

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Saad Dahleb de Blida
Faculté des Sciences
Département de chimie

Mémoire de fin d'étude



Pour L'obtention du diplôme de Master en *chimie*
Option : chimie appliquée

Thème : Effet des ultrasons et du solvant sur la
résolution enzymatique du (R,S)
-1-phényléthanol

Réalisé par :

TOUIL Mohamed et MAIZI Hakim

Président : Dr ABDALLAH EL HADJ Abdellah

Examineur : Dr CHAFAA Fouad

Promoteur : Dr BELAFRIEKH Abderahmane

Année : **2019/ 2020**

Remerciements

A nos très chères mères

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A nos très chers frères Abdelhak, Sifeddine, Redhouane et Bachir. A tous nos amis, spécialement Oussama, Sedad Mohamed, Zamim et Rahim, A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible. Puisse Dieu vous donnez santé, Bonheur, courage et surtout réussites onvous dis merci.

On remercie chaleureusement le Docteur Belafriekh Abderahmane de nous avoir dirigé tout au long de ce travail ; pour son aide et ses conseils judicieux ainsi que pour sa disponibilité et ses qualités humaines, sans lesquels ce travail n'aurait pas bien aboutit, qu'il en soit vivement remercié et qu'il veuille croire en toutes nos considérations et tout nos respects.

On remercie les membres du jury de notre mémoire pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et d'évaluer notre travail :

- Mr ABDALLAH EL HADJ

- Mr CHAFAA

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidé pour que ce travail voie le jour .

Résumé

La séparation des énantiomères est un procédé d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique, agrochimique et d'autres industries de chimie fine. En effet, souvent un seul des énantiomères exerce l'activité biologique requise. Cette séparation peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique. Les voies enzymatiques reposent sur l'utilisation d'enzymes pures ou bien des enzymes modifiées par immobilisation ou formulation. L'emploi d'enzymes présente de nombreux avantages : elles sont moins dangereuses à manipuler, moins polluantes, moins consommatrices d'énergie. Parmi ces enzymes, les lipases, triacylglycérol hydrolases (EC 3.1.1.3), elles sont capables de catalyser des réactions d'estérification, de transestérification ou d'amidification, avec, dans de nombreux cas, une excellente spécificité énantiomérique. Le présent travail a été consacré à l'étude de l'effet des ultrasons sur le comportement de la lipase *Candida rugosa* en termes d'activité et d'énantiosélectivité dans la transestérification de l'alcool racémique (R,S)- 1-phényléthanol avec le propionate de vinyle comme donneur d'acyle. Les expériences ont été conduites avec trois approches : Dans la première, les ultrasons sont utilisés pendant toute la réaction, la deuxième approche consiste à prétraiter l'enzyme 1h avant son utilisation, et en absence des ultrasons dans la troisième pour comparer. L'effet du solvant (ether diéthylique, hexane, toluène, dichlorométhane, chloroforme, THF) sur l'activité enzymatique et l'énantiosélectivité de cette lipase également évalué.

Abstract

The separation of enantiomers is a process of interest to the pharmacy, agro-chemistry and other industries of fine chemistry. Indeed, often only one of the enantiomers exerts the required biological activity. This separation can be carried out chemically or enzymatically. The enzymatic methods are based on the use of enzymes pure or else modified by immobilization or formulation. The use of enzymes has many advantages : they are less dangerous to handle, less polluting, less energy consuming. Among these enzymes, lipases, triacylglycerol hydrolases (EC 3.1.1.3), they are able of catalyzing esterification, transesterification or amidification reactions, with, in many cases, excellent enantiomeric specificity. The present work was devoted to study the effect of ultrasound on the behavior of the *Candida rugosa* lipase in terms of activity and enantioselectivity in the transesterification of racemic alcohol (R,S)-1-phenylethanol with vinyl propionate as the acyl donor. The experiments were carried out with three approaches : In the first, ultrasounds are used throughout the reaction, the second approach consists of pretreating the enzyme 1h before its use, and in the absence of ultrasounds in the third to compare. The effect of the solvent (diethyl ether, hexane, toluene, dichloromethane, chloroform, THF) on the enzymatic activity and the enantioselectivity of this lipase is also evaluated.

ملخص

يعد فصل المتماكبات ذات أهمية كبيرة بالنسبة للصناعات الدوائية و الزراعية والصناعات الكيميائية.

غالبًا ما يمارس واحد من المتماكبين النشاط البيولوجي المطلوب.

يمكن إجراء هذا الفصل كيميائياً أو إنزيمياً.

تعتمد المسارات الإنزيمية على استخدام الإنزيمات النقية أو يتم تعديلها عن طريق التثبيت أو التركيب.

استخدام الإنزيمات له العديد من المزايا فهي أقل خطورة في التعامل معها، وأقل تلويثاً وأقل استهلاك للطاقة.

من بين هذه الإنزيمات، الليباز هيدرولاز ثلاثي الجليسيرين (EC3.1.1.3) قادرة على تحفيز تفاعلات الأسترة أو الأسترة التبادلية أو التوسط مع خصوصية تماثلية ممتازة في كثير من الحالات.

يتمثل عملنا في دراسة تأثير الموجات فوق الصوتية على سلوك الليباز CRL من حيث النشاط أو الإنتقائية الإينونتومرية للكحول (R,S)-1-فينيل إيثانول مع بروبيونات الفينيل ، تم إجراء تجارب بثلاثة طرق:

- الأولى: يتم استخدام الموجات فوق الصوتية طول التفاعل.
- الثانية: نعالج الإنزيم مسبقاً بواسطة الموجات فوق الصوتية لساعة واحدة.
- الثالثة: لا نستخدم الموجات فوق الصوتية ونقوم بتقييم تأثير المذيب (إيثر ثنائي الإيثيل، هكسان، تولوين، ثنائي كلور الميثان، كلوروفورم، THF) على النشاط الإنزيمي و الإنتقائية الإينونتومرية لهذا الليباز.

Table des matières

Abréviations	1
Unités	2
Introduction générale	3
1 Etude bibliographique	5
1.1 Généralités sur les enzymes	5
1.2 Avantages et inconvénients des enzymes	7
1.3 Les lipases	8
1.3.1 Avantages de l'emploi des lipases dans un milieu organiques	8
1.3.2 Sources des lipases	8
1.3.2.1 Sources microbiennes	9
1.3.2.2 Sources végétales	9
1.3.2.3 Sources animales	9
1.4 Structure des enzymes	10
1.4.1 Notion du site actif	10
1.5 Réaction réalisables par les lipases	12
1.5.1 L'estérification	12
1.5.2 L'interesterification	12
1.5.3 La Trans-estérification	13
1.6 Mécanisme d'action des lipases	14
1.7 Propriétés de sélectivité des lipases	15
1.7.1 Chimiosélectivité et Régiosélectivité	15
1.7.2 Enantiosélectivité	16
1.8 Ultrasons	17
1.8.1 Généralités sur les ultrasons	17
1.8.2 Utilisation des ultrasons en chimie	17
1.8.3 Classification des ultrasons	18
1.9 Cavitation	20
1.9.1 Introduction	20
1.9.2 Seuil de cavitation	20
1.9.3 Type de cavité	22
1.9.3.1 Cavité transitoire	22
1.9.3.2 Cavitation stable	23
1.10 Application des ultrasons	24
1.10.1 Applications médicales	24
1.10.2 Application au laboratoire	24

2	Matériels et méthodes	25
2.1	Matériels	25
2.1.1	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	25
2.1.2	Chromatographie sur couche mince	26
2.2	Enzymes et réactifs	27
2.2.1	Lipases	27
2.2.2	Alcool	27
2.2.3	Donneurs d'acyle	28
2.2.4	Solvants	29
2.3	Protocoles des réactions réalisées	31
2.3.1	Prétraitement des lipases par ultrasons	31
2.3.2	Réaction sous agitation magnétique	32
2.3.3	Réaction sous ultrasons	33
3	Résultats et discussions	34
3.1	Généralité sur le 1- phényléthanol	35
3.2	Effets du solvant sur la réaction enzymatique	35
3.3	Généralité sur l'énantiosélectivité	36
3.4	RESULTATS ET DISCUSSION	38
3.4.1	Réaction sous agitation magnétique	39
3.4.2	Réaction après prétraitement de la lipase aux US	40
3.4.3	Réaction sous ultrasons	41
3.5	Comparaison des C et des E dans les trois approches	42
3.5.1	Comparaison des conversions	42
3.5.2	Comparaison des énantioselectivités	43
3.6	Conclusion	44
	Conclusion générale	45
	Bibliographie	46

Table des figures

1.1	les différents types d'enzymes	6
1.2	Fréquence d'utilisation des enzymes	7
1.3	Les différents niveaux de structure des enzymes.	10
1.4	Transestérification catalysée par une lipase	14
1.5	Mécanisme réactionnel de l'acylation d'un alcool par la lipase B de C.antarctica	14
1.6	La chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.	15
1.7	La régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat	16
1.8	Ultrason utilisé dans notre travail	17
1.9	Domaine ultrasonore et ses applications	18
1.10	Classification des ultrasons en fonction de leur fréquence et de leur puissance	19
1.11	Dynamique d'une bulle de cavitation acoustique	21
1.12	Micro-crevasses à la surface d'une particule solide (a) en phase de compression (b) en phase de dilatation	22
1.13	Évolution de la taille d'une bulle de cavitation transitoire[Weissler et al. 1950]	23
2.1	Principe de fonctionnement d'une CPG	25
2.2	CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU	26
2.3	Analyse par CCM	27
2.4	représentation chimique du 1-phényléthanol	28
2.5	représentation chimique du propionate de vinyle	29
2.6	Prétraitement de la lipase par l'US	31
2.7	Réaction réalisée sous agitation magnétique	32
2.8	Réaction réalisée sous US	33
3.1	1-phényléthanol	35
3.2	Hydrolyse enzymatique de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate.	36
3.3	Transestérification enzymatique du 1-phényléthanol racémique	38
3.4	Histogramme comparant la conversions et énantiosélectivités dans chaque solvant (sans US)	39
3.5	Histogramme comparant la conversions et énantiosélectivités dans chaque solvant (Après prétraitement).	40
3.6	Histogramme comparant la conversions et énantiosélectivités dans chaque solvant (Sous US).	41
3.7	Histogramme de comparaison entre les conversions, avec et sans US	42
3.8	Histogramme de comparaison entre les énantiosélectivités, avec et sans US	43

Liste des tableaux

2.1	Propriétés physiques et chimiques de l'alcool	28
2.2	Propriété physique et chimique du propionate de vinyle	29
2.3	Propriétés chimiques des solvants utilisés	30
3.1	résultats obtenus sous agitation magnétique dans différent solvants organique	39
3.2	Résultats obtenus sous prétraitement dans différents solvants organiques	40
3.3	Résultats obtenus sous l'ultrason dans différents solvants organiques.	41
3.4	Comparaison des conversions, en présence et en absence des US	42
3.5	Comparaison d'énantioselectivité, en présence et en absence des US	43

Abréviations

E : l'enzyme

S : le substrat

P : le produit

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

C : Conversion

E : facteur d'énantiosélectivité

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CCM : Chromatographie sur couche mince

E : Enantiosélectivité

ee_s : Excès énantiomérique du substrat

ee_p : Excès énantiomérique du produit

P_R et P_S : les concentrations des énantiomères produits de la réaction

Log P : Le coefficient de partage dans le système à deux phases le n-octanol et l'eau

R, S : Enantiomères Rectus et Sinister

T : Température

THF : Tétrahydrofurane

US : Ultrasons

UV : la spectroscopie ultraviolet-visible

R_f : Le rapport frontal

tr : Temps de Rétention

Unités

bar : Unités de pression

°C : Degrés Celsius

cm^{-1} : Centimètres-1 (unités du nombre d'onde)

g : Unité de la force relative de centrifugation (1 g = l'accélération de la pesanteur)

h : Heures

Hz : Hertz

l : Litres

M : Moles par litre m/z : Rapports de la masse atomique (en unité de masse atomique) sur la charge d'une molécule

min : Minutes

$mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$: Millimoles par heures par g d'enzyme

mol : Moles

μL : microlitre

nm : nanometer

μm : micrometre

Introduction générale

De nos jours la demande de composés qui sont énantiomériquement purs est en forte augmentation surtout dans l'industrie pharmaceutique. A titre d'exemple, la vente de médicaments énantiomériquement purs était de 225 milliard d'euros en 2005, représentant 37% du marché de l'industrie pharmaceutique[Erb 2006]

On peut réaliser la synthèse des énantiomères par plusieurs voies : chimique ou enzymatique. Les voies enzymatiques reposent sur l'utilisation d'enzymes purs ou de préparations d'enzymes immobilisés. L'emploi d'enzymes présente de nombreux avantages : ils sont moins dangereux à manipuler, moins polluants, moins consommateurs d'énergie que les catalyseurs traditionnels à base de métaux comme le ruthénium, le titane ou l'iridium[Ghanem 2007][Govindaraju et al. 2011]

Les enzymes peuvent aussi être utilisés à température ambiante, ce qui les rend attractifs en terme de coût énergétique. Parmi ces enzymes, les lipases, sont capables de catalyser des réactions d'estérification, de transestérification avec, dans de nombreux cas, une excellente spécificité énantiomérique. Les lipases, sont très utilisées dans le domaine industriel, à cause de leur sélectivité mais aussi car elles sont respectueuses de l'environnement. Surtout après l'apparition de la réglementation (REACH) entré en vigueur en 2007 ou il s'agit de recenser, d'évaluer, de contrôler et de restreindre les substances chimiques nuisible à l'environnement, il existe une forte demande de synthèse de composés stéréochimiquement purs tout en respectant l'environnement on parle la de « chimie verte ».[Assmuth et al. 2010]

Cependant, l'activité et l'énantiosélectivité des lipases pour divers substrat synthétiques ne sont pas toujours suffisantes.

Il est alors nécessaire de chercher des moyens afin d'améliorer leur fonctionnement. Plusieurs méthodes ont été développées à cette fin : l'ingénierie des solvants, l'immobilisation enzymatique, la lyophilisation de l'enzyme, l'application d'ondes mécaniques, etc. [Belafriekh et al. 2017]

De nos jours. pour pouvoir activer les diverses transformations chimiques, les ultrasons ont été introduit dans la chimie organique et la biotechnologie, aussi les ultrasons sont utilisés pour améliorer la solubilisation des substrats et le transfert de masse à l'intérieur et à l'extérieur du site actif de l'enzyme [(Garcia-Ubasart et al. 2011)[Zhu et al. 2010]

Lors de la mise en œuvre d'une synthèse par voie enzymatique il est conseillé d'opérer dans des milieux non aqueux pour éviter la réaction d'hydrolyse qui est alors indésirable.[Vrutika and Datta 2015] L'utilisation de solvants organiques comme milieu pour les réactions catalysées par les lipases offre de nombreux avantages tels que la possibilité de solubiliser des substrats insolubles dans l'eau, faciliter la récupération des produits par une simple filtration du biocatalyseur et la possibilité d'augmenter la stabilité thermique de l'enzyme[Kumar et al. 2016], en on peut dire que les solvants organiques peuvent affecter considérablement la sélectivité enzymatique , cela veut dire que le choix de l'enzyme a une importance cruciale[Secundo et al. 1992]

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet des ultrasons sur une réaction enzymatique, via la transestérification du (R,S)-1-phényléthanol par le propionate de vinyle comme donneur d'acyle en absence et en présence d'ultrasons. Pour ce faire, nous avons utilisé la CRL (Lipase *Candida Rugosa*) comme biocatalyseur dans différents solvants organiques. En effet, nous nous sommes intéressés à l'effet des ultrasons sur l'énantiosélectivité de la protéine utilisé. Dans un premier temps, nous avons réalisé cette réaction uniquement en absence d'ultrasons sous agitation magnétique puis nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus en présence d'ultrasons (comme un prétraitement et pendant toute la réaction). Notre travail sera scinder en trois chapitres.

Une mise au point bibliographique sur la procédure d'ultrason, les enzymes et quelques exemples de réactions organiques et enzymatiques réalisées sous ultrasons fera l'objet du premier chapitre.

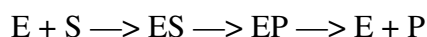
Le deuxième chapitre décrit la partie expérimentale qui regroupe le matériel et les méthodes utilisés.

Le chapitre troisième fait place à nos approches, différents substrats qui sont choisis pour réaliser la réaction désiré, les résultats obtenus et leurs discussions.

