des cas, *cis* ou *trans*, seul un énantiomère est transformé par l'enzyme et un seul isomère du diol est formé. Des études réalisées dans de l'eau marquée à ^{18}O ont montré que l'atome d'oxygène était incorporé régiosélectivement sur l'atome de carbone 10 de l'époxyde (fig 47).

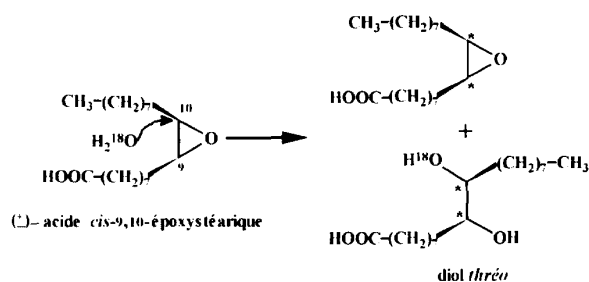


Fig 47

En 1969, une EH impliquée dans la conversion du *trans*-2,3-époxy succinate a été extraite de la bactérie *Pseudomonas putida* et a été cristallisée [173]. La bioconversion de l'époxyde racémique par cette enzyme conduit à l'acide tartrique *méso*. Cette réaction s'est avérée non énantiosélective (fig 48).

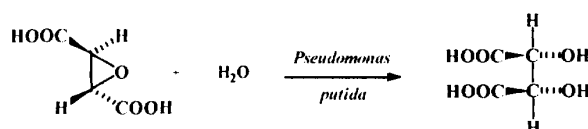
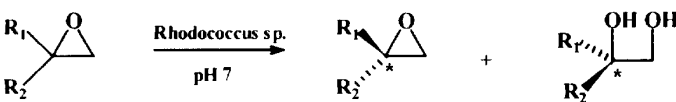


Fig 48

En 1980, Michaels *et al* [174] ont montré qu'une EH soluble de *Bacillus megaterium* partiellement purifiée, était capable de catalyser l'hydrolyse de l'époxy palmitate en 9,10-dihydroxypalmitate alors qu'en 1982, de Bont *et al* [175] ont mis en évidence l'hydrolyse de l'oxyde de propylène par la bactérie *Nocardia A60* lorsque l'oxyde de propylène est utilisé comme substrat de croissance.

Tableau XIV.

					
		EPOXYDE		DIOL	
R ₁	R ₂	Conf abs	ee (%)	Conf abs	ee (%)
H	CH ₂ -O-allyl	nd	< 5	nd	~ 5
H	C(CH ₃) ₃	nd	< 5	nd	17
H	n-C ₆ H ₁₃	<i>S</i>	38	<i>R</i>	22
H	n-C ₁₄ H ₂₉	<i>S</i>	< 10	<i>R</i>	< 10
CH ₃	CH ₂ Ph	nd	< 10	nd	< 10
CH ₃	n-C ₅ H ₁₁	<i>R</i>	72	<i>S</i>	40
CH ₃	n-C ₈ H ₁₇	<i>R</i>	23	<i>S</i>	10

En 1989, Escoffier *et al* ont réalisé des travaux sur l'étude du métabolisme de plusieurs stéroïdes du type spiro-3-oxiranes par la bactérie *Mycobacterium aurum* [176]. Ils ont observé que la transformation enzymatique de l'isomère (3*S*)-I et celle de l'isomère (3*R*)-II conduisait au même composé III. Afin de déterminer le ou les mécanismes impliqués dans ces réactions, ces auteurs ont réalisé une étude en présence d'H₂¹⁸O. Il est apparu que l'hydrolyse se produisait selon deux mécanismes différents en fonction de chacun des isomères. Ainsi, une catalyse acide avec inversion de configuration sur C-3 interviendrait pour l'isomère (3*S*)-I et une catalyse basique avec rétention de configuration serait mise en jeu pour l'isomère (3*R*)-II (fig 49).

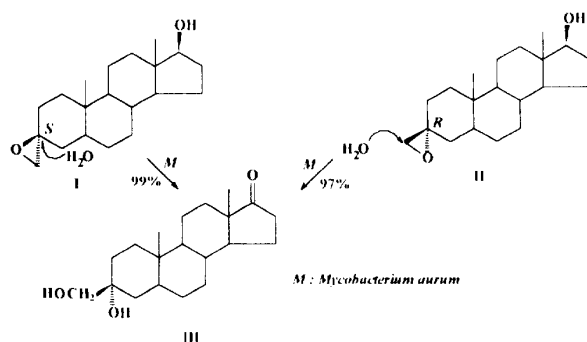


Fig 49

Plus récemment, Jacobs *et al* ont décrit la caractérisation d'une EH extraite de *Pseudomonas* sp [177]. Cette enzyme hydrolyse plusieurs époxydes, tels que l'épichlorhydrine, l'épibromhydrine, l'époxyoctane et l'oxyde de styrène. Cependant, les deux énantiomères sont convertis sans énantioselection. Une étude réalisée en présence d'H₂¹⁸O avec l'épichlorhydrine a indiqué une régiosélectivité de l'attaque identique à celle décrite dans le cas des EH de mammifères, à savoir sur l'atome de carbone le moins encombré.

En 1993, au cours d'une étude sur l'hydrolyse enzymatique de nitriles utilisant une préparation immobilisée de *Rhodococcus* sp, Faber *et coll* ont découvert

une activité d'EH dans la préparation brute de l'enzyme [178]. Plusieurs époxydes ont été soumis à l'hydrolyse enzymatique et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIV.

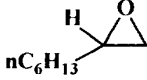
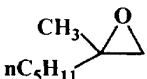
Ces résultats montrent qu'il n'existe qu'une faible énantioselectivité pour les époxydes monosubstitués, alors qu'une meilleure énantioselectivité a été observée pour les époxydes *gem*-disubstitués. De plus, une inversion d'énantioselectivité intéressante apparaît au cours de ces réactions. Ainsi, dans le cas d'époxydes monosubstitués, l'énantiomère (*R*) est préférentiellement hydrolysé permettant l'obtention de l'énantiomère (*S*) alors que pour les époxydes disubstitués, c'est l'énantiomère (*S*) qui s'hydrolyse rapidement et l'antipode (*R*) qui reste inchangé. En revanche, l'étude de divers époxydes *méso* a montré qu'ils étaient soit de mauvais substrat, soit des non-substrats pour l'hydrolyse enzymatique par *Rhodococcus* sp.

