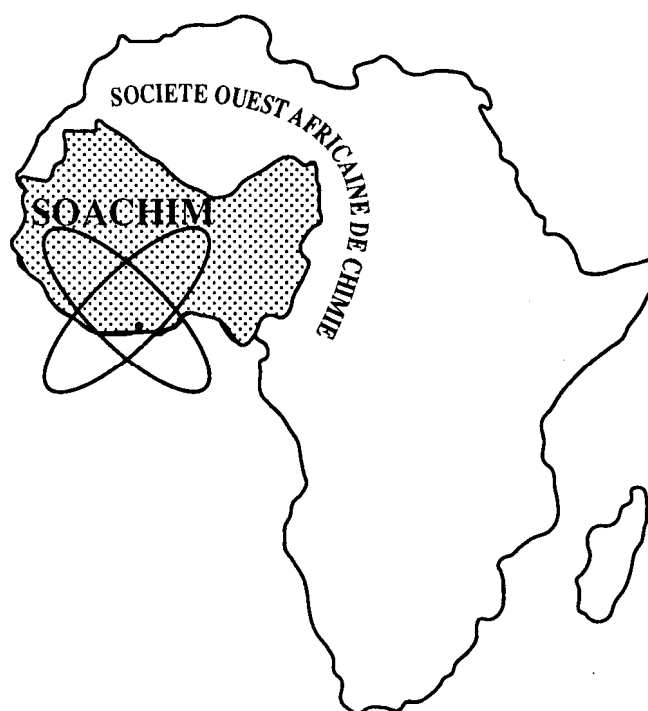


# *Réduction du 2-acétylpyridine par la Levure de Boulanger : Une étude de la spécificité de substrat de la YADH (Yeast Alcohol DeHydrogenase)*

**Issa Samb et Mohamed Lamine Gaye**

***Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie***

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*(2017), 044 : 58 - 63  
22<sup>ème</sup> Année, Décembre 2017



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2  
Cote INIST (CNRS France) : <27680>  
Site Web: <http://www.soachim.org>

## Réduction du 2-acétylpyridine par la Levure de Boulanger : Une étude de la spécificité de substrat de la YADH (Yeast Alcohol DeHydrogenase)

Issa Samb<sup>1,2\*</sup> et Mohamed Lamine Gaye<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Chimie de Coordination Organique (LCCO), Département de chimie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal

2. Equipe de recherche de Chimie Organique et Thérapeutique (ECOT) de l'Université Alioune Diop de Bambey, Sénégal

(Reçu le 03/04/2017 – Accepté après corrections le 29/12/ 2017)

**Résumé :** La levure de boulanger est une déshydrogénase qui suit la règle de Prelog. Cette dernière nous indique que le transfert de l'hydrure pro-*R* du pyridinium de la YADH a eu lieu sur la face *Re* du 2-acétylpyridine ce qui conduit à la synthèse de l'énantiomère *S* du 1-(pyridin-2-yl)éthanol, comme le montre le schéma suivant :

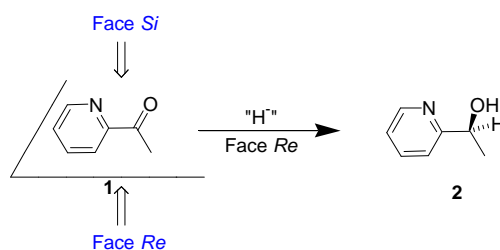


Figure 1. Réduction régiosélective du 2-acétylpyridine

**Mots clés :** YADH, pyridinium, 2-acétylpyridine, 1-(pyridin-2-yl)éthanol, ester de Mosher

## Reduction of 2-acetylpyridine by Baker's Yeast: A study of the substrate specificity of YADH (Yeast Alcohol Dehydrogenase)