Etude bibliographique

1.1 Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des édifices macromoléculaires de nature protéique qui jouent le rôle de catalyseurs avec une efficacité et une spécificité fonctionnelle, elles sont utilisées souvent pour obtenir des molécules chirales à haute pureté optique. En 1893, Wilhelm Ostwald montra que les enzymes sont des catalyseurs et en 1894 Emil Fisher posa l'acte fondateur de la notion de stéréospécificité dans le phénomène de catalyse enzymatique sous l'image d'une clé qui ouvre une serrure et une seule. Les mécanismes moléculaires de la catalyse enzymatique ne posent pas de problèmes différents de ceux de la réactivité chimique. Soit la réaction élémentaire catalysée



Où E est l'enzyme, S est le substrat et P le produit. Les biocatalyseurs sont capables d'accélérer la vitesse de la réaction jusqu'à cent milliards (10^{11}) fois la vitesse de la réaction spontanée en diminuant l'énergie d'activation [Penasse 1974]. Ainsi elles offrent une façon propre et écologique d'exécuter des processus chimiques en conditions douces et avec un haut degré de sélectivité. Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Il y a six classes principales :

1	oxydoréductases	catalysent les réactions d'oxydoréduction des alcools, cétones, aldéhyde....
2	transférases	transfèrent les groupes : monocarboné, azoté, phosphorés etc...
3	hydrolases	hydrolysent des liaisons esters, amides, thioester
4	lyases	permettent la formation des doubles liaisons ou l'addition des groupements fonctionnels sur ces liaisons (C=C, C=O, C=N).
5	isomérases	permettent l'isomérisation-racémisation
6	ligases	effectuent des synthèses avec une source d'énergie (formation des liaisons (C-O, C-C, C-N, C-S).

FIGURE 1.1 – les différents types d'enzymes

Parmi les enzymes les plus utilisées par les chimistes dans le domaine de recherche ou celui de l'industrie, les hydrolases (qui proviennent de diverses origines : animales, fongiques, végétales...) sont les plus importantes, elles ont l'avantage de ne pas utiliser de coenzyme, ainsi leur manipulation est aisée et leur coût est faible.

Utilisation des hydrolases en synthèse organique :

Depuis le milieu des années quatre-vingt et grâce aux premiers travaux de Klibanov

[Klibanov et al. 1984] qui a montré la réactivité des enzymes dans un milieu organique en présence d'un minimum d'eau qui est le milieu naturel des enzymes, l'exploitation de ces biocatalyseurs dans les biotransformations en synthèse organique a connu un développement notable. Comme nous l'avons signalé précédemment, les hydrolases sont les plus fréquemment sollicitées lors des biocatalyses et les lipases qui en font partie sont largement utilisées[Faber et al. 1996]. Nous nous sommes intéressés aux hydrolases plus précisément aux lipases qui sont les enzymes les plus sollicitées par le chimiste organicien, la figure-(1.2) illustre la fréquence d'utilisation des enzymes.

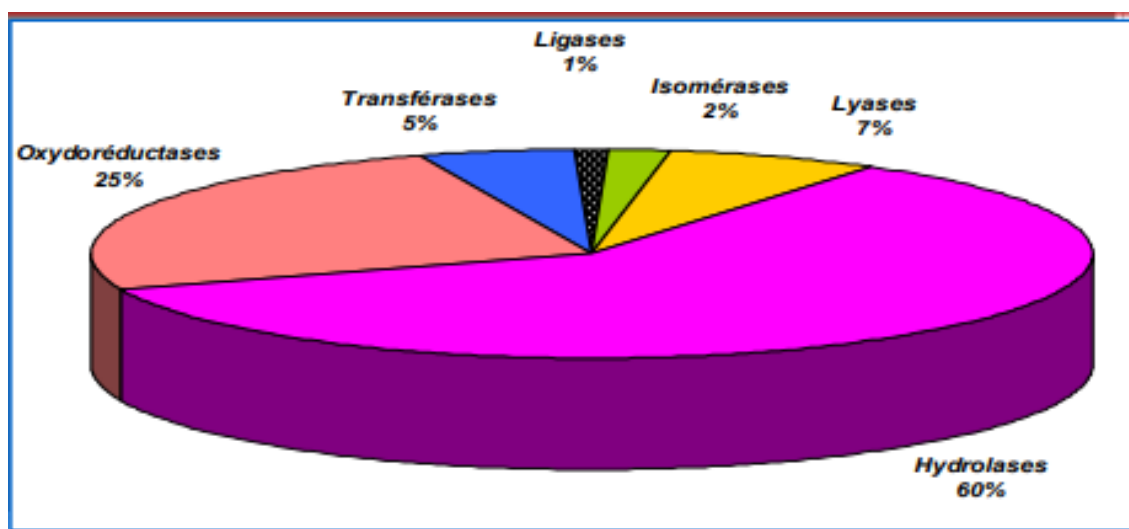


FIGURE 1.2 – Fréquence d'utilisation des enzymes

1.2 Avantages et inconvénients des enzymes

L'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseurs doués d'une haute spécificité a constitué une véritable révolution pour la préparation de nouvelles molécules organiques à intérêt potentiel. Depuis les premiers travaux pivots de Klibanov [Kirchner et al. (1985)] qui expliquent l'effet des modifications physico-chimiques de l'environnement des enzymes par l'utilisation de milieux organiques, ainsi que la réactivité enzymatique dans ces milieux en présence d'un minimum d'eau qui est le milieu naturel des enzymes, l'utilisation de ces outils biocatalytiques a connu une évolution accrue et a attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la recherche fondamentale et en particulier le monde de la chimie organique. [De Carvalho (2011)] La facilité de mise en œuvre de ces catalyseurs, ainsi que l'exploitation de méthodes d'immobilisation des enzymes libres (sous forme sauvage), facilite leur récupération par simple filtration et autorise une éventuelle réutilisation, ce qui permet de classer ce type de catalyse comme hétérogène. La biocatalyse est considérée comme complémentaire à la catalyse homogène par le bien de plusieurs aspects tels que : la reconnaissance d'un seul énantiomère, la grande stéréosélectivité des enzymes, [Zaks et al. (1985)] et un TON (Number of turn over) élevé . L'exploitation des enzymes comme catalyseurs augmente la vitesse d'une réaction chimique jusqu'à 1020 fois, et ce par la diminution de la barrière énergétique. Leur utilisation reste limitée à cause de leur fragilité, leur sensibilité, à savoir leur dénaturation à des températures élevées, leur grande spécificité, la nécessité d'utiliser des cofacteurs et coenzymes qui s'avèrent onéreux, solubilité limitée dans les solvants organiques et le risque d'oxydation de certains résidus (Méthionine, Cystéine, Trypsine). Les réactions catalysées par les enzymes se déroulent dans des conditions douces : température inférieure à 100°C, pression atmosphérique et pH neutre par rapport aux réactions chimiques

correspondantes. [Tao et al. (2011)]

1.3 Les lipases

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases EC : 3.1.1.3) sont des sérines hydrolases atypiques qui sont retrouvées aussi bien chez les végétaux, animaux [Cherif and Gargouri 2009], bactéries Gram+ [Guncheva and zhiryakova 2011] ou Gram -[Gaur et al. 2008], et chez les mycètes[Fu et al. 2009] les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface entre lipide et eau. Ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides.[Alloue et al. 2008]

1.3.1 Avantages de l'emploi des lipases dans un milieu organiques

La compatibilité des lipases avec les milieux organiques pauvres en eau, a offert de nouvelles opportunités pour faire une chimie propres, et a élargi le champ de leurs applications en synthèse organique, et ce par le bien de plusieurs avantages, tels que [Klibanov (2001)] :

- Augmentation de la solubilité des substrats apolaires.
- Traitement aisé, et ce dû à la séparation du catalyseur des produits par une simple filtration et une éventuelle récupération de la lipase si elle est immobilisée.
- Amélioration des rendements en produits par élimination immédiate du solvant organique par évaporation, la stabilité thermique de certaines enzymes est accrue.
- La possibilité de moduler la chimio-, la régio- et l'énantio-sélectivité des lipases par un choix judicieux du solvant.[Sheldon (1996)]

Il est à noter que la polarité des solvants organique est désignée par une corrélation entre l'hydrophobicité d'un solvant organique et le facteur LogP, le logarithme du coefficient de partition entre le n-octanol et l'eau, peut influencer significativement la réactivité et la sélectivité lipasiques. Précisément en catalyse enzymatique, le paramètre LogP quantifie l'hydrophobicité du solvant. Les solvants non-polaires avec $\text{LogP} > 1$ sont les plus sollicités, par contre les solvants hydrophiles avec $\text{LogP} < 1$. [Ghanem (2007)]

1.3.2 Sources des lipases

La première lipase a été découverte dans le jus pancréatique des animaux en 1856 par Claude Bernard[P L A Overbeeke et al. 2000]. Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles

ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires[Fickers et al. 2008].

1.3.2.1 Sources microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par des bactéries telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* ou du genre *Pseudomonas*. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces*[Svendsen 2000]. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux[Alloue et al. 2008]

1.3.2.2 Sources végétales

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes[Beisson et al. 2001]. Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés en acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante[Adlercreutz et al. 1997].

1.3.2.3 Sources animales

Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes : le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel. En effet, les lipases jouent un rôle important dans la digestion en particulier chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides[Baba et al. 1991]. Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et à leur absorption. Il s'agit de la lipase gastrique, de la lipase pancréatique, et de la lipase hépatique. Des études de leurs structures suggèrent que ces différentes enzymes dérivent d'un ancêtre commun[Warden et al. 1993].

Elles sont capables d'hydrolyser les glycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol. Elles peuvent aussi catalyser la transestérification entre glycérides.

1.4 Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines qui sont elles-mêmes des enchaînements des acides aminés de configuration L.

La structure primaire est la séquence dans laquelle les acides aminés sont disposés linéairement dans la chaîne protéique. Dès que la structure primaire s'enroule sur elle-même elle constitue **la structure secondaire** formant principalement des hélices α et *feuilles* β .

La structure tertiaire se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures : hélices et feuillettes. Le repliement et la stabilisation de protéines à structure tertiaire dépend de plusieurs types de liaisons faibles qui stabilisent l'édifice moléculaire.

La structure quaternaire est l'assemblage de deux ou plus de la structure tridimensionnelle. Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation de cette structure. Le principal élément de stabilisation des structures quaternaires est l'interaction hydrophobe entre les acides aminés non polaires

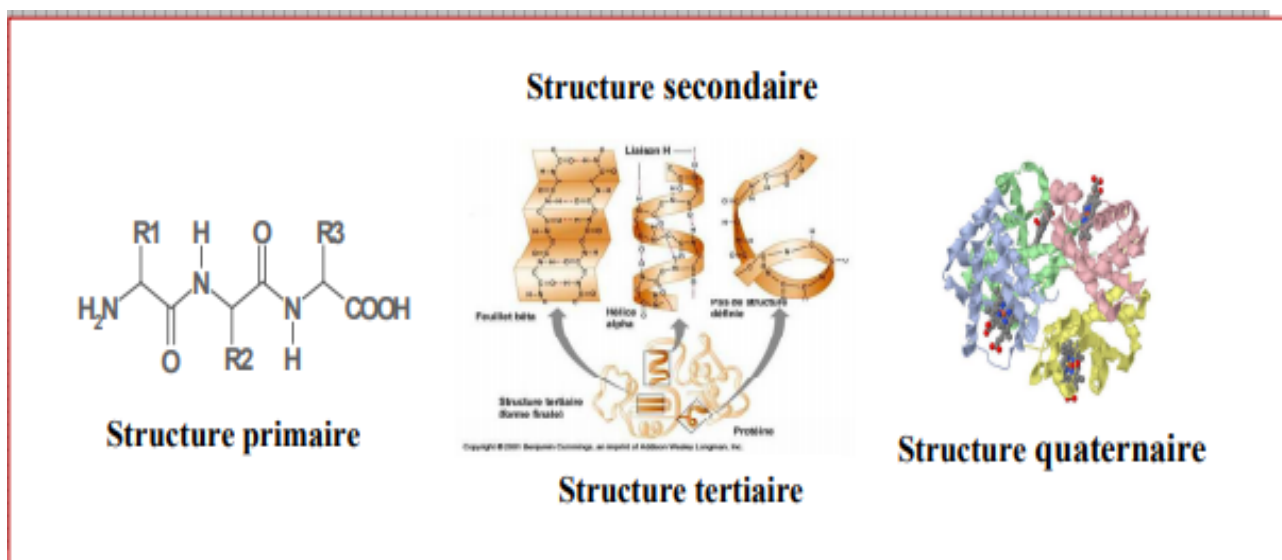


FIGURE 1.3 – Les différents niveaux de structure des enzymes.

1.4.1 Notion du site actif

Les sites actifs sont des creux ou des sillons permettant la fixation du substrat. La forme plus ou moins grande du site actif explique en partie la spécificité de reconnaissance du substrat, appelée également poche enzymatique. C'est une cavité de caractère non polaire dans laquelle le substrat s'insère pour être transformé. Cette poche enzymatique est constituée de deux zones fonctionnelles :

1. **un site de fixation** : constitué de résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liaisons chimiques. Ce dernier est lui-même divisé en deux compartiments : une large

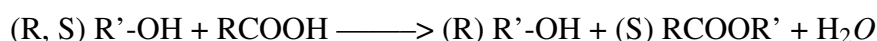
poche hydrophobe et une poche plus petite en aval. Cette petite poche serait responsable de la stéréosélectivité des lipases pour les alcools secondaires.

2. **un site de reconnaissance du substrat** : constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat.

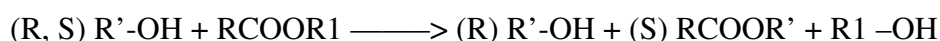
1.5 Reaction réalisables par les lipases

Les lipases peuvent être employées en synthèse organique en tant que catalyseurs de choix. En effet, elles présentent l'avantage de réaliser une multitude de réactions chimiques, allant de l'estérification [Vidya and Chadha 2010], à l'acidolyse [Foresti and Ferreira 2010] en passant par l'amidification [Prasad et al. 2005] l'hydrolyse [Zhang and Liu 2011] ou la transestérification [Singh et al. 2008]. Les grands types de réactions où interviennent les lipases sont les suivants [Mokhtar-annaba 2011] :

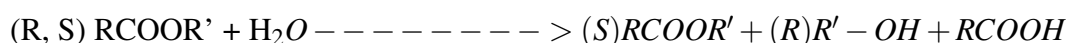
Estérification d'un acide par un alcool



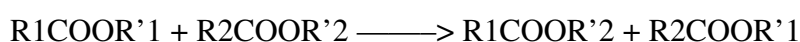
Transesterification de l'alcool



Hydrolyse d'un ester



Interestérification



1.5.1 L'estérification

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes pour ces utilisations industrielles, puisqu'elles peuvent être facilement manipulées. Une large gamme d'esters d'acide gras est maintenant produite commercialement en utilisant une lipase immobilisée, en présence de solvants non-aqueux. Par exemple, des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne (12-20 atomes de carbone) et d'alcools à courte chaîne, afin de servir dans la confection de produits alimentaires ou cosmétiques, tandis que ceux issus d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à longue chaîne sont utilisés dans la fabrication de plastifiants et de lubrifiants. Ainsi la lipase de *C. rugosa* immobilisée sur du nylon a permis la synthèse d'oléyl butyrate à partir d'acide butanoïque et de n-butanol en présence de n-hexane. [Alloue et al. 2008]

1.5.2 L'interestérification

Lors de la réaction d'interestérification, un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras. Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'application à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardio-vasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale, ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par

mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérisation). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains. L'utilisation des solvants en interestérisation entraîne la nécessité d'une désodorisation du produit final, en revanche l'interestérisation enzymatique réalisée en l'absence de solvants organiques est une très bonne alternative. [Alloue et al. 2008]

1.5.3 La Trans-estérisation

La transestérisation implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolise) ou avec le glycérol (glycérolise). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérisation par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras poly-insaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique.

