UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES

Etude du mécanisme de la porphobilinogène synthase de *Pseudomonas aeruginosa* :

Synthèses, études cinétiques et structures déterminées à l'aide des rayons X d'analogues de bisubstrats

---

Thèse
présentée à l'Institut de Chimie de la Faculté des Sciences
de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences
par

Sabine GACOND

Chimiste diplômée de l'Université de Neuchâtel

Acceptée sur proposition du jury :

Prof. Reinhard Neier	Université de Neuchâtel, Directeur de thèse
Prof. Robert Deschenaux	Université de Neuchâtel, Rapporteur
Prof. Jean-Marc Neuhaus	Université de Neuchâtel, Rapporteur
Prof. Christian Bochet	Université de Fribourg, Rapporteur

1 Novembre 2005

Université de Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Etude du mécanisme de la porphobilinogène synthase de *Pseudomonas aeruginosa* : synthèses, études cinétiques et structures déterminées à l'aide des rayons X d'analogues de bisubstrats

Sabine GACOND

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

MM. R. Neier (directeur de thèse),
R. Deschenaux, J.-M. Neuhaus
et C. Bochet (Fribourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 11 novembre 2005

Le doyen :

J.-P. Derendinger

Ce travail a été effectué de septembre 2002 à novembre 2005 à l'Institut de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel sous la direction du Professeur Reinhard Neier. Au terme de ce travail, j'aimerai exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à son aboutissement.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au Professeur Reinhard Neier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son groupe sur un sujet de recherche très intéressant et stimulant ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoigné durant ces trois années.

Je remercie également les Professeurs Robert Deschenaux, Christian Bochet et Jean-Marc Neuhaus pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire et de corriger mon manuscrit.

J'adresse également mes remerciements au Prof. Dieter Jahn et au Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel de l'Université de Braunschweig (D) qui ont mis à ma disposition leur laboratoire pour tout le coté biochimique de ce travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Dr. Frédéric Frère et Merle Nentwich pour l'aide qu'ils m'ont apporté durant mon stage et pour tout le travail qu'ils ont effectué avec moi. Je les remercie également pour les discussions très intéressantes que nous avons partagées.

Ma plus profonde gratitude va également à tous ceux qui de près ou de loin ont côtoyé mon groupe et qui ont contribué à créer une bonne ambiance et de bonnes conditions de travail. Je pense particulière à Valéria Botomei, Ana-Maria Buciumas, François Loiseau, le Dr. Sylvain Burger, Valliyanagam Ramakrishnan, Beat Herzog, Laurette Schmitt, Akane Hartenbach, le Dr. Anne Bourry, le Dr. Sébastien Lanaspèze et le Dr. Olivier Vallat, de même que Youri Sauser pour sa participation dans le cadre de sa première année d'apprentissage. Un merci tout particuliers à Sylvain qui a accepté de relire ce manuscrit et qui m'a fait part de ses remarques pertinentes.

Mes remerciements vont également aux différents services analytiques de l'Institut de chimie: *le service de spectrométrie de masse avec le Dr. Laura Gonzales-Cuervo, le Dr. Nicolas Mottier et le Dr. Bernard Jean-Denis; le service de spectroscopie RMN 400 MHz avec Heinz Bursian et le Dr. Saturnin Claude; le service de masse haute résolution de l'Université de Fribourg, Freddy Nydegger et l'HES de Fribourg pour les analyses élémentaires; de même qu'aux personnes qui permettent par leur travail de faire vivre scientifiquement, administrativement et humainement l'Institut de Chimie.*

Ce travail a été soutenu financièrement par l'Etat de Neuchâtel et le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

Enfin je tiens à remercier plus particulièrement Julie L., Julie B., Laurette, Nicolas, Jérôme, Sébastien, Anne, Akane, Gaël, Ludo, et Fifi pour leur amitié et leur soutien pendant ces trois années; de même qu'en dehors de l'Institut Jenni, Vivi, Caro, Virginie, Shizuka, Toff, Agnès et Johan et tout spécialement Stuff, Alex et Vincent qui me soutiennent depuis bien longtemps maintenant et qui ont toujours été présent dans les moments difficiles.

Finalement je dédie ce travail à mon frère Stéphane et à ma sœur Christine ainsi qu'à Valérie, Erick, Léonie et Tobias et plus particulièrement à mes parents qui ont toujours cru en moi et à qui je dois bien plus qu'un simple soutien de leur part.

Abréviations

AE	analyse élémentaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ALA	acide 5-aminolévulinique
ARN	acide ribonucléique
Boc	tert-butoxycarbonyl
BTP	1,3-bis[tris-(hyroxyméthyl)méthylamino]propane
calc.	calculé
Cbz	benzylcarbonyl
CCM	chromatographie sur couche mince
COSY	correlation spectroscopy
DCI	ionisation chimique
DEAE	diéthylaminoéthyl
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfert
DMBA	p-diméthylaminobenzaldehyde
DME	1,2-diméthoxyéthane
DMF	diméthylformamide
DOSA	acide 4,7-dioxosébacique
Eb	point d'ébullition
éq.	équivalent
EI	impact électronique
ESI	electrospray ionisation
FT	fourrier transformation
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthane sulfonique
HETCOR	heteronuclear correlation spectroscopy
HMB	hydroxyméthylbilane
HR	haute résolution
IPTG	thiogalactoside d'isopropyle
IR	infrarouge
LB	Luria-Bertani
MCPBA	acide métachloroperbenzoïque
MMP	acide monoperoxyphtalique
MS	spectrométrie de masse
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBG	porphobilinogène
PBGS	porphobilinogène synthase
Pf	point de fusion
ppm	parties par million
Red-Al	bis(2-méthoxyéthoxy)aluminiumhydrure de sodium
Rf	facteur de rétention
RMN	résonnance magnétique nucléaire

rpm	revolution per minute
OSA	acide 4-oxosébacique
sat.	saturé
SDS	sodium dodécylsulfate
ta	température ambiante
TCA	acide trichloroacétique
TIM	triose-phosphate isomérase
THF	tetrahydrofurane
TMS	triméthylsilyl
Tos	toluènesulfonamide
UV	ultra-violet
VIS	visible

Acides aminés :

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Methionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosine

Inhibiteurs synthétisés :

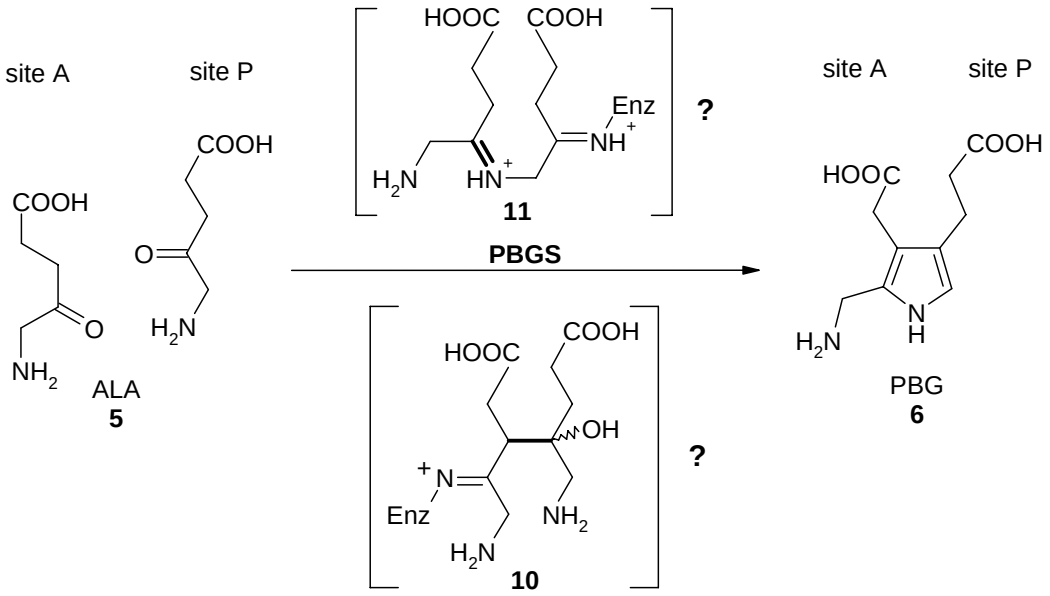
Amine	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylamino)-4-oxo-pentanoique
Ether	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo-pentanoique
Sulfone	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique
Sulfoxyde	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique
Thioéther	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo pentanoique

Structures des inhibiteurs co-cristallisées avec la PBGS :

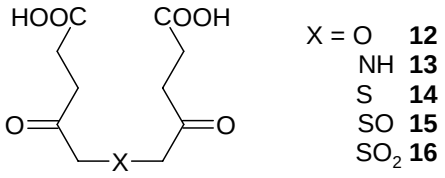
5-OH-LA/*Pa*PBGS	acide 5-hydroxylévulinique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
5-F-LA/*Pa*PBGS	acide 5-fluorolévulinique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
ALA/*Sc*PBGS	acide lévulinique co-cristallisé avec la PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure)
éther/*Pa*PBGS	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo-pentanoique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
amine/*Pa*PBGS	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylamino)-4-oxo-pentanoique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
thioéther/*Pa*PBGS	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo pentanoique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
sulfoxyde/*Pa*PBGS	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
sulfone/*Pa*PBGS	acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique co-cristallisé avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*
intermédiaireI/*Sc*PBGS	acide 5-aminolévulinique co-cristallisé avec la PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure), stabilisant l'intermédiaire II dans le site actif
intermédiaireII/*Hs*PBGS	acide 5-aminolévulinique co-cristallisé avec la PBGS humaine, stabilisant l'intermédiaire I dans le site actif

Résumé

Ce travail est basé sur l'obtention d'informations sur le mécanisme adopté par la porphobilinogène synthase (PBGS, EC 4.2.1.24). La porphobilinogène synthase est la seconde enzyme impliquée dans la biosynthèse des produits tétrapyrroliques naturels (chlorophylle, hème, etc.) qui effectue la condensation asymétrique de deux molécules d'acide 5-aminolévulinique **5** (ALA) en porphobilinogène **6** (PBG). Deux différents mécanismes ont été proposés concernant cette réaction enzymatique, passant soit par la formation d'une première liaison C-C (réaction de type aldol), soit par la formation d'une première liaison C-N (formation d'une base de Schiff) entre les deux molécules de substrat. Le même substrat doit donc être reconnu dans le site actif de l'enzyme en deux positions différentes : le site A et le site P.



Une nouvelle série d'analogue de bisubstrat, contenant les fonctions carboxylates et les fonctions cétones nécessaires pour une bonne reconnaissance au site actif de l'enzyme, a été créée. Les dimères symétriques **12-16**, dérivant de l'acide lévulinique (acide γ-céto-valérique), ont été synthétisés afin d'imiter la liaison des deux substrats au site actif de la PBGS. Différents hétéroatomes sont utilisés pour lier les deux unités d'acide lévulinique afin de tester l'influence de leur taille et de leur polarité sur leur potentiel à inhiber la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*.



Dans un premier temps, les potentiels d'inhibition des composés **12-16** ont été caractérisés en déterminant les valeurs IC_{50} sur la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*. Puis les tests cinétiques ont été effectués afin de déterminer les constantes d'inhibition et le type d'inhibition. L'hétéroatome, reliant les deux unités acide lévulinique, a une grande influence sur le comportement de l'inhibition.

Les structures aux rayons X de l'enzyme co-cristallisée avec les différents inhibiteurs **12-16**, apportent de nouvelles informations sur le mécanisme de la PBGS. Les inhibiteurs *slow binder* **13-15** liés par deux bases de Schiff dans le site actif de la PBGS, forment un intermédiaire cyclique par création d'une liaison C-C entre le carbone 3 du site A et 8 du site P. L'inhibiteur rapidement réversible **12** ne forme qu'une base de Schiff dans le site P et par conséquent l'intermédiaire cyclique n'est pas observé. Le composé **16** montre un mode de liaison unique au site actif de la PBGS car c'est un inhibiteur *slow binder* ne formant qu'une base de Schiff avec le site P et donc aucune liaison C-C. Par contre, cette structure montre la stabilisation surprenante d'un ion magnésium au site actif de la PBGS.

Lors de la co-cristallisation de la PBGS avec l'inhibiteur **12**, une hydrolyse de ce dernier s'est produite sous des conditions basiques, formant ainsi l'analogue de substrat acide 5-hydroxylévulinique **36**. Deux molécules de cet inhibiteur rapidement réversible sont liées *via* des bases de Schiff au site A et P respectivement. Ce composé est structurellement et chimiquement l'analogue le plus proche du substrat naturel ALA **5**.

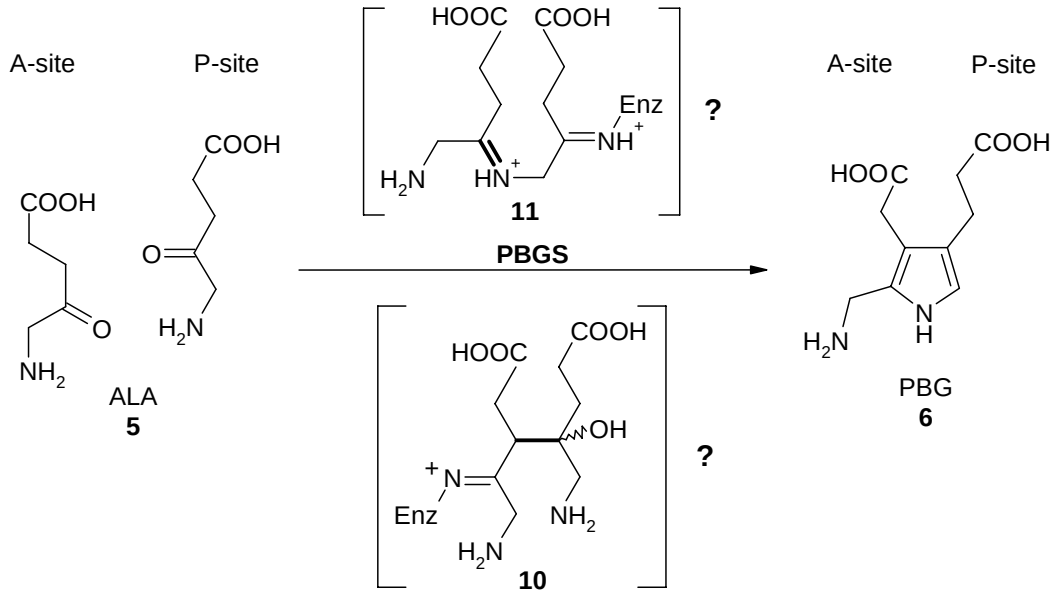
Toutes les informations apportées par les différentes structures aux rayons X des inhibiteurs synthétisés dans ce travail favorisent nettement un des deux mécanismes de la PBGS : formation de la liaison C-C avant la liaison C-N entre les deux molécules du substrat naturel.

Mots clés

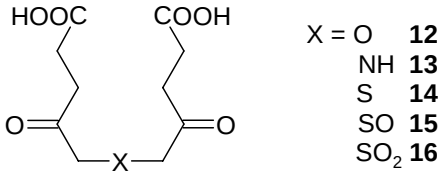
Porphobilinogène synthase; *Pseudomonas aeruginosa*; synthèse de tétrapyrrole; analogue de bisubstrat; inhibiteur; structure cristalline.

Summary

The aim of this work is to acquire new informations on the mechanism of the porphobilinogen synthase (PBGS, EC 4.2.1.24). The porphobilinogen synthase is the second enzyme involved in the biosynthesis of natural tetrapyrrolic compounds (chlorophyll, heme, etc.) which condenses by a no symmetrical way two same substrate molecules, the 5-aminolevulinic acid **5** (ALA), to form the porphobilinogen **6** (PBG). Two different mechanisms were proposed involving either a first C-C bond formation (aldol reaction) or a first C-N bond formation (Schiff base formation) between the two substrates. Therefore, the same substrate has to be recognised in the active site at two different positions: the A-site and the P-site.



A new series of bisubstrate analogs, which contains the carboxylate and keto functions for a good recognition in the active site, was created. Symetrically linked dimers **12-16** derived from levulinic acid (γ-valéric acid) have been synthesised to mimic the assumed bisubstrate bound to the active site of PBGS. Different heteroatoms were used to link the two levulinc acid units in order to test the influence of their size and polarity on their potency to inhibit the PBGS from *Pseudomonas aeruginosa*.



First, the compounds **12-16** inhibition potentiels were characterised by determining their IC_{50}-values using the PBGS from *Pseudomonas aeruginosa*. Then, kinetic data were made to

determine the constants and modes of inhibition. The heteroatom which links the two levulinic acid units, has a strong influence on the inhibition behaviour.

The X-ray structures of the enzyme with the different inhibitors **12**-**16** give new informations concerning the mechanism of the PBGS. The *slow binder* inhibitors **13**-**15** linked by two Schiff bases in the active site of the PBGS, form a cyclic intermediate by creation of a C-C bond between the carbon 3 in the A-site and 8 in the P-site. The fast reversible inhibitor **12** forms only one Schiff base in the P-site and therefore the cyclic intermediate is not observed. The compound **16** shows a unique binding mode in the active site because it is a *slow binder* inhibitor forming only one Schiff base in the P-site and then no C-C bond. On the other hand, this structure shows the surprising stabilisation of a magnesium ion in the active site of the PBGS.

During the co-cristallisation between the enzyme and the inhibitor **12**, hydrolysis of **12** takes place under basic conditions, giving the substrate analog 5-hydroxylevulinic acid **36**. Two molecules of this fast reversible inhibitor are linked by a Schiff base in the A- and P-site respectively. This compound is structurally and chemically the best one to mimic the natural substrate ALA **5**.

All the information giving by the different X-ray structures of the inhibitors synthesised in this work give clearly preference to one of the mechanism: formation of the C-C bond prior the C-N bond between the two natural substrate molecules.

Key words

Porphobilinogen synthase; *Pseudomonas aeruginosa*; tetrapyrrole synthesis; bisubstrat analog; inhibitor; crystal structure.

Table des matières

1 INTRODUCTION 1

1.1 Les pigments de la vie 1
1.1.1 Généralités 1
1.1.2 Biosynthèse 3

1.2 La porphobilinogène synthase (PBGS) 5
1.2.1 Une énigme mécanistique 5
1.2.2 Mécanisme selon Shemin 7
1.2.3 Mécanisme selon Jordan 8
1.2.4 Caractéristiques des PBGS 10
1.2.4.1 Isolation et structure 10
1.2.4.2 Rôle des métaux 11

1.3 Les méthodes à disposition pour élucider un mécanisme enzymatique 11

2 BUT DU TRAVAIL 13

3 STRUCTURE DES PBGS 15

3.1 Les deux grandes familles de la PBGS 15

3.2 Structures 3D semblables aux PBGS 16

3.3 Différences entre les PBGS : arrangement et influence des ions métalliques 19
3.3.1 PBGS dépendantes du zinc 19
3.3.2 PBGS dépendantes du magnésium 21
3.3.3 Comparaison des sites actifs de la PBGS d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* 24
3.3.4 Classification des PBGS 26

4 DONNÉES DISPONIBLES AVANT LE DÉBUT DE CE TRAVAIL 28

4.1 Généralités 28

4.2 La littérature existante sur les inhibiteurs de la PBGS 29
4.2.1 Les résultats des tests cinétiques 29
4.2.2 Les résultats de co-cristallisations de l'enzyme avec divers inhibiteurs 34

4.3 Mécanismes proposées pour la formation du porphobilinogène 44

5 ETUDES D'INHIBITION 50

5.1 Cinétique enzymatique 50
5.1.1 L'équation de Michaelis-Menten 50
5.1.2 Détermination des paramètres cinétiques 52
5.1.2.1 Utilisation du graphe Michaelis-Menten 52
5.1.2.2 Utilisation du graphe de Lineweaver-Burk 52
5.1.2.3 Utilisation du graphe de Eadie-Hofstee 53
5.1.2.4 Utilisation du graphe de Hanes 53

5.1.3 Les inhibitions 54
5.1.3.1 L'inhibition compétitive 54
5.1.3.2 L'inhibition incompétitive 56
5.1.3.3 L'inhibition mixte 58
5.1.3.4 L'inhibition non-compétitive 60
5.1.4 Les inhibitions dépendantes du temps 61
5.1.4.1 L'inhibition slow-binding 64
5.1.4.2 L'inhibition slow, tight binding 64
5.1.4.3 L'inhibition tight binding 65
5.1.4.4 L'inhibition irréversible 66
5.1.5 Cinétique des inhibiteurs dépendants du temps [109] 67
5.1.5.1 Détermination de la constante d'inhibition 67
5.1.5.2 K_I pour un inhibiteur slow-binding et slow, tight binding 67
5.1.5.3 K_I pour un inhibiteur tight binding 68
5.1.5.4 K_I pour un inhibiteur irréversible 69
5.1.5.5 Détermination du type d'inhibition 70

5.2 La coopérativité 72

5.3 Cinétique de la PBGS 74
5.3.1 La PBGS : deux substrats identiques, un produit 74
5.3.2 Les hypothèses de travail appliquées à l'étude du mécanisme 79

6 SYNTHÈSE DES INHIBITEURS 81

6.1 Synthèse du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle 27 81

6.2 Synthèse de l'analogue oxygéné 12 82
6.2.1 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique **12** selon la littérature [117] ... 82
6.2.2 Synthèse des éthers 83
6.2.2.1 Synthèse selon Williamson 83
6.2.2.2 Synthèse des éthers : autres conditions 85
6.2.2.3 Synthèse d'un éther symétrique à partir de la 1-hydroxy-2-butanone **38** 86

6.3 Synthèse de l'analogue amine 13 88
6.3.1 Protection des amines 88
6.3.2 Synthèse de l'amine protégée 90
6.3.3 Déprotection de la fonction amine 95
6.3.4 Protection des fonctions cétones 100
6.3.5 Déprotection des fonctions amine et cétones de **61** 103

6.4 Synthèse des trois analogues soufrés 14, 15 et 16 110
6.4.1 Synthèse du composé thioéther **14** 110
6.4.2 Synthèse du composé sulfone **16** et du composé sulfoxyde **15** 111
6.4.2.1 Oxydation des thioéthers en sulfone et en sulfoxyde 111
6.4.2.2 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique **16** 113
6.4.2.3 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique **15** 114
6.4.2.4 Oxydation de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoique **14** 118

7 RÉSULTATS 120

7.1 Purification de la PBGS 120

7.2 Détermination des paramètres de la PBGS 125
7.2.1 Activité spécifique 125

7.2.2 Détermination de K_M et k_{cat} de la PBGS 127

7.3 Classification des inhibiteurs 127

7.4 La procédure des tests d'inhibition 128

7.5 Détermination des valeurs IC_{50} 130

7.6 Détermination de l'influence du temps de préincubation sur les tests d'inhibitions 133

7.7 Détermination des paramètres cinétiques des inhibiteurs 135
7.7.1 Inhibitions indépendantes du temps 135
7.7.2 Inhibitions dépendantes du temps 136
7.7.3 Détermination de K_I et du type d'inhibition 137

7.8 Structures aux rayons X de la PBGS co-cristallisée avec les inhibiteurs 139
7.8.1 Paramètres cinétiques et co-cristallisation avec la PBGS de l'acide 5-hydroxylévulinique **36** 139
7.8.2 Structures de la PBGS co-cristallisée avec les analogues de bisubstrat **12**-**16** 144
7.8.2.1 Influence des structures sur la fixation du *lid* 144
7.8.2.2 Composé éther **12** (éther/*Pa*PBGS) 144
7.8.2.3 Composés amine **13** (amine/*Pa*PBGS) et thioéther **14** (thioéther/*Pa*PBGS) 146
7.8.2.4 Composé sulfoxyde **15** (sulfoxyde/*Pa*PBGS) 149
7.8.2.5 Composé sulfone **16** (sulfone/*Pa*PBGS) 151

8 DISCUSSION 154

8.1 Différences conformationnelles entre les structures 154

8.2 Présence d'un ion magnésium au site actif de l'enzyme 154

8.3 Mécanisme de la PBGS proposée à l'issue des résultats obtenus 155

9 CONCLUSION 159

10 PERSPECTIVES 165

11 PARTIE EXPÉRIMENTALE CHIMIQUE 166

11.1 Méthodes analytiques et appareils 166
11.1.1 Chromatographie 166
11.1.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) 166
11.1.1.2 Chromatographie sur colonne – chromatographie flash 166
11.1.2 Spectroscopie infrarouge (IR) 166
11.1.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) 166
11.1.4 Spectroscopie de masse (MS) 167
11.1.5 Analyse élémentaire (AE) 167
11.1.6 Point de fusion (Pf) 167
11.1.7 Verreries, système de chauffage et de refroidissement 168
11.1.8 Numérotation des structures 168

11.2 Solvants 168
11.2.1 Solvants standards 168

11.2.2 Solvants pour réactions 169

11.3 Produits chimiques 169

11.4 Synthèses 171

11.4.1 Synthèse du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **27** et du 3-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **28** 171
11.4.2 Synthèse du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **34** 173
11.4.3 Synthèse de l'acide 5-hydroxy-4-oxopentanoique **36** 174
11.4.4 Synthèse du bis(5-formyl-2-furfuryl) éther **32** 175
11.4.5 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butoxy)-4-oxo-pentanoate de méthyle **37** 176
11.4.6 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique **12** 177
11.4.7 Synthèse du 5-[(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butyl)-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-4-oxo-pentanoate de méthyle **51** 178
11.4.8 Synthèse du 5-(5-hydroxy-4-oxo-pentanoylamino)-4-oxo-pentanoate de méthyle **52** 180
11.4.9 Synthèse de l'acide 5-[(4-carboxy-2-oxo-butyl)-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-4-oxo-pentanoique **59** 181
11.4.10 Synthèse de l'acide 4-oxo-5-(toluène-4-sulfonylamino)-pentanoique **60** 182
11.4.11 Synthèse du 3-(2-{[[2-(2-méthoxycarbonyl-ethyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-méthyl}-[1,3]dioxolan-2-yl)-propionate de méthyle **61** 183
11.4.12 Synthèse du N,N-Bis-[2-(3-hydroxy-propyl)-[1,3]dioxolan-2-yl-méthyl]-4-méthyl-benzène sulfonamide **63** 185
11.4.13 Synthèse de l'acide 3-(2-{[[2-(2-carboxy-éthyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-méthyl}-[1,3]dioxolan-2-yl)-propionique **62** 186
11.4.14 Synthèse de l'acide 3-[2-({[2-(carboxy-éthyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-amino}-méthyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-propionique **64** 188
11.4.15 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylamino)-4-oxo-pentanoique **13** 189
11.4.16 Synthèse du 5-(4-methoxycarbonyl-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle **68** 190
11.4.17 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle **69** 192
11.4.18 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoique **14** 193
11.4.19 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique **16** 194
11.4.20 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle **70** 195
11.4.21 Synthèse du 4-(carboxyméthyle)-5-(3-méthoxy-3-oxopropyl)-thiopyrylium-3-olate **71** 196
11.4.22 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique **15** 197

12 PARTIE EXPÉRIMENTALE BIOCHIMIQUE 199

12.1 Appareils utilisés 199

12.2 Produits utilisés 200

12.3 Travail microbiologique et biochimique 201

12.3.1 Milieux et tampons 201
12.3.1.1 Culture et isolation de la PBGS 201
12.3.1.2 SDS-PAGE 201
12.3.1.3 Purification par HIC (hydrophobic interactions chromatography) 202
12.3.1.4 Purification par AEC (anion exchange chromatography) 202
12.3.1.5 Dialyse 203
12.3.1.6 Stockage de la protéine 203
12.3.1.7 Détermination de l'activité 203
12.3.1.8 Tests d'inhibition 203
12.3.2 Construction du vecteur d'expression pLM_PBGS 204
12.3.3 Production et purification de la PBGS 204
12.3.3.1 Préculture 204
12.3.3.2 Induction 204
12.3.3.3 Inhibiteurs de protéase, french press et précipitation au sulfate d'ammonium 204

12.3.3.4 Purification par HIC (hydrophobic interactions chromatography) 205
12.3.3.5 SDS-PAGE après HIC 205
12.3.3.6 Purification par AEC (anion exchange chromatography) 206
12.3.3.7 SDS-PAGE après AEC 206
12.3.3.8 Concentration des fractions et dialyse 207
12.3.3.9 Détermination de la quantité de protéine 207
12.3.3.10 Stockage de la protéine 208
12.3.4 Détermination des paramètres de la PBGS 208
12.3.4.1 Détermination de l'activité 208
12.3.4.2 Détermination de K_M et k_{cat} 209

12.4 Etude cinétique de la PBGS 210
12.4.1 Préparation de la solution de l'inhibiteur 210
12.4.2 Détermination des valeurs IC_{50} 210
12.4.3 Détermination de la dépendance ou indépendance du temps des inhibiteurs 211
12.4.4 Test cinétique suivant Michaelis-Menten [100] 212
12.4.5 Détermination de K_I pour les inhibiteurs dépendants du temps [109] 213
12.4.6 Détermination du type d'inhibition pour les inhibiteurs dépendants du temps 213

12.5 Cristallisations et détermination des structures 214

13 ANNEXE 219

13.1 Annexe 1 219

13.2 Annexe 2 220

13.3 Annexe 3 222

13.4 Annexe 4 224

13.5 Annexe 5 225

13.6 Annexe 6 229

13.7 Annexe 7 237

13.8 Annexe 8 241

14 BIBLIOGRAPHIE 243

1 Introduction

1.1 Les pigments de la vie

1.1.1 Généralités

Il y a plus de 400 ans, la couleur verte de l'herbe et la couleur rouge du sang étaient une énigme pour les grands esprits tels que les métaphysiciens. De nos jours, grâce à la chimie moderne, on sait que le monde vert et le monde rouge dérivent tous deux d'une seule et unique famille de pigments ayant comme base un macrocycle constitué d'atomes de carbone et d'azote (Figure 1).

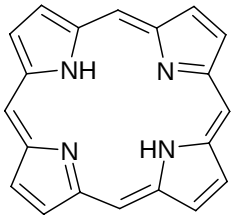


Figure 1: Le macrocycle porphyrine non-substitué (appelé également porphine)

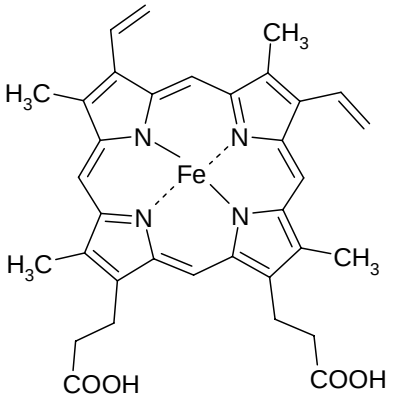
Les exemples les plus connus de ce type de macromolécules sont l'hème **1**, qui est responsable de la couleur rouge du sang et la chlorophylle **2**, qui est responsable de la couleur verte des plantes. Ces exemples de porphyrines font partie de la famille des « *pigments de la vie* », désignée ainsi par Battersby [1, 2] dans les années 80. Les porphyrines sont des corps cycliques formés de 4 anneaux pyrroliques reliés par des ponts méthényles. Une de leurs propriétés caractéristiques est la formation de complexes avec des ions métalliques : le fer pour l'hème et le magnésium pour la chlorophylle. Dans la nature, ces métallo-porphyrines se conjuguent alors à des protéines pour former le groupe des « *pigments de la vie* ».

On compte parmi ces composés tétrapyrroliques [3] (Figure 2):

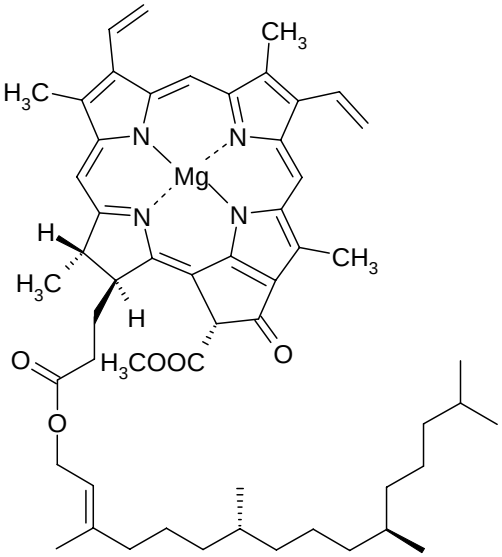
- l'hème **1** : porphyrine contenant du fer et qui est attachée à une protéine, la globine. Ces protéines conjuguées sont capables de s'unir à l'oxygène de façon réversible et l'oxygène peut ainsi être transporté à travers le corps (hémoglobine) ou stocké au sein du tissu musculaire (myoglobine).

- la chlorophylle A **2** : porphyrine contenant du magnésium et qui est indispensable à la photosynthèse dans les chloroplastes, en collectant les photons de la lumière et en les transformant en énergie.

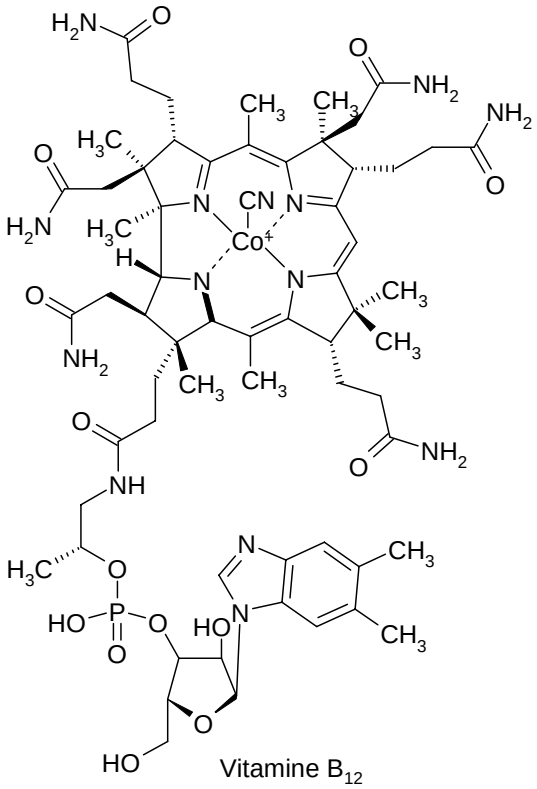
- la vitamine B_{12} **3** : dérivé d'une porphyrine contenant du cobalt et qui catalyse une série de réarrangements peu communs : tel que des transferts concomitant d'hydrogène et de groupement hydroxy ou carboxylate.



Hème
1



Chlorophylle A
2



Vitamine B_{12}
3

Figure 2 : Quelques exemples des « *pigments de la vie* »

Une autre particularité intéressante des porphyrines est le fait que de petites variations au niveau de la structure tétrapyrrolique sont en mesure de générer une grande diversité dans

leurs fonctions biochimiques. Comme nous le savons au sujet de l'hème **1** et de la chlorophylle A **2**, les pigments tétrapyrroliques jouent un rôle important dans les processus fondamentaux de la vie. Ils sont présents universellement dans le monde du vivant et sans leur existence, la vie comme nous la connaissons ne serait pas possible. C'est pourquoi ces tétrapyrroles ont reçu le nom de « *pigments de la vie* ».

Un autre point soulignant notre complète dépendance de ces pigments est que les dysfonctionnements, appelés porphyries, d'une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'hème **1**, affectent ceux et celles caractérisés par un mauvais métabolisme porphyrique [4, 5]. Certains de ces disfonctionnements ont comme symptômes une sensibilité à la lumière et un état neurovégétatif.

1.1.2 Biosynthèse

A priori il n'y a aucune raison de penser que l'hème **1** et la chlorophylle A **2** sont deux composés de la même famille. Et pourtant, tous deux partagent la même voie biosynthétique jusqu'à un certain point et c'est uniquement dans les étapes finales que leurs biosynthèses respectives sont différentes.

Tous les tetrapyrroles ont un précurseur commun, l'uroporphyrinogène III **4** et suivent tous une même voie biosynthétique (Figure 3).

Le premier intermédiaire de cette biosynthèse est l'acide 5-aminolévulinique **5** (ALA). Chez les mammifères, les champignons, les levures et les bactéries, ALA **5** est issu de la condensation de la glycine avec le succinyl coenzyme A (succinyl CoA), intermédiaire du cycle de Krebs. Cette réaction est catalysée par une enzyme, ALA synthase, et requiert la présence d'un cofacteur, le pyridoxyl 5-phosphate. Les plantes vertes, les algues et certaines bactéries synthétisent l'acide 5-aminolévulinique **5** à partir de l'acide glutamique *via* un processus multi-enzymatique impliquant un ARN de transfert [6, 7].

A partir de ALA **5**, la biosynthèse du tetrapyrrole est indépendante des organismes considérés, contrairement à la formation de **5** qui, comme on l'a vu, est obtenu par deux biosynthèses complètement différentes.

Deux molécules d'acide 5-aminolévulinique **5** sont ensuite condensées, *via* la porphobilinogène synthase (PBGS), selon une réaction du type Knorr, pour former le porphobilinogène **6** (PBG). On reviendra plus en détail sur cette séquence réactionnelle dans le chapitre quatre. La condensation de quatre molécules de PBG **6**, tête-queue, catalysée par la PBG déaminase, conduit à l'hydroxyméthylbilane **7** (HMB). Une cosynthase prend ensuite le HMB **7** libéré et le transforme rapidement en uroporphyrinogène III **4**. Suivent ensuite des

réactions de décarboxylation, d'oxydation et d'insertion de métaux toutes gouvernées par des enzymes qui conduisent aux différents pigments [3].

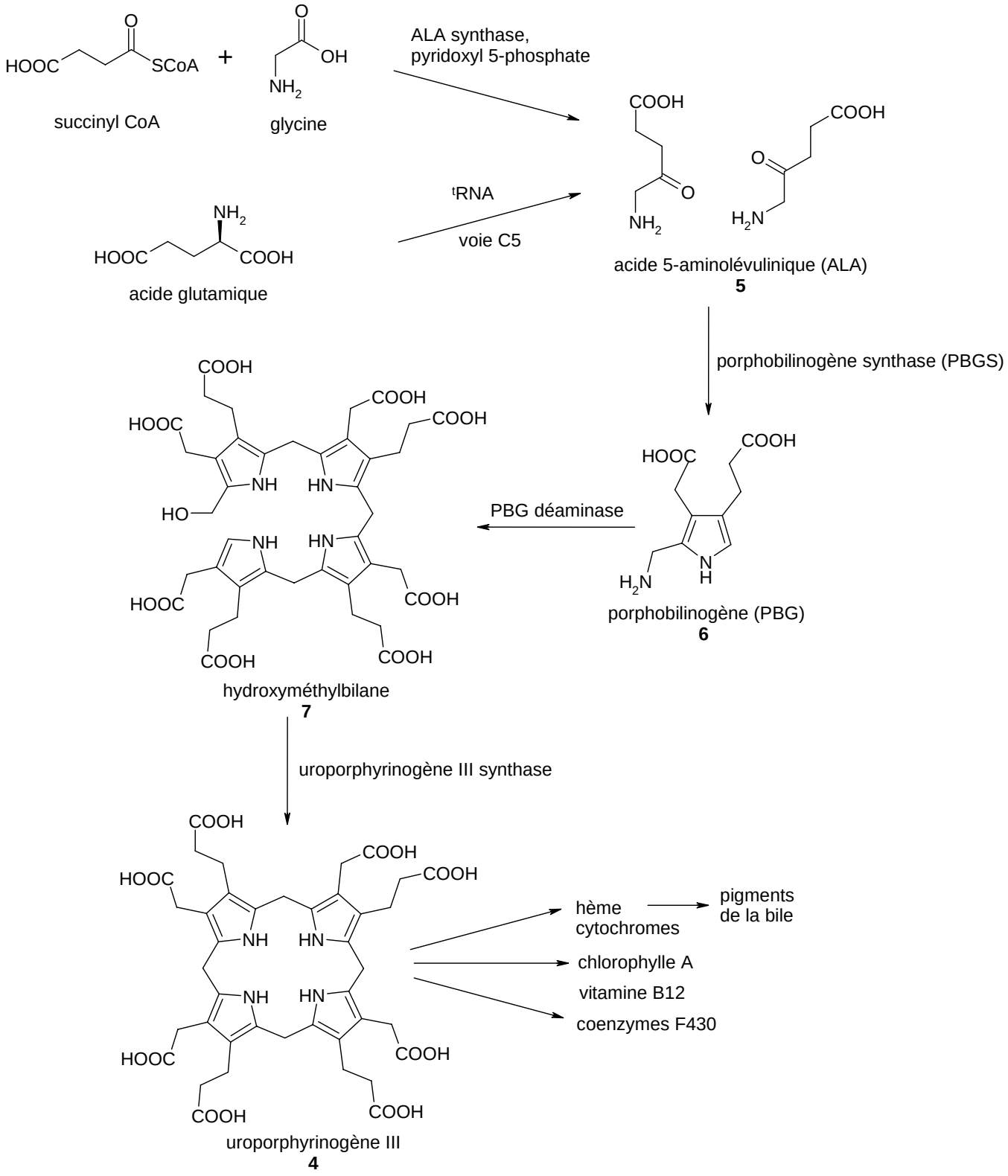


Figure 3 : Biosynthèse du squelette des « *pigments de la vie* »

L'importance des tétrapyrroles dans le monde du vivant et le fait qu'ils soient issus d'une même voie biosynthétique ont stimulé l'intérêt porté au PBG **6**, ainsi qu'à l'enzyme PBGS, qui condense de façon non symétrique deux molécules de ALA **5**. Depuis les débuts de la chimie organique, la compréhension des processus biologiques est intimement liée au désir d'imiter la nature [8-11].

C'est dans ce désir de compréhension que notre groupe s'intéresse à l'élucidation du mécanisme de la PBGS et au développement d'une synthèse efficace du PBG **6**, en utilisant la stratégie parfaite mise en œuvre par la nature. Le travail de C. Soldermann-Pissot [12] sur la synthèse d'un précurseur stable de la PBG **6** permet d'envisager l'étude des nombreuses possibilités que peuvent offrir cette dernière tant au niveau biologique que synthétique. La biosynthèse peut être utilisée pour synthétiser des porphyrines naturelles en grandes quantités dans des cellules cancéreuses si des précurseurs naturels, nécessaires à ce chemin biosynthétique, peuvent être fournit d'une manière sélective. Notre groupe étudie actuellement la possibilité d'utiliser la PBG **6** couplée à des acides aminés en photothérapie dynamique.

1.2 La porphobilinogène synthase (PBGS)

1.2.1 Une énigme mécanistique

La porphobilinogène synthase, également appelée acide 5-amino-lévulinique dehydratase (ALAD), est présente dans tous les organismes qui synthétisent les tétrapyrroles [13]. Cette enzyme catalyse la dimérisation non symétrique de deux molécules d'ALA **5** pour former la PBG **6** (Figure 4a). Cette transformation est d'autant plus élégante que la réaction purement chimique conduit à un autre composé. La dimérisation par voie chimique de ALA **5** donne avec de bons rendements un dimère symétrique: la pyrazine **8** [14] (Figure 4b). Dans des conditions anaérobies, la formation de petites quantités de pseudo-PBG **9** a été reportée [15, 16] (Figure 4c), et en présence d'Amberlite TR-45 celle de PBG **6** a été observée avec un rendement de 10 % après 20 jours de réaction [14, 15].

Ces résultats sont d'autant plus surprenants que la synthèse des pyrroles selon Knorr est un outil synthétique largement connu dans la chimie des hétérocycles [17, 18]. En quelque sorte, l'enzyme utilise intelligemment une pseudo réaction de Knorr impliquant dans un ordre indéterminé une condensation aldolique et la formation d'une base de Schiff.

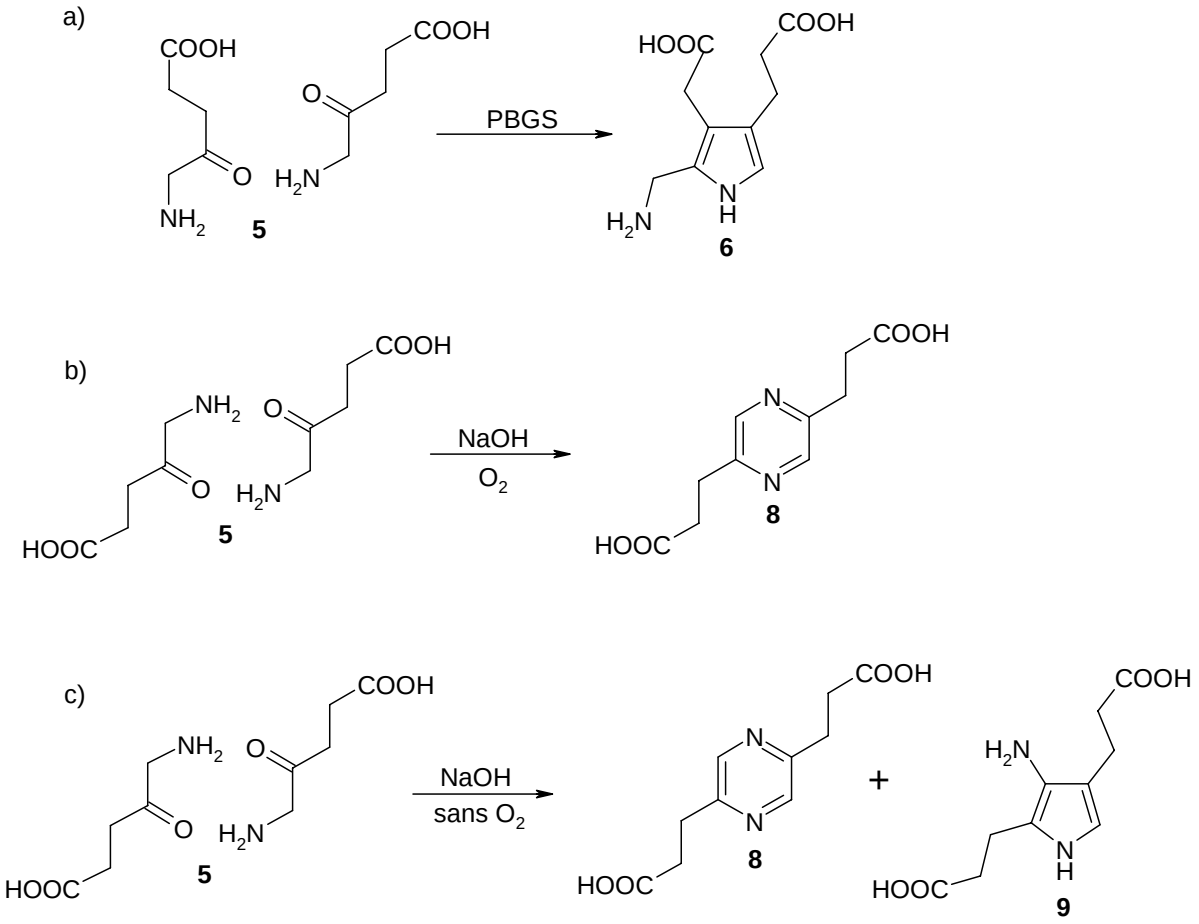


Figure 4 : a) Condensation enzymatique de ALA **5** ; b) condensation chimique de ALA **5** en présence de l'oxygène [14] et c) condensation chimique en absence d'oxygène [15, 16]

La grande réussite de l'enzyme est de reconnaître ces deux substrats identiques d'une façon totalement différente, afin de former le PBG **6** et non la pyrazine **8**. Suivant ce raisonnement, on a introduit les notions de site A et site P ; le site A étant l'endroit du site actif où la chaîne acétique du PBG **6** va être liée et le site P celui de la chaîne propionique (Figure 5).

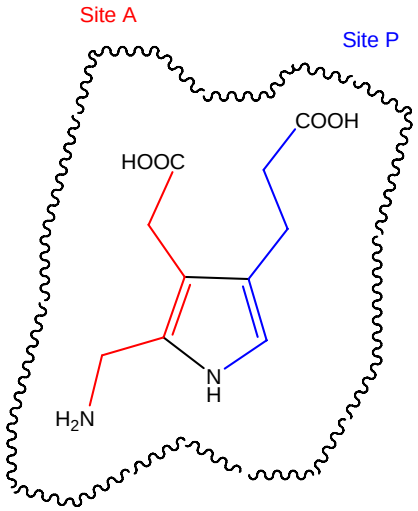
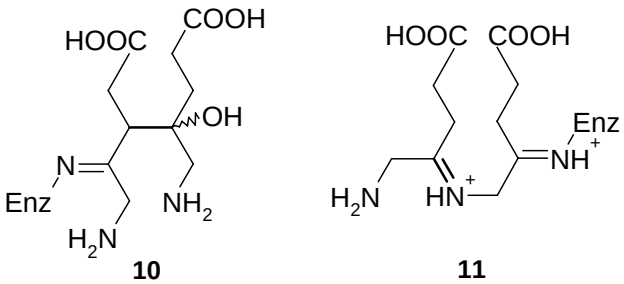


Figure 5 : Site actif de la PBGS

Dans la littérature, on trouve deux mécanismes qui s'opposent. Le premier a été proposé par Shemin en 1968 [19], suivi par celui de Jordan en 1980 [20]. Les deux mécanismes proposés présentent des intermédiaires (Figure 6) différents et une suite de réactions inversées : pour Shemin, la liaison C-C est formée en premier tandis que pour Jordan c'est la liaison C-N.



10 Shemin: liaison C-C

11 Jordan I: liaison C-N

Figure 6 : Principaux intermédiaires proposés

1.2.2 Mécanisme selon Shemin

Le mécanisme proposé par Shemin en 1968 [19] implique la reconnaissance de la première molécule de ALA **5** au site A de l'enzyme. La formation de la première liaison covalente entre l'enzyme et son substrat a lieu *via* une base de Schiff entre une lysine présente au site actif et le groupe carbonyle d'ALA **5**. La tautomérisation imine-énamine qui en résulte, active le méthylène en position 3. La réaction aldolique peut ainsi suivre avec attaque nucléophile sur le carbonyle du second ALA **5**. Il y a ensuite perte d'eau, cyclisation et enfin aromatisation pour obtenir le PBG **6**. Le mécanisme postulé par Shemin est analogue à une réaction catalysée par la classe I des aldolases et suggère donc que la première liaison formée entre les deux molécules de substrat est la liaison carbone-carbone (Figure 7).

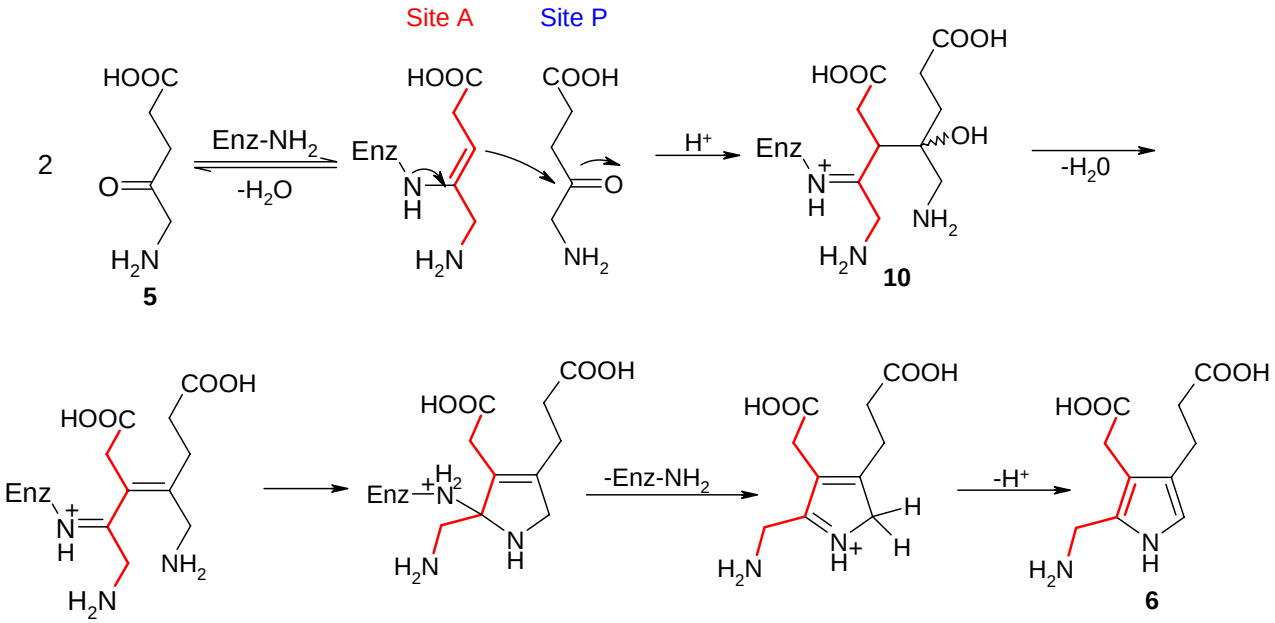


Figure 7 : Mécanisme Shemin

1.2.3 Mécanisme selon Jordan

Plusieurs années après le mécanisme postulé par Shemin, Jordan propose deux mécanismes qui diffèrent dans la suite des réactions mais qui ont comme point commun le site de formation de la base de Schiff. A l'inverse de Shemin, il détermine le site P comme étant le lieu de reconnaissance de la première molécule d'ALA **5**, en utilisant une technique élégante de «pulse-labeling» [20].

Dans le premier mécanisme [20], il postule qu'après formation de la première base de Schiff entre la lysine et le premier substrat, une seconde se forme entre la seconde molécule d'ALA **5** et le complexe enzyme-substrat : celle-ci étant formée par attaque nucléophile de l'amine du complexe sur le carbonyle cétonique de l'ALA **5**. La fermeture du cycle se fait par réaction aldolique intramoléculaire puis est suivie par une aromatisation pour former le PBG **6**. Le premier mécanisme postulé par Jordan, appelé Jordan I, suggère donc que la première liaison formée entre les deux molécules de substrat est la liaison carbone-azote (Figure 8).

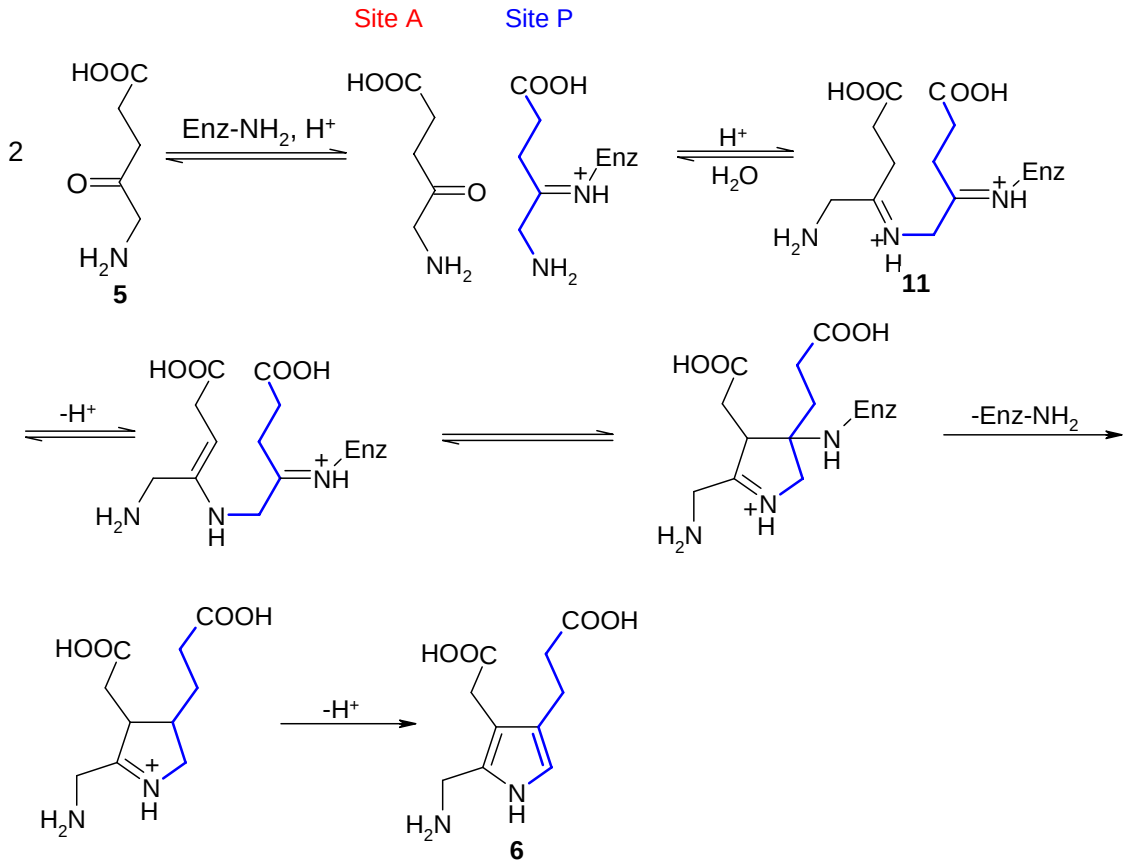


Figure 8 : Mécanisme Jordan I

Jordan proposa plus tard un second mécanisme [13], appelé Jordan II. La formation de la base de Schiff a toujours lieu dans le site P, mais la réaction qui suit est une réaction aldolique entre le second ALA **5** et l'iminium. L'élimination de la lysine qui fixait le substrat au site actif, permet d'obtenir une cétone α,β-insaturée qui après cyclisation et aromatisation forme le PBG **6** (Figure 9).

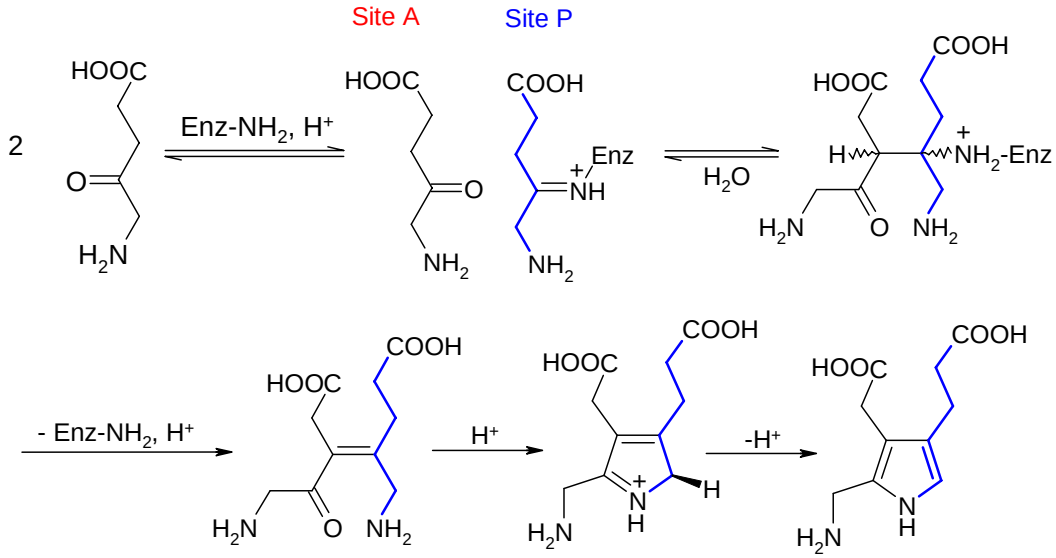


Figure 9 : Mécanisme Jordan II

Jusqu'à maintenant, il était encore difficile de favoriser un des mécanismes plutôt qu'un autre.

1.2.4 Caractéristiques des PBGS

1.2.4.1 Isolation et structure

L'enzyme fut isolée la première fois par Gibson [21] en 1955 à partir du foie de bœuf. Depuis, il fut démontré que l'enzyme existe dans pratiquement tous les organismes. Bien que les propriétés catalytiques fondamentales de toutes les PBGS soient similaires, des différences dans la structure enzymatique primaire, dans la nature des ions métalliques ainsi que dans la sensibilité aux thiols, furent observées. La disponibilité des séquences des cADN (homme [22], rat [23], levure [24], *hemB* d'*E. coli* [25], *hemB* de *Pseudomonas aeruginosa* [26] et bien d'autres) permit de comparer la séquence des acides aminés, de déterminer le pourcentage d'homologie ainsi que de mettre en évidence des domaines hautement conservés. Toutes ces études montrent que parmi les domaines les plus conservés, on en distingue particulièrement deux: un domaine de site actif contenant un résidu lysine catalytiquement actif [27] et un domaine de fixation métallique [28]. En possédant une lysine capable de former une base de Schiff et un site de liaison pour un métal, le site actif de la PBGS a des caractéristiques communes aux deux classes des aldolases. La classe I des aldolases utilise une base de Schiff, *via* une lysine, au site actif tandis que la classe II utilise un ion métallique.

Les PBGS ont une taille variant entre 250 et 340 kDa et présentent une structure quaternaire octamérique. Les sous-unités des PBGS issues de cellules animales ou de levure sont au nombre de huit et forment huit parties identiques de 37 kDa chacune [29, 30]. Shemin décrit ces sous-unités de la PBGS de foie de bovin comme étant les huit sommets d'un cube.

1.2.4.2 Rôle des métaux

Les PBGS sont grossièrement classées en deux catégories :

- métallo-enzymes nécessitant la présence de zinc
- métallo-enzymes nécessitant la présence de magnésium

La PBGS provenant de mammifères, qui sont des métalloenzymes à base de zinc, ont un pH optimal d'environ 6.3-7.0 [29, 31, 32]. La PBGS de levure et d'*Escherichia coli* nécessite aussi la présence de ions Zn^{2+} pour atteindre un maximum d'activité, mais elle travaille à un pH plus basique que la PBGS animale (pH = 9.8 pour la levure et pH = 8.5 pour *Escherichia coli*) [33]. Comme pour celle de la levure, la PBGS isolée des plantes et des bactéries a un pH optimal basique (pH = 8.0 pour les plantes et pH = 8.0-8.5 pour les bactéries [34, 35]), mais elle diffère des autres PBGS eucaryotiques par son besoin en ion métallique différent. En effet, la PBGS des plantes utilise des ions Mg^{2+} à la place de ions Zn^{2+}, tandis que celle des bactéries montre soit une non-nécessité de ions métalliques, soit, comme dans le cas de *Rhodopseudomonas spheroides*, une activation par des ions K^{+} en plus des ions Zn^{2+} [36].

1.3 Les méthodes à disposition pour élucider un mécanisme enzymatique

Pour l'étude du mécanisme enzymatique, les six méthodes suivantes sont souvent utilisées et permettent aujourd'hui d'obtenir des informations supplémentaires pour proposer et vérifier des hypothèses mécanistiques.

a) la mutagénèse dirigée
b) la modification des chaînes latérales des acides aminés
c) la cinétique
d) la détection d'intermédiaires
e) les rayons X
f) la modélisation moléculaire

a) La mutagénèse dirigée est une méthode puissante qui permet de décrire l'importance d'un acide aminé particulier dans la catalyse enzymatique. Par contre, son utilisation est délicate, car il faut être certain que seule la mutation désirée a bien été introduite et que cette mutation n'altère pas, de manière significative, la structure générale de l'enzyme. Autrement, il est extrêmement difficile d'imputer à cette modification le changement observé dans les propriétés catalytiques.

b) Si on modifie la chaîne secondaire d'un acide aminé impliqué dans la catalyse, l'enzyme devient inactive. L'identité de l'acide aminé touché par la modification peut être établie, par exemple par séquençage du peptide. Cette méthode possède des inconvénients: la

spécificité des modifications (vérifier qu'un seul acide aminé est altéré et non plusieurs) et l'implication directe de la modification sur la catalyse (ce n'est pas parce qu'une modification désactive une enzyme, qu'elle implique nécessairement la modification d'un acide aminé essentiel à la catalyse; la modification peut induire simplement un changement conformationnel, sur un site éloigné du site actif, conduisant à l'inactivation de l'enzyme).

c) De nombreuses informations peuvent être obtenues à partir de la cinétique enzymatique. En effet, en variant la nature du substrat, c'est-à-dire en utilisant des inhibiteurs, il est possible de faire une corrélation entre la vitesse de la réaction ainsi que le type d'inhibition rencontrée, et la structure du composé. De là, on peut se forger une idée sur l'environnement du site actif: la présence de groupes catalytiques importants jouant le rôle d'une base ou d'un acide, la présence d'acides aminés permettant la reconnaissance d'une fonction chimique, la présence d'acides aminés formant des liaisons covalentes avec le substrat, etc. Une structure minimale du site actif peut être alors envisagée.

d) Une méthode directe pour obtenir des informations sur le chemin réactionnel emprunté par une enzyme consiste à détecter des intermédiaires impliqués dans cette réaction. Dans certains cas, un intermédiaire est suffisamment stable pour être isolé et caractérisé. Certains intermédiaires peuvent être détectés par méthodes spectroscopiques, d'autres sont piégés par modification chimique.

e) La méthode des rayons X est une technique qui fournit l'ensemble des données sur la structure de l'enzyme. Le défi réside dans la compréhension et l'interprétation de toutes ces informations. Il est nécessaire de connaître le positionnement du site actif et le mode de liaison du substrat à l'enzyme pour pouvoir déterminer l'importance des chaînes secondaires des acides aminés impliqués dans la catalyse. L'analyse des structures aux rayons X de l'enzyme co-cristallisée à des inhibiteurs fournit des indications sur la reconnaissance du substrat au site actif, sur la formation de liaison covalente entre le substrat et l'enzyme, sur l'environnement immédiat du site actif, sur la présence et la position des ions métalliques, etc.

f) La modélisation moléculaire est un outil puissant qui permet de construire, de visualiser, d'analyser et de stocker des modèles de systèmes moléculaires complexes qui peuvent ensuite aider à interpréter les relations structures-activités. Dans la plupart des cas, la structure aux rayons X de la protéine est disponible. Une des stratégies de la modélisation moléculaire consiste à visualiser la protéine à l'écran et à essayer de concevoir la molécule présentant la meilleure complémentarité topographique et électronique avec le site actif, cette molécule peut très bien être un intermédiaire réactionnel. Une fois la molécule conçue théoriquement, il est possible de la synthétiser et de la faire réagir avec la protéine. L'analyse de l'interaction entre le composé et l'enzyme fait appel aux techniques décrites plus haut.

2 But du travail

Le but de ce travail de thèse consiste à apporter de nouveaux éléments permettant d'élucider le mécanisme utilisé par l'enzyme porphobilinogène synthase. (Les résultats antérieurs sont résumés dans le chapitre 4). Cette enzyme permet la condensation non symétrique de deux molécules d'acide 5-aminolévulinique **5** en porphobilinogène **6**. Elle est particulière dans le fait qu'elle utilise deux substrats identiques et que ces deux molécules sont incorporées de manière différente dans le produit final. Les deux substrats sont séparément liés au site actif, chacun étant lié à sa partie du site actif.

L'approche utilisée dans ce travail est basée sur la synthèse de structures d'analogues de bisubstrat (dérivant de l'acide lévulinique) ayant pour cible le site actif de la PBGS (Figure 10). Ces dimères **12-16** symétriquement lié par un hétéroatome sont synthétisés afin d'imiter les liaisons des deux substrats au site actif. L'étude cinétique du comportement de telles structures a pour but de déterminer leur affinité pour le site actif (K_I) et le site d'interaction (type d'inhibition).

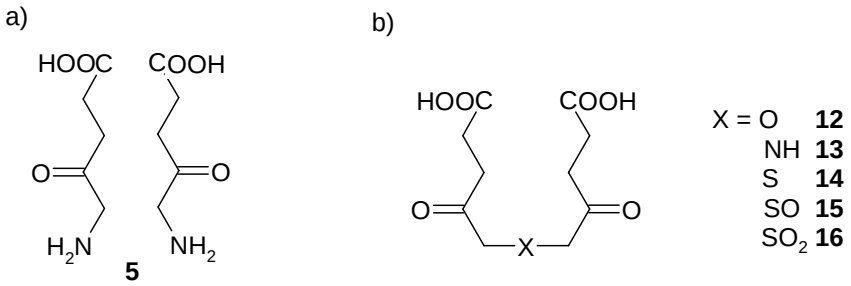


Figure 10 : a) deux molécules du substrat naturel ALA **5**; b) les analogues de bisubstrat **12-16**: éther **12** (acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo-pentanoique), amine **13** (acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylamino)-4-oxo-pentanoique), thioéther **14** (acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo pentanoique), sulfoxyde **15** (acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique) et sulfone **16** (acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)- 4-oxo-pentanoique)

Il existe des différences entre les PBGS en terme de métaux requis, de paramètres cinétiques, de dépendance de pH, d'inactivation par des inhibiteurs, de susceptibilité à l'oxydation, etc. La validité de l'interprétation des résultats obtenus dans notre groupe porte sur la PBGS d'*Escherichia coli* qui est une enzyme dépendante du zinc. Dans le cadre de la collaboration avec le Dr. N. Frankenberg-Dinkel, les tests cinétiques des analogues de bisubstrat ont été effectués sur la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*. La PBGS utilisée pour effectuer ces tests est une enzyme dépendante du magnésium possédant un site actif dont la structure aux rayons X est connue mais qui diffère des enzymes étudiées jusqu'à présent par notre groupe.

A l'occasion de ce travail, un stage à la Technische Universität Carolo-Wilhelmina de Braunschweig dans les groupes du Prof. D. Jahn et du Dr. N. Frankenberg-Dinkel a été

réalisé. Dans le cadre de ce stage, tous les composés synthétisés **12-16** ont été testés comme inhibiteur de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*. Toutes les constantes d'inhibition et les types d'inhibition, quand cela fut possible, ont été déterminés avec l'aide de M. Nentwich et du Dr. F. Frère.

La co-cristallisation des inhibiteurs **12-16** avec la PBGS et l'analyse détaillée de la structure aux rayons X, effectuées par M. Nentwich et Dr. F. Frère, permettent de caractériser l'interaction des inhibiteurs avec l'enzyme et d'avancer de nouvelles hypothèses concernant le mécanisme réactionnel.

.