**Abstract:** Baker's yeast is a dehydrogenase that follows the Prelog rule. The latter indicates that the transfer of the pro-*R* hydride of the pyridinium of the YADH took place on the *Re* face of the acetyl pyridine. This leads to the synthesis of the *S*-enantiomer of 1-(pyridin-2-yl)ethanol, as shown in the following diagram:

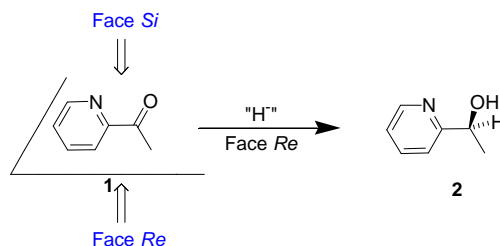


Figure 1. Regioselective reduction of 2-acetylpyridine

**Key words:** YADH, pyridinium, 2-acetylpyridine, 1-(pyridin-2-yl)ethanol, ester of Mosher

\* Email : [issa.samb@uadb.edu.sn](mailto:issa.samb@uadb.edu.sn)

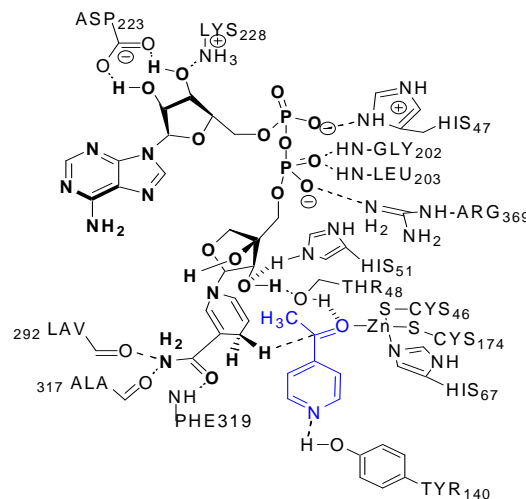
## 1. Introduction

La réduction de composés carbonyles prochiraux par la levure YADH a été largement étudié en chimie bio-organique pour obtenir divers types d'alcools asymétriques. Des travaux antérieurs sur l'influence des structures de départ sur la stéréochimie ont montré que la réduction catalysée de cétones aliphatiques par des micro-organismes conduit à des alcools secondaires asymétriques avec une énantiosélectivité modérée. [1]

Dans le cadre de nos travaux de recherche nous nous sommes intéressés à la réduction de cétones non symétriques en alcools asymétriques par la levure YADH. Nous reportons dans cet article les résultats des travaux que nous avons réalisés en partant du 2-acétylpyridine. L'étude par RMN de l'ester de Mosher résultant de la réduction du 2-acétylpyridine par la levure YADH nous a permis de voir l'efficacité de la réaction par la mesure de son taux de conversion et son énantiosélectivité. Ceci nous a également permis d'effectuer une étude de la relation structure-activité du 2-acétylpyridine et du transfert de l'hydrure pro-*R*.

Cette orientation du transfert d'hydrure résulte de l'orientation du substrat dans le site actif de l'enzyme. Comme nous le montre le modèle du site actif, la conformation de l'YADH au sein de ce site semble bloquée par de nombreuses liaisons ainsi que des interactions électrostatiques, avec les acides aminés du site actif de l'enzyme. [2-5]

