

Roland Furstoss (*) Bioconversions et chimie fine

Le domaine des bioconversions est un aspect de la chimie organique qui a connu un développement relativement récent, mais particulièrement vigoureux. Le but essentiel du présent article, qui constitue le canevas d'un cours de maîtrise, est, en s'appuyant sur un certain nombre d'exemples illustratifs, d'inciter nos jeunes chimistes ou microbiologistes à tourner leurs regards vers un domaine a priori différent du leur, mais qui peut leur apporter un certain nombre d'outils fort appréciables et leur permettre d'acquérir un langage commun, nécessaire à une future collaboration dans ce domaine, plein d'avenir, des bioconversions.

Introduction

Le domaine des bioconversions est actuellement un aspect de la chimie organique fine que ni le chimiste organicien, ni le microbiologiste ne peuvent plus ignorer. Il est actuellement en pleine expansion et fournit au chimiste organicien un nombre croissant "d'outils" nouveaux et très performants, utilisables en synthèse organique fine. Cet article ne prétend en aucun cas constituer une revue exhaustive dévolue aux réactions de bioconversions. Son but est, bien plus modestement, de présenter en les illustrant par des exemples tirés de la littérature, un certain nombre de concepts et de potentialités propres ou impliquées dans les bioconversions.

Définition d'une bioconversion

Afin d'éviter toute ambiguïté ultérieure, il convient tout d'abord de définir ce que le chimiste organicien appelle "une bioconversion". Il est actuellement admis, qu'une bioconversion est la transformation, catalysée par un système enzymatique, d'un substrat (A), à structure bien déterminée, en un produit (B) (fig. 1). Cette transformation, catalysée par un système enzymatique, est, dans la grande majorité des cas, effectuée en un nombre très restreint d'étapes (une seule en général). Le catalyseur enzymatique peut être mis en œuvre de diverses façons, à savoir : soit dans un être vivant (mammifère ou micro-organisme), soit dans des cellules végétales ou animales (isolées et cultivées), soit à l'aide d'enzymes extraites et plus ou moins purifiées.

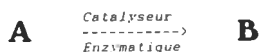


FIGURE 1. – Définition d'une bioconversion.

Bien que la première bioconversion digne de ce nom date de 1862, puisqu'elle a été décrite par Pasteur à propos de l'oxydation microbiologique de l'éthanol en acide acétique [1], le véritable développement des bioconversions est relativement récent et date d'une quarantaine d'années environ. En effet, un premier ouvrage concernant les bioconversions a été publié dès 1903 par Plimmer [2], mais ce n'est qu'à la fin des années cinquante que paraissaient divers répertoires rassemblant les bioconversions

connues dans le monde [3-6]. Depuis lors, de nombreux livres ou revues concernant divers types de substrats, tels les terpènes, les alcaloïdes, les stéroïdes, etc., ont été publiés et témoignent de l'accroissement extrêmement important du nombre d'études menées dans ce contexte à l'échelle mondiale [7-10].

Implication des bioconversions

Le développement récent et quasi exponentiel du nombre de publications dévolues à ce domaine résulte du fait de différents facteurs. Les deux raisons les plus évidentes qui expliquent ce développement sont : d'une part, le fait que les bioconversions sont impliquées dans des domaines variés (phytosanitaire, pharmacologie, parfumerie, arômes alimentaires, etc.), d'autre part, et surtout, la mise en évidence du fait que les enzymes possèdent des caractéristiques très intéressantes pour le chimiste organicien, en particulier en ce qui concerne leur spécificité (spécificité de substrat régio- et stéréospécificité) et leur aptitude à réaliser des réactions difficiles ou impossibles à effectuer par voie chimique classique (synthèse chirale ou hydroxylation d'atomes de carbone non activés par exemple).

Les deux exemples suivants permettent d'illustrer l'implication des bioconversions dans le domaine pharmacologique.

Le premier de ces exemples concerne la découverte, historique, des sulfamides. En effet, le *Prontosil*, molécule azoïque, avait été préparé en 1932 par Mietsch et Klarer dans les laboratoires de la société Bayer, et ceci dans le cadre d'une étude sur des molécules susceptibles de colorer spécifiquement certains micro-organismes. Un test biologique systématique *in vitro* avait indiqué que cette molécule était dépourvue de propriétés bactéricides jusqu'au jour où, en 1935, son activité antibactérienne a été mise en évidence par Domagk (IG Farben, à Elberfeld) dans le cadre de tests biologiques réalisés *in vivo*. Des études ultérieures ont montré que cette activité était due à la fission réductive microbiologique de la double liaison azote-azote, ce qui conduit à la formation d'un sulfamide (fig. 2). C'est donc grâce à cette bioconversion réalisée dans le tube intestinal des mammifères que la première famille d'agents antibactériens efficaces, celle des sulfamides, a été découverte. Il est fort intéressant de souligner, à ce propos, que cette découverte décrite dans la note devenue célèbre de Tréfouel et coll. [11] a donné le véritable coup d'envoi à la chimiothérapie moderne. De nombreux autres

(*) Directeur de recherche CNRS. Laboratoire de chimie organique et bioorganique (URA CNRS 1320). Faculté des sciences de Luminy, Case 901, 70, route Léon Lachamp, 13288 Marseille Cedex 9.

exemples de ce type, qui concernent donc l'activation *in vivo* d'un médicament (une prodrogue) par bioconversion, sont actuellement connus dans le domaine pharmacologique.

Un deuxième aspect de l'implication des bioconversions dans le domaine pharmaceutique concerne la préparation de métabolites de médicaments. Ceux-ci doivent en effet être testés du point de vue de leur activité biologique (toxicité, biodégradabilité, etc.) lors des études préalables à la mise sur le marché d'une molécule biologiquement active. Dans de nombreux cas, la réalisation de ces études biologiques nécessite une synthèse de *novo* des métabolites souhaités, synthèse qui peut s'avérer être particulièrement laborieuse. Une technique différente, développée en particulier aux États-Unis par le groupe de Rosazza, consiste à étudier les bioconversions de ces substances. Ces auteurs ont en effet démontré que les métabolites microbiens ainsi obtenus sont souvent identiques à ceux formés chez l'animal, ce qui permet donc leur obtention, en quantité appréciable, en une étape unique de bioconversion [12]. Ceci est illustré par exemple par l'obtention de la 9-hydroxyellipticine, métabolite hépatique de l'ellipticine, alcaloïde doté de propriétés antitumorales (fig. 2). De la même manière, il a été montré que diverses prostaglandines sont présentes, dans le plasma sérial humain, sous forme de produits hydroxylés en position 19 [13]. Dans la mesure où ces métabolites constituent une proportion importante des dérivés détectés, il était fort intéressant de disposer d'une voie d'accès aisée à ces molécules afin de tester leurs activités biologiques propres. Là encore, les bioconversions réalisées à l'aide de champignons ont permis la transformation, en une étape unique, de diverses prostaglandines en leurs dérivés 19-hydroxylés. Ainsi, par exemple, la prostaglandine F_{2α} est transformée, par une souche de *streptomyces*, en un mélange de produits hydroxylés en position 18 et 19 (rendements respectifs 20 et 24 %) (fig. 2) [14].

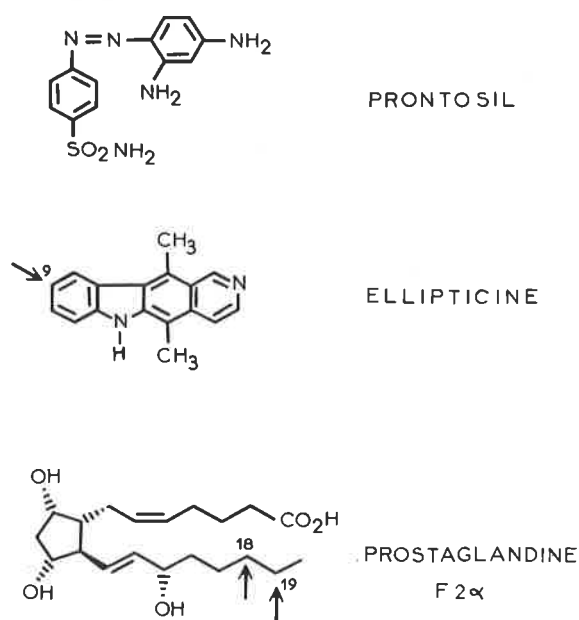


FIGURE 2. – Obtention de métabolites par bioconversion.

Intérêt des bioconversions

Nous avons souligné précédemment le fait que l'intérêt principal des bioconversions réside dans l'aptitude des catalyseurs biologiques à réaliser des réactions hautement spécifiques. L'analyse détaillée des transformations microbiologiques permet de subdiviser cette spécificité en différents aspects :

- la *spécificité du substrat* : un catalyseur enzymatique est capable de sélectionner un seul substrat (ou type de substrat) parmi un mélange de diverses molécules,
- la *spécificité de réaction* : une enzyme est considérée générale-

ment comme ne catalysant qu'un seul type de réaction,

– la *stéréospécificité* : une bioconversion pourra avoir lieu avec une régiospécificité, une stéréospécificité et même une énantiospécificité parfaitement définies. Ceci pourra donc conduire :

- soit au dédoublement d'un mélange racémique (réaction énantiosélective),
- soit à la formation (plus ou moins exclusive) d'un seul énantiomère à partir d'un substrat prochiral (réaction "énantiogénique")*.