3 Structure des PBGS

3.1 Les deux grandes familles de la PBGS

La caractérisation expérimentale de PBGS isolées de différentes sources, a permis d'observer des différences importantes en ce qui concerne l'affinité des ions métalliques, les paramètres cinétiques, la dépendance au pH et la sensibilité vis-à-vis de l'oxydation entre autre. L'interprétation des ces différences fut l'hypothèse d'une variation des structures et d'un changement du mécanisme des PBGS concernées. Les PBGS ont été dans un premier temps divisées en deux grandes familles suivant leur dépendance pour les ions métalliques [37]. Les PBGS issues des mammifères et de levure montrent une dépendance vis-à-vis de l'ion Zn^{2+}. L'ion Zn^{2+} est coordiné à des résidus cystéines, dont les groupes thiols sont extrêmement sensibles à l'oxydation. L'oxydation de ces groupes thiols induit une diminution de l'activité catalytique et une perte stoechiométrique des ions métalliques coordinés [38]. Cette observation est compatible avec l'hypothèse que les résidus cystéines sont nécessaires pour lier l'ion Zn^{2+}. Dans les PBGS issues des plantes, la région riche en résidus cystéines est remplacée par une région riche en résidus aspartates. De plus, ces PBGS montrent une dépendance au magnésium [39]. Par conséquent, la coordination d'un ion magnésium aux résidus aspartates, qui sont plus appropriés pour se coordiner à ce métal que les cystéines, a été postulée. Ces PBGS sont donc moins sensibles à l'oxydation [35]. La caractérisation de la PBGS d'*Escherichia co*li a permis de démontrer qu'une enzyme peut se lier à du magnésium et du zinc en même temps et que les deux métaux présentent des actions bien différentes et spécifiques [40]. Finalement, la structure aux rayons X de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* révèle bien la présence d'ions magnésium mais ces derniers ne sont pas localisés dans le site actif [41]. Les rayons X montrent que la disposition des ions métalliques n'est pas identique pour les deux catégories de PBGS.

La structure aux rayons X des PBGS issues de cinq espèces est disponible : celle de la levure [42, 43], d'*Escherichia coli* [44, 45], de *Pseudomonas aeruginosa* [41, 46], de l'espèce humaine [47] et tout récemment de *Chlorobium vibrioforme* [48]. Toutes les PBGS étudiées jusqu'à maintenant partagent un haut degré de conservation dans la séquence des acides aminés (23% identique et 38% similaire) [49].

Les études portant sur la PBGS en tant que métalloenzyme ont été très nombreuses [50-52]. Cette caractéristique de la PBGS présente un intérêt certain car la PBGS est l'une des cibles principales d'un poison bien connu de l'environnement, le plomb [53]. Pour la PBGS issue des mammifères, l'inhibition par le plomb semble être la conséquence directe d'une substitution du zinc par le plomb [54].

3.2 Structures 3D semblables aux PBGS

La structure, déterminée par les rayons X, de la PBGS de levure publiée en 1997 par Erskine [42] a révélé, pour le monomère, la présence de ce qu'on appelle un tonneau TIM (*TIM-barrel* $(\alpha/\beta)_8$), communément rencontré chez les enzymes. La notation TIM fait référence à la structure de la Triose-phosphate IsoMérase pour laquelle ce tonneau fut observé la première fois [55] (Figure 11). La partie centrale est constituée de huit brins β parallèles qui sont disposés les uns contre les autres formant ainsi un tonneau ouvert. Les hélices α, qui relient les brins β parallèles, sont toutes localisées à l'extérieur du tonneau. L'intérieur d'un tonneau est exclusivement formé par des chaînes latérales provenant de résidus de brins β donnant à l'ensemble de l'unité un cœur hydrophobe. La structure entière apparaît compacte et relativement peu flexible. Dans cette structure en *TIM barrel*, les sites de liaison du ligand sont formés par des régions de *loops* (boucles) de jonction, situées à l'extrémité carboxy-terminale. Ces régions ne contribuent pas à la stabilité de la structure, mais participent à la fixation du substrat ou à l'activité catalytique [56].

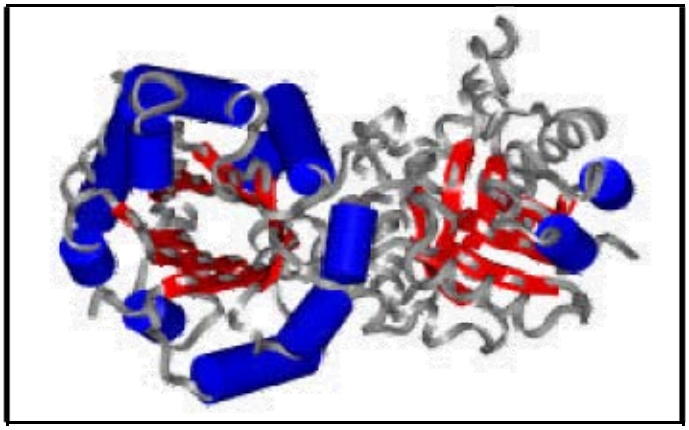


Figure 11 : Représentation de la triose phosphate isomérase : les hélices α sont en bleu et les feuillets β en rouge [57]

Par rapport à l'enzyme TIM, la PBGS montre une hélice α supplémentaire, nommée α8 et formée par les résidus 289-302 (la numérotation correspond à l'enzyme issue de levure), située entre deux membres réguliers du *TIM barrel* (α9 et β9). Elle montre également un bras caractéristique à l'extrémité amino-terminale. Ces deux régions sont importantes pour les interactions quaternaires.

La PBGS présente une organisation octamérique (Figure 12) avec un groupe de symétrie I422 ou D_4. Les huit sous-unités sont normalement toutes identiques, excepté pour la PBGS de la *Pseudomonas aeruginosa* où une dissymétrie des monomères à l'intérieur du dimère fut observée [41]. Les interactions les plus intenses sont décrites lors de la formation d'un dimère [58] (Figure 13). Les deux tonneaux TIM se positionnent de telle façon que les axes des

cylindres soient orthogonaux. Les sites actifs sont dirigés vers l'extérieur, vers le solvant, ce qui est en contraste avec des hypothèses antérieures qui supposaient que le site actif se situe à l'interface des sous-unités [59]. Il existe une séquence d'acides aminés mobiles, ordonnée ou désordonnée suivant les structures, qui peut isoler le site actif du solvant. Cette région mobile ressemble donc à un couvercle (*lid*) qui peut s'ouvrir ou se fermer suivant les situations.

Le bras *N*-terminal est important pour la stabilité du dimère et de l'octamère [42]. Les études supplémentaires sur la *Pseudomonas aeruginosa* indiquent que la présence du bras *N*-terminal est importante pour l'oligomérisation, pour la stabilité de l'oligomère et pour l'activité de l'enzyme.

Des études ont montré que la suppression des ions métalliques influe fortement sur l'activité catalytique mais leur suppression ne modifie pas la structure quaternaire une fois qu'elle est formée [60]. L'ion métallique n'est pas essentiel à la formation de l'octamère mais stabilise l'état oligomérique de l'enzyme.

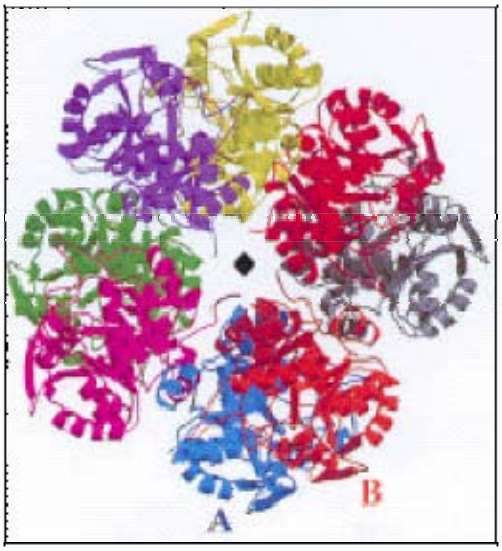


Figure 12 : Représentation de la structure octamérique de la PBGS [57]

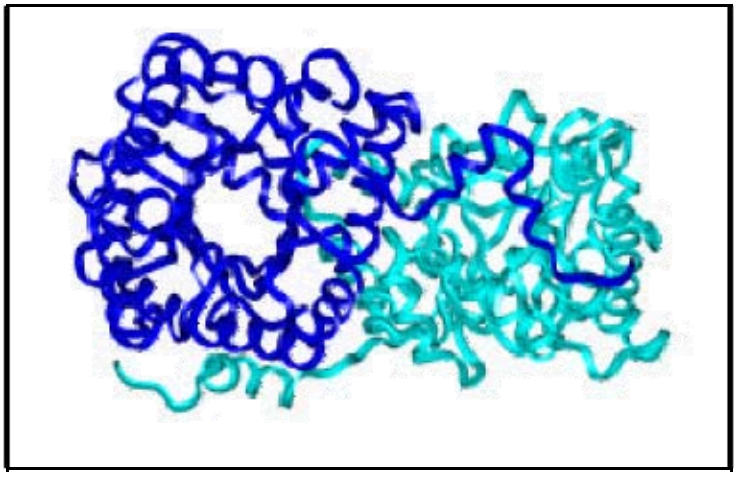


Figure 13: Représentation de la structure du dimère de la PBGS [57]

Beaucoup d'expériences de mutagénèse ou de modification chimique ont permis de localiser les résidus importants pour le processus catalytique [61, 62]. Mêlées à celles apportées par l'élucidation de la structure tridimensionnelle, ces données ont permis de situer le site actif du côté des brins *C*-terminaux du tonneau. En effet, dans les domaines du tonneau TIM, le site actif est généralement formé pas des boucles situées à l'une des extrémités du tonneau α/β qui relient les brins β *C*-terminaux aux hélices α *N*-terminales. Les résidus catalytiquement actifs sont localisés dans cet ensemble de régions de boucles [56].

Les *loops* formant la cavité du site actif contiennent deux lysines (Lys) adjacentes 210 et 263 (numérotation provenant de la PBGS de levure). La Lys263 fut mise en évidence *via* des méthodes d'analyse biochimique [63], contrairement à la Lys210 dont la présence fut découverte uniquement grâce à la structure aux rayons X de la PBGS [42]. En effet, dès les années 1960, il est supposé que la première molécule ALA **5** forme une base de Schiff avec un acide aminé présent au site actif de l'enzyme. Afin de déterminer la présence de la base de Schiff dans le processus enzymatique, Shemin incuba le substrat naturel, marqué au ^{14}C sur le carbone en position 4, avec la PBGS et effectua ensuite une réduction à l'aide de $NaBH_4$ [19]. Shemin en conclut que le substrat forme une base de Schiff avec un groupe amine du site actif et que l'inactivation et l'incorporation de la radioactivité résultent de la formation d'une amine secondaire après réduction de cette base de Schiff. L'acide aminé responsable de la formation de la base de Schiff peut être une lysine. La confirmation de ce postulat fut apportée par Nandi en 1978 [64] qui conclût que c'était bien le groupe ε-amino d'une lysine qui forme la base de Schiff au site actif.

En utilisant une PBGS exempte d'ions métalliques, Jaffe et al [65-67] ont effectué diverses études de la base de Schiff en utilisant la RMN ^{13}C et ^{15}N.
Les résultats obtenus ont été les suivants :

- l'imine montrait une configuration *trans* (Figure 14),
- l'imine était dans un état protoné et l'amine libre sur le carbone en position 5 du substrat était dans un état non protoné.

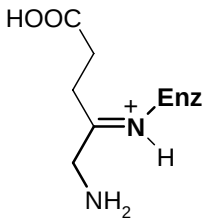


Figure 14 : Configuration de la base de Schiff selon Jaffe

La présence de la seconde lysine (Lys210) au site actif de l'enzyme a été déterminée grâce à la résolution aux rayons X de la structure de la PBGS de levure [42]. Des résultats non publiés de Shoolingin-Jordan ont montré que lorsque la Lys210 est supprimée par mutation dirigée, l'enzyme devenait inactive. Ce résultat fut interprété par le fait que cette lysine était

nécessaire à la catalyse en ajustant le pH au site actif de l'enzyme. Etant dans un état protoné, la Lys210 diminuerait le pKa de la base de Schiff formée à partir de la Lys263. Les résultats obtenus par la suite par Neier et Zdanov ont montré pour la première fois la réactivité de cette seconde lysine, par formation d'une base de Schiff avec un ligand co-cristallisé au site actif de l'enzyme [45]. Ces derniers résultats combinés aux résultats présentés dans ce travail permettent d'affirmer que la première hypothèse du rôle de la Lys210, en tant que régulateur du pH, semble être fausse.

L'ossature de l'enzyme ainsi que l'arrangement des acides aminés dans l'espace est semblable pour toutes les PBGS, seuls la séquence des acides aminées diffère au site actif ainsi que la dépendance aux ions métalliques. Les sites actifs de deux enzymes, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont décrits et comparés dans les chapitres suivants.

3.3 Différences entre les PBGS : arrangement et influence des ions métalliques

La résolution des structures aux rayons X de PBGS issues de différents organismes [42, 44] ont permis de valider l'hypothèse de l'existence de différents sites métalliques postulés par des études biochimiques [28, 40, 49, 68, 69]. Il s'est avéré que les différentes tentatives d'attribution du rôle des métaux, faites avant la résolution des structures aux rayons X, étaient fausses. Les structures cristallographiques fournissent des informations sur l'emplacement exact de ces sites métalliques au sein de l'enzyme ainsi que sur la nature des différents ligands entourant les métaux.

3.3.1 PBGS dépendantes du zinc

La première structure aux rayons X pour une PBGS dépendante du zinc provient de la PBGS de levure. Les données récoltées par Erskine et al. [42, 70] et Warren et al. [53] sur la PBGS de levure montrent la présence de deux atomes de zinc au site actif de l'enzyme : un premier zinc entouré de trois ligands cystéines (Cys133, 135 et 143) et d'un ion hydroxyde ou d'une molécule d'eau. Ce site présente une géométrie de coordination tétraédrique. Basé sur les études biochimiques et cinétiques [33, 63, 69], la densité électronique observée entre une histidine et une cystéine (His142, Cys234) a été attribuée à la présence d'un deuxième zinc. Les données expérimentales montrent que ce second site métallique est moins bien défini et sa position est plus éloignée des deux lysines présentes au site actif de l'enzyme. Les analyses de Dent [71] suggéraient la présence d'une quatrième cystéine, la Cys130, comme ligand du premier zinc. Les structures aux rayons X permirent d'établir que cette Cys130 précède le

domaine de liaison du métal et que sa chaîne latérale est totalement ensevelie dans un environnement hydrophobe et n'est donc pas accessible.

A partir d'études portant sur la PBGS d'*Escherichia coli* [40], Jaffe a montré la présence de huit cations Zn^{2+} par octamère nécessaire à la catalyse ainsi que l'influence de l'addition de cations Mg^{2+} sur l'efficacité et l'activité de l'enzyme, même à une concentration optimale de zinc.

Le site actif contient un atome de zinc important pour la réactivité [72]. Ce zinc est également coordiné à trois résidus cystéines (Cys120, Cys122 et Cys130) ainsi qu'à une molécule d'eau dans une géométrie tétraédrique [44]. Le zinc semble jouer un rôle dans la liaison entre l'enzyme et le second substrat et dans la réactivité de ce dernier. Une des premières analyses considérées est que ce zinc sert de pince afin d'ancrer le substrat au site A, grâce aux fonctions cétone (en position 4) et amine (en position 5) du substrat qui sont capables de coordiner l'ion métallique [50]. La stoechiométrie des ions métalliques au site actif d'*Escherichia coli* est discutée de manière très controversée. Des résultats non publiés indiquent que seulement la moitié des sites actifs forment une base de Schiff avec le substrat naturel et donc que la PBGS peut montrer un phénomène de réactivité *half-site*. Shemin détermina que seulement quatre des sous-unités sur les huit étaient attachées de manière covalente avec le substrat [73]. Jaffe démontra que les huit cations se repartissent en deux groupes, ce qui implique la présence de quatre ions zinc au site décrit précédemment et quatre zinc dans un second site métallique. Par conséquent uniquement quatre sites actifs par octamère seraient fonctionnels [40, 74], alors que d'autres études ont montré que la PBGS contenait huit sites actifs fonctionnels (huit ions Zn^{2+}) [75]. Finalement, la résolution de la structure aux rayons X de la PBGS d'*Escherichia coli* montre huit monomères équivalents, suggérant que chaque monomère contient un site actif fonctionnel [42, 44].

Pour la PBGS d'*Escherichia coli*, un troisième site métallique est observé [44]. Les cations Mg^{2+} (8 cations Mg^{2+}/octamère) jouent un rôle allostérique important dans la cohésion de l'octamère [49] : en effet l'atome de magnésium allostérique est lié à l'interface de chaque tonneau $\alpha\beta$ avec le bras *N*-terminal de la sous-unité voisine et permet un rôle de maintien de la structure quaternaire grâce à la présence de ponts salins autour de ce magnésium. La première sphère de coordination de ce site de géométrie octaédrique contient uniquement un acide aminé, la glutamine (Glu231). Les cinq autres ligands du magnésium sont des molécules d'eau. La sphère externe de coordination contient des molécules d'eau supplémentaires, deux résidus aspartates (Asp168 et Asp235), deux squelettes carbonyles (Met167 et Ser192) et une arginine (Arg111) provenant du bras *N*-terminal de la sous-unité adjacente [45]. Les détails moléculaires sont représentés dans la Figure 15.

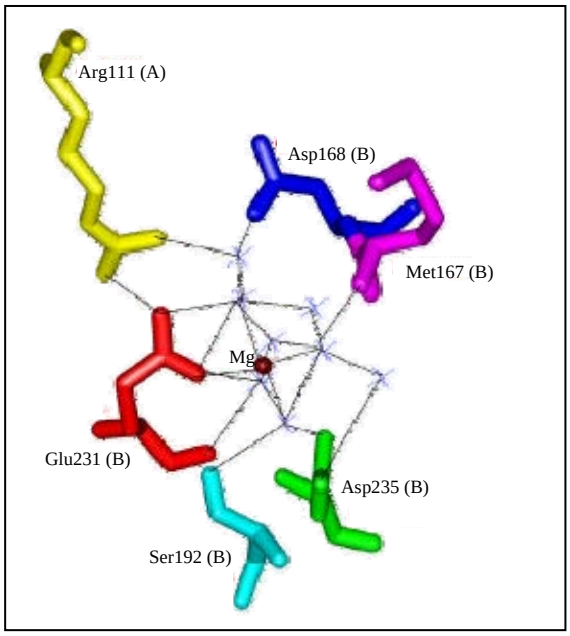


Figure 15 : Sphère de coordination du magnésium au site allostérique de la PBGS d'*Escherichia coli*. Les molécules d'eau sont représentées par les croix bleues [57]

Avant la résolution de la structure aux rayons X, la position de l'arginine (Arg111) et de l'acide glutamique (Glu231) dans la séquence des acides aminés était utilisée afin de déterminer la présence ou non du magnésium au site allostérique.

3.3.2 PBGS dépendantes du magnésium

Les premières études faites sur les enzymes indépendantes du zinc furent menées sur la PBGS issue de *Bradyrhizobium japonicum* [39]. Il fut démontré que la région riche en cystéine dans les PBGS dépendantes du zinc était remplacée par une région riche en acides aspartiques pour les PBGS indépendantes du zinc. Comme la PBGS montrait une dépendance au magnésium, il fut donc postulé, que le magnésium pouvait se lier au site actif en se coordinant aux résidus aspartates qui sont de meilleurs ligands que les cystéines pour le magnésium. Cette PBGS utilise quatre magnésium catalytiques par octamère, huit magnésium allostériques par octamère et un ion monovalent (K^+). C'est la première PBGS où l'absence de zinc catalytique fut démontrée.

La structure aux rayons X de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* montre que les trois résidus cystéines présents au site actif pour les PBGS dépendantes du zinc, sont remplacés par deux résidus aspartates et un résidu alanine [41]. Cette protéine contient seulement quatre ions magnésium par octamère, la stoechiométrie la plus basse étudiée jusqu'à maintenant pour les PBGS. Ce concept de quatre monomères fonctionnels est connu sous le nom de réactivité *half-site*. Jahn et Frankenberg [76] établirent qu'à une faible concentration de cations Mg^{2+}, la

PBGS issue de la *Pseudomonas aeruginosa* catalyse lentement la formation du PBG **6** de manière indépendante au métal. Cela suggère que le site actif ne contient pas de ion métallique divalent, même dans des conditions d'activité maximale. La structure aux rayons X montre bien l'absence d'ion magnésium au site actif. Les ions Mg^{2+} sont situés hors du site actif et jouent donc un rôle allostérique.

La symétrie des dimères pour la PBGS issue d'*Escherichia coli* est en fort contraste avec la dissymétrie des dimères de la PBGS de la *Pseudomonas aeruginosa*. La structure de la *Pseudomonas aeruginosa* présente un dimère dissymétrique où le métal lié au site allostérique est présent uniquement dans une des deux sous-unités [41] (Figure 16). Le monomère A est appelé forme «fermée» parce que la densité électronique bien définie du *lid* protège l'entrée du site actif. Ce monomère est associé à l'ion Mg^{2+} qui est localisé dans le site allostérique. Le monomère B est appelé forme «ouverte», car le site actif est très accessible de l'extérieur à cause d'un manque de densité électronique dans la région du *lid*. Ce monomère ne contient pas d'ion Mg^{2+}. La stimulation observée sur l'activité catalytique par l'occupation du site allostérique suggère une communication directe avec le site actif à travers une distance de plus de 10 Å. L'importance de la région du *lid* sur la catalyse de l'enzyme, est reflétée par le haut degré de conservation des acides aminés dans cette région pour toutes les PBGS connues. La structure ordonnée du *lid* au site actif observée pour le monomère A est requise pour permettre la séparation du site actif avec le solvant et obtenir ainsi une enzyme compétente pour la catalyse.

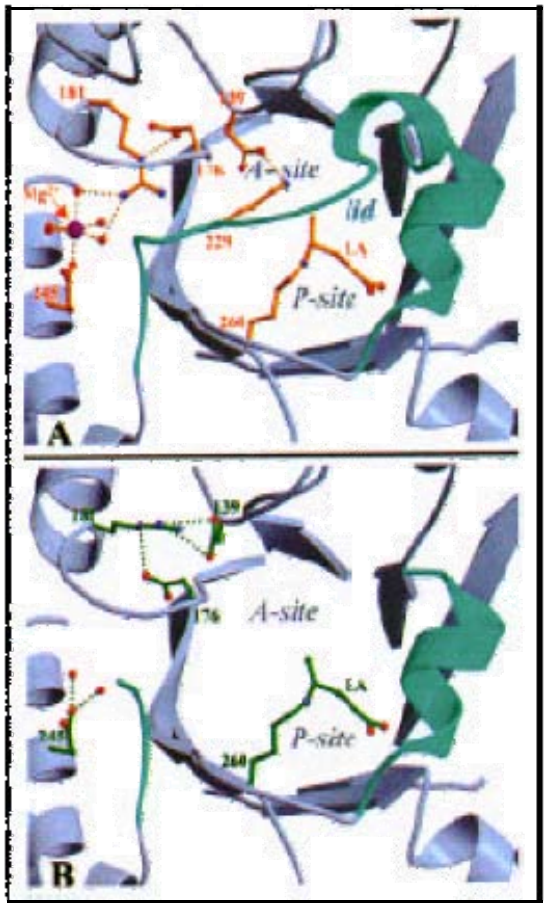


Figure 16 : Comparaison du site actif des monomères A et B de la PBGS de la *Pseudomonas aeruginosa*. Le *lid* au-dessus du site actif est de couleur turquoise. L'image du haut montre le monomère A, pour lequel le site allostérique est occupé par un cation Mg^{2+} (sphère rose). Activation du site actif de manière allostérique par Mg^{2+}. L'image du bas montre le monomère B avec absence de l'ion métallique au site allostérique. Dans les deux monomères, le site P est occupé par une molécule d'acide lévulinique **17** (vert) *via* une base de Schiff avec la Lys260 [41]

L'absence d'ion bivalent au centre actif pose la question de savoir si il est vraiment possible qu'un ion magnésium se lie au site actif pour les PBGS indépendantes du zinc. Le manque d'ion métallique au site actif requiert que, quel que soit le rôle du métal au site actif des PBGS dépendantes du zinc, il doit y avoir des acides aminés (ou des cations monovalents) qui peuvent jouer le même rôle dans les PBGS telle que *Pseudomonas aeruginosa*.

La structure récente de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* avec les ligands acide 5-fluorolévulinique **18**, révèle la présence au site actif d'un ion monovalent (probablement Na^{+}) [46]. Le rôle de cet ion n'est pour l'instant pas encore bien compris. L'ion monovalent est localisé à un endroit différent du zinc lorsque ce dernier est présent dans la PBGS, mais les deux métaux semblent partager le même rôle concernant la stabilisation du ligand.

La structure récente de la PBGS issue de *Chlorobium vibrioforme* [48] montre les mêmes caractéristiques que la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*. Le site actif présente les

mêmes acides aminés et aucune densité électronique ne suggère la présence d'un ion magnésium. Cette PBGS contient aussi un magnésium allostérique, dont la stoechiométrie est de huit par octamère. Comme cela a déjà été montré pour la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*, le magnésium allostérique stimule l'activité catalytique de la PBGS de *Chlorobium vibrioforme*. Cette stimulation suggère une interaction entre le site allostérique et le site actif de l'enzyme *via* un réseau de liaisons hydrogène. Lorsque le magnésium est présent au site allostérique, deux molécules d'eau présentes dans la première sphère de coordination du métal forment des liaisons hydrogène avec un résidu arginine (Arg176), ce dernier faisant des liaisons hydrogène avec un résidu aspartate (Asp171) du site actif. La Figure 17 montre l'interaction entre le site actif et le site allostérique.

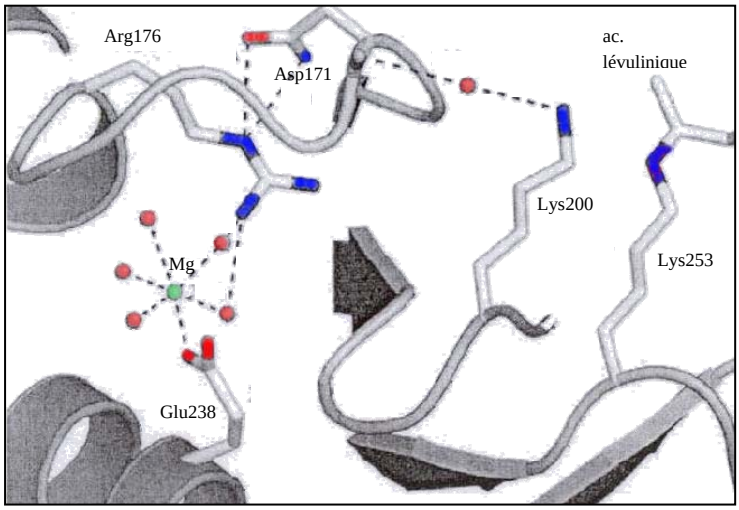


Figure 17 : Interactions entre le site allostérique du magnésium (en vert) et le site actif, exempt de ion métallique, *via* des liaisons hydrogène entre des molécules d'eau (en rouge) et les acides aminés pour la PBGS de *Chlorobium vibrioforme* [48]

3.3.3 Comparaison des sites actifs de la PBGS d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*

Dans les deux cas, le substrat lié au site P forme une base de Schiff connue depuis longtemps avec une des deux lysines (Lys246 pour *Escherichia coli* ou Lys260 pour *Pseudomonas aeruginosa*) présentes dans le site actif. La résolution récente des rayons X [46], montre que le second substrat peut également former une base de Schiff dans le site A avec la deuxième lysine (Lys194 ou Lys205). Différents acides aminés du site actif forment des liaisons hydrogènes avec les deux substrats. Il s'agit des acides aminés suivants : la glutamine (Gln) et l'arginine (Arg) dans le site A ainsi que la sérine (Ser) et la tyrosine (Tyr) dans le site P. Dans le schéma proposé pour les deux différents sites actifs seuls six acides aminés diffèrent entre les deux enzymes. Pour le site actif de la PBGS d'*Escherichia coli*, le zinc présent au site actif est coordiné à trois cystéines (Cys119, Cys121 et Cys129) et à une molécule d'eau. Une

sérine (Ser164), un résidu glutamate (Glu122) ainsi qu'une arginine (Arg215) sont aussi présents au site actif de la PBGS d'*Escherichia coli*. Dans le site actif de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*, les trois cystéines sont remplacés par deux résidus aspartates (Asp131 et Asp139) et un alanine (Ala129). Une sérine (Ser175), un résidu aspartate (Asp176), une proline (Pro132) ainsi qu'une lysine supplémentaire (Lys229) viennent compléter le site actif. La Figure 18 montre de manière schématique les sites actifs de la PBGS d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*.

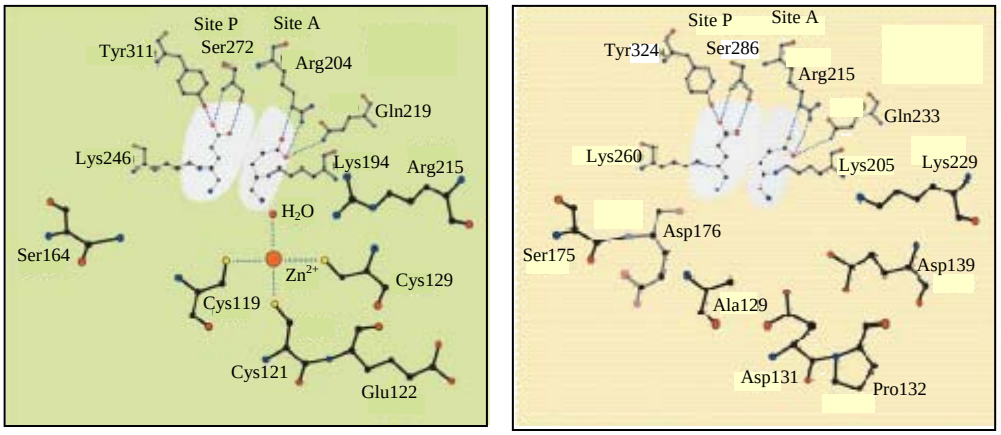


Figure 18 : L'image de gauche décrit le site actif de la PBGS d'*Escherichia coli*, tandis que celle de droite décrit le site actif de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* [77]

La comparaison entre les deux enzymes montre que le site actif diffère de seulement six acides aminés. Une étude récente [77] montre qu'il est possible de passer du site actif indépendant du zinc de *Pseudomonas aeruginosa* à un site actif dépendant du zinc semblable à *Escherichia coli*. Pour cela, les acides aminés présents au site actif d'*Escherichia coli* sont introduits, par mutation dirigée, dans le site actif de *Pseudomonas aeruginosa*. Le mutant obtenu à partir de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*, par échange de cinq acides aminés, montre une bonne activité catalytique ainsi qu'une dépendance au zinc et une activation par le magnésium, semblable à la PBGS issue d'*Escherichia coli*. Une étude précédente [78] avait déjà permis de modifier, par mutation dirigée, la PBGS indépendante du zinc *Bradyrhizobium japonicum* en PBGS dépendante du zinc.

La superposition des deux sites actifs des PBGS d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* montre un alignement des acides aminés au site actif, ce qui laisse suggérer que les deux enzymes utilisent un mécanisme similaire [79] (Figure 19).

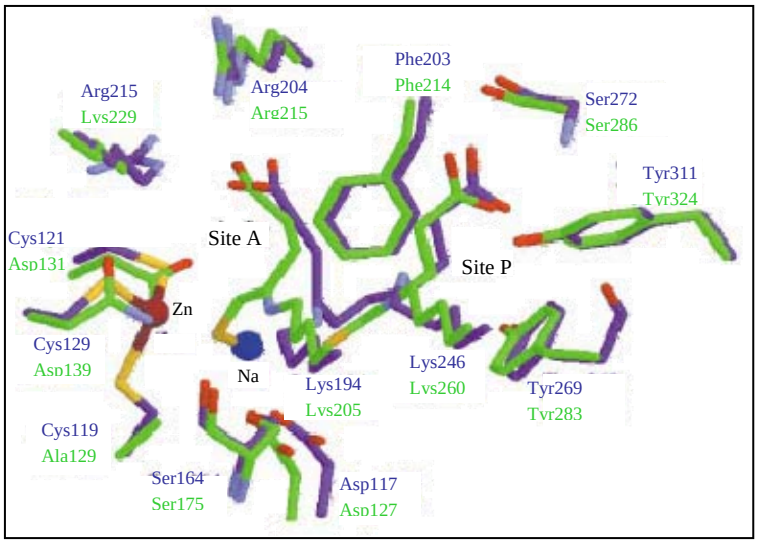


Figure 19 : Superposition des deux sites actifs des PBGS d'*Escherichia coli* (en vert) et de *Pseudomonas aeruginosa* (en violet) [79]

Les explications concernant le mode de liaison des ligands aux sites actifs sont données dans le chapitre suivant. Il est évident que les sites actifs des différentes PBGS ont un haut degré d'homologie à travers les acides aminés présent et leur positionnement spatial. Ceci suggère que les enzymes dépendantes du zinc ou du magnésium effectuent un type de mécanisme similaire pour catalyser la synthèse du PBG **6**.

3.3.4 Classification des PBGS

La position des différents métaux observés et leur rôle sont complètement différents d'une PBGS à l'autre. Des erreurs dans l'interprétation des données expérimentales accumulées ont été faites. Jaffe a tenté de rationaliser le rôle des différents métaux en les classant en trois catégories : catalytiquement non essentiel (métal A), catalytiquement essentiel (métal B) et activateur allostérique (métal C). A ce jour, cinq catégories ont été répertoriées (Tableau 1).

Type	Exemple	Métal A	Métal B	Métal C
I	Mammifère	4 Zn(II)	4 Zn(II)	absent
?	*S. cerevisiae* (levure)	8 Zn(II)	8 Zn(II)	absent
II	*E. coli*	Absent	8 Zn(II)	8 Mg(II)
III	Plantes	4 Mg(II)	4 Mg(II)	8 Mg(II)
IV	*B. japonicum*	4 Mg(II)	Absent	8 Mg(II)
V	*P. aeruginosa*	absent	absent	4 Mg(II)

Tableau 1: Classification selon Jaffe des PBGS en fonction des ions métalliques divalents requis

La découverte du manque de magnésium au site actif de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* pose une question: le magnésium peut-il se trouver au site actif et jouer le même rôle que le zinc ? Les études faites jusqu'à maintenant, notamment sur la PBGS d'*Escherichia coli,* montre bien que le zinc est catalytiquement nécessaire au site actif et que le magnésium joue un rôle allostérique à l'interface des sous-unités. De plus, des études menées par Jaffe montrent qu'il semble impossible qu'une PBGS utilise un magnésium à la place d'un zinc, ce qui lui suggéra de proposer une séparation en quatre sites de coordination pour métaux bivalents (deux sites pour le zinc et deux sites pour le magnésium) [80].

Les différentes classifications proposées par Jaffe ont donné lieu à des confusions entre les différents sites métalliques, notamment entre les sites métalliques A et B. De plus, les interprétations données par l'auteur ne sont, jusqu'à maintenant, pas toutes vérifiées. De ce fait, il semble que la meilleure classification reste la dernière proposée par Jaffe [72] qui différencie les PBGS sur la base qu'elles utilisent ou non un zinc catalytique au site actif et qu'elles utilisent ou non un magnésium allostérique à l'interface des sous-unités de l'enzyme. Environ la moitié des PBGS étudiées jusqu'à maintenant, utilise un ion zinc au site actif et plus de 90% des PBGS utilisent un ion magnésium allostérique.

4 Données disponibles avant le début de ce travail

4.1 Généralités

L'étude mécanistique de réactions catalysées par les enzymes est un véritable défi pour les chimistes et les biochimistes. Ce défi est d'autant plus intéressant à relever, si la transformation enzymatique en question est composée d'une suite de réactions. La biosynthèse du PBG **6** à partir de l'acide aminolévulinique **5** fait partie de cette catégorie de réactions multi-étapes complexes et les questions usuelles concernant ce type de réactions se posent : la réaction chimique est-elle identique à la réaction enzymatique, ou encore, quelle est la séquence des réactions et quelles sont les étapes accélérées par l'enzyme ? La réponse à la première question a déjà été apportée dans le premier chapitre : elle est négative. La dimérisation chimique de ALA **5** en pyrazine **8**, à la place de la formation du PBG **6**, ne fait qu'accroître l'intérêt porté à la PBGS. La question abordant la séquence des étapes reste en ce moment encore ouverte, car malgré les résultats obtenus jusqu'à maintenant, on ne peut pas encore exclure une des deux séquences de manière formelle. En plus de ces interrogations s'ajoute une difficulté supplémentaire propre à la PBGS : comment l'enzyme reconnaît et différencie ces deux substrats identiques dans le site actif ? Cette particularité de double substrat identique complique sérieusement les données cinétiques mais renforce l'attention portée à cette biosynthèse.

Que cela soit en présence ou en absence d'une structure aux rayons X, un concept basé sur la synthèse de molécules, ayant pour cible le site actif de l'enzyme, reste le meilleur moyen d'approcher rationnellement l'étude du biocatalyseur ainsi que ces interactions avec les deux substrats identiques jusqu'à leur transformation en produit. Notre approche, initiée pas Lüönd [81], est basée sur la synthèse d'inhibiteurs analogues du substrat, analogues du produit et analogues des intermédiaires se formant lors du processus catalytique. L'affinité des analogues du substrat et celle des analogues du produit pour le site actif peuvent être facilement corrélés à celle des substrats et du produit en fonction du degré d'analogie. Le concept d'analogues d'intermédiaires est basé sur une hypothèse non triviale : celle d'une telle structure ayant une affinité significative pour le site actif. Lors du processus catalytique le site actif et la structure de l'intermédiaire s'adaptent mutuellement afin de procéder à la transformation. Et il est certainement vrai que l'enzyme subit au cours de la réaction des modifications chimiques (principalement des transferts de proton). L'absence de ces modifications chimiques au sein du site actif natif peut constituer un obstacle à l'affinité avec la structure d'un analogue d'intermédiaire. Nous pouvons parler de tolérance ou d'intolérance de l'enzyme pour les analogues d'intermédiaires postulés selon qu'ils sont représentatifs ou non des intermédiaires réels.

Dans notre approche, l'affinité des analogues pour le site actif est établie par une mesure de leur potentiel en tant qu'inhibiteurs de la transformation enzymatique. Une modification

systématique des analogues est nécessaire pour avoir une image la plus complète possible et afin d'en déduire des informations sur la surface du site actif.

La détermination de structures aux rayons X à haute résolution de l'enzyme et/ou de l'enzyme associée soit au substrat soit à un inhibiteur permet de trouver les fonctions responsables de la catalyse enzymatique et d'apporter des informations importantes sur le mécanisme.

4.2 La littérature existante sur les inhibiteurs de la PBGS

4.2.1 Les résultats des tests cinétiques

Notre groupe a étudié le comportement d'inhibition de la PBGS isolée de *Rhodobacter spheroides* et d'*Escherichia coli*. Le but de ces études systématiques est de caractériser suffisamment les sites de reconnaissance de la PBGS, afin que des analogues adéquats aux intermédiaires postulés puissent être synthétisés et pour que leur comportement d'inhibition soit testé. L'objectif à long terme est la compréhension détaillée du mécanisme et l'obtention d'une collection d'inhibiteurs qui pourraient co-cristalliser avec l'enzyme. Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats des analogues d'intermédiaires, il a fallu étudier systématiquement les analogues de substrat et les analogues de produit [82, 83]. Pour les expériences d'inhibition, les conditions expérimentales sont choisies afin de pouvoir appliquer les lois de Michaelis-Menten (voir chapitre 5).

Les premières investigations ont été effectuées sur la PBGS de *Rhodobacter spheroides* [81, 82]. Des premiers résultats montrent que les analogues de substrat et les analogues de produit effectuent une inhibition compétitive. Un modèle du site actif a pu être développé à partir des différents résultats accumulés (Figure 20).

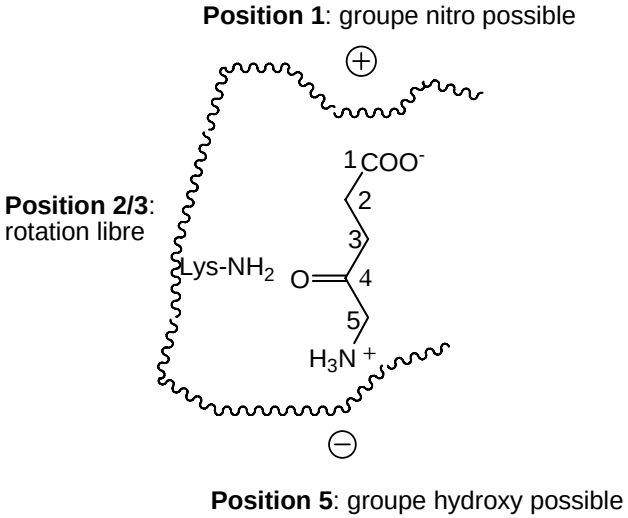
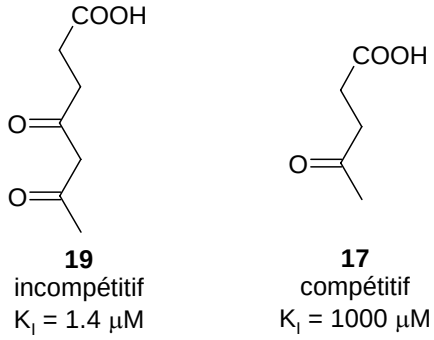


Figure 20 : Site actif de la PBGS décrit par Lüönd

La fonction acide en position 1 est importante pour la reconnaissance et est reconnue par une charge positive. La fonction cétone en position 4 semble être primordiale pour former la base de Schiff avec la lysine présente au site actif. Des substituants peu encombrants sur les carbones 2, 3 et 5 semblent être bien tolérés par l'enzyme. En testant des composés possédant entre les carbones 2 et 3 des doubles liaisons, Lüönd a pu justifier l'importance d'avoir une libre rotation autour de ces carbones. La forme protonée de l'amine n'est pas aussi importante pour la reconnaissance du substrat et peut être remplacée par des substituants neutres ou polaires.

A la suite de ce travail, Henz a repris les études d'inhibition, mais cette fois-ci sur la PBGS issue d'*Escherichia coli* [83]. Sur une série d'analogues de substrat similaires à ceux déjà testés par Lüönd, il retrouve les mêmes tendances. Le grand pas en avant fut le développement d'une nouvelle série d'inhibiteurs, celle des β-dicétones. Le pouvoir inhibiteur de cette famille se base sur celui de la succinylacétone **19**, plusieurs fois observé. La succinylacétone **19** et ses analogues suivent un comportement qui semble à priori être incompétitif et la succinylacétone **19** reste de loin le meilleur inhibiteur testé jusqu'à présent (1500 fois plus puissant que l'acide lévulinique **17**) (Figure 21).



19
incompétitif
K_I = 1.4 μM

17
compétitif
K_I = 1000 μM

Figure 21 : Potentiel d'inhibition pour la succinylacétone **19** et l'acide lévulinique **17**

A partir des ces résultats, une corrélation entre le type d'inhibition et le site de reconnaissance a pu être déduite (Figure 22). Nous interprétons une inhibition compétitive comme une compétition entre le substrat naturel et l'inhibiteur dans le site A de l'enzyme. L'observation d'une inhibition mixte ou incompétitive est un signe clair d'une interaction plus complexe. Dans ce cas, l'inhibiteur est probablement aussi en compétition avec le substrat naturel dans le site P. En l'absence de groupes fonctionnels capables de former des liaisons covalentes irréversibles, l'inhibition slow-binding et même l'inhibition irréversible sont une indication du fait que certains groupes fonctionnels interagissent de manière synergique avec les acides aminés du site actif. Il est probable que ces interactions se fassent aux deux sites de l'enzyme (site A et site P) (voir chapitre 5).

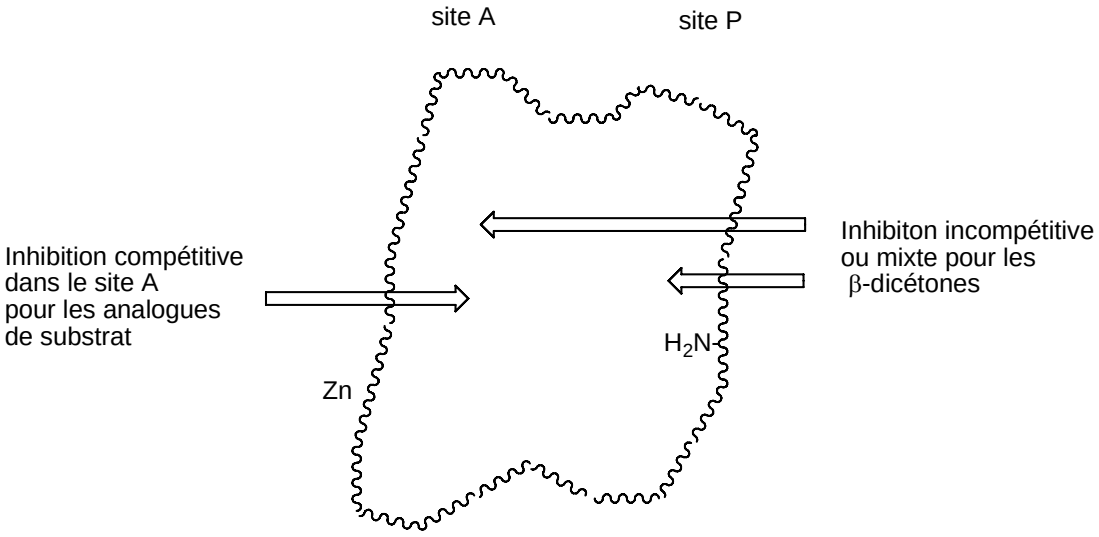


Figure 22 : Corrélation type d'inhibiteurs/sites d'interactions

Dans ces conditions expérimentales, le type et le site d'interaction d'un inhibiteur spécifique peuvent être déduits du type d'inhibition déterminé avec l'aide de l'analyse cinétique. Avec l'étude de plus de 100 inhibiteurs, cette corrélation a pu être vérifiée et est devenue importante pour l'interprétation des résultats expérimentaux.

L'étude de séries de diacides considérés comme analogues des intermédiaires postulés a été l'approche la plus importante (Figure 23) [84].

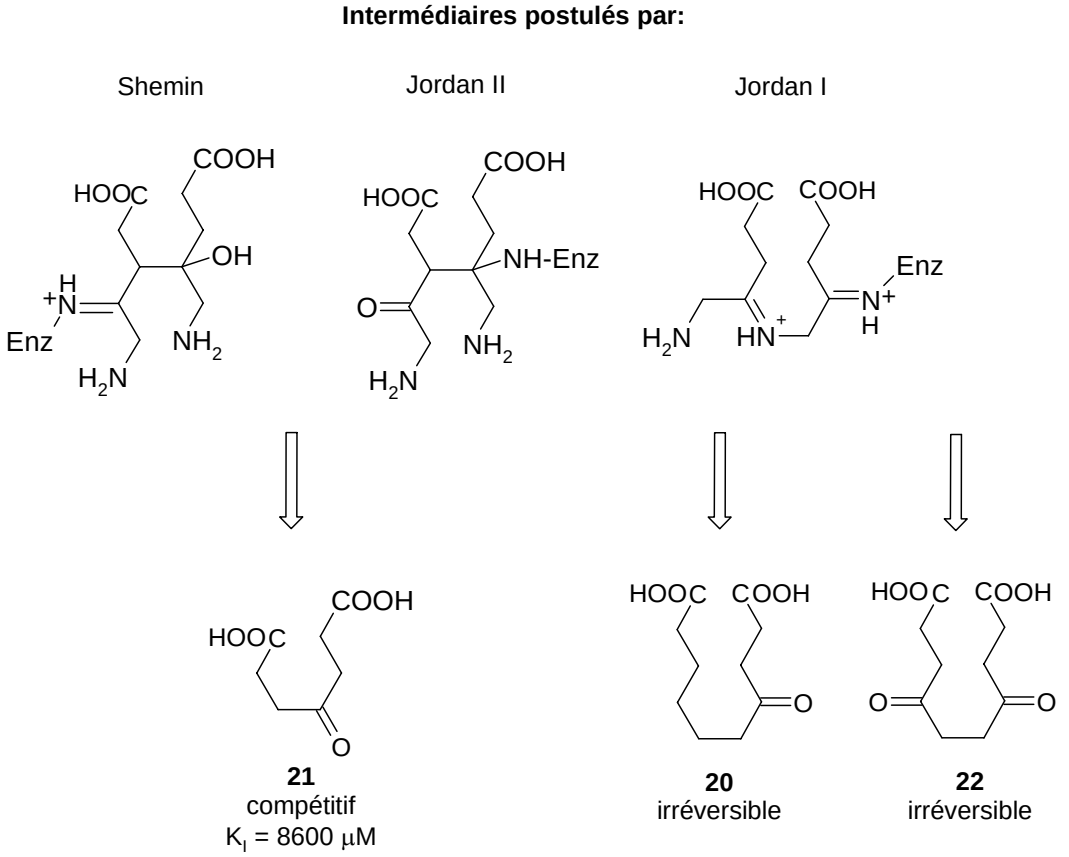


Figure 23 : Comparaison des structures postulées comme intermédiaires par Shemin et Jordan respectivement avec les diacides utilisés comme inhibiteurs

L'étude systématique des acides γ-céto dicarboxyliques de 5 à 12 carbones donne des informations intéressantes : les acides dicarboxyliques de 5 carbones à 7 carbones montrent un potentiel d'inhibition compétitif faible. Pour ceux qui possèdent 8 et 9 carbones, l'inhibition devient incompétitive et la valeur de la constante d'inhibition diminue. L'acide dicarboxylique à 10 carbones devient un inhibiteur irréversible. Finalement, les inhibiteurs à 11 et 12 carbones montrent un comportement *slow binder*.

La conclusion importante de cette série d'étude d'inhibition est claire : l'acide γ-céto-dicarboxylique **20**, qui ressemble à l'intermédiaire initialement postulé par Jordan I, est fortement lié et montre un comportement d'inhibition irréversible. L'intermédiaire **21**, qui est censé imiter celui postulé par Jordan II, semble être reconnu «seulement» comme un analogue de substrat, sans site d'interaction supplémentaire avec l'enzyme. Les inhibiteurs, dont la distance entre les deux acides carboxyliques est trop courte, montrent un comportement compétitif et sont donc uniquement reconnus comme analogue de substrat. Les inhibiteurs ne correspondant pas à la longueur des intermédiaires postulés (8, 9, 11 et 12 carbones) se lient quand même fortement au site actif de manière incompétitif ou *slow binder* ce qui implique probablement des interactions dans les deux sites A et P. L'interprétation évidente de ces

résultats est que l'acide 4-oxosébacique **20** et l'acide 4,7-dioxosébacique **22** sont reconnus par l'enzyme grâce à leurs extrémités carboxylates et grâce à leur fonction cétone qui forme une base de Schiff avec la lysine présente au site P du site actif. Ces trois points de reconnaissance aboutissent à une inhibition quasi-irréversible.

La PBGS a deux méthodes différentes de reconnaissances du substrat pour ces deux sites A et P. Pour permettre l'analyse de la reconnaissance au site A et au site P, une nouvelle structure type a été élaborée [57].

On a pu constater qu'une interaction en trois points (fonction cétone et deux fonctions carboxylate) est primordiale pour une excellente reconnaissance au site actif. Les résultats obtenus sur la série des diacides montrent que la PBGS est très sensible à la longueur de la chaîne. Les dérivés de l'acide sébacique, **20** et **22**, proche analogue de l'intermédiaire clé postulé pour le mécanisme Jordan I, montrent la plus grande efficacité. En tenant compte de tous ces facteurs, une structure type fut développée. A partir d'un diacide à 10 carbones comprenant un carbonyle en position γ par rapport à l'une des deux fonctions acide et une fonction amide sur l'autre position γ par rapport à la deuxième fonction acide (la fonction cétone pouvant former la base de Schiff contrairement à la fonction amine), il est possible de définir dans quel site ont lieu les diverses inhibitions observées (Figure 24).

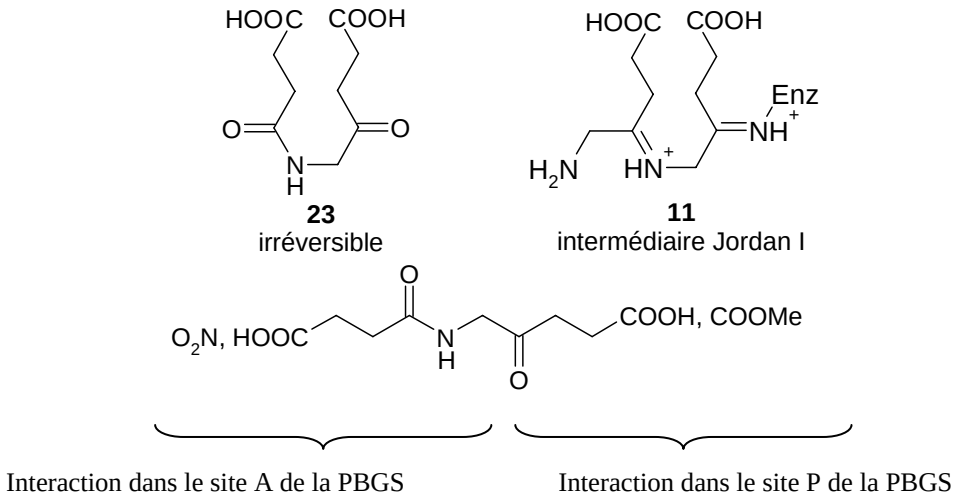


Figure 24 : Structure type d'un diacide mixte irréversible

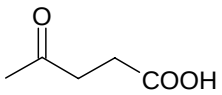
Cette étude nous permet de distinguer la reconnaissance sélective aux deux sites de l'enzyme. Le comportement d'inhibition irréversible obtenu pour ce type de molécule (**23**) montre que le site A est plus tolérant que le site P devant l'introduction d'une fonction amide, lorsque cette dernière est incorporée dans un analogue de l'intermédiaire clé du mécanisme de Jordan I **11**. La fonction cétone est nécessaire dans le site P pour la formation de la base de Schiff.

Les analyses aux rayons X des co-cristallisations de l'enzyme avec les inhibiteurs peuvent permettre de distinguer exactement la reconnaissance au site P et au site A.

4.2.2 Les résultats de co-cristallisations de l'enzyme avec divers inhibiteurs

Erskine et al. ont publié toute une série de structures radiocristallographiques de la PBGS issue de la levure, complexée à divers inhibiteurs ainsi qu'au substrat naturel [43, 44, 70]. Les structures cristallines disponibles à ce jour sont listées, avec leur entrée PDB, dans l'annexe 1 (chapitre 12).

Les résultats de co-cristallisation de l'enzyme avec l'acide lévulinique **17** ont apporté des informations sur la reconnaissance du groupe carboxylate au site P de l'enzyme [44, 70].



17
compétitif
K_I = 1000 μm

L'inhibiteur est lié à l'enzyme *via* une base de Schiff, comme prévu avec la lysine (Lys263) du site P. Le groupement carboxylate de l'inhibiteur forme des ponts hydrogène avec les groupes hydroxy d'une sérine (Ser290) et d'une tyrosine (Tyr329), et avec l'azote de la chaîne principale de la Ser290.

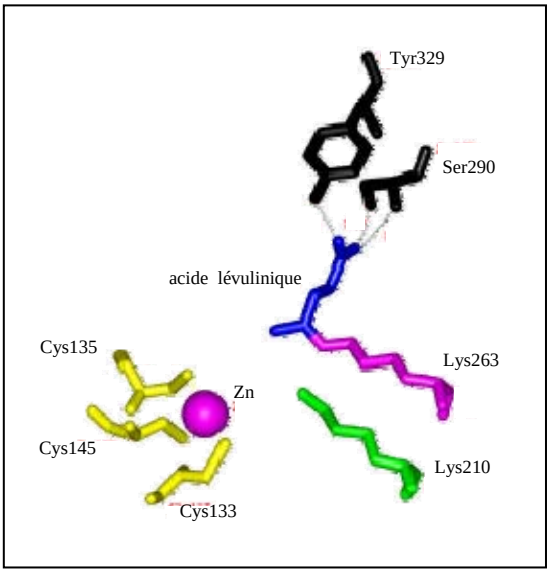


Figure 25 : Structure du complexe enzyme acide lévulinique **17**, en bleu. Reconnaissance du carboxylate *via* des ponts hydrogène avec la Ser290 et la Tyr329. La Lys263, en violet, forme la base de Schiff avec l'inhibiteur. La seconde Lys210 est représentée en vert. L'ion Zn^{2+}, en violet, est coordiné à trois cystéines (Cys133, 135 et145), en jaune [57]

Le *lid*, qui joue le rôle de couvercle ouvrant et fermant l'accès du site actif, est mal défini (résidu 217 à 235) pour la PBGS de levure ne contenant pas d'inhibiteur. Pour l'enzyme complexée à l'acide lévulinique **17**, tous les acides aminés appartenant à ce *lid* montrent une densité électronique nettement mieux définie, ce qui peut amener à penser que la présence de l'inhibiteur a un effet d'organisation très marqué. Cette région devient donc plus ordonnée et/ou adopte une autre conformation en présence du substrat.

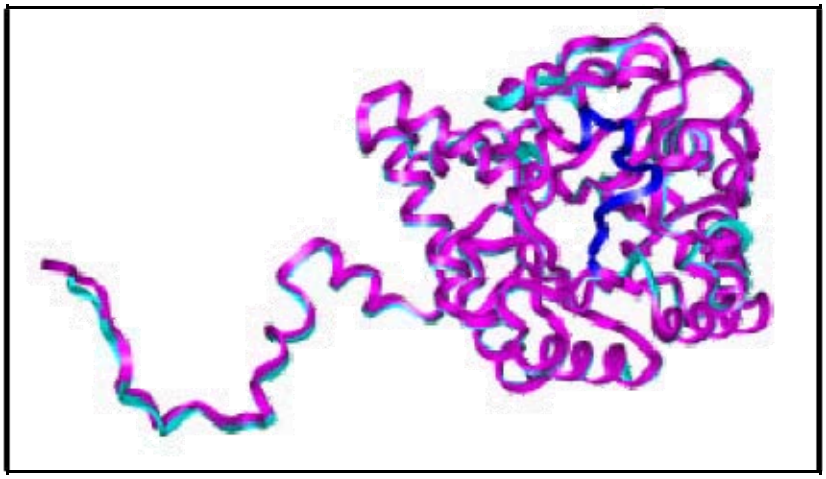
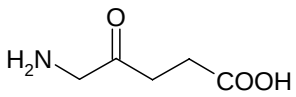


Figure 26 : Superposition du monomère de la PBGS : sans inhibiteur, en bleu clair, et complexé à l'acide lévulinique **17**, en violet. Le lid est représenté par le ruban en bleu foncé [57]

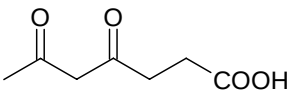
Les résultats de co-cristallisation de l'enzyme avec le substrat naturel montrent que ALA **5** est lié au site P *via* une base de Schiff avec la Lys263. De manière similaire à l'acide lévulinique **17**, la reconnaissance au site P s'effectue *via* la Ser290 et la Tyr329 et le groupement carboxylate du ligand.



5

ALA **5** diffère de l'acide lévulinique **17** par la présence d'un groupe amino sur le carbone en position 5 qui forme des ponts hydrogènes avec un résidu aspartate (Asp131) et une sérine (Ser179), ce qui implique que ces acides aminés peuvent jouer un rôle dans la séquence réactionnelle.

La succinylacétone **19** possède un groupe cétone à la place du groupe amino du substrat naturel.



19
K_I = 1.4 µm

Cet inhibiteur est fortement fixé uniquement au site P de la PBGS *via* une base de Schiff avec la Lys263 et le groupement carboxylate forme tout comme le substrat naturel et l'acide lévulinique des ponts hydrogène avec la Tyr329 et la Ser290. Des ponts hydrogène entre le groupement cétone et la Ser179 sont aussi observés comme dans le cas de ALA **5** (Figure 27).

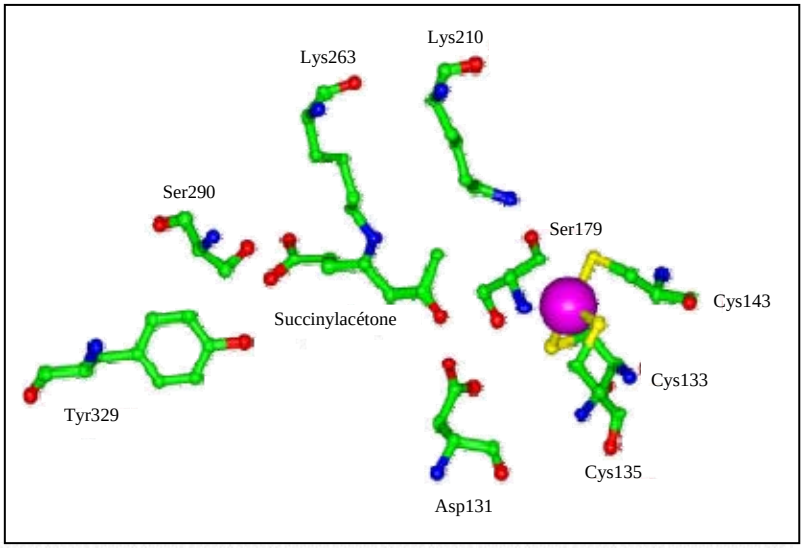
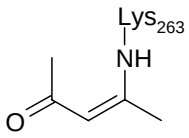


Figure 27 : Structure de l'enzyme avec la succinylacétone. Acides aminés importants impliqués dans la liaison de la succinylacétone **19** au site actif de la PBGS. L'ion Zn^{2+}, en violet, est coordiné à trois cystéines (Cys133, 135 et145) [57]

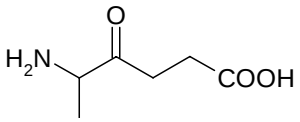
La succinylacétone **19** est reconnue comme un inhibiteur puissant de la PBGS. Il est connu dans la littérature que les unités 1,3-dicétone forment une base de Schiff avec une lysine au site actif de l'enzyme, qui se stabilise ensuite par tautomérie en un amide vinylogue **24**, dont la configuration cis et la conformation s-trans ont été déterminées par analyse des spectres UV/VIS [57].



24
amide vinylogue
cis-s-trans

Dans le complexe enzyme succinylacétone **17**, la chaîne latérale de la Lys210 (site A) est déplacée exceptionnellement de 2 Å, permettant ainsi à la succinylacétone **17** de s'adapter à la cavité du site actif. Une des conséquences de ce déplacement est une désorganisation au niveau du *lid*. Ce changement conformationnel important est attribué à un effet de collision en chaîne ne provenant finalement que d'une modification conformationnelle locale de la Lys210 (site A) lors de la liaison covalente de la succinylacétone **17** avec la Lys263 (site P). Il est intéressant de remarquer la présence d'une autre petite région désorganisée sur le bras amino-terminal du monomère adjacent. Tout changement conformationnel au niveau du site actif d'un dimère peut donc se répercuter aux dimères voisins *via* cette région et donc la liaison du substrat ou d'un inhibiteur à un monomère peut influencer le turnover des monomères voisins.

L'acide 4-oxo-5-aminohexanoique **25** est un composé intéressant, car il se complexe à la Lys263 du site P de la PBGS sous forme d'un carbinolamine **26** (Figure 28). Comme c'est le cas dans les autres ligands, le groupement carboxylate est reconnu au site P grâce à la Tyr329 et la Ser290.



25

K_I = 0.2 mM

Cet intermédiaire **26** est l'issue d'une des étapes de la formation de la base de Schiff. Il a été postulé que la présence du groupe méthyle de cet inhibiteur permet de stabiliser ce complexe peu commun. Cette structure est maintenue par divers ponts hydrogène entre l'amine du ligand et la Tyr207 et l'Asp131, et entre l'alcool de ce même ligand et la Lys210. Elle donne un rôle important à la Lys210 dans la stabilisation de la forme carbinolamine.

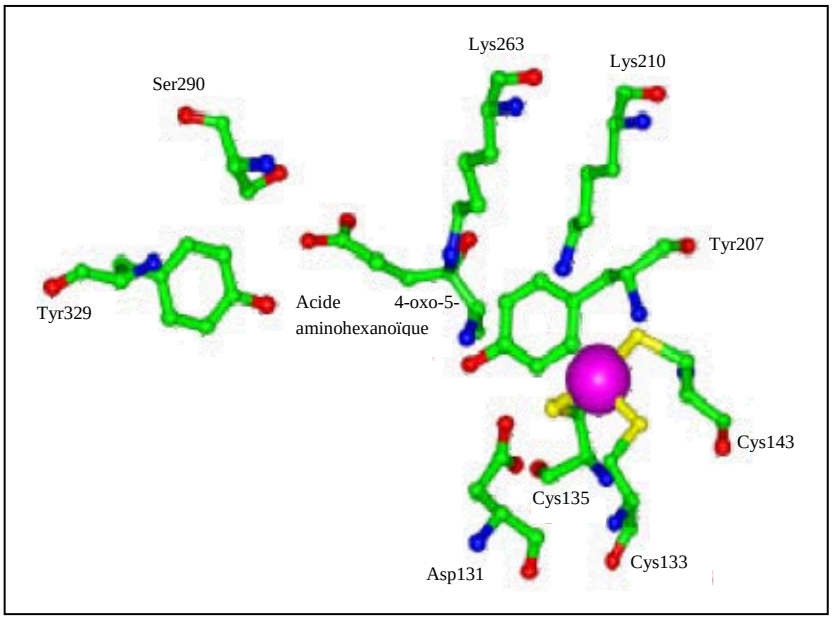
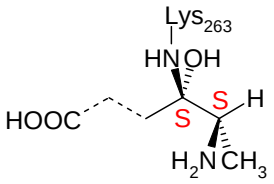


Figure 28 : Structure de l'enzyme avec l'acide 4-oxo-5-aminohexanoique **25**. Formation du carbinolamine **26**. L'ion Zn^{2+}, en violet, est coordiné à trois cystéines (Cys133, 135 et145)[57]

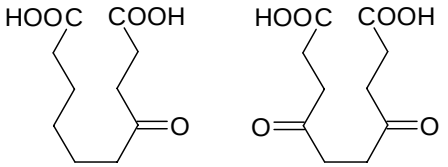
D'après la structure aux rayons X, la configuration de l'intermédiaire carbinolamine **26** est la suivante :



26
carbinolamine

Cette molécule est composée de deux carbones asymétriques donc la configuration absolue est S, S. Les liaisons en trait tillé indiquent que la suite de carbones reliant le groupe carboxylate, ne se trouve pas dans un même plan que les deux carbones asymétriques. Ces deux plans sont quasi orthogonaux.

L'analyse des structures contenant l'acide 4-oxosébacique (OSA) **20** et l'acide 4,7-dioxosébacique (DOSA) **22**, analogues de l'intermédiaire clé de Jordan I, permet d'avoir une idée plus précise des interactions mises en jeu au site A [85-87]. Les deux groupes carboxyliques sont à une distance idéale pour pouvoir interagir, de manière simultanée, aux deux sites de reconnaissance de l'enzyme [88].



20
irréversible

22
irréversible

De manière similaire aux ligands étudiés jusqu'à maintenant, les deux ligands **20** et **22** sont liés de manière covalente *via* une base de Schiff avec la lysine (Lys263) du site P. La reconnaissance du groupe carboxylate dans ce même site, s'effectue *via* la Ser290 et la Tyr329. Cette reconnaissance est identique pour les deux inhibiteurs. Le *lid* se trouve sous une conformation nettement plus ordonnée une fois l'inhibiteur lié au site actif. Pour les deux ligands, la reconnaissance du groupe carboxylate au site A a lieu *via* des ponts hydrogène avec deux arginines (Arg220 et Arg232) et une glutamine (Gln236) (Figure 29). Dans le cas de OSA **20**, ces interactions se font à plus longues distances. Dans le cas de DOSA **22**, il y a deux liens covalents possibles (deux fonctions cétones). Il est donc important de noter la formation de la deuxième base de Schiff avec la lysine (Lys210) du site A de l'enzyme pour ce composé. L'activité de cette seconde lysine est démontrée pour la première fois [89]. Une distorsion est observée entre les carbones en position 5 et 6 pour permettre la formation de cette seconde base de Schiff, ce qui suggère que la chaîne acétyle a plus de flexibilité que la chaîne propyle. Cette flexibilité est essentielle pour permettre les changements d'hybridations nécessaires à la formation du PBG **6**. Cette distorsion n'est pas observée pour **20** étant donné qu'il n'y pas formation de la seconde base de Schiff.

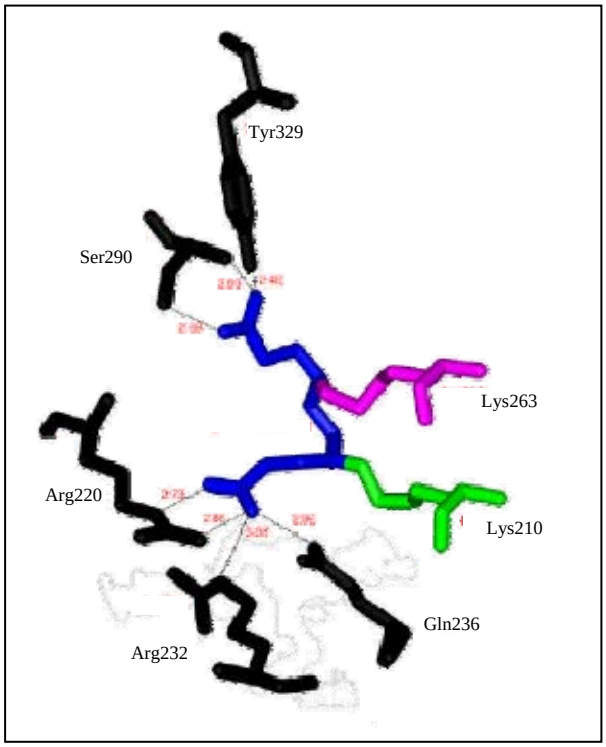
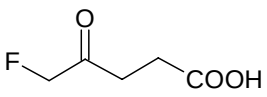


Figure 29 : Structure du complexe enzyme et de l'acide 4,7-dioxosébacique **22**, en bleu. Au site P, le groupement carboxylate forme des ponts hydrogène avec la Ser290 et la Tyr329, en noir, au site A avec l'Arg220, l'Arg232 et la Gln236, en noir. La Lys 263, en violet, et la Lys210, en vert, forment deux bases de Schiff avec l'acide 4,7-dioxosébacique **22** [57]

Malgré le fait que l'acide 4-oxosébacique **20**, l'acide 4,7-dioxosébacique **22** et la succinylacétone **19** sont tous des inhibiteurs avec une grande affinité pour l'enzyme, les raisons semblent être différentes [57]. L'acide 4-oxosébacique **20** et l'acide 4,7-dioxosébacique **22** sont liés dans les sites A et P du site actif de la PBGS et gagnent leur affinité par interactions avec les deux sites. Au contraire, la succinylacétone **19** est étroitement fixée au site P grâce à la stabilité de la formation de l'amide vinylogue.