Faber *et coll* [179], ont également réalisé une étude sur plusieurs souches bactériennes dont les cellules ont été lyophilisées. Les substrats étudiés sont l'1-2-époxyoctane et le 2-méthyl-1,2-époxyheptane. Ils ont ainsi, à partir des excès énantiomériques des époxydes et des diols, déterminé les coefficients d'énantioselectivités *E*. Un cas très intéressant apparaît être celui de l'hydrolyse du 2-méthyl-1,2-époxyheptane par des cellules lyophilisées de *Rhodococcus* où un coefficient d'énantioselectivité d'environ 100 est observé. Dans les autres cas, l'énantioselectivité est plutôt faible. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XV.

• Les EH de champignons microscopiques

Dans les années 1970, Marumo et Suzuki [180] ont entrepris des études sur le métabolisme de l'époxyfarnésol racémique par le champignon *Helminthosporium sativum*. Cette transformation métabolique conduit à trois composés présentant une configuration (*S*). Le (*S*)(-)-10,11-dihydroxyfarnésol I est obtenu avec un rendement de 12,4%; l'acide (*S*)(-)-10,11-dihydroxyfarnésique II avec un rendement de 21%; et la (*S*)(-)-9,10-dihydroxygéranylacétone III avec un rendement de 6,6%. Ces résultats semblent indiquer que le champignon hydrolyse sélectivement un seul époxyde du mélange racémique produisant le diol lévogyre (fig 50).

Tableau XV.

Substrats	Microorganismes	DIOL		EPOXYDE		Sélectivité E
		Conf abs	ee (%)	Conf abs	ee (%)	
	<i>Rhodococcus</i> NCIB 11216	<i>R</i>	39	<i>S</i>	21	2,8
	<i>Rhodococcus</i> NCIB 11540	<i>R</i>	26	<i>S</i>	12	1,6
	<i>Corynebacterium</i> UPT9	<i>R</i>	41	<i>S</i>	10	2,6
	<i>Glomerella cingulata</i> ATCC 10534	<i>R</i>	28	<i>S</i>	20	2,1
	<i>Diplodia</i> NCIB 10936	<i>R</i>	46	<i>S</i>	19	3,2
	<i>Fusarium</i> NCIB 62416	nd	≈ 0	nd	nd	≈ 1
	Novo SP 409	<i>R</i>	22	<i>S</i>	38	2,2
	<i>Rhodococcus</i> NCIB 11216	<i>S</i>	96	<i>R</i>	67	≈ 100
	<i>Rhodococcus</i> NCIB 11540	<i>S</i>	87	<i>R</i>	81	36
	<i>Corynebacterium</i> UPT9	<i>S</i>	71	<i>R</i>	17	7
	<i>Glomerella cingulata</i> ATCC 10534	<i>R</i>	5	<i>S</i>	9	1,9
	<i>Diplodia</i> NCIB 10936	<i>R</i>	20	<i>S</i>	10	1,7
	<i>Fusarium</i> NCIB 62416	nd	≈ 0	nd	≈ 0	≈ 1
	Novo SP 409	<i>S</i>	40	<i>R</i>	71	4,7

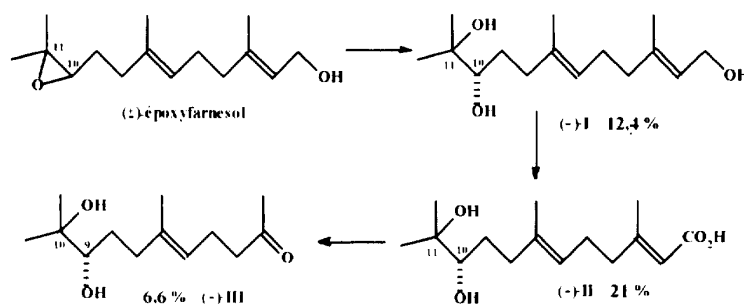


Fig 50

Afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse précédente, les auteurs ont étudié cette réaction de façon plus approfondie. En réalisant l'hydrolyse enzymatique à partir de chacun des énantiomères et du mélange racémique, ils ont obtenu des rendements globaux d'environ 70% en énantiomère lévogyre dans les trois cas. Ils en ont déduit que chacun des énantiomères produisait le (-)-10, 11-dihydroxyfarnésol I. Ils ont ensuite examiné le problème du site d'attaque de l'époxyde et pour cela, l'époxyfarnésol racémique marqué à l'oxygène 18 a été soumis à l'hydrolyse en présence de cellules d'*Helminthosporium sativum*. Pour expliquer le marquage majoritaire observé en C₁₀ (85%) un mécanisme de *trans* addition classique a été proposé pour l'hydrolyse de l'énantiomère (*R*)-(+) en (*S*)-(-)-glycol. En revanche, pour l'énantiomère (*S*)-(-), le mécanisme proposé correspond à une *cis*-hydratation. En effet, dans un premier temps, l'énantiomère (*S*) subirait une ouverture *trans* par attaque d'un groupement nucléophile de l'enzyme pour former un intermédiaire covalent du type enzyme-substrat. Celui-ci serait ensuite hydrolysé enzymatiquement pour conduire au diol de configuration (*S*). Le schéma suivant décrit les deux mécanismes proposés.

Sur la base du résultat précédent, Marumo et Suzuki ont étudié la transformation chimique stéréo-

spécifique du (*S*)-(-)-10,11-dihydroxyfarnésol en (*S*)-(-)-époxyfarnésol et en (*R*)-(+)-époxyfarnésol [181]. Ces deux énantiomères sont obtenus avec des rendements d'environ 40% et présentent une activité d'hormone juvénile d'insectes (fig 51).

Dans ce même contexte, Kolattukudy et Brown ont décrit en 1975, la présence dans le champignon *Fusarium solani pisi* d'une EH capable de catalyser l'hydrolyse de l'acide *cis*-18-hydroxy-9,10-époxyoctadécanoïque en diol *érythro* [182]. L'EH impliquée a été partiellement purifiée. Son activité principale est localisée dans la fraction soluble. Compte tenu de la configuration *érythro* du diol obtenu, il apparaît que l'hydrolyse a été effectuée selon une stéréochimie *cis*. Cette *cis*-hydratation implique un mécanisme (similaire à celui suggéré par Marumo) faisant intervenir une entité nucléophile appartenant à l'enzyme. Cette entité pourrait être dans ce cas un groupement thiolate. Toutefois, ce type de mécanisme par *cis*-hydratation n'est pas observé dans tous les cas d'hydrolyse par des champignons filamenteux. En effet, Hartman *et al* ont montré qu'une préparation enzymatique d'uredospores catalyse la *trans*-hydratation de l'acide *cis*-9,10-époxyoctadécanoïque en diol *thréo* correspondant [183] (fig 52).