* Proposition de la Commission de Nomenclature de L'IUPAC

Une confusion extrême existe actuellement dans la littérature en ce qui concerne l'utilisation du terme "énantiosélectif", qui est utilisé aussi bien pour décrire :

- la synthèse d'un produit chiral à partir d'un synthon chiral (dans ce cas, le terme "énantiosélectif" nous semble être parfaitement inapproprié, la seule "sélection d'énantiomère" étant effectuée par le chimiste lui-même lors du choix du synthon chiral utilisé comme substrat de départ !),
- la différenciation cinétique observée entre deux énantiomères d'un mélange racémique (dans ce cas, la réaction est effectivement "énantiosélective") et, enfin,
- la transformation stéréospécifique d'un substrat prochiral en un produit chiral (ou aucune "sélection d'énantiomère" n'est possible dans le substrat de départ prochiral).

C'est pourquoi, nous proposons la dénomination "réaction énantio-génique" dans ce dernier cas. En effet on observe alors une réaction qui, tout en n'effectuant aucune "sélection" d'énantiomère sur le substrat (produit de départ) de la réaction *génère* préférentiellement (ou exclusivement) un énantiomère unique (voir, par exemple, la référence [40]).

Dans les deux cas, une molécule chirale sera formée. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où l'obtention de molécules chirales est l'une des préoccupations actuelles importantes des chimistes organiciens, en particulier en ce qui concerne les composés à activité biologique. En effet, les deux énantiomères d'un mélange racémique possèdent très souvent des propriétés biologiques différentes, comme cela est illustré par les cas du limonène, du propanolol et de la thalidomide (fig. 3).

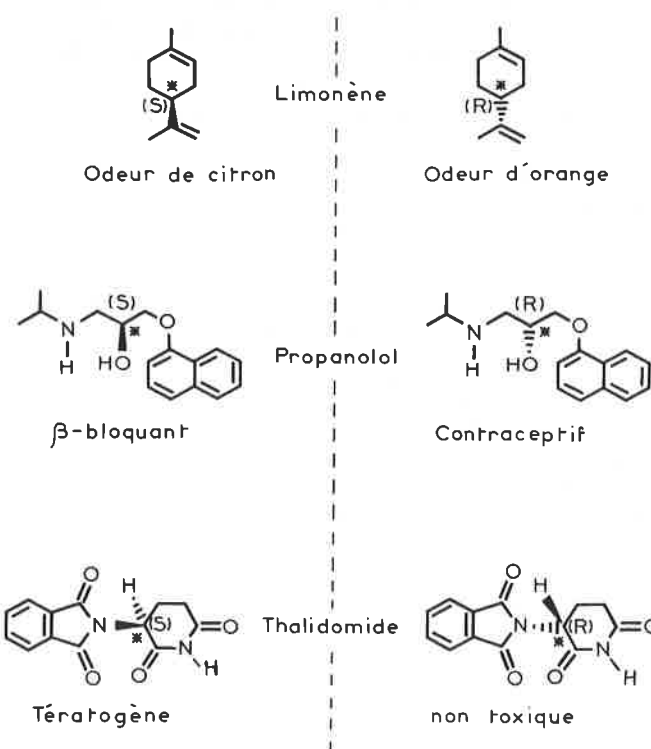


FIGURE 3. – Influence de la configuration absolue sur les propriétés biologiques de diverses molécules.

Il est donc évident que, dans les domaines industriels liés aux molécules douées d'activités biologiques (phytosanitaire, pharmacologie...), la préparation spécifique d'un énantiomère unique permettra des améliorations notables (diminution des doses, suppression d'effets secondaires, indésirables ou même rédhibitoires, etc.). Incontestablement, pour des molécules de ce type, on peut affirmer que "l'avenir est chiral".

Mise à part cette remarquable propriété des enzymes d'être d'excellents catalyseurs chiraux, l'utilisation d'enzymes en synthèse organique dispose de deux autres atouts actuellement irremplaçables par la chimie classique, à savoir :

- leur aptitude à réaliser des fonctionnalisations hautement sélectives d'atomes de carbone non activés (en particulier des hydroxylations). Cet aspect a été tout spécialement étudié dans le domaine des stéroïdes et a, là encore, ouvert la voie à la synthèse de molécules présentant un grand intérêt thérapeutique : les corticostéroïdes ;
- leur acceptation, par la législation en vigueur actuellement, comme catalyseurs utilisables pour la synthèse industrielle d'arôme alimentaires disposant du label "naturel".

Réactions réalisables par bioconversion

L'examen de la littérature relative aux bioconversions indique que, mis à part de rares exemples telle la réaction de Diels-Alder, la plupart des réactions de base de la chimie organique peuvent être catalysées par les enzymes. Cela va des réactions simples telle l'hydrolyse de fonctions esters jusqu'à des réactions surprenantes comme l'addition de carbènes sur des oléfines [15] *.

De façon schématique, les réactions réalisables peuvent être classées comme suit :

- **les hydrolyses** : de diverses fonctions, tels des esters, amides, uréthanes, époxydes, etc.
- **les oxydo-réductions** : oxydation d'alcools, réductions de doubles liaisons, de fonctions carbonyle, création de doubles liaisons éthyléniques, etc.,
- **les oxygénations** : qui, tout en étant des réaction d'oxydation, ont ceci de particulier qu'elles conduisent à l'incorporation d'un atome d'oxygène dans la molécule de départ : hydroxylations d'atomes de carbone non activés, hydroxylations de noyaux aromatiques, époxydations de doubles liaisons, réactions de Baeyer Villiger, clivage de liaisons C-C en dérivés carbonyle, etc.
- **les condensations** : acylations, estérifications, glycosidations, etc.,
- **les isomérisations** : transpositions de squelettes carbonés, etc.,
- **la formation de liaisons carbone-carbone** : aldolisations, etc.,
- **l'introduction d'hétérofonctions.**

La grande majorité des bioconversions décrites à l'heure actuelle concerne cependant les trois premières catégories de réactions. Celles-ci, en effet, s'avèrent être réalisables sur de très nombreuses molécules, présentant des structures extrêmement différentes, et ceci grâce à l'action de microorganismes ou d'enzymes divers. Les quatre derniers types de réaction, tout en étant fort intéressants, constituent souvent des étapes de biosynthèse présentant une spécificité de substrat élevée (certaines de ces enzymes n'admettent même qu'un substrat unique, ce qui est par exemple le cas pour la tartrate déshydrogénase) et s'avèrent donc être d'intérêt plus limité pour la synthèse organique.

Nous nous efforcerons, dans la suite de cet exposé, de décrire certains exemples particulièrement illustratifs pour chacune de ces trois catégories de réactions.

Quelques exemples illustratifs des bioconversions

Les hydrolyses

Hydrolyses de fonctions esters

Il existe dans le monde vivant de très nombreuses hydrolases capables de catalyser l'hydrolyse de fonctions variées... portées par des substrats divers ! La fonction ester constitue toutefois le prototype de ces fonctions hydrolysables : grâce à leur énantiosélectivité et/ou à leur stéréospécificité, certaines de ces nombreuses hydrolases vont permettre la préparation de synthons chiraux. Ainsi, l'hydrolyse d'une époxyester racémique, décrite par Whitesides et coll., permet l'obtention de l'alcool (S) et de l'ester (R) (résiduel) optiquement actifs. Cette hydrolyse est réalisée par action de la lipase pancréatique de porc et conduit à des produits dont l'excès énantiomérique varie en fonction de la longueur de la chaîne carbonée portée par l'ester. On peut ainsi obtenir, sur des quantités de l'ordre de plusieurs grammes, l'ester résiduel présentant un excès énantiomérique avoisinant 90 % [16] (fig. 4). De la même manière, un cyanoester racémique dérivé du 1-naphtol peut être dédoublé par action d'une lipase de *Pseudomonas*. Ceci permet la préparation de son énantiomère (R) avec un excès énantiomérique de 87 % et l'accumulation, dans le milieu réactionnel, de l'ester résiduel de configuration (S) [17]. Ces synthons chiraux permettent l'accès direct, par voie chimique classique, à chacun des énantiomères du propanolol qui, comme nous l'avons signalé précédemment, possèdent des propriétés biologiques différentes, ce qui rend ce dédoublement particulièrement attrayant du point de vue pharmacologique.

Les hydrolases sont aussi capables de réaliser l'hydrolyse stéréospécifique d'un seul groupement énantiotopique porté par une molécule prochirale (réaction "énantiogénique" !). C'est ainsi, par exemple, que le bêta-aminoglutarate de méthyle peut être hydrolysé par l'estérase du foie de porc (PLE) pour conduire au monoacide (R) correspondant, qui provient de l'hydrolyse régio-sélective de la fonction ester proS. L'excès énantiomérique

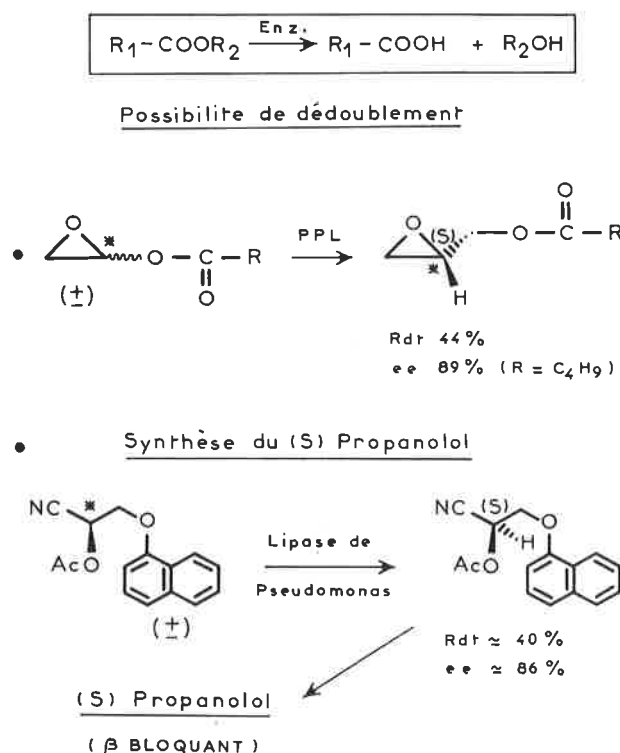


FIGURE 4. – Hydrolyse énantiosélective d'un ester racémique.