La structure de la PBGS issue de la *Pseudomonas aeruginosa* avec l'acide 5-fluoro-lévulinique **18** a fourni un support supplémentaire pour élucider le mécanisme catalytique initié par les liaisons consécutives des deux molécules ALA **5** au site P et au site A.



18
compétitif
K_I = 85 µm

La structure obtenue (Figure 30) montre pour la première fois deux analogues de substrats identiques liés au site actif de la PBGS *via* une base de Schiff dans le site P et une dans le site

A [46]. C'est le premier modèle détaillé qui permet d'identifier tous les résidus engagés dans le site A aussi bien que dans le site P pour une PBGS indépendante du zinc. La reconnaissance au site P se fait, comme précédemment, *via* une sérine (Ser286) et une tyrosine (Tyr324) avec le groupement carboxylate du ligand, tandis qu'au site A, elle se fait *via* une arginine (Arg215) et une glutamine (Gln233). Le site P est hydrophobe avec des résidus acides aminés aromatiques (Phe86, Tyr214 et Tyr283) en étroit contact avec la partie apolaire du ligand. Le substituant fluoro du ligand imite l'amine du substrat naturel et occupe la même position dans le site P. Ceci est prouvé par superposition de cette structure avec la structure de la co-cristallisation du substrat naturel avec la PBGS de levure [43]. Les deux substituants fluoro sont en étroit contact avec un cation monovalent. Cette structure [46] prouve pour la première fois qu'un ion métallique alcalin peut être requis dans le site actif d'une PBGS indépendante du zinc, afin de stabiliser le substrat. Les conformations différentes pour les deux inhibiteurs au site A et P montrent que le substrat au site A est prédisposé à la formation de l'énamine qui est en accord parfait avec la formation initiale de la liaison C-C du PBG **6**. La fonction de cet ion monovalent n'est pas encore bien comprise.

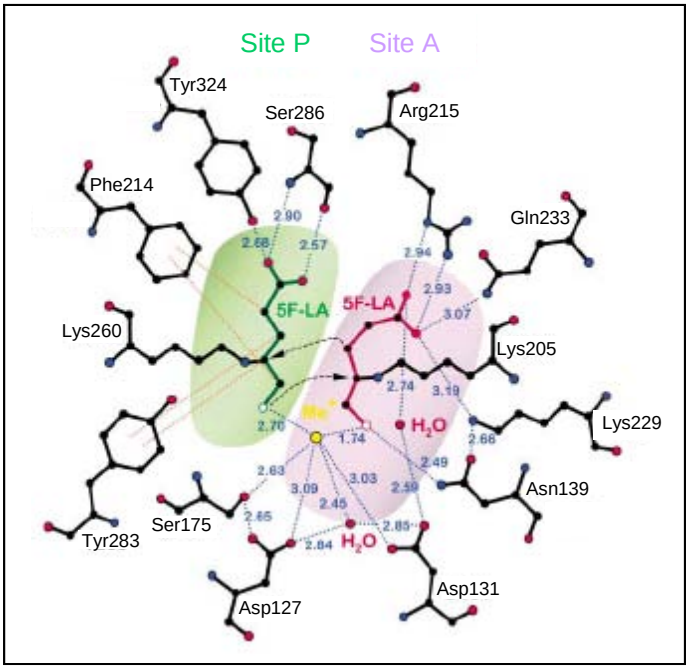


Figure 30 : Structure de l'enzyme avec l'acide 5-fluorolévulinique **18**. L'inhibiteur dans le site P est représenté en vert et celui dans le site A en rose. Les atomes de fluor sont en blanc et le cation monovalent est en jaune [46]

Une autre structure d'une PBGS indépendante du zinc complexée avec l'acide lévulinique **17** a été déterminée [48]. La PBGS issue de *Chlorobium vibrioforme* forme une base de Schiff avec la lysine (Lys253) du site P et l'acide lévulinique **17**. Les mêmes interactions déjà rencontrées, à savoir des liaisons hydrogènes avec les résidus tyrosine (Tyr318) et sérine (Ser279) et des interactions de certains acides aminés avec la partie hydrophobe du ligand, sont observées.

Récemment, la résolution de la structure de la PBGS de levure complexée avec deux molécules du substrat naturel, montre la stabilisation d'un intermédiaire cyclique similaire au produit PBG **6** [90]. Ainsi, à partir des deux molécules ALA **5**, les liaisons C-C et C-N se sont formées pour donner cet intermédiaire cyclique trapé au site actif de l'enzyme (intermédiaireI/*Sc*PBGS) (Figure 31).

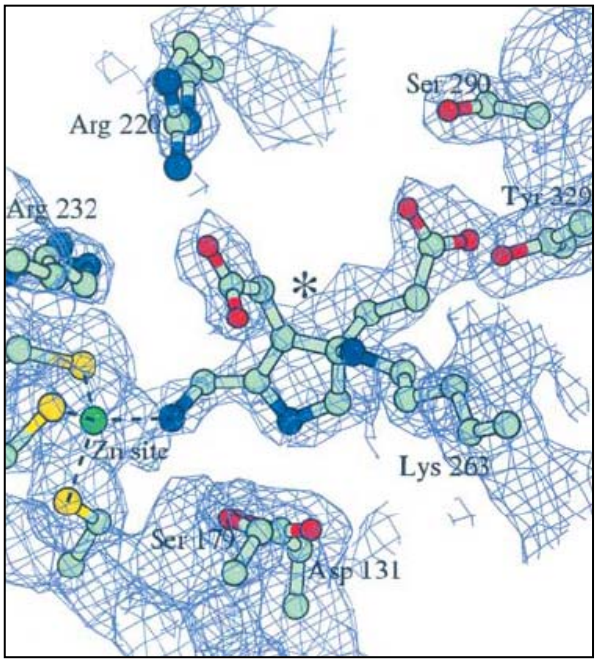


Figure 31 : Structure de l'enzyme avec un intermédiaire cyclique lié via une base de Schiff dans le site P (Lys 263). La fonction amine dans le site A de l'intermédiaire est lié au zinc (en vert) [90]

Cet intermédiaire cyclique est lié de manière covalente à la lysine (Lys263) du site P. Le groupement carboxylate dans le site P forme les liaisons hydrogène décrit précédemment, avec les résidus sérine (Ser290) et tyrosine (Tyr287). Dans ce site P, l'intermédiaire est entouré par les chaînes hydrophobiques tyrosines (Tyr216 et Tyr287), phénylalanine (Phe219) et valine (Val289). Tous ces résidus sont invariables et hautement conservés, impliquant un rôle important dans la liaison du substrat pour toutes les espèces de PBGS. L'intermédiaire cyclique n'est pas lié de manière covalente dans le site A, mais le groupe carboxylate forme des liaisons électrostatiques avec des résidus arginines (Arg220 et Arg232) et glutamine (Gln236) comme cela a déjà été démontré avec les ligands OSA **20** et DOSA **22**. Dans ce cas, il y a une interaction supplémentaire entre le groupement carboxylate dans le site A et la lysine (Lys210). De plus, le groupe amine de la chaîne secondaire de l'intermédiaire cyclique est coordiné à l'ion Zn^{2+}, remplaçant l'ion hydroxyde normalement présent. Cette liaison peut participer à la stabilisation de l'intermédiaire cyclique trapé.

Un allèle rare issu de la PBGS humaine semble montrer une structure quaternaire hexamèrique [91], contrairement à la PBGS humaine (ainsi que toutes les PBGS étudiées jusqu'à maintenant) qui montre une structure quaternaire octamérique. Des études cinétiques ont montrées que la forme hexamèrique était moins active. Cette observation est attribuée à la

différence de structure quaternaire, sans pour autant démontrer une relation directe entre la structure quaternaire et l'activité diminuée de l'enzyme. Il a déjà été prouvé que pour les PBGS issues des plantes et de certaines bactéries, la forme octamérique la plus active peut être dissociée en unités structurales plus petites et moins actives [39, 58, 73, 92, 93]. Des études récentes menées par Jaffe, semble supposer qu'il existe un équilibre des structures quaternaires entre la forme octamérique et la forme hexamérique pour les PBGS issues des plantes [94]. Le site allostérique du magnésium jouerait un rôle, encore incompris, dans cet équilibre. L'interprétation des résultats des expériences de chromatographie à exclusion de taille et d'ultracentrifugation analytique sur la PBGS de *Rhodobacter capsulatus*, laisse supposer que cette PBGS présente une structure quaternaire hexamèrique [95]. De plus, cette enzyme semble indépendante de tous ions métalliques pour son activité catalytique. Une seule PBGS avec une structure quaternaire hexamèrique a été déterminée aux rayons X [91]. L'observation de cette structure exceptionnelle a renforcé l'interprétation des données cinétiques de PBGS isolées de différentes source, qui reposait exclusivement sur des simulations de l'équilibre entre la forme octamère, hexamère et tétramère et l'attribution des réactivités différenciées aux structures de degré d'association différente. La co-cristallisation de l'allèle rare de la PBGS humaine avec deux molécules ALA **5**, montre que les deux substrats sont liés de manière covalente par les deux lysines présentes au site P et au site A [91]. De plus, les deux substrats sont reliés l'un à l'autre par une liaison C-C, ce qui peut être interprété comme la présence d'un intermédiaire trapé sur le site actif (intermédiaireII/*Hs*PBGS). La question principale pour interpréter correctement cette structure est de savoir, si nous voyons une structure du type « *dead end* » non corrélée avec le mécanisme de l'enzyme ou si réellement nous avons la chance d'observer un stade intermédiaire du mécanisme enzymatique.

La détermination des structures de l'enzyme avec les inhibiteurs décrits dans ce chapitre a aidé à définir la séquence des résidus acides aminés formant le site P et surtout le site A. Dans le site P, les différents ligands observés forment tous une base de Schiff avec leur fonction cétone et la lysine présente dans ce site. De plus, le groupement carboxylate des ligands forment des liaisons hydrogène avec une sérine et une tyrosine présentes dans le site actif. Des interactions hydrophobes sont également observées dans le site P, entre la chaîne apolaire des ligands et des acides aminés telles que des tyrosines et une phénylalanine. Dans le site A, certains ligands forment également la base de Schiff avec la lysine présente dans ce site. Le groupement carboxylate des ligands est également reconnu par des liaisons hydrogène avec une arginine et une glutamine. Ces résultats permettent de dire que les groupements carboxylates et les groupements γ-cétones sont nécessaires pour une bonne reconnaissance aussi bien au site P qu'au site A. Les résultats des tests d'inhibition montrent que les inhibiteurs imitant une réaction initiale du type aldol entre les deux substrats naturels (mécanisme Jordan II) sont de faibles inhibiteurs, alors que les inhibiteurs basés sur la formation initiale de la base de Schiff (mécanisme Jordan I), montrent un bon potentiel d'inhibition ou sont même parfois des inactivateurs irréversibles. Ainsi, les résultats obtenus

favorisent le mécanisme Jordan I par rapport au mécanisme Jordan II qui lui reste préféré pour des raisons stéréoélectroniques [46, 81]. Il est à noter que les deux ligands **20** et **22** imitant l'intermédiaire Jordan I, ressemblent également à des analogues de bisubstrat (Figure 32).

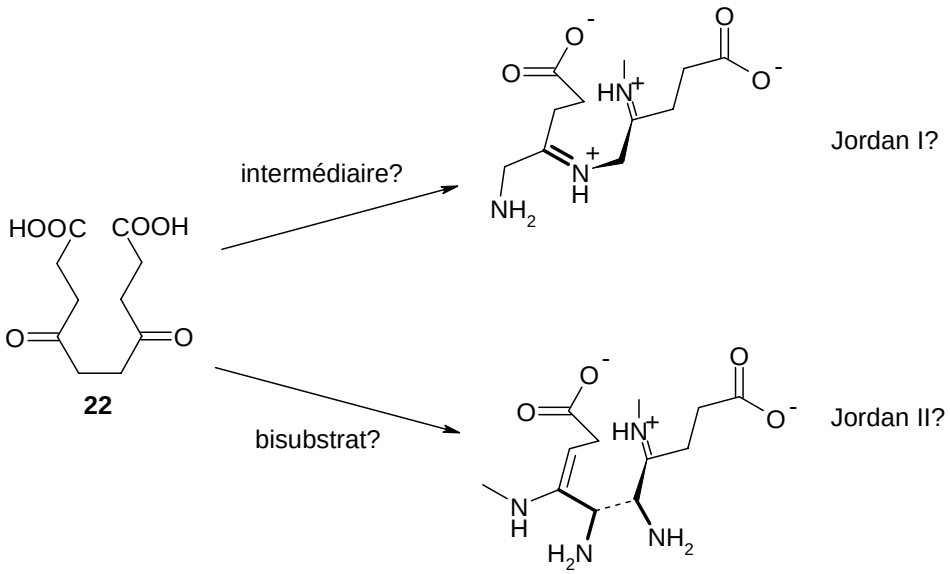


Figure 32 : Les diacides peuvent se comporter aussi bien comme analogues d'intermédiaires que comme analogues de bisubstrat

Afin de lever l'ambiguïté sur les inhibiteurs **20** et **22** présentés ci-dessus (analogue d'intermédiaire postulé ou analogue de bisubstrat), des tests cinétiques sur une série d'analogues de bisubstrat spécifiquement conçue et nouvellement synthétisée, sont effectués. Ces nouveaux analogues sont des dimères dérivant de l'acide lévulinique, symétriquement reliés par un hétéroatome.

4.3 Mécanismes proposées pour la formation du porphobilinogène

Grâce aux résultats des tests d'inhibition et des structures aux rayons X de l'enzyme complexée avec des inhibiteurs, la compréhension du mécanisme de formation du PBG **6** a été améliorée, sans toutefois pouvoir conclure définitivement laquelle des deux liaisons, C-C ou C-N, se forme initialement. Les deux mécanismes possibles (Jordan I et II) sont à nouveau dessinés (Figure 34 et Figure 35) et complétés par les résultats obtenus jusqu'à maintenant [96].

La première étape de la réaction catalysée par la PBGS, est la formation de la base de Schiff du premier substrat à la lysine (Lys263) du site P de l'enzyme. Ceci est démontré depuis longtemps par Jordan, grâce à son élégante expérience de «pulse labelling» [20]. La formation de la première base de Schiff dans le site P ne nécessite pas la présence d'un ion métallique et

semble commune à toutes les enzymes. Cette première réaction libère une molécule d'eau et deux protons. La lysine (Lys210) du site A, qui se trouve à l'état protoné [42], a été identifiée comme pouvant jouer le rôle de tampon pour le transfert des protons [44]. Ce premier substrat forme, grâce à son groupement carboxylate, des ponts hydrogène avec des acides aminés présents au site actif, tels que la Tyr329 et la Ser179, comme cela a été démontré précédemment (Figure 33).

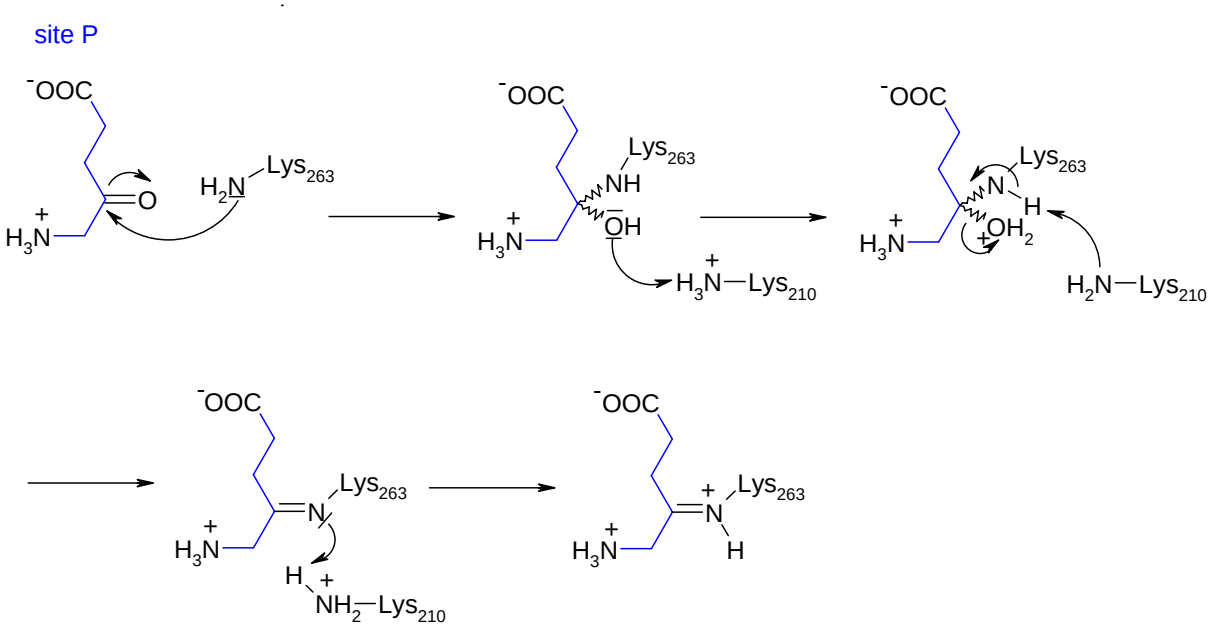


Figure 33 : Formation de la base de Schiff entre le premier substrat et la Lys263 dans le site P

L'étape suivante est la reconnaissance du deuxième substrat au site A de l'enzyme. Jaffe a postulé que cette étape nécessite la présence de l'ion métallique zinc qui jouerait un rôle dans l'activation du substrat par coordination des fonctions amine et cétone de ALA **5** [50, 68]. Selon l'auteur cette liaison pourrait faciliter la formation de la deuxième base de Schiff si elle a lieu. Le zinc se coordine dans une géométrie tétraèdre à trois cystéines et à un quatrième ligand. Il semble donc impossible que les deux fonctions du substrat puissent se lier en même temps au zinc. De plus, ce zinc coordiné à trois cystéines, est un mauvais acide de Lewis et donc ne peut pas jouer son rôle d'activateur de la fonction cétone du substrat. Les études cinétiques ne sont pas en faveur de cette liaison substrat-ion métallique. En effet, les inhibiteurs testés comprenant un meilleur ligand pour le zinc que la fonction amine, sont en fait de mauvais inhibiteurs [97]. Et ceux qui présentent une fonction qui est un mauvais ligand pour le zinc et qui de plus, augmente le caractère électrophile de l'atome de carbone de la fonction cétone et donc diminue celui nucléophile de l'atome d'oxygène, sont de très bons inhibiteurs [97]. Il existe une seule structure aux rayons X en faveur d'une liaison avec l'ion métallique. Il s'agit de l'intermédiaire cyclique (formation des liaisons C-C et C-N entre deux molécules ALA **5**) trapé dans la PBGS de levure [90]. Dans cette structure, le groupe amino du site A de l'intermédiaire cyclique est lié au zinc. Cette découverte ne permet pas de dire si

le substrat naturel est lié à l'ion métallique dès sa reconnaissance au site A ou si cette liaison ne se fait qu'avec la formation de cet intermédiaire.

A ce stade de la recherche, les deux mécanismes sont possibles (Jordan I et Jordan II), car aucune preuve évidente ne nous permet de favoriser un des deux mécanismes.

Le premier mécanisme (Figure 34) est soutenu par les résultats des tests d'inhibitions des analogues d'intermédiaires qui sont en faveur de la formation initiale de la liaison C-N [88]. L'inhibiteur acide 4,7-dioxosébacique **22** serait donc considéré comme un analogue d'intermédiaire [45]. La formation de la liaison C-N se fait *via* une base de Schiff entre les deux molécules de substrats (étape I). La deuxième base de Schiff ainsi formée doit se transformer en une énamine pour rendre possible la formation de la deuxième liaison, la liaison C-C (étape III). La conformation exacte de l'intermédiaire requise pour activer la réaction du type aldol n'est pas connue. Il est possible que la déprotonation de l'atome de carbone en position 3 du substrat au site A se fasse avec l'aide de l'anion hydroxyde (B(1)) coordiné au zinc [44] (étape II). La déprotonation à l'aide de la base B(2) (étape A) permet ensuite l'élimination de la Lys263 (étape B). La Lys210 semble pouvoir jouer le rôle de B(2). La dernière déprotonation à l'aide de la Lys263 (étape C) permet de former le porphobilinogène **6** [88].

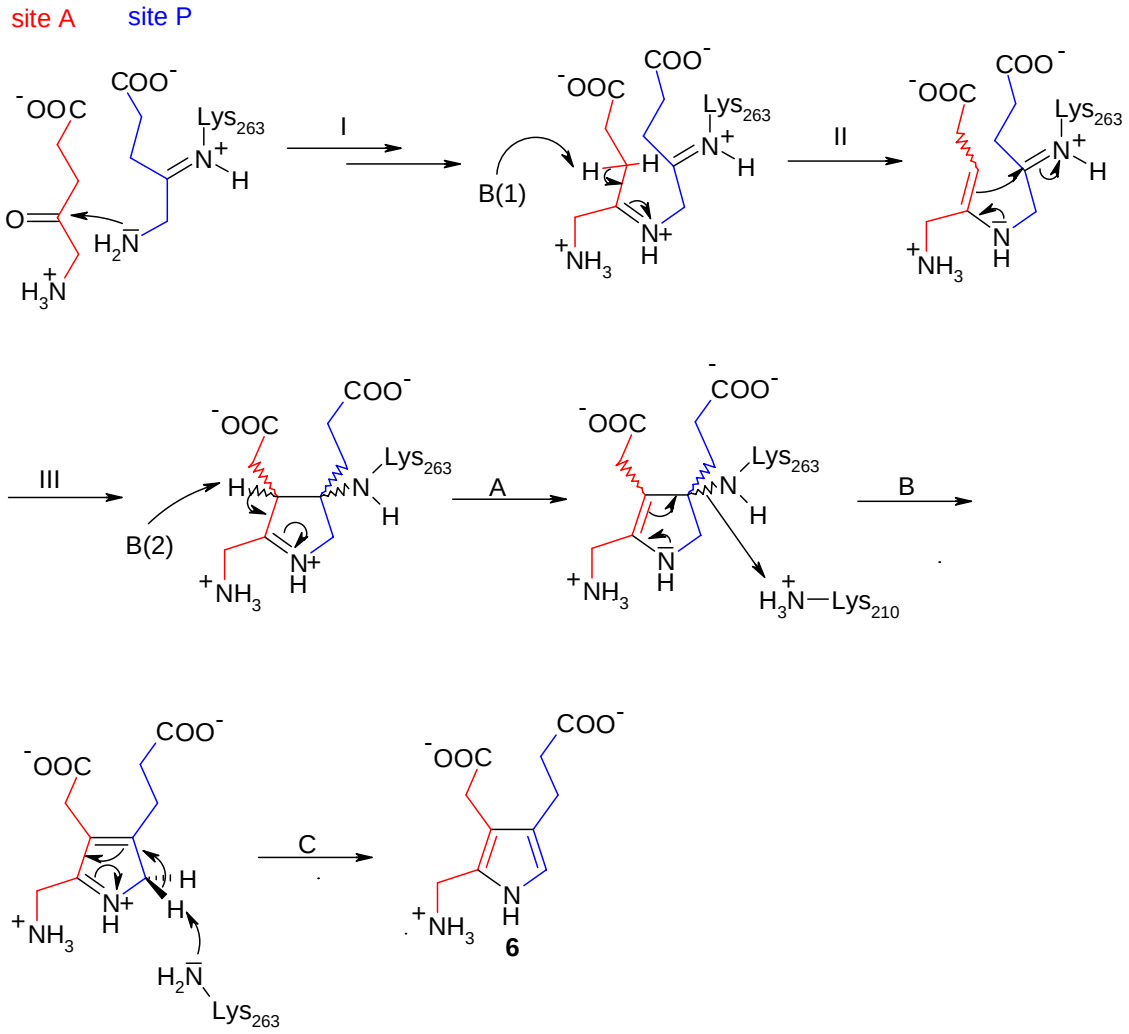


Figure 34 : Formation du PBG **6** *via* le mécanisme de Jordan I

Le second mécanisme (Figure 35) fait intervenir la formation initiale de la liaison C-C. Le second substrat forme une base de Schiff avec la lysine (Lys210) du site A, ce qui est en accord avec les structures aux rayons X de la PBGS complexée avec l'acide 4,7-dioxosébacique **22** et l'acide 5-fluorolévulinique **18** [45, 46]. Dans ce cas, l'acide 4,7-dioxosébacique **22** serait considéré comme un analogue de bisubstrat et non comme un analogue d'intermédiaire. L'arrangement conformationnel des deux ligands acide 5-fluorolévulinique **18** suggère que dans le site P, le substrat est lié via un iminium, alors que dans le site A, les changements d'hybridation de l'azote et du carbone en α de la base de Schiff pour constituer la forme énamine est facilitée [46]. Cette complémentarité des centres réactifs est en faveur de la formation de la liaison C-C (étape V). La transformation de l'iminium en énamine au site A nécessite une déprotonation du carbone en position 3 du substrat (étape IV). Cette déprotonation (B(3)) peut se réaliser soit grâce à la fonction carboxylate en position 1 de ce même substrat soit à l'ion hydroxyde coordiné au zinc [79]. De plus, les deux bases de Schiff sont parallèles (ce qui n'est pas illustré sur la figure par commodité d'écriture) et cette situation favorise une réaction du type aldol. La formation de la liaison C-C est électroniquement favorable [81] et suit les angles d'attaque de Bürgi-Dunitz

ainsi que les règles de Baldwin pour la fermeture du cycle à cinq chaînons [98], ce qui n'est pas le cas pour le premier mécanisme proposé.

L'étape suivante est la formation de la base de Schiff entre les deux substrats (étape VI) par l'attaque du groupe amino du substrat naturel au site P. La fermeture du cycle est suivie par la libération de la Lys210 (étape VII). La déprotonation à l'aide de B(4), qui peut être la Lys210, permet la libération de la deuxième lysine (Lys263) qui, par une dernière déprotonation permet la formation du PBG **6** (étapes A à C).

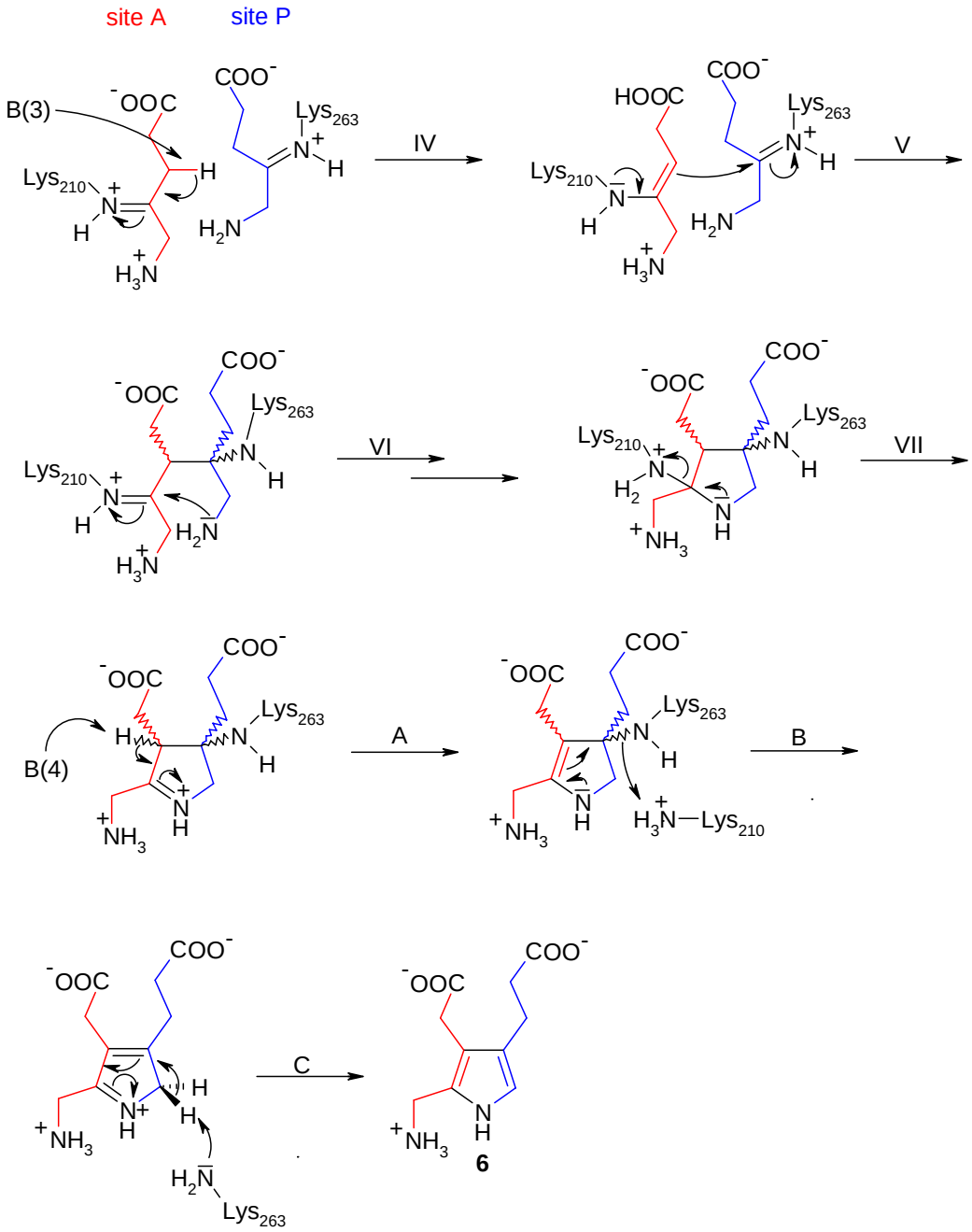


Figure 35 : Formation du PBG **6** *via* le mécanisme de Jordan II

Quel que soit le mécanisme, on observe durant les réactions un changement d'hybridation significatif, particulièrement pour la position 3 du substrat du site A. Pour permettre cela, les études faites sur les complexes entre l'enzyme et les acides 4- et 4,7-(di)oxosébaciques **20** et **22** respectivement, montrent que la chaîne acétyle acquiert suffisamment de mobilité au cours des différentes étapes [87]. Un autre point semblable aux deux mécanismes est la déprotonation, apparemment possible grâce à la Lys210 (B(2) ou B(4)) dans l'étape A qui permet de libérer la Lys263. Et la dernière étape (étape C) se réalise grâce à la Lys263, qui agit comme une base. Cette étape se fait sous contrôle stéréochimique et uniquement l'hydrogène *pro*-R est arraché [99]. Elle est extrêmement rapide et elle est déterminante thermodynamiquement pour la formation du PBG **6**.

5 Etudes d'inhibition

5.1 Cinétique enzymatique

5.1.1 L'équation de Michaelis-Menten

Le terme de cinétique enzymatique implique l'étude de la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme ainsi que les différents facteurs qui affectent celle-ci. Pour les cas simplifiés, on suppose que l'enzyme n'a pas de caractéristique spéciale (pas de propriété allostérique) et qu'elle ne convertit qu'un substrat en produit. Les systèmes sont en réalité beaucoup plus complexes notamment les systèmes multi-substrats comme la PBGS.

Dans une réaction chimique non catalysée du premier ordre, la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la concentration en substrat et le graphique représentant la vitesse en fonction de la concentration en substrat aurait l'allure d'une ligne droite. Le même type de graphique dans le cas d'une réaction catalysée par une enzyme, n'est plus une ligne droite mais une hyperbole [100] (Figure 36).

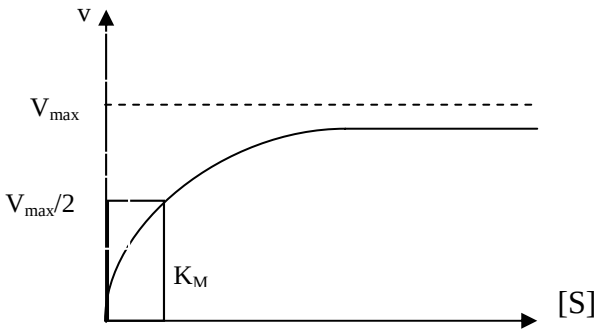


Figure 36: Profil de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration de substrat

Les premiers travaux portant sur cette hyperbole sont les fruits des recherches de Michaelis et Menten [101] ainsi que ceux de Briggs et Haldane [102]. L'équation déduite de cette hyperbole s'appelle l'équation de Michaelis-Menten.

Michaelis et Menten postulent que la catalyse passe par la rapide et réversible formation d'un complexe enzyme-substrat. Ce complexe est ensuite lentement converti en produit avec régénération de l'enzyme ($k_{-1}>>k_2$) (Schéma 1).

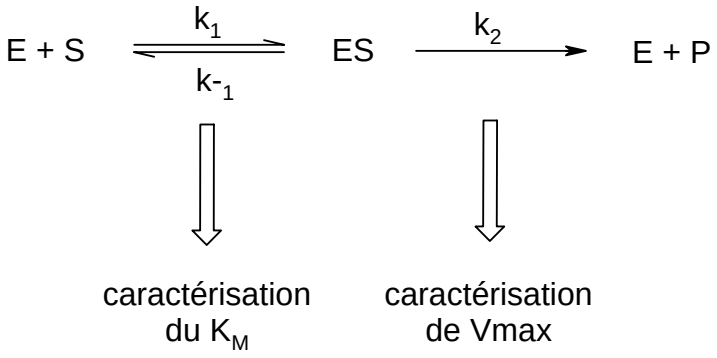


Schéma 1: Réaction enzymatique

Briggs et Haldane admettent un état stationnaire du complexe enzyme-substrat. La Figure 37 montre comment les diverses entités se comportent durant la réaction. Si on ne tient pas compte du début de la réaction, appelé phase transitoire qui a un temps de vie de quelques millisecondes, la concentration en complexe enzyme-substrat reste pratiquement constante jusqu'à ce que le substrat commence à manquer. La vitesse de formation du complexe enzyme-substrat doit être quasi égale à sa vitesse de dégradation.

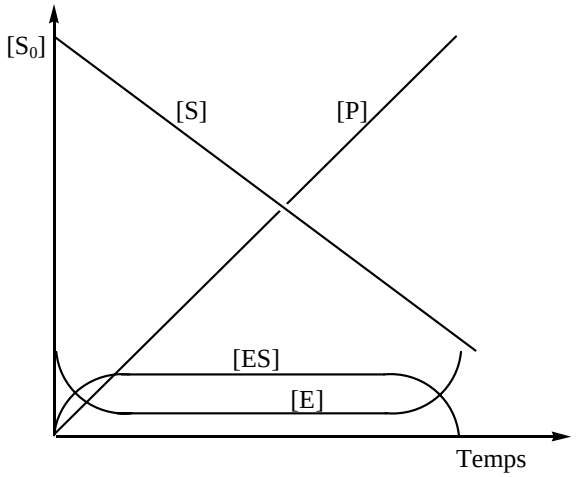


Figure 37 : Evolution des entités d'une réaction simple de Michaelis-Menten

L'équation de Michaelis-Menten se retrouve le plus couramment sous la forme suivante :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1) \qquad K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2)$$

si $k_2 << k_{-1}$, $K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$

$$V_{max} = \frac{k_2}{[E]_0} \quad (3)$$

$[E]_0$: concentration initiale en enzyme

Les deux variables de cette équation sont la vitesse de la réaction v, et la concentration en substrat [S]. V_{max} est la vitesse de réaction dans des conditions de concentration saturante en substrat. Dans ces conditions, chaque molécule d'enzyme aura un substrat fixé sur elle et interagira pour le convertir en produit le plus vite possible. La constante de Michaelis-Menten, K_M, décrit l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus K_M est grand, plus les liaisons entre l'enzyme et le substrat sont faibles, tandis que lorsque K_M est petit les liaisons sont fortes. k_2 (ou k_{cat}) est appelée «turnover number» et exprime le nombre maximal de molécules de substrat convertit en produit par une molécule d'enzyme dans une unité de temps, quand l'enzyme est complètement saturée en substrat.

5.1.2 Détermination des paramètres cinétiques

5.1.2.1 Utilisation du graphe Michaelis-Menten

Toutes les méthodes pour déterminer les paramètres cinétiques utilisent la même expérience de base qui consiste à mesurer la vitesse à différentes concentrations de substrat. La première méthode serait d'utiliser le graphe v en fonction de [S] mais il est très difficile de déterminer les valeurs de v, de V_{max} et de K_M directement à partir de l'hyperbole.

5.1.2.2 Utilisation du graphe de Lineweaver-Burk

La méthode de calcul la plus utilisée et la plus familière est celle connue sous le nom de Lineweaver-Burk ou de graphe de double réciproque [100]. C'est une simple conversion algébrique de l'équation de Michaelis-Menten qui donne l'expression suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (4)$$

Les paramètres cinétiques peuvent être directement déterminés à partir du graphe 1/v en fonction de 1/[S] qui est une droite de pente K_M/V_{max} (Figure 38).

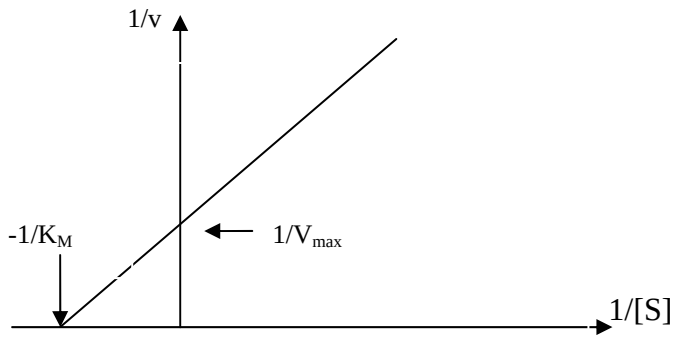


Figure 38 : Représentation graphique de l'équation de Lineweaver-Burk

5.1.2.3 Utilisation du graphe de Eadie-Hofstee

Tout comme le graphe de Lineweaver-Burk, cette technique de calcul est basée sur une conversion de celle de Michaelis-Menten et donne une équation linéaire [103].

$$v = V_{max} - \frac{v}{[S]} \cdot K_M \qquad (5)$$

Les variables sont v et v/[S], la droite résultante est de pente égale à K_M et coupe l'axe des ordonnées en V_{max}, ce qui fait que cette méthode est une lecture directe de V_{max} (Figure 39).

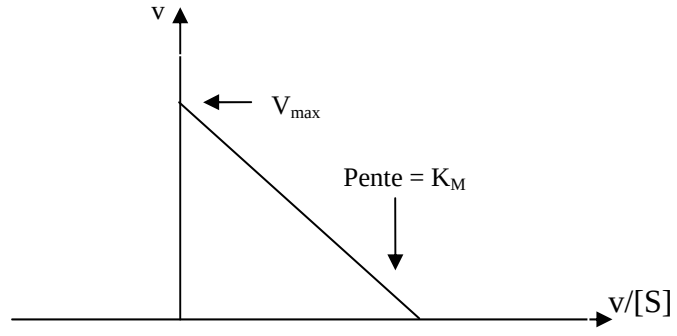


Figure 39 : Représentation graphique de l'équation de Eadie-Hofstee

5.1.2.4 Utilisation du graphe de Hanes

C'est encore une autre conversion de l'équation de Michaelis-Menten qui donne une nouvelle relation linéaire.

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot [S] + \frac{K_M}{V_{max}} \qquad (6)$$

En portant [S]/v en fonction de [S], on obtient une droite de pente $1/V_{max}$ (Figure 40).

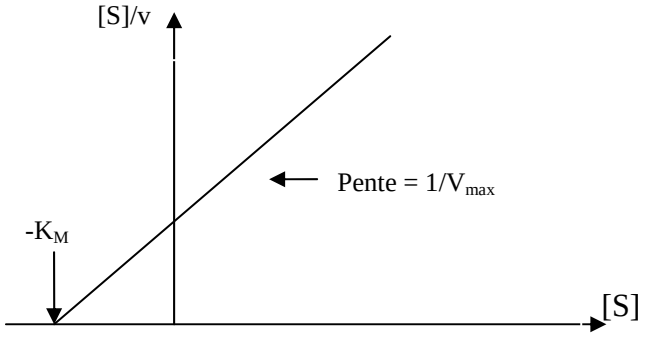


Figure 40 : Représentation graphique de l'équation de Hanes

5.1.3 Les inhibitions

Une des utilisations des analyses cinétiques est l'étude d'inhibiteurs enzymatiques. Les inhibiteurs sont des composés qui interagissent avec les enzymes en influençant la liaison du substrat et donc la vitesse de la réaction et/ou le turnover de l'enzyme (c'est-à-dire le nombre de réactions enzymatiques qui ont lieu à chaque site actif par unité de temps). Ces inhibiteurs peuvent être soit déjà présents dans la cellule et permettent ainsi de contrôler la vitesse des réactions métaboliques, soit être introduits artificiellement dans la cellule afin de servir d'outils pour l'étude des réactions enzymatiques. De nombreux inhibiteurs sont toxiques, car justement ils rendent inactifs des enzymes vitales pour l'organisme. Ces substances sont spécifiques à des organismes individuels ou à des groupes d'organismes et peuvent être utilisées comme antibiotique, pesticide, herbicide, etc.

Les inhibiteurs peuvent agir de plusieurs façons avec l'enzyme et la cinétique enzymatique est un outil important pour différencier ces divers mécanismes.

5.1.3.1 L'inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif est un composé possédant une analogie structurale et chimique élevée par rapport au substrat naturel de l'enzyme. A cause de cette ressemblance, l'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme un substrat potentiel et se lie à lui. Comme le substrat et l'inhibiteur ne sont pas identiques, l'enzyme ne peut pas convertir l'inhibiteur en produit et

donc la réaction est bloquée. Dans ce cas, on dit que le substrat naturel et l'inhibiteur sont mutuellement exclusifs, car ils ne peuvent pas se lier en même temps au site actif (Schéma 2).

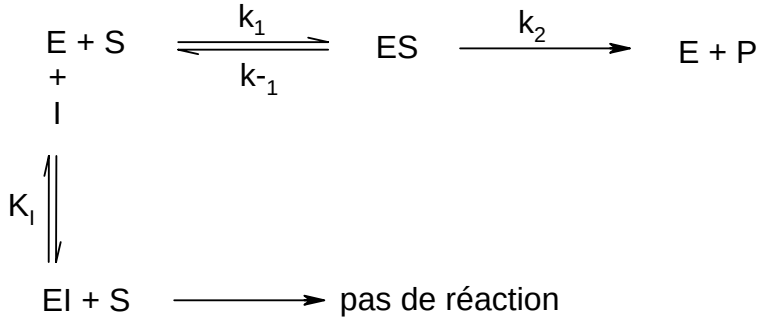


Schéma 2 : Inhibition compétitive

L'addition d'un inhibiteur compétitif favorise la dissociation du complexe ES et augmente donc la valeur de la constante de Michaelis-Menten. L'inhibition compétitive dépend donc des concentrations en substrat et en inhibiteur mais surtout des affinités respectives de l'enzyme pour le substrat et l'inhibiteur. La constante caractérisant l'inhibition est appelée constante d'inhibition, K_I :

$$K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \qquad (7)$$

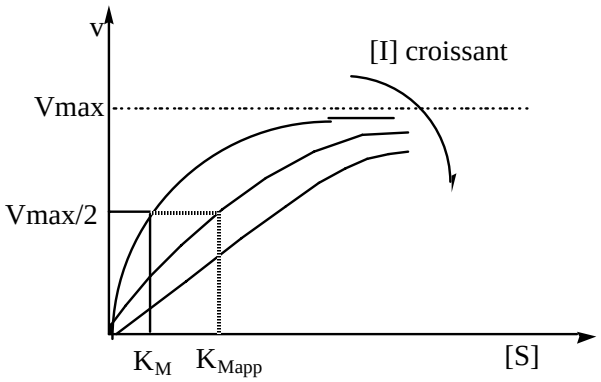


Figure 41 : Représentation graphique de v en fonction de [S] en présence de diverses concentrations d'un inhibiteur compétitif

La vitesse de la réaction doit être modifiée afin de tenir compte de l'inhibition :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \qquad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \qquad (8)$$

La visualisation du graphique (Figure 41) représentant la vitesse en fonction de la concentration en substrat montre qu'à de fortes concentrations en substrat, l'effet de l'inhibiteur est négligeable et que la vitesse V_{max} reste inchangée. Par contre, en calculant la valeur du K_M apparent (K_{Mapp}) à partir de $V_{max}/2$, il est clair que la valeur de la nouvelle constante de Michaelis-Menten augmente. Ces deux tendances sont les caractéristiques d'une inhibition compétitive.

A partir de l'équation (8) il est possible d'obtenir l'équation de Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive et les graphes qui en découlent (Figure 42) :

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha \cdot K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (9)$$

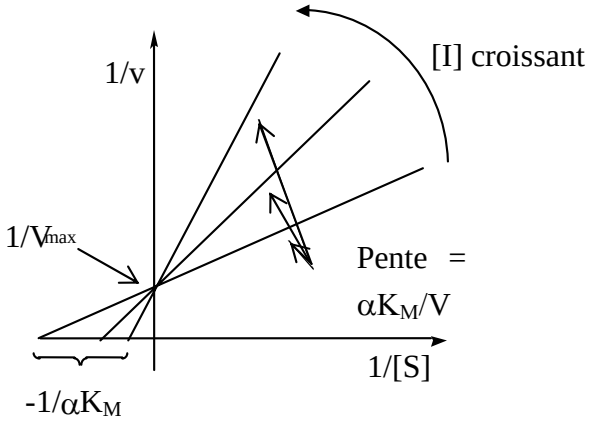


Figure 42 : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour l'utilisation d'un inhibiteur compétitif

En reportant la concentration en inhibiteur en fonction de K_{Mapp}, une lecture directe de la constante d'inhibition, K_I, est possible sur l'ordonnée. En effet, la constante K_{Mapp} est une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur pour une inhibition compétitive [104] :

$$K_{Mapp} = \frac{K_M}{K_I} \cdot [I] + K_M \qquad (10)$$

5.1.3.2 L'inhibition incompétitive

Un inhibiteur incompétitif se lie généralement uniquement au complexe enzyme-substrat et ne se lie donc pas à l'enzyme libre. L'inhibition incompétitive peut se dérouler de deux manières : la fixation du substrat peut causer un changement conformationnel de l'enzyme et révéler ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur ou l'inhibiteur peut se fixer directement sur le

complexe enzyme-substrat. Une fois que l'inhibiteur est lié à l'enzyme, cette dernière ne peut plus transformer le substrat en produit (Schéma 3).

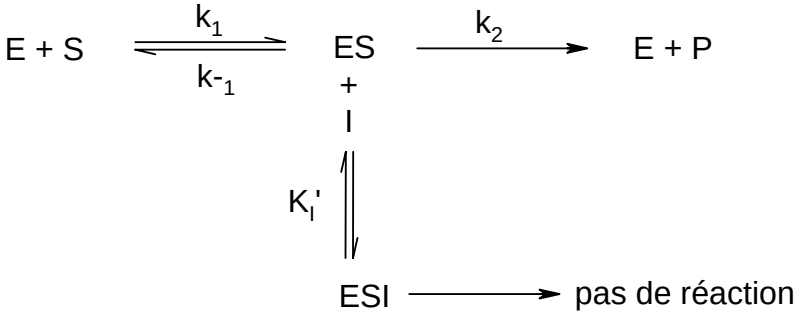


Schéma 3 : Inhibition incompétitive

La constante d'inhibition devient :

$$K_I' = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]} \qquad (11)$$

L'équation de Michaelis-Menten pour une inhibition incompétitive devient:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right) + K_M} \qquad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'} \qquad (12)$$

Contrairement à une inhibition compétitive, les effets de l'inhibition incompétitive ne sont pas annulés par des concentrations élevées en substrat. Pour ce type d'inhibition, autant K_M que V_{max} sont affectés par la présence de l'inhibiteur.

A partir de l'équation (12), il est possible d'obtenir l'équation de Lineweaver-Burk pour une inhibition incompétitive. En effectuant une série de graphiques du type Lineweaver-Burk, des droites parallèles sont obtenues (Figure 43).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}} \qquad (13)$$

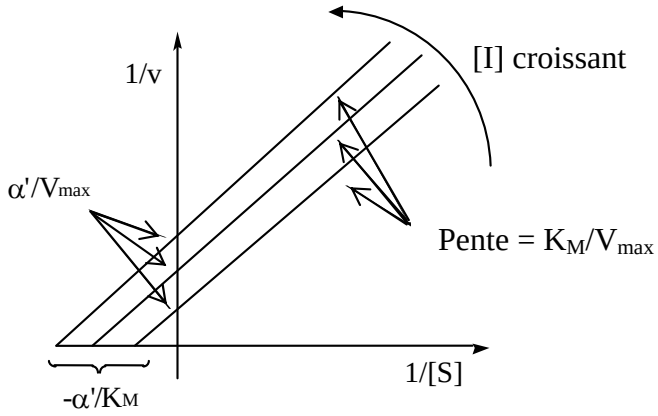


Figure 43 : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour l'utilisation d'un inhibiteur incompétitf

En reportant la concentration en inhibiteur en fonction de $1/K_{Mapp}$, une lecture directe de la constante d'inhibition, K_I, est possible sur l'ordonnée. En effet, la constante $1/K_{Mapp}$ est une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur pour une inhibition incompétitive [104] :

$$\frac{1}{K_{Mapp}} = \frac{1}{K_M \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{1}{K_M} \qquad (14)$$

Ce type d'inhibition est assez rare pour une enzyme à un seul substrat. En effet si un inhibiteur montre de fortes affinités pour le complexe enzyme-substrat, il serait fort étonnant qu'il n'interagisse pas avec l'enzyme libre. Cette inhibition est par contre fréquente pour des enzymes multi-substrats. L'inhibition incompétitive peut être considérée comme un cas limite de l'inhibition mixte.

5.1.3.3 L'inhibition mixte

Si l'inhibiteur se lie aussi bien à l'enzyme libre qu'au complexe enzyme-substrat, on parle alors d'une inhibition mixte. Dans ce cas, on admet que la liaison avec l'inhibiteur soit dans les deux cas réversibles (Schéma 4).

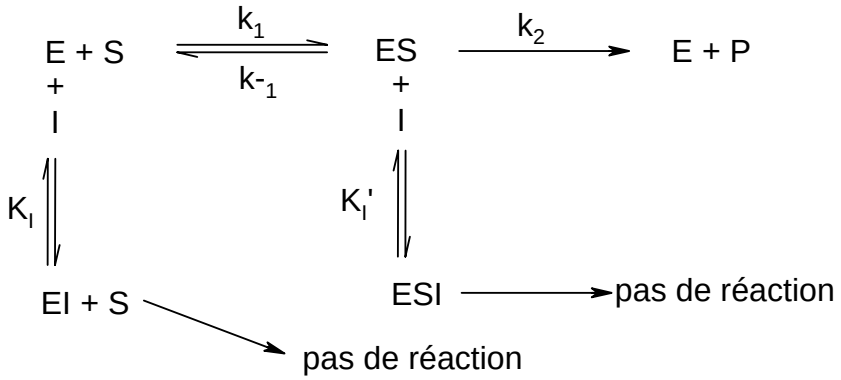


Schéma 4 : Inhibition mixte

Les constantes de Michaelis-Menten sont les suivantes :

$$K_I = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]} \qquad (15)$$

et

$$K_I' = \frac{[ES]\cdot[I]}{[ESI]} \qquad (16)$$

L'équation de Michaelis-Menten pour l'inhibition mixte devient :

$$v = \frac{V_{max}\cdot[S]}{\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)\cdot K_M + \left(1+\frac{[I]}{K_I'}\right)\cdot[S]} \qquad \alpha = 1+\frac{[I]}{K_I},\ \alpha' = 1+\frac{[I]}{K_I'} \qquad (17)$$

A partir de l'équation (17) il est possible d'obtenir l'équation de Lineweaver-Burk pour une inhibition mixte et les graphes qui en découlent (Figure 44).

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha\cdot K_M}{V_{max}}\cdot\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}} \qquad (18)$$

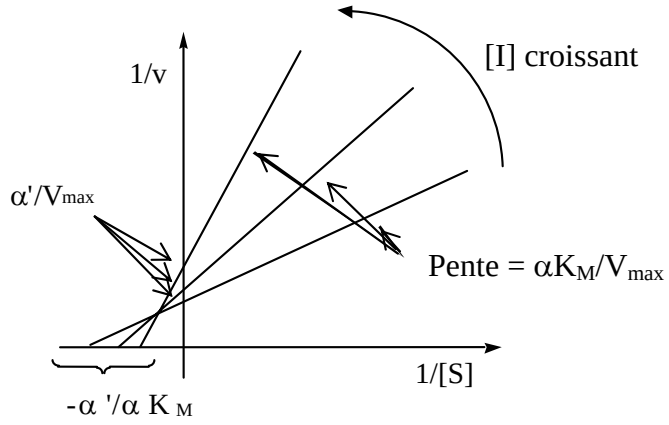


Figure 44 : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour l'utilisation d'un inhibiteur mixte

En reportant la concentration en inhibiteur en fonction de $K_{Mapp}/V_{max'}$ ($V_{max'}$ étant la vitesse maximale pour chaque concentration en inhibiteur), une lecture directe de la constante d'inhibition, K_I, est possible sur l'ordonnée. En effet, le rapport $K_{Mapp}/V_{max'}$ est une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur pour une inhibition mixte [104]:

$$\frac{K_{Mapp}}{V_{max'}} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot K_I} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{max}} \qquad (19)$$

De la même manière $K_{I'}$ peut être déterminé de manière directe en reportant la concentration en inhibiteur en fonction de 1/Vmax :

$$\frac{1}{V_{max'}} = \frac{1}{V_{max} \cdot K_{I'}} \cdot [I] + \frac{1}{V_{max}} \qquad (20)$$

5.1.3.4 L'inhibition non-compétitive

Un inhibiteur non-compétitif se lie de manière réversible ailleurs qu'au site actif de l'enzyme et n'en empêche pas l'accès (Schéma 5). Les inhibiteurs non-compétitifs sont des effecteurs allostériques puisqu'ils agissent ailleurs que sur le site actif.

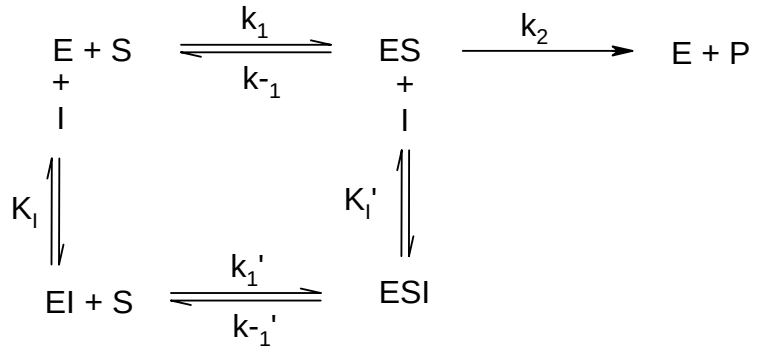


Schéma 5 : Inhibition non-compétitive

Dans le cas particulier où la fixation de l'inhibiteur ne modifie pas la fixation du substrat (K_I=K_I' et k_1=k_1'), l'inhibiteur diminue la concentration de l'enzyme sans modifier la répartition entre enzyme libre et lié. La constante d'inhibition reste constante, mais il y a perte apparente de concentration d'enzyme, donc réduction de V_{max}. L'inhibiteur est alors qualifié de «non-compétitif pur» (Figure 45).

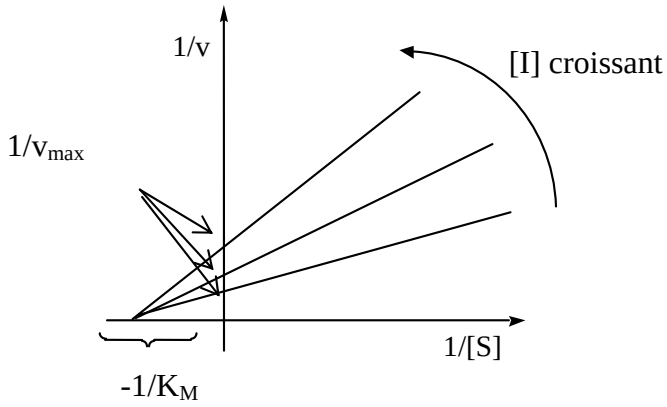


Figure 45 : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour l'utilisation d'un inhibiteur non-compétitif pur

Pour les cas plus généraux où la fixation de l'inhibiteur modifie la fixation du substrat (K_I > ou < K_I' et k_1 > ou < k_1'), les droites se croisent ailleurs que sur un axe. La position de ce point d'intersection est donc importante pour déterminer le type d'inhibition.

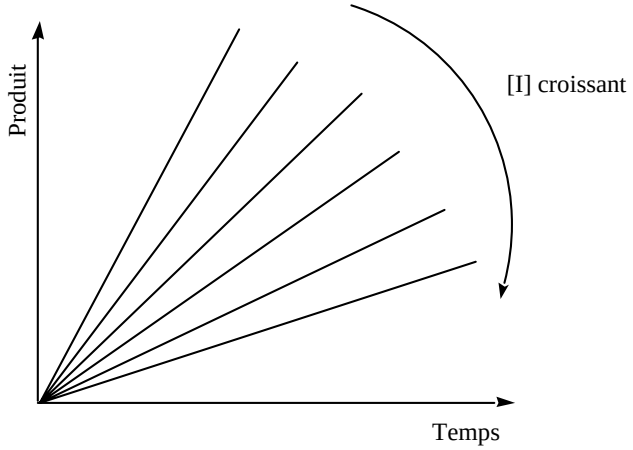
5.1.4 Les inhibitions dépendantes du temps

Toutes les inhibitions décrites jusqu'à maintenant se réalisent grâce à des inhibiteurs réversibles qui établissent rapidement l'équilibre entre l'enzyme et l'inhibiteur. Elles ne dépendent pas du temps.

Il y a déjà plus de cinquante ans que Easson et Stedman [105] ont fait mention pour la première fois d'un type d'inhibiteur qui n'obéissait pas aux lois de cinétique utilisées pour les inhibiteurs réversibles rapides. Ces inhibiteurs établissent l'équilibre entre l'enzyme et l'inhibiteur de manière lente et ont donc été appelés «inhibiteurs dépendants du temps» par Morrison [106] et Cha [107] qui ont été les premiers à étudier leur cinétique. Au contraire d'une inhibition réversible qui établit rapidement l'équilibre entre l'inhibiteur et l'enzyme, une inhibition dépendante du temps est progressive jusqu'à ce que tout l'inhibiteur ou toute l'enzyme soit transformé en un complexe enzyme-inhibiteur.

Pour illustrer graphiquement l'inhibition dépendante du temps, on peut comparer les effets d'un inhibiteur classique par rapport à un inhibiteur dépendant du temps sur la formation du produit en fonction du temps (Figure 46). Pour un inhibiteur classique, la vitesse de réaction reste linéaire sur une période pendant laquelle il y a suffisamment de substrat. Pendant les premières millisecondes, les courbes décrivant la vitesse de réaction en présence d'un inhibiteur dépendant du temps, sont identiques à celles d'un inhibiteur classique. Au départ, il y a donc une formation de produit quasi identique à celle de la réaction enzymatique normale. Cette période est suivie par une étape où une vitesse d'état quasi-stationnaire plus lente s'installe. Celle-ci diminue quand la concentration en inhibiteur augmente [108]. Si la vitesse de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur est tellement lente voir négligeable, on parle d'inhibition irréversible.

a)



b)

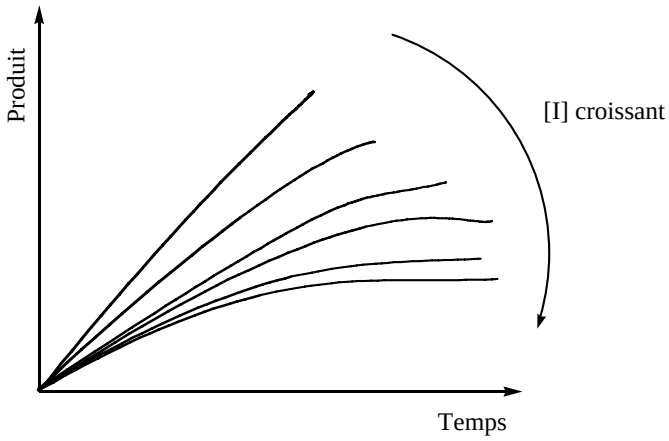


Figure 46 : Courbes comparant l'effet a) d'un inhibiteur classique et b) d'un inhibiteur dépendant du temps sur la formation du produit de la réaction enzymatique

Il existe quatre types différents d'inhibiteurs dépendant du temps. Une manière de classer des substances en équilibre avec l'enzyme, par rapport à la concentration totale de l'inhibiteur ($[I]_{tot}$) et de l'enzyme ($[E]_{tot}$) a été donnée par Morrison et Walsh [108] (Tableau 2).

	Caractéristiques	
Classe d'inhibiteur	**Rapport $[I]_{tot}/[E]_{tot}$**	**Etablissement de l'équilibre** $E + I \rightleftharpoons EI$
fast binder	$[I]_{tot} >> [E]_{tot}$	rapide
tight binding, irréversible	$[I]_{tot} \cong [E]_{tot}$	rapide
slow binding	$[I]_{tot} >> [E]_{tot}$	lent
slow, tight binding	$[I]_{tot} \cong [E]_{tot}$	lent

Tableau 2 : Classification des différents inhibiteurs

5.1.4.1 L'inhibition slow-binding

Un inhibiteur slow-binding est un inhibiteur réversible qui établit l'équilibre enzyme-inhibiteur lentement. De faibles valeurs sont donc observées pour les constantes de vitesse (Schéma 6).

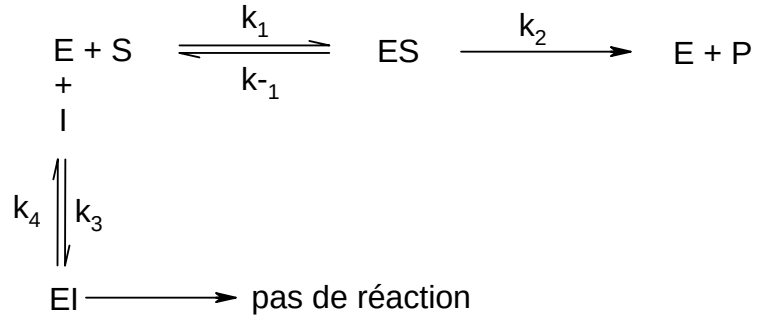


Schéma 6 : Inhibition slow-binding

La constante d'inhibition est la même que pour un inhibiteur classique, rapidement réversible :

$$K_I = \frac{k_4}{k_3} = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]} \qquad (21)$$

5.1.4.2 L'inhibition slow, tight binding

Morrison et Walsh [108] ont montré que lorsque K_I est petit et que la concentration de l'inhibiteur varie dans le domaine de la constante d'inhibition ($K_I \approx [I]$), les valeurs des constantes de vitesse k_3 et k_4 sont petites. Dans ces conditions, l'attaque d'un inhibiteur sera lente. Un tel inhibiteur est appelé inhibiteur slow, tight binding (Schéma 7).

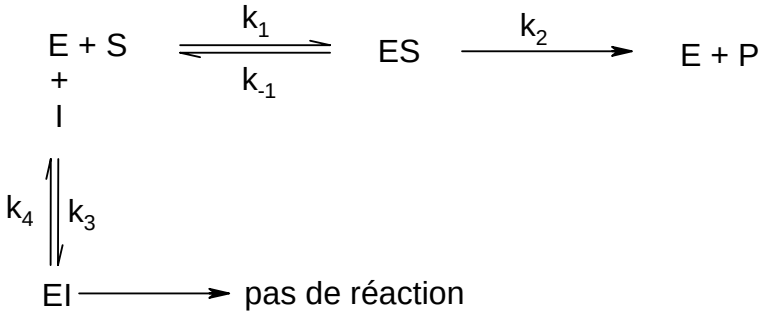


Schéma 7 : Inhibition slow, tight binding

La constante d'inhibition doit prendre en compte la diminution de la concentration de l'enzyme libre et de l'inhibiteur libre :

$$K_I = \frac{([E] - [EI]) \cdot ([I] - [EI])}{[EI]} \qquad (22)$$

5.1.4.3 L'inhibition tight binding

Un inhibiteur tight binding forme dans un premier temps un rapide complexe EI. La liaison de l'inhibiteur sur l'enzyme induit une transition conformationelle ou une isomérisation qui forme lentement un deuxième complexe EI* (Schéma 8). Dans ce cas, il ne faut pas seulement avoir une lente conversion de EI en EI*, mais il faut aussi que la vitesse d'isomérisation inverse (k_6) soit bien inférieure à la vitesse d'isomérisation (k_5).

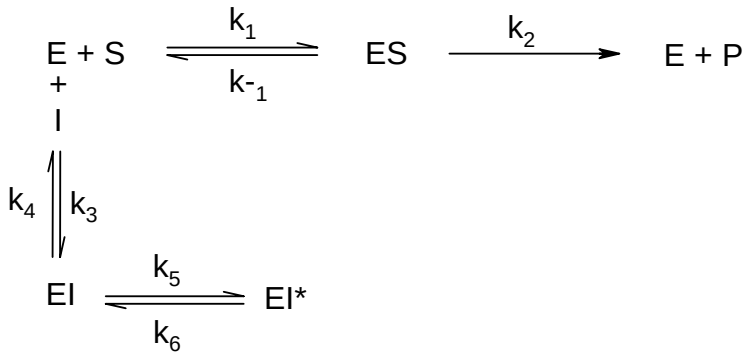


Schéma 8 : Inhibition tight binding

En plus de la constante de dissociation du complexe initiale, qui est toujours donnée par la même relation, il faut tenir compte d'une deuxième constante de dissociation pour la formation du second complexe.

$$K_I = \frac{k_4}{k_3} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \qquad (23)$$

et

$$K_I^* = \frac{K_I \cdot k_6}{k_5 + k_6} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI] + [EI^*]} \qquad (24)$$

5.1.4.4 L'inhibition irréversible

Un inhibiteur irréversible se lie au site actif de l'enzyme via une réaction irréversible et dès lors cet inhibiteur ne peut plus être dissocié de l'enzyme (Schéma 9). Dans ces conditions la vitesse d'isomérisation inverse (k_6) est égale à zéro, ce qui n'était pas le cas pour les types d'inhibition décrits précédemment. Il y a formation d'une liaison forte et le plus souvent covalente.

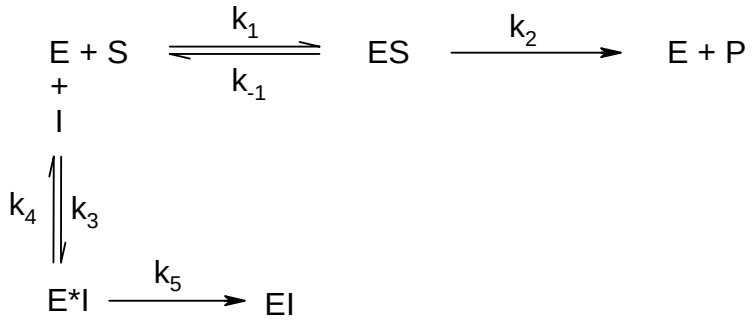


Schéma 9 : Inhibition irréversible

L'effet cinétique d'un inhibiteur irréversible consiste à réduire la concentration de l'enzyme active, et donc de diminuer la concentration du complexe ES. Etant donné que généralement l'étape déterminante pour la vitesse est celle transformant le complexe ES en E+P avec une vitesse k_2, il est clair qu'en diminuant la concentration de l'enzyme, on va observer un ralentissement de la vitesse de la réaction globale.

Si du substrat est ajouté, une fois la réaction complétée entre l'inhibiteur et l'enzyme, le système obtenu va de nouveau obéir aux lois de Michaelis-Menten. La valeur du K_M va donc être identique, mais on observera un V'_{max} plus petit (ceci est valable si l'inhibiteur n'est pas en excès) :

$$\text{En absence d'un inhibiteur : } V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0 \qquad (25)$$

$$\text{En présence d'un inhibiteur : } V'_{max} = k_{cat} \cdot ([E]_0 - [E]) \qquad (26)$$

Afin de différencier un inhibiteur irréversible d'un inhibiteur tight binding avec un k_6 très faible, il faut déterminer si l'activité de l'enzyme peut être retrouvée après une dialyse. Une dialyse permet d'éliminer un inhibiteur réversible de la solution enzymatique.

Les inhibiteurs irréversibles sont usuellement considérés comme des poisons et sont donc inadéquats pour des buts thérapeutiques. Par contre, ils sont fort utiles pour les études du site actif des enzymes. En effet, vu qu'un inhibiteur irréversible se lie fortement au site actif, il peut servir de marqueur et permettre l'identification d'acides aminés importants.

5.1.5 Cinétique des inhibiteurs dépendants du temps [109]

5.1.5.1 Détermination de la constante d'inhibition

Si la vitesse de la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme est faible comparé à la vitesse de la réaction non inhibée, l'étude cinétique consiste à mesurer la vitesse de formation du produit, à différentes concentrations d'inhibiteurs et pour différents temps de préincubation. Essentiellement, l'enzyme est préincubée avec l'inhibiteur à des temps différents avant que la vitesse de formation du produit ne soit mesurée. Dans ces conditions, pour des concentrations fixes en inhibiteur, la vitesse diminue exponentiellement en fonction du temps.

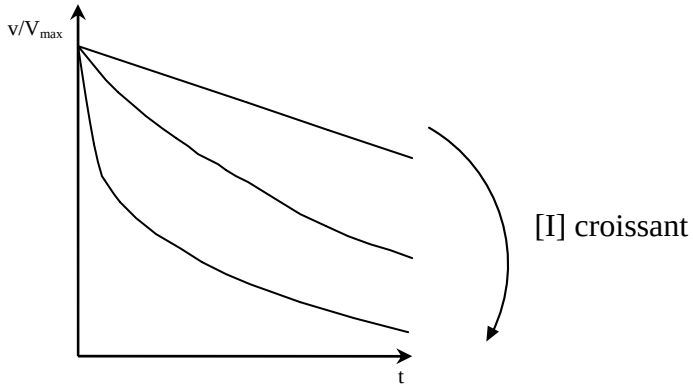


Figure 47 : Profil de la vitesse en fonction du temps pour différentes concentrations en inhibiteur

La vitesse peut est exprimée à l'aide de k_{obs} qui représente la constante de vitesse apparente de premier ordre :

$$\frac{v}{V_{max}} = \exp(-k_{obs} \cdot t) \qquad (27)$$

En représentant k_{obs} en fonction des différentes concentrations en inhibiteur, il est possible de faire la distinction entre les quatre types d'inhibiteurs dépendants du temps.