L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final. [Alloue et al. 2008]

1.6 Mécanisme d'action des lipases

Le mécanisme réactionnel des réactions enzymatiques est commun à toutes les sérines hydrolases. Prenons l'exemple général d'une transestérification

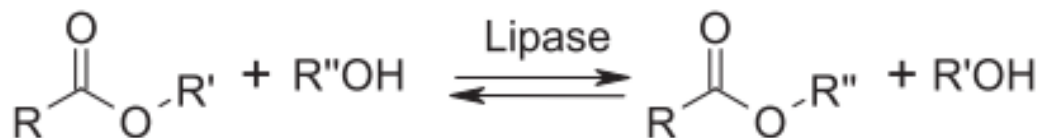


FIGURE 1.4 – Transestérification catalysée par une lipase

La première étape consiste en l'attaque nucléophile de la sérine sur le donneur d'acyle (1), entraînant la formation du premier intermédiaire tétraédrique. Par départ d'alcool, l'acyl-enzyme se forme (2). L'attaque nucléophile du second substrat sur l'acyl-enzyme provoque la formation du second intermédiaire tétraédrique (3) qui est stabilisé par liaisons hydrogènes. Après départ du produit, l'enzyme est retrouvé sous sa forme native. [Beauchard et al. 2009]

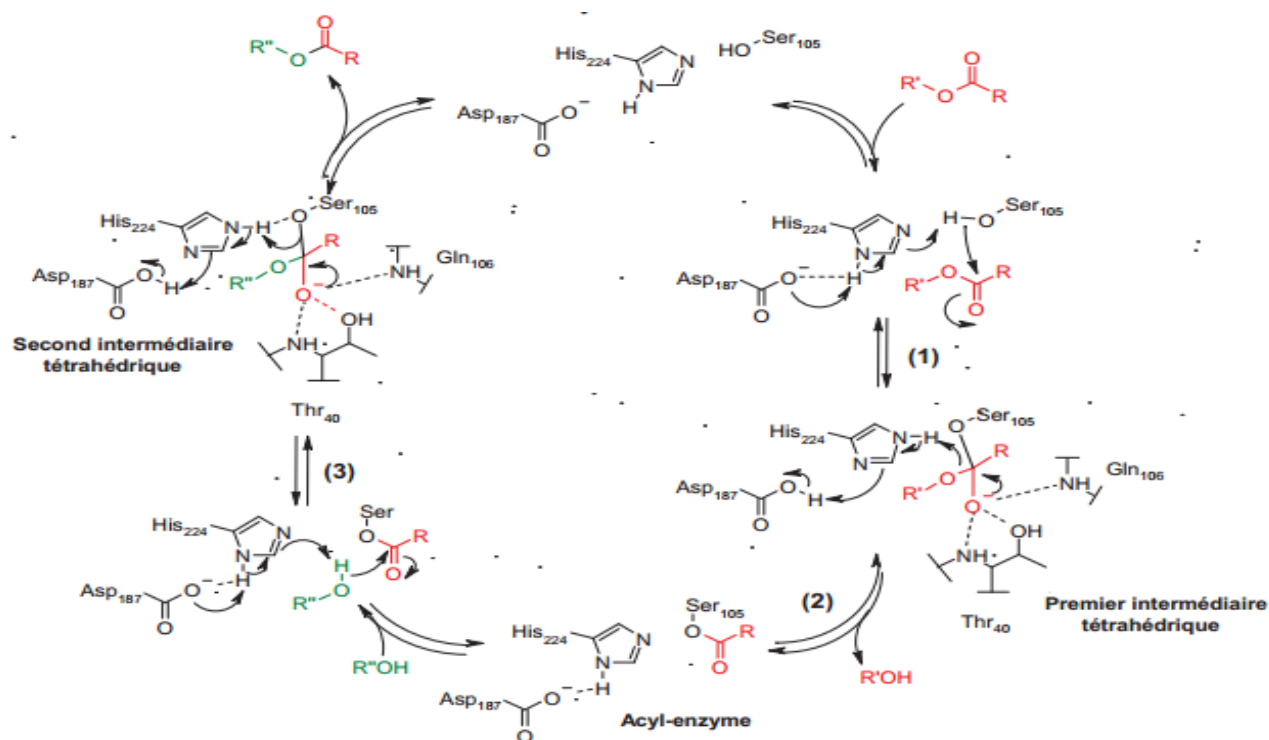


FIGURE 1.5 – Mécanisme réactionnel de l'acylation d'un alcool par la lipase B de *C. antarctica*

1.7 Propriétés de sélectivité des lipases

Du point de vue catalyseurs en synthèse organique, les lipases possèdent plusieurs propriétés intéressantes. Comme on la mentionnés au paravent elles peuvent catalyser une grande variété de réactions tout en acceptant des substrats divers, différents même de leur substrat naturel.

De plus, les lipases possèdent souvent différents types de sélectivité envers ces substrats. C'est ce qui les rend vraiment spéciales et pour cela on les utilise souvent en synthèse organique car ces caractéristiques permettent d'éviter les réactions indésirables qui peuvent être de nature dangereuse pour l'environnement.

1.7.1 Chimiosélectivité et Régiosélectivité

La chimiosélectivité d'une lipase est sa capacité de catalyser spécifiquement la transformation d'une fonction donnée, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes susceptibles de réagir (OH, NH, SH...), cette propriété importante des lipases trouve un domaine d'application dans plusieurs études, surtout l'acylation des substrats polyfonctionnels tels que les aminoalcools des thioalcools ou des peptides[Jaeger and Eggert 2002]

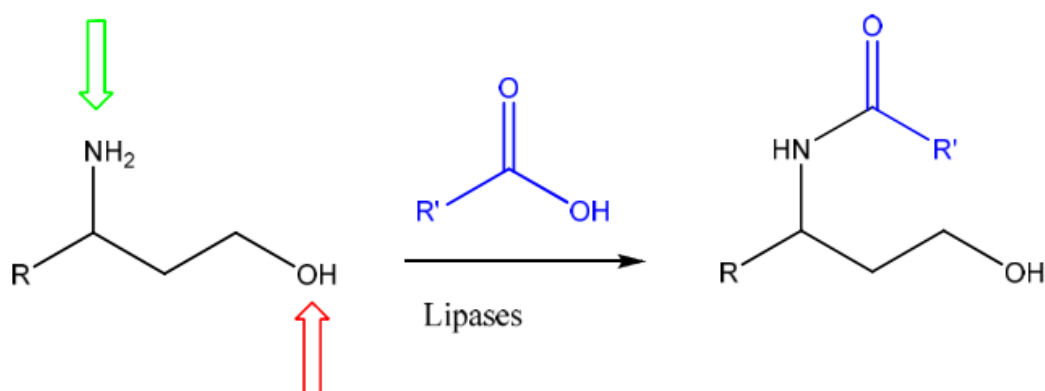


FIGURE 1.6 – La chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.

La régiosélectivité c'est la capacité d'une lipase à réagir préférentiellement avec certains sites d'un autre réactif parmi plusieurs possibilités, conduisant préférentiellement à certains produits parmi plusieurs possibles. Dans de nombreuses études, les lipases sont utilisées pour catalyser sélectivement et avec des rendements élevés la O-acylation de nombreux substrats poly-hydroxylés, tels que des sucres, des polyalcools[Li et al. 2016]

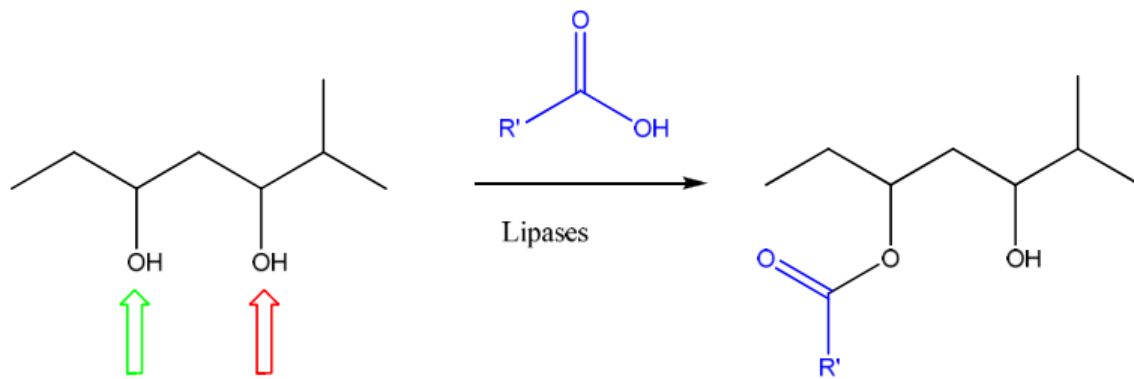


FIGURE 1.7 – La régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat

1.7.2 Enantiosélectivité

Une des principales utilisations des lipases en synthèse organique c'est pour leur chimio et régio-sélectivité mais aussi pour leur énantiosélectivité lors de la résolution des mélanges racémiques d'alcools et d'amines secondaires ou des esters chiraux.

1.8 Ultrasons

1.8.1 Généralités sur les ultrasons

Les ultrasons sont des ondes acoustiques sinusoïdales dont la plage de fréquence se situe entre 16 kHz et 10 MHz. L'unité de mesure des ultrasons se nomme Hertz (Hz). L'utilisation des ultrasons en chimie n'était qu'une simple curiosité il y a quelques années. Le concept de la cavitation acoustique était peu connu dans le domaine de la chimie appliquée. Avec le prix élevé des réactifs en chimie organique et leur grande toxicité, l'utilisation des ultrasons est devenue une avenue intéressante pour le chimiste pour diminuer l'utilisation de réactifs et les temps de réaction. Depuis les 20 dernières années, plusieurs recherches ont été effectuées sur l'utilisation des ultrasons lors de réaction chimique, la sonochimie est née. Les avantages de la sonochimie sont multiples; l'utilisation d'un milieu réactionnel organique ou aqueux, la production de radicaux lors de la cavitation. L'utilisation des ultrasons est aussi associé au domaine de la chimie verte, car il diminue la consommation d'énergie pour certaines réactions chimiques et diminue l'utilisation de divers réactifs toxiques pour l'environnement.[Faber 2001]

1.8.2 Utilisation des ultrasons en chimie

L'utilisation de la puissance des ultrasons par les chimistes est une nouvelle avenue pour l'application d'une énergie d'activation différente de ce qu'il est présentement utilisé soit, le chauffage, la lumière et la pression. Le premier chimiste qui étudié l'effet des ultrasons au travers un liquide est Alfred L. Loomis en 1927, la sonochimie est née. [Strauss et al. 1999]



FIGURE 1.8 – Ultrason utilisé dans notre travail

Les avantages des ultrasons viennent de la cavitation acoustique qui se traduit par la génération de bulles de cavitation, l'éclatement de la bulle engendre une zone de haute vitesse qui produit une augmentation de la vitesse des molécules dans cette région.[Fantin et al. 1995]

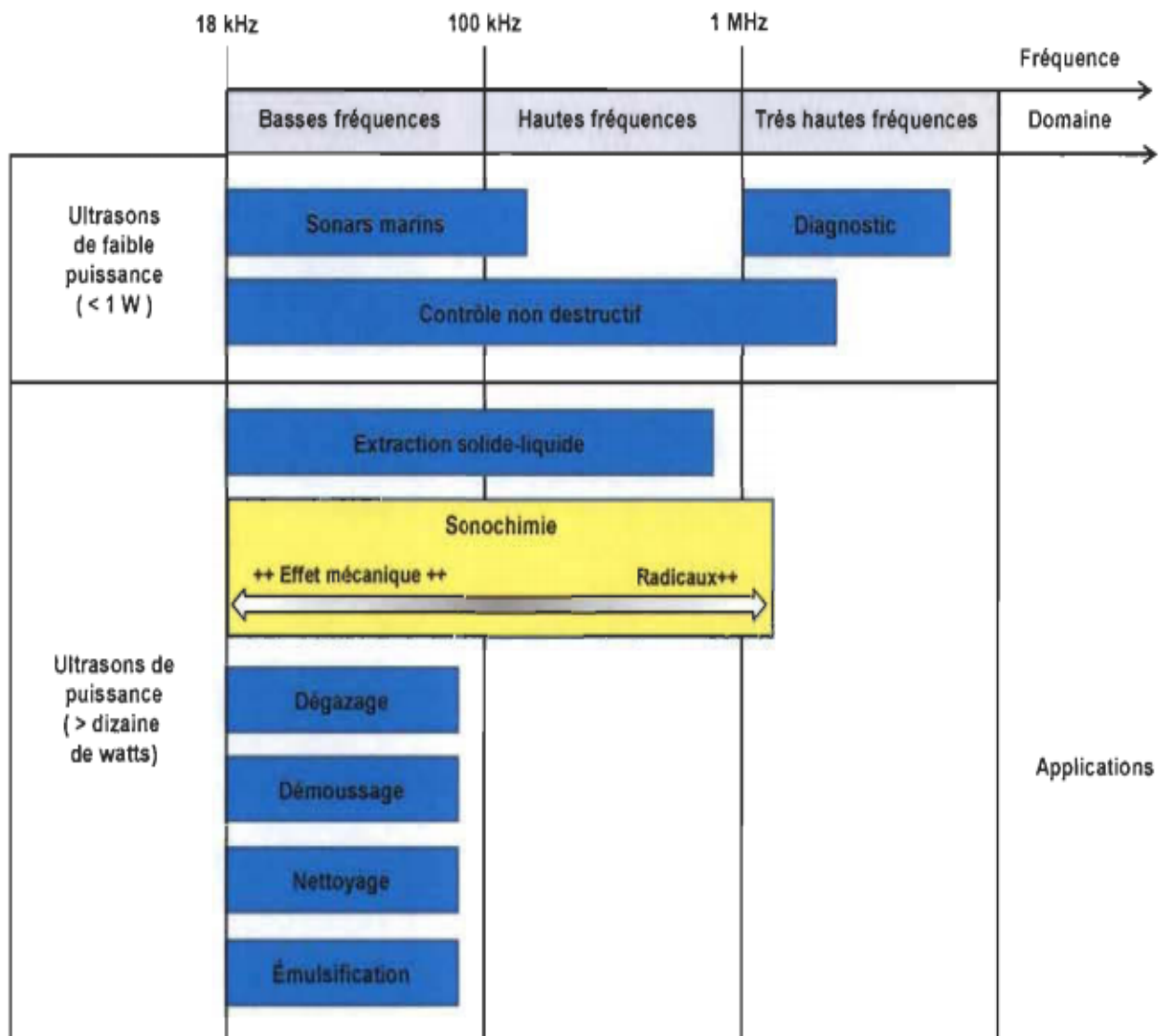


FIGURE 1.9 – Domaine ultrasonore et ses applications

1.8.3 Classification des ultrasons

Il est généralement admis que les ultrasons sont divisés en deux catégories :

- **Les ultrasons de faible puissance :**

aussi appelés ultrasons de diagnostic dont la fréquence est comprise entre quelques Mégahertz et quelques Gigahertz. Les intensités à ces fréquences sont relativement faibles (quelques Watts par cm) et n'entraînent aucune modification irréversible du milieu de propagation. Le principe consiste à émettre une onde ultrasonore dans le milieu à étudier et de capter l'écho produit par les hétérogénéités ou les frontières du milieu. Les applications les plus connues des ultrasons se trouvent dans cette

catégorie : l'échographie, la télémétrie (mesure de distances) ou encore la mesure des propriétés élastiques des matériaux... Elles sont toutes regroupées dans ce que l'on appelle le Contrôle Non Destructif (CND).