* A notre connaissance, il s'agit cependant là d'un exemple unique de ce type de réaction.

modeste ainsi obtenu (40 %) peut être grandement amélioré en substituant la fonction amine par une fonction benzyloxycarbonyle. C'est alors la fonction ester proR qui est hydrolysée sélectivement, ce qui conduit à l'ester de configuration absolue (S) avec un excellent excès énantiomérique (93 %). Des étapes chimiques subséquentes conduisent, à partir de ce synthon chiral, à divers antibiotiques bêta-lactamiques (telles la thiénamycine, la carpétimycine A ou l'asparénomycine C) sous la forme d'un énantiomère unique [18] (fig. 5).

La modification judicieuse des conditions expérimentales utilisées lors de la mise en œuvre des hydrolases peut aussi permettre de réaliser la réaction inverse de l'hydrolyse, à savoir la *synthèse* d'esters à partir d'acides et d'alcools. C'est ainsi, par exemple, que le menthol racémique, traité par la lipase de *Candida cylindracea* dans l'heptane en présence d'acide laurique, conduit à la formation énantiosélective de laurate de l-menthyle, obtenu ainsi avec un excès énantiomérique de 86 % [19] (fig. 6). Bien que cette réaction soit réalisée dans l'heptane, la présence d'un minimum d'eau est indispensable et il semble bien que, dans ces conditions, le microenvironnement de l'enzyme soit une phase aqueuse. L'utilisation de diverses enzymes en présence de solvants organiques est une voie de recherche particulièrement bien étudiée depuis plusieurs années. Dans de rares cas, l'utilisation de solvants organiques miscibles à l'eau, ou totalement anhydres, a aussi été décrite pour ce genre de réaction [20, 21].

Enfin, il faut signaler que diverses réactions de transestérification peuvent être réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Ainsi, cette même lipase de *Candida cylindracea*, immobilisée sur un support solide, est capable de catalyser la transestérification énantiosélective de l'ester méthyle de l'acide 2(p-chlorophénoxy) propionique en présence de n-butanol. Ceci conduit à l'énantiomère (R) de l'ester correspondant, dérivé dont seul cet énantiomère possède des propriétés herbicides exploitées industriellement. L'énantiomère (S) résiduel du substrat pouvant être racémisé en milieu basique, le rendement global de la réaction atteint 81 %, l'excès énantiomérique obtenu étant supérieur à 97 %. Ces facteurs, ainsi que la concentration particulièrement élevée utilisable pour cette bioconversion (400 g/l), en font un procédé particulièrement attractif pour sa synthèse industrielle [22] (fig. 7).

Hydrolyse de fonction amides

Comme nous l'avons souligné précédemment, les réactions d'hydrolyse enzymatique ne sont pas limitées aux fonctions ester. Ainsi, l'une des premières applications industrielles des bioconversions concerne-t-elle l'hydrolyse régiosélective de la fonction amide portée par la chaîne latérale de la pénicilline G, antibiotique obtenu par fermentation. Cette hydrolyse, réalisée grâce à l'action d'une pénicilline acylase d'*Escherichia coli* immobilisée, conduit à l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) qui sert de

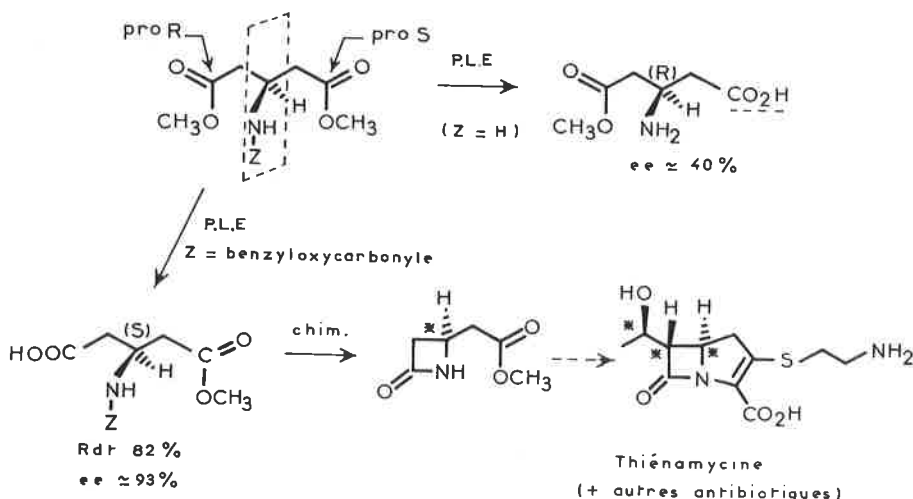


FIGURE 5. – Hydrolyse régiospécifique d'un diester prochiral.



Réaction dans solvants organiques

Ex.

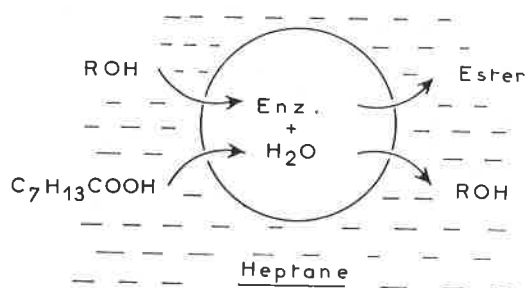
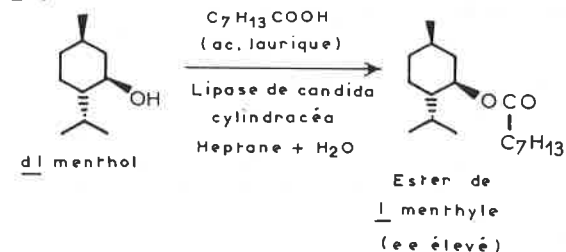


FIGURE 6. – Estérification énantiosélective catalysée par une lipase dans un solvant organique.

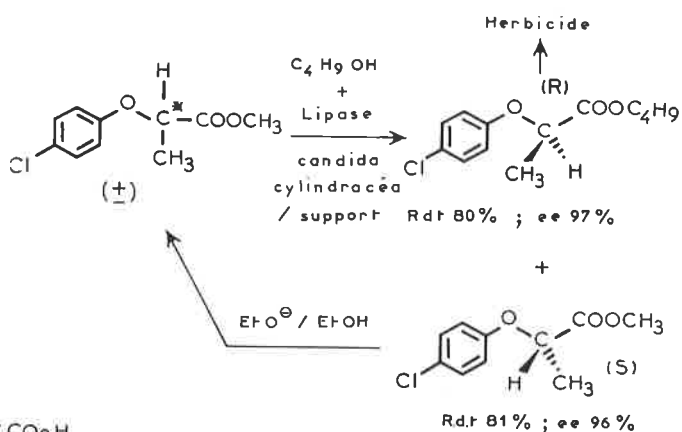
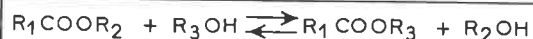


FIGURE 7. – Transestérification énantiosélective d'un ester racémique.

“pierre à bâtir” pour la synthèse ultérieure de très nombreuses pénicillines modifiées, présentant des activités spécifiques plus élevées (moins d'effets secondaires) et une meilleure résistance aux phénomènes de désactivation qui sont la cause de diverses résistances microbiennes à ces antibiotiques [23] (fig. 8).

Le procédé Toray de synthèse de la L-lysine met en œuvre, lui aussi, l'hydrolyse d'une fonction amide (fig. 9). Ainsi, l'action d'un microorganisme (*Cryptococcus laurentii*) conduit à l'hydrolyse énantiosélective de l'énantiomère (S) de l'α-aminocaprolactame, produit facilement accessible par voie chimique. Il se forme ainsi un mélange de L-lysine et d'énantiomère résiduel ce dernier pouvant être racémisé *in situ* par action d'une racémase produite par un deuxième microorganisme, *Achromobacter obae*. Ceci permet donc de recycler cet énantiomère, si bien que ce procédé, mis en œuvre sur un substrat racémique, conduit à l'obtention de la seule L-lysine avec un rendement quasiment quantitatif et un excès énantiomérique supérieur à 99 % [24]. Là encore, la forte concentration utilisable pour cette réaction (100 g/l) permet de rendre ce procédé compétitif pour la synthèse industrielle de la L-lysine.