Un autre exemple intéressant d'hydrolyse enzymatique par les champignons est celui décrit pour le

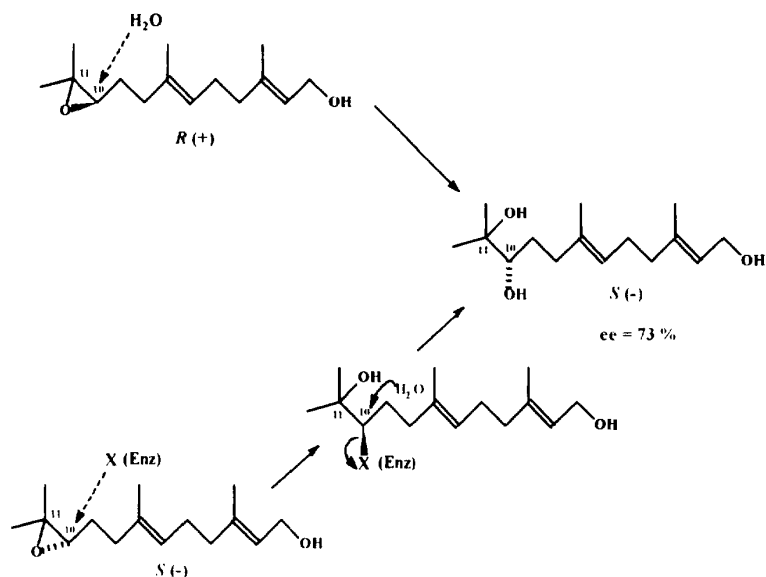


Fig 51

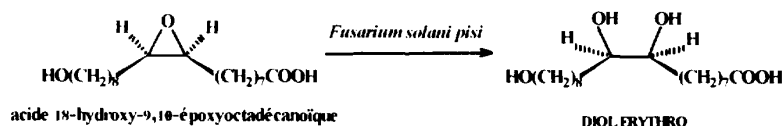


Fig 52

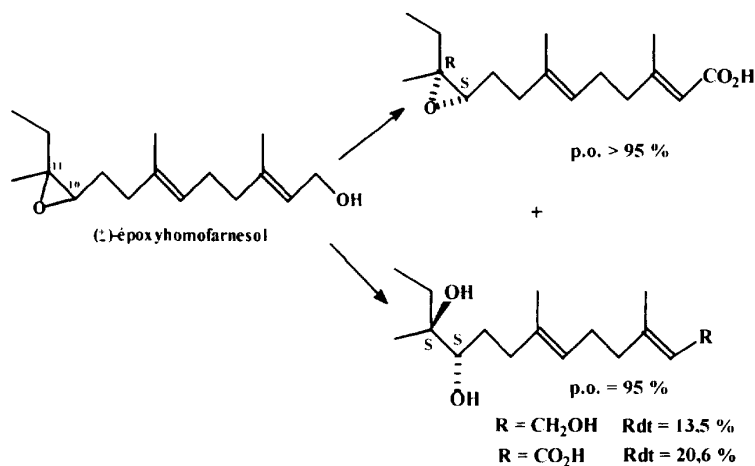


Fig 53

10,11-époxyhomofarnésol [184]. L'alcool terpénique racémique contenant un époxyde *cis* disubstitué est hydrolysé par *Helminthosporium sativum* pour conduire principalement au diol (10*S*,11*S*) (13,5%) ainsi qu'au diol (10*S*,11*S*) (20,6%) correspondant à une oxydation de l'alcool allylique terminal. Par contre, le (10*S*,11*R*) époxyhomofarnésol n'est pas transformé; seule la fonction alcool portée par l'atome de carbone C-1 est oxydée. D'autres métabolites minoritaires ont également été obtenus (fig 53).

L'énantiomère (+)-10*R*,11*S* du substrat est hydrolysé par voie enzymatique et subit une attaque nucléophile *trans* en position C₁₀ comme dans le cas de l'époxyfarnésol. En revanche, l'énantiomère (-)-10*S*,11*R* est résistant à l'hydrolyse par l'EH fongique. Cette difficulté d'hydrolyse par le champignon a été attribuée à l'effet d'encombrement stérique du groupement éthyle placé en position C₁₁.

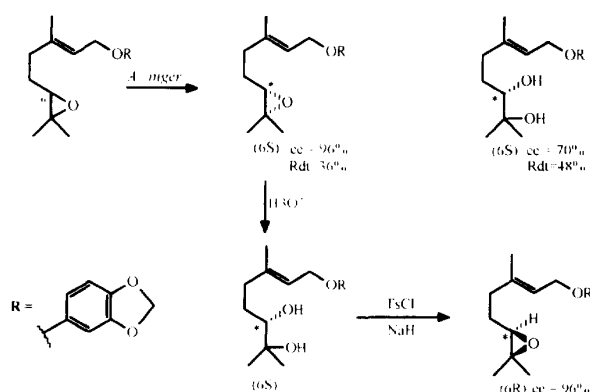


Fig 55

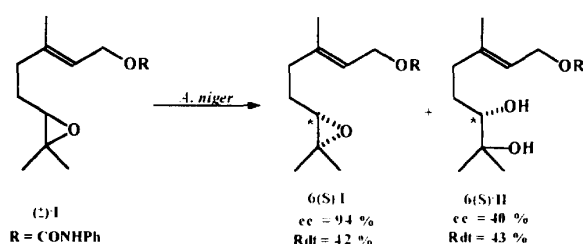


Fig 54

Biohydrolyses par le champignon *Aspergillus niger*

■ Biohydrolyse énantiosélective du N-phénylcarbamate d'époxygéraniol

Furstoss *et coll* ont montré récemment que le champignon *Aspergillus niger* possède lui aussi une époxycide hydrolase, et que celle-ci est capable d'hydrolyser énantiosélectivement le N-phénylcarbamate de 6,7-époxygéraniol (I) racémique [185]. Ceci permet de préparer l'époxyde (6S) avec une pureté optique élevée ainsi que le diol (6S) correspondant (II) optiquement enrichi. Cette bioconversion a pu être réalisée à l'échelle préparative sur 5 g de substrat et à une concentration de 5 g/L pour conduire à 2,1 g d'époxyde chiral. Cet époxycide est un synthon chiral intéressant car utilisable pour la synthèse de nombreux composés naturels [186,187] (fig 54).