5.1.5.2 K_I pour un inhibiteur slow-binding et slow, tight binding

Pour un inhibiteur slow-binding et slow, tight binding la relation entre k_{obs} et la concentration en inhibiteur est donnée par la relation suivante :

$$k_{obs} = k_4 \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{Iapp}}\right) \qquad (28)$$

où
K_{Iapp} (K_I apparent) : est relié au vrai K_I par différentes fonctions dépendantes du mode d'inhibition.

Le graphe de k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur donne une droite de pente égale k_4/K_{Iapp} et qui coupe l'axe des ordonnées en k_4 (Figure 48).

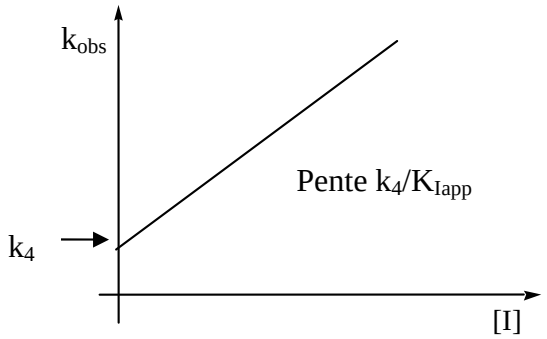


Figure 48 : Détermination de K_I pour un inhibiteur slow-binding et slow, tight binding

5.1.5.3 K_I pour un inhibiteur tight binding

Pour un inhibiteur tight binding la relation entre k_{obs} et la concentration en inhibiteur est donnée par la relation suivante :

$$k_{obs} = k_6 + \left(\frac{k_5 \cdot [I]}{K_{Iapp} + [I]} \right) \qquad (29)$$

L'équation peut aussi être écrite de la manière suivante :

$$k_{obs} = k_6 \left(\frac{1 + \frac{[I]}{K^*_{Iapp}}}{1 + \frac{[I]}{K_{Iapp}}} \right) \qquad (30)$$

Le graphe de k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur donne une hyperbole (Figure 49). En ajustant une courbe non linéaire au valeurs obtenues à partir de la deuxième équation, les valeurs de k_6, K_{Iapp} et K^*_{Iapp} peuvent être déterminées.

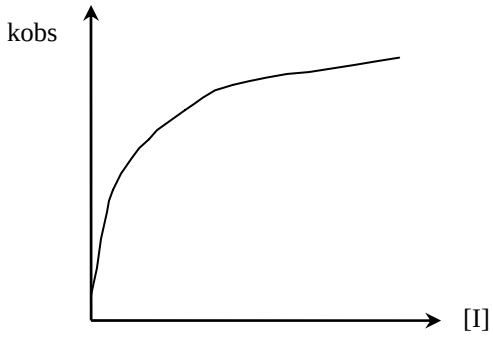


Figure 49 : Détermination de K_I pour un inhibiteur tight binding

5.1.5.4 K_I pour un inhibiteur irréversible

Pour un inhibiteur irréversible la relation entre k_{obs} et la concentration en inhibiteur est donnée par la relation suivante :

$$k_{obs} = \frac{k_5 \cdot [I]}{K_{Iapp} + [I]} \qquad (31)$$

Le graphe de k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur donne à nouveau une hyperbole, mais cette dernière passe par l'origine (ce qui reflète $k_6 = 0$).

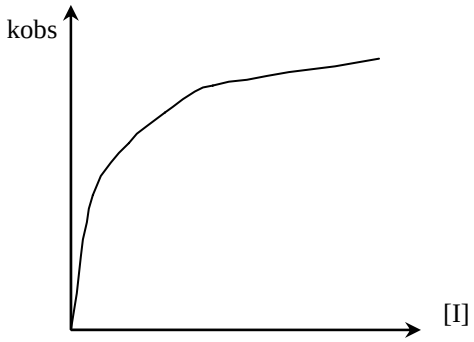


Figure 50 : Détermination de K_I pour un inhibiteur irréversible

Pour un inhibiteur irréversible, le retour à l'enzyme libre et à l'inhibiteur libre à partir du complexe enzyme-inhibiteur est perturbé par l'étape d'irréversibilité qui s'ensuit. C'est pour cette raison que le terme K_{Iapp} de l'équation (31) ne représente plus la constante de dissociation, mais représente la concentration apparente nécessaire pour obtenir la moitié de

l'inactivation de l'enzyme. De la même manière k_5 est, dans cette équation, la vitesse maximum d'inactivation de l'enzyme. Le graphe de la double-réciproque de $1/k_{obs}$ en fonction de 1/[I] nous fournit une droite.

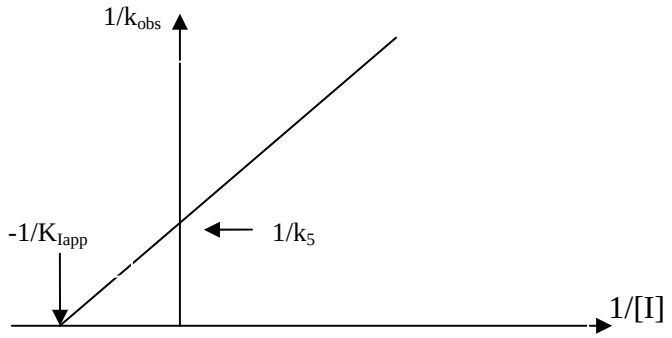


Figure 51 : Double réciproque pour un inhibiteur irréversible

La plupart de inhibiteurs irréversibles se lient à l'enzyme de manière réversible (représenté par K_{Iapp}) avant l'étape lente d'inactivation (représenté par k_5) (Schéma 9). Si la vitesse de formation du complexe réversible entre l'enzyme et l'inhibiteur est cinétiquement insignifiante comparée à la vitesse d'inactivation, le graphe de la double réciproque passe par l'origine, reflétant ainsi une inactivation à une seule étape (Schéma 10).

$$E + I \xrightarrow{k_5 = k_{inactivation}} EI$$

Schéma 10 : Inactivation de l'enzyme en une seule étape

5.1.5.5 Détermination du type d'inhibition

Morrison [110] a déclaré que la plupart des inhibiteurs dépendants du temps sont des inhibiteurs compétitifs, se liant donc au site actif de l'enzyme. Néanmoins il est possible, en principe au moins pour les inhibiteurs slow-binding, d'interagir avec l'enzyme de manière compétitive, incompétitive, non-compétitive ou mixte. Afin de déterminer le type d'inhibition, il faut étudier l'influence de différentes concentrations en substrat pour une concentration fixe en inhibiteur en fonction du temps (Figure 52).

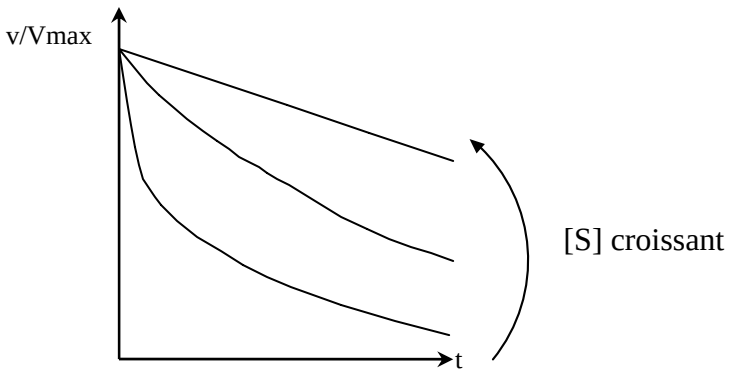


Figure 52 : Profil de la vitesse en fonction du temps pour différentes concentrations en substrat

k_{obs} peut à nouveau être déterminé par l'équation de la vitesse :

$$\frac{v}{V_{max}} = \exp(-k_{obs} \cdot t) \qquad (27)$$

Tian et Tsou [111] ont déterminé les relations entre k_{obs} et la concentration en substrat pour des inhibiteurs compétitifs, non-compétitifs et incompétitifs. Ces relations sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 3).

Type d'inhibition	**Equation reliant k_{obs} et [S]**
Compétitif	$k_{obs} = \frac{k}{1+\frac{[S]}{K_M}}$ (32) k est une valeur empirique
Non-compétitif	$k_{obs} = k$ (33)
Incompétitif	$k_{obs} = \frac{k}{1+\frac{K_M}{[S]}}$ (34)

Tableau 3 : Equation reliant k_{obs} à [S] pour chaque type d'inhibition

Un inhibiteur compétitif slow binder montre une diminution de la valeur k_{obs} pour une augmentation de la concentration en substrat. Par contre, pour le cas d'un inhibiteur non-compétitif, la valeur de k_{obs} ne varie pas en fonction de la concentration en substrat, alors que pour un inhibiteur incompétitif la valeur de k_{obs} augmente lorsque la concentration en substrat augmente aussi. Ces relations entre k_{obs} et la concentration en substrat sont illustrées ci-dessous (Figure 53).

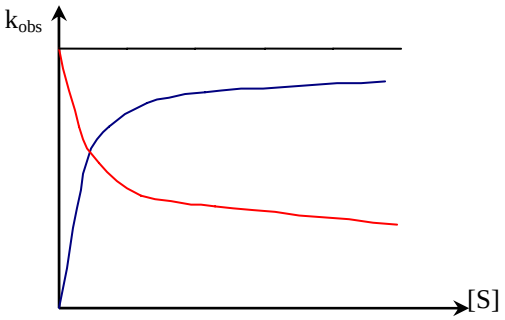


Figure 53 : Détermination du type d'inhibition pour un inhibiteur compétitif (rouge), non-compétitif (noir) et incompétitif (bleu)

5.2 La coopérativité

Une enzyme allostérique est formée de plusieurs sous-unités, chacune possédant un site actif dont la conformation spatiale est variable et change fréquemment. La zone de contact entre deux sous-unités correspond à un site régulateur où peuvent agir des molécules activatrices ou inhibitrices selon leur influence sur la conformation des sous-unités. La fixation d'une molécule de substrat ou d'un effecteur (activateur ou inhibiteur) sur une sous-unité facilite celle des autres molécules en augmentant leur affinité vis-à-vis du site actif vacant. C'est le principe de coopérativité. Dans une coopérativité positive, une molécule entraîne l'augmentation de l'affinité du site actif pour les autres molécules tandis que pour une coopérativité négative, la fixation de la première molécule diminue cette affinité. Lorsque les deux molécules sont semblables, il y a effet homotropique (l'effet hétérotropique concerne des molécules différentes).

Pour une réaction enzymatique «normale», sans coopérativité, le graphe de la vitesse en fonction de la concentration en substrat donne une hyperbole. Lorsqu'il y a coopérativité, le graphe est sigmoïdale (Figure 54). Pour des concentrations très faibles en substrat, l'augmentation de la concentration entraîne seulement une petite augmentation pour la vitesse.

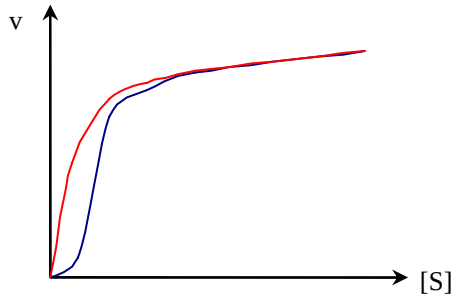


Figure 54 : Vitesse en fonction de la concentration en substrat sans coopérativité (rouge) et avec coopérativité (bleu)

L'hyperbole peut être exprimée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \qquad (1)$$

Tandis que la courbe sigmoïdale est exprimée par l'équation de Hill :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h} \qquad (35)$$

où
$K_{0.5}$: est la constante de Hill et représente la concentration en substrat à mi-saturation
h : est le coefficient de coopérativité

Lorsque h=1, il n'y a pas de coopérativité et l'équation (35) est la même que l'équation (1), donc la courbe représentant v = f([S]) est hyperbolique. Lorsque h>1, une coopérativité positive est observée et lorsque h<1 une coopérativité négative est observée (Figure 55). La coopérativité négative est beaucoup moins répandue que la coopérativité positive. Pour la coopérativité négative, l'enzyme est beaucoup moins sensible au changement de concentration de substrat et devient même indépendante de la concentration en substrat.

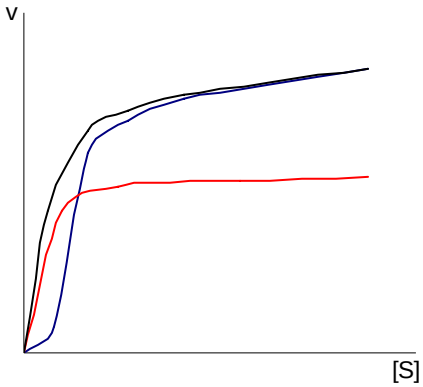


Figure 55 : Pas de coopérativité lorsque h=1 (noir), coopérativité positive lorsque h>1 (bleu) et coopérativité négative lorsque h<1 (rouge)

Les droites qui découlent de l'équation de Michaelis-Menten, tels que pour le graphe de Lineweaver-Burk, n'en sont plus dans le cas où la coopérativité existe.

Concernant les inhibitions dépendantes du temps, où l'équation de Michaelis-Menten ne peut pas être appliquée, la coopérativité peut aussi être considérée. Pour rappel, l'équation suivante permet de déterminer le K_I pour une inhibition *slow binder* :

$$k_{obs} = k_4 \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{Iapp}}\right) \qquad (28)$$

En tenant compte de la coopérativité, l'équation (27) devient :

$$k_{obs} = k_4 \cdot \left(1 + \left(\frac{[I]}{K_{Iapp}}\right)^h\right) \qquad (36)$$

Lors des différents tests enzymatiques effectués dans ce travail, les équations tenant compte de la coopérativité (35) et (36) ont été appliquées.

5.3 Cinétique de la PBGS

5.3.1 La PBGS : deux substrats identiques, un produit

La PBGS catalyse une réaction impliquant la condensation de deux substrats identiques. On serait donc en droit d'attendre une cinétique du second ordre. Pourtant les données expérimentales montrent assez clairement une cinétique de premier ordre, comme celle

décrite par les équations de Michaelis-Menten. La cinétique observée ne peut cependant pas s'expliquer aussi simplement par les lois de Michaelis-Menten qui sont relatives à une enzyme et à un substrat.

Les premiers à proposer des équations applicables à la PBGS furent Granick et Mauzerall en 1958 [112]. En se basant sur leurs études, deux schémas réactionnels doivent être considérés. Le premier décrit une première étape de dimérisation chimique entre les deux ALA **5** pour former une imine qui joue ensuite le rôle de substrat dans la réaction enzymatique (Schéma 11).

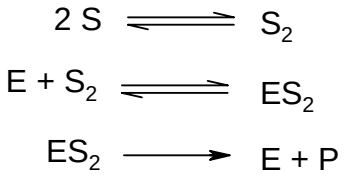


Schéma 11 : Premier schéma réactionnel proposé par Granick-Mauzerall

Cette première proposition a été abandonnée pour des raisons concernant notamment la vitesse de formation du dimère. Si cette étape de dimérisation est l'étape la plus lente, la concentration en enzyme n'aura aucun effet sur la vitesse de formation du produit. Si par contre cette dimérisation est spontanée et rapide, elle doit avoir lieu en présence de fortes concentrations en dimères S_2 pour ne pas présenter une cinétique du second ordre entre la vitesse et la concentration en substrat. Etant donné que cette dernière condition n'est pas remplie, puisque seules de faibles quantités en dimère ont été détectées, une deuxième solution fut développée.

Ce second schéma réactionnel propose la fixation d'un substrat puis celle d'un autre sur l'enzyme (Schéma 12).

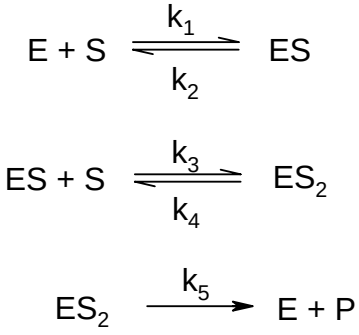


Schéma 12 : Deuxième schéma réactionnel proposé par Granick-Mauzerall

La formation du complexe ES_2 ne doit pas être l'étape déterminant la vitesse, sinon on observerait une cinétique de second ordre. Si c'était la formation du complexe ES qui était lente, alors la vitesse devrait être proportionnelle à la concentration du substrat, ce qui n'est

pas le cas, puisqu'elle tend vers une limite. Si la formation du produit P est l'étape déterminant la vitesse, alors la dissociation du complexe ES doit être plus lente que celle du complexe ES_2 de manière à pouvoir expliquer la cinétique observée. La vitesse initiale est décrite de la manière suivante :

$$v = \frac{k_5 \cdot [E]_0}{1 + \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1}\right] \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{k_2}{k_1} \cdot \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3}\right] \cdot \frac{1}{[S]_0^2}} \qquad (37)$$

Pour que cette équation du second degré puisse après simplification décrire la cinétique observée expérimentalement, il faut réunir selon Granick les conditions suivantes :

- les deux substrats se fixent dans un ordre prédéterminé
- la constante de dissociation du premier complexe enzyme-substrat est considérablement plus petite que la constante du second complexe
- l'étape finale de formation du PBG détermine la vitesse

$$\frac{1}{[S]_0^2} \text{ est négligeable si: - } [S]_0 > \frac{k_2}{k_1 + \frac{k_3 \cdot k_5}{k_4 + k_5}}$$

- k_5 est petit

$$v = \frac{k_5 \cdot [E]_0}{1 + \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1}\right] \cdot \frac{1}{[S]_0}} = \frac{k_5 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{[S]_0 + \left[\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1}\right]} \Rightarrow \text{Michaelis-Menten} \qquad (38)$$

Suivant les informations accumulées par la suite à propos du mécanisme de la PBGS, tout le schéma mécanistique peut être décrit de la manière suivante (Figure 56) :

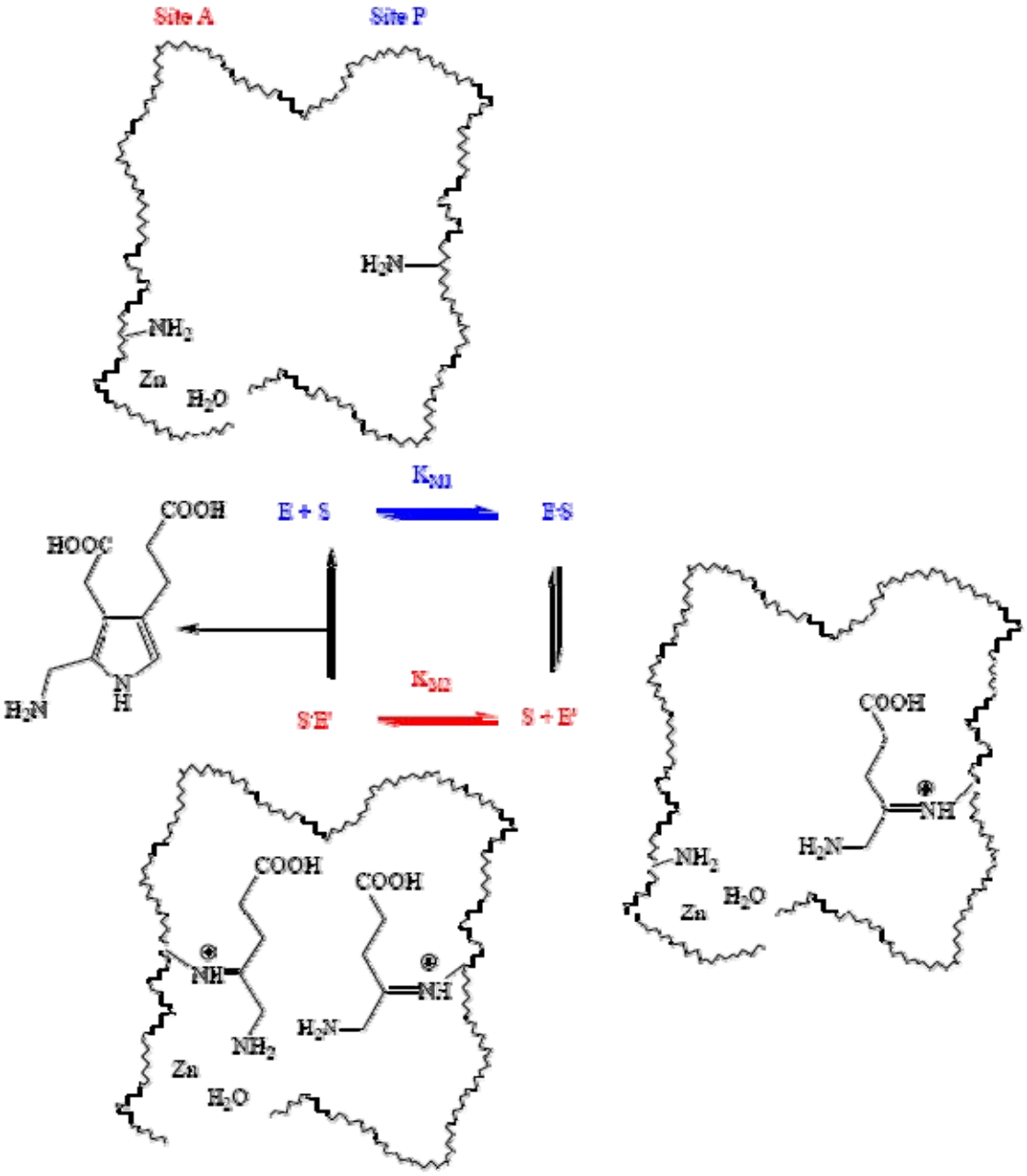


Figure 56 : Schéma mécanistique de la PBGS (E' = ES)

Il est important de pouvoir déterminer les constantes de Michaelis-Menten pour les deux substrats se liant à l'enzyme. On peut schématiser la séquence réactionnelle de la PBGS ainsi que définir l'équation de la vitesse de la manière suivante (Schéma 13) :

$$E + S \underset{}{\overset{K_{M1}}{\rightleftharpoons}} ES + S \overset{K_{M2}}{\rightleftharpoons} ES_2 \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Schéma 13 : Séquence réactionnelle faisant intervenir la PBGS

L'enzyme présente deux sites de reconnaissance, chaque site étant spécifique à l'un des deux substrats et possédant un K_M propre :

$$K_{M1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \qquad (39)$$

et

$$K_{M2} = \frac{[ES] \cdot [S]}{[ES_2]} \qquad (40)$$

L'équation de la vitesse est la suivante :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^2}{K_{M1} \cdot K_{M2} + K_{M2} \cdot [S] + [S]^2} \qquad (41)$$

R. Lüönd a mentionné dans le cadre de sa thèse [82] que dans le cas spécifique de la formation d'une liaison covalente entre le substrat et l'enzyme, le terme ($K_{M1} \cdot K_{M2}$) peut être éliminé et de cette manière une équation du premier ordre peut être obtenue :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^2}{K_{M2} \cdot [S] + [S]^2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_{M2} + [S]} \qquad (42)$$

Dans le cas du mécanisme faisant intervenir la PBGS, ce serait considérer la formation de la base de Schiff comme étant un pas irréversible et rapide. Cette simplification est possible pour les concentrations utilisées dans les tests cinétiques et a été démontrée dans le cadre de la thèse de C. Engeloch-Jarret (Schéma 14) [113].

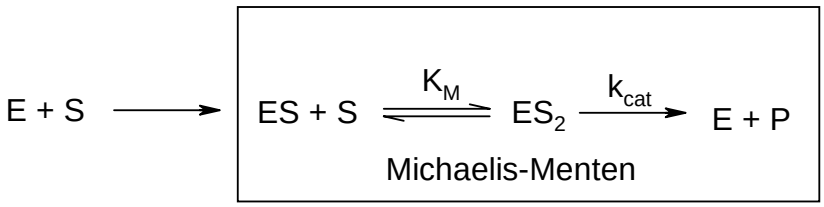


Schéma 14 : Séquence réactionnelle simplifiée impliquant la PBGS afin de pouvoir appliquer les équations de Michaelis-Menten

Finalement, la vitesse est calculée à partir de l'équation suivante :

$$v = \frac{n \cdot A \cdot 10^6}{l \cdot t \cdot \varepsilon} \quad \text{(unité : } \mu M/min) \qquad (43)$$

où
l : est la largeur de la cuvette, l=1 cm
ε : est le coefficient d'extinction, ε = 60'200 $cm^{-1}M^{-1}$,
A : est l'absorbance à 555 nm
n : est le facteur de dilution, n=4

5.3.2 Les hypothèses de travail appliquées à l'étude du mécanisme

Tous les résultats obtenus lors des tests d'inhibitions sont discutés dans le chapitre qui suit en accord avec les points suivants :

- La porphobilinogène synthase possède deux sites de reconnaissances distincts pour chacun de ses deux substrats, nommés site A et P.

- La séquence de reconnaissance des deux substrats est la suivante : la première molécule ALA **5** est reconnue au site P et la seconde au site A.

- Le site actif contient deux lysines : une des lysines forme la base de Schiff avec la première molécule ALA **5** ; et la seconde formerait une seconde base de Schiff avec le deuxième substrat selon les résultats obtenus par rayons X [85, 89].

- La première base de Schiff est de configuration trans entre l'azote de la lysine et le carbone C5 de ALA **5** selon les résultats RMN ^{13}C et ^{15}N déterminé par Jaffe [66, 67].

- Le carboxylate de ALA **5** est reconnu au site P par une sérine et une tyrosine et le carboxylate de ALA **5** au site A par deux arginines et une glutamine.

Ces donnés montrent une représentation minimale du site actif mais suffisante pour émettre les hypothèses suivantes (Figure 57) :

- La constante K_M impliquée dans la cinétique de Michaelis-Menten est celle correspondant à la reconnaissance du second substrat qui se lie dans le site A.

- Les composés qui décrivent une inhibition compétitive pure sont en compétition directe avec le second substrat se fixant dans le site A.

- Les inhibiteurs compétitifs-mixtes, incompétitifs-mixtes et incompétitifs inhibent les deux sites avec des proportions variables suivant les cas (une molécule dans chaque site).

- Les inhibiteurs *slow binder*, tight (slow) binder et irréversible inhibent essentiellement le site P, mais dans certains cas peuvent inhiber les deux sites (inhibition possible des deux sites avec une même molécule).

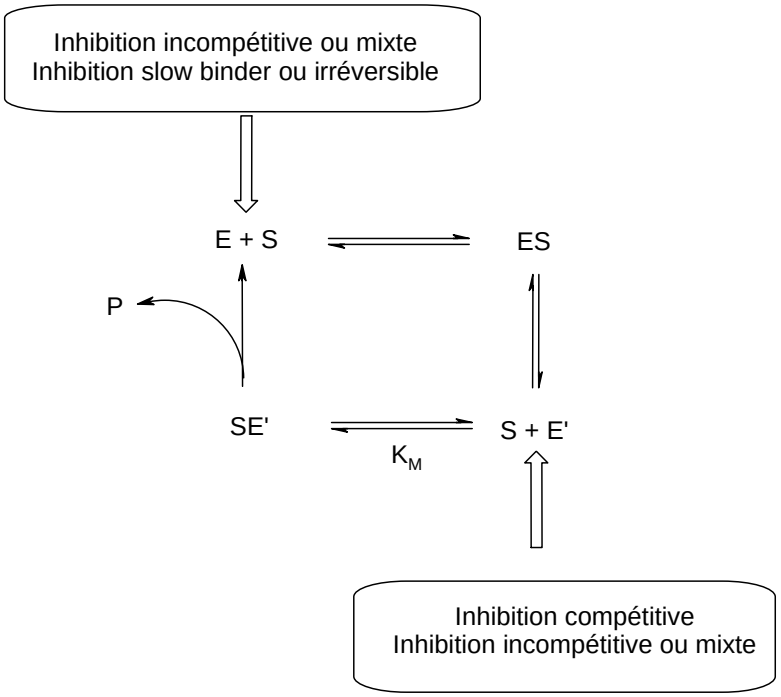


Figure 57 : Corrélation entre les sites de reconnaissance des deux substrats et le type d'inhibition

Les diverses molécules testées vont être analysées selon le type d'inhibition rencontrée et les valeurs de K_I obtenues. Ainsi les données récoltées additionnées des données déjà connues devraient créer un tableau général de l'environnement présent autour des substrats naturels au site catalytique de l'enzyme.

6 Synthèse des inhibiteurs

Les inhibiteurs ont été divisés en trois classes, dépendant de l'hétéroatome central de la molécule (soufre, oxygène ou azote). Le précurseur commun à tous les inhibiteurs est le composé 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **27**.

6.1 Synthèse du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle 27

Ce composé à déjà été étudié et synthétisé dans notre groupe [114-116]. Ainsi, à partir de l'acide lévulinique commercial **17**, et après bromation et estérification, les isomères 3-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **28** et le 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **27** sont obtenus (Figure 58).

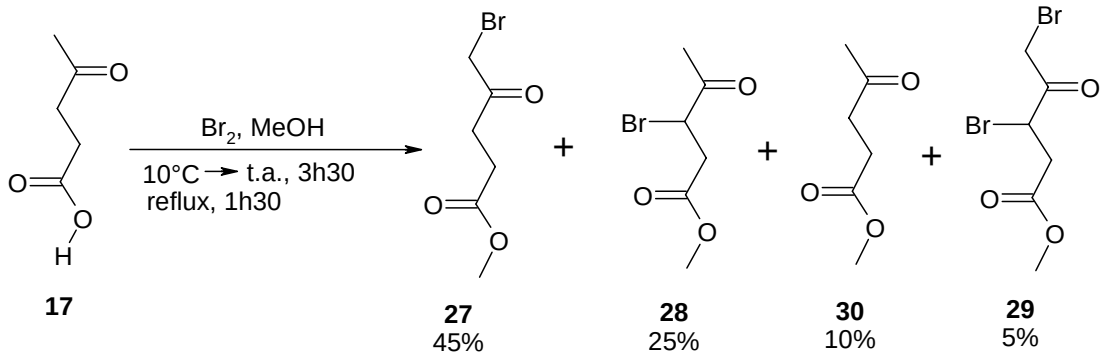


Figure 58 : Bromation de l'acide lévulinique **17**

Les produits secondaires comme le 3,5-dibromo-4-oxopentanoate de méthyle **29** ainsi que le 4-oxo-pentanoate de méthyle **30** sont aussi obtenus. Les rendements pour le 5-bromo-4-oxopentanoate de méthyle **27** peuvent atteindre 50% après distillation soigneuse sur colonne de Widmer. Les fractions mixtes en **27** et **28** sont distillées une deuxième fois.

6.2 Synthèse de l'analogue oxygéné 12

6.2.1 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique 12 selon la littérature [117]

La synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique **12** est décrit dans la littérature [117] (Figure 59). Cottier et coll ont étudié la transformation directe des composés buténolides (tels que le composé **31**) en composés γ-oxo acide (tels que **12)**. La méthode utilisée est celle décrite par Marchand et Reddy [118] qui permet une réduction hautement sélective de la liaison C=C dans les composés dicarbonylé α,β-insaturés. Cette nouvelle procédure réside dans l'utilisation de la poudre de zinc inactivé dans l'acide acétique à température ambiante sous ultrasons. Le bain à ultrasons permet d'éviter l'activation du zinc et l'utilisation de températures élevées. Le composé **32** est obtenu par condensation à partir de **33**. **32** est ensuite convertit en **31** par photooxygénation utilisant les conditions décrits par Nigay et coll [119]. Finalement les conditions décrites par Marchand et Reddy sont appliquées sur la molécule **31** pour donner le composé désiré **12** avec un bon rendement.

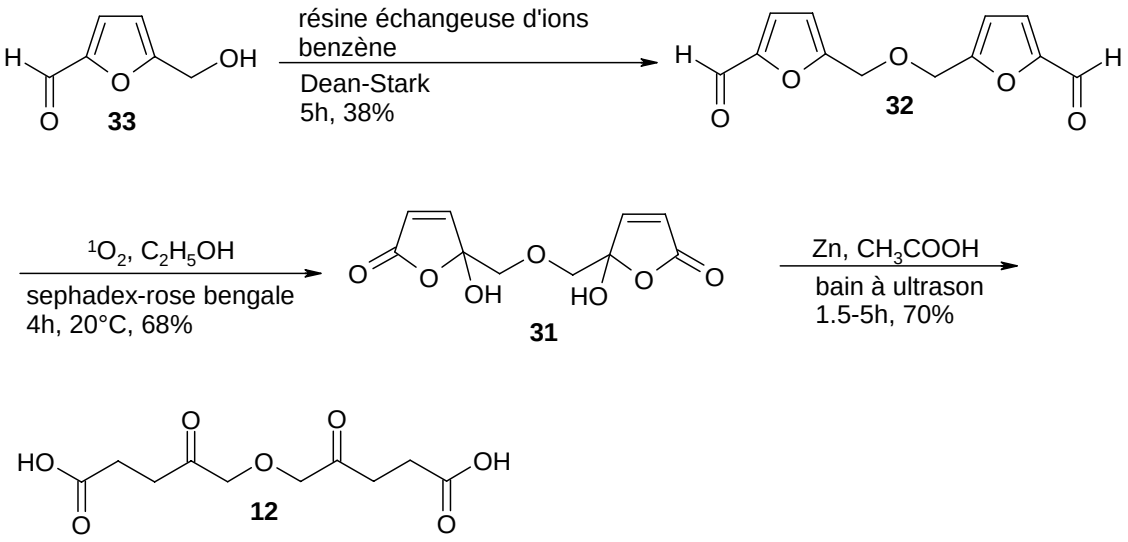


Figure 59 : Synthèse de l'analogue oxygéné **12**

La réaction de condensation de **33** se fait dans un appareil de Dean-Stark. Le benzène est remplacé par le toluène moins toxique. Etant donné les petites quantités de **32** engagées, du tamis moléculaire activé (4Å) est ajouté dans le Dean-Stark afin de piéger de manière efficace l'eau formée durant la réaction. La réaction n'est pas complète après les cinq heures indiquées dans la littérature et **32** est obtenu avec un faible rendement (Figure 60). Cette étape n'est pas optimisée avant d'être certain que l'étape suivante de photooxygénation soit reproductible.

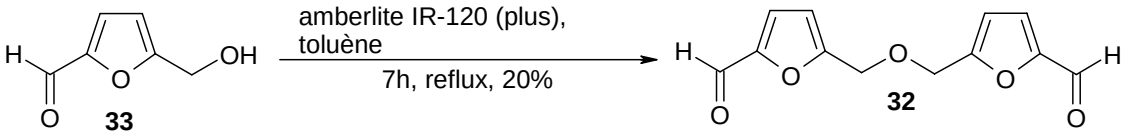


Figure 60 : Synthèse de **32** à partir de **33**

Le montage du mode opératoire décrit par Nigay [119] pour la photooxygénation n'a pas pu être reproduit fidèlement. La pression d'oxygène est maintenue à l'aide d'une seringue. Ce système ne permet pas de déterminer la quantité d'oxygène consommée. La lampe halogène de 150 W est placée à 20 cm du tube de Schlenk qui est thermostatisé à 20°C. Malheureusement aucune trace du produit désiré **31** n'est obtenue, seul le produit de départ est récupéré (Figure 61). Ceci pourrait s'expliquer par une fuite dans le montage. Donc, on ne serait pas en présence uniquement d'oxygène. Il se pourrait qu'il y ait eu non-activation du photosensibilisateur sephadex-rose bengale synthétisé pour l'occasion. Des études faites sur ce photosensibilisateur montre qu'il est le meilleur compromis entre une cinétique réactionnelle correcte et un bon pourcentage de produit [119]. Le rose de bengale est déposé sur une résine de type polysaccharidique (sephadex) dans du méthanol. Après décoloration complète de la solution, le solvant est évaporé et le produit est réduit manuellement en une poudre fine.

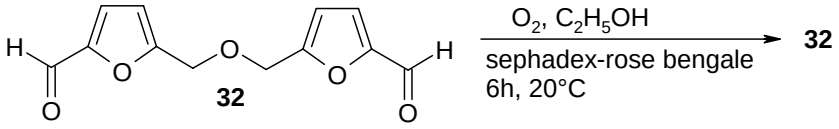


Figure 61 : Essai de photooxygénation de **32**

Pour des raisons pratiques de montage, ce mode opératoire est abandonné.

6.2.2 Synthèse des éthers

6.2.2.1 Synthèse selon Williamson

La manière la plus simple de synthétiser un éther consiste à faire réagir un alkoxyde avec un halogénoalcane primaire dans les conditions typiques des substitutions nucléophiles d'ordre deux. Ce procédé est la synthèse des éthers de Williamson. L'alcool dont provient l'alkoxyde peut être employé comme solvant (si il est peu coûteux), mais d'autres solvants polaires sont tout aussi, voir même, plus efficace. La procédure consiste à traiter dans un premier temps l'alcool en présence de NaH afin de former l'alkoxyde de sodium et ensuite à ajouter l'halogénoalcane afin de former l'éther désiré. Un exemple de synthèse est illustré dans la figure suivante [120] (Figure 62) :

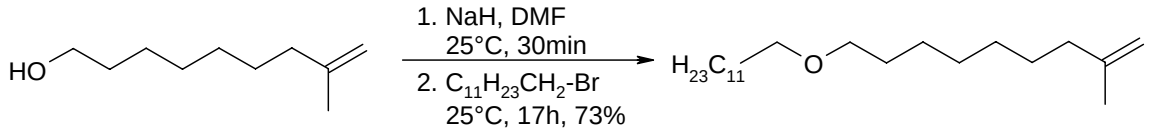


Figure 62 : Synthèse d'un éther selon Williamson

La synthèse du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **34** a été développée par Lüönd, à partir du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **27**. Ce dernier est traité par l'acide formique, en présence de DBU dans le benzène pour donner le 5-formyloxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **35**, qui est facilement hydrolysé sur une colonne d'alumine neutre. Le composé **34** est alors obtenu avec un rendement de 47% après microdistillation (Figure 63).

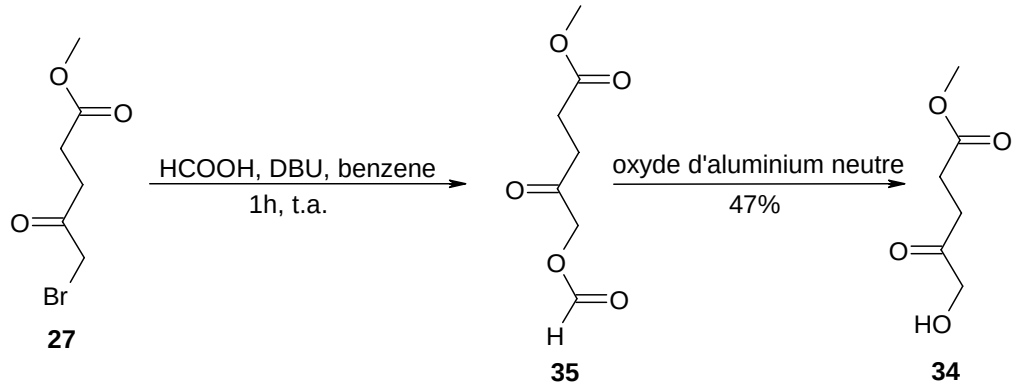


Figure 63 : Synthèse du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **34**

L'hydrolyse de **34** en acide 5-hydroxy-4-oxopentanoique **36** est facilement réalisable à l'aide de HCl 6N (Figure 64).

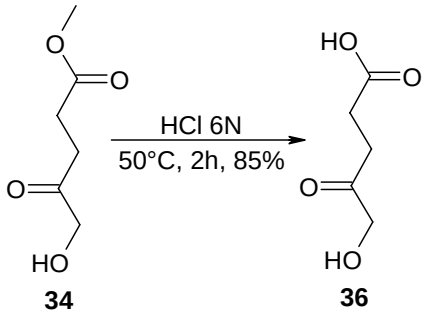
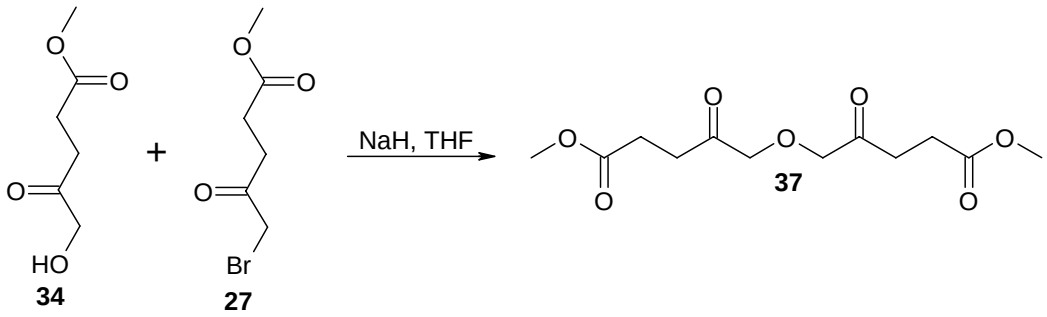


Figure 64 : Hydrolyse de **34** avec HCl 6N

Une synthèse est amorcée avec l'alcool **34** et l'halogénoalcane **27**. **34** est traité avec NaH afin de former l'alkoxyde de sodium qui pourra ensuite réagir avec **27** (Figure 65). Aucune trace d'éther n'est observée lorsque la réaction à température ambiante se fait avec de l'hydrure de sodium à 60% dispersé dans une huile (entrée 1), même lorsque du bromure de tétrabutylammonium (TBAB) est ajouté comme catalyseur [121] après un jour de réaction

(entrée 2). Pour les deux essais suivants, l'hydrure de sodium est activé par des lavages au pentane puis séché pendant 24 heures. En utilisant l'hydrure de sodium activé et en chauffant la réaction, des traces de l'éther **37** sont obtenues (entrées 3 et 4).



34 **27**

Entrée	Température	Temps de réaction	Qualité NaH	Rendement de 37	Remarque
1*	t.a.	4h	non-activé	-	
2*	t.a.	2 jours	non-activé	-	TBAB ajouté après 1 jour de réaction à t.a.
	reflux	5h			
3**	70°C	23h	activé	~10%	
4**	reflux	23h	activé	~10%	

* **34** et NaH sont agités pendant 1h à la température indiquée avant l'ajout de **27**. ** **34** et NaH sont agités pendant 3h à la température indiquée avant l'ajout de **27**.

Figure 65 : Synthèse de **37** selon Williamson

Le rendement mentionné n'est pas le rendement exact mais estimé parce que les fractions obtenues après passage de **37** sur chromatographie sur colonne de silice ne sont pas pures. Une microdistillation ainsi qu'une distillation au four à boule ont été essayées pour améliorer la pureté de **37** mais sans succès.

6.2.2.2 Synthèse des éthers : autres conditions

D'autres conditions que celles décrites par Williamson peuvent être utilisées pour synthétiser un éther à partir d'un alcool et d'un halogénoalcane. L'oxyde d'argent permet d'activer par coordination l'halogène afin d'en faire un meilleur groupe partant. C'est aussi un réactif efficace pour les molécules contenant des fonctions esters ou lactones. Ces conditions ont été utilisées par Fischer dans la formation d'alkylglucosides [122, 123]. Dans l'exemple suivant, le 1-hydroxy-2-butanone **38** est traité avec du bromure d'allyle en présence de Ag_2O et de $CaSO_4$ pendant 10h pour donner l'éther résultant avec un excellent rendement [124] (Figure 66).

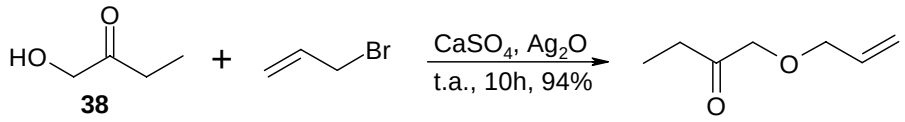


Figure 66 : Synthèse d'un éther à l'aide de Ag_2O

Le traitement de **34** et **27** en présence de l'oxyde d'argent à température ambiante ne permet par la formation de l'éther attendu (Figure 67).

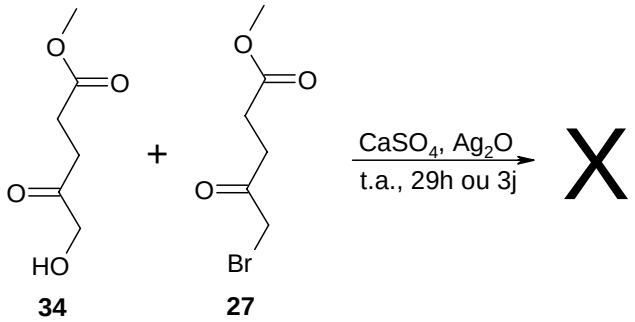


Figure 67 : Essai de synthèse de **37** à partir de **34** et **27** à l'aide de Ag_2O

6.2.2.3 Synthèse d'un éther symétrique à partir de la 1-hydroxy-2-butanone **38**

En 1991, Still et Daoquan [125] ont synthétisé l'époxynitrile **39** à partir de la 1-hydroxy-2-butanone **38**. La première étape consiste à convertir l'alcool en un meilleur groupe partant tel que le toluène-2-sulfonyle **40** à partir du chlorure de toluène-4-sulfonyle (Tos-Cl), puis de traiter le produit brut réactionnel obtenu avec du cyanure de potassium en présence de l'éther couronne 18-crown-6 afin d'obtenir l'époxynitrile **39** (Figure 68).

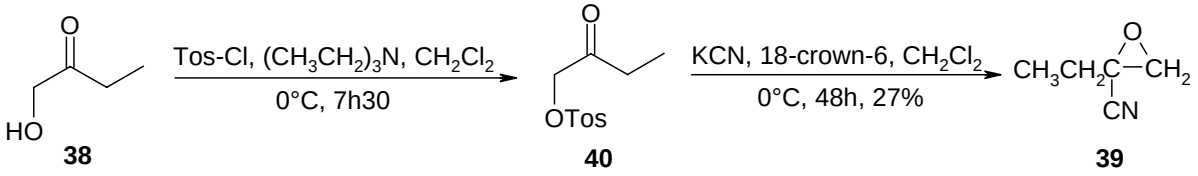


Figure 68 : Synthèse de l'époxynitrile **39** à partir de la 1-hydroxy-2-butanone **38**

La conversion de l'α-cétol **38** en **40** fut initialement difficile mais finalement possible avec un rendement brut de 90% utilisant la triéthylamine à 0°C comme catalyseur. Les analyses par ^{1}H-RMN permettent de déterminer que le brut réactionnel est composé d'un mélange de l'alcool protégé **40** et de l'éther symétrique **41**, dans un rapport 82 :18 (Figure 69). A une température plus élevée, l'éther **41** devient le produit dominant voir même exclusif. Ce qui est

aussi observé lorsque la pyridine est utilisée à 0°C comme catalyseur à la place de la triéthylamine.

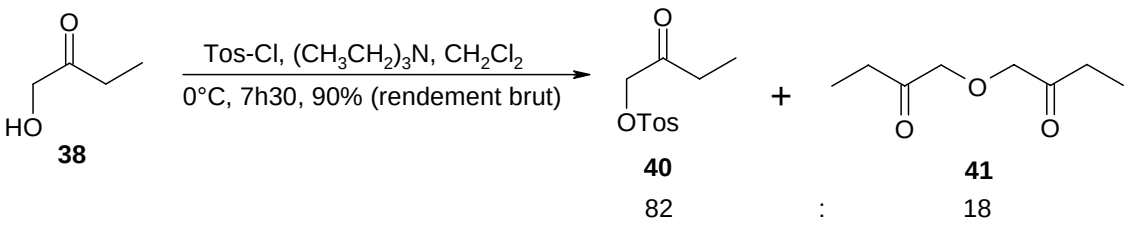
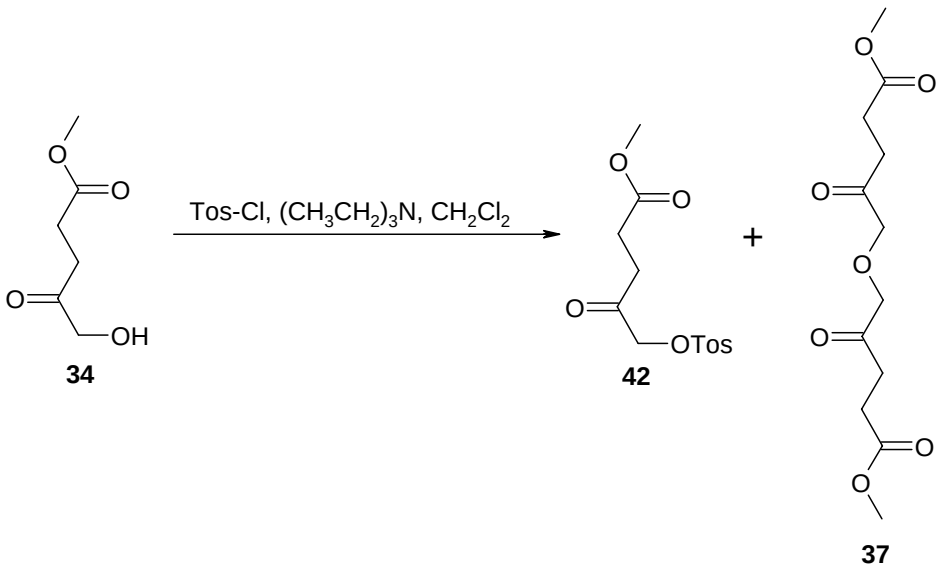


Figure 69 : Synthèse de l'éther **41** à partir du 1-hydroxy-2-butanone **38**

La molécule **34** est très semblable à la molécule de départ **38**, nécessaire à l'obtention de l'éther **41**. La fonction ester supplémentaire de **34** ne devrait pas interférer dans le bon déroulement de la réaction. Tous les essais effectués se déroulent de la même manière : l'alcool **34** est solubilisé dans le dichlorométhane ; la triéthylamine puis le chlorure de toluène-4-sulfonyl sont ajoutés au mélange et agités pendant le temps et à la température indiqués dans le tableau ci-dessous (Figure 70). Le premier essai effectué à 0°C aboutit à un mélange des produits finaux **42** et **37** (entrée 1). Lorsque le temps de réaction est inférieur à 16h (entrée 2), l'éther **37** ne s'est quasiment pas formé, uniquement des traces sont observées. A partir d'une température de 20°C, l'alcool protégé **42** ne se forme plus (entrées 3 à 6). Les meilleures conditions sont donc obtenues avec 1.2 équivalents de Tos-Cl en laissant agiter pendant 20h à température ambiante (entrée 5). Dans ces conditions, l'éther désiré **37** est obtenu avec un bon rendement. Lorsque le nombre d'équivalents de Tos-Cl est plus petit (entrée 4) ou plus grand (entrée 6) que 1.2, une diminution du rendement de l'éther **37** est observée.



Entrée	Equivalent de Tos-Cl	Température	Temps de réaction	Rendement de 42	Rendement de 37
1	1.2	0°C	24h	14%	8%
2	1.1	10°C	8h	20%	traces
3	1.1	20°C	1 nuit	-	21%
4	0.6	20°C	1 nuit	-	10%
5	1.2	t.a.	20h	-	82%
6	1.5	t.a.	1 nuit	-	11%

Figure 70 : Synthèse de l'éther **37** à partir de l'alcool **34**. Différentes conditions testées.

Finalement, l'hydrolyse des fonctions esters de **37** à l'aide de HCl 6N forme l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique **12** voulu avec un très bon rendement (Figure 71).

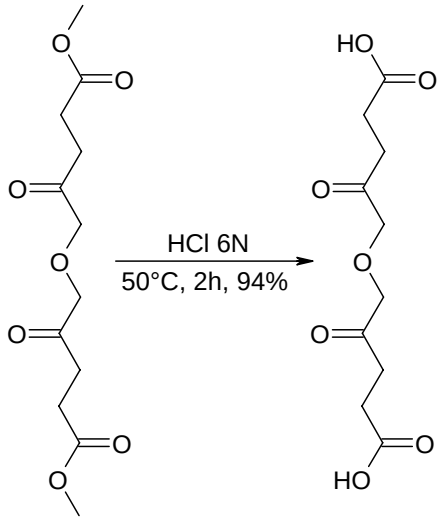


Figure 71 : Hydrolyse de **37** en **12**

6.3 Synthèse de l'analogue amine 13

6.3.1 Protection des amines

Les amines peuvent être synthétisées par alkylation de l'atome d'azote. Ce processus repose sur une propriété importante de l'azote : sa nucléophilie. Malheureusement l'alkylation d'un halogénoalcane sur une amine ou sur l'ammoniac ne s'arrête pas à la monoalkylation mais continue jusqu'à l'amine tertiaire. Le mélange de produit qui est obtenu est un inconvénient majeur qui limite considérablement l'utilité de l'alkylation directe en synthèse organique. Un

des moyens pour contourner l'obtention du mélange est de protéger l'amine, afin d'obtenir uniquement l'amine secondaire. La synthèse des polypeptides nécessite l'intervention de groupes protecteurs au niveau de la fonction amine.

Beaucoup de groupes protecteurs ont été développés pour le groupe amino, incluant les carbamates (>NCO_2R), utilisés pour la protection des acides aminés dans la synthèse des peptides et des protéines, et les amides (>NCOR), utilisés plus généralement dans la synthèse des alcaloïdes et pour la protection de l'atome d'azote des bases adénine, cytosine et guanine dans la synthèse des nucléotides [126]. Dans les paragraphes suivants, seuls les groupements protecteurs utilisés sont décrits.

Le groupement tert-butoxycarbonyl (Boc) demeure l'un des groupes protecteurs pour l'amine le plus fréquent en synthèse organique (Figure 72) [127]. Il est inerte face à une hydrogénolyse catalytique et extrêmement résistant aux réactifs basiques et nucléophiles. La déprotection de groupe amino peut être réalisée par un traitement acide dans des conditions suffisamment douces pour laisser intact le reste de la molécule.

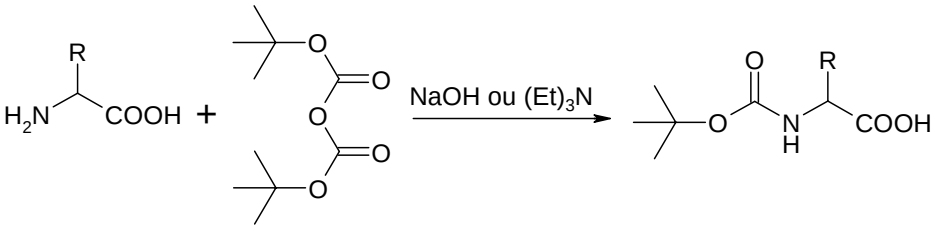


Figure 72 : Schéma général de la protection de la fonction amine d'un acide aminé par Boc

Le groupement benzyloxycarbonyl (Cbz) est aussi fréquemment utilisé (Figure 73) [127].

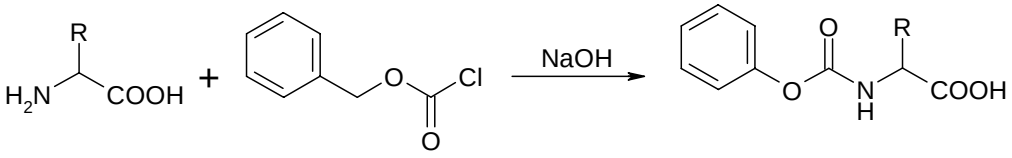


Figure 73 : Schéma général de la protection de la fonction amine d'un acide aminé par Cbz

La déprotection dans ce cas-ci se fait par hydrogénolyse ce qui fournit tout d'abord un acide carbamique en guise d'intermédiaire réactionnel. La décarboxylation spontanée de celui-ci régénère immédiatement la fonction amine (Figure 74).

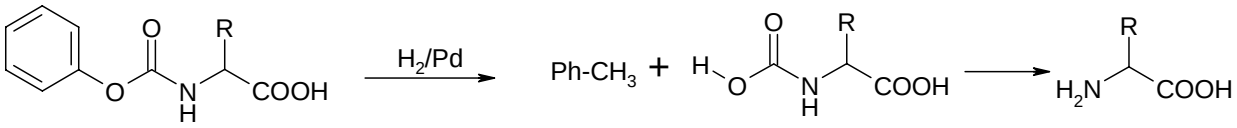


Figure 74 : Schéma général pour le clivage d'une amine protégée par Cbz

Les composés sulfonamides sont les groupes protecteurs pour les amines les plus stables. Ils sont stables face à des réductions catalytiques et aux hydrolyses alcalines. Ils ont aussi l'avantage d'être hautement cristallin et d'être moins sensibles aux attaques nucléophiles que les groupes protecteurs communs de type carbamate. La facilité du clivage dépend de la structure de l'amine. Les dérivés sulfonamides des amines faiblement basiques comme les indoles, les pyrroles et les imidazoles peuvent être facilement clivés par simple hydrolyse basique, tandis que les amines secondaires et primaires requièrent des conditions de réduction plus fortes. La figure suivante montre la protection avec le groupe toluènesulfonamide (Tos) (Figure 75).

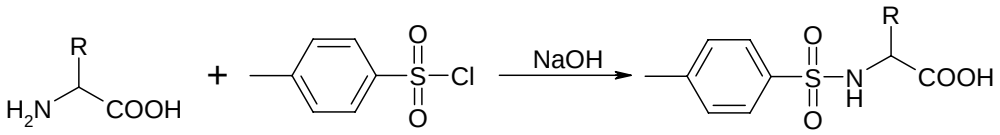


Figure 75 : Schéma général de la protection de la fonction amine d'un acide aminé par Tos

6.3.2 Synthèse de l'amine protégée

La manière la plus efficace de former des amines secondaires est donc de protéger le groupe amino. Le groupe tosyle joue un double jeu : il augmente l'acidité des hydrogènes portés par l'atome d'azote et il préserve ce dernier de multiples réactions de substitution dans les réactions avec des agents électrophiles. Ainsi, l'alkylation de **43** dans des conditions basiques, suivie de la détosylation de l'intermédiaire N,N-dialkyltosylamine **44** est en principe une simple voie préparative pour les amines secondaires symétriques **45** (Figure 76) [128].

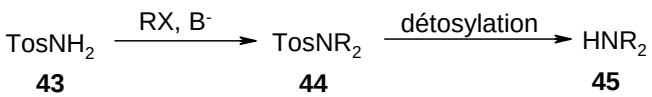


Figure 76 : Schéma général pour la formation d'une amine secondaire

Différentes conditions ont été décrites dans la littérature. Lee & coll [129] décrivent la condensation lente de **46** avec le toluène-4-sulfonamide **47** en présence de K_2CO_3 dans

l'acétone. Après un reflux de deux jours le bisadduit **48** désiré est obtenu ainsi que le monoadduit **49** (Figure 77).

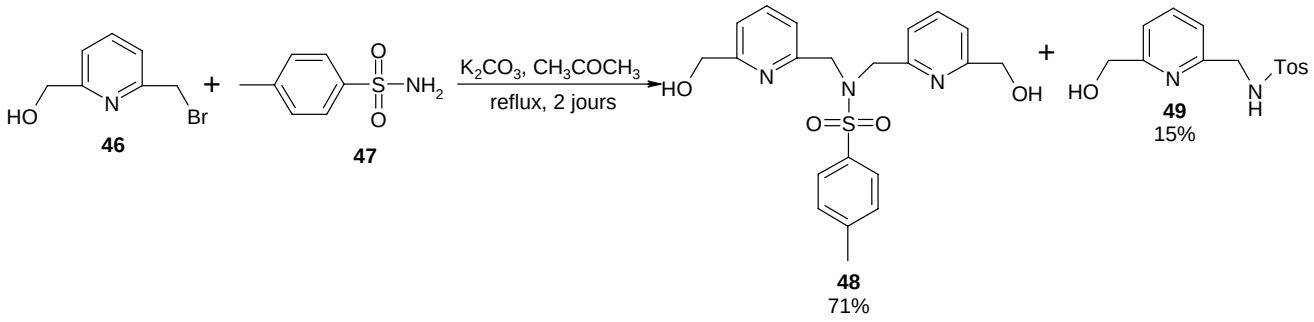


Figure 77 : Alkylation d'un sulfonamide **47** en présence de K_2CO_3

Lorsque Lee et coll ont essayé d'augmenter la vitesse de réaction par un changement de solvant (DMF), une réaction secondaire inattendue s'est produite. En effet, après un jour de réaction à reflux un nouveau composé s'est formé (Figure 78).

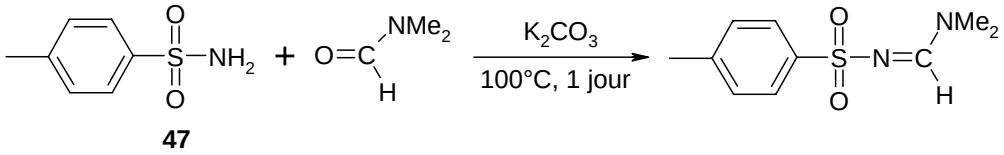
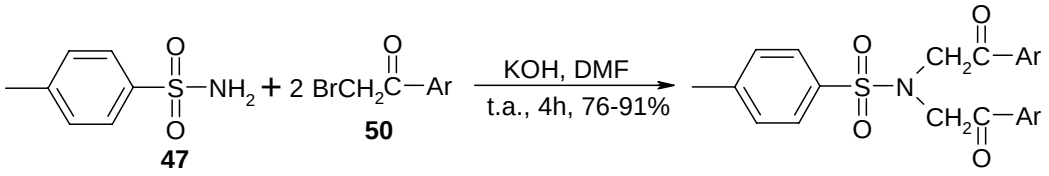


Figure 78 : Réaction entre le DMF et le toluène-4-sulfonamide **47**

Jia & coll [130] décrivent le traitement du toluène-4-sulfonamide **47** avec deux équivalents d'une cétone méthylique α-bromé **50** en présence d'hydroxyde de potassium dans du DMF (Figure 79).



Ar = C_6H_5, ClC_6H_4, *p*-$CH_3C_6H_4$

Figure 79 : Alkylation d'un sulfonamide **47** en présence de KOH

Shirai et Oda [131] décrivent une alkylation en présence d'hydroxyde de sodium dans de l'éthanol et obtiennent le sulfonamide secondaire avec un bon rendement (Figure 80).

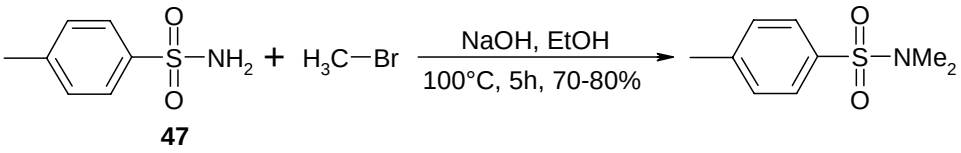
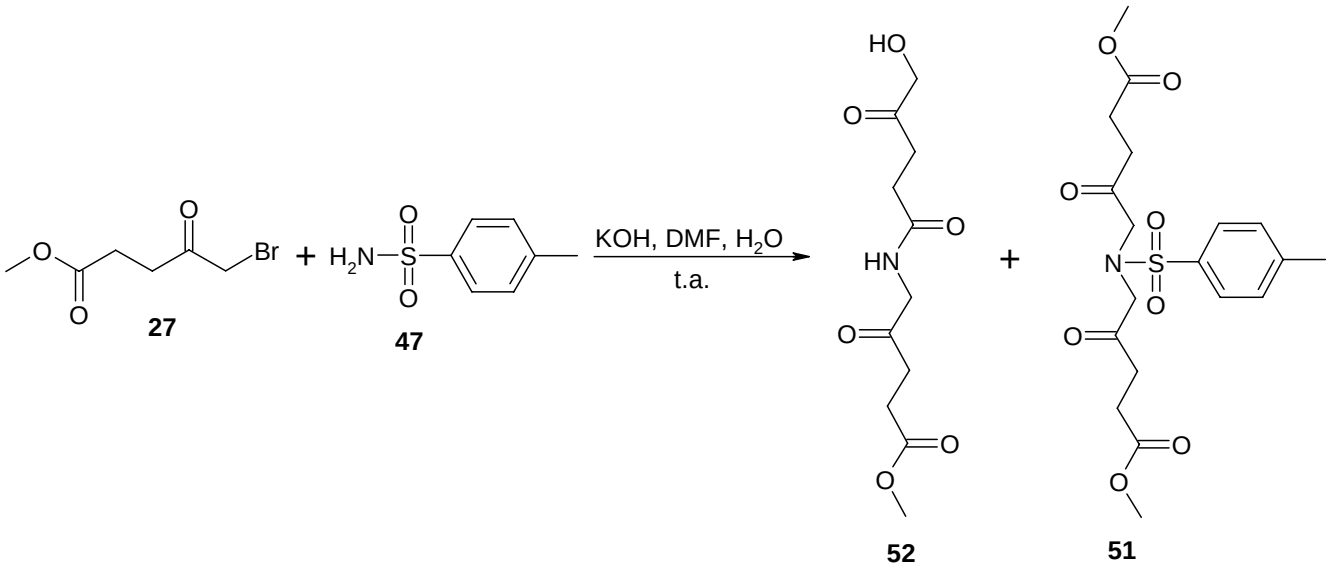


Figure 80 : Alkylation d'un sulfonamide **47** à l'aide de NaOH

Les premiers essais d'alkylation du toluène-4-sulfonamide **47** à l'aide de notre précurseur **27** en présence de KOH dans le DMF donnent lieu à la formation du sulfonamide secondaire attendu **51** dans un faible rendement. Les produits de départ sont aussi récupérés ainsi qu'un produit secondaire identifié comme étant le composé **52** (Figure 81).



Temps de réaction	Rendement 52 [%]	Rendement 51 [%]
4h	5	24
1 nuit	9	23

Figure 81 : Alkylation du toluène-4-sulfonamide **47** avec le composé **27** en présence de KOH

En augmentant le temps de réaction de quatre heures à une nuit, nous observons une augmentation du produit secondaire **52** mais pas de l'amine secondaire **51** désirée. Ainsi, l'augmentation du temps de réaction favorise les réactions secondaires.

Nous avons ensuite testé l'alkylation en présence d'hydroxyde de sodium dans de l'éthanol. Un mélange des deux produits **52** et **51** est à nouveau observé. Un mauvais rendement est obtenu pour **51** (Figure 82).

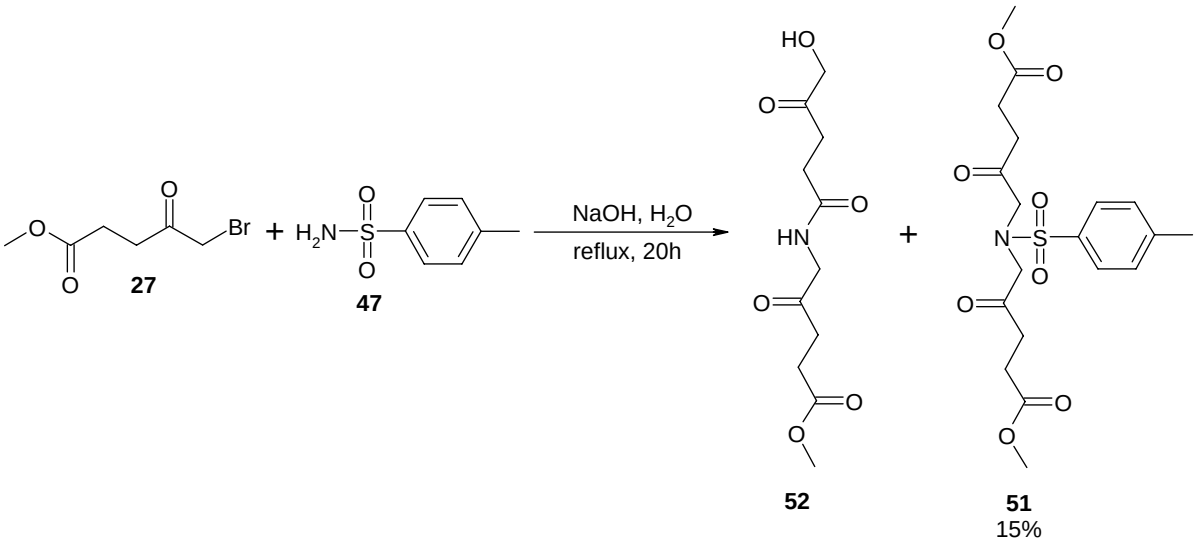
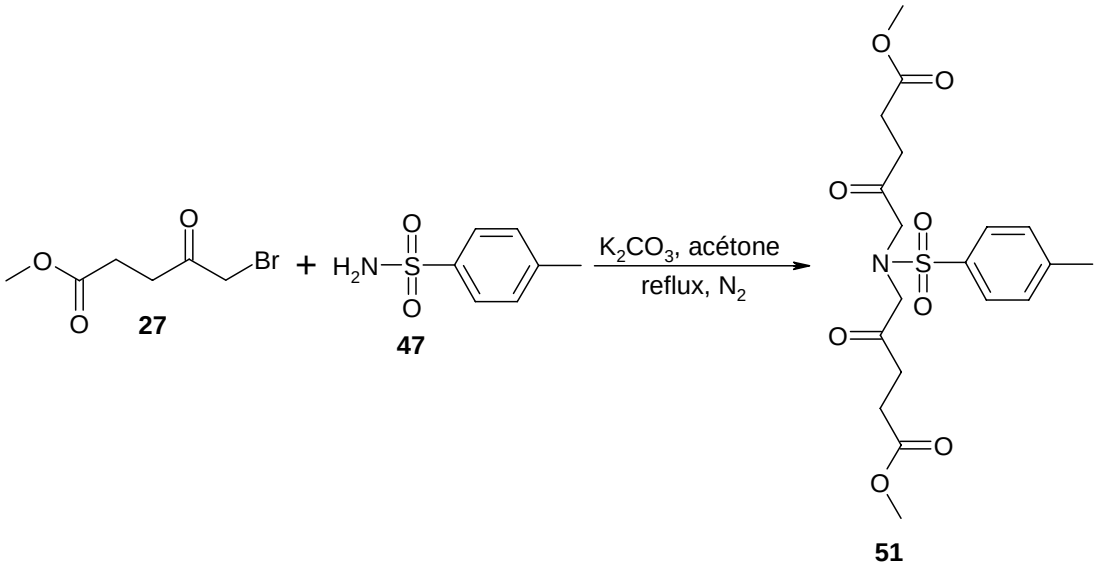


Figure 82 : Alkylation du toluène-4-sulfonamide **47** avec le composé **27** en présence de NaOH

En présence d'eau, la réaction secondaire de formation du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **34** à partir de **27**, est facilement réalisable. Le réactif toluène-4-sulfonamide peut réagir ainsi avec **27** mais également avec **34**. La présence de la fonction amide dans le composé intermédiaire formé par l'attaque du réactif **47** sur une molécule de **27** et une de **34**, favorise, dans les conditions de réaction, l'hydrolyse du groupe protecteur de l'amine pour donner le composé secondaire **52**. Afin de surpasser le problème de la formation de ce produit non désirable **52**, nous devons utiliser une base faible incapable de déprotoner le réactif toluène-4-sulfonamide, mais dont le rôle est de « pousser » la réaction vers le produit désiré **51**. De plus, les conditions de réactions doivent être exempt de toutes traces d'eau afin d'éviter la formation de **34**.