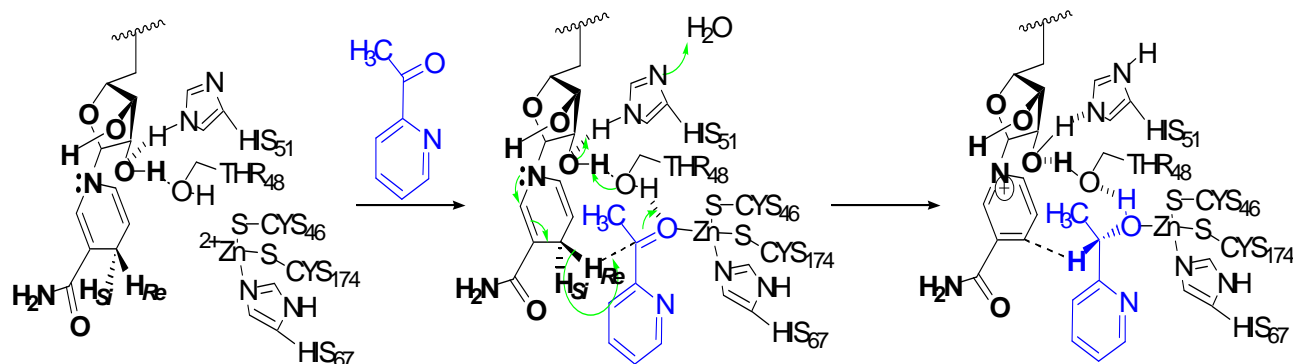
On notera que chacun des tétramères qui compose la YADH comporte un ion  $Zn^{2+}$  (accepteur de ligand) et un groupe  $NAD^+$ , qui vont participer à la réduction. [6]



**Figure 2.** Rôle de l'enzyme pour le transfert de l'hydrure

Le mécanisme de cette réduction est une chaîne de transmissions de protons. [7-9]. En effet la dihydropyridine de NADH cède son proton Pro-*R*, idéalement situé au-dessus du plan de la 2-acétylpyridine au carbonyle dont l'orientation est bloquée par la formation d'un complexe avec le zinc. Suit alors un transfert de proton entre les acides aminés et  $NAD^+$  pour conduire à l'alcool **2**. Tous les composants intervenant dans ce mécanisme sont en interactions par des liaisons hydrogènes, comme on peut le voir dans le mécanisme suivant : (Figure 3)

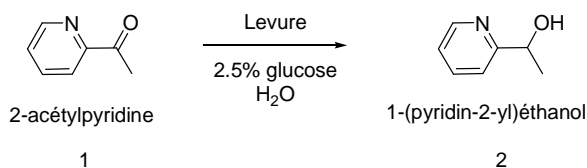
On notera que l'eau intervenant dans ce mécanisme est celle présente dans le milieu. Le transfert d'hydrogène devrait donc être stéréospécifique du proton Pro-*R* et conduire à l'alcool attendu de configuration *S*, ce que nous allons pouvoir déterminer par la suite en étudiant le mélange d'énantiomères formé par l'intermédiaire d'un ester de Mosher. [10-12]



**Figure 3.** Mécanisme de la réduction

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Synthèse de l'alcool du 1-(pyridin-2-yl)éthanol



**Figure 4.** Préparation du 1-(pyridin-2-yl)éthanol

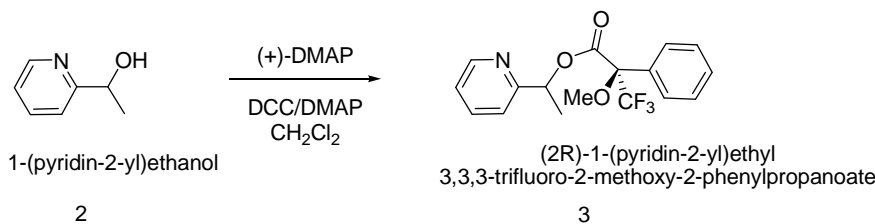
Après 5 jours d'agitation, le surnageant présent dans le milieu réactionnel est extrait par de l'acétate d'éthyle et une solution de chlorure de calcium. Le résidu obtenu après séchage et concentration est un mélange du 2-acétylpyridine **1** ( $R_f = 0,56$ ) et de l'alcool **2** (1-(pyridin-2-yl)éthanol) attendu ( $R_f = 0,35$ ), (éluant DCM/ 5% MeOH, révélation UV,  $\lambda = 254\text{nm}$ ).

Pour le mélange 1-(pyridin-2-yl) éthanol et 2-acétylpyridine, on identifie chaque molécule grâce aux déplacements chimiques puis on effectue une séparation par purification sur colonne de silice.