Dans le même ordre d'idées, il a été montré que d'autres molécules, telles le composé de Bower (6',7'-époxy-7-géranyloxy coumarine) qui est un analogue d'hormone juvénile d'insecte, peuvent être hydrolysées par le même microorganisme. Les propriétés biologiques de ce composé ont été mises en évidence à partir de la molécule racémique, le rôle biologique joué par chacun de ses énantiomères n'ayant pas été déterminé. Afin d'obtenir chacun de ces deux énantiomères séparément, Furstoss *et coll* [188] ont tenté un dédoublement cinétique par biohydrolyse de l'époxyde racémique avec *A. niger*. Cette biohydrolyse s'est avérée être très énantiosélective. L'énantiomère (6S) a ainsi été isolé avec un rendement de 36% et un excès énantiomérique supérieur à 95%. Son antipode (6R) est facilement obtenu par

hydrolyse acide de l'énantiomère (6S), suivie d'une cyclisation intramoléculaire en présence de chlorure de tosyl et d'hydruure de sodium. Les tests biologiques des énantiomères séparés du composé de Bower ont montré que l'énantiomère (6R) était dix fois plus actif que son antipode (6S) sur l'insecte *Tenebrio molitor* (fig 55).

■ Biohydrolyse diastéréosélective

Les auteurs [185] ont également montré que ce champignon permet aussi de réaliser des hydrolyses diastéréosélectives. Ainsi, chacun des deux mélanges de 8,9-époxy limonènes (obtenus par époxidation chimique des énantiomères commerciaux de limonènes, et qui sont très difficiles à séparer par une autre méthode chimique) a été soumis à une hydrolyse par *Aspergillus niger*. Dans chacun des cas, un seul des diastéréoisomères est hydrolysé, ce qui permet évidemment une séparation très aisée de l'époxyde résiduel (optiquement pur) et du diol formé (optiquement pur lui aussi). Ceci permet l'accès, après refermeture de chacun des diols en époxycide, aux quatre stéréoisomères de l'époxy limonène. Il est alors facile d'obtenir par voie chimique les quatre stéréoisomères du Bisabolol (qui sont des produits naturels présents dans différentes huiles essentielles) et en particulier du (4S,8S)- α -Bisabolol, composé qui entre dans la composition de diverses crèmes et lotions cosmétiques compte tenu de ses propriétés bactéricides et antimycotiques (fig 56).

■ Biohydrolyse énantiocomplémentaire de l'époxyde de styrène

Ces mêmes auteurs ont également étudié la biohydrolyse énantiosélective de l'époxyde de styrène racémique avec deux champignons microscopiques, *Aspergillus niger* et *Beauveria sulfurescens* [185]. Ils ont constaté que, de façon très surprenante, ces deux microorganismes présentaient une énantiosélectivité opposée. En effet, dans le cas d'*A. niger*, l'époxyde (S) reste inchangé dans le milieu tandis que l'époxyde (R) est rapidement hydrolysé en diol. Par contre, dans le cas de *B. sulfurescens*, l'époxyde (R) est récupéré intact dans le milieu alors que l'énantiomère (S) est hydrolysé en diol (R). Ces biohydrolyses ont par la suite été réalisées à l'échelle préparative. Par exemple le dédoublement de 10 g/L d'époxyde de styrène racémique par *A. niger* permet

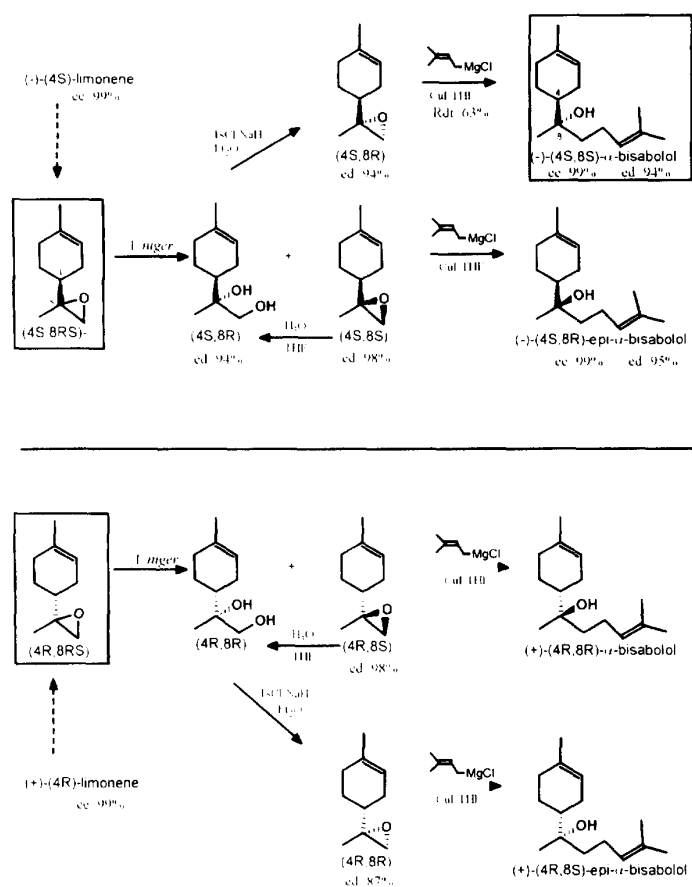


Fig 56

d'isoler 2,3 g d'époxyde de styrène de configuration absolue (*S*) (ee = 96%, Rdt 23%) (fig 57).

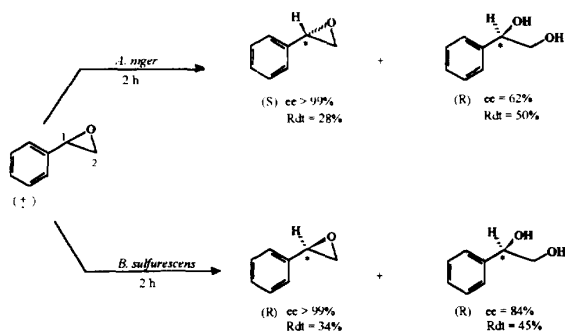


Fig 57

Une étude mécanistique réalisée en présence d'eau marquée (H_2^{18}O) a montré que cette énantio-complémentarité vis-à-vis des deux énantiomères de l'oxyde de styrène s'accompagnait d'une différence de régiosélectivité dans l'ouverture du cycle oxirane.