Finalement, l'alkylation du toluène-4-sulfonamide **47** à l'aide du composé **27** en présence de K_2CO_3 dans de l'acétone sous azote, forme l'amine secondaire **51** désirée. Malheureusement la réaction n'est pas quantitative et les produits de départ peuvent être récupérés à la fin de la réaction. Dans ces conditions, le produit secondaire **52** n'est pas obtenu (Figure 83). Le meilleur rendement est obtenu lorsque le milieu réactionnel est placé à reflux pendant 15h.



Temps de réaction [h]	Rendement 51 [%]
>24	Dégradation
24	42
15	62

Figure 83 : Alkylation du toluène-4-sulfonamide **47** avec le composé **27** en présence de K_2CO_3

Afin d'obtenir un bon rendement, il est nécessaire que la verrerie soit préalablement séchée à l'étuve pendant une nuit, que les réactifs soient extrêmement purs et que le solvant soit fraîchement distillé avant son utilisation. Lorsque ces conditions ne sont pas strictement respectées, nous observons une diminution du rendement pour le composé **51**.

Nous avons essayé d'appliquer les conditions utilisées (K_2CO_3, acétone, reflux) pour l'obtention d'analogues de **51** (avec d'autres groupes protecteurs d'amine) (Tableau 4).

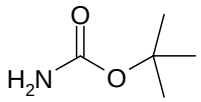
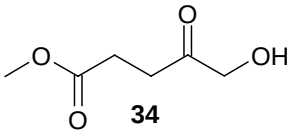
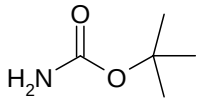
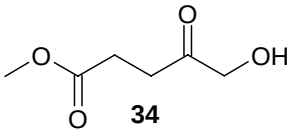
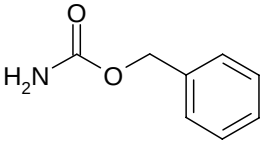
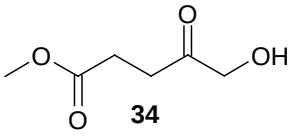
Groupes protecteurs	Solvant	Temps de réaction	Produit obtenu	Rendement [%]
	Acétone	22h	 **34**	20
	Dichlorométhane	23h30	 **34**	9
	Acétone	15h	 **34**	45

Tableau 4 : Essai d'alkylation d'une amine protégée par différents groupes protecteurs

Malheureusement, nous ne constatons pas la formation de l'amine secondaire protégée désirée car la base utilisée n'est pas suffisamment forte pour la déprotonation des composés carbamates. Au lieu de cela, la présence de trace d'eau permet la formation du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **34** avec de faibles rendements.

Par la suite, nous avons essayé de changer les conditions de réactions pour le groupe protecteur Boc [132, 133]. Des essais ont été effectués en utilisant une base plus forte. Malheureusement, l'alkylation de l'amine protégée en présence de NaH dans le DMF ne forme pas le produit désiré. Nous avons essayé la réaction à température ambiante puis à basse température mais dans aucun des cas nous avons obtenu un produit identifiable (Figure 84).

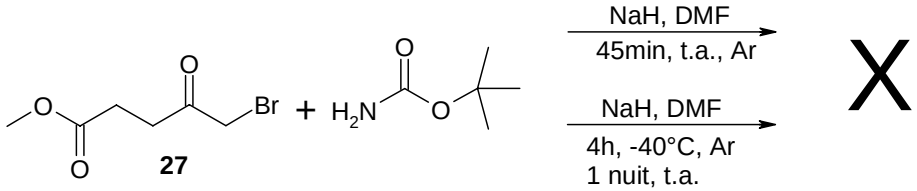
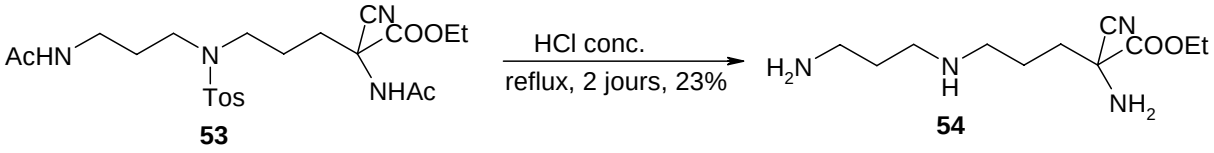


Figure 84 : Essai de protection de l'amine avec Boc

6.3.3 Déprotection de la fonction amine

Les dérivés sulfonamides des amines faiblement basiques tels que les pyrroles et les indoles sont plus faciles à cliver que les dérivés des amines aliphatiques plus basiques. Les amines protégées de pyrroles, indoles ou imidazoles peuvent être facilement clivées par une hydrolyse basique ce qui est généralement impossible pour des alkylamines. Malgré tout,

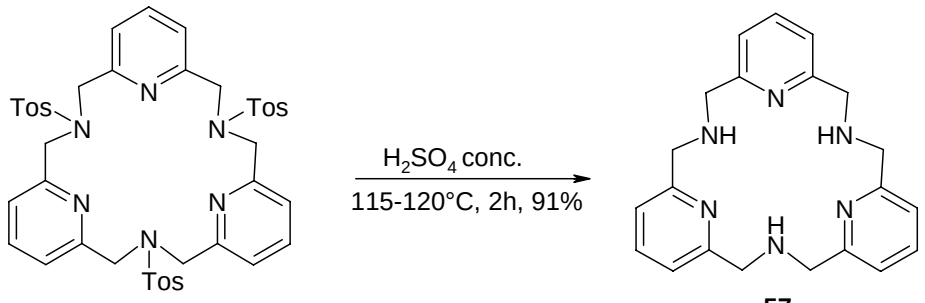
quelques exemples dans la littérature montrent qu'il est tout de même possible de cliver des amines aliphatiques dans des conditions d'hydrolyse classique. L'hydrolyse de **53** à l'aide de HCl concentré fournit, après deux jours à reflux, l'amine déprotégée **54** [134] (Figure 85).



53 **54**

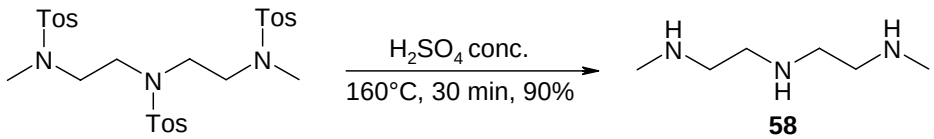
Figure 85 : Déprotection de **53** par hydrolyse à l'aide de HCl

Un autre exemple est la déprotection des molécules **55** et **56** à l'aide de l'acide sulfurique concentré pour donné les amines désirées **57** et **58** dans un très bon rendement [129, 135] (Figure 86 et Figure 87).



55 **57**

Figure 86 : Déprotection de **55** par hydrolyse à l'aide de H_2SO_4 [129]



56 **58**

Figure 87 : Déprotection de **56** par hydrolyse à l'aide de H_2SO_4 [135]

Ces conditions classiques d'hydrolyse ont donc été testées sur la molécule **51**. Le traitement de **51** avec HCl 6N ne déprotège pas la fonction amine, mais hydrolyse uniquement les fonctions esters (molécule **59**) (Figure 88).

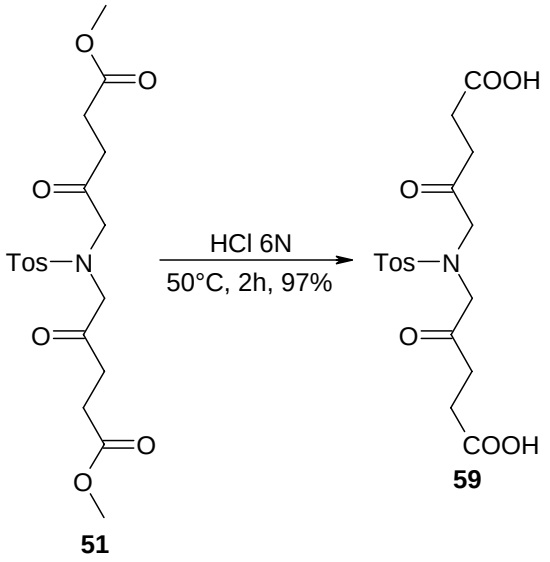
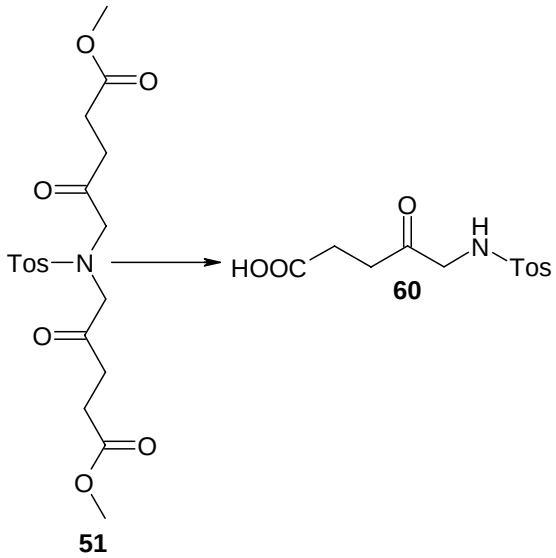


Figure 88 : Hydrolyse de **51** à l'aide de HCl 6N

Le traitement de **51** avec, soit HCl concentré pendant une nuit, soit H_2SO_4, ne donne toujours pas le produit déprotégé désiré mais le produit **60** (Figure 89).



Réactif	**T [°C]**	**Temps [h]**	**Rendement 60 [%]**
HCl conc.	50°C	15	52
H_2SO_4	100°C	1	24

Figure 89 : Différentes tentatives d'hydrolyse de **51**

Les conditions d'hydrolyse classiques étant rarement efficaces pour cliver le groupe protecteur sulfonamide (comme c'est le cas pour la molécule **51**), des conditions réductives sont généralement utilisées, remplaçant ainsi des conditions drastiques d'hydrolyse.

La suppression du groupe protecteur tosyle d'acides aminés a été reportée pour la première fois par Fischer [136] en 1915 utilisant un mélange chaud d'iodure de phosphonium et d'acide iodhydrique. Cette procédure drastique fut appliquée par la suite par Schönheimer [137] en 1926 pour générer le peptide libre d'un dérivé tosylé. En 1937 du Vigneaud [138] a démontré que le groupe protecteur tosyle peut être clivé avec du sodium métallique dans l'ammoniac liquide. Dès lors, le groupe protecteur tosyle est devenu un outil important dans la chimie des peptides. Le clivage réductif en présence de sodium et d'ammoniac liquide est la première méthode efficace mise au point [139-141]. Pour des raisons pratiques, ces conditions n'ont pas été testées.

Une autre méthode est la réduction du toluène-4-sulfonamide à l'aide d'une solution de naphthalenure de sodium dans du 1,2-diméthoxyéthane (DME) [142-145]. A basse température, le clivage des amines secondaires requiert deux équivalents de naphthalenure de sodium. Une solution de sulfonamide est titrée avec une solution de naphthalenure de sodium jusqu'à atteindre le point final où la couleur vert-noire de la solution de toluènesulfonamide persiste ce qui signifie que tout le sulfonamide a été consommé [146]. Cette technique est similaire à celle développée pour le clivage du groupement toluène-4-sulfonate pour régénérer des alcools [147] avec pour différence que le clivage du sulfonamide semble être meilleur dans une solution de diméthoxyéthane que dans une solution de tetrahydrofurane. Le diméthoxyéthane réagit à température ambiante avec la solution de naphthalenure de sodium et forme le méthyle vinyle éther [148] (Figure 90).

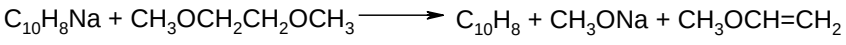


Figure 90 : Réaction entre le naphthalenure de sodium et le diméthoxyéthane

Ce processus est suffisamment lent à température ambiante pour ne pas interférer avec la réaction de clivage [149]. Le mécanisme de la réaction de clivage est similaire à celui proposé par Kovacs et Ghatak [141] pour le clivage du toluène-4-sulfonamide à l'aide de sodium et d'ammoniac liquide. La réaction totale a été représentée par Birch et Smith comme suit [150] (Figure 91) :

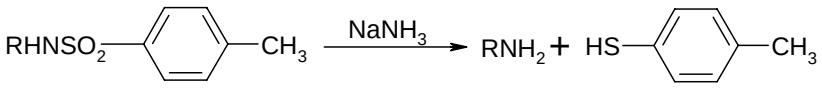


Figure 91 : Mécanisme de Birch et Smith pour la détosylation en présence de sodium métallique et d'ammoniac liquide

La déprotection selon Kovacs et Ghatak conduit à une quantité considérable de dioxyde de soufre et non au *p*-thiocrésol (*p*-$CH_3C_6H_5SH$) lors du clivage avec le mélange sodium/ammoniac liquide. Ce qui poussa les auteurs à étudier en détail le mécanisme de réaction. Ils démontrèrent que la réaction de clivage peut être représentée à l'aide de deux mécanismes (Figure 92). Le mécanisme A est majoritaire et implique un clivage carbone-soufre pour aboutir au toluène et au dioxyde de soufre. Le mécanisme B est minoritaire et implique le clivage soufre-azote pour donner l'acide sulfinique. Ce dernier peut à nouveau être clivé selon deux mécanismes différents, le premier par réduction donnant le composé *p*-thiocrésol et le deuxième par clivage de la liaison carbone-soufre pour donner le toluène et le dioxyde de soufre.

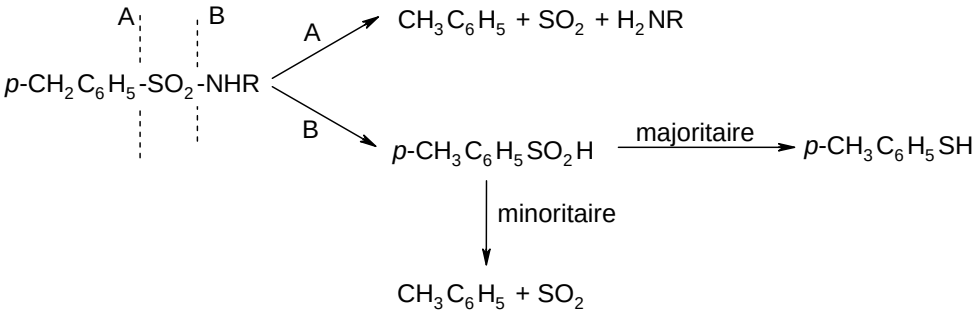


Figure 92 : Mécanismes de détosylation selon Kovacs et Ghatak

Quelques années plus tard, Schulenberg et coll [146] ont également étudié ce mécanisme et ont trouvé des résultats contredisant le mécanisme proposé par Kovacs et Ghatak. Ils n'ont pas détecté la présence de *p*-thiocrésol. Ils proposent donc un autre mécanisme (Figure 93). L'étape lente est le transfert initial d'électrons (étape 2 et 3). Pour le moment on ne peut pas encore déterminer quel fragment est l'anion et quel fragment et le radical donc le symbole $^{\cdot}/^{-}$ est utilisé pour montrer l'ambiguïté de la situation. Deux équivalents semblent donc nécessaires pour former les deux fragments anions. Finalement, l'amine déprotégée est protonée grâce à la présence de l'eau (étape 4). La différence de ce mécanisme avec le mécanisme de Kovacs et Ghatak se trouve essentiellement dans les étapes 5 à 7, étapes de formation de l'anion $S_2O_4^{2-}$. La réduction initiale en $SO_2^{\cdot -}$ (étape 5) est apparemment plus rapide que l'étape 6, mais uniquement le produit de l'étape 7 est observé.

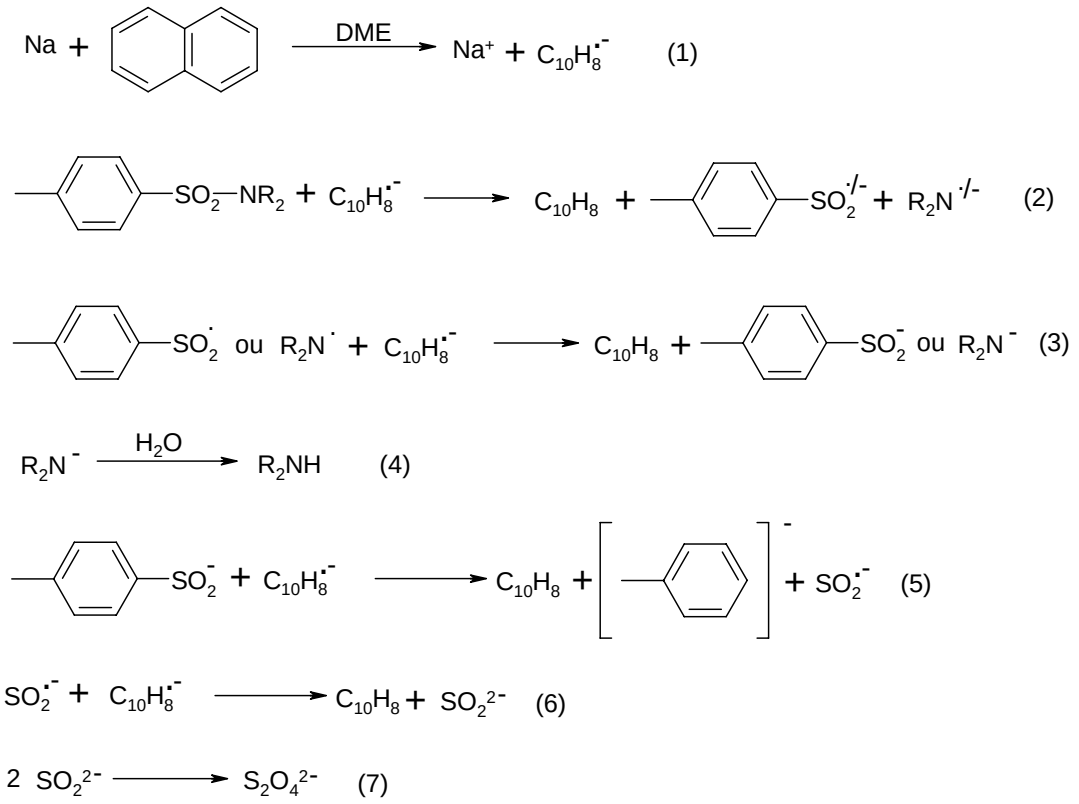


Figure 93 : Mécanisme de détosylation selon Schulenberg et coll

Une autre méthode pour la déprotection des composés sulfonamides consiste à mettre à reflux un mélange contenant le composé sulfonamide et l'agent réducteur bis(2-méthoxyéthoxy)aluminiumhydrure de sodium (Red-Al) dans un solvant hydrocarboné aromatique [151].

La première méthode réductive testée sur la molécule **51** fut celle décrite en dernier. **51** agité à reflux pendant deux heures en présence de l'agent réducteur Red-Al dans du THF ne permet pas la déprotection de l'amine. Aucun produit n'a pu être identifié et le produit de départ n'a pas été récupéré ce qui présuppose une dégradation de **51**. Les groupements carbonyles et carboxyles ne survivent généralement pas à des conditions réductives [151], c'est pourquoi avant d'essayer d'autres méthodes, il est jugé nécessaire de protéger les deux fonctions cétones.

6.3.4 Protection des fonctions cétones

L'électrophilicité du groupe carbonyle est sa caractéristique principale. Il est parfois nécessaire de devoir protéger ce genre de groupement lorsque l'on veut faire réagir un nucléophile sur un autre groupement. Les groupes protecteurs les plus utilisés sont les acétals et les thioacétals [152]. Le groupe protecteur est introduit en traitant le composé carbonyle en

présence d'un acide avec un alcool, un diol, un thiol ou un dithiol. Les acétals cycliques et acycliques sont stables vis-à-vis des bases, des nucléophiles incluant les organométalliques, des hydrures et des réductions telles que les réductions faites avec du sodium métallique dans l'ammoniac. Les composés 1,3-dioxolanes et 1,3-dioxanes sont les acétals cycliques les plus utilisés comme groupes protecteurs et sont généralement préparés par réaction du carbonyle avec respectivement l'éthane-1,2-diol ou le propane-1,3-diol par catalyse acide (Figure 94). Un équivalent molaire d'eau est libéré durant la réaction et son élimination efficace est nécessaire pour une réaction complète, c'est-à-dire pour déplacer l'équilibre de la réaction vers la droite. La manière la plus efficace pour éliminer l'eau est la distillation azéotropique continue utilisant du benzène (ou du toluène) et un appareil de Dean-Stark. De plus, si de petites quantités sont utilisées lors de la réaction, l'addition de tamis moléculaire activé (4Å) peut s'avérer très utile afin d'absorber l'eau formée. Les catalyseurs acides les plus communs utilisés sont l'acide toluène-4-sulfonique (PTSA), l'acide camphorsulfonique (CSA), le toluène-4-sulfonique pyridinium (PPTS) ou des résines échangeuses d'ions.

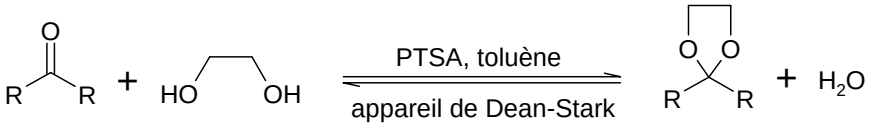


Figure 94 : Protection de la fonction cétone à l'aide de l'éthane-1,2-diol

Noyori et coll [153] ont montré que les cétones peuvent être converties en dioxolanes correspondant, par réaction avec le bis-triméthylsilyl ether de l'éthane-1,2-diol en présence de triméthylsilyl triflate (TMSOTf) à basse température et sous argon avec de très bon rendement (Figure 95).

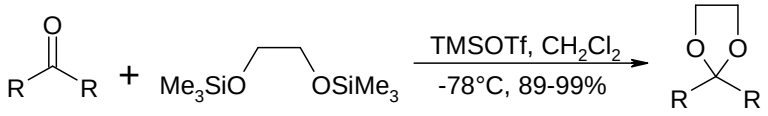


Figure 95 : Protection de la fonction cétone à l'aide d'un alkoxytriméthylsilane

La méthode la plus commune pour déprotéger un acétal est une hydrolyse acide. La facilité de l'hydrolyse peut varier énormément. Dans certains cas, l'hydrolyse est tellement facile que la perte du groupe protecteur acétal peut se faire durant une chromatographie sur colonne de silice. Dans d'autres cas, les acétals peuvent être si robustes que des conditions drastiques (telles que acide minéral et chauffage) sont nécessaires. Par exemple, les composés contenant des fonctions amines basiques sont assez résistants à l'hydrolyse parce que la protonation a lieu en premier sur la fonction la plus basique qui est le groupement amino. La charge positive résultante repousse la protonation de l'oxygène qui est nécessaire à l'hydrolyse. L'hydrolyse acide d'un acétal avec HCl 6N dans l'acétone est illustrée dans la figure suivante [154, 155] (Figure 96).

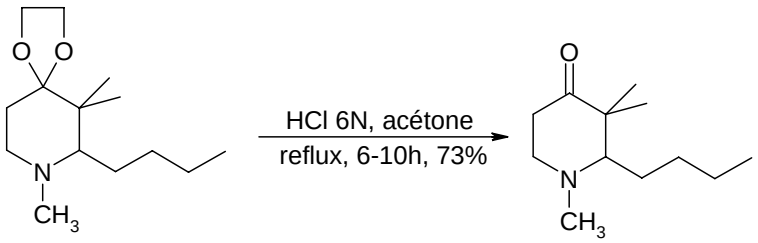


Figure 96 : Déprotection de la fonction cétone d'un composé présentant une fonction amine

Les conditions classiques de protection de la fonction cétone décrites en premier ont d'abord été testées sur la molécule **51**. L'appareil de Dean-Stark ainsi que du tamis moléculaire ont été utilisés afin de piéger l'eau, mais malheureusement aucune trace de la molécule protégée désirée n'a été observée (Figure 97).

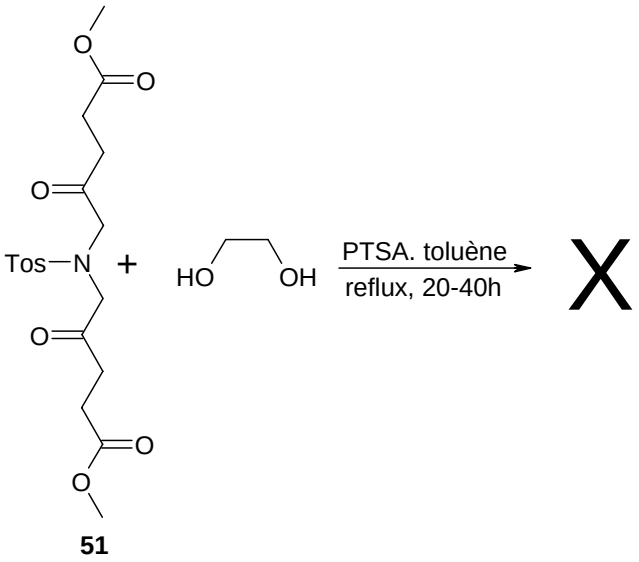
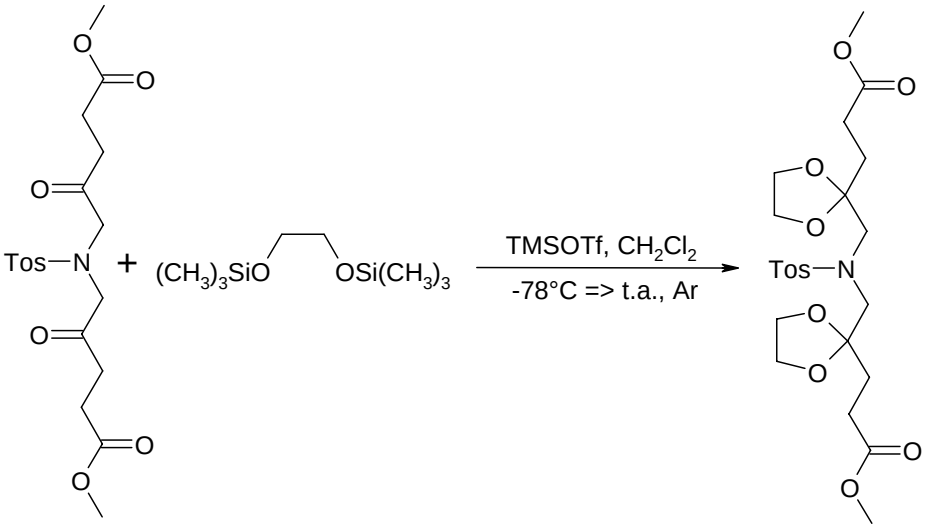


Figure 97 : Essai de protection des fonctions cétones de **51** à l'aide de l'éthane-1,2-diol

Les conditions décrites par Noyori et coll fournissent la molécule protégée désirée **61** à partir de **51** avec un bon rendement (Figure 98).



51 **61**

Temps de réaction [h]	**Rendement de 61 [%]**
7	65
5	82

Figure 98 : Protection des fonctions cétones de **51** d'après Noyori et coll

Lorsque le temps de réaction passe de sept à cinq heures, le rendement de **61** est amélioré.

6.3.5 Déprotection des fonctions amine et cétones de 61

Dans un premier temps, deux conditions basiques classiques [156, 157] ont été tentées pour déprotéger la fonction amine de la molécule **61**. Malheureusement dans les deux cas, aucune déprotection n'est observée. Nous obtenons l'hydrolyse des fonctions esters, résultant à la molécule **62** (Figure 99).

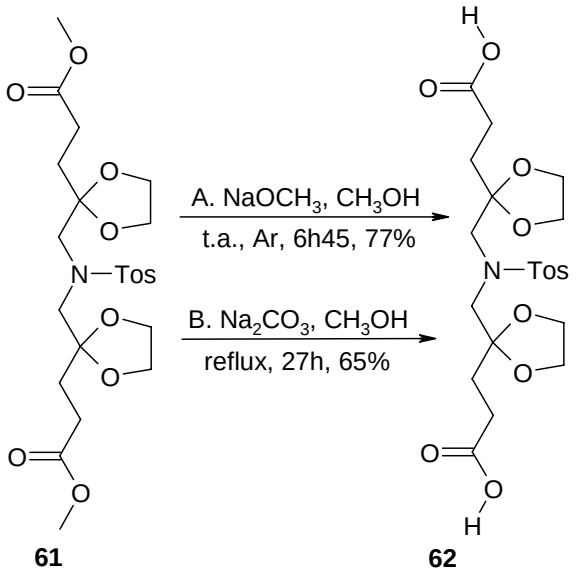


Figure 99 : Essai de déprotection de l'amine **61** à l'aide de conditions basiques classiques

La première méthode réductive testée sur **61** fut celle utilisant l'agent réducteur bis(2-méthoxyéthoxy)aluminium hydrure de sodium (Red-Al) dans du THF. Le mélange à reflux pendant trois heures permet la réduction des fonctions esters en alcool (molécule **63**) (Figure 100). Lorsque le temps de réaction dépasse les trois heures, une dégradation du produit est observée.

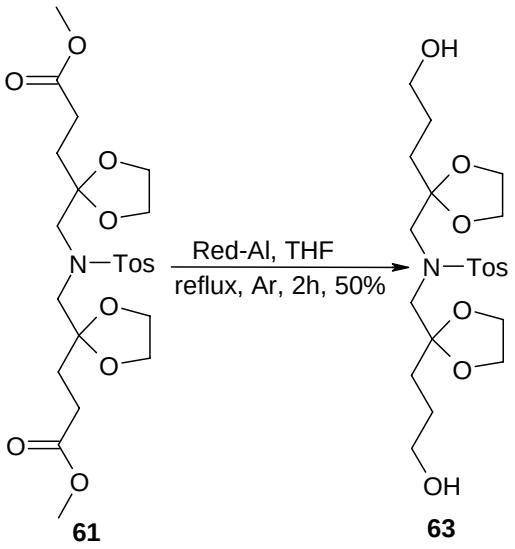


Figure 100 : Essai de déprotection de l'amine avec l'agent réducteur Red-Al

Finalement, les conditions utilisant la solution de naphthalenure de sodium comme agent de titration d'une solution de **61**, permet la déprotection de la fonction amine et forme la molécule **64** (Figure 101). La solution de naphthalenure de sodium est obtenue en laissant agiter pendant deux heures à température ambiante et sous argon, le sodium (1 équivalent) et

le naphtalène (1 équivalent) dans du diméthoxyéthane (DME). La déprotection de l'amine se fait ensuite par titration d'une solution de **61** dans du DME fortement agitée à basse température, par la solution de naphthalenure de sodium. Cette solution est ajoutée, goutte à goutte, jusqu'à ce que la solution de **61** se colore en noir-vert et que cette couleur persiste. La titration se fait sur une heure environ et sept équivalents de la solution de naphthalenure de sodium sont nécessaires pour la déprotection.

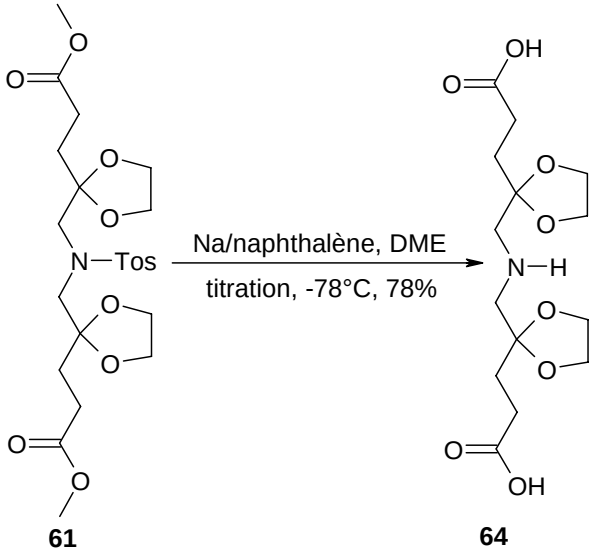


Figure 101 : Déprotection de l'amine à l'aide d'une solution de naphthalenure de sodium

Lors de la déprotection de l'amine, les fonctions esters n'ont évidemment pas résistées aux conditions réductrices et l'on obtient donc le composé diacide **64**.

La dernière étape consiste en la déprotection des deux fonctions cétones. Comme décrit dans le chapitre précédent, des conditions acides devraient permettre cette déprotection. La molécule **64** est donc traitée avec HCl concentré pendant une nuit à 80°C et l'on observe bien la formation de **13** (Figure 102).

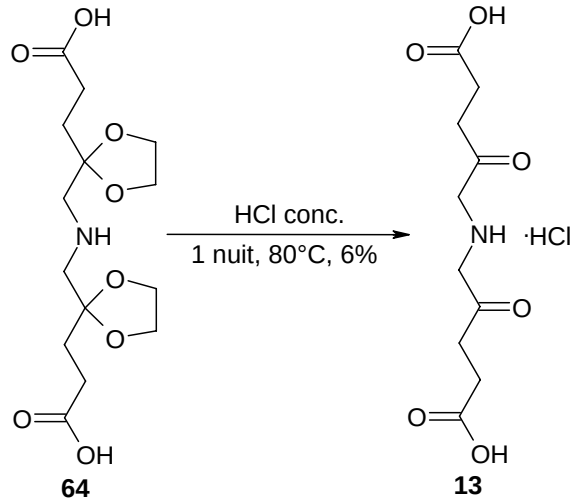
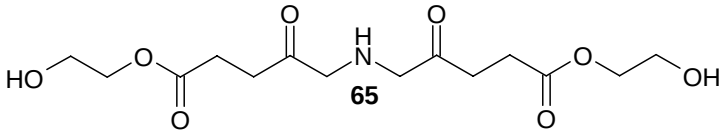


Figure 102 : Déprotection des fonctions cétones dans des conditions acides

Quelques difficultés sont intervenues lors du traitement de la réaction. Après que la réaction soit agitée pendant une nuit à 80°C, le solvant est évaporé et lors de cette étape, une estérification entre le composé **13** et l'éthane-1,2-diol formé durant la réaction, donne lieu à la formation du composé **65**.



Avant l'évaporation du solvant, le composé **65** n'est pas présent. Il se forme bien lors de la concentration de la solution du brut. Une technique envisagée pour contourner ce problème d'évaporation est l'élimination de l'éthane-1,2-diol par distillation azéotrope. L'éthane-1,2-diol forme un azéotrope avec le phényléther et l'heptane. Le phénylether ou l'heptane est ajouté au brut réactionnel, et le mélange est distillé au four à boule. Malheureusement nous n'observons pas une isolation nette de l'éthane-1,2-diol du composé **13** et les deux produits sont retrouvés aussi bien dans les ballons de récupération que dans le distillat. Cette méthode est donc abandonnée.

Un autre essai pour séparer l'éthane-1,2-diol du composé **13** fut d'envisager une séparation sur les CCM préparatives. Les essais effectués ne nous permettent pas d'isoler **13**, ce qui peut être expliqué par un problème de stabilité et de dégradation de **13** en présence de la silice.

Finalement, nous avons amené le pH du mélange réactionnel (après réaction) entre 2 et 3, à l'aide d'une solution aqueuse de NaOH, suivi de l'évaporation du solvant. De cette manière, la formation du produit secondaire **65** n'a pas lieu. Le brut de la réaction se compose donc de **13**, de l'éthane-1,2-diol et de NaCl formé lors de la neutralisation. Le brut est dissous dans un minimum de méthanol et NaCl non dissout est filtré. De l'éther est ajouté à la solution afin de

reprécipiter **13**. Le solide très fin beige obtenu est ensuite récupéré par centrifugation. Nous n'avons pas pu éliminer complètement la présence de NaCl ce qui est à l'origine d'une contamination d'environ 10% (estimation). Par manque de temps, l'étape de purification et donc le rendement (6%) n'ont pas pu être optimisés.

Des études ont montré l'influence des cations monovalents sur l'activité spécifique de la PBGS [158]. Etant donné les petites quantités d'inhibiteur utilisées lors des tests enzymatiques, la présence de NaCl dans le composé **13** ne devrait pas interférer sur les résultats cinétiques.

La première ^{1}H-RMN (200 MHz) effectuée sur **13** dans D_2O montre bien les deux triplets typiques des quatre protons sur les carbones 2 et 3 (2.46 et 2.74 ppm) ainsi qu'un singulet (4.08 ppm) correspondant aux protons du carbone 5 (Figure 103).

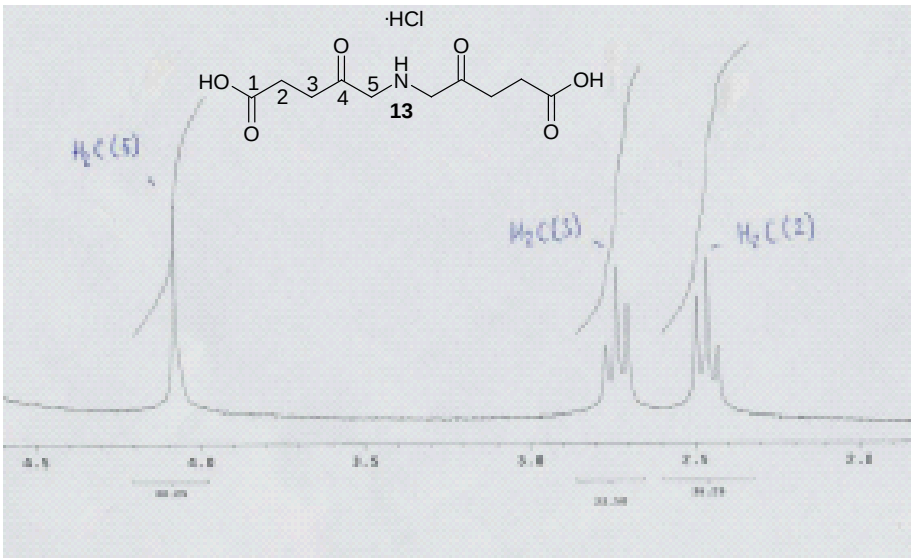


Figure 103 : ^{1}H-RMN 200 MHz de **13**

Quelques jours plus tard, une ^{1}H-RMN 400 MHz du même tube donne pour les protons du carbone 5 deux singulets, l'un fin (4.25 ppm) et l'autre large (4,23 ppm) (Figure 104).

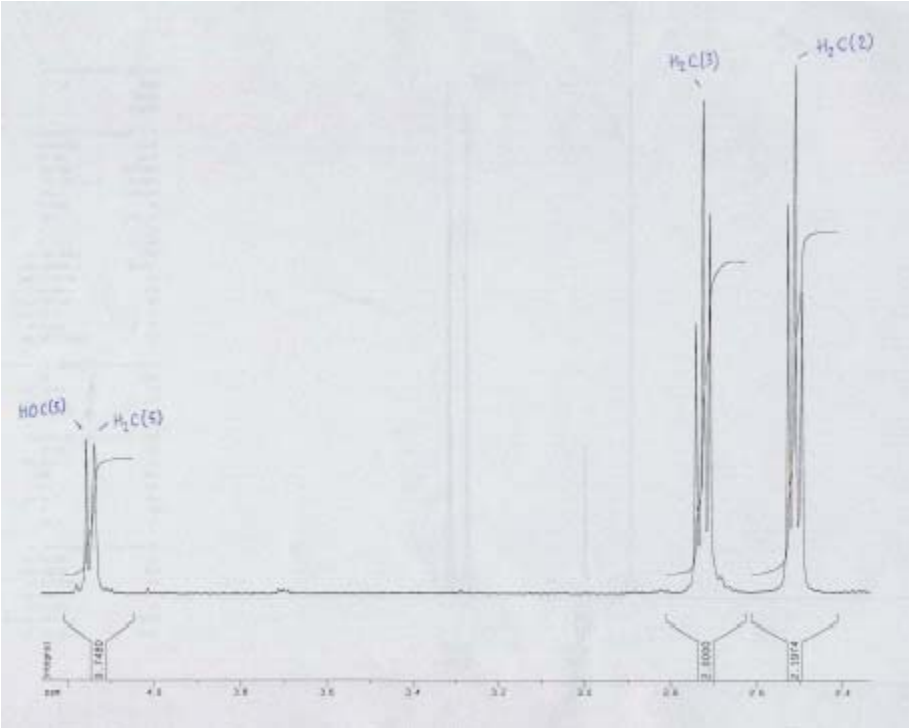


Figure 104 : ^{1}H-RMN 400 MHz de **13**

Ceci peut être expliqué par un échange lent à température ambiante des protons du carbone 5 avec les deutériums du solvant D_2O pour donner, dans un premier, temps le composé **66**, puis le composé **67** (Figure 105).

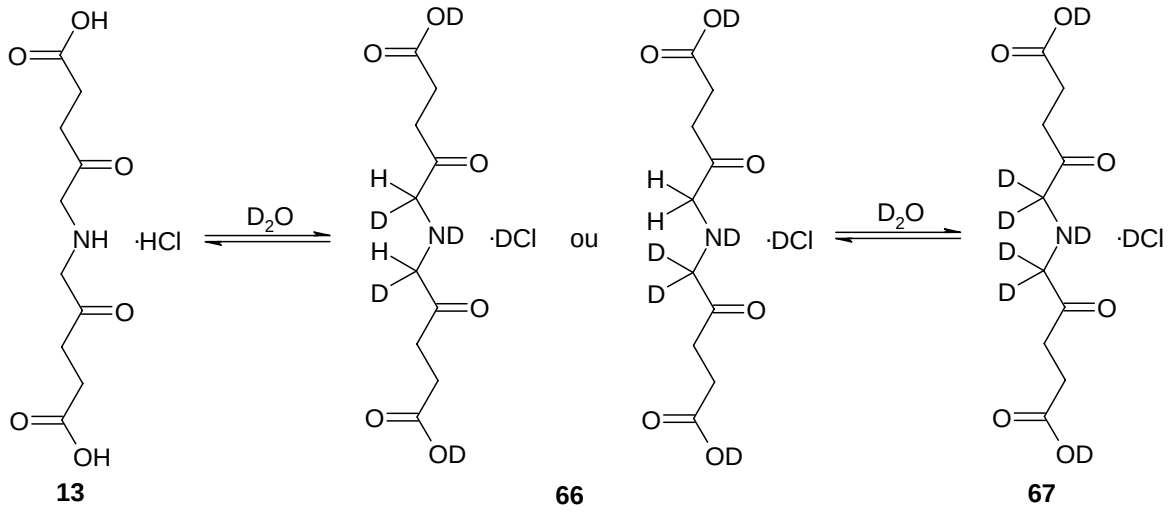


Figure 105 : Echange proton-deutérium

Cet échange est expliqué par la grande mobilité des protons en position α de la fonction cétone du composé **13** (Figure 106). La tautomérisation céto-énolique se réalise par catalyse acide ou basique. Elle est rapide. La forme cétonique est plus stable et généralement uniquement des traces d'énol sont présentes. De plus, nous observons seulement l'échange

des protons du carbone 5 qui sont plus acides que les protons du carbone 3 à cause de la présence de la fonction amine en α. L'échange pour les protons du carbone 3 est encore plus lent et n'a donc pas été observé.

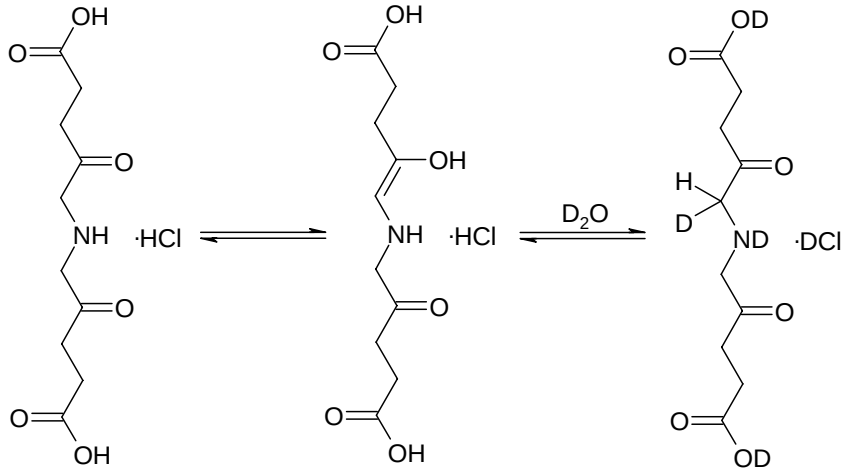


Figure 106 : Equilibre céto-énolique de **13**

Ainsi, les deux singulets à 4.25 et 4.23 ppm de ^{1}H-RMN 400 MHz s'expliquent par la présence des deux composés **13** et **66**. Ceci est confirmé quelques jours plus tard, en faisant la ^{13}C-RMN toujours du même tube. Un multiplet est observé pour le carbone 5 qui correspond bien au couplage carbone-deutérium du composé **67** (Figure 107).

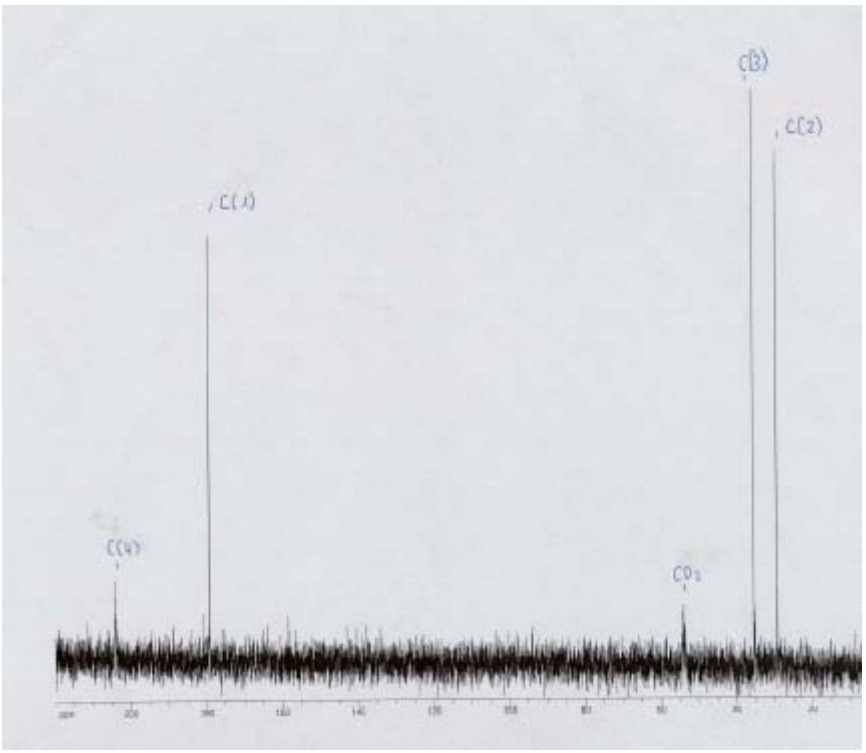


Figure 107 : ^{13}C-RMN 100 MHz de **67**

Afin de prouver cette hypothèse, des spectres ^{1}H-RMN 200 MHz haute température ont été effectués afin de prouver l'échange entre les protons du carbone 5 et les deutériums du solvant (Figure 108). A 20 °C, un singulet est obtenu pour les protons du carbone 5. La mesure effectuée à 50°C montre un déblindage des signaux tandis que pour la mesure à 60°C on observe un léger déplacement mais surtout la diminution du signal. Finalement, un retour à température ambiante entraîne la disparition complète du pic. Malheureusement la résolution n'est pas optimale ceci étant dû à un nombre insuffisant de scans effectués durant la mesure. La figure suivante montre la disparition du pic correspondant aux protons du carbone 5 (pour les graphes en entier voir annexe 8 dans chapitre 12).

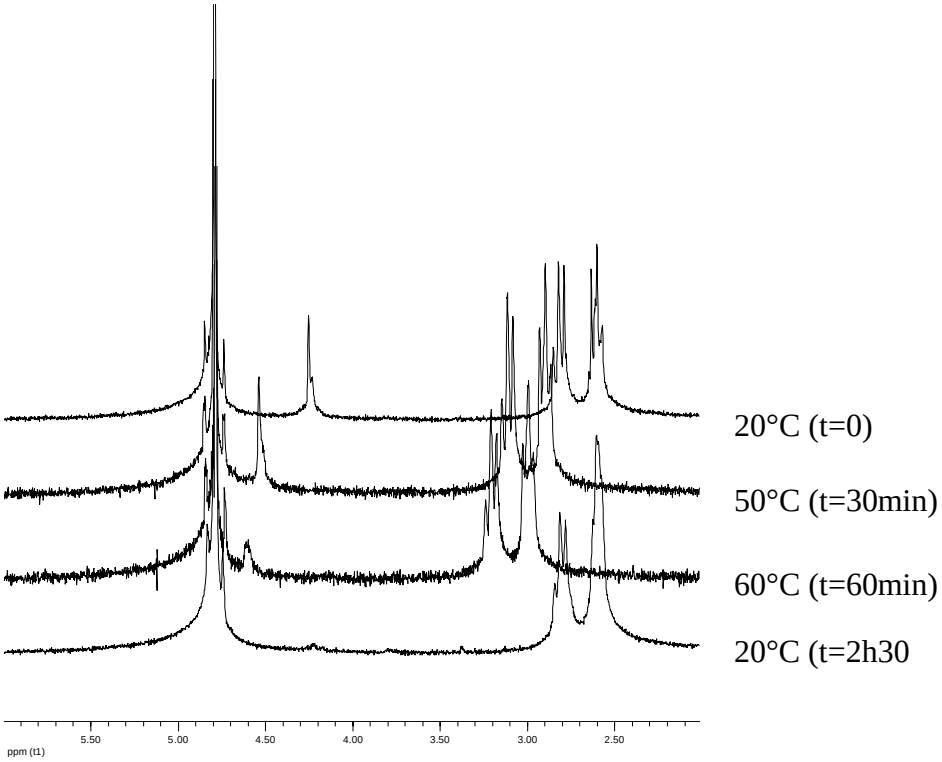


Figure 108 : ^{1}H-RMN 200 MHz de **13** à différentes températures. L'échange proton-deutérium du carbone 5 de **13** est démontré par la disparition du pic correspondant

6.4 Synthèse des trois analogues soufrés 14, 15 et 16

6.4.1 Synthèse du composé thioéther 14

Les thioéthers du type $RCOCH_2SCH_2COR$ ont deux groupements méthyles activés par un groupe carbonyle et un atome de soufre. Les sulfures de dicétone sont facilement préparés par condensation du composé halogénométhyle cétone correspondant avec du sulfure de sodium dans l'éthanol à reflux. Il est également possible de travailler dans l'acétone à température ambiante ou à basse température (Figure 109) [159, 160].

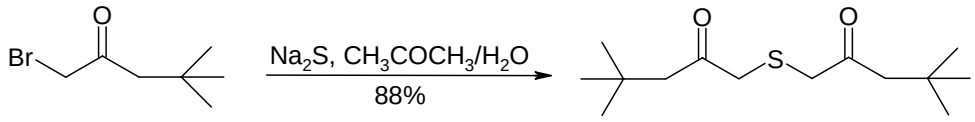


Figure 109 : Synthèse de composés sulfure de dicétone à l'aide de sulfure de sodium

Le précurseur bromé **27** conduit, en présence du sulfure de sodium, au composé **68** attendu. Le sulfure de sodium solubilisé dans H_2O est ajouté à **27** dans l'acétone, à O°C, sous azote, puis le mélange est agité à température ambiante pendant 8h donnant le produit désiré **68** avec un bon rendement (79%) (Figure 110).

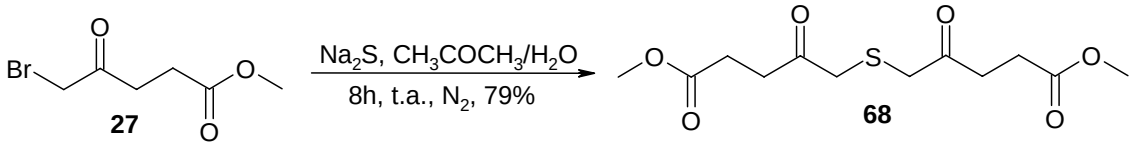


Figure 110 : Synthèse du sulfure de dicétone 68 à l'aide du sulfure de sodium

L'hydrolyse du sulfure de dicétone **68** à l'aide dune solution 6N HCl pendant 2h à 50°C forme l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoique **14** désiré avec un très bon rendement (Figure 111).

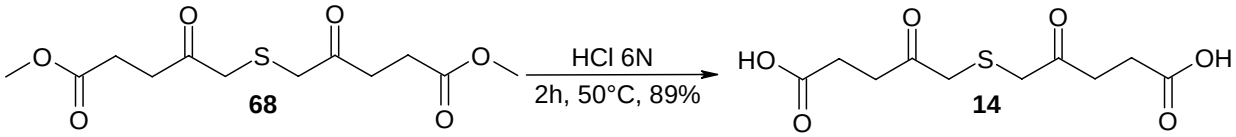


Figure 111 : Synthèse de l'analogue thioéther **14** désiré

6.4.2 Synthèse du composé sulfone 16 et du composé sulfoxyde 15

6.4.2.1 Oxydation des thioéthers en sulfone et en sulfoxyde

Le soufre, étant de la troisième période (possédant des orbitales d), est capable de réaliser une expansion de sa couche de valence de manière à s'accommoder de plus d'électrons que ceux qui sont permis par la règle de l'octet. Les sulfures sont facilement oxydés en sulfoxyde et/ou en sulfone suivant la méthode utilisée. L'oxydation du composé sulfoxyde seul requiert des conditions hautement sélectives, qui ne peuvent pas être appliquées généralement, tandis que l'oxydation complète en sulfone est beaucoup plus facile à réaliser. Des ajustements appropriés des conditions de réactions sont généralement suffisants. Beaucoup de méthodes différentes ont été développées et les plus courantes sont décrites par Madesclaire [161].

L'oxydation de composé sulfure de dibenzyle en sulfoxyde de dibenzyle en utilisant de l'acide nitrique est décrite pour la première fois par Mäcker en 1865 [162]. Les méthodes utilisées sont extrêmement variées. De tous les agents utilisés, trois sont particulièrement efficaces pour l'oxydation d'un thioéther en sulfoxyde de par leur sélectivité raisonnable, leur mise en pratique facile et leurs rendements. Il s'agit du métaperiodate de sodium, de l'acide métachloroperbenzoique (MCPBA) et du iodosobenzène [161].

Nous nous sommes concentrés sur l'acide perbenzoïque et ses dérivés comme agent d'oxydation des thioéthers. En 1928, Lewin fut le premier à décrire l'oxydation des sulfures en sulfoxydes en utilisant l'acide perbenzoïque [163-166]. Cette méthode est depuis fréquemment utilisée. La liaison O-O faible de l'acide perbenzoïque et de ces dérivés, permet l'attaque de substrats riches en électrons tels que les alcènes et les thioéthers. Il en résulte qu'un atome d'oxygène est transféré sur le substrat. L'acide métachloroperbenzoïque (MCPBA) est l'un des agents les plus sélectifs pour l'oxydation des thioéthers en sulfoxyde. Avant l'utilisation de MCPBA, l'acide monoperoxyphthalique (MPP) était fréquemment utilisé comme agent d'oxydation. Le désavantage de ce réactif réside dans le fait qu'il devait être synthétisé à chaque utilisation contrairement à MCPBA qui est commercial. La production commerciale du monoperoxyphthalate de magnésium (MMPP) a permis d'éliminer ce problème et différents types d'oxydation sont possibles [167].

L'oxydation du composé thioéther **68** en présence de MCPBA donne la sulfone **69** correspondante. MCPBA dissout dans CH_2Cl_2 est ajouté à -40°C au composé **68** dans CH_2Cl_2. Le mélange est agité pendant 20 min à -40°C avant de revenir à température ambiante et d'être agité 2h30 de plus. Les premiers essais effectués avec 2.5 équivalents de MCPBA conduisent à la formation de **69** avec un rendement de 47%. Ce dernier peut être augmenté (85%) en utilisant 3.5 équivalents d'oxydant (Figure 112).

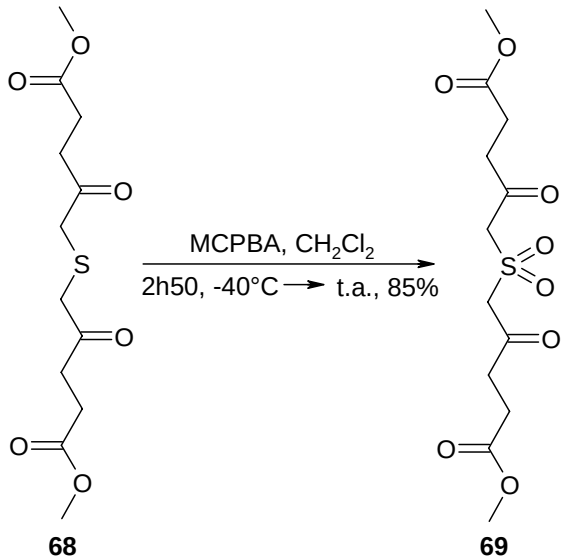


Figure 112 : Synthèse de **69** par oxydation de **68** à l'aide de MCPBA

En variant les conditions, l'oxydation de **68** en sulfoxyde uniquement est possible. Les premiers essais ont été fait en traitant 1.2 équivalents de MCPBA avec **68** pendant 20 minutes à -40°C, puis en laissant revenir à température ambiante et en agitant 30 minutes de plus. Dans ces conditions, le sulfoxyde **70** désiré est obtenu avec un très bon rendement et sans trace de la sulfone **69** (Figure 113).

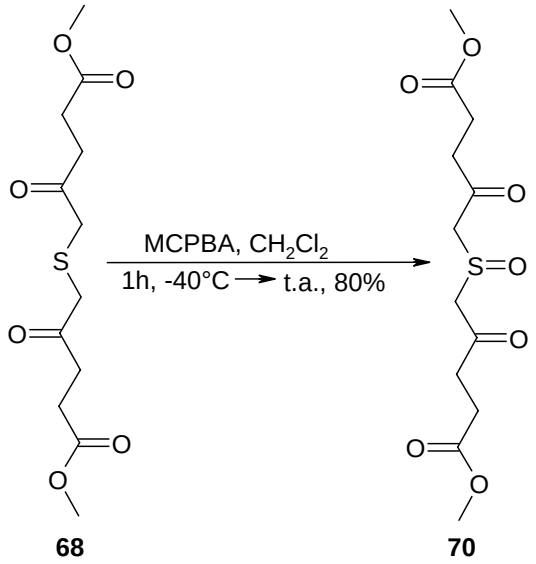
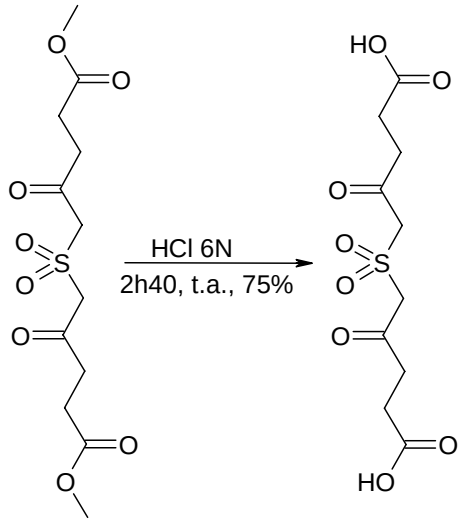


Figure 113 : Synthèse de **70** par oxydation de **68** à l'aide de MCPBA

6.4.2.2 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique **16**

L'hydrolyse des deux fonctions esters du sulfone **69** par HCl 6N pendant 2h à température ambiante conduit à l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique **16**. En laissant agiter pendant 2h40, le rendement de **16** augmente (63% à 75%) (Figure 114).

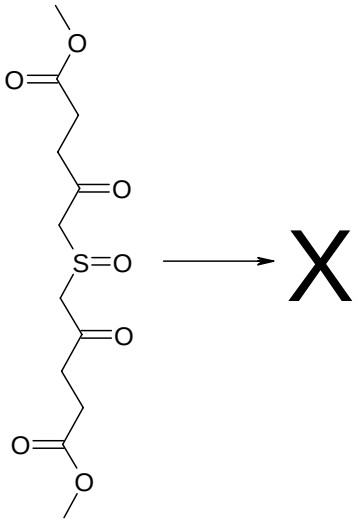


69 **16**

Figure 114 : Hydrolyse de **69** à l'aide de HCl 6N

6.4.2.3 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique **15**

Dans le tableau ci-dessous sont résumées les conditions infructueuses d'hydrolyse des fonctions esters en fonctions acides carboxyliques, en présence d'une fonction sulfoxyde (Figure 115). Le traitement du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo pentanoate de méthyle **70** par HCl 6N pendant une ou quatre heures, ne permet pas l'hydrolyse des fonctions esters (entrées 1 à 3). Dans la littérature, l'hydrolyse des fonctions esters en présence d'une fonction sulfoxyde est possible en utilisant des conditions basiques classiques [168, 169]. Malheureusement, l'utilisation d'une solution 10% de NaOH en présence de **70** ne conduit pas à l'hydrolyse souhaitée (entrée 4). Deux autres conditions douces de saponification des fonctions esters ont été essayées, malheureusement sans résultat. La première est l'utilisation d'hydroxyde de lithium en présence de THF et d'eau [170, 171] (entrée 5). Et la deuxième est l'utilisation d'hydroperoxyde de lithium dans le THF [172, 173] (entrées 6 et 7). L'hydroperoxyde de lithium est préparé in situ par traitement de l'hydroxyde de lithium avec de l'eau oxygénée. L'utilisation d'iodure de lithium (entrées 8 et 9) n'a rien donné non plus [174, 175].

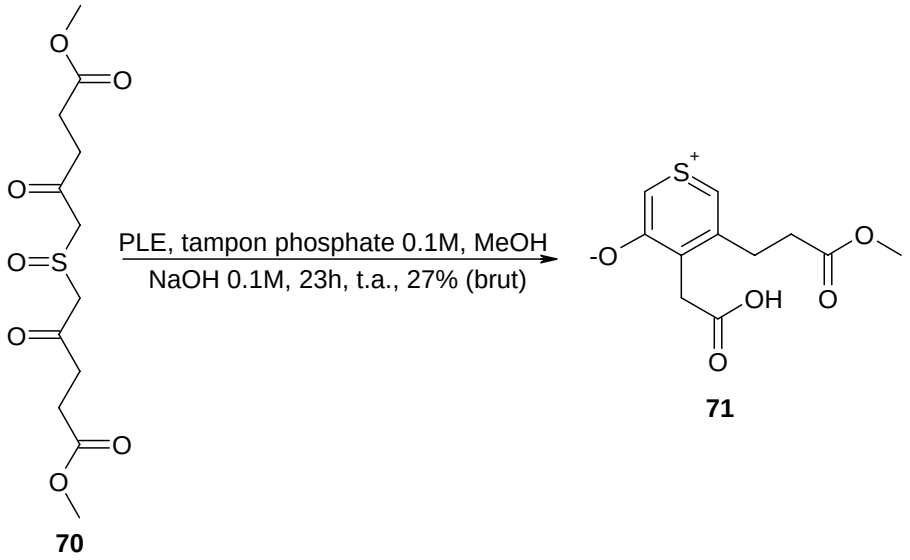


70

Entré	Réactifs	Solvants	Température	Temps
1	HCl 6N	-	t.a.	1h
2	HCl 6N	-	t.a.	4h
3	HCl 6N	-	60°C	1h30
4	NaOH 10%	-	t.a.	1h
5	LiOH	THF/H_2O	t.a.	2h
6	$LiOH/H_2O_2$ (N_2)	THF/H_2O	t.a.	50min
7	$LiOH/H_2O_2$ (N_2)	THF/H_2O	t.a.	15min
8	LiI (Ar)	DMF	reflux	1h
9	LiI (Ar)	DMF	reflux	28h

Figure 115 : Différentes conditions d'hydrolyse testées sur **70**

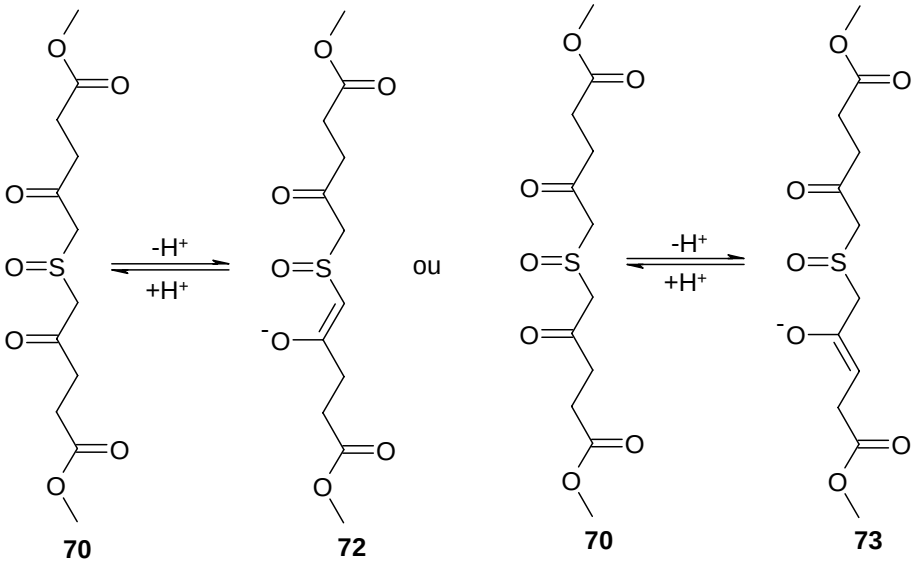
Finalement, nous nous sommes concentrés sur l'hydrolyse enzymatique des esters en acides carboxyliques, déjà utilisée par F. Stauffer durant sa thèse [176]. **70** est dissout dans un tampon phosphate à l'aide du minimum de méthanol. De l'estérase de foie de porc (PLE) est alors ajoutée à la solution et l'hydrolyse enzymatique est indiquée par une diminution du pH. Le pH est maintenu à 7.6 par l'addition d'une solution de NaOH 0.1 M à l'aide d'un pH-stat. Après 23 h de réaction à température ambiante, le pH est stable à 7.6 ce qui indique la fin de la réaction. 0.89 équivalent de NaOH 0.1 M a été ajouté. Cette réaction donne lieu à la formation du composé aromatique **71** avec un rendement brut de 27% (Figure 116). La réaction est faite une deuxième fois en utilisant une solution de NaOH 0.05 M pour maintenir le pH à 7.6. Cette fois-ci 1.4 équivalents de NaOH 0.05 M ont été nécessaires pour mener la réaction à son terme. Par contre aucun rendement brut n'a pu être calculé, au vue de la quantité importante d'impuretés présentes dans le composé **71**.



70 **71**

Figure 116 : Transformation enzymatique de **70**

Le composé **70** peut former l'énolate à deux endroits, avec préférence pour la formation de l'énolate **72**, car les protons sur le carbone 5 sont plus acides que ceux du carbone 3 (Figure 117).



70 **72** **70** **73**

Figure 117 : Tautomérie céto-énolique de **70**

L'attaque de l'énolate **73** sur la cétone permet la formation d'un cycle à 6 stable **74**. La molécule se transforme ensuite pour donner le composé aromatique **71** (Figure 118).

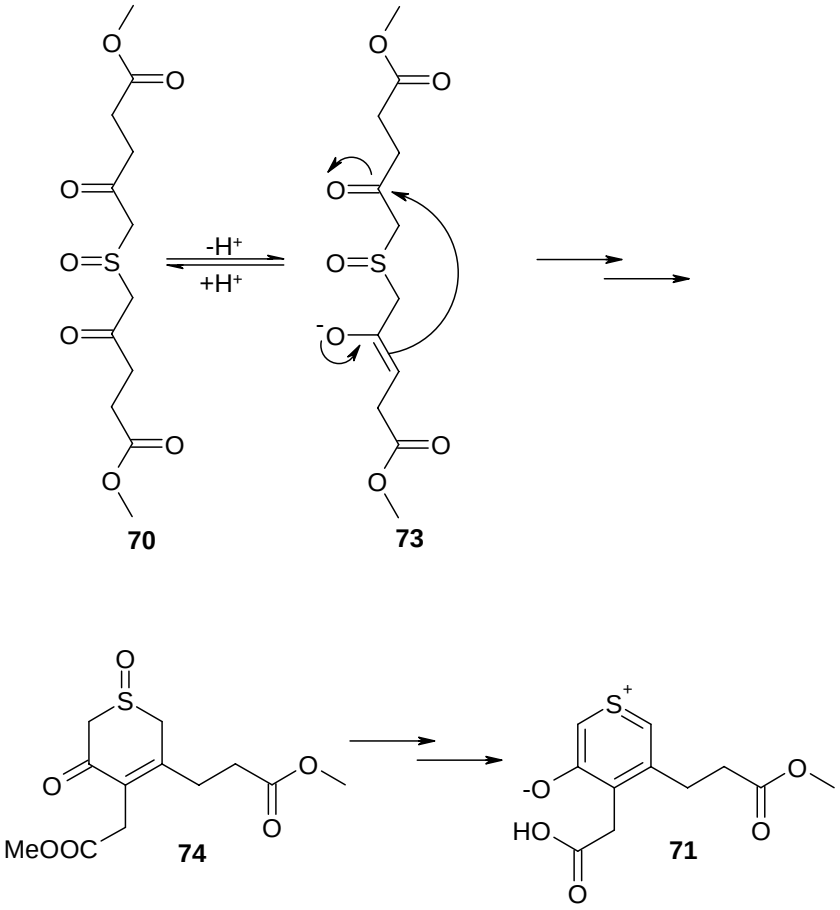


Figure 118 : Transformation de **70** en **71** à l'aide de PLE

L'hydrolyse de l'ester de la chaîne partant du carbone 3 peut s'expliquer par la stabilisation qu'apporte la formation de la liaison hydrogène de l'acide carboxylique avec l'oxygène porté par le cycle aromatique (Figure 119). Cette stabilisation supplémentaire n'est pas possible si l'ester de la chaîne partant de carbone 2 est hydrolysé.