- Les ultrasons de puissance :

dont la fréquence est située entre 16 kHz et quelques Mégahertz. Les intensités peuvent atteindre plusieurs centaines de Watts par cm et de ce fait, l'interaction de l'onde avec le milieu de propagation peut créer des modifications physico-chimiques irréversibles au sein de celui-ci. De nombreuses applications sont possibles : le nettoyage, l'émulsification, l'homogénéisation, la sonoélectrochimie... Cette catégorie est elle-même divisée en deux groupes : les ultrasons basse fréquence allant de 20 à 100 kHz étant les plus utilisés et les ultrasons haute fréquence de 100 kHz à quelques Mégahertz. Nous utiliserons exclusivement ces hautes fréquences dans ce travail.[Sheldon et al. 1993]

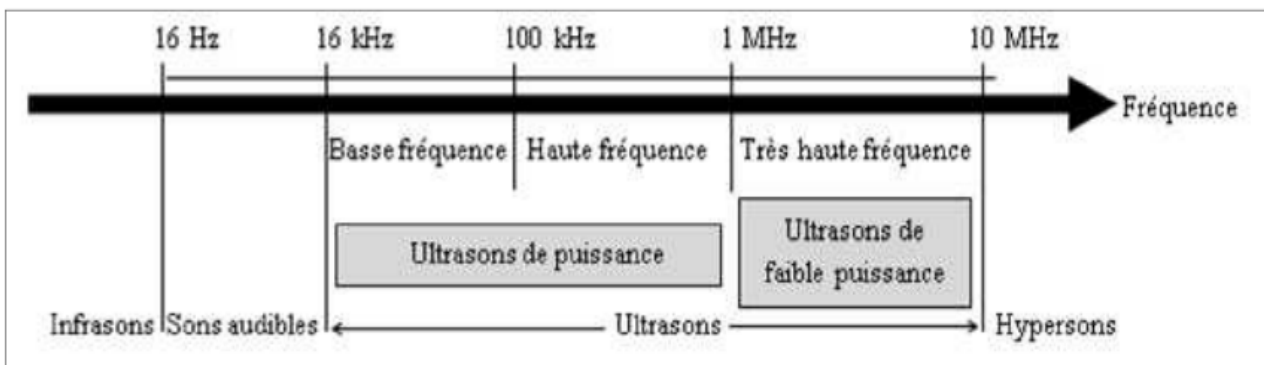


FIGURE 1.10 – Classification des ultrasons en fonction de leur fréquence et de leur puissance

1.9 Cavitation

1.9.1 Introduction

Dans certaines conditions, l'exposition d'un milieu liquide (ou semi-liquide) à des ultrasons donne naissance à des cavités ou bulles de gaz ou de vapeur au sein du milieu. Ce phénomène désigné sous le nom de cavitation, exige parfois la présence préliminaire dans le milieu de noyaux, c'est-à-dire de corpuscules gazeux de dimension de l'ordre du micromètre au maximum et qui sont stabilisés, grâce à la présence de crevasses ou de pores ou par d'autres moyens. Il s'est révélé utile de distinguer la cavitation stable et la Cavitation transitoire, il s'agit dans les deux cas de mécanismes importants pour les effets biologiques des ultrasons, le premier intervenant plus particulièrement aux faibles intensités (par exemple 300 mW/cm² ou moins dans l'eau) et le second aux fortes intensités. Dans de nombreuses expériences, les deux types de cavitation interviennent simultanément alors que, dans certaines situations, seule intervient la cavitation stable.

Les effets chimiques des ultrasons résultent des processus physiques qui créent, agrandissent et implosent les cavités gazeuses et vaporeuses dans un liquide. Les ondes ultrasonores, comme toutes les ondes sonores, se composent des cycles de compression et d'expansion. Les cycles de compression exercent une pression positive sur le liquide, poussant les molécules les unes contre les autres; contrairement aux cycles de compression, les cycles d'expansion exercent une pression négative, éloignant les molécules les unes des autres. Pendant le cycle de dépression, une vibration d'intensité suffisante peut produire des cavités. Un liquide est lié par les forces attractives, qui déterminent la résistance à la traction du liquide. Afin de former une cavitation, une grande pression négative liée au cycle d'expansion de l'onde ultrasonore est nécessaire pour surmonter la résistance à la traction du liquide [Suslick et al. 1989].

1.9.2 Seuil de cavitation

On appelle seuil de cavitation la pression nécessaire pour faire apparaître les premières bulles. Selon l'application visée, certaines études présentent ce seuil de cavitation en fonction de l'énergie (intensité ou puissance acoustique) qui est calculée à partir de la puissance. Apfel et Holland ont montré que le seuil de cavitation dépend de la fréquence : plus la fréquence est grande, plus l'amplitude de l'onde doit être importante pour pouvoir initier la cavitation [Apfel et al 1991]. Blake a prévu une pression acoustique minimum afin de créer une bulle sphérique libre de gaz, et vaincre ainsi les forces de tension superficielle. Il a supposé aussi des conditions de basses fréquences et des valeurs de viscosité négligeables. Quand la fréquence est suffisamment élevée, l'inertie du liquide retarde la croissance de la bulle pour une durée assez longue jusqu'à dépasser la phase de compression; ainsi, la pression acoustique doit être plus grande afin de surmonter les forces de cohésion [Leighton 2004]

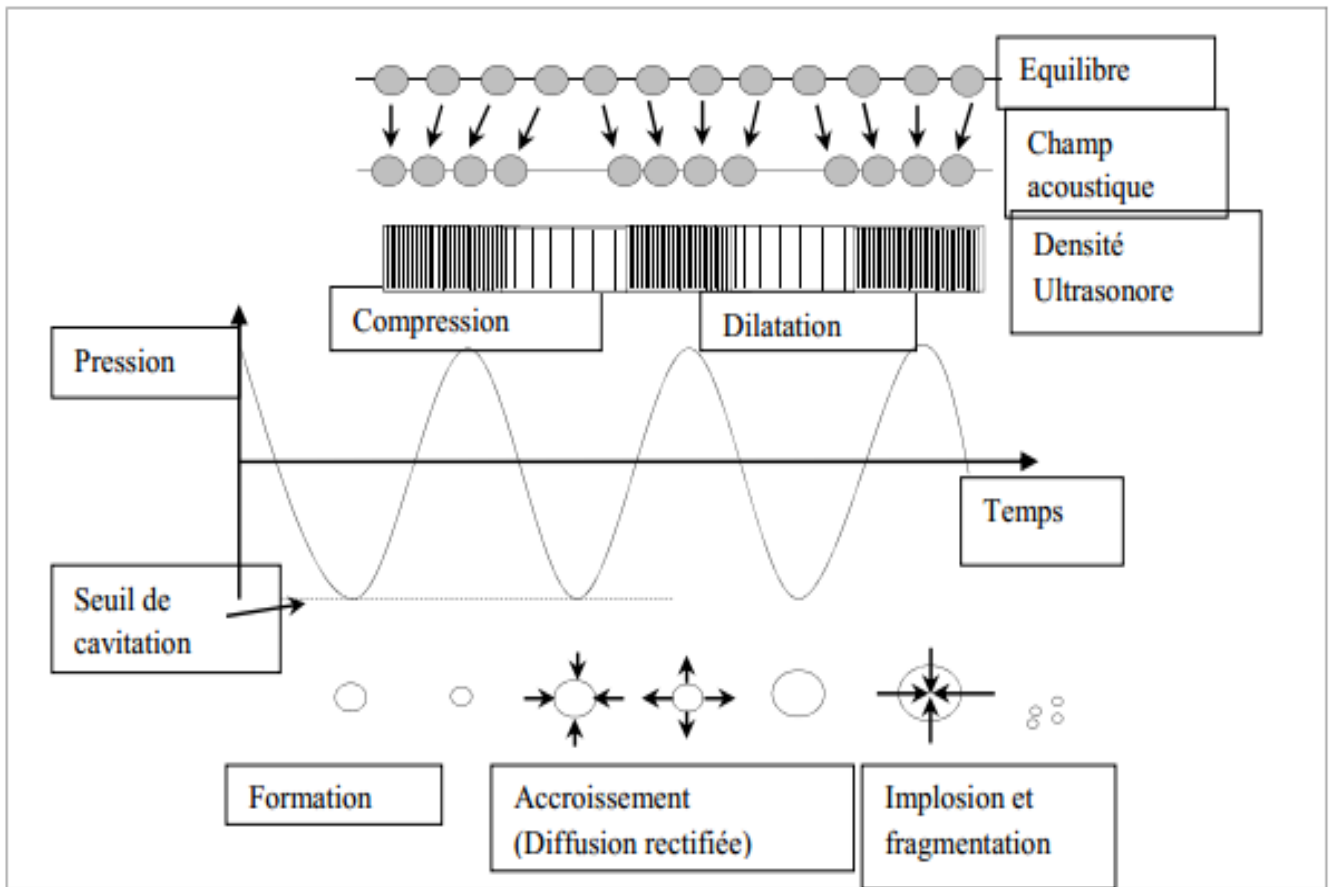


FIGURE 1.11 – Dynamique d'une bulle de cavitation acoustique

La pression acoustique nécessaire pour déclencher la cavitation ultrasonore est faible, de l'ordre de 1 à 2 bars pour un liquide saturé en gaz .

La présence des impuretés telles que les particules solides, les poussières, les microbulles de gaz ou de vapeurs piégées dans les micro-crevasses à la surface de ces particules solides et poussières dans le liquide réduit le seuil de la pression acoustique nécessaire pour la formation de la cavitation. Dans une crevasse, la surface de la poche de gaz est concave et sa tension superficielle réduit la pression à l'intérieur de la poche. La poche de gaz dans la crevasse se dilate pendant la phase de raréfaction des ultrasons permettant ainsi la diffusion du gaz dans la crevasse depuis le liquide environnant, ce qui a pour effet la diminution de la pression. Pendant la phase de compression, la poche de gaz rétrécit et sa pression augmente, il en résulte la diffusion du gaz de la poche vers le liquide. Par voie de conséquence de l'effet de surface, le taux de diffusion pendant l'expansion est plus élevée car le gradient de concentration du gaz dans le liquide est plus élevé. En conclusion, une bulle de gaz est créée d'une crevasse quand la poche de gaz se développe suffisamment [Madanshetty et al. 1991] [Borkent et al. 2008] comme le montre la Figure (1.10)

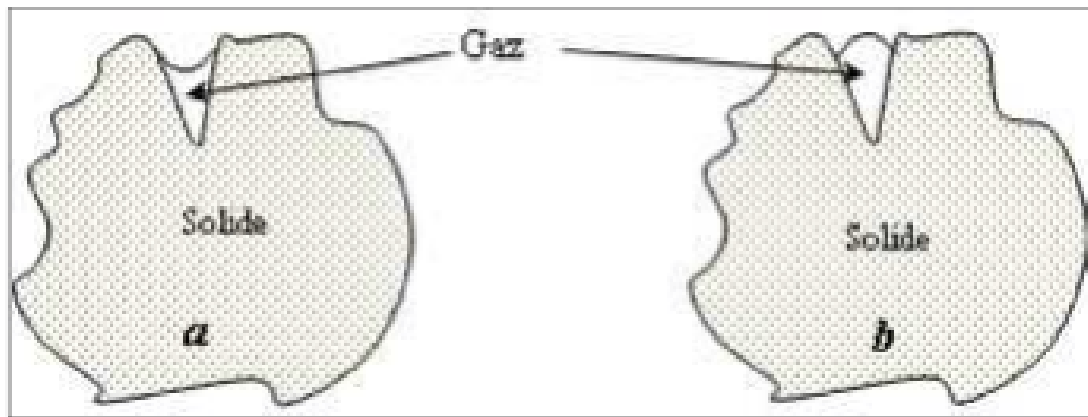


FIGURE 1.12 – Micro-crevasses à la surface d’une particule solide (a) en phase de compression (b) en phase de dilatation

1.9.3 Type de cavité

1.9.3.1 Cavité transitoire

Ce phénomène a lieu à forte intensité ultrasonore [Suslick 1989], supérieure à 10 W/cm [Henri 1992]. Ce type de bulles de cavitation grossit très rapidement puis implose violemment. Leur durée de vie n’excède pas quelques cycles et parfois même pas la fin d’un seul cycle comme l’illustre la Figure. L’implosion brutale de ces bulles conduit à la formation de nouveaux nucléis qui servent de germes de cavitation. On admet qu’il n’existe pas de transfert de gaz entre le liquide et la bulle mais seulement une vaporisation et une condensation de ce liquide [Lorimer and Mason 1987]. La taille typique d’une bulle de cavitation transitoire est comprise entre 2 et 10 μ m. Le paramètre permettant la définition d’une bulle comme étant transitoire, est le rapport entre son rayon d’équilibre et son rayon critique. Pour un intervalle de fréquence de 20 à 100 kHz, ce rapport est égal à 2 pour les bulles transitoires [Moholkar et al. 2000]

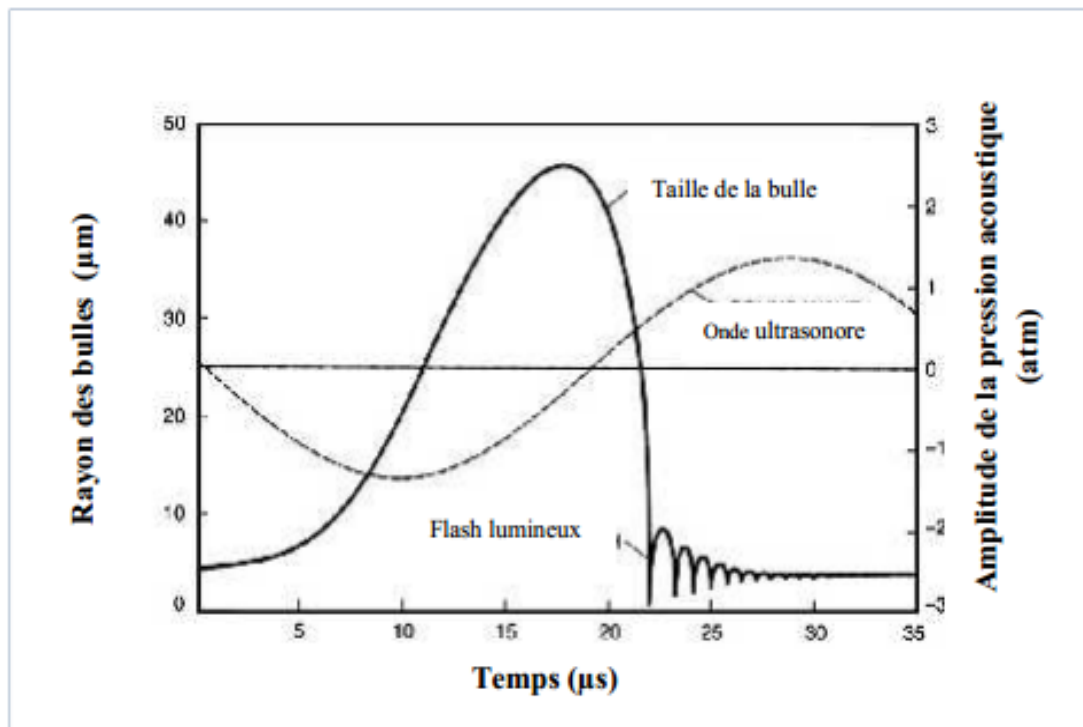


FIGURE 1.13 – Évolution de la taille d'une bulle de cavitation transitoire [Weissler et al. 1950]

1.9.3.2 Cavitation stable

Les cavitations stables ont lieu à faible intensité ultrasonore [Suslick 1989] de l'ordre de 1 à 3 W/cm [Henri 1992]. Dans ce cas, les bulles de gaz vibrent avec une faible amplitude autour d'une position d'équilibre pendant plusieurs cycles. Elles évoluent lentement par un transfert de gaz ou de vapeur du liquide. En effet, le flux de gaz lors de la phase de dépression, de l'extérieur vers l'intérieur de la bulle, est supérieur à celui de la phase de compression (de l'intérieur vers l'extérieur de la bulle). La taille des bulles augmente ainsi par diffusion rectifiée. Ces bulles peuvent ensuite soit, coalescer et remonter à la surface (effet de dégazage) soit disparaître par dissolution. L'amplitude d'oscillation des bulles est faible et leur durée de vie est grande. L'implosion de ces bulles stables est moins violente que celle des bulles transitoires, mais toutefois suffisante pour développer des températures et des pressions nécessaires pour créer des espèces radicalaires et/ou atomiques [Thompson and Doraiswamy 1999][Mason 2002].

1.10 Application des ultrasons

De nos jours les ultrasons possèdent une grande importance dans divers domaines

1.10.1 Applications médicales

Une physiothérapie comporte en général une série de séances, normalement de 5 à 20 min chacune, répétées quotidiennement ou de façon intermittente pendant plusieurs semaines. Le générateur d'ultrasons peut être appliqué directement sur la peau, par l'intermédiaire, comme agent de couplage, d'un liquide ou d'un gel. On peut aussi plonger dans l'eau le générateur et le membre à traiter. La pratique recommandée consiste à déplacer constamment le générateur de façon à assurer une distribution régulière de l'énergie ultrasonore absorbée dans le tissu. Aussi, les ultrasons sont exploités pour des approches interventionnelles directes utilisant des fortes puissances, ils permettent de détruire des substances ou tissus indésirables et pulvérisent des calculs rénaux. Ils sont également utilisés en kinésithérapie pour diminuer les douleurs, favoriser la circulation, aussi pour rendre des articulations moins raides.

1.10.2 Application au laboratoire

Le domaine d'application le plus répandu au niveau du laboratoire est celui du nettoyage et du dégraissage des solides par les bacs à ultrasons. Le nettoyage par ultrasons nécessite l'emploi de détergents spécifiques et souvent un léger chauffage (entre 60 et 80°C). Principe de fonctionnement : La génération de microbulles dans le liquide contenu dans le bain à ultrasons, et leur implosion est le principal vecteur de nettoyage ou de traitement approprié. Il doit être conjugué au détergent adéquat. L'efficacité est directement liée à la puissance (l'amplitude) généralement réglable, et à la fréquence, fixe ou sélectionnable sur certains modèles. La plupart des bains de laboratoire travaillent entre 35 et 40 KHz.