Il apparaît donc que le dédoublement enzymatique d'époxydes racémiques peut être réalisé grâce à l'utilisation de diverses époxyde hydrolases (EH). Ces enzymes, qui peuvent se montrer hautement régio- et

énantiosélectives, ne font pas intervenir de cofacteur, ce qui devrait rendre leur utilisation en synthèse organique relativement aisée. Plus précisément, ces enzymes sont capables d'hydrolyser sélectivement un seul des deux énantiomères d'un époxyde racémique, ce qui permet au bout d'un temps déterminé de conversion, de récupérer l'énantiomère résiduel sous forme optiquement pure. Bien que ce dédoublement entraîne la disparition de la moitié de l'époxyde, il reste une méthode économiquement intéressante vu la différence de prix qui existe entre les époxydes racémiques et les époxydes optiquement purs.

Conclusion

Compte tenu de la versatilité chimique et donc du grand potentiel synthétique offert par les intermédiaires du type époxyde, ainsi que de l'importance sans cesse croissante des molécules «énantiopures» pour tout développement industriel de composés biologiquement actifs [189], il apparaît que toute méthodologie permettant la préparation de tels intermédiaires de synthèse sous forme optiquement pure est primordiale pour la synthèse organique.

Dans ce contexte, deux types d'approche majeurs ont été développés – d'une part la synthèse chimique conventionnelle basée sur la chimie organométallique –

d'autre part une approche de bioconversions basée sur la mise en œuvre de divers catalyseurs enzymatiques [190].

L'examen de la littérature relative à la synthèse conventionnelle fait apparaître que des progrès considérables ont été réalisés au cours de la dernière décennie. Certaines de ces méthodes permettent donc maintenant l'accès à divers époxydes optiquement purs de façon particulièrement satisfaisante. Cependant, elles sont bien entendu elles aussi limitées, en particulier quant aux substrats utilisables et, dans certains cas, ne conduisent qu'à des époxydes présentant des excès énantiomériques moyens. Un autre inconvénient majeur des approches chimiques citées – primordial du point de vue industriel – réside dans le fait qu'elles sont toutes brevetées par des Sociétés américaines (ARCO Chemicals pour l'époxydation asymétrique de Sharpless – ou SEPRACOR pour la dihydroxylation de Sharpless ou l'époxydation asymétrique de Jacobsen et Katsuki) et que toute utilisation industrielle est soumise à paiement de royalties.

Ces différents éléments font que toute autre méthodologie peut être d'un grand intérêt. C'est le cas par exemple des approches basées sur l'utilisation de catalyseurs biologiques (cellules entières ou enzymes purifiées). L'examen de la littérature, décrit dans cette revue, montre que l'utilisation de biocatalyseurs peut aussi apporter un certain nombre de réponses satisfaisantes à cette problématique. En particulier, il apparaît que la mise en œuvre de réactions d'hydrolyses énantiosélectives d'époxydes, réalisées grâce à diverses époxyde hydrolases (EH), semble être une approche particulièrement prometteuse dans la mesure où – contrairement aux diverses monooxygénases utilisables – ces enzymes n'impliquent pas l'intervention de coenzymes, ce qui constitue toujours une limitation intrinsèque pour ce type de réaction.

Il est très vraisemblable que de nouveaux progrès seront réalisés dans ce contexte au cours des prochaines années, que ce soit dans l'approche chimique conventionnelle ou par voie de biocatalyse.

Références

- Breaux L, Durst T, *Tetrahedron : Asymmetry* (1991) 2, 367
- Aggarwal VK, Kalomiri M, Thomas AP, *Tetrahedron : Asymmetry* (1994) 5, 723
- Kolb HC, Sharpless KB, *Tetrahedron* (1992) 48, 10515
- Prileschajew N, *Chem Ber* (1909) 42, 4811
- Dryuk G, *Tetrahedron* (1976) 32, 2855
- Swern D, *Organic Peroxides*, Wiley Intersciences, New York (1971) II, 355
- Ewins RC, Henbest HB, McKervy MA, *J Chem Soc. Chem Commun* (1967) 1085
- Pirkle WH, Rinaldi PL, *J Org Chem* (1977) 42, 2080
- Rebek Jr J, *Heterocycles* (1981) 15, 517
- Ben Hassine B, Gorsane M, Geerts-Evrard F, Pecher J, Martin RH, Castelet D, *Bull Soc Chim Belg* (1986) 95, 547
- Curci R, Fiorentino M, Troisi L, Edwards JO, Pater RH, *J Org Chem* (1980) 45, 4758
- Curci R, Fiorentino M, Serio MR, *J Chem Soc, Chem Commun* (1984) 155
- Davis FA, Harakal ME, Awad SB, *J Am Chem Soc* (1983) 105, 3123
- Davis FA, Chattopadhyay S, *Tetrahedron Lett* (1986) 27, 5079
- Manoury E, Mouloud HAH, Balavoine GGA, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 2339
- Budt KH, Vatele JM, Kishi Y, *J Am Chem Soc* (1986) 108, 6080
- Charette AB, Côté B, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 2283
- Pluim H, Wynberg H, *J Org Chem* (1980) 45, 2498
- Wynberg H, Greijdanus B, *J Chem Soc, Chem Commun* (1978), 427
- Julia S, Masana J, Vega JC, *Angew Chem* (1980) 92, 968
- Julia S, Guixer JG, Masana J, Rocas J, Colonna S, Annuziata R, Molinari H, *J Chem Soc, Perkin Trans* (1982) 1, 1317
- Colonna S, Molinari H, Banfi S, Julia S, Masana J, Alvarez A, *Tetrahedron* (1983) 39, 1635
- Banfi S, Colonna S, Molinari H, Julia S, Guixer J, *Tetrahedron* (1984) 40, 5207
- Baures PW, Eggleston DS, Flisak JR, Gombatz K, Lantos I, Mendelson W, Remich JJ, *Tetrahedron Lett* (1990) 31, 6501
- Meunier B, *Chem Rev* (1992) 92, 1411
- Groves JT, Nemo TE, Myers RS, *J Am Chem Soc* (1979) 101, 1032
- Groves JT, Myers RS, *J Am Chem Soc* (1983) 105, 5791
- Mansuy D, Battioni P, Renaud JP, Guerin P, *J Chem Soc, Chem Commun* (1985), 155
- Haltermann RL, Jan ST, *J Org Chem* (1991) 56, 5253
- Collman JP, Zhang X, Lee VJ, Brauman JI, *J Chem Soc, Chem Commun* (1992), 1647
- Konishi K, Oda K, Nishida K, Aida T, Inoue S, *J Am Chem Soc* (1992) 114, 1313
- Naruta Y, Ishihara N, Tani F, Maruyama K, *Bull Chem Soc Jpn* (1993) 66, 158
- Naruta Y, Tani F, Ishihara N, Maruyama K, *J Am Chem Soc* (1991) 113, 6865
- Collman JP, Zhang X, Lee VJ, Uffelman ES, Brauman JI, *Science* (1993) 261, 1404
- Collman JP, Lee VJ, Zhang X, Ibers JA, Brauman JI, *J Am Chem Soc* (1993) 115, 3834
- Kagan HB, Mimoun H, Mark C, Schurig V, *Angew Chem* (1979) 18, 485
- Schurig V, Hintzer K, Leyrer U, Mark C, Pitchen P, Kagan HB, *J Organomet Chem* (1989) 370, 81
- Hiatt R, *Oxidation*, Augutine RL, Trecker DJ, Eds New York, 1971 Vol II, Chap 3
- Sheldon R, *Bull Soc Chim Belg* (1985) 64, 651
- Tani K, Hanafusa M, Otsuka S, *Tetrahedron Lett* (1979) 32, 3017
- Katsuki T, Sharpless KB, *J Am Chem Soc* (1980) 102, 5974
- Sharpless KB, Verhoeven TR, *Aldrichim Acta* (1979) 12, 63
- Hanson RM, Sharpless KB, *J Org Chem* (1986) 51, 1922
- Maugh TH, *Science* (1983) 221, 351
- Burns CJ, Martin CA, Sharpless KB, *J Org Chem* (1989) 54, 2826
- Rossiter BE, Katsuki T, Sharpless KB, *J Am Chem Soc* (1981) 103, 464
- Klunder J, Ko SY, Sharpless KB, *J Org Chem* (1986) 51, 3710
- Sharpless KB, *Janssen Chem Acta* (1988) 6, 3