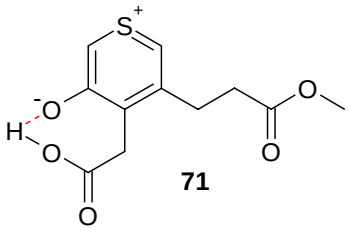
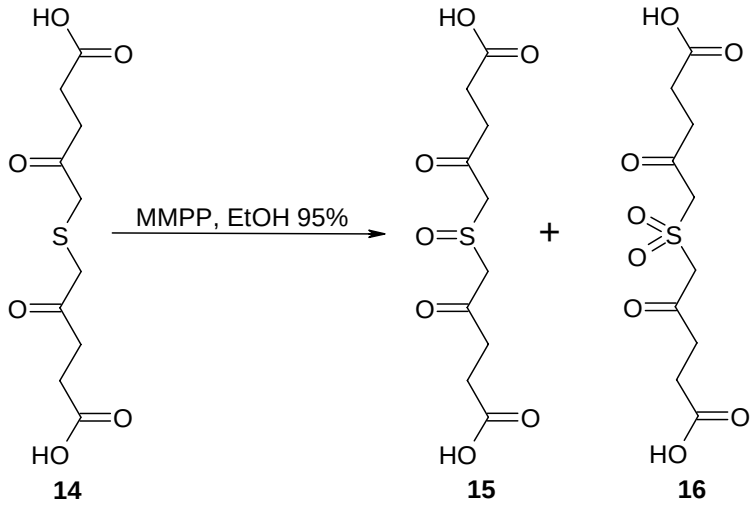


Figure 119 : Liaison hydrogène entre l'acide carboxylique et l'oxygène voisin du composé **71**

6.4.2.4 Oxydation de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoique **14**

Finalement, nous avons essayé d'oxyder le thioéther diacide **14** pour donner le sulfoxyde **15** désiré. Dans un premier temps, nous avons appliqué les mêmes conditions utilisées pour les oxydations faites dans le chapitre précédent. Le traitement de **14** avec MCPBA n'aboutit pas à l'oxydation en sulfoxyde. Par contre, l'oxydant MMPP est efficace vis-à-vis de la molécule **14** (Figure 120). Cette dernière est ajoutée à une solution à 95% d'éthanol. Le mélange hétérogène est chauffé à 40°C jusqu'à dissolution complète du solide. Ensuite, 1.5 équivalents de MMPP est ajouté et le mélange est agité pendant 20h à 40°C pour donner un mélange **15**/**16** contenant majoritairement **16** (entrée 1). Dans les essais suivant, **14** est ajouté à l'éthanol 95%, puis le mélange hétérogène est chauffé légèrement au sèche-cheveux jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Alors, 0.8 équivalents de MMPP sont ajoutés et après 25 minutes d'agitation à température ambiante, un mélange de **15**/**16** est obtenu, contenant cette fois-ci majoritairement **15** (entrée 2). Une amélioration est encore obtenu avec un temps d'agitation de 20 min (entrée 3). Le mélange est composé de 96% de sulfoxyde **15** et de 4% de sulfone **16**, avec un rendement de 84% pour **15**.



Entré	Equivalent de MMPP	Température	Temps	15:16
1	1.5	40°C	20h	37:63
2	0.8	t.a.	25 min	87:13
3	0.8	t.a.	20 min	96:4

Figure 120 : Synthèse de **15** par oxydation de **14** à l'aide de MMPP

Des essais de purification ont été tentés sur le mélange **15/16** (96:4). Tout d'abord des recristallisations ont été faites dans le méthanol mais aucune séparation des deux produits n'a pu être possible. Une séparation par chromatographie sur colonne de silice a aussi été effectuée mais sans succès. De plus, par cette méthode, il y a énormément de perte de produits sur la silice. Nous avons donc décidé que les tests enzymatiques se ferraient sur le mélange

15/16 (96:4). Comme les tests enzymatiques seront réalisés sur le composé de type sulfone **16** pur, une comparaison du potentiel d'inhibition avec le mélange **15/16** (96:4) ainsi qu'une estimation du potentiel d'inhibition de **16** seront très certainement possibles.

7 Résultats

7.1 Purification de la PBGS

La purification de l'enzyme issue de *Pseudomonas aeruginosa* est basée sur la méthode de purification mise au point par le Dr. E. Jaffe (Philadelphia, USA). Ce travail ainsi que tous les tests cinétiques ont été effectués dans les laboratoires du Prof. D. Jahn et du Dr. N. Frankenberg-Dinkel à la Technische Universität Carolo-Wilhelmina de Braunschweig (Allemagne).

Le vecteur d'expression pLM_PBGS a été construit et fourni par Linda Stith et Eileen K. Jaffe (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA). Le gène *P. aeruginosa hemB*, codant pour la PBGS, est excisé depuis le plasmide pGEX*hemb* [76] avec les deux enzymes de restrictions (*Nde*I et *Bam*HI) *via* mutagenèse (QuickChange). Ce gène est ensuite introduit dans le vecteur plasmide d'*Escherichia coli* (pET3a) générant ainsi pLM_PBGS. L'intégrité du plasmide construit est vérifiée par la détermination de la séquence ADN.

La production de la protéine est faite dans les conditions suivantes: les précultures sont constituées de 500 ml de milieu Luria-Bertani (LB) contenant de l'ampicilline (100 µl/mg) et du glucose (0.4%) ainsi que d'une colonie BL21 (λDE3) contenant pLM_PBGS récupérée sur la boîte de Pétri. Les solutions sont incubées une nuit sous agitation à 37°C, jusqu'à ce que la solution devienne trouble. Après centrifugation, les culots avec les nouvelles colonies sont transférés dans une nouvelle culture de 500 ml de LB contenant de l'ampicilline (100 µl/mg) et sont induits en présence de thiogalactoside d'isopropyle (IPTG) (100 µM) pendant une nuit sous agitation à 18°C. Après centrifugation, les nouveaux culots peuvent être purifiés. La purification se déroule selon la manière décrite ci-dessous (Figure 121).

Les cellules sont lysées lorsque le culot est resuspendu dans le tampon 2 (pH=8.0, 50 mM de tris(hydroxyméthyl)-aminométhane, 100 mM de NaCl, 0.05% d'octyl-phénolpolyéthylèneglycoléther), 10% de t-octylphénoxypolyéthoxyéthanol X-100, 5 mM de $MgCl_2$). Une pastille d'inhibiteur de protéase est dissoute dans la solution. La solution est ensuite dissociée à l'aide de la French Press et les cellules mortes sont enlevées par centrifugation.

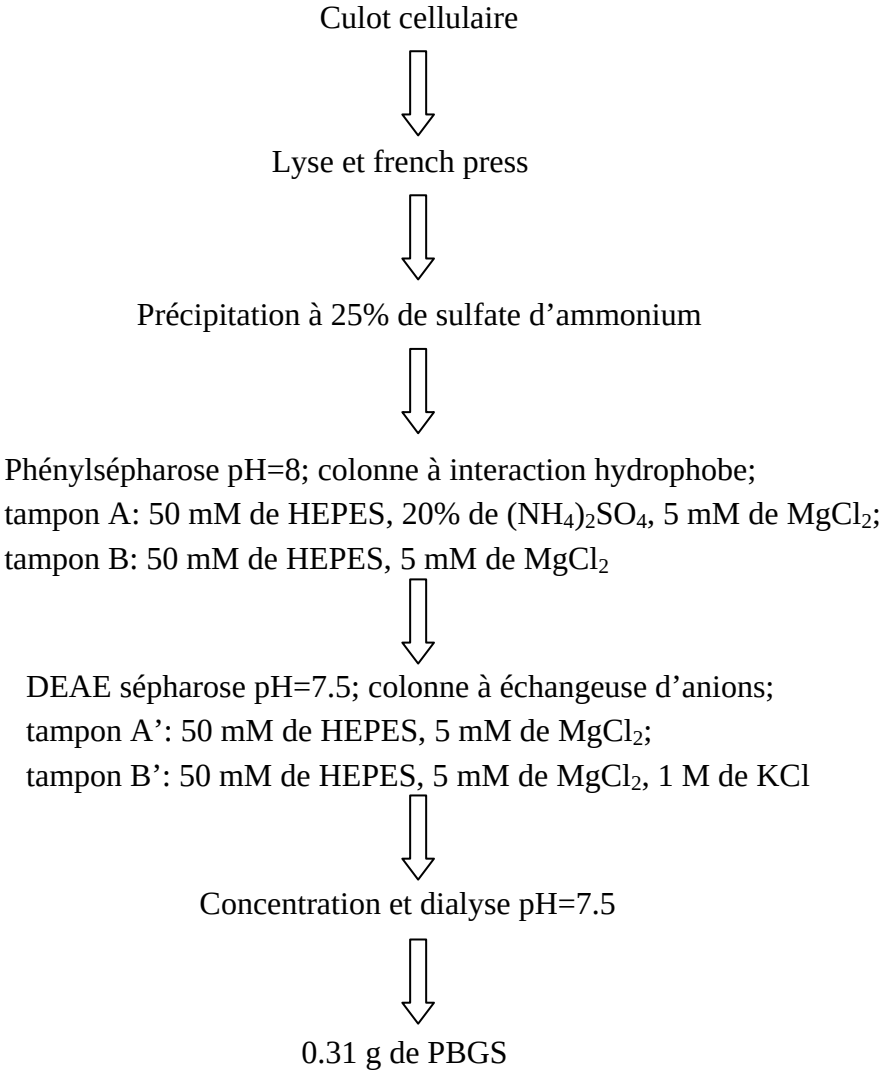
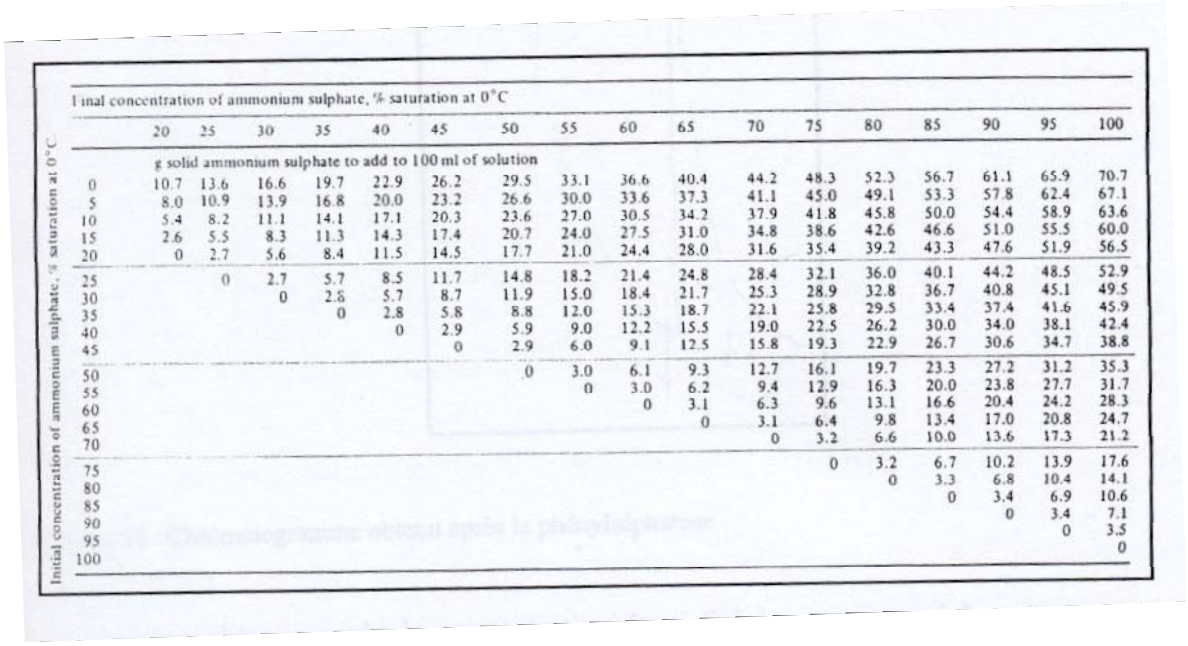


Figure 121 : Processus de purification

L'étape suivante consiste en une précipitation à 25% de sulfate d'ammonium. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter était calculée par rapport au tableau ci-dessous (Tableau 5) relativement à une saturation totale à 0°C.



Initial concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C	Final concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	g solid ammonium sulphate to add to 100 ml of solution																
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
55								0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7
60									0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
65										0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7
70											0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75												0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80													0	3.3	6.8	10.4	14.1
85														0	3.4	6.9	10.6
90															0	3.4	7.1
95																0	3.5
100																	0

Tableau 5 : Quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour obtenir la concentration désirée

Le sel est ajouté par petite portion sous agitation à 4°C puis laissé précipiter, toujours sous agitation, une nuit à 4°C. Le culot obtenu par centrifugation est dissout dans 10 ml du tampon B de la première colonne de purification (pH=8.0, 50 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthane sulfonique (HEPES), 5 mM de $MgCl_2$). Ce volume est chargé sur une colonne apolaire (phénylsépharose). L'élution est effectuée avec le tampon A (50 mM de HEPES, 5 mM de $MgCl_2$, 20% de sulfate d'ammonium) complété par un gradient de 0% à 100% de tampon B. L'ADN et l'ARN ne sont pas retenus par cette colonne et donc éluent en premier. La PBGS, qui est une protéine très hydrophobe, est beaucoup plus retenue par la colonne. Son élution est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm (Figure 122).

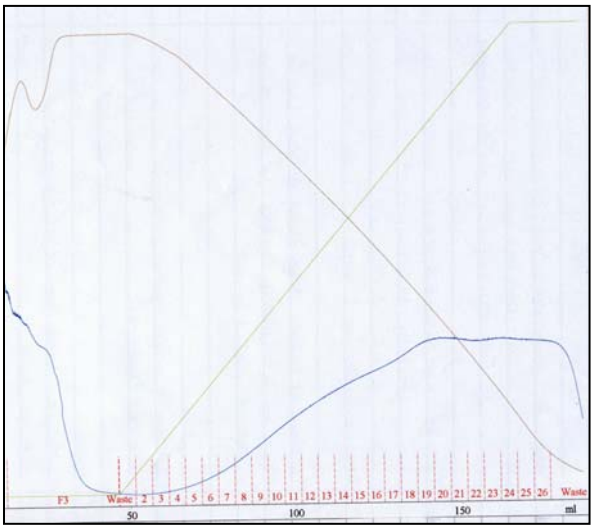


Figure 122 : Chromatogramme obtenu pendant la colonne de phénylsépharose. Présence des protéines à 280 nm (bleu), gradient du tampon B (en vert) et conductivité (en brun)

La présence de la PBGS dans les tubes est vérifiée par SDS-PAGE 12.5% (Figure 123).

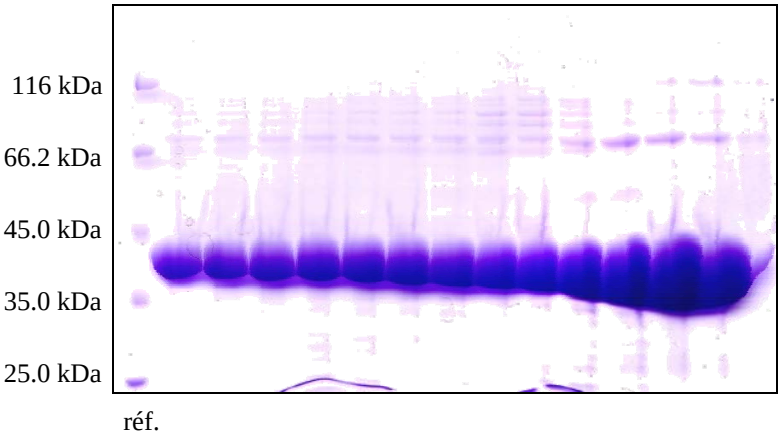


Figure 123 : Présence de l'enzyme determinée par SDS-PAGE après la colonne de phénylsépharose. La PBGS est présente dans toutes les fractions

Les tubes contenant la PBGS sont réunis et directement injectés sur la deuxième colonne de purification (DEAE sépharose) qui est une colonne à exclusion de taille. L'élution est effectuée avec un tampon A' (50 mM de HEPES, 5 mM de $MgCl_2$) complété par un gradient de 0% à 100% de tampon B' (50 mM de HEPES, 5 mM de $MgCl_2$, 1 M de KCl). L'élution de la PBGS est à nouveau suivie à 280 nm (Figure 124).

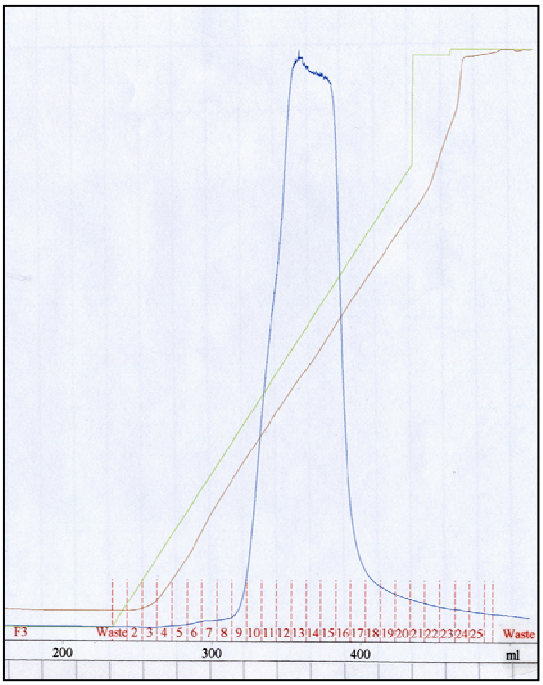


Figure 124 : Chromatogramme de la colonne de DEAE sépharose. Présence des protéines à 280 nm (en bleu), gradient du tampon B' (en vert) et conductivité (en brun)

La présence de la PBGS dans les tubes est à nouveau vérifiée par SDS-PAGE 12.5% (Figure 125).

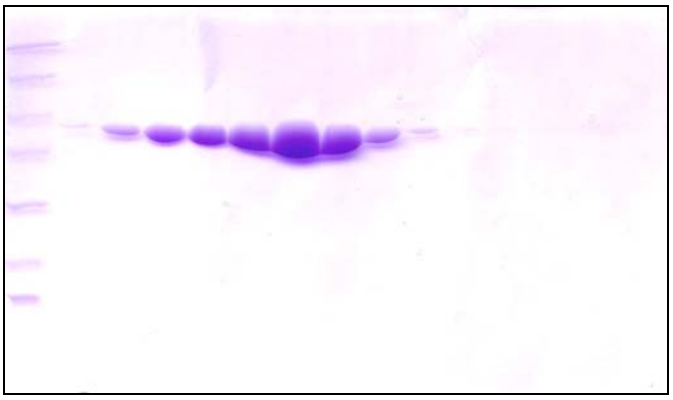


Figure 125 : Présence de l'enzyme determinée par SDS-PAGE après la colonne DEAE sépharose. L'enzyme est présente dans les fractions 9 à 18

Les fractions contenant la PBGS sont réunies et la solution obtenue est ultra-concentrée jusqu'à un volume de 15 ml à l'aide d'une membrane. Finalement, une dialyse est effectuée pendant une nuit à 4°C, afin d'éliminer tous les sels qui sont entrés en contact avec la protéine.

La détermination de la quantité de protéine se fait en mesurant l'absorption de la solution contenant la protéine, à 280 nm dans des cuvettes en quartz. Des dilutions sont nécessaires afin d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0.1 et 0.9.

La concentration se calcule à partir de la relation Lambert-Beer :

$$A = c \cdot d \cdot \varepsilon \qquad (44)$$

A : absorbance à 280 nm
c : concentration en protéine [M]
d : largeur de la cuve, d = 1 cm
ε : coefficient d'extinction, ε = 28020 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

L'absorbance est calculée pour deux dilutions semblables (1:100), et pour une dilution (1:5). Une moyenne sur les trois mesures est faite:

A (moyen) = 15.47
PM (dimère protéine) = 37800 g/mol

c = 552.1 μM ou c = 20.87 mg/ml

A partir d'un litre de culture, 0.31 g de PBGS est isolé.

7.2 Détermination des paramètres de la PBGS

7.2.1 Activité spécifique

L'activité spécifique de la PBGS est déterminée à partir de 23 concentrations différentes entre 0.001 et 1 μM. Les tests sont faits pour une concentration saturante (K_M = 0.114 mM) et fixe en substrat (8 mM).

L'activité spécifique se calcule à partir de l'équation (45) :

$$SA = \frac{V_{max}}{[PBGS]} \qquad (45)$$

SA : activité spécifique en [μmol PBG/mg PBGS/h]
V_{max} : vitesse maximale en [μM/h]
[PBGS] : quantité de protéine en [mg/ml]

La vitesse maximale se calcule à partir de l'équation (43) :

$$V_{max} = \frac{A_{max} \cdot n \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l \cdot t} \qquad (43)$$

A_{max} = absorbance maximale à 555 nm
n = facteur de dilution, n = 4
ε = coefficient d'extinction, ε = 60200 $cm^{-1} \cdot M^{-1}$
l = largeur de la cuve, l = 1 cm
t = temps [h]

La vitesse maximale est déterminée pour un temps de 15 minutes, l'équation (43) devient donc

$$V_{max} = \frac{A_{max} \cdot 4 \cdot 10^6}{60200 \cdot 1} \cdot 4 \qquad (46)$$

Le graphe de l'activité spécifique en fonction de la concentration en PBGS donne une courbe sigmoïdale (Figure 126).

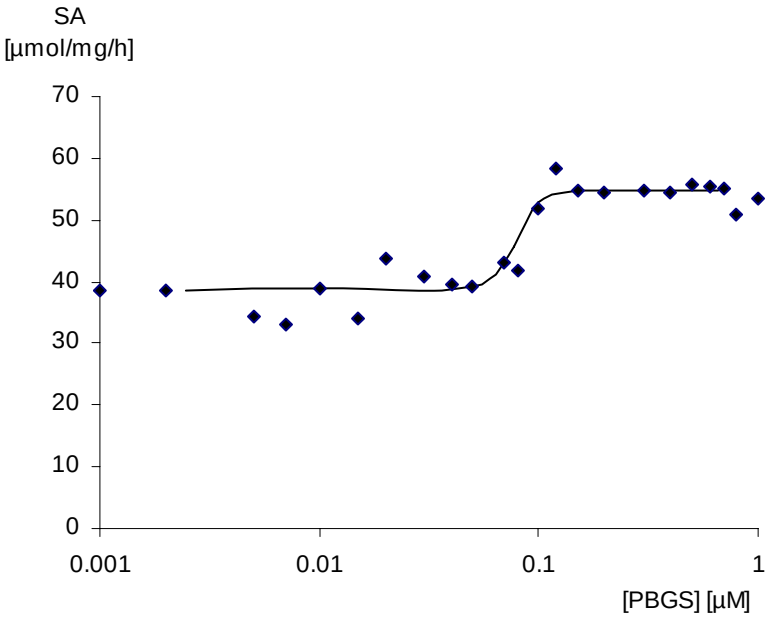


Figure 126 : Activité spécifique en fonction de la concentration en PBGS

7.2.2 Détermination de K_M et k_{cat} de la PBGS

Les constantes K_M et k_{cat} (voir chapitre 5) de la PBGS sont déterminées à partir de 10 concentrations différentes (entre 0 et 4 mM) en substrat. Les tests sont faits avec une concentration fixe en PBGS (4 μg/ml).

La constante de Michaelis-Menten, K_M, se calcule à partir de l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [ALA]}{K_M + [ALA]} \qquad (1)$$

K_M : constante de Michaelis-Menten en [mM]
[ALA] : concentration en substrat en [mM]
v : vitesse de réaction en [mM/h]
V_{max} : vitesse maximale en [mM/h]

Le «turnover number», k_{cat} se calcule à l'aide de l'équation suivante :

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[PBGS]} \qquad (3)$$

k_{cat} : en [1/s]
[PBGS] : concentration en PBGS en [mM]

Les résultats obtenus sont les suivants :

K_M = 0.114 mM
k_{cat} = 0.654 1/s

Ces deux valeurs sont comparables aux autres valeurs de PBGS purifiées jusqu'à maintenant [39, 57, 76, 177].

7.3 Classification des inhibiteurs

Il est important de pouvoir classer les inhibiteurs selon un critère présélectionné, c'est-à-dire en fonction de leur qualité (excellent, bon, moyen, faible et non inhibiteur). Cette approche a été utilisée dans notre groupe en premier par M. Henz [83] et ensuite repris par E. Homberger-Zizzari [57]. La constante que nous avons utilisée comme standard est K_M = 114

μM. Un excellent inhibiteur présente un K_I dans le même ordre de grandeur que la constante K_M.

Le tableau suivant (Tableau 6) donne une bonne idée de la puissance d'un inhibiteur par rapport au K_I observé :

Qualité de l'inhibition	**Constante d'inhibition K_I**
inhibiteur excellent	< 100 μM
inhibiteur bon	entre 100 μM et 1000 μM
inhibiteur moyen	entre 1000 μM et 10'000 μM
inhibiteur faible	> 10'000 μM

Tableau 6 : Classification des inhibiteurs

7.4 La procédure des tests d'inhibition

La procédure des tests d'inhibition est toujours la même, les seuls changements d'un test à l'autre sont les concentrations en inhibiteurs et en substrat et le temps de préincubation.

Les concentrations en enzyme et en substrat utilisées lors des différents tests sont comparables aux études précédentes [45, 46, 97, 178]. La concentration de l'inhibiteur est choisie de manière à ce que les valeurs d'absorbance se situent dans un intervalle compris entre 0.1 et 0.9.

Les tests se déroulent selon le processus décrit ci-dessous (Figure 127).

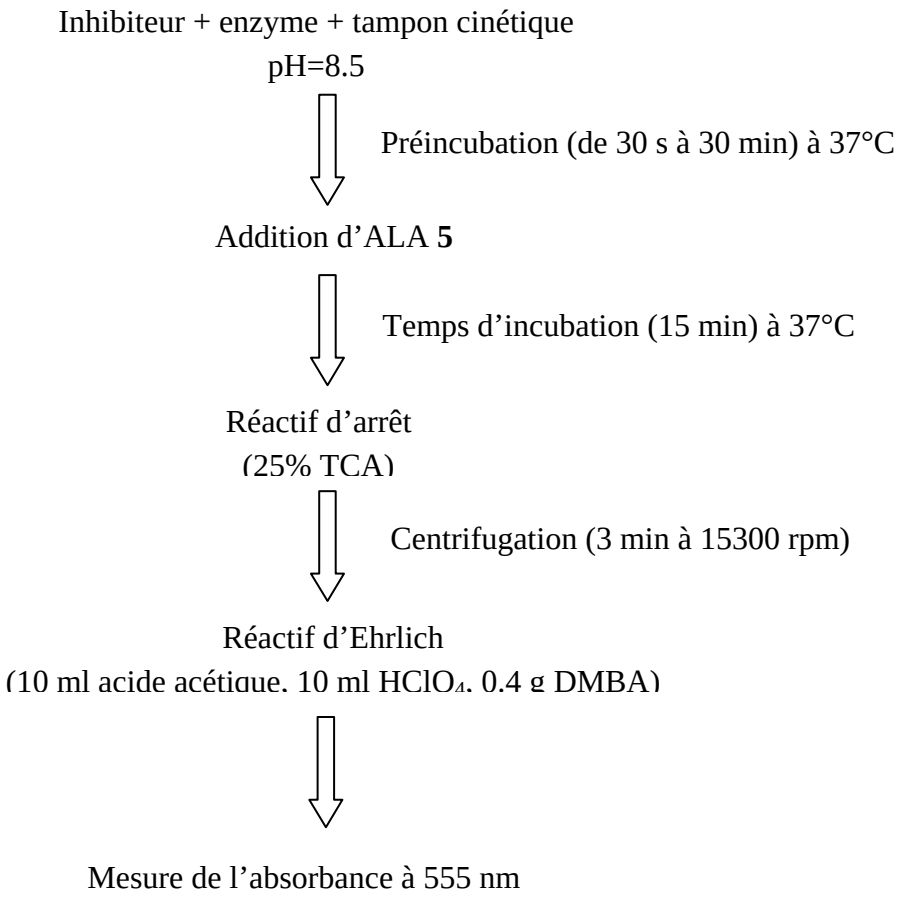


Figure 127 : Test d'inhibition

La première partie de l'expérience consiste à préincuber dans un thermostat à 37°C, l'inhibiteur avec l'enzyme dans le tampon cinétique à un pH=8.5 (100 mM de 1,3-bis[tris-(hydroxyméthyl)méthylamino]propane (BTP) et 10 mM de chlorure de magnésium). Une fois le temps de préincubation atteint, des quantités variables mais prédéfinies d'ALA **5** sont ajoutées. Le temps d'incubation est fixé à 15 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par adjonction du mélange réactionnel dans un même volume d'une solution à 25% d'acide trichloroacétique. Une fois la solution centrifugée (3 min à 15'300 rpm), le surnageant réagit avec un volume équivalent du réactif d'Ehrlich (0.4 g de *p*-diméthylaminobenzaldehyde, 10 ml d'acide acétique et 10 ml d'acide perchlorique). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 555 nm et correspond à la formation du complexe entre le réactif d'Ehrlich et le porphobilinogène **6** (Figure 128). Les solutions obtenues présentent des dégradés de rose et l'absorbance est proportionnelle à la quantité de porphobilinogène **6** formé.

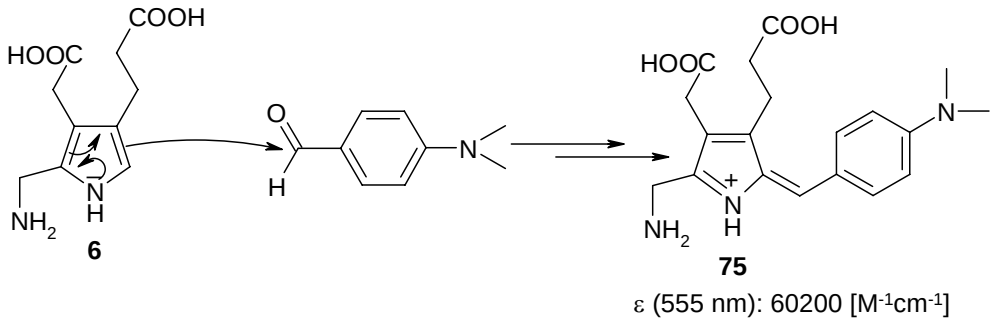


Figure 128 : Réaction du porphobilinogène **6** avec le réactif d'Ehrlich

Le chromophore **75** obtenu montre un coefficient d'extinction de 60200 $cm^{-1} \cdot M^{-1}$ à 555 nm.

La vitesse de la réaction, v est définie par les valeurs d'absorbance obtenues lors des tests et est donnée par la relation suivante :

$$v = \frac{n \cdot A \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l \cdot t} \qquad (43)$$

où
A : absorbance à 555 nm
n : facteur de dilution, n = 4
ε : coefficient d'extinction, ε = 60200 $cm^{-1} \cdot M^{-1}$
l : largeur de la cuve, l = 1cm
t : temps d'incubation, t = 15 min

7.5 Détermination des valeurs IC_{50}

La valeur IC_{50} correspond à la concentration en inhibiteur pour laquelle la réaction enzymatique est inhibée à 50%. La détermination de cette valeur est un moyen rapide afin d'avoir un ordre de grandeur des concentrations en inhibiteur nécessaire pour inhiber la formation du PBG **6**. Ces tests se font à des concentrations en substrat (2 mM) et en enzyme (4 μg/ml) fixes et avec un temps de préincubation de 30 minutes. Les treize concentrations de l'inhibiteur varient de 125 mM à $125 \cdot 10^{-6}$ mM.

La valeur IC_{50} est calculée à partir de l'équation suivante :

$$A = \frac{A_{max}}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \qquad (47)$$

où

A : absorbance à 555 nm
IC_{50} : concentration en inhibiteur pour une inhibition de 50% en [mM]
[I] : concentration en inhibiteur en [mM]

Assumant un comportement coopératif des inhibiteurs, comme cela est souvent le cas pour les inhibitions d'enzymes multimères comme la PBGS, un coefficient de coopérativité, h, est ajouté à l'équation (47) :

$$A = \frac{A_{max}}{1+\left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^{h}} \qquad (48)$$

où
h : coefficient de coopérativité, h=1 pas de coopérativité
h>1 coopérativité positive
h<1 coopérativité négative

Les valeurs IC_{50} et h ont été calculées afin de donner les meilleurs résultats en fonction de l'équation (48), en utilisant les régressions de sigmaplot8 et sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 7).

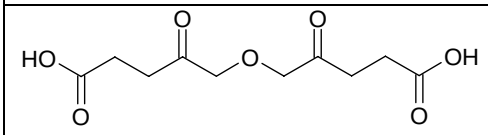
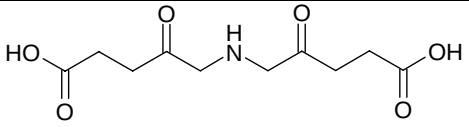
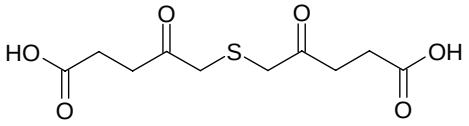
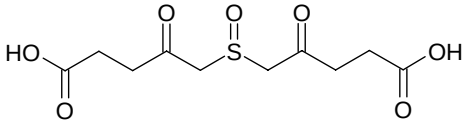
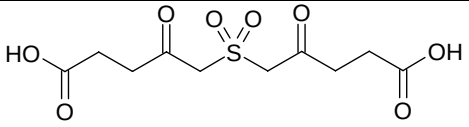
Structure	**Composé**	**IC_{50} [mM]**	**Coefficient de coopérativité h**
	**12**	0.96	1.12
	**13**	0.31	0.95
	**14**	0.34	1.29
	**15**	38.4	0.64
	**16**	9.94	1.62

Tableau 7 : Résultats des valeurs IC_{50}

Les graphes de l'absorbance en fonction de la concentration en inhibiteur pour la détermination des valeurs IC_{50} sont représentés dans la figure suivante (Figure 129).

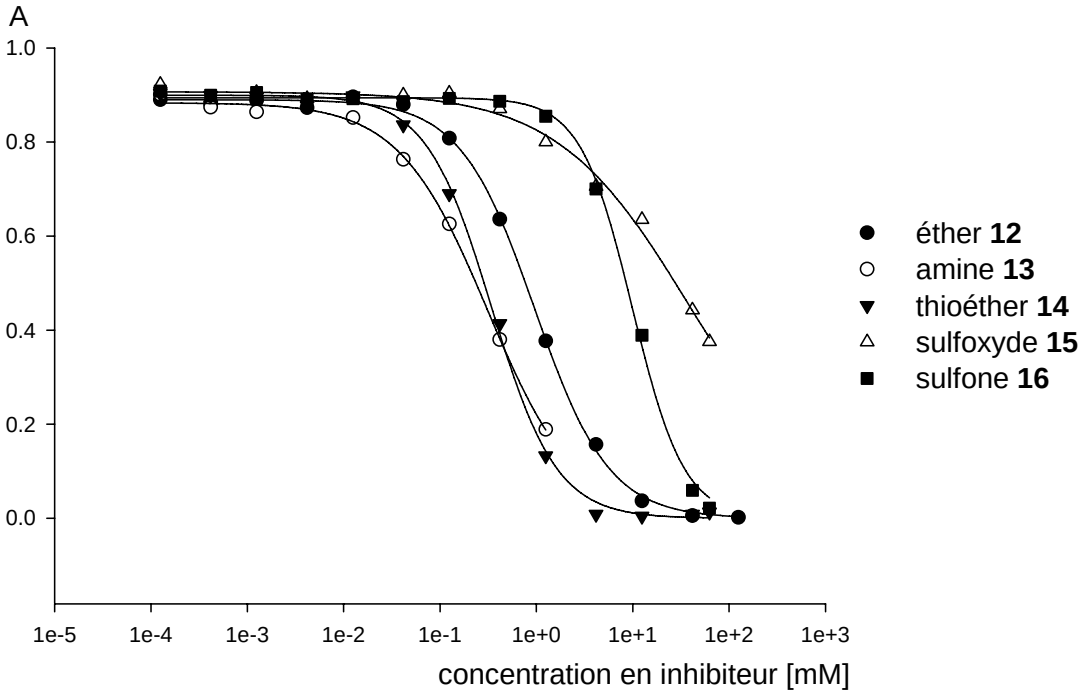


Figure 129 : Graphe représentant l'absorbance en fonction de la concentration en inhibiteur afin de déterminer les valeurs IC_{50}

Pour les composés amine **13** et sulfoxyde **15**, les valeurs pour les concentrations supérieures à 6.25 et 62.5 mM respectivement n'ont pas pu être mesurées à cause de problèmes de solubilité.

Les meilleurs inhibiteurs de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* sont les composés éther **12**, amine **13** et thioéther **14**. Ces trois composés sont des inhibiteurs encore plus efficaces que l'acide 4,7-dioxosébacique **22** dont la valeurs IC_{50} est de 2.1 mM pour la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* [45]. Ces trois composés ont une fonction centrale (*linker*) relativement petite. Les fonctions amine et éther sont capables de former des liaisons hydrogène avec des acides aminés présents au site actif de l'enzyme. La fonction éther est un accepteur de liaisons hydrogène tandis que la fonction amine peut être soit accpeteur soit donneur de liaisons hydrogène suivant son état de protonation. La fonction thioéther peut également former des liaisons hydrogène mais ces dernières sont beaucoup moins polarisées que celles observées avec les atomes azote ou oxygène. Le sulfoxyde **15** et la sulfone **16**, comprenant des linker accepteurs de liaisons hydrogène, sont des inhibiteurs un peu plus faibles. Ceci peut s'expliquer par le fait que le pont qui relie les deux groupements acide lévulinique est plus encombrant. Les deux groupements semblent donc avoir plus de mal à s'intégrer dans le site actif de l'enzyme et par conséquent, ces deux composés **15** et **16** semblent moins bien reconnus au site actif et sont donc moins efficaces pour inhiber la réaction.

Ces résultats peuvent prudemment être interprétés dans le sens d'indiquer la présence dans le site actif, d'un groupement capable de faire des liaisons hydrogène. L'option de pouvoir former ces liaisons hydrogène semble être nécessaire pour une excellente reconnaissance au site actif de l'enzyme, si l'on compare nos résultats avec l'acide 4,7-dioxosébacique **22**. Les composés **12-14** semblent avoir atteint la grandeur optimale de cette classe d'inhibiteur diacide dicétone.

Comme ces valeurs IC_{50} ne donnent pas de renseignements sur le mode d'inhibition, le pas suivant est donc de déterminer la constante d'inhibition et le type d'inhibition. Pour permettre ces analyses, il a d'abord fallu déterminer si le temps de préincubation avec l'enzyme a une influence sur les inhibiteurs **12- 16**, comme cela fut démontré pour l'acide 4,7-dioxosébacique **22** [45].

7.6 Détermination de l'influence du temps de préincubation sur les tests d'inhibitions

La deuxième étape consiste à savoir si les inhibiteurs sont dépendants du temps. Pour ce faire, les concentrations en enzyme (4 µg/ml), en substrat (2 mM) et en inhibiteur (valeur IC_{50}) sont fixes. Seul le temps de préincubation varie (entre 30 secondes et 30 minutes).

Le graphe suivant montre l'influence du temps sur les inhibiteurs **12-16** (Figure 130).

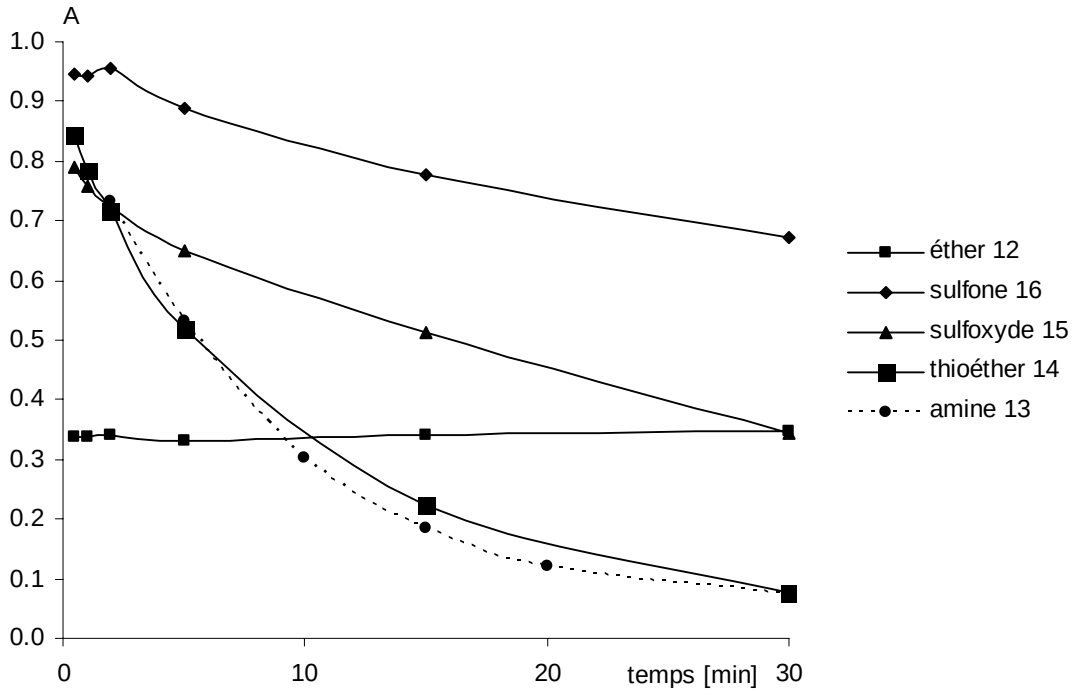


Figure 130 : Graphe de l'absorbance en fonction du temps pour les différents inhibiteurs

Le tableau suivant résume l'influence du temps sur les inhibiteurs (Tableau 8).

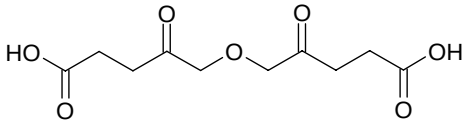
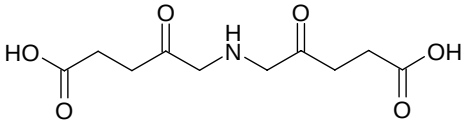
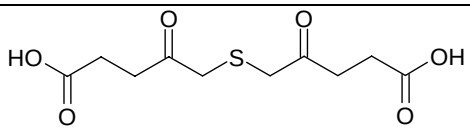
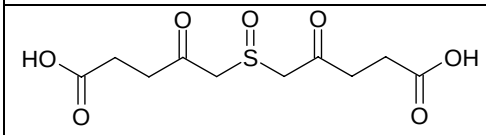
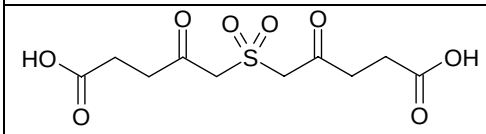
Structure	Composé	Temps
	**12**	Indépendant
	**13**	Dépendant
	**14**	Dépendant
	**15**	Dépendant
	**16**	Dépendant

Tableau 8 : Détermination de l'influence du temps sur les inhibiteurs

D'après les résultats, seul le composé **12** est indépendant du temps, ce qui est très surprenant car cet inhibiteur possède une structure similaire aux autres analogues de bisubstrat **13-16**. Un comportement identique de l'efficacité de l'inhibition en fonction du temps était attendu pour l'ensemble des cinq inhibiteurs dicarbonylés **12-16**. Vue l'indépendance de l'efficacité de l'inhibition en fonction du temps pour le composé **12,** l'équation de Michaelis-Menten peut être appliquée pour déterminer la constante d'inhibition ainsi que le type d'inhibition [100]. Les quatre autres composés **13-16** sont dépendants du temps. La détermination des constantes d'inhibitions ainsi que celle du type d'inhibition est réalisée à partir des équations décrites pour les inhibiteurs dépendants du temps [109].

Lorsque nous avons determinés les valeurs IC_{50} pour les cinq composés **12-16**, nous avons utilisés un temps de préincubation de 30 minutes. Pour les composés amine **13** et thioéther **14** le temps de préincubation utilisé est raisonnable pour l'obtention de l'équilibre avec l'enzyme, par contre il ne semble pas suffisant pour les composés sulfoxyde **15** et sulfone **16**. Par conséquent, les valeurs IC_{50} obtenus pour ces deux derniers composés ne semblent plus être correct étant donné que le temps de préincubation avec l'enzyme n'était pas suffisant.

7.7 Détermination des paramètres cinétiques des inhibiteurs

Pour les inhibiteurs **12-16** les paramètres cinétiques peuvent être calculés en utilisant l'équation classique de Michaelis-Menten (indépendant du temps) [100] ou en mesurant l'influence du temps sur l'inhibition pour des concentrations variées en inhibiteur (détermination de K_I) ou en substrat (détermination du mode d'inhibition) utilisant les équations décrites dans [109].

7.7.1 Inhibitions indépendantes du temps

Dans un premier temps, les valeurs de K_{Mapp} sont calculées à l'aide du programme SigmaPlot8 à partir de la relation de Michaelis-Menten (équation (35)) pour chaque concentration en inhibiteur [100]. L'équation (35) représente l'équation de Michaelis-Menten où le coefficient de coopérativité est pris en compte. Les graphes dérivés de l'équation de Michaelis-Menten servent à déterminer le type d'inhibition (Tableau 9). Les types d'inhibition sont donc différenciés suivant les variations des deux caractéristiques V_{max} et K_{Mapp} en fonction de la concentration en inhibiteur.

Michaelis-Menten	**Lineweaver-Burk**
$v = \frac{V_{max} \cdot [I]^h}{K_{Mapp}^h + [I]^h}$ (35)	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_{Mapp}}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[I]}$ (4)
Eadie-Hofstee	**Hanes**
$v = V_{max} - \frac{v}{[I]} \cdot K_{Mapp}$ (5)	$\frac{[I]}{v} = \frac{K_{Mapp}}{V_{max}} + \frac{[I]}{V_{max}}$ (6)

Tableau 9 : Equations permettant la détermination de K_{Mapp} et du type d'inhibition pour un inhibiteur classique

Une fois le K_{Mapp} connu, les valeurs de K_I sont déterminées utilisant le graphe entre K_{Mapp}, K_I et la concentration en inhibiteur (Tableau 10).

Type d'inhibiton	Equation	Graphe
compétitive	$[I] = \frac{K_I}{K_M} \cdot K_{Mapp} - K_I$ (10)	[I] en fonction de K_{Mapp}
incompétitive	$[I] = K_M \cdot K_I \cdot \frac{1}{K_{Mapp}} - K_I$ (14)	[I] en fonction de $\frac{1}{K_{Mapp}}$
mixte	$[I] = \frac{V_{max} \cdot K_I}{K_M} \cdot \frac{K_{Mapp}}{V_{max'}} - K_I$ (19)	[I] en fonction de $\frac{K_{Mapp}}{V_{max'}}$
	$[I] = V_{max} \cdot K_{I'} \cdot \frac{1}{V_{max'}} - K_{I'}$ (20)	[I] en fonction de $\frac{1}{V_{max'}}$

Tableau 10 : Equations permettant la détermination de K_I pour un inhibiteur classique

7.7.2 Inhibitions dépendantes du temps

Les équations décrites dans le chapitre 5 permettent de caractériser un inhibiteur dépendant du temps. Les mesures sont faites dans un premier temps pour une concentration fixe en substrat, avec variation de la concentration en inhibiteur afin de déterminer la constante d'inhibition, puis dans un deuxième temps pour une concentration fixe en inhibiteur, avec variations de la concentration en substrat, afin de déterminer le type d'inhibition [109]. Dans les deux cas, les mesures se font pour des temps de préincubation compris entre 30 secondes et 30 minutes. Pour chacune des courbes obtenues, k_{obs} est calculé, à l'aide du programme SigmaPlot8, *via* la relation suivante :

$$v = V_{max} \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \qquad (27)$$

Ensuite, par la construction de différents graphes, la valeur de K_I, le type d'inhibiteur ainsi que le type d'inhibition pour les composés **13-16** peuvent être déterminés (Tableau 11).

Détermination de K_I pour les inhibiteurs dépendants du temps	**Type d'inhibiteur (slow binder, tight binder, irréversible)**	**Type d'inhibition (compétitif, incompétitif, non-compétitif)**
$k_{obs} = k_4 \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$ (28) $k_{obs} = k_4 \cdot \left(1 + \left(\frac{[I]}{K_I}\right)^h\right)$ (49)	Graphe de k_{obs} en fonction de [I] ([S] fixe)	Graphe de k_{obs} en fonction de [S] ([I] fixe)

Tableau 11 : Méthode de calcul pour des inhibiteurs dépendants du temps

7.7.3 Détermination de K_I et du type d'inhibition

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les constantes d'inhibition et les types d'inhibition pour les cinq analogues de bisubstrat **12- 16** (Tableau 12).

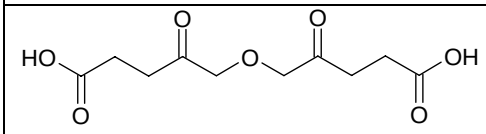
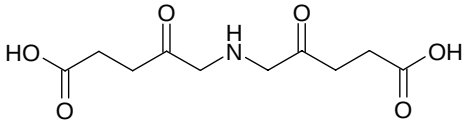
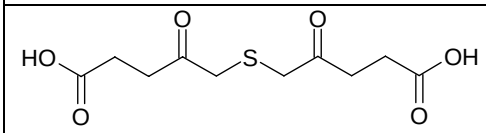
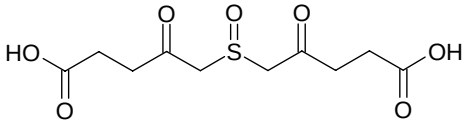
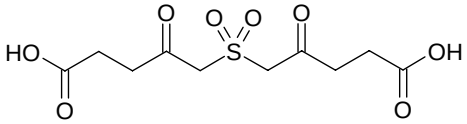
Structure	Composé	K_I [μM]	Type d'inhibition
	**12**	151	*fast binder* mixte
	**13**	225	*slow binder*
	**14**	62.0	*slow binder* non-compétitif
	**15**	10822	*slow binder*
	**16**	11046	*slow binder* non-compétitif

Tableau 12 : Constantes d'inhibition et types d'inhibition pour les analogues de bisubstrat **12-16**

La structure dicarbonylée et la longueur des analogues de bisubstrat **12-16** synthétisés laissent supposer une reconnaissance dans les deux sites de l'enzyme. Le mode d'inhibition classique (*fast binder)* observé pour l'analogue éther **12** est surprenant, parce que **12** ne suit pas le même comportement que les quatre autres analogues. L'éther **12** se comporte comme un inhibiteur *fast binder* mixte, avec une constante d'inhibition, K_I, de 151 μM et un K_I' de 2.18 mM. Ces résultats en font un très bon inhibiteur comparé à ceux testés jusqu'à présent [45, 46, 84-86, 88, 97]. Le type d'inhibition mixte trouvé pour cet inhibiteur suggère que **12** est reconnu dans les deux sites actifs de l'enzyme.

Les autres inhibiteurs dicarbonylés synthétisés **13-16** montrent une dépendance de leur potentiel d'inhibition par rapport au temps de préincubation avec la PBGS. Les analogues amine **13** et thioéther **14**, qui sont des composés quasi isostères, donnent une constante d'inhibition de 225 et 62.0 μM, respectivement. Ces résultats montrent que **13** et **14** sont d'excellents inhibiteurs. Ce sont des inhibiteurs réversibles lents (*slow binder*) avec un mode d'inhibition non compétitif déterminé pour le thioéther **14**. L'analogue sulfoxyde **15** montre le même comportement *slow binder* mais a une constante d'inhibition plus élevée, 10.8 mM.

L'analogue sulfone **16** a une affinité comparable de 11.0 mM et un mode d'inhibition non compétitif. Ces deux inhibiteurs sont donc des inhibiteurs moyens. Cette augmentation des constantes d'inhibitions pour ces deux analogues de bisubstrat peut s'expliquer par le groupement encombrant (sulfoxyde et sulfonyle) qui relie les deux parties acide γ-cétopentanoique identiques de cette série d'inhibiteurs, comme cela a déjà été discuté pour les valeurs IC_{50}. De plus, dans le cas de l'analogue sulfone **16**, la constante d'inhibition n'a pu être déterminée que lorsque un terme de coopérativité h était introduit dans le calcul (équation (49)). Une valeur de 2.3 est obtenue pour le terme de coopérativité. Etant donné que la PBGS est une enzyme multimère, la coopérativité est déjà présente au niveau de la réaction non inhibée, mais cette forte coopérativité dans le mode d'inhibition est unique au composé sulfone **16**. A ce stade, cette forte coopérativité de **16**, comparé aux autres inhibiteurs *slow binder* **13-15**, ne s'explique pas. Il s'agit peut-être d'une légère différence du mode d'interaction avec l'enzyme, mais cette hypothèse ne peut être vérifiée qu'à l'aide des structures aux rayons X.

Le type d'inhibition pour les composés **13** et **15** n'a pas été déterminé par manque de produit et de temps. Le type d'inhibition non compétitif déterminé pour les composés *slow binder* **14** et **16** est étonnant. La détermination du type d'inhibition peut être difficile à cause de variations dans la précision des valeurs et n'est donc pas confirmée à 100%. Des études cinétiques supplémentaires devraient être effectuées afin de confirmer ce type d'inhibition non compétitif. Par définition, un inhibiteur non compétitif se lie de manière réversible en dehors du site actif de l'enzyme et n'en empêche pas l'accès. Une explication de cette observation peut être la structure oligomérique de l'enzyme. En effet, comme la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* peut présenter une réactivité *half-site*, l'inhibiteur pourrait ainsi se lier dans un des quatre monomères inactifs. Par conséquent, l'inhibiteur n'est donc pas lié au site actif et ainsi le type d'inhibition non compétitif semble s'expliquer. Ce changement du type d'inhibition est surprenant en étudiant une série d'analogues de bisubstrat. Les études faites jusqu'à présent ont montré une bonne corrélation du type d'inhibition avec le type de structure étudiée. Le comportement non compétitif n'a jamais été prouvé sans équivoque pour des inhibiteurs de la PBGS étudiés jusqu'à maintenant. Pour cette raison, l'interprétation de ce résultat est difficile. La structure des composés reste, malgré le type inhabituel d'inhibition, un argument fort en faveur de la reconnaissance dans les deux sites A et P. La résolution des structures de la PBGS avec les différents composés **12-16** va permettre de déterminer clairement le lieu de la reconnaissance des inhibiteurs.

7.8 Structures aux rayons X de la PBGS co-cristallisée avec les inhibiteurs

Des co-cristallisations de la PBGS avec les analogues de bisubstrat synthétisés **12-16** ont été réalisées par M. Nentwich et le Dr. F. Frère à l'Université de Braunschweig. Pour ce faire, ils ont utilisé la méthode de « *hanging-drop, vapor-diffusion* » (pour les détails voir le chapitre 11). La résolution aux rayons X des structures des cristaux est effectuée par le Dr. F. Frère (pour les détails voir le chapitre 11). La première surprise est apparue lors de la résolution de la PBGS qui devait normalement être complexée avec le composé éther **12**. La structure montre que le ligand **12** s'est hydrolysé pour donner deux ligands acide 5-hydroxylévulinique **36**. L'hydrolyse de **12** s'est produite en présence d'une solution aqueuse de NaOH utilisée pour solubiliser l'inhibiteur. Lorsqu'une solution tampon est employée pour solubiliser **12**, la co-cristallisation de l'enzyme avec l'éther non hydrolysé est possible. Avant de décrire les différentes structures de la PBGS avec les analogues de bisubstrat **12-16**, les paramètres cinétiques ainsi que la structure obtenue par rayons X de l'acide 5-hydroxylévulinique **36** sont décrits.

7.8.1 Paramètres cinétiques et co-cristallisation avec la PBGS de l'acide 5-hydroxylévulinique 36

L'acide 5-hydroxylévulinique **36** est un composé très intéressant parce qu'il est chimiquement et structurellement le ligand le plus proche du substrat naturel ALA **5** étudié jusqu'à maintenant. La détermination de la valeur IC_{50} pour **36** à l'aide de l'équation (48) donne le résultat suivant (Tableau 13) :

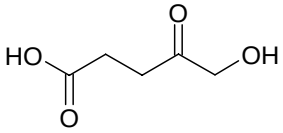
Structure	**Composé**	**IC_{50} [mM]**	**Coefficient de coopérativité h**
	**36**	4.05	1.14

Tableau 13 : Valeur IC_{50} pour l'acide 5-hydroxylévulinique **36**

L'inhibiteur **36** montre une valeur IC_{50} dans le même ordre de grandeur que l'analogue sulfone **16**.

Le composé **36** a déjà été testé sur la PBGS issue de *Rhodopseudomonas spheroides* [81]. La constante d'inhibition pour cet inhibiteur *fast binder* est de 250 μM. Le test qui permet de déterminer si l'inhibiteur est dépendant du temps ou non n'a donc pas été nécessaire sur ce composé. Par contre, la constante d'inhibition ainsi que le type d'inhibition ont été déterminés

sur la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les analogues de bisubstrat **12-16** et sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 14).

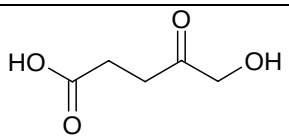
Structure	Composé	K_I [mM]	Type d'inhibition
	**36**	1.45	*fast binder* compétitif

Tableau 14 : Constante d'inhibition et type d'inhibition pour l'acide 5-hydroxylévulinique **36**

L'acide 5-hydroxylévulinique **36** est un inhibiteur *fast binder*, compétitif avec une constante d'inhibition de 1.45 mM, ce qui est quelque peu différent du résultat obtenu dans la littérature [81]. Ces caractéristiques sont identiques à celles déterminées pour l'acide lévulinique **17** et l'acide 5-fluorolévulinique **18**, qui ont des structures similaires à **36**. Ces trois composés **36**, **17** et **18** sont des analogues de substrat.

La résolution de la structure cristalline de la PBGS complexée avec l'acide 5-hydroxylévulinique **36** (5-OH-LA/*Pa*PBGS) est très intéressante parce que l'inhibiteur est similaire au substrat naturel ALA **5** du point de vue de sa structure et de sa réactivité. Deux molécules de **36** sont reconnues et liées dans le site actif de la PBGS (Figure 131).

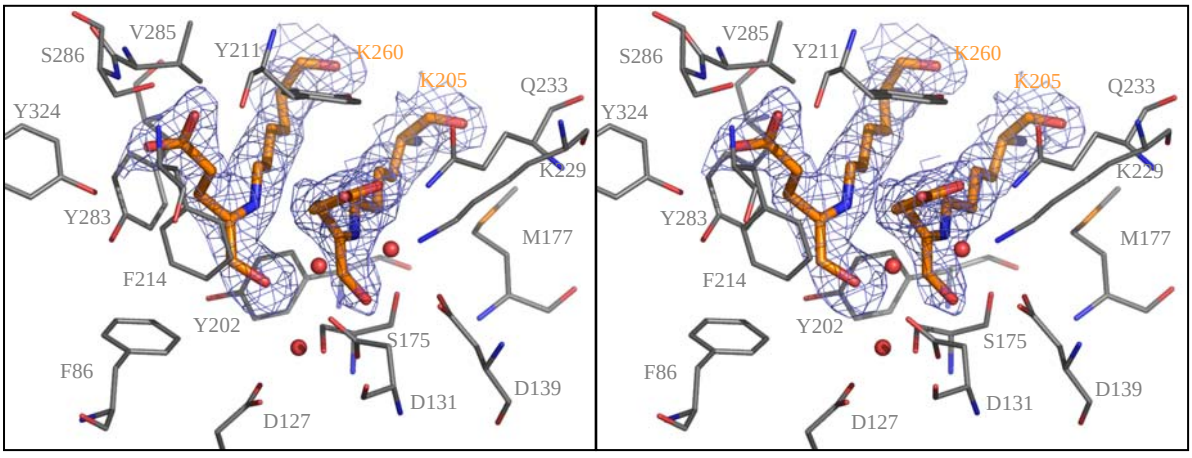


Figure 131 : Acide 5-hydroxylévulinique **36** co-cristallisé à la PBGS. Les deux molécules d'inhibiteur, en orange, sont liées respectivement dans le site P à la Lys260 et dans le site A à la Lys205 *via* des bases de Schiff. Les résidus acides aminés environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

Les deux molécules **36** sont fixées respectivement à la lysine du site A (Lys205) et à celle du site P (Lys260) de la PBGS *via* des bases de Schiff. Leur conformation est analogue à celle des deux molécules de l'acide 5-fluorolévulinique **18** avec cette même enzyme (5-F-LA/*Pa*PBGS) [46]. Néanmoins, l'interaction du groupement en position cinq (groupement

hydroxy ou fluoro) des deux inhibiteurs **36** et **18** diffère totalement. Alors que les deux atomes de fluor des deux molécules **18** stabilisent un cation monovalent au site actif, le groupement hydroxy de **36** dans le site A uniquement, interagit directement avec les résidus acides aminés du site actif à travers des liaisons hydrogènes (Asp139 et Ser175). La position du cation monovalent qui est à mi-chemin entre les deux ligands **18** dans la structure 5-F-LA/*Pa*PBGS semble inoccupée dans la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Dans le site P, le groupe carboxylate de **36** est reconnu à travers des liaisons hydrogène avec les résidus Tyr324 et Ser286 et la partie apolaire de l'inhibiteur (carbone 2 à 5) forment des interactions hydrophobes avec les résidus Phe86, Tyr202, Tyr211, Phe214 et Tyr283. Ces différentes interactions sont les mêmes que celles observées pour la structure 5-F-LA/*Pa*PBGS. Le groupement hydroxy de l'inhibiteur **36** lié au site P se trouve dans quasi la même position que le groupement fluoro de **18** mais ne forme pas d'interactions avec les résidus environnants. Dans le site A, Le groupe carboxylate de l'inhibiteur **36** forme des interactions hydrophiles avec les résidus Arg215, Lys229, Gln233 et une molécule d'eau tandis que le groupement hydroxy forme des liaisons hydrogène avec les résidus Asp139 et Ser175. Cet hydroxy a également une position identique à la fonction fluoro dans le site A. Ces interactions sont similaires avec ce qui est observé dans toutes les structures de PBGS qui lie des ligands dans le site A.

Une structure récente de la PBGS d'*Escherichia coli*, montre une molécule d'acide 5-hydroxylévulinique **36** liée de manière covalente *via* une base de Schiff dans le site P uniquement [179]. Deux conformations du ligand ont été déterminées. Le groupement carboxylate est positionné et reconnu de la même manière que dans la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Il en est de même pour les interactions hydrophobes des carbones 2 à 5 du ligand. La différence avec notre structure est que la fonction hydroxy de **36** lié dans la PBGS d'Escherichia coli, forme des liaisons hydrogène avec les résidus Asp131 et Ser179 (numérotation de la PBGS d'*Escherichia coli*). Cette nouvelle structure ne montre pas la présence d'une seconde molécule de ligand dans le site A, comme c'est le cas pour notre structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Comme le site A n'est pas occupé, il doit y avoir passablement moins de restriction pour cet inhibiteur unique lié au site P dans la PBGS d'*Escherichia coli*. Cette analyse est compatible avec le fait que **36** puisse adopter deux conformations. L'inhibiteur lié dans le site P occupe la partie où la fonction hydroxy (respectivement amine du substrat naturel) doit avoir une certaine liberté. Le fait que cet inhibiteur unique puisse former des liaisons hydrogène avec l'enzyme et que ces interactions ne sont plus visible dans notre structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS, est en accord avec le mécanisme. Ce groupement ou plutôt la fonction amine du substrat naturel, doit pouvoir réagir pour former la liaison avec l'autre substrat. Pour cela, le groupe fonctionnel doit être libre et des liaisons hydrogène fortes seront un empêchement pour ce pas ultérieur.

La Figure 132 montre la superposition de la structure du substrat naturel ALA **5** co-cristallisé à la PBGS de levure (ALA/*Sc*PBGS) [43], avec la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Le substrat naturel ALA **5** est lié de manière covalente au site P (Lys260). Les deux ligands montrent une

conformation identique dans le site P et les résidus environnants sont positionnés de façon identique dans le site actif de ces deux PBGS issues de différents organismes.

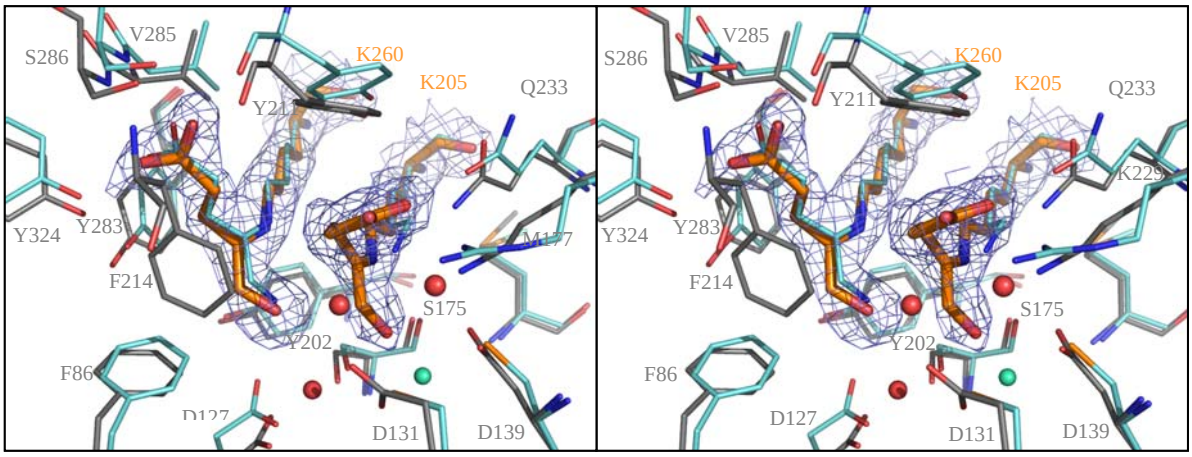


Figure 132 : Superposition de ALA/*Sc*PBGS [43], en cyan, avec 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Le substrat naturel est lié *via* une base de Schiff dans le site P et l'ion zinc de *Sc*PBGS est représenté par une sphère cyan

La superposition de la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS avec la structure ALA/*Sc*PBGS est un indice fort qu'au moins la partie dans le site P est bien décrite dans notre structure. La position du groupement hydroxy de **36** lié au site P, respectivement du groupement amino de ALA **5**, sont dans une position similaire avec toutes les structures enzyme-inhibiteur déterminées jusqu'à maintenant. L'enzyme provenant de *Pseudomonas aeruginosa* et celle provenant de la levure sont des enzymes qui ont été classées dans des catégories différentes en fonction de leur dépendance pour les métaux. Pour rappel la PBGS d'*Escherichia coli* est une enzyme qui dépend obligatoirement de la présence de Zn^{2+}. Dans la structure de cet enzyme un Zn^{2+} est fixé dans le site actif. La PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* dépend de la présence de Mg^{2+}. Le Mg^{2+} n'est pas lié dans le site actif, mais à l'interface de deux protéines qui forment un dimère. Malgré cette différence les structures aux rayons X montrent une similitude étonnante ce qui est un bon indicateur pour l'hypothèse que les différentes classes de PBGS utilisent des mécanismes identiques ou au moins similaires.

L'acide 5-hydroxy-lévulinique **36** est un analogue plus proche du substrat naturel que l'acide 5-fluorolévulinique **18**, en tout cas en ce qui concerne les interactions du type liaisons hydrogène. La comparaison des conformations des deux inhibiteurs **36** et **18** montre une partie où les deux ligands avec des structures chimiques différentes, sont superposables. Ces deux structures de la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa* ont incorporées deux molécules d'analogue de bisubstrat en formant la double base de Schiff. Les positions des deux groupements carboxylates et les liaisons hydrogènes qui fixent cette partie des deux inhibiteurs **18** et **36** sont quasi identiques. Les chaînes qui relient les groupements carboxylates aux carbones des groupements carbonyles sont superposables. Finalement, les deux bases de Schiff ne montrent que des variations minimes indépendantes de la structure de l'inhibiteur. Pour la partie dans le site P, nous avons observé que le ligand **36** est superposable

au substrat naturel et que le réseau d'interactions est identique (Figure 132). Le groupement hydroxy de **36** ne montre pas de liaisons hydrogènes évidentes avec des résidus environnants pour ce côté du site actif (site P), comme cela est le cas dans le site A. Il est vrai, que la fonction hydroxy a une capacité plus faible de donneur de liaisons hydrogène que la fonction amino (respectivement ammonium) du substrat naturel. Néanmoins, cette absence de liaisons hydrogène pour la fonction hydroxy rejoint le fait que cette partie doit rester libre afin de pouvoir réagir pour former la liaison C-N. Donc l'enzyme a de bonnes raisons pour ne pas trop « fixer » ce substituant afin qu'il puisse s'adapter à une multitude de stade intermédiaire. Pour la partie dans le site A, nous supposons que la conformation de nos deux inhibiteurs **36** et **18** reflète la situation du substrat naturel ALA **5**. En ce qui concerne le réseau de liaisons hydrogène de ce même site A, nous supposons que la conformation de l'acide 5-hydroxylévulinique **36** est plus proche du processus naturel que la conformation de l'acide 5-fluorolévulinique **18**. Les deux analogues de substrats **18** et **36** sont suffisamment similaires pour émettre l'hypothèse que ces deux structures sont de bons modèles pour le stade du mécanisme enzymatique où deux substrats sont liés en même temps sur le site actif.