Les fréquences : Plus la fréquence est basse, plus l'énergie est importante.

25 KHz : Nettoyage puissant de surfaces dures, très souillées par des graisses, huiles, cires et poussières. A proscrire pour les matériaux et métaux tendre tel l'aluminium.

30 KHz : Conseillé pour les pièces de verre non volumétrique, métaux et plastiques, dégazage de solvants et solutions aqueuses. Convient très bien au nettoyage de contenants utilisés pour des calcinations, travaux de chimie organique, ...

40 KHz : Surfaces tendres, minéraux précieux, métaux tendres, dégazage et verrerie volumétrique de précision.

130 KHz : Nettoyage de pièces très fragiles (joaillerie, électronique, ...) Le choix du détergent spécifique est primordial.

Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse de routine essentielle dans de nombreux laboratoires. Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée figure(2.1). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention [Rouessac 2004].

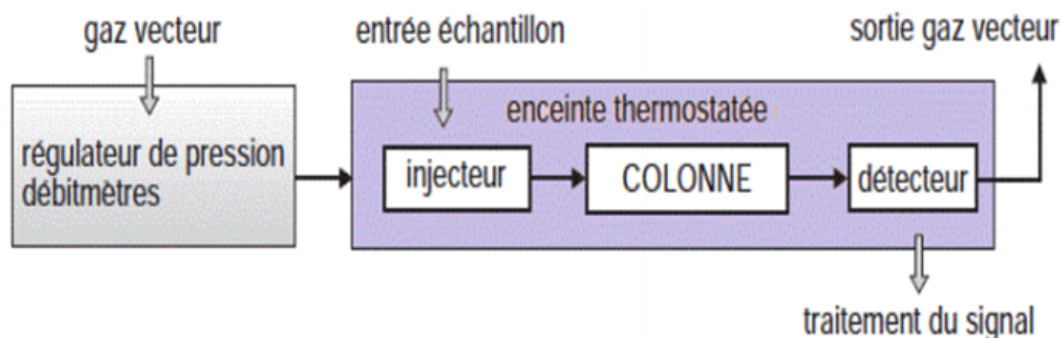


FIGURE 2.1 – Principe de fonctionnement d'une CPG

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG) utilisé dans notre travail : GC-17, SHIMADZU : équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme d'hydrogène (FID). Et d'une colonne capillaire chirale Beta-dex™ 325 (30 m x 0,25 mm x 0,25 m) .

Les conditions de méthode d'expériences sont les suivantes :

- température initiale : 120°C
- temps initiale : 12 min
- température finale : 200°C

- temps finale : 30 min
- vitesse : 6°C/min



FIGURE 2.2 – CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU

2.1.2 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. Les analyses sont réalisées sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice *MERCK60F₂₅₄* (couche : 0.2 mm ; la détection des taches est effectuée avec un indicateur UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$))

phase mobile : éther de pétrole / éther diéthylique : 30/70.

Rf_1 (propionate de phényléthanol) : 0.61.

Rf_2 (1-phenylethanol) : 0.5.

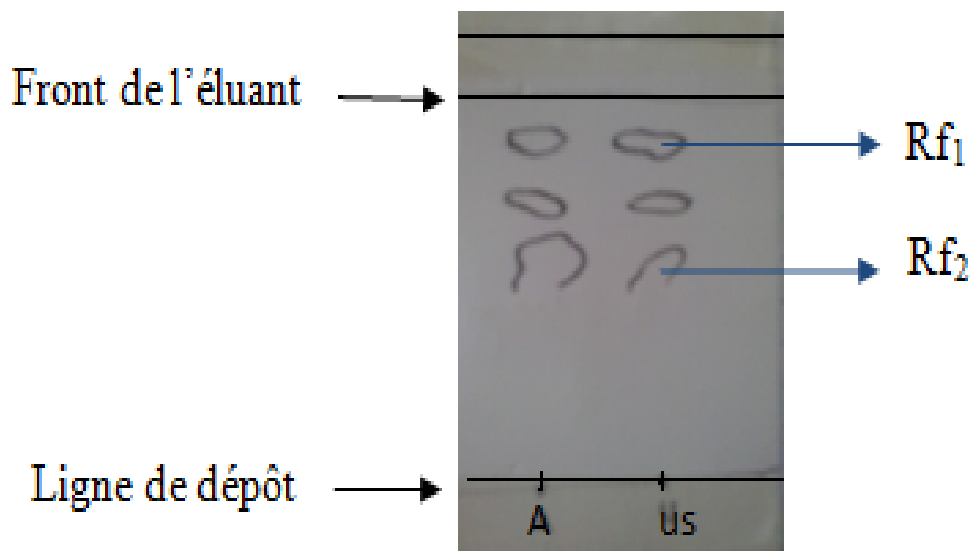


FIGURE 2.3 – Analyse par CCM

2.2 Enzymes et réactifs

2.2.1 Lipases

CRL (lipase de *Candida rugosa* type VII, 700 U/mg) : La lipase de *Candida rugosa* (CRL) a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir de poudre brute. CRL hydrolyse les triacylglycérols sans spécificité de longueur de chaîne[Sarda and Desnuelle 1958]. Une activité spécifique d'environ 800 U / mg était mesurée avec la trioléine ou la tributyrine comme substrat à 37 °C et pH 8. La CRL est une vraie lipase. Cette enzyme présente le phénomène d'activation interfaciale lorsque la tripropionine a été utilisée comme substrat[MTIBAA et al.].

2.2.2 Alcool

(R,S)-phényléthanol est un liquide incolore, peu volatil, à faible odeur florale de type hyacinthe/gardénia, ou une odeur rappelant l'amande. Il est combustible mais très peu inflammable.

Formule	$C_8H_{10}O$
Etat Physique	Liquide
Masse Molaire	122.16 g/mol
Point de Fusion	19-20°C
Point d'ébullition	204°C
Densité	1.012 g/mol
Pureté	>99 %
Solubilité	Soluble dans l'eau, l'alcool et le glycérol

TABLE 2.1 – Propriétés physiques et chimiques de l'alcool

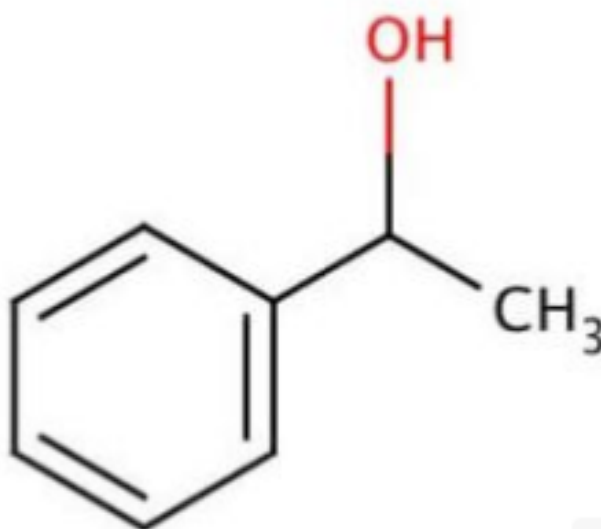


FIGURE 2.4 – représentation chimique du 1-phénylethanol

2.2.3 Donneurs d'acyle

Le propionate de vinyle est le composé organique de formule $CH_3CH_2CO_2CH = CH_2$. Ce liquide incolore est l'ester d'acide propionique et d'alcool vinylique. Il est utilisé pour produire des poly ainsi que des copolymères avec des esters d'acrylate.

Formule	$C_5H_8O_2$
Etat Physique	Liquide
Masse Molaire	100.117 g/mol
Point de Fusion	- 80°C
Point d'ébullition	93 à 94°C
Densité	0.917 g/cm ³ (20°C)
Pureté	>99 %
Solubilité	6.5 mL/L

TABLE 2.2 – Propriété physique et chimique du propionate de vinyle

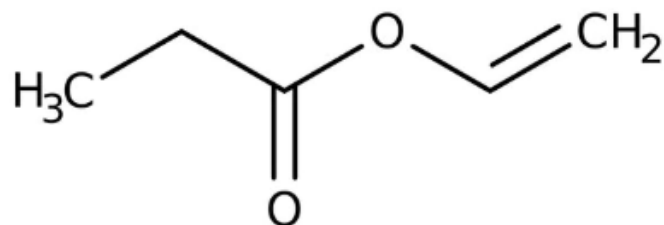


FIGURE 2.5 – représentation chimique du propionate de vinyle

2.2.4 Solvants

	Formule	Masse Molaire	Densité	Point de Fusion	Point d'ébullition	Log P
Ether diéthylique	$C_4H_{10}O$	74.1216 g/mol	0.714 g/cm ³	- 116 °C	35 °C	0.89
Hexane	C_6H_{14}	86.1754 g/mol	0.6594 g/cm ³	- 95.3 °C	68.73 °C	3.50
Toluène	C_7H_8	92.1384 g/mol	0.867 g/cm ³	- 95 °C	110.58 °C	2.73
Dichlorométhane	CH_2Cl_2	84.933 g/mol	1.33 g/cm ³	- 95.1 °C	40 °C	1.25
Chloroforme	$CHCl_3$	119.378 g/mol	1.4892 g/cm ³	- 64 °C	62 °C	1.97
THF (Tétrahydrofurane)	C_4H_8O	72.1057 g/mol	0.89 g/cm ³	- 108.5 °C	66 °C	0.46

TABLE 2.3 – Propriétés chimiques des solvants utilisés

2.3 Protocoles des réactions réalisées

2.3.1 Prétraitement des lipases par ultrasons

Dans un tube hermétiquement fermé, 50 mg de lipase (lipase de *Candida rugosa* CRL) sont solubilisés dans 3,5 ml de solvant (Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane, Chloroforme, THF) traités aux ultrasons pendant une heure. Dans un autre tube hermétiquement fermé, nous ajoutons 5mM d'alcool ((R,S)-1-phenylethanol) et 10 mM de donneur d'acyle (vinyl propionate). Ensuite, nous ajoutons l'enzyme prétraitée. Puis le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 4 heures à une température de 45°C. A la fin de la réaction, nous prélevons un échantillon de 25 μL pour analyse (par CPG).

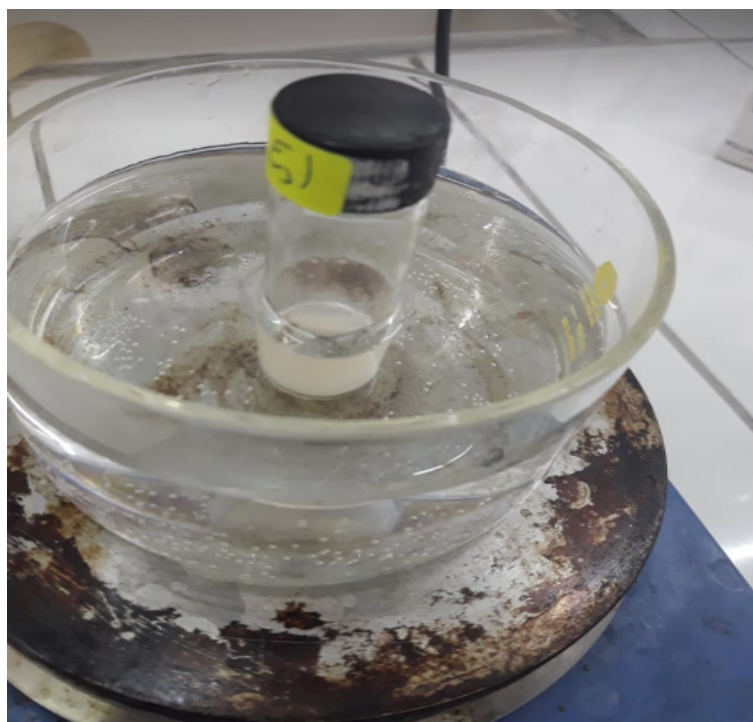


FIGURE 2.6 – Prétraitement de la lipase par l'US

2.3.2 Réaction sous agitation magnétique

Dans un tube hermétiquement fermé, 5 mM d'alcool secondaire racémique ((R,S)-1-phenylethanol) et 10 mM de donneur d'acyle(vinyl propionate) sont solubilisés dans 4 ml de solvant organique(Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane, Chloroforme, THF). La réaction est ensuite initiée par addition de 50 mg de lipase (lipase de *Candida rugosa* CRL) et mise sous agitateur magnétique pendant 4 heures à une température ne dépassant pas 45°C. A la fin de la réaction, nous prélevons un échantillon de 25 microlitres pour analyse (par CPG).



FIGURE 2.7 – Réaction réalisée sous agitation magnétique

2.3.3 Réaction sous ultrasons

Dans un tube hermétiquement fermé, 5 mM d'alcool secondaire racémique ((R,S)-1-phényléthanol) et 10 mM de donneur d'acyle (vinyl propionate) sont solubilisés dans 4 ml de solvant organique (Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane, Chloroforme, THF). La réaction est ensuite initiée par addition de 50 mg de lipase (lipase de *Candida rugosa* CRL) et mise sous ultrasons pendant 4 heures à une température ne dépassant pas 45°C. A la fin de la réaction, nous prélevons un échantillon de 25 μ L pour analyse (par CPG).



FIGURE 2.8 – Réaction réalisée sous US

Résultats et discussions

1. INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, différentes études ont montré que l'activité, la stabilité et la sélectivité des enzymes peuvent être considérablement renforcées par un changement de milieu réactionnel [Jin et al. 2001][Lozano et al. 2001][Van Rantwijk et al. 2003]. Les solvants influencent ainsi les enzymes d'une manière complexe impliquant de nombreuses interactions entre le solvant, les substrats et l'enzyme.

Au début les enzymologistes utilisaient l'eau comme solvant. Car l'eau est le solvant par excellence pour les réactions biochimiques dans le monde vivant. Ainsi, les applications de la catalyse enzymatique concernaient essentiellement des réactions d'hydrolyse. Cependant, de nombreuses enzymes fonctionnent dans un environnement hydrophobe, par exemple les lipases et les déshydrogénases. Ces enzymes, se retrouvent essentiellement au niveau des membranes cellulaires, et sont actives dans la cellule pour une concentration en eau inférieure à 55,55 M. Le fait que naturellement, elles fonctionnent dans un milieu hydrophobe, permet de mieux expliquer qu'elles conservent leurs activités dans un milieu organique contenant une faible quantité d'eau [Dordick 1989].

Notre travail a pour objectif l'étude de l'effet des ultrasons sur la résolution enzymatique d'un alcool secondaire, le (R,S)-1-phényléthanol, avec le propionate de vinyle comme donneur d'acyle présence de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) dans différents solvants organiques. Pour avoir un élément de comparaison sur l'effet des ultrasons (US), les réactions ont été effectuées sous agitation magnétique classique, en l'absence d'ultrasons. Ensuite, seule l'enzyme a reçu un prétraitement aux US puis introduite dans le mélange réactionnel, et enfin, les réactions ont été réalisées directement sous US. Dans ce chapitre nous allons présenter nos résultats de l'effet du solvant et des ultrasons (US) sur la réaction enzymatique, en particulier sur son énantiosélectivité caractérisée par le facteur E.

3.1 Généralité sur le 1- phényléthanol

Le 1-phényléthanol est un alcool secondaire utilisé comme molécule modèle dans les réactions catalysées par les lipases et surtout comme intermédiaire très utile en synthèse organique. Chacun des deux énantiomères du 1-phényléthanol est utilisé comme réactif chiral pour la détermination de la pureté énantiomérique, comme conservateur dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique.

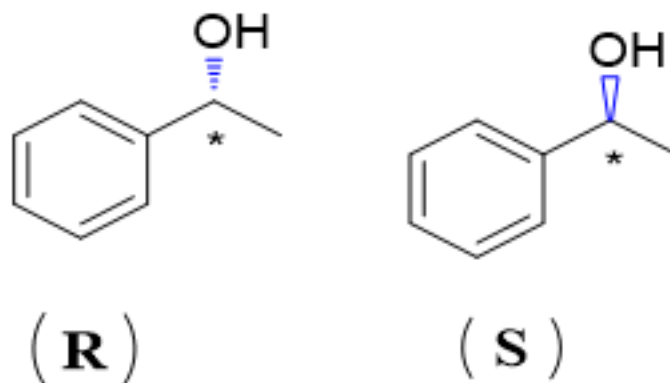


FIGURE 3.1 – 1-phényléthanol

3.2 Effets du solvant sur la réaction enzymatique

Le solvant joue un rôle important dans le fonctionnement des enzymes. L'activité et la sélectivité de l'enzyme peuvent être affectées de manière très importante selon la nature du solvant réactionnel.