- 49 Zhang W, Loebach JL, Wilson SR, Jacobsen EN, *J Am Chem Soc* (1990) 112, 2801
- 50 Srinivasan K, Perrier S, Kochi JK, *J Am Chem Soc* (1986) 108, 2309
- 51 Irie R, Noda K, Ito Y, Matsumoto N, Katsuki T, *Tetrahedron Lett* (1990) 31, 7345
- 52 Irie R, Noda K, Ito Y, Katsuki T, *Tetrahedron Lett* (1991) 32, 1055
- 53 Irie R, Noda K, Ito Y, Matsumoto N, Katsuki T, *Tetrahedron : Asymmetry*, (1991) 2, 481
- 54 Sasaki H, Irie R, Katsuki T, *Synlett* (1993), 300
- 55 Hosoya N, Hatayama A, Irie R, Sasaki H, Katsuki T, *Tetrahedron* (1994) 50, 4311
- 56 Hosoya N, Irie R, Katsuki T, *Synlett* (1993), 261
- 57 Zhang W, Lee NH, Jacobsen EN, *J Am Chem Soc* (1994) 116, 425
- 58 Palucki M, Pospisil PJ, Zhang W, Jacobsen EN, *J Am Chem Soc* (1994) 116, 9333
- 59 Jacobsen EN, Zhang W, Muci AR, Ecker JR, Deng L, *J Am Chem Soc* (1991) 113, 7063
- 60 Wang ZM, Kakiuchi K, Sharpless KB, *J Org Chem* (1994) 59, 6895
- 61 Imuta M, Kawai K, Ziffer H, *J Org Chem* (1980) 45, 3352
- 62 Weijers CAGM, Litjens MJJ, de Bont JAM, *Appl Microbiol Biotechnol* (1992) 38, 297
- 63 Besse P, Veschambre H, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 1271
- 64 Besse P, Veschambre H, *Tetrahedron : Asymmetry* (1994) 5, 1249
- 65 Kasai N, Tsujimura K, Unoura K, Suzuki T, *J Indust Microbiol* (1992) 9, 97
- 66 Nakamura T, Yu F, Mizunashi W, Watanabe I, *Agric Biol Chem* (1991) 55, 1931
- 67 Nagasawa T, Nakamura T, Yu F, Watanabe I, Yamada H, *Appl Microbiol Biotechnol* (1992) 36, 478
- 68 Archelas A, Furstoss R, «Oxygenation of C-H and C=C Bonds» dans *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis - A comprehensive Handbook* Ed Waldmann H. VCH Berlin (sous presse), Chap B-6-1
- 69 Borel JP, Randoux A, Macquart FX, Le Peuch C, Aleyre J, *Biochimie dynamique*, Maloine, Decarie, Paris, 1987, 267
- 70 Guengerich FP, *J Biol Chem* (1991) 266, 10019
- 71 Guengerich FP, *Mammalian Cytochromes P-450* Ed Guengerich FP, CRC, Boca Raton, FL, 1987 1, 2
- 72 Ortiz de Montellano PR, *Cytochrome P-450* Ed Ortiz de Montellano PR, Plenum, New York, 1986
- 73 Poulos TL, Howard AJ, *Biochemistry* (1987) 26, 8165
- 74 Mansuy D, Battioni P, Battioni JP, *Eur J Biochem* (1989) 184, 267
- 75 Lu AYH, West SB, *Pharmacol Rev* (1980) 31, 277
- 76 Ryan DE, Thomas PE, Reik LM, Levin W, *Xenobiotica* (1982) 12, 727
- 77 Ruettinger RT, Fulco AJ, *J Biol Chem* (1981) 256, 5728
- 78 Ortiz de Montellano PR, Fruetel JA, Collins JR, Camper DL, Loew GH, *J Am Chem Soc* (1993) 113, 3195
- 79 Britton LN, *Microbial Degradation of Organic Compounds* Ed Gibson DT, Dekker, New-York, 1984
- 80 May SW, Abbott BJ, *J Biol Chem* (1973) 248, 1725
- 81 Abbott BJ, Hou CT, *Appl Microbiol* (1973) 26, 86
- 82 May SW, Steltenkamp MS, Schwartz RD, Mc Coy CJ, *J Am Chem Soc* (1976) 98, 7856