Les conformations des deux inhibiteurs **36** et **18** sont compatibles avec la proposition que la conformation des deux molécules de substrat naturel a une forte influence sur la facilité à réaliser les prochaines étapes du mécanisme. En se basant sur la partie conformationelle commune aux deux inhibiteurs **36** et **18**, la conclusion est que le substrat dans le site P ne peut pas former le tautomère énamine en direction du carbone 3, sans subir un changement drastique de la conformation. Basé sur le même argument le substrat lié au site A possède une conformation qui devrait faciliter la formation de l'énamine en direction du carbone 3. Cette analyse nous pousse à postuler un contrôle conformationel de la réactivité des deux substrats et à corréler ces observations avec l'hypothèse que les deux substrats se différencient par leur conformation respective une fois que le bis-complexe est formé.

Pour l'acide 5-fluorolévulinique **18** il existe des raisons chimiques évidentes pourquoi l'enzyme s'arrête à ce stade (formation du tautomère énamine envers le carbone portant le substituant fluor dans les deux sites) [46]. Pour l'acide 5-hydroxylévulinique **36** nous ne pouvons pas nous baser sur le même argument. Sur le papier, un mécanisme analogue à celui du substrat naturel peut être postulé pour transformer cet inhibiteur en un analogue oxygéné du PBG (hydroxyméthyle furane substitué). Le fait que les deux molécules **36** ne subissent pas la suite des réactions amenant à un analogue intermédiaire cyclique, au même titre que le substrat naturel ALA **5** dans la structure intermédiaireI/*Sc*PBGS [90], semble s'expliquer par la différence de nucléophilie de l'amine **5** par rapport à l'alcool **36**. L'alcool **36** étant moins nucléophile, la liaison C-O, analogue à la liaison C-N, ne se forme pas.

7.8.2 Structures de la PBGS co-cristallisée avec les analogues de bisubstrat 12-16

7.8.2.1 Influence des structures sur la fixation du *lid*

Toutes les structures dans ce chapitre, montrent le même repliement général que la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* de type sauvage (*wild-type*) [76]. La boucle couvrant le site actif (*lid*) du monomère A est ordonnée dans toutes les structures, excepté pour celle contenant le composé sulfoxyde **15**, tandis qu'avec le composé sulfone **16** la structure montre un repliement partiellement nouveau. Dans le cas de l'enzyme avec la sulfone **16** cette différence peut être dû au mode de liaison spécial de l'inhibiteur qui induit de légers changements (C_α de Asp131 et Gln138 déplacé de 0.8 et 1.0 Å respectivement) dans la boucle connectant Asp131 à Asp139 voisine du *lid* du site actif. Dans le cas de l'enzyme avec le sulfoxyde **15**, Gln138 et His136 montrent deux positions alternatives déplacées qui peuvent expliquer la déstabilisation du *lid* du site actif. Tous les résidus responsables de la coordination des inhibiteurs, incluant Arg215 et Lys229 sont néanmoins bien résolus dans toutes les structures.

7.8.2.2 Composé éther **12** (éther/*Pa*PBGS)

La structure haute résolution de la PBGS avec l'analogue de bisubstrat éther **36** révèle qu'une partie de la structure n'est pas bien résolue. La partie de l'inhibiteur situé dans le site P, incluant la fonction éther, est proprement définie par une densité électronique observée lors de la résolution de la structure aux rayons X. Dans le site A, le carbone en position 2 et le groupement carboxylate sont également bien définis, contrairement au reste de la molécule qui n'est pas visible (excepté le groupe cétone qui est partiellement défini). Cette partie non visible est donc modélisée dans sa conformation la plus probable, basée sur des restrictions conformationnelles (encombrements stériques, place restante dans le site actif, etc.). Une explication pour décrire cette observation peut être que des analogues pour différents stades du mécanisme sont liés en même temps au site actif, empêchant de cette manière leur détermination exacte. Ceci coïncide avec le fait que le composé éther **12** est le seul inhibiteur dicarbonylé de la série à montrer un mode d'inhibition *fast binder*.

L'inhibiteur **12** est lié au site P *via* une base de Schiff avec la lysine (Lys260) tandis que la base de Schiff dans le site A n'est pas formé (Figure 133). La conformation de l'inhibiteur dans le site P ainsi que les différentes interactions avec les résidus environnants, sont identiques à ce qui est observé pour les structures 5-OH-LA/*Pa*PBGS, 5-F-LA/*Pa*PBGS [46] et ALA/*Sc*PBGS [43]. Le groupe carboxylate de l'inhibiteur **12** est reconnu à travers des liaisons hydrogène avec les résidus Tyr324 et Ser286. La partie apolaire (carbones 7 à 10) de **12** forme des interactions hydrophobes avec les résidus Phe86, Tyr202, Tyr211, Phe214 et Tyr283. De manière identique, les interactions responsables de la fixation et le positionnement du groupe carboxylate de l'inhibiteur dans le site A, sont semblables à ceux

observés pour la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS. Le groupement carboxylate est donc reconnu à travers des liaisons hydrogène avec les résidus acides aminés Arg215, Lys229, Gln233. Le groupe cétone, partiellement défini, sur le carbone en position 4, est éloigné de la Lys210 du site A de 4.44 Å. Par contre, cette fonction semble former des liaisons hydrogène avec deux molécules d'eau présentes au site actif. Le reste de la molécule, c'est-à-dire la partie allant des carbones 2 à 5 (site A), est donc modélisée et semble adopter une configuration différente de ce qui est observé pour les structures des PBGS qui lie un ligand dans le site A. Cette différence peut s'expliquer par la non formation de la base de Schiff. Le ligand adopte donc une configuration bien résolue et connue dans le site P tandis que celle du site A est moins bien résolue et incertaine mais semble donc nouvelle, excepté pour le groupe carboxylate qui est fixé dans la position attendue.

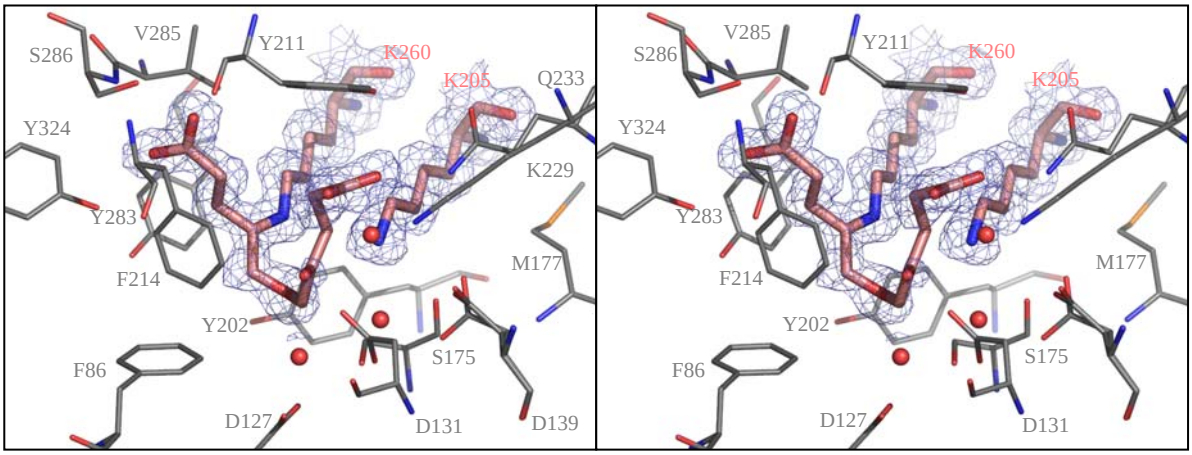


Figure 133 : Composé éther **12** co-cristallisé avec la PBGS. L'inhibiteur, en rose, est lié *via* une base de Schiff seulement à la Lys260 du site P. Les carbones 3 et 5 de l'inhibiteur ne sont pas définis par la densité électronique (en bleu) mais modélisés de la meilleure manière en tenant compte des restrictions conformationnelles. Le résidu Asp139 montre deux conformations. Les résidus environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

La non formation de la seconde base de Schiff dans le site P est surprenante et complètement inattendue du point de vue de la chimie. La question de la présence de deux intermédiaires, un lié par base de Schiff tandis que le second non, peut se poser. L'observation que le résidu Asp139 puisse adopter deux conformations est un indicateur que nous pourrions avoir la présence de deux analogues d'intermédiaire à la place d'une seule structure comme celle qui est modélisée. De plus, cette hypothèse est également soutenue par la mauvaise résolution obtenue pour cette structure.

7.8.2.3 Composés amine **13** (amine/*Pa*PBGS) et thioéther **14** (thioéther/*Pa*PBGS)

La résolution des structures de la PBGS complexée avec les composés amine **13** et thioéther **14**, a révélée une surprise. Les deux inhibiteurs sont liés au site actif *via* des bases de Schiff avec leurs deux groupements cétones et les lysines du site A (Lys205) et du site P (Lys260) respectivement. De plus, dans les deux cas, les structures révèlent une densité électronique continue connectant les carbones 3 et 8 de l'inhibiteur, indiquant la formation d'une liaison C-C entre ces deux atomes, en parfaite analogie avec la réaction catalytique naturelle (Figure 134 et Figure 135). La formation de la nouvelle liaison C-C entraîne la cyclisation de l'inhibiteur, ce qui a pour conséquence le rapprochement des deux lysines. Néanmoins aucun réarrangement significatif des résidus environnants n'est observé, lorsque les structures sont comparées avec les structures 5-OH-LA/*Pa*PBGS, 5-F-LA/*Pa*PBGS [46] et ALA/*Sc*PBGS [43]. Au lieu de cela, la partie apolaire de l'inhibiteur dans le site P change sa conformation, excepté le groupe carboxylate qui reste fixé dans sa position. Pour la même raison la position du groupe carboxylate du site A est légèrement déplacée dans les deux structures, montrant ainsi la plus grande flexibilité de reconnaissance du site A par rapport au site P. Cette observation est compatible avec la séquence de reconnaissance : le substrat est reconnu dans le site P en premier par conséquent le substrat est lié plus fortement dans cette partie du site actif.

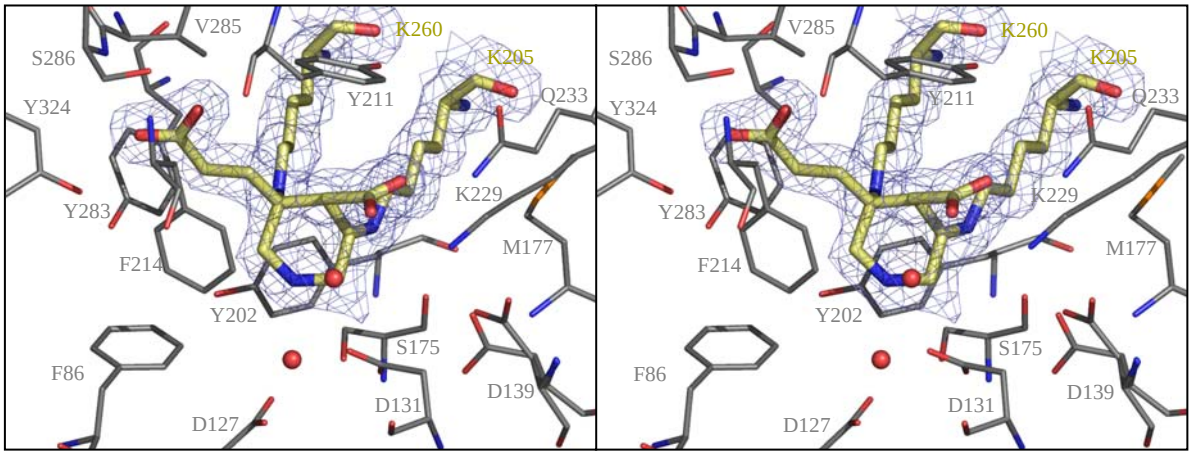


Figure 134 : Composé amine **13** co-cristallisé avec la PBGS. L'inhibiteur, en jaune, est lié à la Lys205 du site A *via* une base de Schiff et à la Lys260 du site P *via* une liaison simple. La réaction d'aldolisation entre le carbone 3 et 8 de l'inhibiteur a crée une nouvelle liaison qui est représentée par une densité électronique (en bleu) continue entre les deux atomes de carbone. Le résidu aspartate (D139) montre deux conformations. Les résidus environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

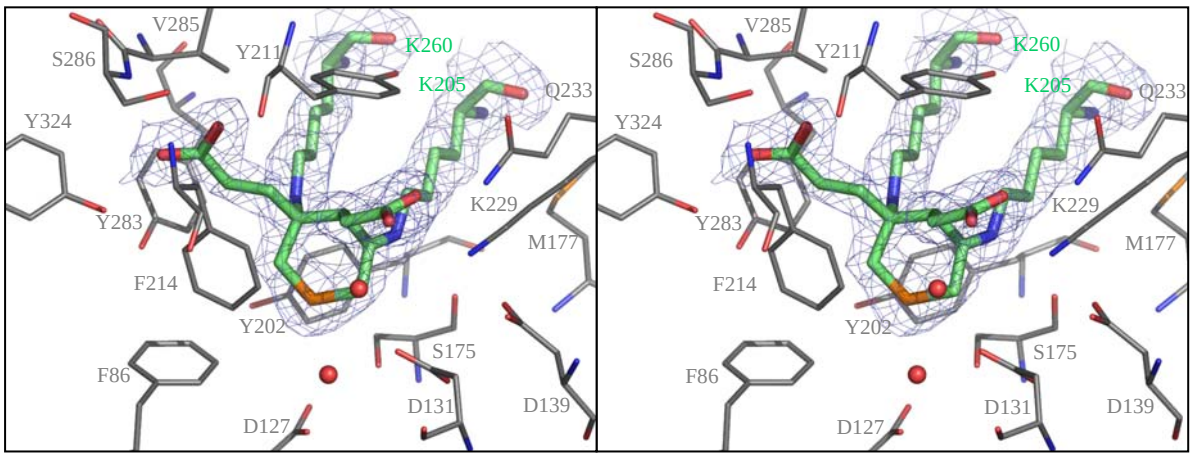


Figure 135 : Composé thioéther **14** co-cristallisé avec la PBGS. L'inhibiteur, en vert, est lié à la Lys205 du site A *via* une base de Schiff et à la Lys260 du site P *via* une liaison simple. La réaction d'aldolisation entre le carbone 3 et 8 de l'inhibiteur a crée une nouvelle liaison qui est représentée par une densité électronique (en bleu) continue entre les deux atomes de carbone. Les résidus environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

Dans le site A, l'inhibiteur est lié à la Lys205 *via* une base de Schiff, tandis que dans le site P, il est lié à la Lys260 *via* une liaison simple. Les deux inhibiteurs sont stabilisés grâce à des interactions hydrophobes avec les résidus Met177, Ala204, Tyr211, Phe214, Tyr283, Val285 et Ser286. Le groupe carboxylate dans le site P est reconnu par des liaisons hydrogène avec les résidus Ser286 et Tyr324. Ces interactions sont typiques de ce qui est observé dans toutes les PBGS qui fixent un ligand dans le site P. Le seul changement observé dans nos deux structures, comparé avec toutes les structures des PBGS qui lie un ligand dans le site P, est la configuration de la partie apolaire (carbones 7 à 10) qui est différente. Cette partie s'adapte ainsi à la formation de la nouvelle liaison C-C. Le groupe carboxylate du site A interagit avec les résidus Arg215, Lys229, Gln233. Ces interactions sont également observées dans toutes les structures des PBGS qui fixent un ligand dans le site A. Dans ces deux nouvelles structures, amine/*Pa*PBGS et thioéther/*Pa*PBGS, une molécule d'eau vient compléter le réseau d'interactions du groupement carboxylate du ligand dans le site A. Cette molécule d'eau fait partie d'un environnement hydrophile (dans le site A) incluant les résidus Asp131, Asp139 et Ser175 et une molécule d'eau supplémentaire. La seule différence entre les deux structures amine/*Pa*PBGS et thioéther/*Pa*PBGS provient de la nature différente de l'atome centrale du ligand. Le groupement sulfure de la structure thioéther/*Pa*PBGS est capable de jouer un rôle d'accepteur de liaisons hydrogène. Cependant cette fonction ne participe pas à la formation de ces liaisons dans le site actif de l'enzyme. Par contre, la fonction centrale amine de la structure amine/*Pa*PBGS forme des liaisons hydrogène avec une des deux molécules d'eau présentes au site actif de la PBGS. Comme l'accepteur de liaisons hydrogène sulfure de **14** ne forme pas de liaisons hydrogène, alors que l'amine de **13** est capable d'en former, cela laisse supposer que la fonction amine joue un rôle de donneur de liaisons hydrogène et pourrait donc se trouver sous sa forme protonée, cela veut dire que ce groupe devrait être présent comme groupe ammonium. Cette hypothèse est compatible avec une de nos

hypothèses de départ : les substrats et les inhibiteurs sont liés au site actif dans un état de protonation (ou de déprotonation) qui correspond au pH de la solution et au pK de ces groupes fonctionnels en solution. Ainsi l'hypothèse d'un réseau de liaisons hydrogène est envisageable entre la forme protonée de l'amine de **13**, une molécule d'eau et la forme déprotonée d'un groupement carboxylate d'un acide aspartique présent au site actif.

Ces deux structures très semblables, amine/*Pa*PBGS et thioéther/*Pa*PBGS, sont à nouveau une bonne indication que nous sommes en présence d'un résultat significatif. La configuration des deux ligands ainsi que les interactions hydrophiles et hydrophobes sont identiques pour les deux structures. La seule différence provient de la fonction centrale (*linker*) des ligands. Contrairement au groupement sulfure de **14**, l'amine secondaire de **13** forme une liaison hydrogène supplémentaire avec une des deux molécules d'eau présente au site actif de l'enzyme. Ces deux structures sont donc des modèles, où la formation de la liaison C–C par une réaction du type aldol entre les deux molécules de substrat s'est produite avant que la base de Schiff formée avec la lysine du site A (Lys205) ne soit détruite par l'attaque du groupement amino du substrat du site P. Un tel intermédiaire a été trouvé dans la structure d'un mutant F12L de la PBGS humaine co-cristallisé avec ALA **5** (intermédiaireII/*Hs*PBGS) [91]. Cet intermédiaire II est obtenu par la formation de la liaison C–C entre les deux molécules ALA **5** qui sont fixées *via* des bases de Schiff au site A et P respectivement. La conformation de la partie supérieure (carbones 1 à 4 du site A et P) de cet intermédiaire I ressemble de manière étroite à la conformation des parties correspondantes (carbones 1 à 4 et carbones 8 à 11) des composés amine **13** et thioéther **14**. Cette observation souligne ainsi le bien-fondé de ces inhibiteurs dans leur capacité à imiter les intermédiaires de réactions. La Figure 136 montre la superposition de la structure intermédiaireII/*Hs*PBGS [91] avec la structure amine/*Pa*PBGS.

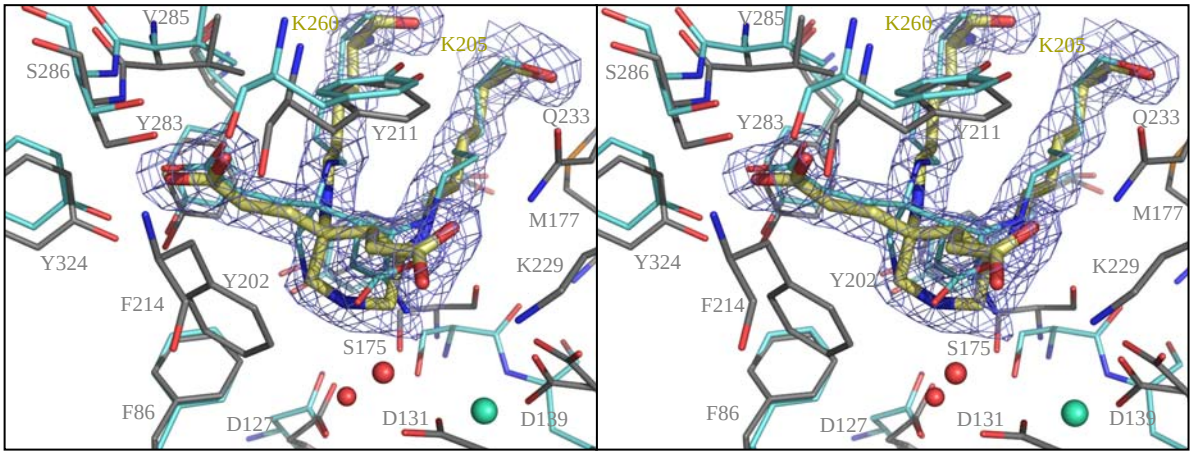


Figure 136 : Superposition de la structure intermédiaireII/*Hs*PBGS [91], en cyan, avec la structure amine/*Pa*PBGS. L'intermédiaire II est issu de la formation de la liaison C-C entre deux molécules de substrat naturel et est lié dans le site A et P *via* des bases de Schiff. L'ion zinc provenant de *Hs*PBGS est représenté par une sphère cyan. Dans la structure intermédiaireII/*Hs*PBGS, quelques résidus sont manquants parce que le site actif est partiellement désordonné

Un second intermédiaire a également été stabilisé dans le site actif de la PBGS. Il s'agit de l'intermédiaire de réaction cyclique stabilisé dans le site actif de la PBGS de levure co-cristallisée avec le substrat naturel ALA **5** (intermédiaireI/*Sc*PBGS) [90], soulignant ainsi le caractère des inhibiteurs à former des intermédiaires de réaction cycliques stables. Les liaisons C-C et C-N sont formées entre les deux molécules ALA **5**, et l'intermédiaire I ainsi formé est lié de manière covalente à la lysine du site P (Lys260) uniquement. La configuration des deux ligands dans le site P et dans le site A est différente, excepté pour les deux groupes carboxylates qui sont positionnés de manière identique. La Figure 137 montre la superposition de cette structure intermédiaireI/*Sc*PBGS avec la structure thioéther/*Pa*PBGS.

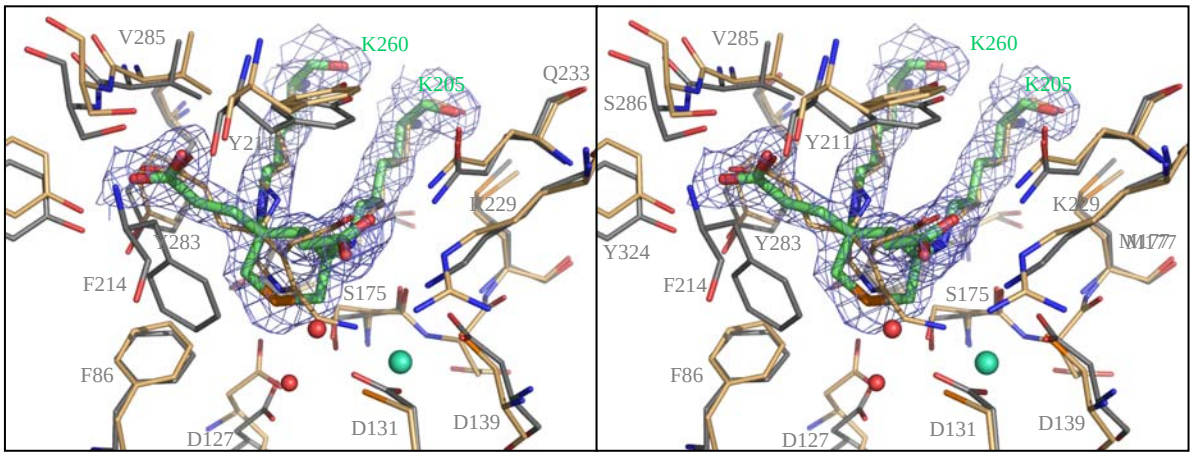


Figure 137 : Superposition de la structure intermédiaireI/*Sc*PBGS [90], en beige, avec la structure thioéther/*Pa*PBGS. L'intermédiaire I est issu de la formation des liaisons C-C et C-N entre deux molécules de substrat naturel et est lié dans le site P uniquement, de manière covalente avec la Lys260. L'ion zinc provenant de *Sc*PBGS est représenté par une sphère cyan

Les deux groupes carboxylates de chacune des deux structures, sont reconnus au même endroit autant dans le site P que dans le site A. La différence est que dans une des structures un cycle à 5 est lié à une base de Schiff uniquement dans le site P (intermédiaireI/*Sc*PBGS) tandis que dans l'autre structure un cycle à 6 est lié *via* deux bases de Schiff (thioéther/*Pa*PBGS). Les deux positionnements des cycles engendrent une configuration différente des deux ligands dans le site P. De plus, ces deux configurations sont différentes de ce qui est observé lorsque un analogue de substrat est lié dans ce site P.

7.8.2.4 Composé sulfoxyde **15** (sulfoxyde/*Pa*PBGS)

La structure de la PBGS co-cristallisée avec le composé sulfoxyde **15** (Figure 138) est comparable aux structures amine/*Pa*PBGS et thioéther/*Pa*PBGS, excepté pour les différences dans la boucle connectant les résidus Asp131 à Asp139. L'inhibiteur est lié au site A par la

Lys205 *via* une base de Schiff et au site P par la Lys260 *via* une liaison simple. La formation de la nouvelle liaison C-C entre les carbones 3 et 8 de l'inhibiteur est à nouveau observée. La conformation de l'inhibiteur **15** et ces interactions avec les résidus environnants sont analogues aux structures amine/*Pa*PBGS et thioéther/*Pa*PBGS, excepté pour le *linker*. Le groupement amine est un donneur de liaisons hydrogène, alors que le groupement sulfure ne forme pas de liaisons hydrogène au site actif de l'enzyme. Le groupement sulfoxyde est quant à lui, plus encombrant et un accepteur de liaisons hydrogène. Ce groupement forme des liaisons hydrogène avec Asp127 et une molécule d'eau. Dans cette structure, la chaîne secondaire de Asp131 et Asp139 est légèrement éloigné de l'inhibiteur comparé à la structure 5-OH-LA/*Pa*PBGS et de l'enzyme seule (*wild-type*), ce qui peut être expliqué par le changement de polarité. Ces changements sont accompagnés par l'apparition d'une seconde conformation pour les résidus 136 à 138 et un *lid* désordonné. Le reste du site actif reste néanmoins inchangé. Comme conséquence, nous sommes amené à supposer que la présence d'un substituant volumineux dans cette partie du site actif empêche le *lid* de s'organiser et en plus le repousse. En même temps cette structure indique que thermodynamiquement les forces en présence pour la fixation de cet intermédiaire sont plus grandes que les forces qui fixent le *lid*. Cette conclusion est en tout cas valable pour l'état cristallin.

Le sulfoxyde **15** est un composé qui contient un centre prochiral sur l'atome de soufre. La Figure 138 présente uniquement le complexe de l'enzyme avec un des deux énantiomères. Lors de la résolution, la présence de densité électronique semble montrer l'existence du deuxième énantiomère mais uniquement faiblement occupé (environ 10%). Nous avons ainsi décidé de faire au plus simple et de ne montrer qu'une seule configuration.

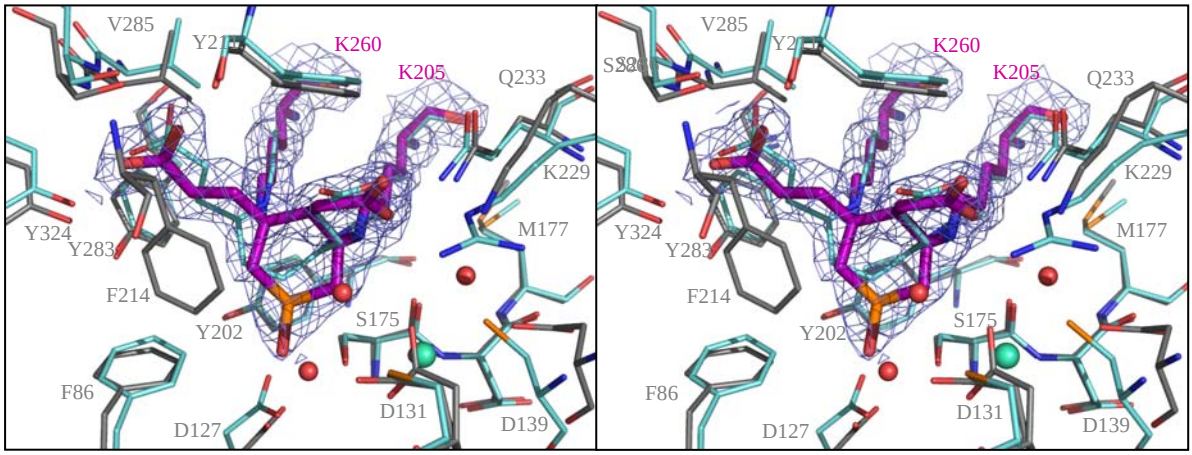


Figure 138 : Composé sulfoxyde **15** co-cristallisé avec la PBGS. L'inhibiteur, en violet, est lié à la Lys205 du site A *via* une base de Schiff et à la Lys260 du site P *via* une liaison simple. La réaction d'aldolisation entre le carbone 3 et 8 de l'inhibiteur a crée une nouvelle liaison qui est représentée par une densité électronique (en bleu) continue entre les deux atomes de carbone. Le résidu Asp131 montre deux conformations alternatives. Les résidus environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges. La structure DOSA/*Sc*PBGS [85], en cyan, liée dans les sites A et P, est superposée à la structure sulfoxyde/*Pa*PBGS. L'ion zinc de *Sc*PBGS est représenté par une sphère cyan

Dans la Figure 138, la structure de l'acide 4,7-dioxosébacique **22** co-cristallisé avec l'enzyme de levure (DOSA/*Sc*PBGS) [85] est superposée à la structure sulfoxyde/*Pa*PBGS. Les deux ligands sont reconnus dans les site A et P *via* des bases de Schiff. La différence entre ces deux structures est que l'inhibiteur **15** peut former la liaison C-C contrairement à l'inhibiteur **22**. La conformation de **22** lié au site A et P du site actif est peu convenable pour la formation de la liaison C-C [46]. Ainsi le *linker* ajouté aux analogues de bisubstrat comparé à **22**, a permis d'introduire un degré de liberté supplémentaire à la configuration de ces composés dicarbonylés dicétones. Cela a permis un mode de liaison moins tendu et la possibilité de la formation de la liaison C-C intramoléculaire, qui n'est pas possible avec des molécules telles que l'acide 4,7-dioxosébacique **22**.

7.8.2.5 Composé sulfone **16** (sulfone/*Pa*PBGS)

Des inhibiteurs *slow binder* dicarbonylés étudiés, le composé sulfone **16** offre la plus grande surprise par sa structure cristalline, en montrant un mode unique de liaison à l'enzyme (Figure 139). L'inhibiteur est fixé de manière covalente *via* uniquement une base de Schiff dans le site P (Lys260). Comme dans le cas de la structure éther/*Pa*PBGS, la seconde base de Schiff n'est pas formée et la liaison C-C n'est pas observée. La conformation de l'inhibiteur **16** dans le site P ainsi que les interactions avec les résidus environnants sont identiques à ce qui est déjà observé pour les structures 5F-LA/*Pa*PBGS, 5-OH-LA/*Pa*PBGS, ALA/*Sc*PBGS et éther/*Pa*PBGS (dans le site P). Dans le site A, contrairement à l'éther **12**, l'inhibiteur **16** est totalement défini par une densité électronique. Le groupement carboxylate de ce site A, est fixé dans la position attendue mais avec une orientation inclinée de 90 degrés, soulignant à nouveau la flexibilité de reconnaissance de cette partie du site actif. Bien que la formation de la seconde base de Schiff dans le site A ne se soit pas produite, le groupement cétone sur le carbone 4 de l'inhibiteur **16** et le groupement amine de la Lys205 se trouvent à une distance permettant une liaison hydrogène. Cette conformation inattendue est probablement le résultat d'une prédisposition à la liaison d'un ion métallique dans le site actif. Effectivement, pour la première fois, un ion magnésium est stabilisé dans le site actif d'une enzyme indépendante du zinc. Cet ion magnésium est coordiné aux résidus Asp131, Asp139, Asp176 ainsi qu'à trois molécules d'eau. L'inhibiteur chélate le métal de manière indirecte à travers des interactions hydrophiles entre le groupement carboxylate et le groupement sulfonyle de **16** du site A avec les trois molécules d'eau. La nature de cet ion métallique est déterminée par la sphère de coordination octaédrique, par la densité électronique et par la distance métal-atome d'oxygène. La stabilisation au site actif d'un ion chlorure, proche de l'ion magnésium, complète un environnement de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène. La présence de cet ion chlorure au site actif ne connait pas de précédent dans les autres structures de la PBGS étudiées jusqu'à maintenant. Cet ion chlorure est connecté au réseau de liaisons hydrogène grâce aux molécules d'eau. Il est possible qu'avec la liaison de l'ion métallique, l'enzyme s'adapte ainsi à l'inversion de polarité provoquée par le changement du groupement

amino (site P) du substrat naturel ALA **5** par la fonction sulfonyle de l'inhibiteur **16**. La liaison de l'ion chlorure peut être un moyen d'équilibrer la polarité et la charge du complexe.

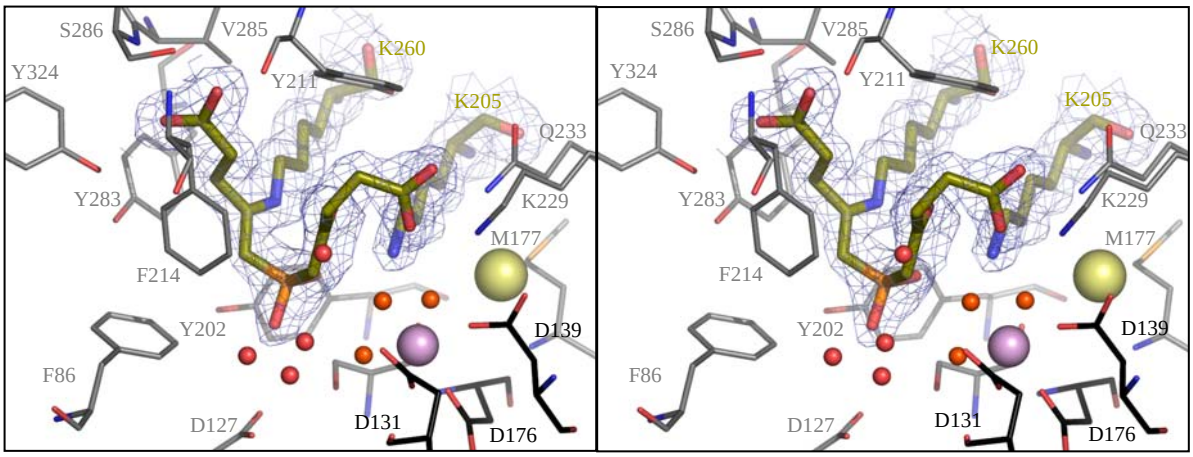


Figure 139 : Composé sulfone **16** co-cristallisé avec la PBGS. L'inhibiteur, en vert olive, est lié uniquement à la Lys260 du site P *via* une base de Schiff. La liaison intramoléculaire n'est pas formée. Un ion magnésium (en violet) et un ion chlorure (en jaune) sont liés au site actif. Le résidu Asp131 montre deux conformations alternatives. Les résidus environnants sont colorés en gris et les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

Dans le site P, le groupe carboxylate de **16** est reconnu à travers des liaisons hydrogène avec les résidus Tyr324 et Ser286 et la partie apolaire de l'inhibiteur (carbones 7 à 10) forment des interactions hydrophobes avec les résidus Phe86, Tyr202, Tyr211, Phe214 et Tyr283. Dans le site A, Le groupe carboxylate de **16** est incliné de 90 degrés par rapport a ce qui était attendu mais forme quand même les interactions hydrophiles avec les résidus Arg215, Lys229, Gln233 et deux des trois molécules d'eau chélatées à l'ion magnésium. Cette inclinaison est la conséquence de la présence du Mg^{2+}. La fonction centrale sulfonyle a également la possibilité d'interagir comme accepteur de liaisons hydrogène grâce à ces deux atomes d'oxygène. Un des deux atomes d'oxygène est à une distance permettant une liaison hydrogène avec la lysine du site A (Lys205). Le second atome d'oxygène, quant à lui, semble former des liaisons hydrogène avec les résidus Asp127, Ser174 et une des trois molécules d'eau chélatées à l'ion magnésium.

Pour le moment, nous ne pouvons pas dire si la présences des deux ions Mg^{2+} et Cl^- est la conséquence de la structure particulière de l'inhibiteur **16** ou si cette présence est caractéristique pour une étape du mécanisme que nous aurions pu trapper grâce à l'inhibiteur. Par contre, l'inhibition *slow binder* observée pour ce composé **16** semble maintenant pouvoir s'expliquer par la complexation du Mg^{2+} et du Cl^- qui sont des réactions consécutives et probablement lentes engendrant une restructuration du site actif. Le fait qu'un terme de coopérativité a du être introduit pour calculer la constante d'inhibition est en accord avec cette hypothèse.

La Figure 140 montre la structure LA/*Sc*PBGS [43] superposée à la structure sulfone/*Pa*PBGS. L'acide lévulinique **17** est lié *via* une base de Schiff au site P de l'enzyme. Dans le site P, les deux ligands ont la même configuration. Les résidus environnants sont situés de manière similaire dans les deux structures. L'ion magnésium provenant de la structure sulfone/*Pa*PBGS et l'ion zinc de *Sc*PBGS sont situés au même endroit dans le site actif de l'enzyme. Ceci pourrait être une indication que notre structure sulfone/*Pa*PBGS pourrait être reliée au mécanisme et ne pas être une structure aberrante due à notre inhibiteur.

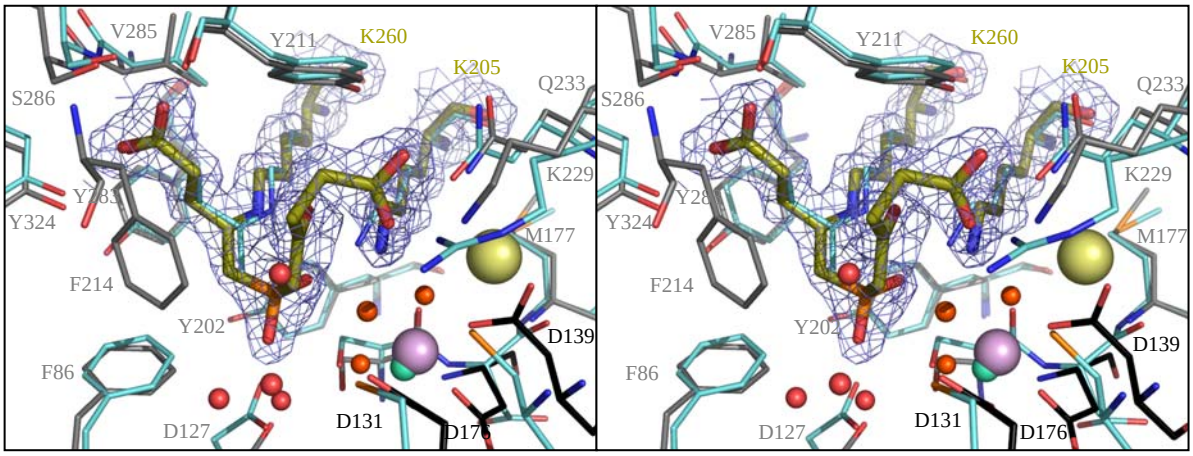


Figure 140 : Superposition de la structure LA/*Sc*PBGS [43], en cyan, avec la structure sulfone/*Pa*PBGS. L'acide lévulinique **17** est lié *via* une base de Schiff dans le site P. L'ion zinc de *Sc*PBGS est représenté par une sphère cyan et se trouve au même endroit que l'ion magnésium de la structure sulfone/*Pa*PBGS (en violet)

Nous pouvons à nouveau remarquer à quel point ces deux structures provenant de deux enzymes classées dans les deux catégories différentes des PBGS, sont similaires. De plus, il a été prouvé pour la première fois, qu'un ion magnésium peut être stabilisé au site actif de la PBGS dans la même position que l'ion zinc dans les PBGS dépendantes du zinc. Cette observation est en faveur de l'hypothèse que les deux types d'enzyme ont malgré leurs différences un mode de fonctionnement similaire. Mais malheureusement le rôle de cet ion magnésium ne peut pour l'instant pas encore être déterminé avec confiance.

8 Discussion

8.1 Différences conformationnelles entre les structures

Les différences conformationnelles entre les six structures se restreignent à la boucle qui connecte les résidus Asp131 avec Asp139 et au *lid* du site actif. Le reste de l'enzyme et spécialement le reste du site actif apparaissent remarquablement rigides et inchangés par les liaisons des différentes substances. Cette observation peut même être étendue aux PBGS issues de différentes sources avec ou sans ligands liés. La flexibilité nécessaire au site actif est donc réalisée par les résidus de ces deux boucles et ainsi cette région montre une adaptabilité considérable. Cette souplesse est montrée par le nombre changeant de molécules d'eau liées dans cette région, qui dépend de la substance liée au site actif, ainsi que la stabilisation de ions magnésium et chlorure au site actif, dans le cas particulier de la structure sulfone/*Pa*PBGS. La flexibilité de ces boucles est aussi reflétée par les facteurs de température des résidus correspondants qui sont bien en dessus de la moyenne pour toutes les structures.

8.2 Présence d'un ion magnésium au site actif de l'enzyme

La liaison d'un ion magnésium au site actif des PBGS ne contenant pas de site de liaison pour le zinc, est étudiée depuis longtemps. Jusqu'à maintenant seules des données RMN et cinétiques supportent l'hypothèse qu'un ion magnésium peut se fixer au site actif de l'enzyme [39, 180], alors que toutes les structures résolues des PBGS indépendantes du zinc étudiées jusqu'à maintenant montrent un ion magnésium uniquement lié au site allostérique éloigné du site actif de l'enzyme [46, 48, 76]. La structure sulfone/*Pa*PBGS montre donc pour la première fois un ion magnésium stabilisé au site actif d'une PBGS indépendante du zinc (Figure 141). Comme cela a été suggéré, les résidus Asp131 et Asp139 sont responsables de l'interaction directe avec l'ion magnésium. Pour les enzymes dépendantes du zinc, ces deux résidus sont remplacés par des résidus cystéines qui permettent de stabiliser l'ion zinc au site actif. Le plus surprenant est le résidu Asp176 qui pivote et se déplace considérablement en dehors de sa position habituelle dans le site actif, afin de venir compléter la sphère de coordination de l'ion métallique. La sphère de coordination est donc composée des trois résidus Asp131, Asp139 et Asp176 ainsi que de trois molécules d'eau. L'ion magnésium de la structure sulfone/*Pa*PBGS se trouve dans une position équivalente au zinc de la structure LA/*Sc*PBGS [43] (Figure 140). De plus, un ion chlorure est lié au site actif, proche de l'ion métallique, probablement pour équilibrer la charge positive introduite par l'ion magnésium.

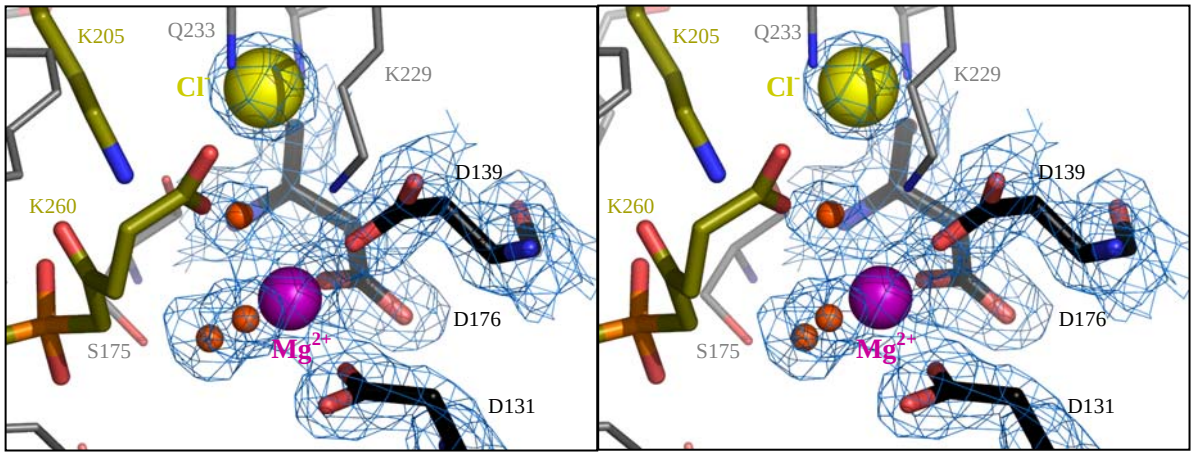


Figure 141 : Coordination de l'ion magnésium, en violet, dans le site actif de la structure sulfone/*Pa*PBGS. La densité électronique (en bleu) décrit l'ion métallique et sa sphère de coordination octaédrique dont les ligands sont Asp131, Asp139, Asp176 et trois molécules d'eau qui interagissent avec la sulfone **16** et l'ion chlorure, en jaune, à travers des liaisons hydrogène. Les résidus environnants sont colorés en gris

Une des hypothèses qui peut être faite sur la présence de cet ion magnésium est de dire que nous sommes en présence d'une étape du mécanisme qu'on aurait pu trapper grâce au composé **16**, où l'ion aurait un rôle à jouer. Cependant la présence du magnésium au site actif de l'enzyme ne doit pas faire oublier le fait que cet ion métallique est stabilisé à travers des interactions artificielles entre le groupement sulfonyle de l'inhibiteur **16** et les résidus coordinés au magnésium. La question est de savoir si les deux groupements amino des intermédiaires naturels ou du produit localisé dans cette région sont capables *in vivo* de stabiliser directement ou indirectement (à travers des molécules d'eau) un tel ion magnésium. Néanmoins, il est étonnant que cette partie du site actif soit suffisamment flexible pour permettre la liaison des ions magnésium et chlorure. Ainsi cette nouvelle structure (sulfone/*Pa*PBGS) rétablit l'idée que les PBGS indépendantes au zinc pourraient lier le magnésium temporairement durant la catalyse. En ajoutant les informations de cette structure avec celles de la structure 5F-LA/*Pa*PBGS, où un cation monovalent est lié au site actif [46], celles des différents mutants de *Pa*PBGS (XXC, CCX, XCC et CCC) montrant des différents sites de liaison de l'ion zinc dans le site actif [181] et celles des enzymes liant naturellement le zinc au site actif (PBGS humaine, de levure, d'*Escherichia coli*, etc…), nous pouvons dire que les PBGS montrent une adaptation incroyable pour la liaison et la stabilisation de différents ions métalliques au site actif.

8.3 Mécanisme de la PBGS proposée à l'issue des résultats obtenus

La comparaison des structures des analogues de bisubstrat **12-16** et de l'analogue de substrat **36** complexés à la PBGS avec les structures récemment résolues [43, 45, 46, 85, 90, 91, 182], permet de décrire en détail le mécanisme catalytique de la formation du porphobilinogène **6** (Figure 142).

La première base de Schiff est formée entre le groupement cétone de la première molécule de substrat ALA **5** et la lysine du site P (Lys260), comme cela a été prouvé par de nombreuses structures cristallines et par les études biochimiques qui ont permis de mettre en évidence cette première base de Schiff [41, 43, 44, 68, 70, 75, 183] (Figure 142, I). En plus de la stabilisation par la base de Schiff, ce premier substrat est fixé par des liaisons hydrogène entre son groupement carboxylate et des résidus environnants (Tyr324 et Ser286) ainsi que par des interactions hydrophobes entre la partie apolaire du substrat (carbones 2 à 5) et des résidus acides aminés (Tyr211, Tyr283 et Phe214 entre autre) présents dans le site actif de l'enzyme.

La deuxième molécule ALA **5** se lie également *via* une base de Schiff à la lysine du site A (Lys205) (Figure 142, II). Ce site A est la partie la plus flexible du site actif. Le deuxième substrat est stabilisé par plusieurs interactions bien définies. Le groupement carboxylate forme des liaisons hydrogènes avec des résidus environnants (Arg215 et Gln233). Le site actif est protégé du milieu environnant par la présence d'un *lid* ordonné. Les structures 5-OH-LA/*Pa*PBGS et 5-F-LA/*Pa*PBGS [46] imitent cet état précédant le début de la catalyse. *In vivo*, la formation de la seconde base de Schiff est temporaire et suivie par la première étape de la catalyse: la formation de la liaison C-C. Cette étape est supportée par les complexes éther/*P*aPBGS et sulfone/*Pa*PBGS où la seconde base de Schiff est manquante. Dans ce cas, la liaison C-C n'est pas formée. Contrairement aux complexes où la seconde base de Schiff est présente et où la liaison C-C est formée (complexes amine/*Pa*PBGS, thioéther/*Pa*PBGS et sulfoxyde/*Pa*PBGS). Ainsi la formation de la seconde base de Schiff (site A) semble une condition nécessaire pour la formation de la liaison C–C.

Pourquoi la liaison C-N ne se formerait pas en premier ? Afin de répondre à cette question, la comparaison entre les complexes amine/*Pa*PBGS, thioéther/*Pa*PBGS, sulfoxyde/*Pa*PBGS et DOSA/*Ec*PBGS [45], DOSA/*Sc*PBGS [85] aide à comprendre, que la formation de la liaison C-C peut se former uniquement quand la substance possède suffisamment de flexibilité conformationnelle, ce qui est le cas pour les deux molécules ALA **5** avant la formation de la liaison C-N. Ainsi cela permet l'attaque du nucléophile (carbone 3 de ALA **5** ou des inhibiteurs du site A) sur l'électrophile (carbone 4 du second ALA **5** ou carbone 8 des inhibiteurs du site P) suivant les angles Bürgi-Dunitz (Figure 142, IV). Dans la structure du mutant F21L de la PBGS humaine [91], qui a un état oligomère différent des PBGS étudiées jusqu'à maintenant et un site actif partiellement désordonné, la substance liée représente un intermédiaire où la formation de la liaison C-C a eu lieu mais où la formation de la liaison C-N n'est pas encore faite, amenant ainsi une preuve supplémentaire à la séquence de réaction décrite.

A la suite de cette réaction d'aldolisation, la liaison C-N peut se former par l'attaque du groupement amino du substrat présent dans le site P sur la base de Schiff du site A (Figure 142, V). Cette fermeture du cycle provoque un échange de base de Schiff, permettant la libération de la lysine du site A (Lys205). L'intermédiaire cyclique ainsi formé ressemble exactement à ceux stabilisés dans les complexes intermédiaireI/*Sc*PBGS [90] et

intermédiaire/*Hs*PBGS [182] ainsi que dans une structure de *Pa*PBGS non publiée. L'existence de tels complexes intermédiaires capables de cristalliser, indique que cet état est stable, ce qui est surprenant. L'explication de cette stabilité relative vient certainement de la conversion lente de cet intermédiaire en produit, qui doit passer par la rupture de la liaison simple restante avec la lysine du site P, permettant ainsi la libération de cette dernière (Lys260). Il a été suggéré que la liaison du substrat dans un site actif voisin de la PBGS multimère déclenche un changement conformationnel qui facilite la rupture avec la Lys260 [96]. Cette étape semble être l'étape limitante de la vitesse de catalyse ce qui explique que la PBGS soit une enzyme lente avec un k_{cat} ayant un ordre de grandeur de 1/seconde et un rapport de k_{cat}/K_M de 10 $s^{-1} \cdot mM^{-1}$. La stabilisation d'intermédiaires cycliques dans la PBGS semble être la raison pour laquelle l'acide 5-hydroxylévulinique **36** ne subit pas la réaction d'aldolisation (formation de la liaison C-C). Nous avons supposé que la formation de la liaison C-O, analogue à la liaison C-N du substrat naturel, n'a pas lieu à cause de la faible nucléophilie de l'alcool. Ainsi l'intermédiaire non cyclique obtenu uniquement après la formation de la liaison C-C ne serait pas stabilisé de manière optimale par l'enzyme et la réaction en elle-même n'a pas la force motrice requise pour se faire.

La cinétique et les structures des inhibiteurs testés dans ce travail supportent l'hypothèse de la stabilisation apportée par les intermédiaires cycliques. L'acide 5-hydroxylévulinique **36** et le composé éther **12** ne forment pas d'intermédiaire cyclique et sont des inhibiteurs rapidement réversible *(fast binder*). Au contraire, les composés amine **13**, thioéther **14** et sulfoxyde **15** sont des inhibiteurs réversibles lents (*slow binder*) soulignant que la libération du produit respectif à travers la rupture de la base de Schiff dans le site A aussi bien que la rupture de la simple liaison liant l'intermédiaire à la lysine du site P, est un événement lent. Le composé sulfone **16** ne rentre pas dans le schéma cinétique décrit ci-dessus parce qu'il se comporte comme un inhibiteur réversible lent (*slow binder*) ne formant ni la deuxième base de Schiff dans le site A, ni la nouvelle liaison C-C. Ce comportement semble s'expliquer par la stabilisation des ions magnésium et chlorure dans le site actif, engendrant ainsi une restructuration probablement lente de ce dernier. Il est aussi à noter que cet inhibiteur est le seul qui nécessite l'introduction du terme de coopérativité h dans l'équation (28) afin de permettre l'interprétation des données cinétiques.

Pour finir ce mécanisme enzymatique, la libération de l'intermédiaire est réalisée par la protonation lente du groupe amino de la lysine du site P (Figure 142, VI), suivie par la rupture de la liaison simple connectant cette lysine à l'intermédiaire (Figure 142, VII). Un proton est arraché de manière stéréospécifique [99] suivie de l'isomérisation des doubles liaisons et de la libération du produit (Figure 142, VIII).

Le mécanisme de la PBGS décrit ci-dessus correspond donc au mécanisme décrit sous l'appellation de Jordan II dans le chapitre 4 (Figure 142). Les résultats obtenus dans ce travail n'apportent aucune information supplémentaire concernant l'origine des bases (B(1) et B(2)) nécessaires pour la formation des deux nouvelles liaisons. Par contre, plusieurs preuves

(décrites ci-dessus et déjà citées dans le chapitre 4) semblent maintenant converger vers un mécanisme nécessitant la formation des deux bases de Schiff dans les site A et P avec les deux molécules de substrat respectivement, favorisant ainsi la liaison C-C en premier. Ces conclusions permettent maintenant de dire que les inhibiteurs acides 4-oxosébacique **20** et 4,7-dioxosébaciques **22** se comportent comme des analogues de bisubstrat et non pas comme des analogues de l'intermédiaire Jordan I comme cela fut suggéré [176, 184].

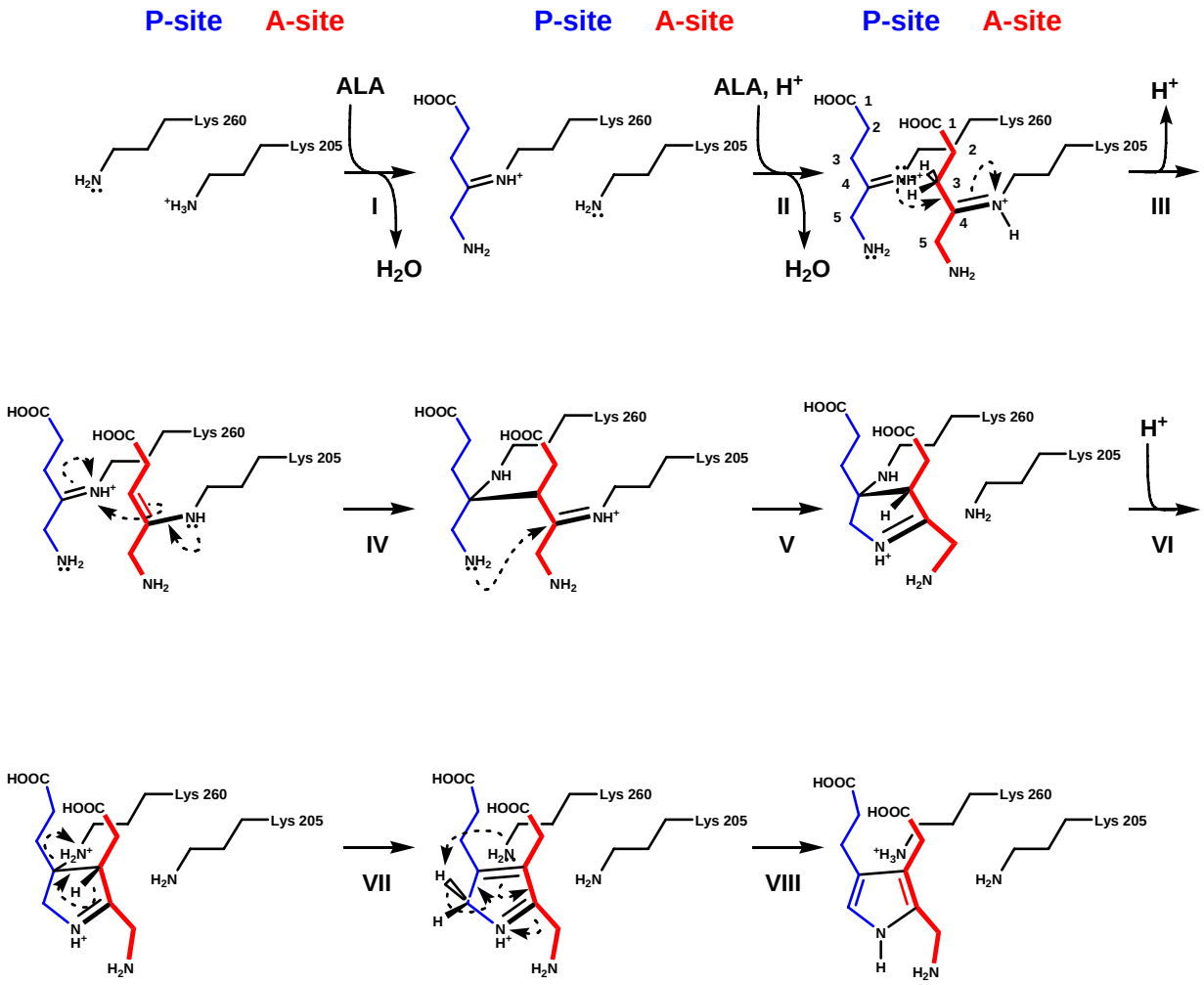


Figure 142 : Mécanisme réactionnel de la PBGS proposé à l'issue de ce travail

9 Conclusion

Afin d'apporter de nouvelles informations concernant le mécanisme de la porphobilinogène synthase, une nouvelle classe d'analogues de bisubstrat a été synthétisée. Ces nouveaux composés ont été analysés afin de lever toute ambiguïté sur la structure minimale imitant les intermédiaires clés du mécanisme Jordan I, qui peuvent également être considéré comme des analogues de bisubstrat (Figure 143) et qui sont d'excellents inhibiteurs par rapport aux analogues d'intermédiaires clés du mécanisme Jordan II.

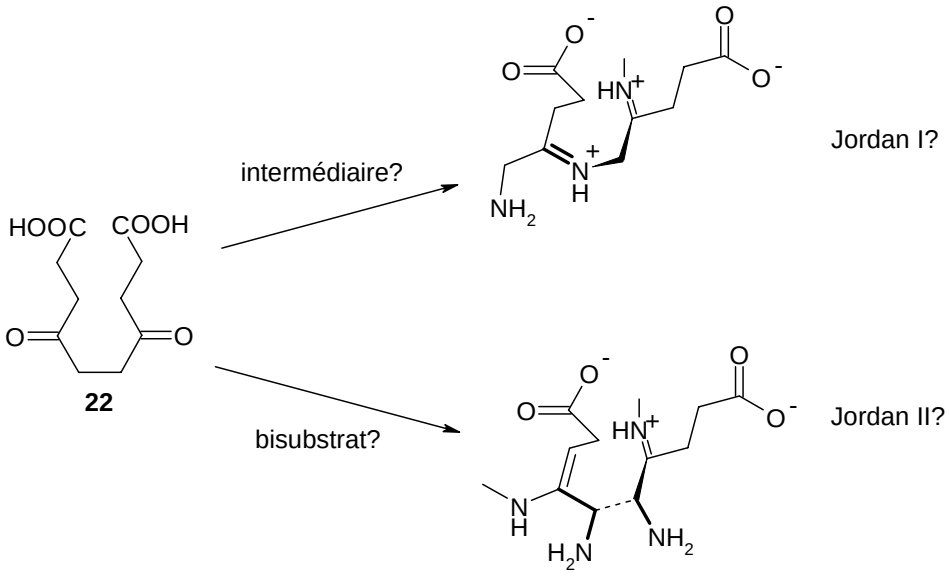


Figure 143 : Les composés diacides dicétones peuvent se comporter aussi bien comme analogues d'intermédiaire que comme analogues de bisubstrat

La structure minimale, pour une bonne reconnaissance au site actif de la PBGS, doit contenir un squelette linéaire, deux groupements carboxylates et au minimum une fonction cétone de manière à former un lien covalent avec une lysine présente au site actif de l'enzyme. Ainsi, les dimères **12-16** symétriquement liés, dérivant de l'acide lévulinique (acide γ-céto-valérique), ont été synthétisés afin d'imiter la liaison des deux molécules de substrat naturel au site actif de la PBGS. Ces nouveaux composés offrent un degré de liberté supplémentaire pour une conformation moins tendue au site actif, grâce à l'addition d'une partie centrale (*linker*) qui n'est pas présente dans les composés diacides dicétones synthétisés jusqu'à maintenant, comme par exemple l'acide 4,7-dioxosébacique **22**. Ces molécules ont permis de tester l'influence de la fonction centrale (*linker*) supplémentaire, comparée à l'acide 4,7-dioxosébacique **22**, ainsi que l'influence du volume et de la polarité de leur *linker* sur leur efficacité à inhiber la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*. Différents hétéroatomes sont utilisés pour lier les deux unités acide lévulinique de cette série d'analogue de bisubstrat (Figure 144).

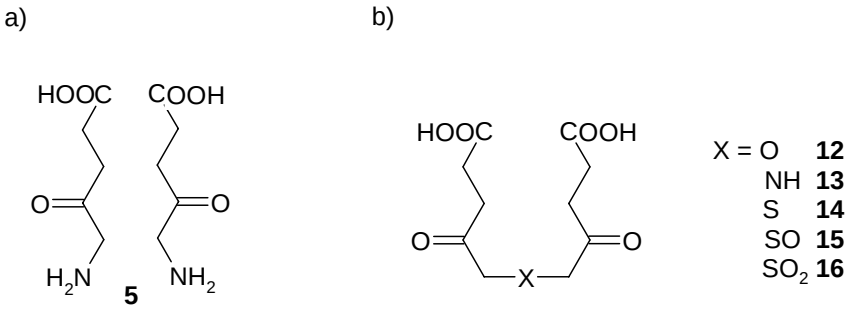


Figure 144 : a) deux molécules du substrat naturel ALA **5** ; b) les analogues de bisubstrat **12-16**

Dans un premier temps, les potentiels d'inhibition de ces analogues de bisubstrat ont été déterminés en mesurant la valeur IC_{50} sur la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*. Les composés **12-14** ont montré un très bon potentiel pour l'inhibition de la réaction enzymatique, tandis que les deux composés **15** et **16** ont montré un potentiel moins important. Ce phénomène peut s'expliquer par le groupement central plus encombrant qui lie les deux parties symétriques des inhibiteurs **15** et **16** par rapport aux autres inhibiteurs. Il semblerait donc, au vue de ces résultats, que la grandeur optimale pour cette série d'inhibiteurs comportant les fonctions diacides et dicétones, est atteinte avec les composés **12-14**.

Le composé éther **12** ne suit pas le même comportement vis-à-vis du temps que les autres inhibiteurs. **12** est un inhibiteur indépendant du temps de préincubation avec la PBGS. Ce qui est surprenant, car la structure de ce composé est semblable aux autres alors qu'un comportement identique était attendu pour les cinq analogues de bisubstrat étudiés dans ce travail. Le composé **12** a été déterminé comme étant un inhibiteur *fast binder* mixte avec une constante d'inhibition K_I de 151 μM, ce qui en fait un excellent inhibiteur. Le type d'inhibition mixte suggère que l'inhibiteur est reconnu dans le site A et dans le site P de la PBGS.

L'acide 5-hydroxylévulinique **36**, obtenu par hydrolyse de **12**, est également un inhibiteur *fast binder* compétitif avec une constante d'inhibition de 1.45 mM. Ce composé est très intéressant parce qu'il est un analogue de substrat, structurellement et chimiquement le plus proche du substrat naturel ALA **5**.

Les quatre composés **13-16** sont des inhibiteurs *slow binder*, dont l'inhibition dépend du temps de préincubation avec l'enzyme. Les composés amine **13** et thioéther **14** sont d'excellents inhibiteurs, avec un K_I de 225 μM et 62.0 μM respectivement. La constante d'inhibition pour les composés sulfoxyde **15** et sulfone **16** montrent la même augmentation de valeurs déjà observée pour les valeurs IC_{50} et ont donc un K_I de 10.8 mM et 11.0 mM respectivement. Il est à noter qu'un terme de coopérativité a été nécessaire pour le calcul de la constante d'inhibition pour le composé **16**, suggérant ainsi un mode de liaison à la PBGS différent par rapport aux autres inhibiteurs *slow binder*. Le type d'inhibition non compétitif

déterminé pour les composés thioéther **14** et sulfone **16** n'a jamais été observé jusqu'à maintenant sur des inhibiteurs de la PBGS. Le mode d'inhibition *slow binder* a déjà été observé pour des inhibiteurs et ces derniers pouvaient être reconnus dans les deux sites (A et P) simultanément. De plus, la structure et la longueur des inhibiteurs **12-16** laissent supposer que les composés sont reconnus dans les deux sites A et P de l'enzyme.

Les différents paramètres cinétiques déterminés pour les inhibiteurs synthétisés dans ce travail sont résumés ci-dessous (Tableau 15).

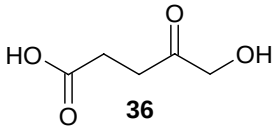
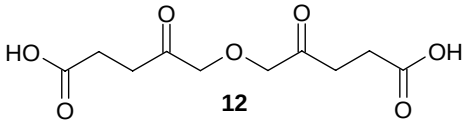
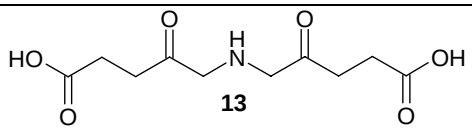
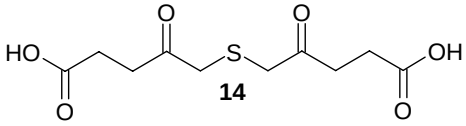
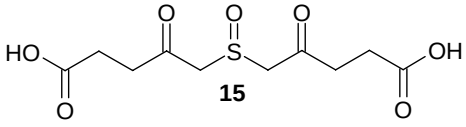
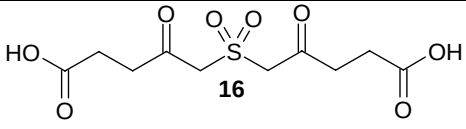
Inhibiteurs	**IC_{50} [48]**	**K_I [μM]**	**Dépendant du temps**	**Type d'inhibition**
 **36**	4.05	1450	non	*fast binder* compétitif
 **12**	0.96	151	non	*fast binder* mixte
 **13**	0.31	225	oui	*slow binder*
 **14**	0.34	62.0	oui	*slow binder* non compétitif
 **15**	38.4	10800	oui	*slow binder*
 **16**	9.94	11000 (h=2.3)	oui	*slow binder* non compétitif

Tableau 15 : Résumé des paramètres cinétiques des inhibiteurs **12**-**16** et **36** obtenus avec la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*

Les structures résolues par rayons X des inhibiteurs **12-16** et **36** avec la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* ont apporté de nouvelles informations concernant le mécanisme enzymatique.

L'acide 5-hydroxylévulinique **36** est reconnu dans les sites A et P de l'enzyme. Deux molécules sont donc liées de manière covalente *via* deux bases de Schiff avec les lysines présentes dans le site A et P respectivement. Ce résultat laisse donc suggérer que les deux molécules de substrat ALA **5** sont fixées de manière covalente au site actif de l'enzyme. Le composé éther **12** est reconnu par une base de Schiff au site P de l'enzyme. Les composés

amine **13**, thioéther **14** et sulfoxyde **15** forment deux bases de Schiff avec les lysines présentes au site A et P respectivement. Dans ces trois cas, une cyclisation de l'inhibiteur est observée par formation de la liaison C-C entre les carbones 3 (situé dans le site A) et 8 (situé dans le site P), transformant ainsi la base de Schiff dans le site P en liaison simple entre le carbone 8 et la lysine (Lys260).

Pour les inhibiteurs liés au site actif de l'enzyme *via* les deux bases de Schiff, la formation d'un intermédiaire cyclique, par création d'une nouvelle liaison C-C, est observée. Ce phénomène se produit uniquement avec des inhibiteurs *slow binder* (amine **13**, thioéther **14** et sulfone **15**). L'inhibiteur *fast binder* éther **12** ne forme qu'une base de Schiff dans le site P et l'intermédiaire cyclique n'est pas observé (pas de formation de la liaison C-C). L'acide 5-hydroxylévulinique **36** forme bien les deux bases de Schiff au site actif de l'enzyme, mais dans ce cas la liaison C-C entre les deux molécules n'est pas observée. Cela s'explique par le fait que seul les intermédiaires cycliques semblent être stabilisés dans le site actif et dans ce cas l'intermédiaire formé ne peut pas être stabilisé de manière optimale. La structure de l'enzyme avec l'analogue de substrat **36** est une preuve en faveur de la fixation des deux molécules de substrat naturel ALA **5** au site actif de l'enzyme *via* deux bases de Schiff avec respectivement la lysine du site A (Lys205) et celle du site P (Lys260). Les structures de l'enzyme avec les analogues de bisubstrat **12-15** sont en faveur de l'hypothèse suggérant que les deux bases de Schiff favorisent la formation en premier de la liaison C-C entre les deux molécules de substrat naturel ALA **5** afin de former le PBG **6**.

La comparaison entre les complexes amine/*Pa*PBGS, thioéther/*Pa*PBGS, sulfoxyde/*Pa*PBGS et DOSA/*Ec*PBGS, DOSA/*Sc*PBGS montre que la formation de la liaison C-C ne peut se former uniquement que quand la substance possède suffisamment de flexibilité conformationelle. Ainsi le *linker* ajouté aux analogues de bisubstrat **12-15** comparé à l'analogue de bisubstrat acide 4,7-dioxosébacique **22**, a permis d'introduire un degré de liberté supplémentaire à la configuration de ces composés dicarbonylés dicétones. Cela a permis un mode de liaison moins tendu dans le site actif et la possibilité de la formation de la liaison C-C intramoléculaire, qui n'est pas possible avec des molécules tel que l'acide 4,7-dioxosébacique **22**. Dans le cas des deux molécules de substrat, il y a plus de flexibilité conformationelle avant la formation de la liaison C-N qu'après. Cette comparaison est une preuve supplémentaire pour soutenir l'hypothèse de la formation de la liaison C-C en premier.