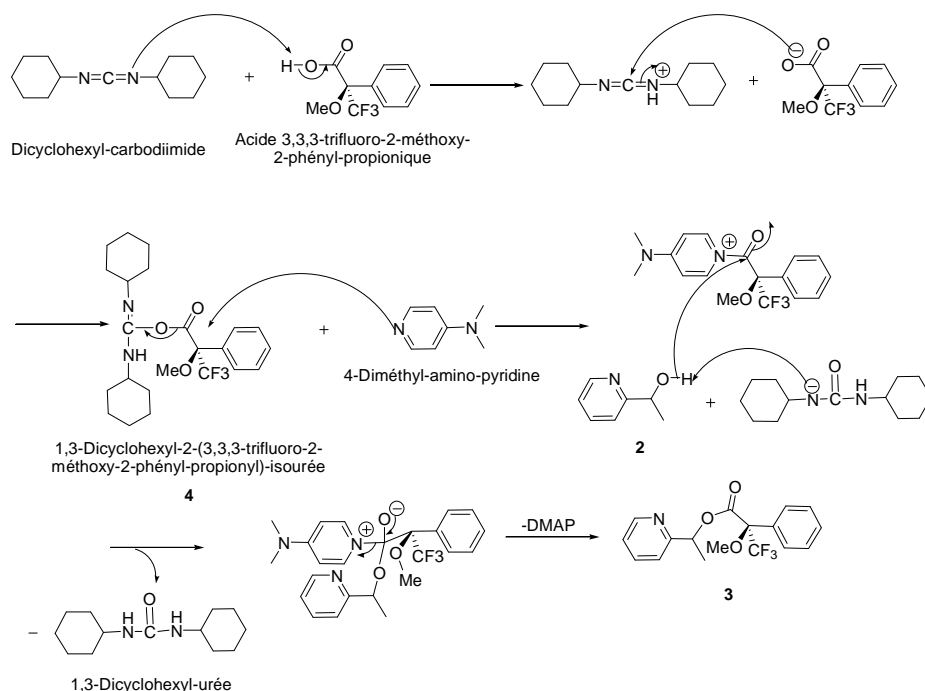
### 2.2 Synthèse de l'ester de Mosher du 1-(pyridin-2-yl)éthanol

L'ester de Mosher de l'alcool précédemment synthétisé est obtenu par activation de l'acide par le DCC ce qui conduit à la formation d'un dérivé *O*-acylé **4**. Cet agent d'acylation réagit lentement avec l'alcool pour former l'ester. Elle est catalysée par la DMAP pour éviter la formation de produit secondaire.

L'effet catalytique de la DMAP est dû à la fonction diméthylamine qui joue le rôle de substituant donneur d'électron, il y a alors augmentation de la nucléophilie et de la basicité de l'azote de la pyridine, ce qui la rend bien plus réactive que l'alcool. Les conditions requises pour la catalyse nucléophile sont donc réunies et l'acylation de l'alcool par un acide est plus rapide en présence de DMAP. Une fois qu'elle a activé le carbonyle de la DMAP est éliminée par une substitution nucléophile de l'alcool sur le ce même carbonyle, ce qui conduit à la formation de l'ester de Mosher **3** attendu avec un rendement de 56%.



**Figure 5.** Préparation de l'ester de Mosher du 1-(pyridin-2-yl)éthanol



**Figure 6.** Mécanisme pour la synthèse de de l'ester de Mosher du 1-(pyridin-2-yl)éthanol

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1.1-(pyridin-2-yl)éthanol

Pour le mélange du 1-(pyridin-2-yl)éthanol et du 2-acétylpyridine, on identifie chaque molécule présente au sein de ce mélange, grâce aux déplacements chimiques précédemment identifiés. RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) : δ = 1,5 (d, CH<sub>3</sub> alcool, J=6,55Hz), 2,74 (s, CH<sub>3</sub> acétyle), 4,89 (q, CH, J=6,55Hz), 7,2 (m, CH<sub>ar</sub> alcool), 7,29 (s, CH<sub>ar</sub> alcool), 7,47 (m, CH<sub>ar</sub> acétyle), 7,69 (m, CH<sub>ar</sub> alcool), 7,83 (m, CH<sub>ar</sub> acétyle), 8,02 (m, CH<sub>ar</sub> acétyle), 8,54 (m, CH<sub>ar</sub> alcool), 8,68 (m, CH<sub>ar</sub> acétyle).