- 83 Coon MJ, Stabel HW, Autor AP, Heidemeda J, Duppel W, *Biological Hydroxylation Mechanism*, GS Boyd, RMS Smellie Eds, Academic, New York, 1972, p 45
- 84 Ueda T, Coon MJ, *J Biol Chem* (1972) 247, 5010
- 85 Ruettinger RT, Griffith GR, Coon MJ, *Arch Biochem Biophys* (1977) 183, 528
- 86 May SW, Schwartz RD, Abbott BJ, Zaborsky OR, *Biochim Biophys Acta* (1975) 403, 245
- 87 Johnstone SL, Philipps GT, Robertson BW, Watts PD, Bertola MA, Koger HS, Marx AF, *Biocatalysis in Organic Media*, Eds Laane C, Tramper J, Lilly MD, Elsevier, Amsterdam, 1987, vol 29, p 387
- 88 Toda N, Hayashi S, Hatano Y, Olunishi H, Miyazaki M, *J Pharmacol Exp Ther* (1978) 207, 311
- 89 De Witt JG, Bentsen JG, Rosenzweig AC, Hedman B, Green J, Pilkington S, Papaefthymiou GC, Dalton H, Hodgson KO, Lippard S, *J Am Chem Soc* (1991) 113, 9219
- 90 Fox BG, Borneman JG, Wackett LP, Lipscomb JD, *Biochemistry* (1990) 29, 6419
- 91 Leak DJ, Dalton H, *Biocatalysis* (1987) 1, 23
- 92 Hou CT, Patel R, Laskin AI, Barnabe N, *Appl Environ Microbiol* (1979) 38, 127
- 93 Seki Y, Shimoda M, Sugimori D, Okura I, *J Mol Catal* (1994) 87, L17
- 94 Ono M, Okura I, *J Mol Catal* (1990) 61, 113
- 95 De Bont JAM, Attwood MM, Primrose SB, Harder W, *Fems Microbiol Lett* (1979) 6, 183
- 96 De Bont JAM, Primrose SB, Collins MD, Jones D, *J Gen Microbiol* (1980) 117, 97
- 97 Habets-Crützen AQH, Carlier SJN, de Bont JAM, *Enzyme Microb Technol* (1985) 7, 17
- 98 Weijers CAGM, de Haan A, de Bont JAM, *Microbiol Sci* (1988) 5, 156
- 99 Habets-Crützen AQH, de Bont JAM, *Appl Microbiol Biotechnol* (1985) 22, 428
- 100 Habets-Crützen AQH, Brink LES, van Ginkel CG, de Bont JAM, Tramper J, *Appl Microbiol Biotechnol* (1984) 20, 245
- 101 Archelas A, Hartmans S, Tramper J, *Biocatalysis* (1988) 1, 283
- 102 Mahmoudian M, Michael A, *Appl Microbiol Biotechnol* (1992) 37, 23
- 103 Mahmoudian M, Michael A, *Appl Microbiol Biotechnol* (1992) 37, 28
- 104 Van Ginkel CG, Welten HGJ, de Bont JAM, *Appl Microbiol Biotechnol* (1986) 24, 334
- 105 Woods NR, Murrell JC, *Biotechnol Lett* (1990) 12, 409
- 106 Takahashi O, Umezawa J, Furuhashi K, Takagi M, *Tetrahedron Lett* (1989) 30, 1583
- 107 Ohta H, Tetsukawa H, *Agric Biol Chem* (1979) 43, 2099
- 108 Weijers CAGM, van Ginkel CG, de Bont JAM, *Enzyme Microbiol Technol* (1988) 10, 214
- 109 Zhang XM, Archelas A, Furstoss R, *Tetrahedron : Asymmetry* (1992) 3, 1373
- 110 Zhang XM, Archelas A, Furstoss R, *J Org Chem* (1991) 56, 3814
- 111 Archelas A, Furstoss R, *Tetrahedron Lett* (1992) 33, 5241
- 112 Cerniglia CE, Yang SK, *Appl Environ Microbiol* (1984) 47, 119-124
- 113 McMillan DC, Fu PP, Cerniglia CE, *Appl Environ Microbiol* (1987) 53, 2560
- 114 White RF, Birnbaum J, Meyer RT, ten Broeke J, Chernerda JM, Demain AL, *Appl Microbiol* (1971) 22, 55
- 115 Griffiths ET, *Tetrahedron Lett* (1976) 15, 1211