Cependant, pour préserver l'intégrité conformationnelle de l'enzyme, celle-ci doit garder un niveau minimal d'hydratation. Ainsi, le solvant utilisé ne doit pas être strictement anhydre ni être trop polaire.

Dans le cas des réactions d'hydrolyse enzymatique, celles-ci ont lieu en milieu tampon. En général une petite quantité de solvant organique est rajoutée afin de solubiliser le substrat organique. Dans l'exemple suivant, qui décrit la réaction de l'hydrolyse de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate, les résultats montrent l'influence du solvant sur la sélectivité de l'enzyme. L'addition du toluène et de l'acétonitrile, à la solution tampon, s'est avérée bénéfique en termes de taux de conversion et d'énantiosélectivité. En présence de l'hexane, seule la réactivité est améliorée.

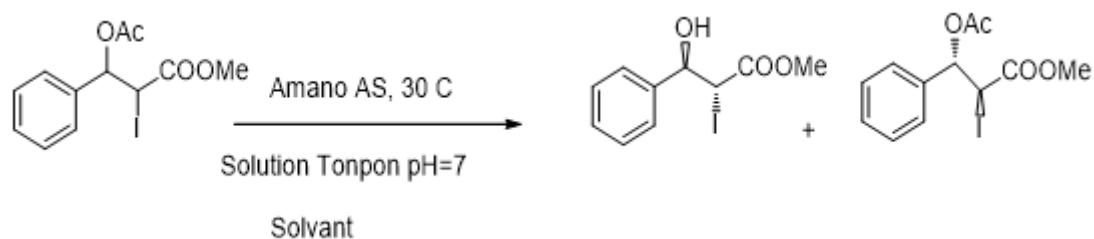


FIGURE 3.2 – Hydrolyse enzymatique de l'ester anti-3-acetoxy-2-iodo-3-phenylpropanoate.

3.3 Généralité sur l'énantiosélectivité

Un grand nombre d'enzymes présentent un caractère énantiosélectif, c'est-à-dire la catalyse préférentielle d'une des deux formes chirales d'un substrat et permettent donc le dédoublement cinétique de mélanges racémiques. L'énantiosélectivité est généralement caractérisée au moyen de l'excès énantiomérique du substrat, noté (ee_s) (équation 1) ou du produit (ee_p) (équation 2). La variation des paramètres (ee_s) et (ee_p) est fonction du taux de conversion (équation 3).

$$\%ee_s = \frac{R - S}{R + S} * 100 \dots (1)$$

$$\%ee_p = \frac{P_R - P_S}{P_R + P_S} * 100 \dots (2)$$

$$\%C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100 \dots (3)$$

R et S représentent les concentrations des énantiomères substrats, P_R et P_S les concentrations des énantiomères produits de la réaction. Le facteur de sélectivité (E) qui caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour un énantiomère donné, est le rapport de vitesse de formation des deux énantiomères en compétition soit :

$$E = \frac{K_R}{K_S}$$

En tenant compte des équations (1) et (2), le facteur d'énantiosélectivité (E) peut alors s'exprimer

comme suit :

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - C(1 + ee_p)]}{\text{Ln}[1 - C(1 - ee_p)]} \dots (4) \text{ou}$$

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - C(1 - ee_s)]}{\text{Ln}[1 - C(1 + ee_s)]} \dots (5)$$

Ces équations sont valables uniquement dans le cas d'une réaction enzymatique irréversible.

3.4 RESULTATS ET DISCUSSION

Notre travail a pour objectif l'étude de l'effet des ultrasons sur la résolution enzymatique d'un alcool secondaire, le (R,S)-1-phényléthanol, avec le propionate de vinyle comme donneur d'acyle.

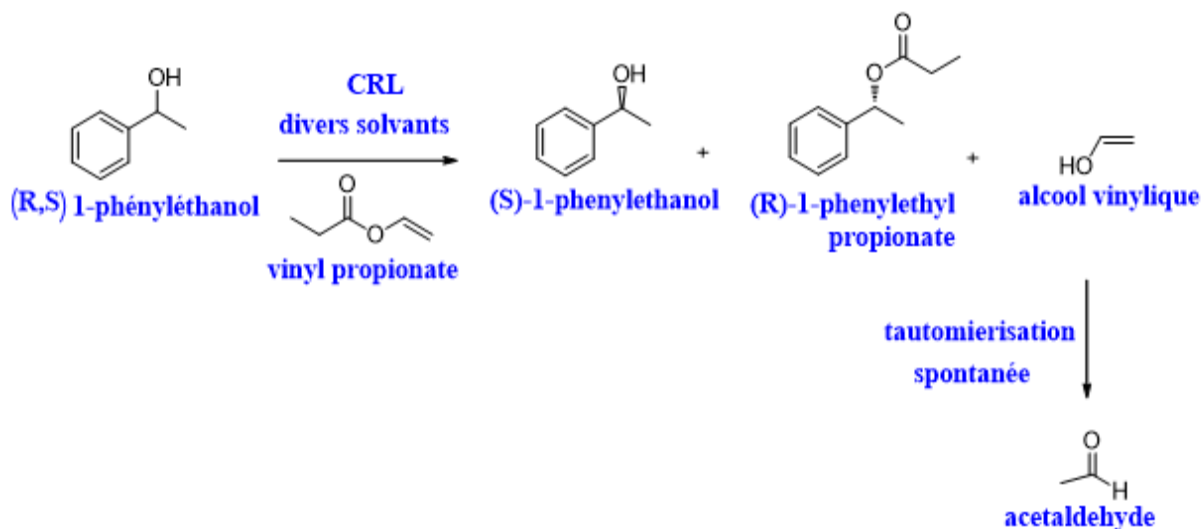


FIGURE 3.3 – Tranestérification enzymatique du 1-phényléthanol racémique

Dans un objectif de généralisation de notre étude nous avons effectué cette réaction modèle dans différents solvants organiques. Afin de quantifier l'effet de ces derniers, nous avons pris le facteur logP qui mesure l'hydrophobicité du solvant et qui est un indicateur très employé en biocatalyse.

3.4.1 Réaction sous agitation magnétique

La réaction de transestérification du (R,S)-1-phényléthanol avec le propionate de vinyle en présence d'une lipase (CRL) a été réalisée sous agitation magnétique (sans ultrasons). Cette réaction a été effectuée dans six solvants différents (Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane, Chloroforme et le THF). La réaction a été suivie par CCM, ensuite par CPG (voir partie expérimentale). Grâce à cette technique, nous avons également déterminé les valeurs d'ees et eep (excès énantiomériques du substrat et du produit), la conversion (%C) et E (facteur d'énantiosélectivité) en utilisant les équations précédentes 1, 2, 3, 4 ou 5 respectivement « comme le montre la Table 3.1 »

Solvants	LogP	Conversion (%C)	Enantiosélectivité (E)
Ether diéthylique	0.89	16.13	9.83
Hexane	3.50	18.35	8.19
Toluène	2.73	15.28	9.50
Dichlorométhane	1.25	17.16	2.10
Chloroforme	1.97	8.50	2.00
THF	0.46	7.32	2.48

TABLE 3.1 – résultats obtenus sous agitation magnétique dans différent solvants organique

L'histogramme ci-dessous (Figure 3.4) illustre mieux la conversion et l'énantiosélectivité de chaque solvant.

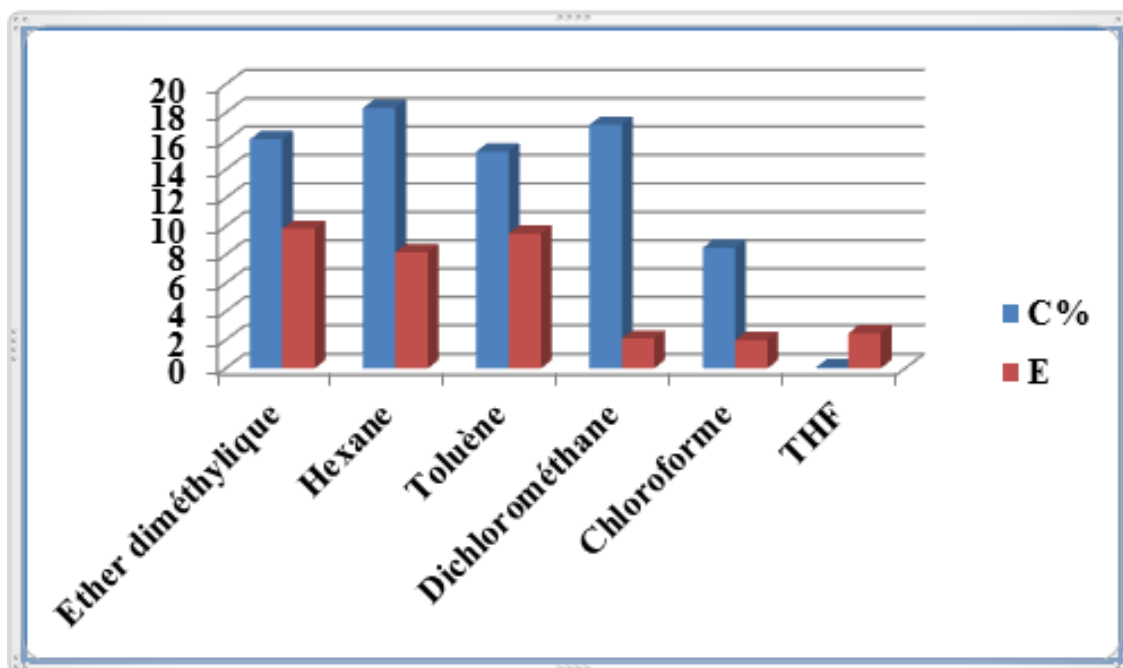


FIGURE 3.4 – Histogramme comparant la conversions et énantiométries dans chaque solvant (sans US)

Les résultats obtenus présentent des conversions entre 7,32% et 18,35% et des énantiosélectivités variant entre $E=2,00$ à $E=9,83$. La réaction en présence de l'éther diéthylique donne une très haute valeur d'énantiosélectivité $E=9,83$ et une conversion acceptable ($C=16,13\%$) contrairement dans le chloroforme qui est $E=2,00$.

3.4.2 Réaction après prétraitement de la lipase aux US

Dans ce cas, la lipase est prétraitée aux US avant d'être introduite dans le milieu réactionnel qui est soumis ensuite à une agitation magnétique classique (tableau 3.2 et figure 3.5).

Solvants	LogP	Conversion (%C)	Enantiosélectivité (E)
Ether diéthylique	0.89	18.12	12.27
Hexane	3.50	25.24	17.30
Toluène	2.73	22.51	12.11
Dichlorométhane	1.25	14.74	3.01
Chloroforme	1.97	10.50	2.37
THF	0.46	8.29	3.83

TABLE 3.2 – Résultats obtenus sous prétraitement dans différents solvants organiques

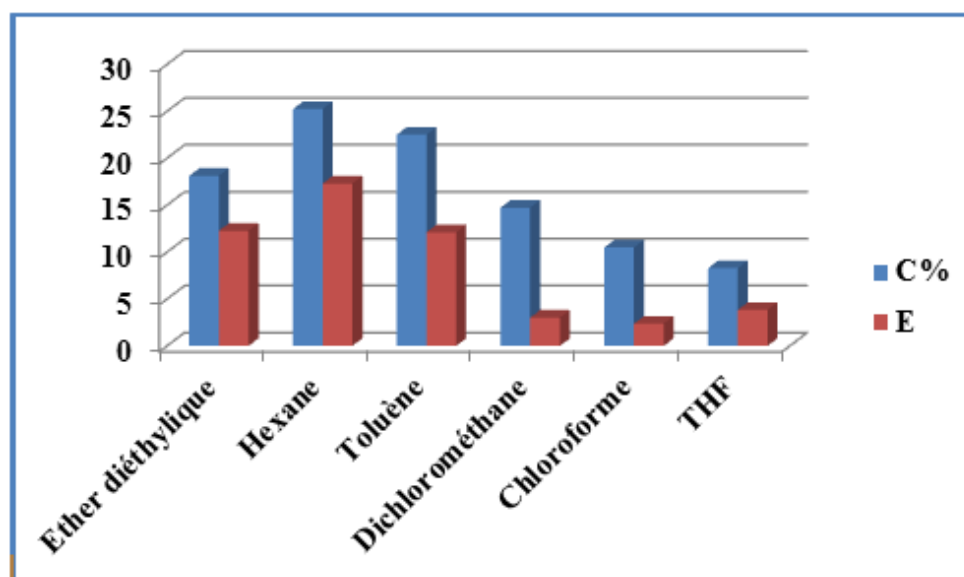


FIGURE 3.5 – Histogramme comparant la conversions et énantiosélectivités dans chaque solvant (Après prétraitement).

Les résultats obtenus montrent qu'on a un intervalle de conversion entre 8,29% et 25,24% et de facteur d'énantiosélectivité entre $E=2,37$ à $E=17,50$. La plus grande valeur de conversion et d'énantiosélectivité a été obtenue dans l'hexane comme solvant.

3.4.3 Réaction sous ultrasons

Dans ce cas les ultrasons ont été employés pendant toute la durée de la réaction. Pour ce faire, nous avons utilisé un bain à ultrasons (Fréq : 42 KHz, Puiss : 70w) avec une température maintenue à 32°C et en gardant les mêmes conditions opératoires utilisées dans la réaction sans ultrasons. Les analyses par CPG nous ont permis de déterminer les excès énantiomériques du (S)-1-phényléthanol et (R)-Acétate de-1-phényléthyle. Comme pour la réaction réalisée sous agitation (sans US), les valeurs de C (la conversion) et E (rapport énantiomérique) ont été déterminées en utilisant les équations (3) et (4) citées plus haut

Solvants	LogP	Conversion (%C)	Enantiosélectivité (E)
Ether diéthylique	0.89	23.86	17.65
Hexane	3.50	37.28	20.90
Toluène	2.73	26.91	19.49
Dichlorométhane	1.25	17.16	5.09
Chloroforme	1.97	13.48	3.86
THF	0.46	12.72	5.44

TABLE 3.3 – Résultats obtenus sous l’ultrason dans différents solvants organiques.

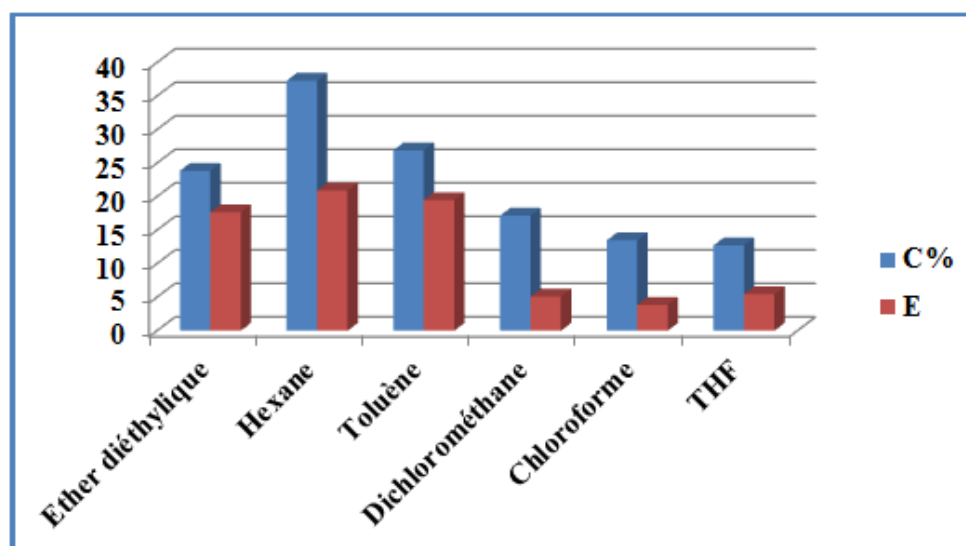


FIGURE 3.6 – Histogramme comparant la conversions et énantiosélectivités dans chaque solvant (Sous US).

Pour cette approche, l’examen général des résultats révèle que les valeurs de la conversion et le facteur d’énantiosélectivité varient entre 12,72% et 37,28% et E=3,86 et 20,90 respectivement. Les meilleures conversions et les énantiosélectivités les plus élevées sont obtenues avec l’hexane qui est le solvant le plus hydrophobe (LogP = 3,5).

3.5 Comparaison des C et des E dans les trois approches

3.5.1 Comparaison des conversions

Afin de réaliser une comparaison entre le comportement de la lipase vis-à-vis de l'agitation magnétique (sans US), après prétraitement et sous irradiations ultrasoniques, nous avons rassemblé l'ensemble des résultats obtenus dans le tableau suivant (tableau 3.4; figure 3.7).