Figure 7. Signaux RMN des protons du 1-(pyridin-2-yl)éthanol et du 2-acétylpyridine

On considère les groupements méthyles des deux composés comme étant des signaux caractéristiques et on utilise leurs intégrations pour calculer le taux de conversion de cette étape.

$$\text{Taux de conversion} = \frac{\text{Aire du pic caractéristique de l'alcool}}{\sum \text{aires des pics caractéristiques de l'alcool et de l'acétyle}}$$

$$\text{Taux de conversion} = \frac{1,1897}{1,1897+2} = 37\%$$

On effectue une purification par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de dichlorométhane et de méthanol. Une fois l'alcool **2** séparé, il est concentré puis analysé par IR et RMN. Nous avons obtenu 360 mg de produit après purification avec un rendement de 52%.

#### 3.2. L'ester de Mosher

L'acide de Mosher est un réactif chiral qui nous permet de réaliser facilement une dérivation de l'alcool synthétisé. Comme il se trouve sous la forme d'un mélange d'énantiomères, nous allons avoir un mélange de diastéréoisomères qui répondent en RMN par des pics dont les surfaces sont proportionnelles aux quantités des isomères présents dans le mélange, et de par la présence du noyau aromatique, par des déplacements chimiques notablement différents.

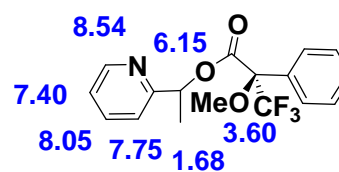


Figure 8. Signaux RMN de l'ester de Mosher

Le méthyle de cette molécule apparaît de nouveau sous forme d'un signal remarquable en RMN. En effet, le méthyle de chaque diastéréoisomère répond sous forme d'un doublet blindé à 1,6 ppm pour l'un et à 1,7 ppm pour l'autre.

Il nous faut alors déterminer à quel signal correspond chaque diastéréoisomère. Ceci est réalisé à l'aide du modèle de l'ester de Mosher, qui nous permet de déduire que le signal le plus déblindé est celui du diastéréoisomère R-S et le moins déblindé correspond à celui du diastéréoisomère R-R.

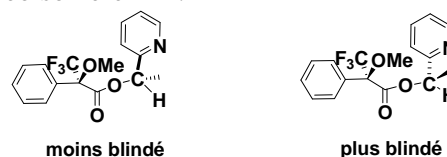


Figure 9. Les structures des diastéréoisomères R-S et R-R

A l'aide des intégrations des pics des signaux en RMN, on peut alors déduire les pourcentages d'énantiomères S et R ainsi que le pourcentage d'excès énantiomérique.

$$\% \text{ d'énantiomère S} = \frac{\text{Aire du pic caractéristique de l'ester RS}}{\sum \text{aires des pics caractéristiques de l'ester RS et de l'ester RR}}$$

$$\% \text{ d'énantiomère S} = \frac{3,0000+2,8663}{3,000+2,8663+1,0480+0,9713} * 100 = 74\%$$

$$\% \text{ d'énantiomère R} = \frac{1,0480+0,9713}{3,000+2,8663+1,0480+0,9713} * 100 = 26\%$$

$$\% \text{ d'excès énantiomérique} = \frac{0,74 - 0,26}{100} * 100 = 49\%$$

Nous avons bien obtenu une majorité d'alcool 2*S*, comme le prévoyait le modèle de Prelog. La levure de boulanger suit donc la règle de Prelog et réduit les acétylpyridines en alcool par attaque privilégiée de l'ion hydrure par la face *Re*. Cependant, on note qu'il y a également formation de l'alcool *R* en quantité moindre.