- 116 Colonna S, Gaggeron N, Casella L, Carrea G, Pasta P, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 1328
- 117 Allain EJ, Hager LP, Deng L, Jacobsen EJ, *J Am Chem Soc* (1993) 115, 4415
- 118 Brink LES, Tramper J, *Biotechnol Bioeng* (1985) 27, 1258
- 119 Furuhashi K, *Chemical Economy & Engineering Review* (1986) 18, 21
- 120 Gou DM, Liu YC, Chen CS, *J Org Chem* (1993) 58, 1287
- 121 Gentile A, Giordano C, Fuganti C, Ghirotto L, Servi S, *J Org Chem* (1992) 57, 6635
- 122 Watabe T, Hiratsuka A, Tsurumori T, *Biochem Biophys Res Commun* (1985) 130, 65
- 123 Watabe T, Hiratsuka A, Ozawa N, Isobe M, *Biochem Pharmacol* (1981) 30, 390
- 124 Watabe T, Ozawa N, Hiratsuka A, Tsurumori T, *Biochem Pharmacol* (1984) 33, 2687
- 125 Wackett LP, Gibson DT, *Biochem J* (1982) 205, 117
- 126 De Bont JAM, Harder W, *FEMS Microbiol Lett* (1987) 3, 89
- 127 Shirai K, Hisatsuka K, *Agr Biol Chem* (1979) 43, 1399
- 128 Weijer CAGM, de Haan A, de Bont JAM, *Appl Microbiol Biotechnol* (1988) 27, 337
- 129 Weijers CAGM, de Bont JAM, *Enzyme Microb Technol* (1991) 13, 306
- 130 Walker CH, Bentley P, Oesch F, *Biochim Biophys Acta* (1978) 539, 427
- 131 Wang P, Meijer J, Guengerich FP, *Biochemistry* (1982) 21, 5769
- 132 Lu AYH, Thomas PE, Ryan D, Jerina DM, Levin W, *J Biol Chem* (1979) 254, 5878
- 133 Hartmann GR, Frear DS, *Biochem Biophys Res Commun* (1963) 10, 366
- 134 Croteau R, Kolattukudy PE, *Biochemistry* (1974) 13, 3193
- 135 Meijer J, Depierre JW, *Chem Biol Interactions* (1988) 64, 207
- 136 Oesch F, Jerina DM, Daly WD, *Arch Biochem Biophys* (1971) 144, 253
- 137 Oesch F, Kaubisch N, Jerina DM, Daly JW, *Biochemistry* (1971) 10, 4858
- 138 Meijer J, DePierre JW, *Eur J Biochem* (1985) 7, 150
- 139 Jerina DM, Ziffer H, Daly JW, *J Am Chem Soc* (1970) 92, 1056
- 140 Hanzlik RP, Edelman M, Michaely WJ, Scott G, *J Am Chem Soc* (1976) 98, 1952
- 141 Bellucci G, Chiappe C, Marioni F, Benetti M, *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1991), 361
- 142 Bellucci G, Chiappe C, Cordoni A, Marioni F, *Tetrahedron Lett* (1994) 35, 4219
- 143 Lu AYH, Ryan D, Jerina DM, Daly JW, Levin W, *J Biol Chem* (1975) 250, 8283
- 144 Dansette PM, Makedonska VB, Jerina DM, *Arch Biochem Biophys* (1978) 187, 290
- 145 Dubois GC, Appella E, Levin W, Lu AYH, Jerina DM, *J Biol Chem* (1977) 253, 2932
- 146 Bell PA, Kasper CB, *J Biol Chem* (1993) 268, 14011
- 147 Lacourciere GM, Armstrong RN, *J Am Chem Soc* (1993) 115, 10466
- 148 Mullin CA, Hammock BD, *Arch Biochem Biophys* (1982) 216, 423
- 149 Watabe T, Ozawa N, Yoshikawa K, *Biochem Pharmacol* (1981) 30, 1695
- 150 Westkaemper RB, Hanzlik RP, *Arch Biochem Biophys* (1981) 208, 195
- 151 Bellucci G, Chiappe C, Cordoni A, Marioni F, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 1153
- 152 Bellucci G, Chiappe C, Marioni F, *Indian J Chem* (1992), 829
- 153 Wistuba D, Schurig V, *Chirality* (1992) 4, 178
- 154 Bellucci G, Pierini G, Conti L, Marioni F, Chiappe C, *J Org Chem* (1989) 54, 5978
- 155 Bellucci G, Ferretti M, Lippi A, Marioni F, *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1988) 2715
- 156 Bellucci G, Berti G, Ferretti M, Mastroilli E, Silvestri L, *J Org Chem* (1985) 50, 1471
- 157 Bellucci G, Bianchini R, Cetera P, Mastroilli E, *J Org Chem* (1982) 47, 3105
- 158 Bellucci G, Berti G, Ingrosso G, Mastroilli E, *J Org Chem* (1980) 45, 299
- 159 Bellucci G, Berti G, Catelani G, Mastroilli E, *J Org Chem* (1981) 46, 5148
- 160 Wistuba D, Schurig V, *Angew Chem Int Ed Engl* (1986) 25, 1032
- 161 Wistuba D, Trager O, Schurig V, *Chirality* (1992) 4, 185
- 162 Bellucci G, Chiappe C, Marioni F, *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1989), 2369
- 163 Bellucci G, Marioni F, Chiappe C, Capitani I, *J Chem Soc Chem Commun* (1989), 1170
- 164 Grant DF, Storms DH, Hammock D, *J Biol Chem* (1993) 23, 17628
- 165 Lacourciere GM, Vakharia N, Tan CP, Morris DI, Edwards GH, Moos M, Armstrong RN, *Biochemistry* (1993) 32, 2610
- 166 Croteau R, Kolattukudy PE, *Arch Biochem Biophys* (1975) 170, 61
- 167 Blée E, Schuber F, *J Biol Chem* (1992) 267, 11881
- 168 Hamberg M, Fahlstadins P, *Plant Physiol* (1992) 99, 987
- 169 Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, Garbarino JE, Rockhold DR, Friedman M, Hammock BD, Belknap WR, *Plant J* (1994) 6, 251
- 170 Blée E, Schuber F, *Biochem J* (1992) 282, 711
- 171 Faber K, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, 1992, p 107
- 172 Niehaus WG Jr, Schroepfer GJ Jr, *J Am Chem Soc* (1967) 89, 4227
- 173 Allen RH, Jakoby WB, *J Biol Chem* (1969) 244, 2078
- 174 Michaels BC, Fulco AJ, Ruettinger RT, *Biochem Biophys Res Commun* (1980) 92, 1189
- 175 de Bont JAM, Van Dijken JP, Van Ginkel KG, *Biochim Biophys Acta* (1982) 714, 465
- 176 Escoffier B, Promé JC, *Bioorg Chem* (1989) 17, 53
- 177 Jacobs MHJ, Vandenwijngaard AJ, Pentenga M, Janssen DB, *Eur J Biochem* (1991) 202, 1217
- 178 Hechtberger P, Wirnsberger G, Mischitz M, Klempier N, Faber K, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 1161
- 179 Wandel V, Mischitz M, Faber K, *European Symposium on Biocatalysis* (1993) Graz (Autriche)
- 180 Suzuki Y, Marumo S, *Tetrahedron Lett* (1972) 19, 1887
- 181 Suzuki Y, Marumo S, *Chem Commun* (1971) 1199
- 182 Kolattukudy PE, Brown L, *Arch Biochem Biophys* (1975) 166, 599
- 183 Hartman GR, Frear DS, *Biochem Biophys Res Commun* (1963) 10, 366
- 184 Imai K, Marumo S, Mori K, *J Am Chem Soc* (1974) 96, 5925
- 185 Chen XJ, Archelas A, Furstoss R, *J Org Chem* (1993) 58, 5528

- 186 Meou A, Bouanah N, Archelas A, Zhang X, Guglielmetti R, Furstoss R, *Synthesis* (1990), 752
- 187 Meou A, Bouanah N, Archelas A, Zhang X, Guglielmetti R, Furstoss R, *Synthesis* (1991), 681
- 188 Archelas A, Delbecque JP, Furstoss R, *Tetrahedron : Asymmetry* (1993) 4, 2445
- 189 Stinson SC, *Chem Eng News*, Septembre 27 (1993) p 72
- 190 Besse P, Veschambre H, *Tetrahedron* (1994) 50, 8885