Solvants	LogP	%C sous agitation	%C après prétraitements	%C sous US
Ether diéthylique	0.89	16.13	18.12	23.86
Hexane	3.50	18.35	25.24	37.28
Toluène	2.73	15.28	22.51	26.91
Dichlorométhane	1.25	10.73	14.74	17.16
Chloroforme	1.97	8.50	10.50	13.48
THF	0.46	7.32	8.29	12.72

TABLE 3.4 – Comparaison des conversions, en présence et en absence des US

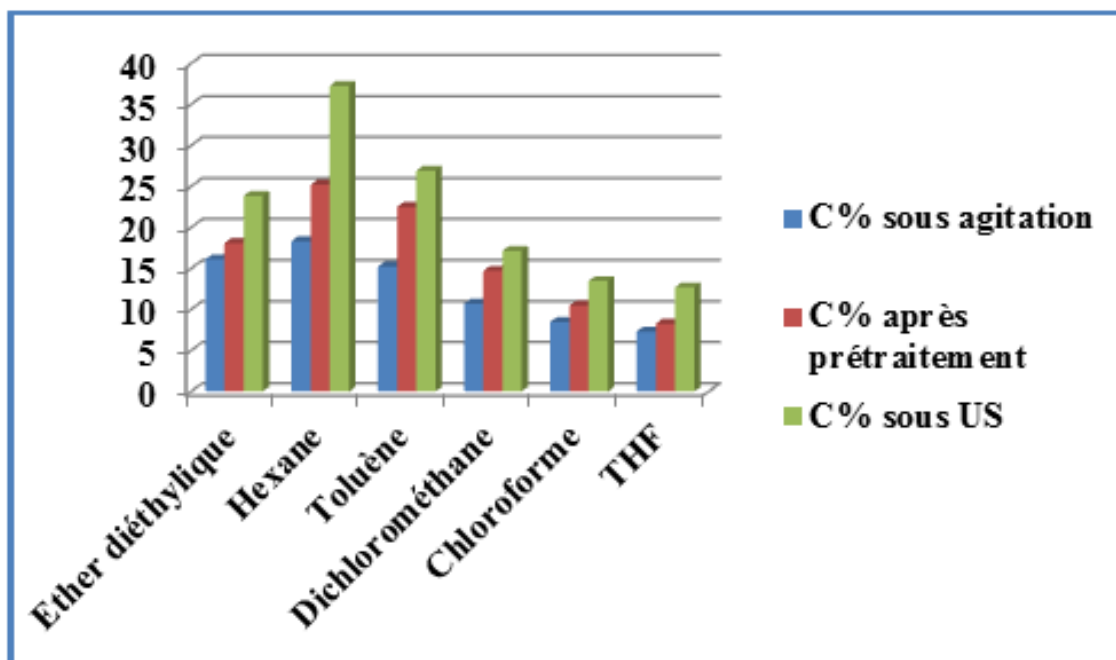


FIGURE 3.7 – Histogramme de comparaison entre les conversions, avec et sans US

Les résultats laissent apparaître une augmentation remarquable de la conversion lorsque les ultrasons sont utilisés en prétraitement et mieux pendant la durée de la réaction et ce, quelque soit le solvant utilisé. Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus pour l'hexane. Il semble par ailleurs que l'hydrophobicité du solvant soit un facteur favorable.

3.5.2 Comparaison des énantioselectivités

L'analyse chromatographique permet d'identifier le facteur d'énantioselectivité (E) qui est l'élément le plus important pour l'étude des molécules bioactives. Les résultats sont donnés dans le tableau et la figure suivants (tableau 3.5 ; figure 3.8).

Solvants	LogP	E sous agitation	E après prétraitement	E sous US
Ether diéthylique	0.89	9.83	12.27	17.65
Hexane	3.50	8.19	17.30	20.90
Toluène	2.73	9.50	12.11	19.49
Dichlorométhane	1.25	2.10	3.01	5.09
Chloroforme	1.97	2	2.37	3.86
THF	0.46	2.48	3.83	5.44

TABLE 3.5 – Comparaison d'énantioselectivité, en présence et en absence des US

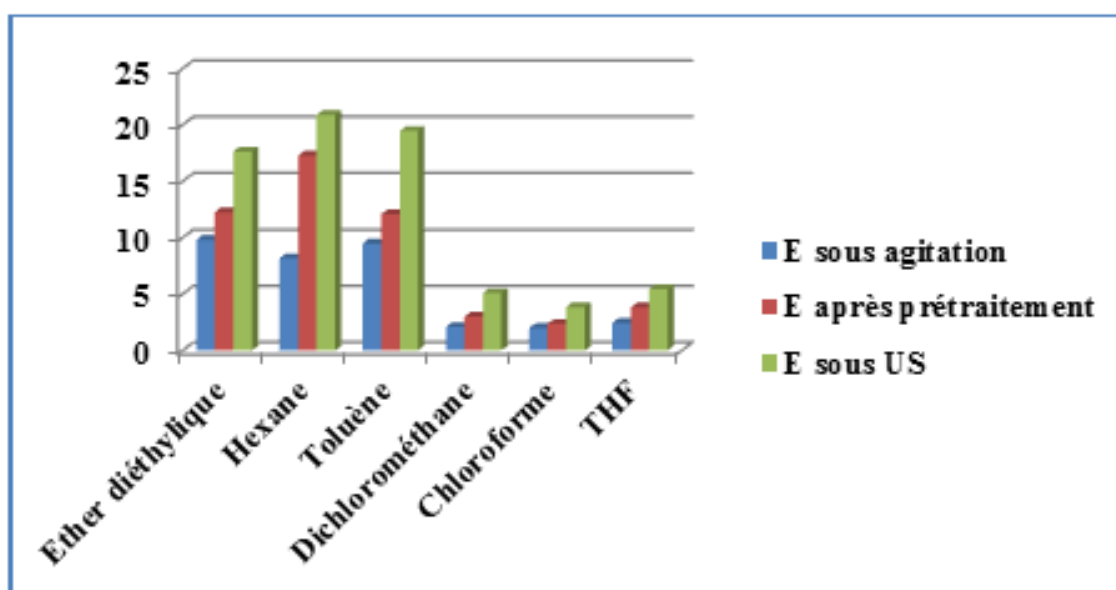


FIGURE 3.8 – Histogramme de comparaison entre les énantioselectivités, avec et sans US

Ces résultats indiquent que l'énantioselectivité a légèrement augmentée en présence des irradiations ultrasonores. Avec l'hexane par exemple l'énantioselectivité a augmenté de 8,19 à 20,90. Par ailleurs, dans le chloroforme l'énantioselectivité s'est améliorée, mais, est restée la plus faible.

3.6 Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié la réaction de transestérification enzymatique du 1- phényléthanol avec le propionate de vinyle en présence de différents solvants organiques.

Nous avons examiné l'effet des ultrasons sur l'énantioselectivité de la réaction selon deux approches : prétraitement de la lipase aux US avant réaction et réaction sous US. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux donnés par les réactions en l'absence d'US.

Nous avons observé que comparativement à la réaction sans ultrasons, les conversions et les énantiométries sont sensiblement améliorées lorsque l'enzyme a subi un traitement aux US préalable. Cette amélioration est nettement plus visible lorsque la réaction est effectuée directement sous ultrasons.

En conclusion, l'utilisation des ultrasons dans les réactions biocatalysées est une méthode performante tant du point de vue conversion que de celui très important de l'accès aux molécules chirales par l'augmentation de l'énantioselectivité de la réaction.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce manuscrit rentre dans le cadre de la synthèse par voie enzymatique d'intermédiaires réactionnels optiquement actifs, indispensables à la synthèse de nombreux médicaments. Une résolution enzymatique du (R,S)-1-phényléthanol avec le propionate de vinyle comme donneur d'acyle en présence de la lipase *Candida Rugosa* (CRL) assistée par ultrason a été étudié. Pour ce faire nous avons réalisées trois approches différentes : US pendant toute la réaction, prétraitement de la lipase par US avant la réaction et en présence des US. Cette étude montre les effets des ultrasons sur la conversion (C) et l'énantiosélectivité (E) et en utilisant comme méthodes d'analyse la chromatographie en phase gazeuse.

Le premier chapitre de ce mémoire a été consacré à une étude bibliographique sur les ultrasons qui ont un grand nombre d'applications, les Enzymes qui ont une large étendue dans ces dernières décennies particulièrement les hydrolytiques telles que les lipases sont fréquemment utilisées en raison de leur compatibilité avec une large gamme de substrats et présentent souvent une grande énantiosélectivité et plusieurs avantages, ce qui leur permet d'être utilisées dans différents domaines. et en fin les effets des ultrasons sur la réaction enzymatique qui peuvent améliorer le rendement et l'énantiosélectivité de nombreuses réactions enzymatique.

Dans le deuxième chapitre, nous avons réalisées un protocole opératoire de manières simple, efficace et douces, avec un excellent rendement.

Finalement, dans le dernier chapitre, nous avons présentées les résultats relatifs concernant la conversion et l'énantiosélectivité pour chaque approche, nous avons obtenues de bons résultats dans le cas de réactions impliquant les irradiations ultrasonores par rapport aux autres approches.

Bibliographie

- [Erb 2006] S. Erb, "Single-enantiomer drugs poised for further market growth," *Pharm. Technol.*, vol. 30, no. Suppl., pp. s14–s18, 2006.
- [Ghanem 2007] A. Ghanem, "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds," *Tetrahedron*, vol. 63, no. 8, pp. 1721–1754, 2007.
- [Govindaraju et al. 2011] K. Govindaraju, V. Kiruthiga, R. Manikandan, T. Ashokkumar, and G. Singaravelu, "–glucosidase assisted biosynthesis of gold nanoparticles : A green chemistry approach," *Mater. Lett.*, vol. 65, no. 2, pp. 256–259, 2011.
- [Assmuth et al. 2010] T. Assmuth, M. Hildén, and M. Craye, "Beyond REACH : Roadblocks and shortcuts en route to integrated risk assessment and management of chemicals," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 18, pp. 3954–3963, 2010.
- [Belafriekh et al. 2017] Belafriekh, A., Secundo, F., Serra, S., Djeghaba, Z. (2017). Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents. *Tetrahedron : Asymmetry*, 28(3), 473-478
- [(Garcia-Ubasart et al. 2011] J. Garcia-Ubasart, A. Esteban, C. Vila, M. B. Roncero, J. F. Colom, and T. Vidal, "Enzymatic treatments of pulp using laccase and hydrophobic compounds," *Bio-resour. Technol.*, vol. 102, no. 3, pp. 2799–2803, 2011.
- [Zhu et al. 2010] K. Zhu, H. Liu, P. Han, and P. Wei, "Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester," *Front. Chem. Eng. China*, vol. 4, no. 3, pp. 367–371, 2010.
- [Vrutika and Datta 2015] P. Vrutika and M. Datta, "Lipase from Solvent-Tolerant *Pseudomonas* sp. DMVR46 Strain Adsorb on multiwalled carbon nanotubes : application for enzymatic biotransformation in organic solvents," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 177, no. 6, pp. 1313–1326, 2015.
- [Kumar et al. 2016] A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, and P. K. Arora, "Lipase catalysis in organic solvents : advantages and applications," *Biol. Proced. Online*, vol. 18, no. 1, p. 2, 2016.
- [Secundo et al. 1992] F. Secundo, S. Riva, and G. Carrea, "Effects of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales," *Tetrahedron : Asymmetry*, vol. 3, no. 2, pp. 267–280, 1992.
- [Penasse 1974] L. Penasse, *Les enzymes : cinétique et mécanisme d'action*, no. DEPOSITO FV. 1974.
- [Klibanov et al. 1984] B. Cambou and A. M. Klibanov, "Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 9, pp. 2687–2692, 1984.
- [Faber et al. 1996] K. Faber, M. Mischitz, and W. Kroutil, "Microbial epoxide hydrolases," *Acta Chem. Scand.*, vol. 50, no. 3, pp. 249–258, 1996.

- [Cherif and Gargouri 2009] S. Cherif and Y. Gargouri, "Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab," *Food Chem.*, vol. 116, no. 1, pp. 82–86, 2009.
- [Guncheva and Zhiryakova 2011] M. Guncheva and D. Zhiryakova, "Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 68, no. 1, pp. 1–21, 2011.
- [Gaur et al. 2008] R. Gaur, A. Gupta, and S. K. Khare, "Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA," *Process Biochem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1040–1046, 2008.
- [Fu et al. 2009] D. Fu, M. Yu, T. Tan, and X. Zhou, "Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 56, no. 2–3, pp. 115–121, 2009.
- [Alloue et al. 2008] W. A. M. Alloue et al., "Les lipases immobilisées et leurs applications," *BASE*, 2008.
- [P L A Overbeeke et al. 2000] P. L. A. Overbeeke, C. Govardhan, N. Khalaf, J. A. Jongejan, and J. J. Heijnen, "Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 10, no. 4, pp. 385–393, 2000.
- [Fickers et al. 2008] P. Fickers, J. Destain, and P. Thonart, "Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications," *Biotechnol. Agron. société Environ.*, vol. 12, no. 2, pp. 119–130, 2008.
- [Svendsen 2000] A. Svendsen, "Lipase protein engineering," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1543, no. 2, pp. 223–238, 2000.
- [Alloue et al. 2008] W. A. M. Alloue et al., "Les lipases immobilisées et leurs applications," *BASE*, 2008.
- [Beisson et al. 2001] F. Beisson, N. Ferté, S. Bruley, R. Voultoiry, R. Verger, and V. Arondel, "Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids*, vol. 1531, no. 1–2, pp. 47–58, 2001.
- [Adlercreutz et al. 1997] P. Adlercreutz, T. Gitlesen, I. Ncube, and J. S. Read, "[12] Vernonia lipase : A plant lipase with strong fatty acid selectivity," in *Methods in enzymology*, vol. 284, Elsevier, 1997, pp. 220–232.
- [Baba et al. 1991] T. Baba, D. Downs, K. W. Jackson, J. Tang, and C. S. Wang, "Structure of human milk bile salt activated lipase," *Biochemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 500–510, 1991.
- [Warden et al. 1993] C. H. Warden et al., "Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse : pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase," *J. Lipid Res.*, vol. 34, no. 8, pp. 1451–1455, 1993.
- [Vidya and Chadha 2010] P. Vidya and A. Chadha, "Pseudomonas cepacia lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester : A comparison in ionic liquids vs hexane," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 65, no. 1–4, pp. 68–72, 2010.
- [Foresti and Ferreira 2010] M. L. Foresti and M. L. Ferreira, "Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium : Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 419–429, 2010.
- [Prasad et al. 2005] A. K. Prasad et al., "Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids," *Tetrahedron Lett.*, vol. 46, no. 26, pp. 4511–4514, 2005.
- [Zhang and Liu 2011] Y.-Y. Zhang and J.-H. Liu, "Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R, S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase," *Biochem. Eng. J.*, vol. 54, no. 1, pp. 40–46, 2011.