### 3.3. Etude du site actif de l'enzyme

L'étude du site actif de l'enzyme révèle l'existence d'un pont hydrogène entre de proton phénolique de la tyrosine 140 et le doublet libre de l'atome d'azote de l'acétylpyridine. D'autres ponts hydrogènes sont également notés comme par exemple celui qui est établi entre l'atome d'oxygène du groupement acétyle et l'un des atomes d'hydrogène du groupement pyridinium NAD<sup>+</sup>. Ces différents ponts hydrogène contribuent à fixer la conformation du groupement carbonyle et à stabiliser l'édifice.

### 3.4. Procédures générales de synthèse du 1-(pyridin-2-yl)éthanol et de l'ester 3

#### Composé 2 : 1-(pyridin-2-yl)éthanol

##### Réactifs : Tableau I

Après 5 jours d'agitation, le surnageant présent dans le milieu réactionnel est extrait par de l'acétate d'éthyle et une solution de chlorure de calcium (NaCl). Le résidu obtenu après séchage et concentration est un mélange d'acétylpyridine **1** et de l'alcool **2** attendu. Une purification par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de dichlorométhane et de méthanol nous a permis d'obtenir 360 mg de l'alcool **2** avec un rendement de 52%

**RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) :** δ = 1,5 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, *J*=6,6Hz), 4,36 (s, 1H, OH), 4,89 (q, 1H, CH, *J*=6,6Hz), 7,19 (dd, 1H, CH<sub>ar</sub>, *J*=6,9 et 4,7Hz), 7,3 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>, *J*=6,9Hz), 7,68 (m, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8,5 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>, *J*= 4,3Hz).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3252 (OH), 2927 (C-CH<sub>3</sub>), 1515 (C=C), 1265 (C-O).

#### Composé 3 : Ester

##### Réactifs : Tableau II

Le mélange laiteux maintenu à reflux 12 h est filtré après refroidissement. Le filtrat est ensuite dilué et mis en contact avec une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) dans une ampoule à décanter. La phase organique récupérée est ensuite séchée sur du N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être concentrée par évaporation. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle pour éliminer les traces de DCU formée, qui est insoluble dans ce solvant, par filtration. Le résidu obtenu après concentration est un mélange de l'ester désiré **3** (Rf = 0,88) et de l'alcool **2** (Rf = 0,35), (éluant DCM/ 5% MeOH, révélation UV, λ = 254nm). On effectue alors une purification par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de dichlorométhane et de méthanol. Une fois l'ester **3** séparé, il est concentré puis analysé par IR, RMN, CCM. Nous avons obtenu 155 mg d'huile jaune pâle, monospot, correspondant un rendement de 56%.

**RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) :** δ = 1,64-1,70 (d, CH<sub>3</sub>, *J*=6,75Hz), 3,53-3,59 (m, CH<sub>3</sub>), 6,15 (q, CH, *J*=6,75Hz), 7,13 (m, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7,17 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7,39-7,50 (m, 5H, CH<sub>ar</sub>), 7,55 (m, CH<sub>ar</sub>), 8,54 (m, 1H, CH<sub>ar</sub>).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3428 (N aromatique), 2932 (C-CH<sub>3</sub>), 2855 (O-CH<sub>3</sub>) 2118 (CF<sub>3</sub>), 1751 (C=O), 1515 (C=C), 1258 (C-O), 1168 (C-N) aromatique, 1021 (C-O), 718 (CF<sub>3</sub>)