Il est aussi possible, comme dans le cas des esters, de modifier les conditions expérimentales de ces réactions pour réaliser la synthèse de fonctions amides. Ainsi, la synthèse industrielle par voie chimique de l'aspartame conduit, par condensation d'un dérivé de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine, à un mélange d'α et de β-aspartame dans des proportions d'en-

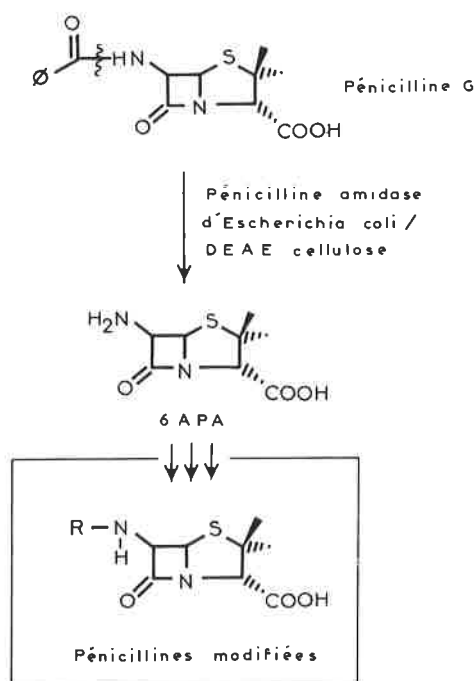


FIGURE 8. – Hydrolyse régiospécifique d'une fonction amide : synthèse industrielle du 6-APA.

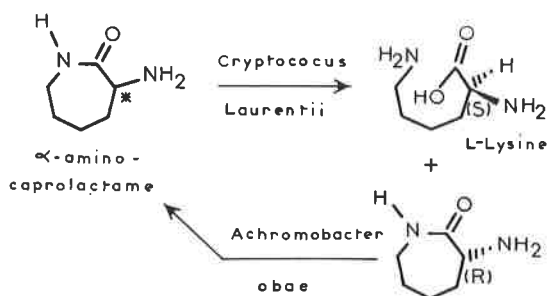


FIGURE 9. – Synthèse énantiosélective de la L-lysine à partir d'α-aminocaprolactame.

viron 70/30. Cependant la saveur amère du β-aspartame nécessite une séparation subséquente de ce mélange. Afin de pallier ce surcoût de procédé, une synthèse enzymatique mettant en œuvre une enzyme (thermolysine) extraite d'une souche thermorésistante, *Bacillus thermoproteolyticus*, a été mise au point récemment par la société japonaise Toyosoda. Cette enzyme, fixée sur des membranes placées dans des réacteurs fonctionnant en continu, catalyse la condensation régiospécifique en milieu solvant organique d'un dérivé de l'acide L-aspartique et de la phénylalanine racémique pour conduire sélectivement à un précurseur de l'α-aspartame (fig. 10). Le fait que cette condensation se fasse de façon régiospécifique, conjugué à la possibilité d'utiliser la phénylalanine racémique comme produit de départ, font de ce procédé un concurrent très compétitif de la synthèse chimique industrielle de cet édulcorant [25].

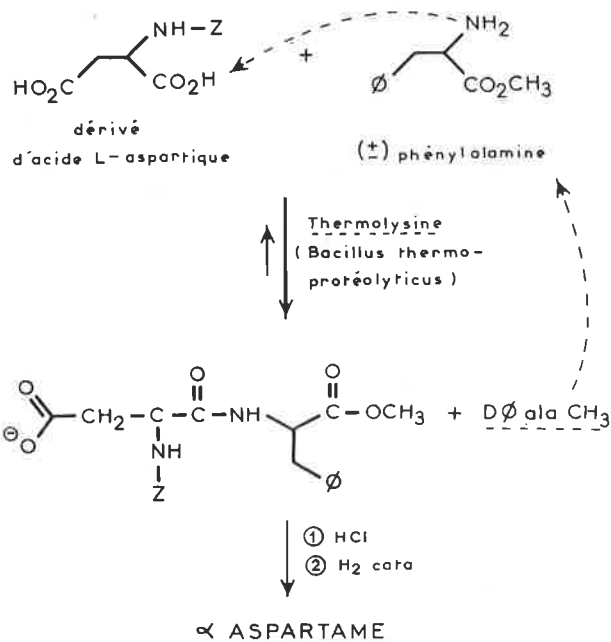


FIGURE 10. – Synthèse industrielle de l'α-aspartame (procédé Toyosoda).

Hydrolyse et hydratation de fonctions nitrile

Un troisième type de fonction dont on peut réaliser l'hydrolyse par catalyse enzymatique est la fonction nitrile. Divers systèmes enzymatiques, telles des amidases ou des nitrilases, peuvent être utilisés pour effectuer cette hydrolyse. Initiés il y a plus de vingt ans à l'université de Montpellier, ces travaux ont débouché depuis peu sur une application industrielle, à savoir la synthèse de l'acrylamide par hydrolyse enzymatique de l'acrylonitrile (société Nitto) [26]. Une usine, qui devrait atteindre une production de 4000 t/an d'acrylamide, est actuellement en cours d'achèvement. Diverses extensions fort intéressantes de ces hydrolyses de nitriles, utilisant comme substrats de base des dinitriles, sont en cours d'évaluation et pourraient conduire prochainement à des applications industrielles majeures. Ainsi, l'hydrolyse sélective de l'une des fonctions nitrile et l'hydratation sélective de l'autre fonction permet d'accéder, à partir de ces dinitriles, à des molécules dissymétriques inaccessibles par voie chimique classique.

Une application intéressante de ces potentialités semble être envisagée par la société Novo dans ce contexte, à savoir la synthèse enzymatique du caprolactame, produit de base de l'industrie chimique lourde (synthèse du nylon-6). Cependant, la compétitivité de ce procédé par rapport à la synthèse chimique du caprolactame ne semble pas encore avoir été établie [27].

Les oxydoréductions

Les oxydoréductions constituent un autre type de réaction que l'on sait bien réaliser par bioconversion. Comme les hydrolases, les oxydoréductases, enzymes qui catalysent ces transformations, sont omniprésentes dans le règne vivant. De nombreuses enzymes de ce type, capables de transformer des substrats divers et variés, ont été mises en œuvre et quelquefois isolées et identifiées. Des études fondamentales et extensives ont ainsi été conduites par divers groupes, dont celui de Prelog qui s'est particulièrement intéressé à l'alcool déshydrogénase de foie de cheval (HLADH) [28]. Il a ainsi été démontré que ces enzymes sont capables, dans de nombreux cas, de réaliser une attaque stéréospécifique sur une seule des deux faces énantiotopiques d'une fonction carbonyle (*fig. 11*). Ceci semble être dû à des interactions stériques impliquées par l'approche du coenzyme et de la fonction carbonyle, interactions liées essentiellement à l'encombrement stérique des substituants portés par la fonction carbonyle. L'intervention de ce facteur primordial permet d'expliquer que, plus la différence de "taille" entre ces deux groupements est importante, plus le positionnement du substrat est "non ambigu", et plus la stéréosélectivité de la réduction est élevée. Ceci conduit donc à une synthèse asymétrique qui fournit, dans la plupart des cas, l'alcool de configuration absolue (S) provenant de l'attaque, par le coenzyme (NADH) impliqué dans ces réactions, de la face *re* de la fonction carbonyle. Cette règle, connue sous la dénomination de "règle de Prelog", souffre cependant de plus en plus d'exceptions au fur et à mesure que de telles études se développent.

La littérature relative aux bioconversions foisonne d'exemples concernant ces oxydoréductions microbiologiques. Aussi avons-nous choisi, comme dans le cas des hydrolyses enzymatiques, de n'en citer que quelques-uns permettant d'illustrer leurs vastes potentialités.

Le premier de ces exemples (*fig. 12*) concerne la réduction d'une fonction carbonyle présente dans divers dérivés d'acétoacétates. Ainsi, il apparaît que, si la réduction de l'acétoacétate de méthyle par la levure de boulanger conduit à l'alcool de configuration (S) possédant un excès énantiomérique de 87 % (Rdt 23 %), la réduction de l'acétoacétate d'éthyle trifluoré en position 4 fournit l'alcool (R) ayant un excès énantiomérique inférieur (*ee* = 48 % pour un rendement de 75 %). La substitution du groupement méthyle C(4) par un atome de chlore conduit, de façon surprenante, à une inversion de la stéréosélectivité et à un alcool de configuration (S) présentant un excès énantiomérique de 55 %. L'augmentation progressive de l'encombrement stérique sur l'atome de carbone C(4) permet ainsi, comme prévu, d'augmenter considérablement l'excès énantiomérique du produit de réaction, le meilleur résultat étant obtenu avec un substituant phénylesulfoxyde (*ee* > 98 %). Il est fort intéressant de constater que ce sulfoxyde peut être facilement hydrogénéolysé, en présence de nickel de Raney, pour conduire à l'hydroxy-3(R)-butanoate d'éthyle, énantiomère du produit obtenu par réduction directe de l'acétoacétate d'éthyle.

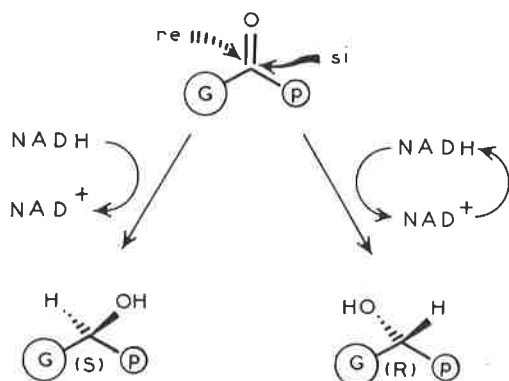


FIGURE 11. – Règle de Prelog : réduction d'une fonction carbonyle par une oxydo-réductase à NAD (P) H.