- [Singh et al. 2008] M. Singh, S. Singh, R. S. Singh, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 7, pp. 2116–2120, 2008.
- [Mokhtar-annaba 2011] U. B. Mokhtar-annaba, "Synthèse énantiosélective d' alcools chiraux via un dédoublement cinétique enzymatique combiné à une stéréoinversion chimique," 2011.
- [Alloue et al. 2008] W. A. M. Alloue et al., "Les lipases immobilisées et leurs applications," *BASE*, 2008.
- [Gotor-Fernandez et al. 2006] V. Gotor-Fernandez, E. Busto, and V. Gotor, "Candida antarctica lipase B : an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 348, no. 7-8, pp. 797–812, 2006.
- [Bornscheuer and Kazlauskas 2006] U. T. Bornscheuer and R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis : regio-and stereoselective biotransformations*. John Wiley Sons, 2006.
- [Pleiss et al. 1998] J. Pleiss, M. Fischer, and R. D. Schmid, "Anatomy of lipase binding sites : the scissile fatty acid binding site," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 93, no. 1–2, pp. 67–80, 1998.
- [Beauchard et al. 2009] A. Beauchard et al., "Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, no. 17, pp. 6257–6263, 2009.
- [Jaeger and Eggert 2002] K.-E. Jaeger and T. Eggert, "Lipases for biotechnology," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 390–397, 2002.
- [Simeó et al. 2009] Y. Simeó, J. V. Sinisterra, and A. R. Alcántara, "Regioselective enzymatic acylation of pharmacologically interesting nucleosides in 2-methyltetrahydrofuran, a greener substitute for THF," *Green Chem.*, vol. 11, no. 6, pp. 855–862, 2009.
- [Li et al. 2016] Y. Li et al., "Hydrolytic kinetics of piceid and its importance for the production of resveratrol," *Process Biochem.*, vol. 51, no. 10, pp. 1699–1705, 2016.
- [Blaser et al. 2010] H. Blaser, G. Hoge, B. Pugin, and F. Spindler, "Industrial Applications of Homogeneous Enantioselective Catalysts," *Handb. Green Chem. Online*, pp. 153–203, 2010.
- [Janes and Kazlauskas 1997] L. E. Janes and R. J. Kazlauskas, "Empirical rules for the enantioselectivity of lipase from *Aspergillus niger* toward secondary alcohols and carboxylic acids, especially -amino acids," *Tetrahedron : Asymmetry*, vol. 8, no. 22, pp. 3719–3733, 1997.
- [Lafaquière 2010] V. Lafaquière, "Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases." Toulouse, INSA, 2010.
- [Rouillard 2012] H. Rouillard, "Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde." 2012.
- [Chen et al. 1982] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, and C. J. Sih, "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 104, no. 25, pp. 7294–7299, 1982.
- [Balcão et al. 1996] V. M. Balcão, A. L. Paiva, and F. X. Malcata, "Bioreactors with immobilized lipases : state of the art," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 18, no. 6, pp. 392–416, 1996.
- [Ivanov et al. 1997] E. Y. Ivanov, T. F. Grigoriva, and V. V Boldyrev, "Methods of bonding targets to backing plate members using solder pastes and target/backing plate assemblies bonded thereby." Google Patents, 14-Jan-1997.
- [Betigeri and Neau 2002] S. S. Betigeri and S. H. Neau, "Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads," *Biomaterials*, vol. 23, no. 17, pp. 3627–3636, 2002.
- [So et al. 2005] H.-M. So et al., "Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 34, pp. 11906–11907, 2005.

- [Foresti and Ferreira 2007] M. L. Foresti and M. L. Ferreira, "Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 4, pp. 769–777, 2007.
- [Rahman et al. 2005] M. B. A. Rahman, S. M. Tajudin, M. Z. Hussein, R. N. Z. R. A. Rahman, A. B. Salleh, and M. Basri, "Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification," *Appl. Clay Sci.*, vol. 29, no. 2, pp. 111–116, 2005.
- [Ghamgui et al. 2007] H. Ghamgui, N. Miled, M. Karra-chaâbouni, and Y. Gargouri, "Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃ : A comparative study," *Biochem. Eng. J.*, vol. 37, no. 1, pp. 34–41, 2007.
- [Xin et al. 2004] J. Xin et al., "Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 22, no. 3, pp. 225–229, 2004.
- [Bagi et al. 1997] C. M. Bagi, D. Wilkie, K. Georgelos, D. Williams, and D. Bertolini, "Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat," *Bone*, vol. 21, no. 3, pp. 261–267, 1997.
- [Destain et al. 2008] J. Destain et al., "Les lipases immobilisées et leurs applications," BASE, 2008.
- [Yan et al. 1999] Y. Yan, U. T. Bornscheuer, and R. D. Schmid, "Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters," *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 12, pp. 1051–1054, 1999.
- [Wehtje and Adlercreutz 1997] E. Wehtje and P. Adlercreutz, "Lipases have similar water activity profiles in different reactions," *Biotechnol. Lett.*, vol. 19, no. 6, pp. 537–540, 1997.
- [Haffter et al. 1996] P. Haffter et al., "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*," *Development*, vol. 123, no. 1, pp. 1–36, 1996.
- [Klibanov 2001] A. M. Klibanov, "Improving enzymes by using them in organic solvents," *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 241–246, 2001.
- [Zaks and Klibanov 1988] A. Zaks and A. M. Klibanov, "Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 7, pp. 3194–3201, 1988.
- [Valivety et al. 1993] R. H. Valivety, P. J. Halling, and A. R. Macrae, "Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media," *Biotechnol. Lett.*, vol. 15, no. 11, pp. 1133–1138, 1993.
- [Chamouleau et al. 2001] F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, and M. Ghoul, "Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 949–954, 2001.
- [Valivety et al. 1992] R. H. Valivety, P. J. Halling, and A. R. Macrae, "Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1118, no. 3, pp. 218–222, 1992.
- [Turner and Vulfson 2000] N. A. Turner and E. N. Vulfson, "At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 108–113, 2000.
- [Schleyer et al. 2001] P. von R. Schleyer et al., "Dissected nucleus-independent chemical shift analysis of -aromaticity and antiaromaticity," *Org. Lett.*, vol. 3, no. 16, pp. 2465–2468, 2001.
- [Lopez Giraldo et al. 2007] L. J. Lopez Giraldo, M. Laguerre, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, M. Pina, and P. Villeneuve, "Lipophilisation de composés phénoliques par voie enzymatique et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées," 2007.
- [Cygler et al. 1994] M. Cygler et al., "A structural basis for the chiral preferences of lipases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, no. 8, pp. 3180–3186, 1994.

- [P L Antoine Overbeeke et al. 1999] P. L. A. Overbeeke, J. Ottosson, K. Hult, J. A. Jongejan, and J. A. Duine, "The temperature dependence of enzymatic kinetic resolutions reveals the relative contribution of enthalpy and entropy to enzymatic enantioselectivity," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 17, no. 1, pp. 61–79, 1999.
- [Johnson and Sakaguchi 1992] C. R. Johnson and H. Sakaguchi, "Enantioselective transesterifications using immobilized, recombinant *Candida antarctica* lipase B : resolution of 2-Iodo-2-cyclalken-1-ols," *Synlett*, no. 10, pp. 813–816, 1992.
- [Bouzemi et al. 2004] N. Bouzemi, H. Debbeche, L. Aribi-Zouioueche, and J.-C. Fiaud, "On the use of succinic anhydride as acylating agent for practical resolution of aryl-alkyl alcohols through lipase-catalyzed acylation," *Tetrahedron Lett.*, vol. 45, no. 3, pp. 627–630, 2004.
- [Ottosson and Hult 2001] J. Ottosson and K. Hult, "Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 1025–1028, 2001.
- [Butler 1979] L. G. Butler, "Enzymes in non-aqueous solvents," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 1, no. 4, pp. 253–259, 1979.
- [Metzger 1998] J. O. Metzger, "Solvent-free organic syntheses," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 37, no. 21, pp. 2975–2978, 1998.
- [Doukyu and Ogino 2010] N. Doukyu and H. Ogino, "Organic solvent-tolerant enzymes," *Biochem. Eng. J.*, vol. 48, no. 3, pp. 270–282, 2010.
- [Chebil et al. 2007] L. Chebil, C. Humeau, J. Anthoni, F. Dehez, J.-M. Engasser, and M. Ghoul, "Solubility of flavonoids in organic solvents," *J. Chem. Eng. data*, vol. 52, no. 5, pp. 1552–1556, 2007.
- [Zaks and Klibanov 1984] A. Zaks and A. M. Klibanov, "Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C," *Science (80-.)*, vol. 224, no. 4654, pp. 1249–1251, 1984.
- [Carrea et al. 1995] G. Carrea, G. Ottolina, and S. Riva, "Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media," *Trends Biotechnol.*, vol. 13, no. 2, pp. 63–70, 1995.
- [Klibanov 1989] A. M. Klibanov, "Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 141–144, 1989.
- [Katsoura et al. 2015] M. H. Katsoura, A. A. Papadopoulou, A. C. Polydera, and H. Stamatis, "Effect of Ionic Liquids on Catalytic Properties and Structure of Biocatalysts," *Ion. Liq. Surfactant Sci. Formul. Charact. Appl.*, vol. 5, p. 459, 2015.
- [Bruneau and Villeneuve 2007] M. Bruneau and A. Villeneuve, *Traiter de recherche création en art : entre la quête d'un territoire et la singularité des parcours*. PUQ, 2007.
- [Docherty and Kulpa Jr 2005] K. M. Docherty and C. F. Kulpa Jr, "Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids," *Green Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 185–189, 2005.
- [Josse et al. 2009] J. Josse, F. Husson, and J. Pages, "Gestion des données manquantes en analyse en composantes principales," *J. la Société Française Stat.*, vol. 150, no. 2, pp. 28–51, 2009.
- [Karedal et al. 2007] J. Karedal, S. Wyne, P. Almers, F. Tufvesson, and A. F. Molisch, "A measurement-based statistical model for industrial ultra-wideband channels," *IEEE Trans. Wirel. Commun.*, vol. 6, no. 8, pp. 3028–3037, 2007.
- [Abbott 2004] A. P. Abbott, "Application of hole theory to the viscosity of ionic and molecular liquids," *ChemPhysChem*, vol. 5, no. 8, pp. 1242–1246, 2004.
- [Gorke et al. 2010] J. Gorke, F. Srienc, and R. Kazlauskas, "Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 15, no. 1, pp. 40–53, 2010.

- [Zhao et al. 2013] C. Zhao, J. Xue, F. Ran, and S. Sun, "Modification of polyethersulfone membranes—a review of methods," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 58, no. 1, pp. 76–150, 2013.
- [Durand 2013] E. Durand, "Solvants de type eutectiques profonds : nouveaux milieux réactionnels aux réactions de lipophilisation biocatalysées par les lipases?" Université de Montpellier 2, 2013.
- [Fessner and Anthonsen 2009] W.-D. Fessner and T. Anthonsen, *Modern biocatalysis : stereoselective and environmentally friendly reactions*. John Wiley Sons, 2009.
- [Ran et al. 2008] N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, and J. Tao, "Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale," *Green Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 361–372, 2008.
- [Atomi 2005] H. Atomi, "Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 166–173, 2005.
- [Bruggink et al. 2003] A. Bruggink, R. Schoevaart, and T. Kieboom, "Concepts of nature in organic synthesis : cascade catalysis and multistep conversions in concert," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 7, no. 5, pp. 622–640, 2003.
- [Carrea and Riva 2008] G. Carrea and S. Riva, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*. John Wiley Sons, 2008.
- [María 2008] P. D. de María, "Nonsolvent applications of ionic liquids in biotransformation and organocatalysis," *Angew. Chem. Int. Ed*, vol. 47, no. 37, pp. 6960–6968, 2008.
- [Matsuda et al. 2005] T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, and T. Ikariya, "Asymmetric synthesis using hydrolytic enzymes in supercritical carbon dioxide," *Tetrahedron : Asymmetry*, vol. 16, no. 5, pp. 909–915, 2005.
- [Faber 2001] K. Faber, "Non-sequential processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product : proposal for stereochemical classification," *Chem. Eur. J.*, vol. 7, no. 23, pp. 5004–5010, 2001.
- [Strauss et al. 1999] U. T. Strauss, U. Felfer, and K. Faber, "Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess," *Tetrahedron : Asymmetry*, vol. 10, no. 1, pp. 107–117, 1999.
- [Fantin et al. 1995] G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, A. Medici, and P. Pedrini, "Combined microbial oxidation and reduction : a new approach to the highyield synthesis of homochiral unsaturated secondary alcohols from racemates," *Tetrahedron : Asymmetry*, vol. 6, no. 12, pp. 3047–3053, 1995.
- [Sheldon et al. 1993] R. A. Sheldon, *Chirotechnology : industrial synthesis of optically active compounds*. CRC press, 1993.
- [Suslick et al. 1989] K. S. Suslick, "The chemical effects of ultrasound," *Sci. Am.*, vol. 260, no. 2, pp. 80–87, 1989.
- [Apfel et al 1991] Apfel, R. E., Holland, C. K. (1991). Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 17(2), 179-185.
- [Leighton 2004] T. G. Leighton, "From seas to surgeries, from babbling brooks to baby scans : The acoustics of gas bubbles in liquids," *Int. J. Mod. Phys. B*, vol. 18, no. 25, pp. 3267–3314, 2004.
- [Madanshetty et al. 1991] S. I. Madanshetty, R. A. Roy, and R. E. Apfel, "Acoustic microcavitation : Its active and passive acoustic detection," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 90, no. 3, pp. 1515–1526, 1991.
- [Borkent et al. 2008] B. M. Borkent et al., "The acceleration of solid particles subjected to cavitation nucleation," *J. Fluid Mech.*, vol. 610, p. 157, 2008.

- [Suslick 1989] K. S. Suslick, "The chemical effects of ultrasound," *Sci. Am.*, vol. 260, no. 2, pp. 80–87, 1989.
- [Henri 1992] D. Henri, "Sonochimie en milieu polyphasique : influence de la puissance ultrasonore et de la géométrie du réacteur." Toulouse, INPT, 1992.
- [Lorimer and Mason 1987] J. P. Lorimer and T. J. Mason, "Sonochemistry. Part 1—the physical aspects," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 16, pp. 239–274, 1987.
- [Moholkar et al. 2000] V. S. Moholkar, S. Rekveld, and M. M. C. G. Warmoeskerken, "Modeling of the acoustic pressure fields and the distribution of the cavitation phenomena in a dual frequency sonic processor," *Ultrasonics*, vol. 38, no. 1–8, pp. 666–670, 2000.
- [Weissler et al. 1950] A. Weissler, H. W. Cooper, and S. Snyder, "Chemical effect of ultrasonic waves : oxidation of potassium iodide solution by carbon tetrachloride," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 4, pp. 1769–1775, 1950.
- [Suslick 1989] K. S. Suslick, "The chemical effects of ultrasound," *Sci. Am.*, vol. 260, no. 2, pp. 80–87, 1989.
- [Henri 1992] D. Henri, "Sonochimie en milieu polyphasique : influence de la puissance ultrasonore et de la géométrie du réacteur." Toulouse, INPT, 1992.
- [Pétrier et al. 2008] C. Pétrier, N. Gondrexon, and P. Boldo, "Ultrasons et sonochimie. techniques de l'ingénieur," *AF*, vol. 6, p. 310, 2008.
- [Thompson and Doraiswamy 1999] L. H. Thompson and L. K. Doraiswamy, "Sonochemistry : science and engineering," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 38, no. 4, pp. 1215–1249, 1999.
- [Mason 2002] T. J. Mason, "Uses of power ultrasound in chemistry and processing," *Appl. Sonochemistry*, 2002.
- [Rouessac 2004] Rouessac, Francis. 2004. "Annick Rouessac Avec Collaboration de Daniel Cruché." Analyse
- [Sarda and Desnuelle 1958] Sarda, L, and P Desnuelle. 1958. "Action de La Lipase Pancréatique Sur Les Esters En Émulsion." *Biochimica et Biophysica Acta* 30(3) : 513–21.
- [MTIBAA et al.] MTIBAA, Hounaida et al. "La Lipase de Candida Rugosa : Caractérisation Biochimique Biochemical Characterization of Candida Rugosa Lipase."
- [Jin et al. 2001] Jin, Jing Bo et al. 2001. "A New Dynamin-like Protein, ADL6, Is Involved in Trafficking from the Trans-Golgi Network to the Central Vacuole in Arabidopsis." *The Plant Cell* 13(7) : 1511–26.
- [Lozano et al. 2001] Lozano, Stephen J, Jill V Scharold, and Thomas F Nalepa. 2001. "Recent Declines in Benthic Macroinvertebrate Densities in Lake Ontario." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58(3) : 518–29.
- [Van Rantwijk et al. 2003] Van Rantwijk, Fred, Rute Madeira Lau, and Roger A Sheldon. 2003. "Biocatalytic Transformations in Ionic Liquids." *TRENDS in Biotechnology* 21(3) : 131–38.
- [Dordick 1989] Van Rantwijk, Fred, Rute Madeira Lau, and Roger A Sheldon. 2003. "Biocatalytic Transformations in Ionic Liquids." *TRENDS in Biotechnology* 21(3) : 131–38.
- [Klibanov (2001)] Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature*, 409(6817), 241-246.
- [Sheldon (1996)] Sheldon, R. A. (1996). Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic reactions in organic media* (pp. 266-307). Springer, Dordrecht.
- [Ghanem (2007)] Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63(8), 1721-1754.

- [Kirchner et al. (1985)] Kirchner, G., Scollar, M. P., Klivanov, A. M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 107(24), 7072-7076.
- [De Carvalho (2011)] De Carvalho, C. C. (2011). Enzymatic and whole cell catalysis : finding new strategies for old processes. *Biotechnology advances*, 29(1), 75-83.
- [Zaks et al. (1985)] Zaks, A., Klivanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3192-3196.
- [Tao et al. (2011)] Tao, J. A., Kazlauskas, R. J. (Eds.). (2011). *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*. John Wiley Sons.