**Tableau I.** Réactifs pour la préparation de 1-(pyridin-2-yl)éthanol

Réactifs	Masse Molaire (g/mol)	Quantité de matière (mmol)	Masse(g)	Volume (ml)
2-acétylpyridine	121	5,1	0,6	
Levure de boulanger			6	
DMF	73			2
Glucose	180			120
1-(pyridin-2-yl)éthanol	123			

**Tableau II.** Réactifs pour la préparation de l'ester de Mosher

Réactifs	Masse Molaire (g/mol)	Quantité de matière (mmol)	Masse(g)	Volume (ml)
1-(pyridin-2-yl)éthanol	123	0,813	0,1	
Acide de Mosher	234,17	0,894		18
DCC	206,33	1,22	0,25	
DMAP	122,17	0,162	0,02	
Ester de Mosher 3	339,31			

#### 4. Conclusion

Nous avons réduit plus ou moins spécifiquement la 2 acétylpyridine selon la règle de Prelog, puis nous avons déterminé l'énantiosélectivité de cette réduction par l'intermédiaire d'un ester de Mosher qui permet l'étude de cette sélectivité, via la diastéréosélectivité de l'ester, ceci par une analyse RMN.

La spécificité de cette réduction est accrue par une interaction entre le doublet libre de l'azote du noyau pyridine du substrat et un acide aminé du site actif de l'enzyme, la tyrosine 140. Cette liaison hydrogène pyridine-tyrosine 140 est essentielle pour qu'il y ait, dans le site actif, reconnaissance du substrat par l'enzyme. La position de l'azote dans le cycle par rapport au groupe acétyle influe également, considérablement, sur les interactions possibles avec les acides aminés et ainsi sur l'énantiospécificité de la réduction du groupe acétyle par la levure de Boulanger selon la règle de Prelog.

#### 5. Remerciements

Nous tenons à remercier l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans pour l'enregistrement des spectres RMN et IR.

#### 6. Bibliographie

- [1] Sarcar, S.; Jain, TK.; Maitra, A. Activity and stability of yeast alcohol dehydrogenase (YADH) entrapped in aerosol OT reverse micelles. *Biotechnol Bioeng.* **1992**, 39 (4), 474-8.
- [2] Bruno, D., Roberto, S. Synthèse totale de l'hydrocortisone dans la levure de boulanger. *Med Sci (Paris)*. **2003**, 19, 1059–1061.

[3] Bryce, V. P., Henry, A., Charlier, J., Ramaswamy, S. Mechanistic implications from structures of yeast alcohol dehydrogenase complexed with coenzyme and an alcohol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2016**, 591, 35-42.

[4] Savarimuthu, B. R., Ramaswamy, S., Bryce, V. P. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry*. **2014**, 16, 53(36), 5791–5803.

[5] Das, S., Mozumdar, S., Maitra, A. Activity and Conformation of Yeast Alcohol Dehydrogenase (YADH) Entrapped in Reverse Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 230 (2), 328-333.

[6] Howard J. E. Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research & Health*. **2007**, 30 (1), 5-13.

[7] Vallee, B. L., Hoch, F. L. Zinc, a component of yeast alcohol dehydrogenase. *PNAS*, **1955**, 41(6), 327-338.

[8] Hayes, J. E., Velick, S. F. Yeast alcohol dehydrogenase: molecular weight, coenzyme binding, and reaction equilibria. *Journal of Biological Chemistry*. **1954**, 207(1), 225-244.

[9] Vladimir L. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **2002**, 2 (4), 481-494.

[10] Hoyer, T. R., Jeffrey, C. S., Shao, F. Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (chiral) carbinol carbons. *Nature Protocols*. **2007**, 2, 2451-2458.

[11] Franca, M. C., Federica, P., Maria, S., Silvia, V., Cristina, F., Alberto, B. Application of Mosher's Method for Absolute Configuration Assignment and Resolution of 2-Hydroxypyrrrolizidinones. *Chirality*. **2005**, 149–153.

[12] Jose, M. S., Emilio, Q., Ricardo, R. The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 17–118.