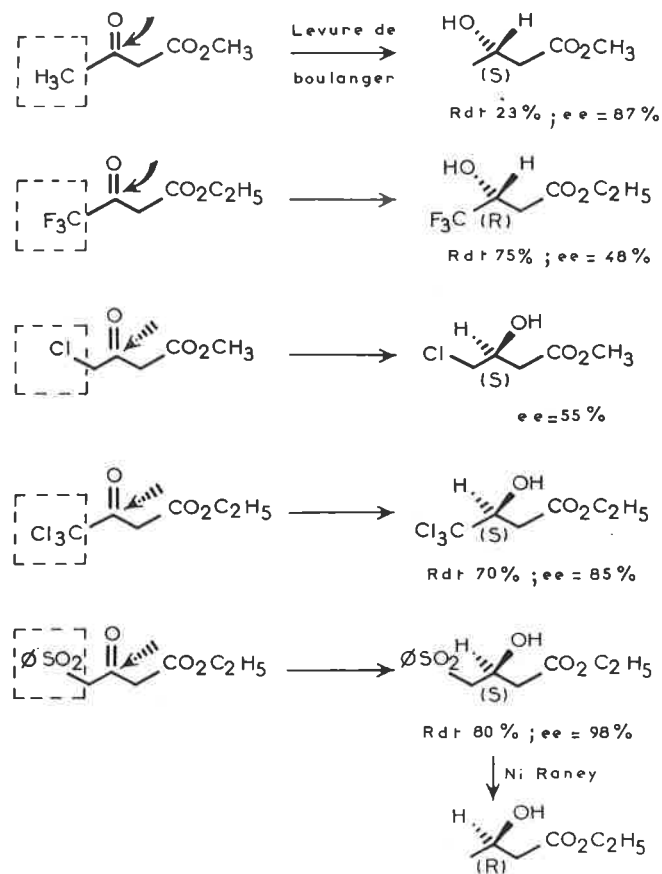


FIGURE 12. – Exemple d'influence des effets stériques sur la stéréosélectivité des oxydoréductions.

Une autre façon d'augmenter la différence d'encombrement stérique entre les deux substituants de cette fonction carbonyle consiste, bien évidemment, à augmenter la taille du substituant alkyle porté par la fonction ester. Ainsi, une étude systématique réalisée par Sih et coll. a montré que, si l'ester méthylique conduit à l'alcool de configuration (S) (*ee* = 87 %), l'ester *n*-butylique obtenu est quasiment racémique, ce qui indique une réduction non stéréosélective de la fonction carbonyle (*fig. 13*). En revanche, cette même réduction, réalisée sur des esters dérivés d'alcools possédant plus de cinq atomes de carbone, conduit à une inversion de la stéréosélectivité de la réaction et à l'augmentation progressive de l'excès énantiomérique, qui atteint une valeur supérieure à 90 % pour des chaînes comportant plus de huit atomes de carbone. L'alcool ainsi obtenu a été utilisé par Sih et coll. pour réaliser la synthèse de la L-carnitine, produit important au niveau biologique puisqu'il est impliqué dans les phénomènes de transfert des acides gras [31].

Ces exemples illustrent bien la façon dont, à partir de concepts basés sur des différences d'encombrement stérique, il est possible de moduler les stéréosélectivités de ces oxydoréductions, de façon à optimiser les excès énantiomériques des produits obtenus. Il faut cependant souligner que, contrairement à ce que l'on pourrait envisager a priori, ces résultats proviennent, non seulement d'une variation de stéréosélectivité d'une enzyme en fonction des facteurs stériques impliqués, mais aussi de l'existence, dans de nombreux microorganismes, de diverses oxydo-réductases présentant des spécificités de substrat et des stéréosélectivités différentes.

Un dernier exemple d'utilisation de ces oxydo-réductions permet d'illustrer leur utilisation dans des réactions "inverses", c'est-à-dire dans des oxydations d'alcools, réalisables grâce à la modification des conditions expérimentales mises en œuvre. Cette réaction est impliquée, par exemple, dans la bioconversion fort originale qui concerne la déracémisation de la pantoyllactone, précur-

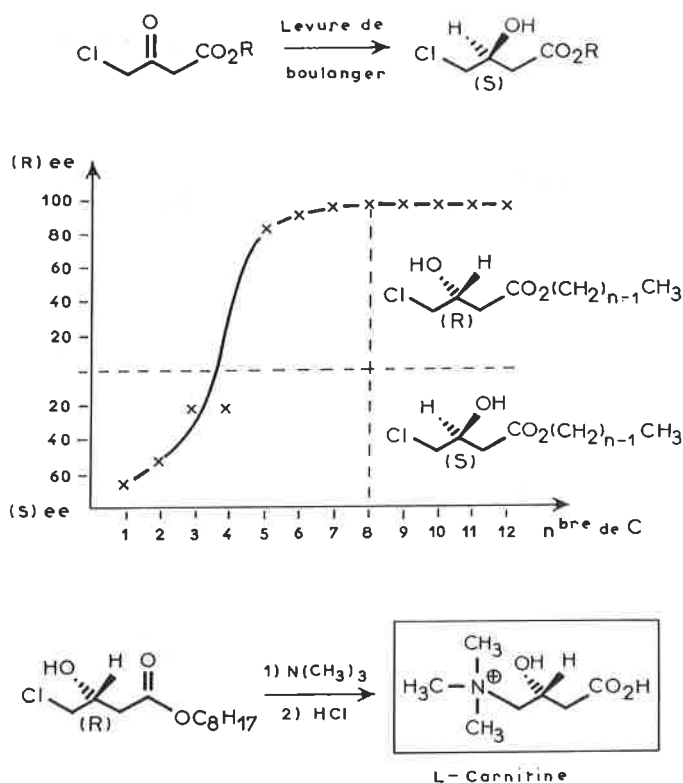


FIGURE 13. – Application d'une oxydo-réduction enzymatique à la synthèse de la L-carnitine.

seur clé de l'acide pantothénique (fig. 14). Ainsi, il a été décrit récemment que l'oxydation énantiosélective de la pantoyllactone racémique par *Rhodococcus erythropolis*, suivie de la réduction stéréosélective subséquente de la fonction carbonyle, ainsi formée, permet de préparer la (S)- pantoyllactone avec un rendement supérieur à 90 % et un excès énantiomérique égal à 95 %. Ce très bel exemple de bioconversion est, à notre connaissance, unique en son genre [32].

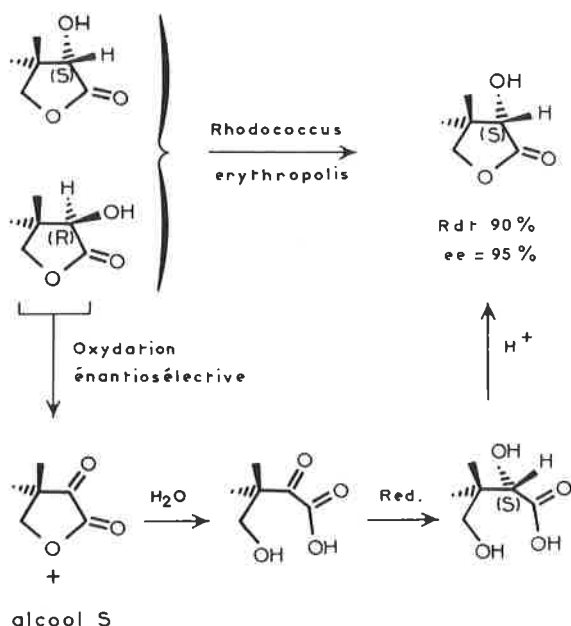


FIGURE 14. – Déracémisation de la pantoyllactone par bioconversion.

La formation de doubles liaisons constitue un autre type d'oxydo-réduction extrêmement intéressant, dans la mesure où elle a conduit à d'importantes applications dans le domaine des stéroïdes doués d'activités progestomimétiques ou estrogènes.

Ainsi, la déshydrogénation en position 1-2 est réalisée par de nombreux microorganismes comme par exemple *Arthrobacter simplex*. Ceci permet la synthèse industrielle de la prédnisone (à partir de la cortisone) ou celle de la triamcinolone à partir de la 9 α -fluoro hydrocortisone [33] (fig. 15). De la même manière, la désydrogénation de 19-norstéroïdes possédant une fonction carbonyle en 3 conduit à l'aromatisation du cycle A et à la formation de stéroïdes phénoliques comme par exemple l'équiline.

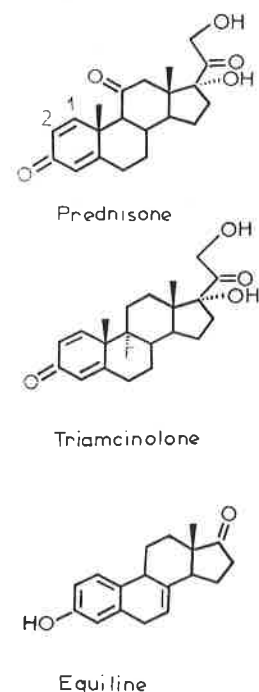


FIGURE 15. – Accès industriel à des stéroïdes par désydrogénation en position 1-2.

Les oxygénations

Les réactions d'oxygénation diffèrent des oxydo-réductions par le fait qu'elles conduisent à l'incorporation d'un ou plusieurs atomes d'oxygène dans la molécule de substrat. De par leurs potentialités, et en particulier dans la mesure où elles peuvent permettre de réaliser régio- et stéréospécifiquement des réactions actuellement impossibles à effectuer par voie chimique classique, l'utilisation de ces réactions constitue l'une des applications les plus fascinantes des bioconversions. En effet, divers types de substrats comportant des fonctions telles qu'une double liaison, un hétéroatome (atome d'azote et de soufre en particulier), une fonction carbonyle, un cycle aromatique ou des atomes de carbone non activés peuvent être oxydés lors de ces réactions (fig. 16). Selon le cas, le produit de réaction sera alors un époxyde (ou un diol résultant vraisemblablement de l'hydrolyse de cet époxyde), un oxyde d'amine ou un sulfoxyde, une lactone (résultant d'une réaction de Baeyer-Villiger sur le composé carbonyle), un phénol ou un alcool. L'intérêt de ces réactions réside essentiellement, soit dans le fait que les produits obtenus sont optiquement actifs (époxydes, sulfoxydes, lactones), soit dans le fait qu'elles sont irréalisables de façon régiospécifique par voie chimique (hydroxylation de cycles aromatiques ou d'atomes de carbone non activés). Dans la grande majorité des cas, les enzymes responsables de ces transformations sont des monooxygénases, c'est-à-dire des enzymes capables d'activer l'oxygène moléculaire pour additionner l'un des ses atomes sur le substrat organique, l'autre atome d'oxygène étant réduit en eau.

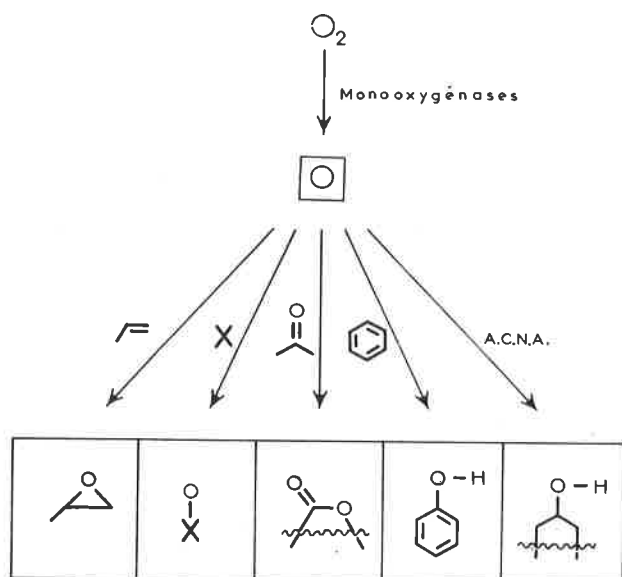


FIGURE 16. – Diverses réactions catalysées par des oxygénases.

Époxydations

Bien qu'ayant été jusqu'à présent relativement peu étudiées, les époxydations microbiologiques d'oléfines sont des réactions particulièrement attrayantes. Ainsi, au milieu des années 70, l'annonce de la mise au point d'une voie enzymatique de production de l'oxyde de propylène souleva un intérêt considérable. Ce procédé, le procédé de Cetus, était fondé sur une suite de trois réactions catalysées chacune par une enzyme spécifique (fig. 17). Malheureusement, les progrès accomplis, dans le même temps, par la pétrochimie classique utilisant l'isobutane, abondant dans les gaz de pétrole de la Mer du Nord, rendirent rapidement le procédé Cetus incompétitif au niveau industriel.

Les époxydations biologiques appliquées à la chimie fine n'en restent pas moins fort intéressantes dans la mesure où elles conduisent à des époxydes optiquement actifs. La seule voie chimique permettant l'époxydation stéréosélective d'une double liaison, la réaction de Sharpless [34] souffre en effet d'une limitation structurale sévère dans la mesure où la présence d'une fonction alcool allylique est indispensable pour l'obtention d'un bon excès énantiomérique, alors que les époxydations enzymatiques ne présentent aucune limitation structurale de ce genre [35].

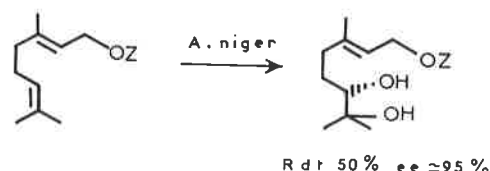
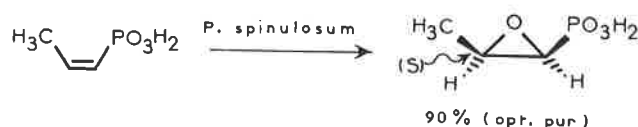
A l'heure actuelle, et bien que de nombreux exemples d'époxydations de doubles liaisons aient été observés sur des substrats divers comme, par exemple, les stéroïdes [36], la plupart des études réalisées dans le cadre de ce problème ont été effectuées sur des alcanes linéaires possédant une (ou deux) double liaison terminale et une chaîne possédant entre trois et huit atomes de carbone [37]. Quelques exceptions à cette règle concernent la syn-

thèse de molécules douées d'activité biologique, par exemple l'obtention de la phosphonmycine (un antibiotique) (fig. 18) [38] et la synthèse du (S)-Atenolol, produit possédant une activité bêta-bloquante [39].

La transformation directe d'une oléfine prochirale en diol optiquement actif, qui passe vraisemblablement par un époxyde intermédiaire, permet aussi très avantageusement l'obtention de synthons nécessaires à la synthèse de diverses autres molécules à intérêt biologique. C'est ainsi, par exemple, que le phényl uréthane du géraniol peut être transformé, en une étape unique, en un diol présentant un excès énantiomérique supérieur à 95 %. Ceci résulte de l'oxygénation régio- et stéréospécifique de la double liaison 6-7. [40].

De la même manière, il est possible de réaliser l'oxydation stéréospécifique de l'atome de soufre d'un sulfure pour conduire à un sulfoxyde chiral grâce à une réaction "énantiogénique". De façon tout à fait intéressante, en jouant sur la nature de micro-organisme choisi, il est possible de préparer l'un ou l'autre des deux énantiomères de ce sulfoxyde [41].

• d'une double liaison



• d'un atome de soufre

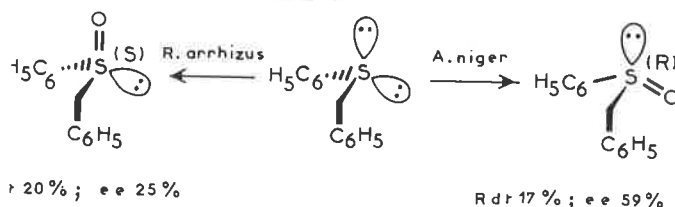


FIGURE 18. – Exemples d'oxygénation de doubles liaisons ou d'atomes de soufre.

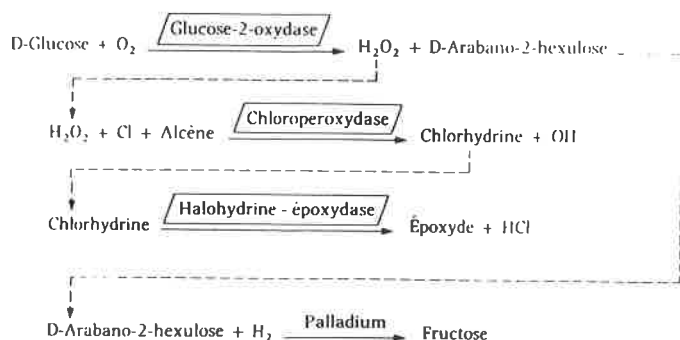


FIGURE 17. – Le procédé Cetus.

Réaction de Baeyer-Villiger

Un autre type de réaction actuellement impossible à réaliser de façon asymétrique par voie chimique est la réaction de Baeyer-Villiger. Des études développées récemment, entre autres par le groupe de Walsh et coll. ont montré que certaines souches d'*Acinetobacter*, étudiées initialement par Trudgill et coll., sont dotées d'une monooxygénase à flavine, baptisée "cyclohexanone oxygénase", capable de catalyser une telle transformation [42, 43]. Il a été démontré que celle-ci se fait avec rétention de configuration. Ces réactions peuvent donc conduire à la synthèse asymétrique de lactones, soit par réaction avec des substrats prochiraux [44, 45], soit par transformation énantiosélective d'un mélange racémique. Les excès énantiométriques des lactones ainsi obtenues

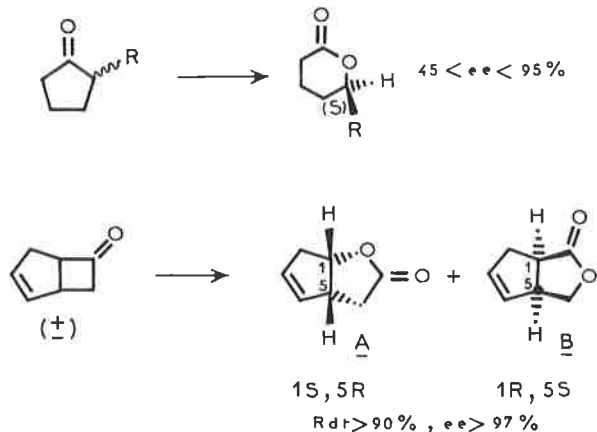
sont, dans certains cas, excellents (supérieurs à 95 %). De même, un résultat décrit précédemment par Azerad et coll. indique qu'une souche de champignons inférieurs (*Curvularia lunata*) est capable de réaliser une réaction de Baeyer-Villiger sur un cétole cyclique qui permet la synthèse ultérieure de l'acide cis-chrysanthémique optiquement pur [46].

De la même manière, diverses cyclopentanones α -alkylées peuvent conduire à des lactones optiquement actives. Ainsi, il nous a été possible de réaliser, en une seule étape, la synthèse du (S)-hexadécanolide. La cétone résiduelle ainsi obtenue peut, elle aussi, conduire en une seule étape chimique à l'énantiomère (R) qui présente un excès énantiomérique de 95 % [47] et qui est la phéromone de la reine de *Vespa orientalis* (fig. 19).

Dans ce même contexte, la bioconversion de la bicyclo [3.2.0] heptène-2-one-6 racémique conduit, avec un rendement quasi quantitatif, à un mélange de deux lactones optiquement actives présentant un excès énantiomérique supérieur à 97 %. Ce résultat est à remarquer, dans la mesure où la lactone A (1S, 5R) est l'un des produits clés les plus importants pour la synthèse de nombreuses prostaglandines. Il est aussi tout spécialement attrayant de par l'énantiosélectivité quasi parfaite de cette bioconversion. En effet, il s'agit là d'un cas, rare, où chacun des énantiomères de la cétone de départ est converti spécifiquement (via une réaction hautement régiosélective) en un produit différent [48].

Sans nul doute, il s'agit là d'une voie d'avenir permettant la synthèse de lactones optiquement actives qui, étant données leurs potentialités comme synthons chiraux, ouvre la voie à la préparation de nombreuses molécules naturelles énantiomériquement pures.

a) Substrats racémiques



b) Substrats prochiraux

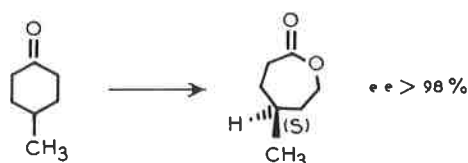


FIGURE 19. – Exemples de réactions de Baeyer-Villiger réalisées par voie enzymatique.

Réactions d'hydroxylation

Les réactions d'hydroxylation réalisables grâce à l'utilisation de microorganismes méritent, à notre sens, une attention spéciale. Elles peuvent en effet être réalisées :

- soit sur des cycles aromatiques,
- soit sur des atomes de carbone non activés.

a) Oxydations de cycles aromatiques

Les réactions d'hydroxylation de cycles aromatiques sont particulièrement intéressantes dans la mesure où l'hydroxylation chimique en position para de noyaux aromatiques est quasiment impossible à réaliser de façon hautement régiospécifique. En revanche, divers exemples décrits dans la littérature indiquent que le processus biologique correspondant peut s'avérer être très régiosélectif. C'est ainsi que l'acétanilide ou divers uréthanes dérivés de l'aniline peuvent être hydroxylés régiospécifiquement en position para. Par exemple, nous avons montré que le Pro-pham (urethane isopropylique utilisé couramment comme herbicide il y a quelques années) subit, sous l'action du champignon *Beauveria sulfurescens*, une hydroxylation régiospécifique dans cette position [49].

Il est aussi possible, en utilisant des microorganismes mutés, de réaliser l'oxydation du benzène ou du toluène. Ce procédé, mis au point par la société ICI en Grande-Bretagne, permet l'accès direct au "benzène cis glycol" (BCG), molécule de base de la synthèse de polymères techniques dont la fabrication industrielle semble être envisagée prochainement [50] (fig. 20).

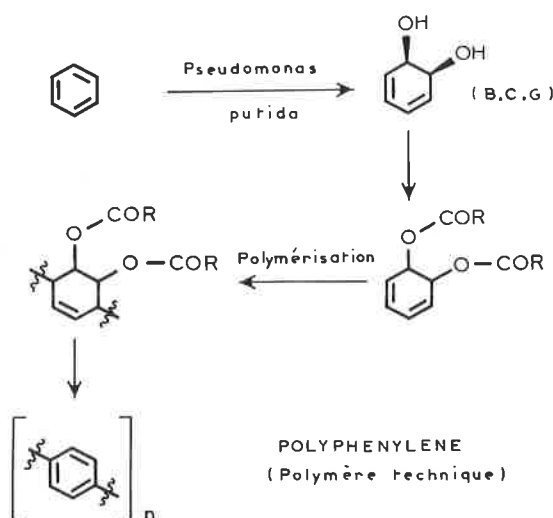


FIGURE 20. – Biooxydation du benzène.

b) Hydroxylation d'atomes de carbone non activés

Enfin "last but not least", il convient de souligner que certains systèmes enzymatiques, essentiellement les cytochromes p-450, permettent de réaliser l'hydroxylation d'atome de carbone non activés avec une grande efficacité et des sélectivités très généralement élevées. Ce type de transformation est à la base des deux bouleversements qui ont marqué le développement de la chimie des stéroïdes : d'une part, la 11- α -hydroxylation de la progestérone (préparée par transformation chimique de la diosgénine, extraite d'une liane mexicaine, la liane de Barbasco) ; d'autre part, la dégradation de la chaîne latérale des stéroïdes, qui a permis l'utilisation, pour réaliser l'hémisynthèse de nombreux stéroïdes, de produits naturels abondants et bon marché tels le cholestérol, le sitostérol ou le stigmastérol [51, 52] (fig. 21). Un certain nombre d'études ultérieures ont montré que de telles hydroxylation pouvaient être réalisées sur des substrats naturels divers comme les sesquiterpènes (fig. 22) ; cette approche a été exploitée comme étape clé de la transformation du patchoulol en norpatchoulénol, ou du cédrol en cédrénone, produits mineurs présents dans les huiles essentielles de patchouli ou de cèdre et qui comptent parmi les vecteurs olfactifs de ces extraits, très prisés en parfumerie [53, 54].

Diverses molécules non naturelles ont aussi été hydroxylées, parmi lesquelles l'acide isobutyrique constitue un exemple spectaculaire. En effet, l'hydroxylation stéréospécifique de l'un des

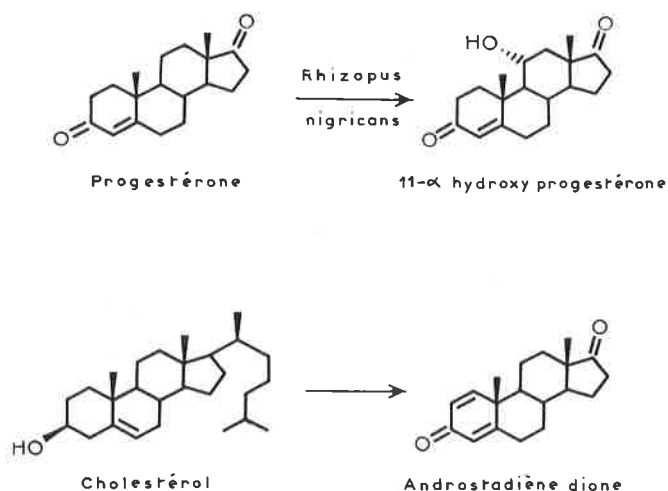


FIGURE 21. – Les deux applications industrielles primordiales dans la chimie des stéroïdes.

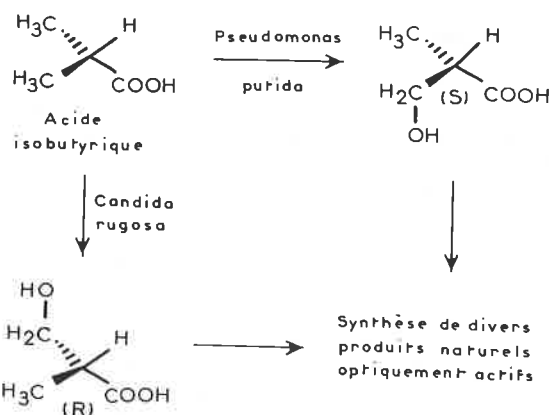
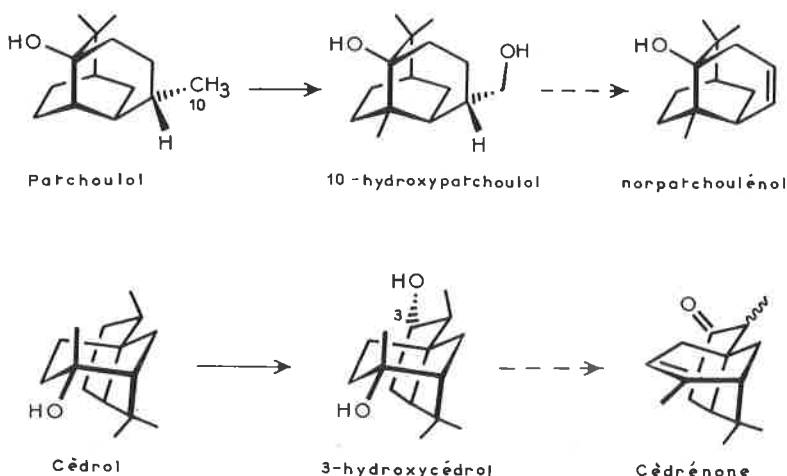


FIGURE 23. – Biohydroxylation régiospécifique de l'acide isobutyrique.

groupements méthyle énantiotopiques de cette molécule conduit à un synthon chiral de configuration (R) ou (S) selon le micro-organisme choisi [55, 56] (fig. 23). Les synthons ainsi obtenus ont été utilisés pour réaliser la synthèse de diverses molécules optiquement actives douées d'activités biologiques telle l' α -tocophérol (vitamine E) ou des muscone, molécule odoriférante extraite de glandes de bouquetins [57, 58].

Conclusion

Les divers exemples que nous avons cités dans cet article ont été sélectionnés de façon à illustrer les diverses potentialités propres aux bioconversions. Ces techniques, utilisables avec souvent un minimum de matériel spécialisé et en mettant en œuvre des techniques microbiologiques de base facilement accessibles à un chimiste organicien, recèlent, comme nous avons essayé de le démontrer, un certain nombre de potentialités fort intéressantes, en particulier dans le domaine de la synthèse chirale. Ainsi, il est possible, soit de réaliser le dédoublement d'un mélange racémique (réaction "énantiosélective"), soit d'effectuer la transformation stéréospécifique d'un substrat prochiral ou la transformation régiospécifique de fonctions énantiotopiques diverses portées par des molécules ou des atomes de carbone prochiraux (réactions "énantiogéniques"). De même, diverses réactions d'oxyda-

tion permettent de réaliser des transformations difficiles (ou impossibles) à effectuer par voie chimique classique.

Comme nous l'avons précisé au début de cet article, il est bien évident que de nombreuses applications fort intéressantes de ces bioconversions ont été passées sous silence, c'est le cas, par exemple, de l'obtention d'acides aminés optiquement actifs, naturels ou non naturels, de configuration L ou D, qui nécessiteraient à eux seuls un article dévolu à leur obtention.

Étant données ces multiples potentialités, il est fort probable que, malgré les récents progrès décrits dans la littérature en ce qui concerne la synthèse chimique asymétrique, les bioconversions continueront à se développer fortement au cours des prochaines années et fourniront au chimiste organicien des voies de synthèse qui s'avéreront, dans certains cas, nettement plus performantes que les méthodes purement chimiques utilisées actuellement. Ces potentialités ont déjà été concrétisées par certains développements industriels de première importance et il est à prévoir que bien d'autres applications, tout aussi intéressantes, émergeront à court ou moyen terme. Les domaines dans lesquels ces techniques devraient vraisemblablement se développer dans un premier temps sont, à notre sens, la synthèse de molécules destinées à des applications agrochimiques ou pharmacologiques, ainsi que le domaine des arômes naturels à usage alimentaire. Sans nul doute, comme le souligne G. Calton dans un article récent, nous nous acheminons très rapidement vers "l'âge d'or des bioconversions" [59].

Bibliographie

- [1] Pasteur (L.), *C.R. Acad. Sci.*, **1862**, 55, 28.
- [2] Plimmer (R.H.A.), The chemical changes and products resulting from fermentation, Longmans, Green and Company, Londres, **1903**.
- [3] Stodola (F.H.), Chemical transformations by micro-organisms, Wiley and Sons, New York, **1958**.
- [4] Wallens (L.L.), Stodola (S.H.), Jackson (R.W.), Type reactions in fermentation chemistry, Agricultural Research Service, USDA, **1959**.
- [5] Achrem (A.A.), Titov (Yu A.), Microbial transformations of steroids, Nauka Press, Moscou, **1966**.
- [6] Charney (W.), Herzog (H.L.), Microbial transformations of steroids, Academic Press, New York, **1967**.
- [7] Kieslich (K.), Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds, Georg Thieme, Stuttgart et Wiley and Sons, New York, **1975**.
- [8] Pour des revues récentes, voir par exemple :
a) Whitesides (G.M.), Wong (C.H.), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 617 ;
b) Jones (J.B.), *Tetrahedron*, **1986**, 42, 3351 ;
c) Yamada (H.), et Shimizu (S.), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 622.
- [9] Mahato (S.B.), Banerjee (S.), Podder (S.), *Phytochem.*, **1989**, 28, 7.
- [10] Wong (C.H.), *Science*, **1989**, 244, 1145.
- [11] Trefouel (J.et T.), Nitti (F.), Bovet (D.), *C.R. de la Société de Biologie*, 23 novembre **1935**.
- [12] Rosazza (J.P.), Microbial transformations of biactive compounds, CRC Press, New York, **1982**.
- [13] Hamberg (M.), Samuelson (B.), *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241, 257.
- [14] Sebek (O.K.), Lincoln (F.H.), Schneider (W.P.), 5th Int. Cong., West Berlin (Abstr.), 17 mai **1976**.
- [15] Rasonyi (S.), Martinoni (B.), Buist (P.H.), Arigoni (D.), *Comptes Rendus de la Société Suisse de Chimie*, 21 octobre **1988**.
- [16] Ladner (W.E.), Whitesides (G.M.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 7250.
- [17] Matsuo (N.), Ohno (N.), *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 5533.
- [18] Ohno (M.), Enzymes in Organic Synthesis ; Ciba Foundation Symposium 111, Pitman, London, **1985**, p. 171.
- [19] Langrand (G.), Baratti (J.), Buono (G.), Triantaphylides (C.), *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 29.
- [20] Maltrason, *Methods Enzymol.*, **1988**, 137, 657.
- [21] Margolin (A.L.), Klivanov (A.M.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 3802.
- [22] Cambou (B.), Klivanov (A.M.), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1984**, 9.
- [23] Cawthorne (M.A.), Ger. P. 2 356 630/1974 ; *Chem. Abst.*, **1975**, 82, 15244.
- [24] Fukumura (T.), *Agric. Biol. Chem.*, **1976**, 40, 1687 ; **1977**, 41, 1327.
- [25] Oyada (K.), *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [26] Jallageas (J.C.), Arnaud (A.), Galzy (P.), *Advances in Biochemical Engineering* (A. Fiechter, ed.), Springer Verlag, Berlin, **1980**.
- [27] Godtfredsen (S.E.), Ingvorsen (K.), Yde (B.), Andresen (O.), *Biocatalysts in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, **1985**.
- [28] Prelog (V.), *Pure Appl. Chem.*, **1964**, 9, 119.
- [29] Seebach (D.), Renaud (P.), Bernd Scheizer (W.), Zuger (M.F.), Brienne (M.J.), *Helv. Chim. Acta*, **1984**, 67, 1843.
- [30] Nakamura (K.), Oshio (K.), Oka (S.), Ohno (A.), Yasui (S.), *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3979.
- [31] Zhou (B.N.), Gopalan (A.S.), Van Middelworth (F.), Shieh (W.R.), Sih (C.J.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5925.
- [32] Shimizu (S.), Hattori (S.), Hata (H.), Yamada (H.), *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, 53, 519.
- [33] Kieslich (K.), "Biotechnology", vol. 6a, Verlag Chemie, Weinheim, **1984**.
- [34] Pfenninger (A.), *Synthesis*, **1986**, 89.
- [35] May (S.W.), Enzymatic epoxidation reactions. *Enzyme Microb. Technol.*, **1979**, 1, 15.
- [36] Kadis (B.), Steroid epoxides in biologic systems. A review. *J. Steroid Biochem.*, **1978**, 9, 75.
- [37] Schwartz (R.D.), Mac Coy (C.J.), *Appl. Environ. Microbiol.*, **1977**, 34, 47.
- [38] White (D.F.), Birnbaum (J.), Meyer (R.T.), Broeke (J.T.), Chemerda (J.M.), Denain (A.L.G.), *Appl. Microbiol.*, **1971**, 22, 55.
- [39] Johnstone (S.L.), Philips (G.T.), Robertson (B.W.), Watts (P.D.), Bertola (M.A.), Koger (H.S.), Marx (A.F.), *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [40] Fourneron (J.D.), Archelas (A.), Furstoss (R.), *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4686.
- [41] Auret (B.J.), Boyd (D.R.), Henbest (H.B.), Watson (C.G.), *Phytochem.*, **1974**, 13, 65.
- [42] Walsh (C.T.), Chen (Y.C.J.), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 333.
- [43] Donoghue (N.A.), Norris (D.B.), Trudgill (P.W.), *Eur. J. Biochem.*, **1976**, 63, 175.
- [44] Schwab (J.M.), Li (W.B.), Thomas (L.P.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4800.
- [45] Taschner (M.H.), Black (D.J.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6892.
- [46] Angelo (J. d'), Revial (G.), Azerad (R.), Buisson (D.), *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 40.
- [47] Alphand (V.), Archelas (A.), Furstoss (R.), *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 347.
- [48] Alphand (V.), Archelas (A.), Furstoss (R.), *Tetrahedron Lett., Biocatalysis*, **1990**, sous presse.
- [49] Vigne (B.), Archelas (A.), Fourneron (J.D.), Furstoss (R.), *Tetrahedron*, **1986**, 42, 2451.
- [50] Taylor (S.C.C.), Ribbons (D.W.), Slavin (A.M.Z.), Widdowson (D.A.), Williams (D.J.), *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 6391.
- [51] a) Nagasawa (M.), Bae (M.), Tamura (G.), Arima (K.), *Agric. Biol. Chem.*, **1969**, 33, 1644 ;
b) Sih (C.J.), Wang (K.C.), *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 1387 ;
c) Holland (H.L.), *Chem. Soc. Rev.*, **1983**, 371.
- [52] Martin (C.K.A.), *Adv. Appl. Microbiol.*, **1977**, 22, 28.
- [53] Suhara (Y.), Iton (S.), Ogawa (M.), Yokose (K.), Sawada (T.), Sano (T.), Rinomiya (R.), Maruyama (H.B.), *Appl. Environ. Microbiol.*, **1981**, 42, 187.
- [54] Lamare (V.), Fourneron (J.D.), Furstoss (R.), Ehret (C.), Corbier (B.), *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 6269.
- [55] Shimazaki (M.), Hasegawa (J.), Kan (K.), Nomura (K.), Nose (Y.), Kondo (H.), Omashi (T.), Watanabe (K.), *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, 30, 3139.
- [56] Hasegawa (J.), Ogura (M.), Kanema (H.), Noda (N.), Kawaharada (H.), Watanabe (K.), *J. Ferment. Technol.*, **1983**, 60, 501.
- [57] Cohen (N.), Eichel (W.F.), Lopersti (R.J.), Neukom (G.), Saucy (G.), *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 3505.
- [58] Branca (Q.), Fischli (A.), *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 925.
- [59] Calton (G.), *Biofutur*, **1988**, 41.