Bien qu'étant un composé *slow binder*, le composé **16** ne forme qu'une seule base de Schiff dans le site P. A partir de cette observation, le fait que **16** ne forme pas l'intermédiaire cyclique n'est donc pas surprenant. Cet inhibiteur se lie donc d'une manière unique au site actif de l'enzyme par rapport aux autres inhibiteurs *slow binder* **13-15**. La surprise de cette structure réside dans le fait qu'un ion métallique et qu'un ion chlorure sont stabilisés au site actif de l'enzyme. C'est la première structure montrant une PBGS indépendante du zinc stabilisant un ion magnésium dans son site actif. Cette observation relance l'hypothèse que les PBGS indépendantes du zinc, pourraient lier temporairement un ion magnésium durant la

catalyse. Il ne faut tout fois pas écarter le fait que cet ion métallique est lié de manière artificielle grâce au ligand de la structure sulfone/*Pa*PBGS. Quoiqu'il en soit, les PBGS montrent une adaptation incroyable pour la liaison et la stabilisation au site actif, de ions de nature différente (zinc, magnésium, chlorure, sodium et/ou potassium).

Les différentes informations obtenues à partir des structures aux rayons X des inhibiteurs avec l'enzyme sont résumées ci-dessous (Tableau 16).

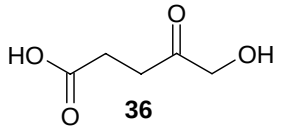
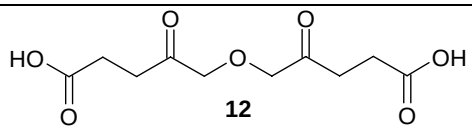
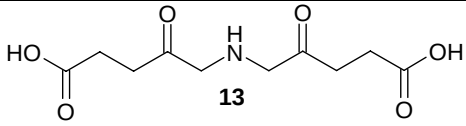
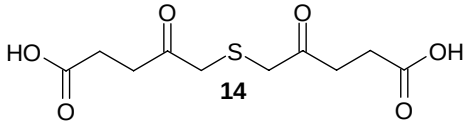
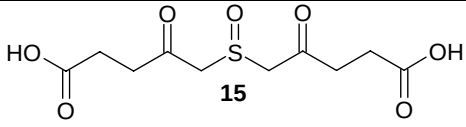
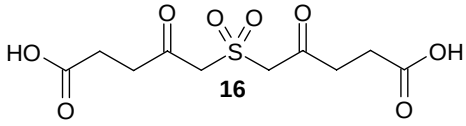
Inhibiteurs	**Type d'inhibition**	**Formation de la base de Schiff dans**		**Formation de la liaison C-C**
		le site P	**le site A**	
 **36**	*fast binder*	oui	oui	non
 **12**	*fast binder*	oui	non	non
 **13**	*slow binder*	oui	oui	oui
 **14**	*slow binder*	oui	oui	oui
 **15**	*slow binder*	oui	oui	oui
 **16**	*slow binder*	oui	non	non

Tableau 16 : Résumé des informations obtenues à partir des structures aux rayons X des inhibiteurs **12**-**16** et **36** avec la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa*

Les informations récoltées sur les structures des inhibiteurs **12**-**16** et **36** avec la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa* sont en faveur d'un mécanisme ressemblant celui postulé par Jordan II. La reconnaissance et la fixation des substrats débutent par la formation de la première base de Schiff dans le site P entre la première molécule d'ALA **5** et la lysine (Lys260), suivie par la formation de la deuxième base de Schiff avec la seconde molécule de substrat et la lysine du site A (Lys205). La formation du PBG **6** commence par une réaction d'aldolisation entre les deux molécules de substrat, formant ainsi la nouvelle liaison C-C. La réaction enzymatique se poursuit par la formation de la base de Schiff inter-substrats pour

former la liaison C-N. La structure azacyclopentane de l'intermédiaire ainsi formé se transforme en porphobilinogène **6** par déprotonations et par libérations successives de la lysine du site A (Lys205) puis du site P (Lys260).

Les résultats obtenus pour les différents inhibiteurs étudiés dans ce travail confirment bien les corrélations qui ont été faites entre le type de l'inhibition et le site d'interactions au site actif (site A et/ou site P). Les inhibiteurs mixtes et *slow binder* sont donc bien reconnus dans les deux sites A et P de l'enzyme.

L'élaboration d'une nouvelle classe d'analogues de bisubstrat, puissants inhibiteurs de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa*, appliquée à la co-cristallisation avec l'enzyme, a permis d'apporter de nouvelles hypothèses dans la détermination du mécanisme enzymatique de la condensation asymétrique de deux molécules ALA **5** en PBG **6**.

10 Perspectives

A la suite de ce travail, nous avons imaginé la synthèse de nouveaux composés pouvant être testés sur la PBGS. Différents nouveaux inhibiteurs potentiels sont présentés dans ce chapitre. La synthèse de l'acide 5-mercaptolévulinique **76** viendait ainsi compléter la série des analogues de substrat comprenant déjà les acides 5-aminolévulinique **5** et 5-hydroxylévulinique **36** (Figure 145).

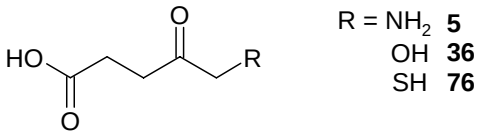


Figure 145 : Série d'analogues de substrat comprenant les acides 5-aminolévulinique **5**, 5-hydroxylévulinique **36** et 5-mercaptolévulinique **76**

Comme l'analogue de bisubstrat sulfone **16** stabilise un ion magnésium au site actif de l'enzyme, il serait interessant de voir si l'analogue de substrat sulfone **77** est également capable de stabiliser un tel ion métallique (Figure 146).

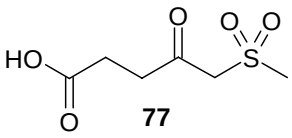


Figure 146 : Analogue de substrat sulfone **77**

Suite à la nouvelle série d'analogues de bisubstrat **12-16** synthétisés dans ce travail, une nouvelle série peut être envisager contenant encore un atome supplémentaire entre les deux fonctions cétone. Les nouveaux composés **78** et **79** vont ainsi permettre de montrer l'influence, au site acitf de la PBGS, de ce degré de liberté supplémentaire par rapport aux composés **12-16** (Figure 147).

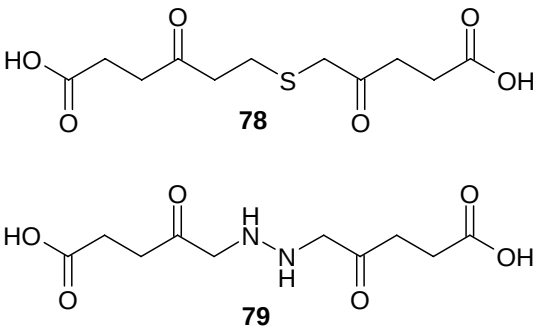


Figure 147 : Nouvelle série d'analogues de bisubstrat: l'acide 6-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-hexanoique **78** et l'acide 5-[N'-(carboxy-2-oxo-butyl)hydrazino]-4-oxo-pentanoique **79**

11 Partie expérimentale chimique

11.1 Méthodes analytiques et appareils

11.1.1 Chromatographie

11.1.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur) avec gel de silice 60 F_{254} (indicateur de fluorescence) sur aluminium (merck, Darmstadt). Après élution dans le système de solvants donné, les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm) puis par l'atomisation d'une solution aqueuse basique de $KMnO_4$.

11.1.1.2 Chromatographie sur colonne – chromatographie flash

Les colonnes sont effectuées avec du gel de silice 60, grosseur de grains 0.040 - 0.063 mm (230 - 400 mesh ASTM) (Merck, Darmstadt). L'éluant et les proportions du mélange utilisées sont décrits dans la partie expérimentale. Les chromatographies sur colonnes s'effectuent sous pression (p = 0.5 - 0.9 atm) sauf indication dans la partie expérimentale.

11.1.2 Spectroscopie infrarouge (IR)

Un spectromètre du type Perkin Elmer FT-IR 1720 X est utilisé pour l'obtention des spectres IR, avec une résolution de 2 cm^{-1}. Les substances cristallines sont analysées dans des pastilles de KBr (puriss p.a., Fluka, Buchs) et les liquides purs sous forme de film (sandwich) entre deux plaques de KBr. Les bandes d'absorption sont données en longueur d'onde entre 4000 et 400 cm^{-1} et différenciées selon leur intensité (division du spectre en 3 parties égales) par des abréviations vs (très intense), s (intense), m (moyenne), w (faible), vw (très faible) ou br (large).

11.1.3 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les mesures RMN pour les spectres ^{1}H à 200 MHz et ^{13}C à 50 MHz sont effectuées avec un spectromètre Gemini XL-200 de Varian et les spectres ^{1}H à 400 MHz et ^{13}C à 100 MHz sont effectués avec un spectromètre Bruker AMX-400. La fréquence de mesure, la température ainsi que le solvant sont précisés entre parenthèse dans chaque cas. Les solvants deutérés proviennent des Cambridge Isotope Laboratories. Le standard interne pour les spectres du

proton (^{1}H): TMS (δ_H = 0.00 ppm), $CDCl_3$ (δ_H = 7.26 ppm), DMSO-d_6 (δ_H = 2.50 ppm), CD_3OD (δ_H = 3.31 ppm) ou D_2O (δ_H = 4.79 ppm). Pour les spectres du carbone (^{13}C): $CDCl_3$ (δ_H = 77.0 ppm), DMSO-d (δ_H = 39.5 ppm) ou CD_3OD (δ_H = 49.0 ppm). Les spectres ^{13}C sont mesurés avec découplage large bande en proton. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm dans l'ordre décroissant et les constantes de couplage J en Hz. Le symbole '≈' indique une valeur moyenne. La multiplicité des signaux est donnée avec les abréviations s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Pour permettre l'interprétation, des spectres HETCOR (long range ou short range), COSY, DEPT135, ont été mesurés lorsque cela s'avérait nécessaire. Les déplacements chimiques exacts des systèmes de spin d'ordre secondaire AB sont calculés d'après H. Günther. Les protons sont arbitrairement désignés par la lettre alphabétique correspondant au système de spin AB dans l'ordre croissant de leur déplacement chimique.

11.1.4 Spectroscopie de masse (MS)

Les mesures de spectrométrie de masse sont effectuées sur un spectromètre PolarisQ (Agilent) pour l'ionisation à impact électronique (EI) avec une énergie de 70 eV et ionisation chimique (DCI) avec l'ammoniac. Les pics sont donnés en m/z et en pourcentage du pic de base (100%). Les mesures par ionisation électro-spray (ESI) sont effectuées sur un appareil ThermoFinnigan LCQ (San José, Californie). La valeur donnée correspond à la masse moyenne de l'ion mesuré précisé entre crochets.
Les spectres haute résolution (HR-MS) sont mesurés à l'Université de Fribourg (Suisse) (dans le groupe du Professeur A. Gossauer par M. F. Nydegger) sur un appareil Brücker BioAPEX II Daltonics. Si la technique d'ionisation n'est pas spécifiée, elle est par électro-spray. La valeur donnée entre parenthèse est celle se rapprochant le plus de la valeur mesurée et correspond à la formule brute de l'ion mesuré.

11.1.5 Analyse élémentaire (AE)

Les analyses élémentaires (analyse CHN) sont effectuées par le département de chimie de l'Ecole d'ingénieurs et d'architectes de Fribourg.

11.1.6 Point de fusion (Pf)

Les points de fusion sont mesurés dans un capillaire à point de fusion avec un appareil Büchi B 510 à bain d'huile. Les valeurs données ne sont pas corrigées.

11.1.7 Verreries, système de chauffage et de refroidissement

La verrerie pour les réactions sous azote, sous argon ou sans humidité est chauffée à 120 °C minimum pendant au moins 2h. Elle est montée chaude et refroidie à température ambiante sous une atmosphère d'azote ou d'argon.
Les réactions à basse température se font dans un bain de glace (0°C) ou dans un bain acétone/azote liquide (entre -40°C et -60°C).
Les réactions sont chauffées par un bain de polyéthylène glycol jusqu'à une température de 180°C.

11.1.8 Numérotation des structures

La numérotation de la structure est en accord avec le nom IUPAC donné par le logiciel Autonom. Cependant, dans certains cas pour des raisons pratiques nous avons utilisé une numérotation arbitraire, indépendante du nom IUPAC de la molécule.

11.2 Solvants

11.2.1 Solvants standards

Les solvants pour les chromatographies, les traitements finals ainsi que pour les extractions sont de qualité technique et sont distillés sur un agent dessicant avant emploi.

Solvant	Abréviation	Distillé sur
Acétate d'éthyle	AcOEt	K_2CO_3
Dichlorométhane		$CaCl_2$
Diéthyléther	Et_2O	$CaCl_2$
Hexane		$CaCl_2$
Méthanol	MeOH	CaO

11.2.2 Solvants pour réactions

Pour toutes les réactions sous atmosphère gazeuse, des solvants secs sont utilisés. Les solvants standard sont distillés sur un agent desséchant.

Solvant	Abréviation	Provenance et qualité
Acétone		SDS purex pour analyses
Benzène		Acros 99%
Dichlorométhane	CH_2Cl_2	SDS purex
1,2-Diméthoxyéthane	DME	Distillé sur sodium/benzophénone
Ethanol	EtOH	p.a. Merck
Isopropylether		Acros stabilisé 99+%
N,N-diméthylformamide	DMF	Fluka puriss
Méthanol	MeOH	p.a. Acros
2-Propanol		p.a. Merck
Tétrahydrofurane	THF	Distillé sur potassium/benzophénone
Toluène		Puriss (over molecular sieve), Fluka

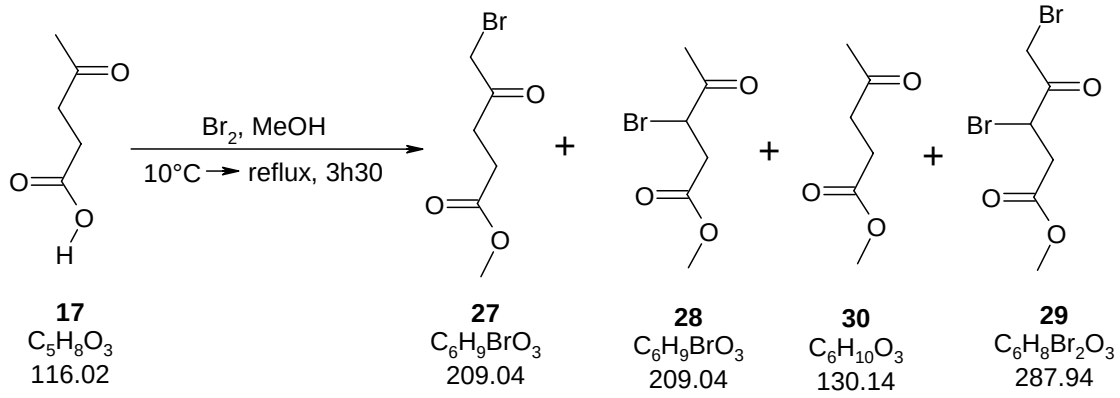
11.3 Produits chimiques

Produits chimiques	Qualité	Provenance
Acide chlorhydrique (HCl)	32% dans H_2O	
Acide m-chloroperbenzoique (MCPBA)	Pract. ~70%	Fluka
Acide formique	Puriss p.a.	Fluka
Acide lévulinique	Purum	Fluka
Acide monoperoxyphtalique de magnésium hexahydraté (MMPP)	Tech ~80%	Fluka
Acide sulfurique (H_2SO_4)	96%	Prochimie
Amberlite, résine échangeuse d'ions	IR-120 (plus)	Aldrich
Argon (Ar)	Techn.	Carbagas
Azote (N_2)	Techn.	Carbagas
1,2-bis(triméthylsiloxy)éthane	Purum ≥97%	Fluka
Brome	Purris p.a.	Fluka
Carbonate de potassium anhydre (K_2CO_3)	Puriss p.a.	Fluka
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	Techn.	Prochimie

Produits chimiques	Qualité	Provenance
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	Puriss p.a.	Fluka
Chlorure de sodium (NaCl)	Techn.	Prochimie
Chlorure de toluène-4-sulfonyle	Puriss p.a.	Fluka
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène(1,5-5) (DBU)	Puriss ≥99% (GC)	Fluka
Esterase de foie de porc (PLE)	≥130 U/mg, lyophilisé	Fluka
Hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$)	Techn.	Fluka
Hydroxyde de potassium (KOH)	Purum p.a. pallets	Fluka
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Puriss p.a.	Fluka
5-Hydroxyméthyl-2-furaldehyde	99%	Aldrich
Methoxyde de sodium	Purum ≥97%	Fluka
Naphtalène	Purum	Fluka
Oxyde d'aluminium	Type 507 neutral (for chromatography)	Fluka
Pyridine	Puriss	Fluka
Sodium		Fluka
Solution de sodium dihydrido-bis(2-méthoxyéthoxy)aluminate (Red-Al)	Tech. ~70% dans toluène (~3.5 M)	Fluka
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	p.a.	SdS
Sulfate de sodium (Na_2SO_4)	p.a.	SdS
Sulfonate de triméthylsyliltrifluorométhane (TMSOTf)	Purum ≥98%	Fluka
Sulfure de sodium hydraté	Puriss p.a.	Fluka
Toluène-4-sulfonamide	Purum ≥99%	Fluka
Triéthylamine	Puriss p.a.	Fluka

11.4 Synthèses

11.4.1 Synthèse du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle 27 et du 3-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle 28



17
$C_5H_8O_3$
116.02

27
$C_6H_9BrO_3$
209.04

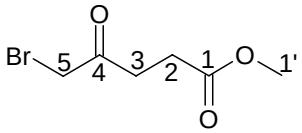
28
$C_6H_9BrO_3$
209.04

30
$C_6H_{10}O_3$
130.14

29
$C_6H_8Br_2O_3$
287.94

A une solution de 100 g (860 mmol, 1.0 éq.) d'acide lévulinique **17** dans 800 ml de méthanol sont ajoutés goutte à goutte, à 10°C et sous forte agitation, 44 ml (860 mmol, 1.0 éq.) de brome. La solution devient orange puis de plus en plus foncée. L'adjonction du brome dure environ 2h30. Laisser le mélange réactionnel revenir à température ambiante (t.a.) pendant 30 minutes puis le mettre à reflux. Après 10 min une soudaine décoloration est observée. Après 90 min à reflux, la solution est refroidie et le méthanol est éliminé par évaporation rotative. Le résidu jaunâtre obtenu est dissout dans 800 ml de CH_2Cl_2. La phase organique est lavée avec 200 ml d'une solution aqueuse de $NaHCO_3$, puis 3 fois avec H_2O. Elle est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis le solvant est éliminé par évaporation rotative. 166.9 g de brut jaune sont obtenus et purifiés par distillation sur colonne de Widmer de 50 cm. 6 fractions sont recueillies dont une contient 86.9 g de **27**. Les fractions mixtes contenant du 3-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **28** et du 5-bromo-4-oxo-pentanoate de méthyle **27** ou du 3,5-dibromo-4-oxopentanoate de méthyle **29** et du 5-bromo-4-oxo-pentonate de méthyle **27** sont redistillées et 4.7 g de **27** sont récupérés. Au total 91.6 g (438 mmol, 50%) de produit désiré **27** sont obtenus sous forme d'un liquide transparent.

Données analytiques de **27**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle (1:2)): 0.5

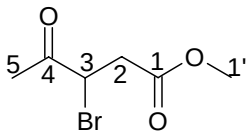
Pf: 60°C à $7 \cdot 10^{-2}$ mmHg

IR (film): 2999m, 2954s, 2849w, 1733s, 1439s, 1411s, 1360s, 1322s, 1208s, 1176s, 1123m, 1079s, 1024s, 988s, 862m, 844m, 694m

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 3.95 (s, 2H, $H_2C(5)$), 3.67 (s, 3H, $H_3C(1')$), 2.95 (t, $^{3}J_{3-2}$ = 6.5, 2H, $H_2C(3)$), 2.65 (t, $^{3}J_{2-3}$ = 6.5, 2H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K) : 201.1 (C(4)), 173.2 (C(1)), 52.4 (C(1')), 34.8 (C(3)), 34.5 (C(5)), 28.5 (C(2))

Données analytiques de **28**:

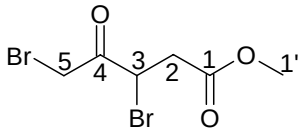


IR (film) : 3003m, 2956m, 2850w, 1724s, 1438s, 1409s, 1359s, 1332s, 1293s, 1211s, 1162s, 1079w, 1016m, 997m, 980m, 896m, 649m

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.65 (dd, $^{3}J_{3-2a}$ = 8.8, $^{3}J_{3-2b}$ = 5.8, 1H, HC(3)), 3.69 (s, 3H, $H_3C(1')$), 3.26 (dd, $^{3}J_{2a-3}$ = 8.8, $^{2}J_{2a-2b}$ = 17.2, 1H, $H_aC(2)$), 2.89 (dd, $^{3}J_{2b-3}$ = 5.8, $^{2}J_{2b-2a}$ = 17.2, 1H, $H_bC(2)$), 2.41 (s, 3H, $H_3C(5)$)

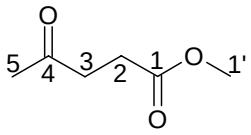
^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 200.8 (C(4)), 171.0 (C(1)), 52.6 (C(1')), 45.3 (C(3)), 38.5 (C(2)), 27.5 (C(5))

Données analytiques de **29**:



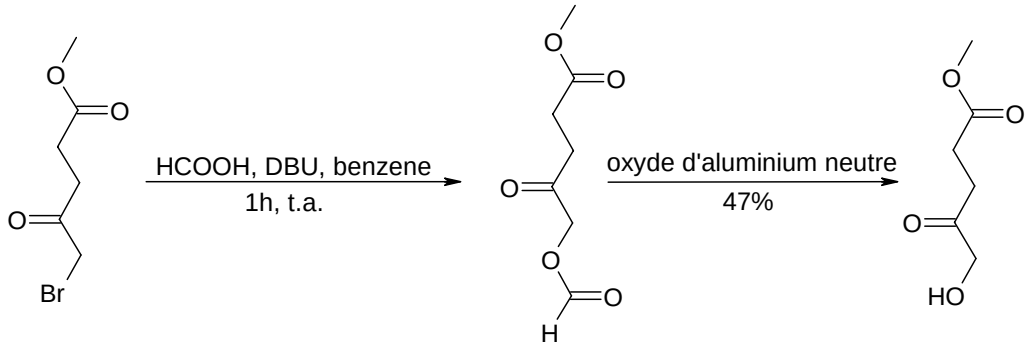
^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 5.02 (dd, $^{3}J_{3-2a}$ = 8.4, $^{3}J_{3-2b}$ = 5.9, 1H, HC(3)), 4.38 (d, $^{2}J_{5a-5b}$ = 13, 1H, $H_aC(5)$), 4.18 (d, $^{2}J_{5b-5a}$ = 13, 1H, $H_bC(5)$), 3.71 (s, 3H, $H_3C(1')$), 3.32 (dd, $^{3}J_{2a-3}$ = 8.4, $^{2}J_{2a-2b}$ = 17.2, 1H, $H_aC(2)$), 2.99 (dd, $^{3}J_{2b-3}$ = 5.9, $^{2}J_{2b-2a}$ = 17.2, 1H, $H_bC(2)$)

Données analytiques de **30**:



^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 3.67 (s, 3H, $H_3C(1')$), 2.76 (t, $^3J_{2-3}$ = 6.1, 2H, $H_2C(2)$), 2.57 (t, $^3J_{3-2}$ = 6.1, 2H, $H_2C(3)$), 2.19 (s, 3H, $H_3C(5)$)

11.4.2 Synthèse du 5-hydroxy-4-oxo-pentanoate de méthyle 34



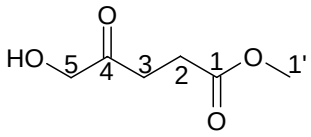
27
$C_6H_9BrO_3$
209.04

35
$C_7H_{10}O_5$
174.15

34
$C_6H_{10}O_4$
146.14

A une solution de 12.6 g (60.2 mmol, 1.0 éq.) de **27** et de 3.44 g (74.7 mmol, 1.2 éq.) d'acide formique dans 85 ml de benzène sont ajoutés goutte à goutte, à 10°C, 11.7 g (77.0 mmol, 1.3 éq.) de DBU. La solution ocre obtenue est agitée à température ambiante pendant 1h. 100 ml d'H_2O sont ensuite ajoutés et le mélange est extrait trois fois avec CH_2Cl_2. Les phases organiques réunies sont lavées successivement avec 250 ml d'une solution aqueuse diluée de HCl (0.1 N) et 100 ml d'H_2O avant d'être séchées sur Na_2SO_4. Après filtration, le solvant est éliminé par évaporation rotative. 9.51 g d'une huile rouge de 5-formyloxy-4-oxo-pentanoate de méthyle **35** sont obtenus. Le brut **35** est ensuite hydrolysé par deux passages successifs sur une colonne constituée par 175 g d'oxyde d'aluminium neutre et élué à pression atmosphérique (éluant: CH_2Cl_2/MeOH, 1:1). 6.07 g de liquide rouge **34** sont obtenus et purifiés par microdistillation ($p=6.5*10^{-2}$ mmHg). 4.10 g (28.0 mmol, 47%) de produit désiré **34** sont récupérés sous la forme d'un liquide incolore.

Données analytiques de **34**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle (2:1): 0.2

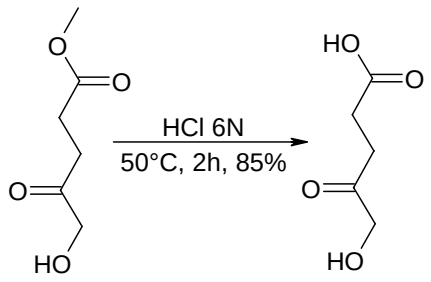
Eb: 55-56°C à $6.5*10^{-2}$ mmHg.

IR (film): 3560-3274br, 3001m, 2956m, 2918m, 2852m, 1729sbr, 1439s, 1413s, 1364s, 1320s, 1256s, 1211s, 1175s, 1125m, 1079s, 1016s, 980m

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.30 (s, 2H, $H_2C(5)$), 3.67 (s, 3H, $H_3C(1')$), 2.68 (s, 4H, $H_2C(2,3)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 208.5 (C(4)), 173.1C(1)), 68.5 (C(5)), 52.3 C(1')), 33.1 (C(3)), 27.8 C(2))

11.4.3 Synthèse de l'acide 5-hydroxy-4-oxopentanoique 36

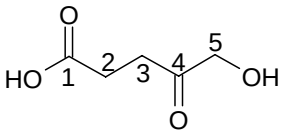


34
$C_6H_{10}O_4$
146.14

36
$C_5H_8O_4$
132.12

0.86 g (5.90 mmol, 1.0 éq.) de **34** et 20 ml d'HCl 6N sont agités à 50°C pendant 2h. Après refroidissement, l'eau est éliminée par évaporation rotative. Le brut est purifié par recristallisation dans un mélange THF/hexane. 0.66 g (5.02 mmol, 85%) de produit désiré **36** est récupéré sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **36** :



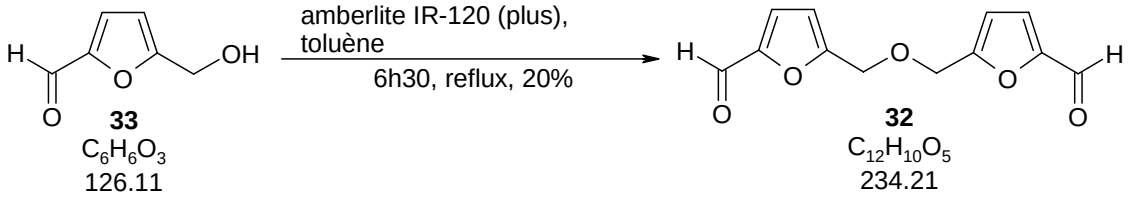
IR (pastille): 3430s, 3379s, 3104-2525br, 1724s, 1694s, 1454s, 1436s, 1410s, 1319s, 1230s, 1213s, 1158m, 1127m, 1091s, 1047m, 1014s, 933s, 742w, 642s, 534m

^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3OD, 298 K): 4.25 (s, $H_2C(5)$), 2.70 (t, $^{3}J_{3\text{-}2} \approx 6.2$, $H_2C(3)$), 2.59 (t, $^{3}J_{3\text{-}2} \approx 6.2$, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, CD_3OD, 298 K): 210.9 (C(4)), 176.3 (C(1)), 68.7 (C(5)), 33.7 (C(3)), 28.3 (C(2))

MS (**ESI**): $[M\text{-}H]^-$ = 131.2

11.4.4 Synthèse du bis(5-formyl-2-furfuryl) éther 32

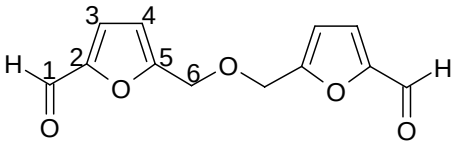


33
$C_6H_6O_3$
126.11

32
$C_{12}H_{10}O_5$
234.21

5.00 g (39.6 mmol, 1 éq.) de 5-hydroxyméthyl-2-furaldehyde **33** et 1.5 g de résine échangeuse d'ions amberlite IR 120 (plus) dans 120 ml de toluène, sont agités à reflux pendant 6h30 dans un ballon surmonté d'un appareil de Dean-Stark. Après filtration, le solvant est éliminé par évaporation rotative. Le brut obtenu est repris dans l'ether, puis filtré et purifié par recristallisation dans un mélange acétone/ ether de pétrole. 0.89 g (3.82 mmol, 20%) de produit désiré **32** est obtenu sous la forme d'un solide brun-orange.

Données analytiques de **32**:

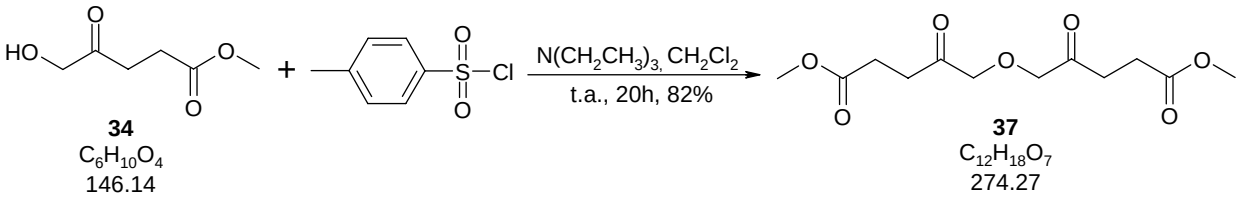


^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 9.62 (s, 2H, HC(1)), 7.21 (d, $^{3}J_{3\text{-}4}$ = 3.55, 2H HC(3)), 6.56 (d, $^{3}J_{4\text{-}3}$ = 3.55, 2H, HC(4)), 4.63 (s, 4H, H_2C(6))

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 177.9 (C(1)), 157.3 (C(2), 152.9 (C(5), 122.0 (C(3)), 112.0 (C(4)), 64.7 (C(6))

MS (**EI**): 233.63, 218.73 (100%), 190.82, 174.90

11.4.5 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butoxy)-4-oxo-pentanoate de méthyle 37

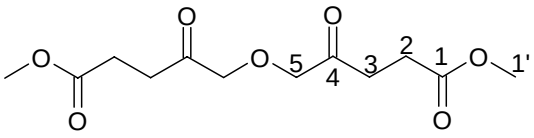


34
$C_6H_{10}O_4$
146.14

37
$C_{12}H_{18}O_7$
274.27

2.03 g (13.9 mmol, 1.0 éq.) de **34**, 1.66 g (16.5 mmol, 1.2 éq.) de triéthylamine et 3.14 g (16.4 mmol, 1.2 éq.) de chlorure de toluène-4-sulfonyle dans 20 ml de CH_2Cl_2 sont agités à t.a. pendant 20h. Le solvant est éliminé par évaporation rotative. 6.60 g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash sur colonne (éluant : CH_2Cl_2/AcOEt 1%). 1.57 g (5.72 mmol, 82%) de produit désiré **37** sont obtenus sous la forme d'un liquide jaunâtre. Le produit secondaire 4-oxo-5-(toluène-4-sulfonyloxy)-pentanoate de méthyle **42** a été isolé et caractérisé.

Données analytiques de **37** :



Rf (CH_2Cl_2/AcOEt 1%): 0.4

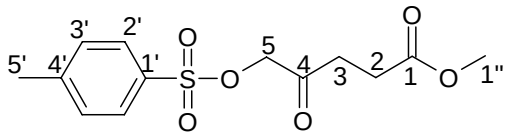
IR (film): 2997m, 2954s, 1733s, 1632m, 1438s, 1403s, 1359s, 1328s, 1200s(br), 1088s, 1025s, 994s, 967m, 872m, 844m, 818m, 775s, 727m

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.15 (s, 4H, H_2C(5)), 3.68 (s, 6H, H_3C(1')), 2.90 (t, $^{3}J_{3\text{-}2} \approx 6.4$, 4H, H_2C(3)), 2.67 (t, $^{3}J_{2\text{-}3} \approx 6.4$, 4H, H_2C(2))

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 201.4 (C(4)), 172.9 (C(1)), 52.1 (C(1')), 48.3 (C(5)), 34.4 (C(3), 27.9 (C(2))

MS (**EI**): 179.2, 167.1, 165.2 (100%), 135.3, 133.3, 115.3, 97.3, 87.4, 69.3, 55.2

Données analytiques de **42** :



Rf (CH_2Cl_2/AcOEt 1%): 0.28

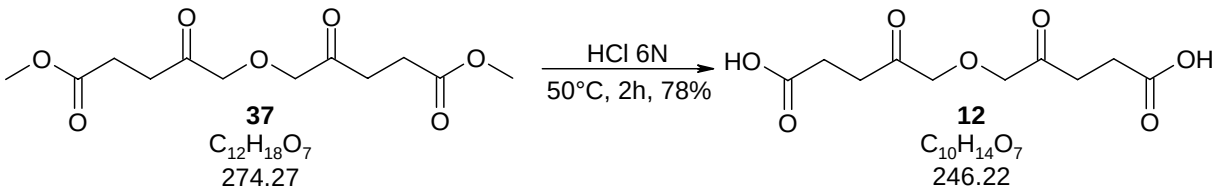
IR (film): 2954m, 2929m, 1736s, 1598m, 1495m, 1438s, 1403m, 1366s, 1309m, 1266m, 1211s, 1191s, 1178s, 1121m, 1097s, 1046m, 1002s, 960s, 871m, 817s, 782s, 667s, 555s

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 7.82 (d, $^{3}J_{2'-3'} \approx 8.5$, 2H, HC(2')), 7.37 (d, $^{3}J_{3'-2'} \approx 8.5$, 2H, HC(3')), 4.55 (s, 2H, $H_2C(5)$), 3.66 (s, 3H, $H_3C(1'')$), 2.82 (t, $^{3}J_{3-2} \approx 6.4$, 2H, $H_2C(3)$), 2.61 (t, $^{3}J_{2-3} \approx 6.4$, 2H, $H_2C(2)$), 2.46 (s, 3H, $H_3C(5')$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 202.0 (C(4)), 172.7 (C(1)), 145.7 (C(1')), 132.3 (C(4')), 130.2 (C(3')), 128.2 (C(2')), 71.9 (C(5)), 52.1 (C(1'')), 33.8 (C(3)), 27.3 (C(2)), 21.8 (C(5'))

MS (EI): 269.2, 155.2, 115.23 (100%), 97.3, 91.3

11.4.6 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butoxy)-4-oxo pentanoique 12



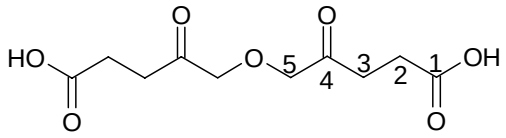
37
$C_{12}H_{18}O_7$
274.27

12
$C_{10}H_{14}O_7$
246.22

0.64 g (2.33 mmol, 1.0 éq.) de **37** et 10 ml d'HCl 6N sont agités à 50°C pendant 2h. Après refroidissement, l'eau est éliminée par évaporation rotative. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne (éluant : MeOH) puis par recristallisation dans un mélange

AcOEt/hexane. 0.45 g (1.83 mmol, 78%) de produit désiré **12** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **12**:



Rf (CH_2Cl_2/AcOEt, 10:3): 0.35

Pf: 86°C

IR (pastille): 3445-2316br, 1736s, 1690s, 1433m, 1410s, 1366m, 1324m, 1296s, 1212m, 1096m, 1038m, 951m, 863w, 770m, 732w, 621m

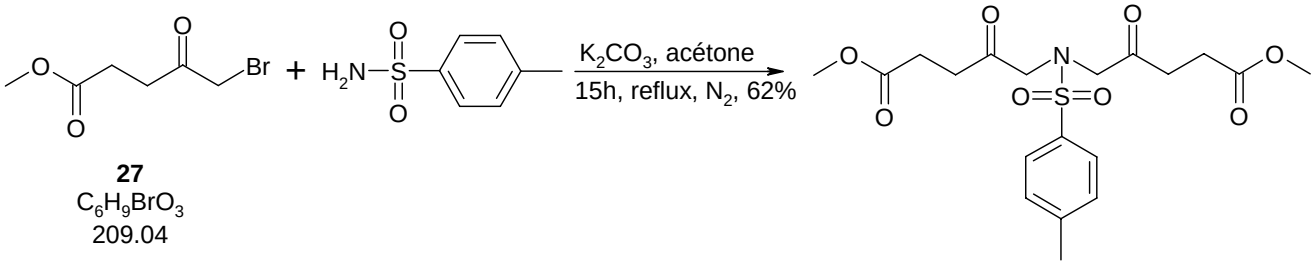
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.14 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.90 (t, $^{3}J_{3\text{-}2} \approx 6.4$, 4H, $H_2C(3)$), 2.71 (t, $^{3}J_{2\text{-}3} \approx 6.4$, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 201.3 (C(4)), 178.3 (C(1)), 48.2 (C(5)), 34.2 (C(3)), 27.9 (C(2))

MS (APCI): $[M\text{-}H_2O+H]^+ = 229.2$

MS (EI): 133.14, 101.16, 73.17, 55.15 (100%)

11.4.7 Synthèse du 5-[(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butyl)-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-4-oxo-pentanoate de méthyle 51

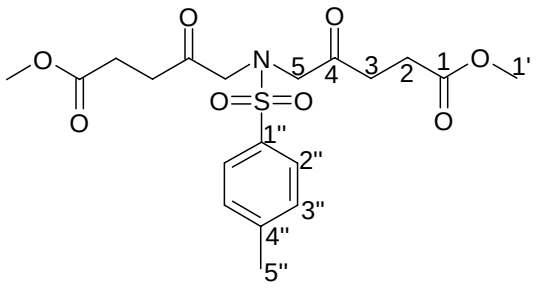


27
$C_6H_9BrO_3$
209.04

51
$C_{19}H_{25}NO_8S$
427.48

4.00 g (23.4 mmol, 1.0 éq.) de toluène-4-sulfonamide et 6.60 g (47.6 mmol, 2.0 éq.) de carbonate de potassium anhydre dans 150 ml d'acétone sont agités à reflux pendant 50 min sous N_2. 9.99 g (47.8 mmol, 2.0 éq.) de **27** sont alors ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue. La solution hétérogène est agitée pendant 15 h à reflux. Après refroidissement et filtration du solide sur büchner, le solvant est éliminé par évaporation rotative. 11.1 g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: hexane/acétate d'éthyle, 1:2) puis recristallisés dans de l'isopropanol. 6.24 g (14.6 mmol, 62%) de produit désiré **51** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **51**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle, 1:2): 0.32 (UV et $KMnO_4$)

Pf: 109°C

IR (pastille): 2955m, 2940m, 2921m, 1739s, 1722s, 1599m, 1496w, 1451m, 1440s, 1414s, 1358s, 1329s, 1305s, 1200s, 1183s, 1174s, 1155s, 1119m, 1093s, 1019m, 998m, 983s, 975s, 887m, 881m, 816m, 804m, 781s, 741w, 716m, 662s, 555s, 540s

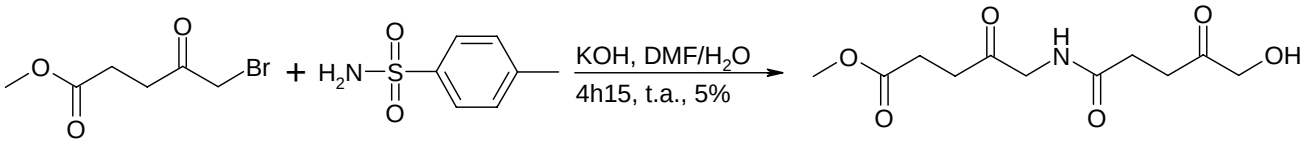
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 7.68 (d, $^3J_{2''-3''} \approx 8.4$, 2H, $H_2C(2'')$), 7.29 (d, $^3J_{3''-2''} \approx 8.4$, 2H, $H_2C(3'')$), 4.18 (s, 4H, $H_2C(5)$), 3.65 (s, 6H, $H_3C(1')$), 2.73-2.69 (m, 4H, $H_2C(3)$), 2.63-2.59 (m, 4H, $H_2C(2)$, 2.42 (s, 3H, $H_3C(5'')$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 204.2 (C(4)), 173.1 (C(1)), 144.0 (C(1")), 136.0 (C(4"), 129.8 C(3")), 127.6 (C(2")), 56.6 (C(5)), 52.0 (C(1')), 34.1 (C(3)); 27.9 (C(2)), 21.7 (C(5"))

MS (ESI): $[M+Na]^+ = 450.2$

AE $C_{19}H_{25}NO_8S$ (427.48): calc.: C 53.39, H 5.89, N 3.28; mes.: C 53.33, H 5.92, N 3.18

11.4.8 Synthèse du 5-(5-hydroxy-4-oxo-pentanoylamino)-4-oxo-pentanoate de méthyle 52

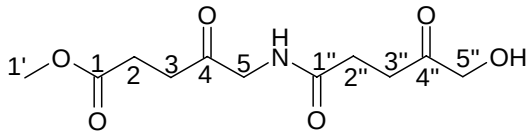


27
$C_6H_9BrO_3$
209.04

52
$C_{11}H_{17}NO_6$
259.26

A une solution de 1.22 g (5.83 mmol, 2.0 éq.) de **27** dans 2 ml de DMF est ajouté goutte à goutte un mélange de 0.50 g (2.92 mmol, 1.0 éq.) de toluène-4-sulfonamide et 0.37 g (6.53 mmol, 2.2 éq.) d'hydroxyde de potassium dans 0.6 ml d'H_2O et 4 ml de DMF. La solution trouble est agitée pendant 4h15 à t.a.. 10 ml de glace sont ajoutés et le précipité formé se dissout. Le mélange réactionnel est extrait trois fois avec CH_2Cl_2. Les phases organiques réunies sont lavées une fois avec une solution aqueuse de NaCl sat., séchées sur Na_2SO_4, filtrées et le solvant éliminé par évaporation rotative. 1.06 g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: hexane/acétate d'éthyle, 1:2). 40.0 mg (0.15 mmol, 5%) du produit secondaire **52** sont récupérés sous la forme d'une huile et 282 mg (0.69g, 24%) de produit **51** sont récupérés sous la forme d'un solide jaunâtre. Les rendements n'ont pas été optimisés pour ces conditions.

Données analytiques de **52**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle, 1:2): 0.11 ($KMnO_4$)

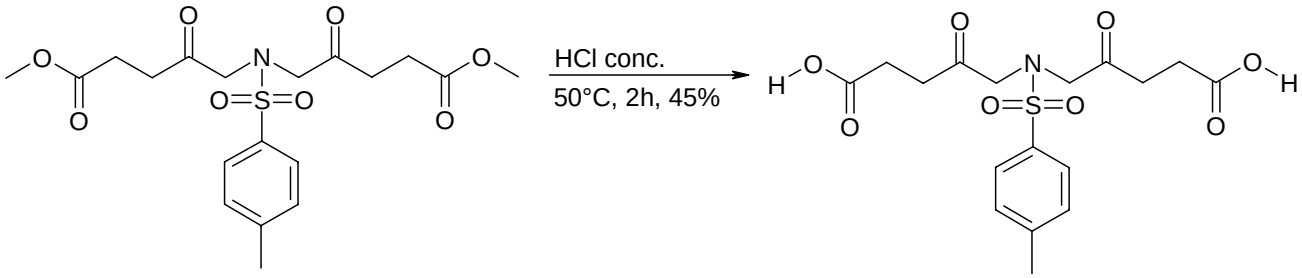
IR (pastille) : 3616-3154br, 2955m, 2933m, 1732sbr, 1439s, 1419s, 1369s, 1316m, 1201s, 1175s, 1106s, 1081s, 1012m, 911w, 845w

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.73 (s, 2H, $H_2C(5)$), 4.31 (d, $^3J_{5'',-0H}$ = 4.8, 2H, $H_2C(5'')$), 3.67 (s, 3H, $H_3C(1')$), 3.04 (t, $^3J_{OH-5''}$ = 4.8, 1H, OH), 2.84-2.80 (m, 2H, $H_2C(2'')$), 2.76-2.69 (m, 4H, $H_2C(3,3'')$), 2.66-2.62 (m, 2H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 208.2 (C(4'')), 202.5 (C(4)), 173.1 (C(1'')), 172.0 (C(1)), 68.5 (C(5, 5'')), 52.3 (C(1')), 33.6 (C(3 ou 3'')), 33.1 (C(3 ou 3'')), 27.6 (C(2, 2''))

MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 282.0

11.4.9 Synthèse de l'acide 5-[(4-carboxy-2-oxo-butyl)-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-4-oxo-pentanoique 59

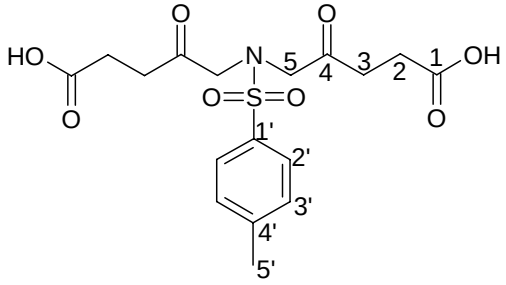


51
$C_{19}H_{25}NO_8S$
427.48

59
$C_{17}H_{21}NO_8S$
399.42

143 mg (0.34 mmol, 1 éq.) de **51** et 10 ml d'HCl 6N sont agités à 50°C pendant 2h. Après refroidissement l'eau est éliminée par évaporation rotative. 130 mg de brut sont obtenus et reprécipités dans un mélange de MeOH/isopropylether. 60.0 mg (0.15 mmol, 45%) de produit **59** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **59**:



Pf: 141°C

IR (pastille): 3432-2669br, 1724s, 1712s, 1600w, 1433m, 1411s, 1394m, 1340s, 1330s, 1307m, 1296m, 1243m, 1178m, 1159s, 1085m, 1022m, 971m, 936m, 821m, 806w, 791w, 676m, 557m, 540m

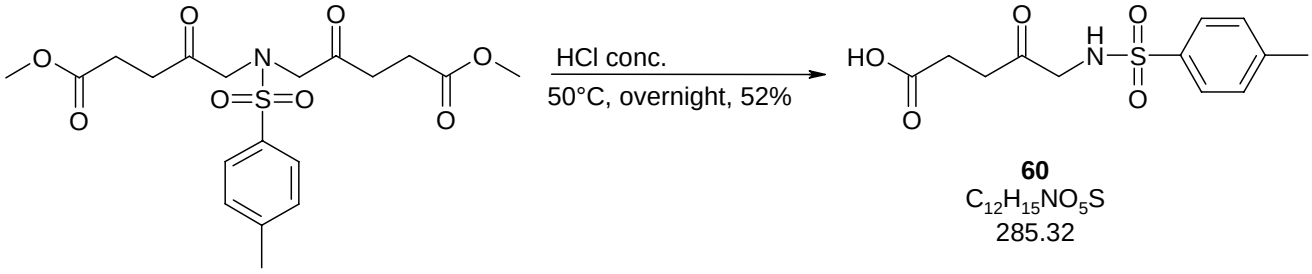
^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): 12.16 (s_l, 2H, COOH), 7.66 (d, $^3J_{2'-3'} \approx 8.5$, 2H, HC(2')), 7.37 (d, $^3J_{3'-2'} \approx 8.5$, 2H, HC(3')), 4.11 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.64 (t, $^3J_{3-2} \approx 6.6$, 4H, $H_2C(3)$), 2.39 (s, 3H, $H_3C(5')$), 2.38 (t, $^3J_{2-3} \approx 6.6$, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, DMSO, 298 K): 204.3 (C(4)), 173.4 (C(1)), 143.0 (C(1')), 135.9 (C(4')), 129.4 (C(3')), 126.9 (C(2')), 56.1 (C(5)), 33.5 (C(3)), 27.4 (C(2)), 20.8 (C(5'))

MS (ESI): $[M-H]^-$ = 398.0, $[M+H]^+$ = 400.2, $[M+H_2O]^+$ = 417.3, $[M+Na]^+$ = 422.3, $[M+K]^+$ = 438.1

HR-MS: 422,0886 $[M+Na]^+$ (calculé 422,0888), 398.0915 $[M-H]^-$ (calculé 398.0910)

11.4.10 Synthèse de l'acide 4-oxo-5-(toluène-4-sulfonylamino)-pentanoique 60

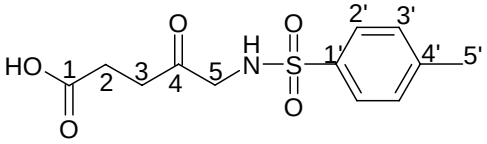


51
$C_{19}H_{25}NO_8S$
427.48

60
$C_{12}H_{15}NO_5S$
285.32

131 mg (0.31 mmol, 1 éq.) de **51** et 8 ml d'HCl conc. sont agités à 50°C pendant une nuit. Après refroidissement, l'eau est éliminée par évaporation rotative. 131 mg de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: MeOH/acétate d'éthyle, 1:9). 45.7 mg (0.16 mmol, 52%) de produit **60** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **60**:



Rf (MeOH/AcOEt, 1:9): 0.4 (UV et $KMnO_4$)

Pf: 144°C

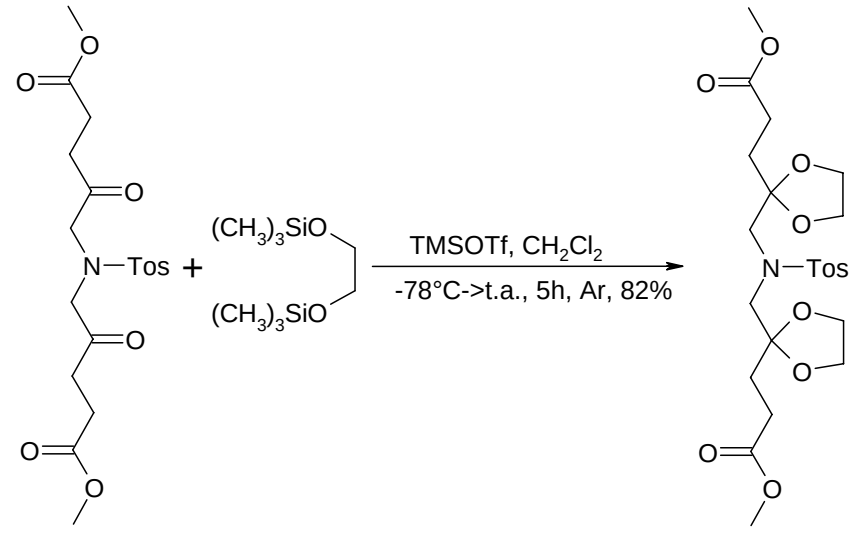
IR (pastille): 3423-2643br, 3291s, 2921m, 1715s, 1686s, 1599m, 1445m, 1403m, 1369m, 1339s, 1322m, 1306m, 1241m, 1214m, 1161s, 1123m, 1090s, 1030m, 949m, 862w, 818m, 673m, 564w, 544m

^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): 7.91 (t, $^{3}J_{NH-5}$ = 5.9, 1H, NH), 7.67 (d, $^{3}J_{2'-3'}$ ≈ 8.1, 2H, HC(2')), 7.38 (d, $^{3}J_{3'-2'}$ ≈ 8.1, 2H, HC(3')), 3.72 (d, $^{3}J_{5-NH}$ = 5.9, 2H, $H_2C(5)$), 2.63 (t, $^{3}J_{3-2}$ ≈ 6.5, 2H, $H_2C(3)$), 2.38 (s, 3H, $H_3C(5')$), 2.37 (t, $^{3}J_{2-3}$ ≈ 6.5, 2H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, DMSO, 298 K): 204.4 (C(4)), 173.6 (C(1)), 142.6 (C(1')), 137.5 (C(4')), 129.6 (C(3')), 126.5 (C(2')), 51.3 (C(5)), 34.0 (C(3)), 27.4 (C(2)), 21.0 (C(5'))

MS (ESI): $[M-H]^-$ = 284.0

11.4.11 Synthèse du 3-(2-{[[2-(2-méthoxycarbonyl-ethyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-méthyl}-[1,3]dioxolan-2-yl)-propionate de méthyle 61

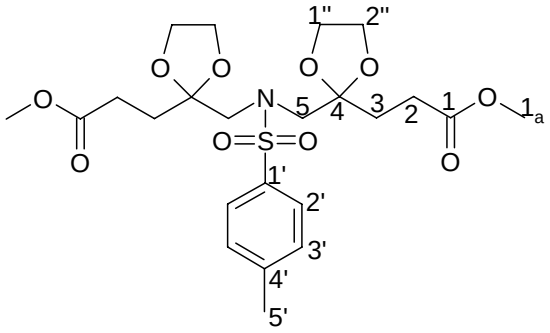


51
$C_{19}H_{25}NO_8S$
427.48

61
$C_{23}H_{33}NO_{10}S$
515.53

0.04 ml (0.22 mmol, 0.1 éq.) de TMSOTf, 1.29 g (6.26 mmol, 2.6 éq.) de 1,2-bis(triméthylsiloxy)éthane sont ajoutés successivement, à -40°C et sous Ar, à un mélange de 1.02 g (2.38 mmol, 1.0 éq.) de **51** dans 5 ml de CH_2Cl_2. Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à une température comprise entre -40°C et –20°C puis 5h supplémentaire à t.a.. La phase organique est lavée deux fois avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$ sat., puis séchée sur Na_2SO_4, filtrée et le solvant est éliminé par évaporation rotative. 3.54 g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: hexane/acétate d'éthyle, 1:1). 1.0 g (1.98 mmol, 82%) de produit **61** sont récupérés sous la forme d'une huile très visqueuse.

Données analytiques de **61**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle, 1:1): 0.4

IR (film) : 2953s, 2893s, 1732s, 1598s, 1495m, 1435s, 1335s, 1155s, 1091s, 1034s, 951s, 931s, 895s, 865m, 816s, 805s, 756s, 716m, 659s, 546s

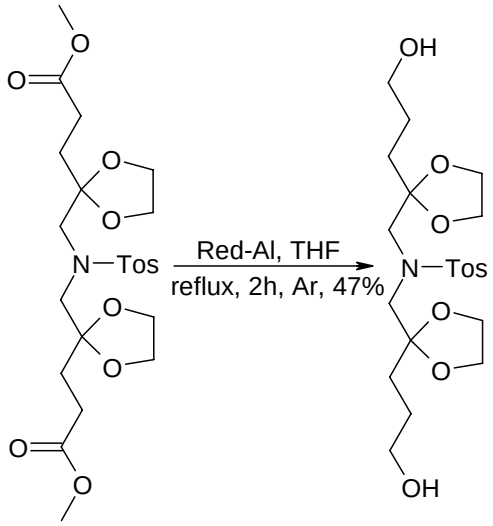
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 7.70 (d, $^{3}J_{2'-3'} \approx 8.2$, 2H, HC(2')), 7.25 (d, $^{3}J_{3'-2'} \approx 8.2$, 2H, HC(3')), 3.81-3.71 (m, 4H, H_aC(1'', 2'')), 3.69-3.63 (m, 4H, H_bC(1'', 2'')), 3.66 (s, 4H, H_2C(5)), 3.65 (s, 6H, H_3C(1a)), 2.40 (s, 3H, H_3C(5')), 2.32 (t, $^{3}J_{2-3} \approx 7.5$, 4H, H_2C(2)), 1.91 (t, $^{3}J_{3-2} \approx 7.5$, 4H, H_2C(3))

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 174.9 (C(1)), 142.9 (C(1')), 138.9 (C(4')), 129.8 (C(3')), 127.8 (C(2')), 110.5 (C(4)), 64.9 (C(1'' et 2'')), 51.7 ($C(1_a)$), 49.6 (C(5)), 31.1 (C(3)), 28.4 (C(2)), 21.6 (C(5'))

MS (ESI): $[M+Na]^+ = 538.3$

HR-MS: 538.1717 $[M+Na]^+$ (calculé 538.1723)

11.4.12 Synthèse du N,N-Bis-[2-(3-hydroxy-propyl)-[1,3]dioxolan-2-yl-méthyl]-4-méthyl-benzène sulfonamide 63

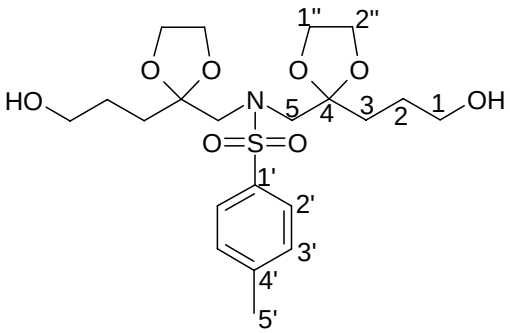


61
$C_{23}H_{33}NO_{10}S$
515.53

63
$C_{21}H_{33}NO_8S$
459.53

A une solution de 0.76 g (1.47 mmol, 1.0 éq.) de **61** dans 20 ml de THF anhydre sous Ar, sont ajoutés goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, 1.9 ml (6.65 mmol, 4.5 éq.) de Red-Al. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 90min. Après refroidissement, une solution de NaOH 10% est ajoutée jusqu'à neutralisation de la phase organique, puis cette dernière est extraite trois fois avec de l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées une fois avec une solution aqueuse de NaCl sat., séchées sur Na_2SO_4, filtrées puis le solvant est éliminé par évaporation rotative. 0.59 g de brut est obtenu et purifié par chromatographie flash (éluant: acétate d'éthyle/MeOH, 19:1), puis recristallisé dans de l'isopropanol. 0.32 g (0.70 mmol, 47%) de produit **63** est récupéré sous la forme d'un solide blanc. Le rendement n'a pas été optimisé.

Données analytiques de **63**:



Rf (acétate d'éthyle): 0.1

Pf: 103 °C

IR (pastille): 3418-3132br, 2957m, 2932m, 2889m, 1492m, 1452m, 1422m, 1364m, 1331s, 1308m, 1222m, 1196m, 1159s, 1115m, 1092m, 1065s, 1029m, 1004m, 966s, 952s, 868w, 825m, 815w, 805m, 766m, 682m, 651m, 552m, 539m

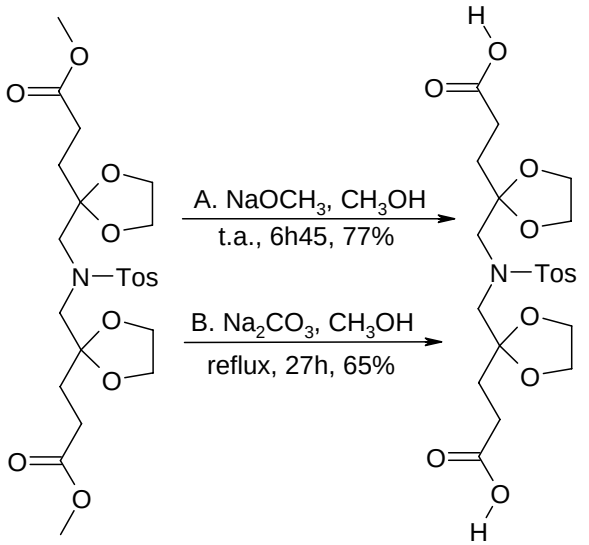
^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3OD, 298 K): 7.70 (d, $^{3}J_{2'-3'} \approx 8.4$, 2H, HC(2')), 7.34 (d, $^{3}J_{3'-2'} \approx 8.4$, 2H, HC(3')), 3.81-3.78 (m, 4H, $H_aC(1'', 2'')$), 3.71 (s, 4H, $H_2C(5)$), 3.69-3.66 (m, 4H, $H_bC(1'', 2'')$), 3.47 (m, 4H, $H_2C(1)$), 2.42 (s, 3H, $H_3C(5')$), 1.56 (m, 8H, $H_2C(2,3)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, CD_3OD, 298 K): 144.3 (C(1')), 140.6 (C(4')), 130.3 (C(3')), 128.6 (C(2')), 112.2 (C(4)), 65.8 (C(1'' et 2'')), 63.0 (C(1)), 50.9 (C(5)), 33.4 (C(3)), 27.3 (C(2)), 21.4 (C(5'))

MS (ESI): $[M+Na]^+ = 482.2$

HR-MS: 482.1819 $[M+Na]^+$ (calculé 482.1825)

11.4.13 Synthèse de l'acide 3-(2-{[[2-(2-carboxy-éthyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-(toluène-4-sulfonyl)-amino]-méthyl}-[1,3]dioxolan-2-yl)-propionique 62



61
$C_{23}H_{33}NO_{10}S$
515.53

62
$C_{21}H_{29}NO_{10}S$
487.47

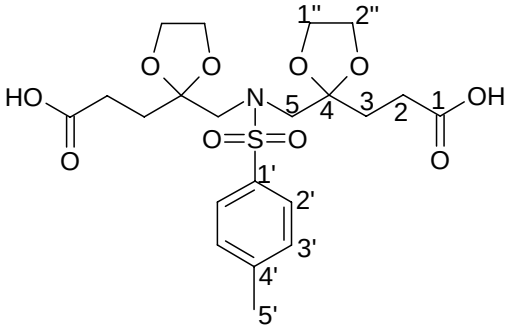
METHODE A

Une solution hétérogène de 0.80 g (1.55 mmol, 1.0 éq.) de **61** et de 1.07 g (10.1 mmol, 6.5 éq.) de carbonate de sodium dans 20 ml de méthanol est agitée à reflux pendant 30h. Le mélange réactionnel est refroidi puis filtré sur célite et le solvant est éliminé par évaporation rotative. Le brut obtenu est reprécipité dans un mélange de MeOH/isopropylether. 0.58 g (1.19 mmol, 77%) de produit **62** est obtenu sous la forme d'un solide beige. Le rendement n'a pas été optimisé.

METHODE B

A une solution de 0.32 g (0.61 mmol, 1.0 é1.) de **61** dans 4 ml de méthanol est ajouté goutte à goutte et sous Ar, 0.77 g (1.42 mmol, 2.3 éq.) de sodium méthoxide dans 4 ml de méthanol. La solution jaunâtre est agitée à t.a. pendant 6h45. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation rotative. 0.32 g de brut est obtenu et purifié par chromatographie flash (éluant: acétate d'éthyle/méthanol, 8:2). 0.19 g (0.40 mmol, 65%) de produit **62** est récupéré sous la forme d'un solide jaunâtre. Le rendement n'a pas été optimisé.

Données analytiques de **62**:



Rf (acétate d'éthyle/méthanol, 8:2): 0.4

Pf: pyrolyse à 280°C

IR (pastille): 3633-3105br, 2969m, 1735m, 1577s, 1439s, 1412s, 1330s, 1213m, 1156s, 1091m, 1046m, 952m, 880w, 817w, 758w, 660m, 548m

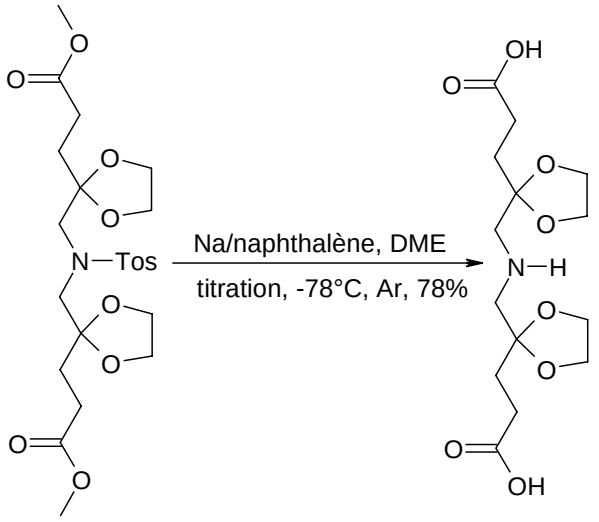
^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3OD, 298 K): 7.71 (d, $^{3}J_{2'-3'} \approx 8.2$, 2H, HC(2')), 7.33 (d, $^{3}J_{3'-2'} \approx 8.2$, 2H, HC(3')), 3.84-3.76 (m, 4H, $H_aC(1'', 2'')$), 3.74 (s, 4H, $H_2C(5)$), 3.68-3.62 (m, 4H, $H_bC(1'', 2'')$), 2,41 (s, 3H, $H_3C(5')$), 2.22-2.18 (m, 4H, $H_2C(2)$), 1.89-1.85 (m, 4H, $H_2C(3)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, CD_3OD, 298 K): 181.6 (C(1)), 144.2 (C(1'')), 140.6 (C(4'')), 130.2 (C(3')), 128.7 (C(2')), 112.1 (C(4)), 65.8 (C(1'' et 2'')), 50.8 (C(5)), 33.8 (C(3)), 32.4 (C(2)), 21.4 (C(5'))

MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 510.3, $[M-H]^-$ = 486.1

HR-MS: 510.1397 $[M+Na]^+$ (calculé 510.1410)

11.4.14 Synthèse de l'acide 3-[2-({[2-(carboxy-éthyl)-[1,3]dioxolan-2-ylméthyl]-amino}-méthyl)-[1,3]dioxolan-2-yl]-propionique 64

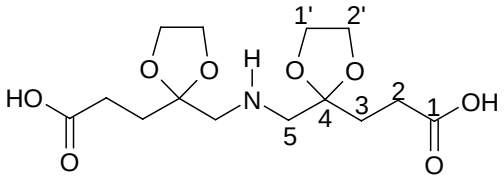


61
$C_{23}H_{33}NO_{10}S$
515.53

64
$C_{14}H_{23}NO_8$
333.34

Une solution de naphthalenure de sodium est préparée en ajoutant 0.21 g (9.24 mmol, 7.0 éq.) de sodium à un mélange de 1.39 g (10.9 mmol, 8.0 éq.) de naphtalène dans 15 ml de DME anhydre sous Ar et en agitant 2h à t.a.. Une solution de 0.68 g (1.33 mmol, 1 éq.) de **61** dans 10 ml de DME sec est refroidie à -78°C. La solution noire-verte de naphthalenure de sodium est ajoutée (15 ml) goutte à goutte à la solution bien agitée de **61** dans le DME, jusqu'à ce que la couleur noire-vert persiste. La réaction est stoppée avec 0.3 ml d'H_2O ce qui cause la complète décoloration du mélange. Le solvant est éliminé par évaporation rotative. 1.96 g de brut jaune sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: AcOEt/MeOH, 2:1 à 1:2). 0.35 g (1.04 mmol, 78%) du produit désiré **64** sont récupérés sous la forme d'un solide jaunâtre.

Données analytiques de **64**:



Rf (acétate d'éthyle/méthanol, 1:2): 0.19

Pf: 27°C

IR (pastille): 3430s(br), 2969m, 2899m, 1630s, 1567s, 1491m, 1407s, 1372m, 1303m, 1213m, 1138m, 1048m, 952w, 853w, 646w(br)

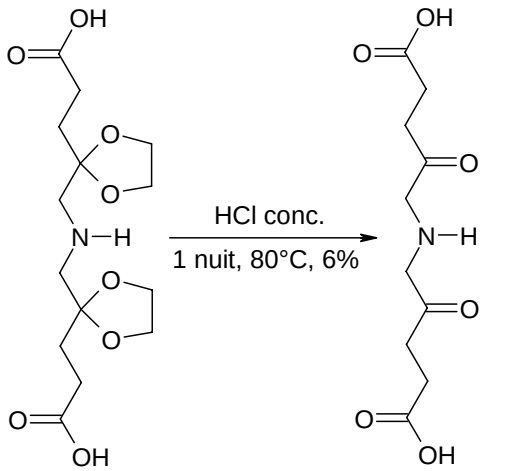
^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3OD, 298 K): 4.08-4.04 (m, 4H, $H_aC(1', 2')$), 4.03-4.00 (m, 4H, $H_bC(1', 2')$), 3.10 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.27 (t, 4H, $^{3}J_{3\text{-}2} \approx 7.3$, $H_2C(3)$), 1.98 (t, 4H, $^{3}J_{2\text{-}3} \approx 7.3$, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, CD_3OD, 298 K): 181.2 (C(1)), 109.7 (C(4)), 66.2 (C(1' et 2')), 52.4 (C(5)), 32.8 (C2)), 32.6 (C(3))

MS (ESI): $[M\text{-}H]^-$ = 332.3

HR-MS: 332.1346 $[M\text{-}H]^-$ (calculé 332.1345)

11.4.15 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylamino)-4-oxo-pentanoique 13

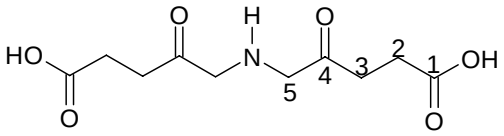


64
$C_{14}H_{23}NO_8$
333.34

13
$C_{10}H_{15}NO_6$
245.23

1.14 g (3.43 mmol, 1.0 éq.) de **64** et 10 ml d'HCl conc. sont agités à 80°C pendant une nuit. Après refroidissement, la solution est amenée à pH=2-3 à l'aide d'une solution aqueuse de NaOH, puis l'eau est éliminée par évaporation rotative. Le brut obtenu est repris dans du MeOH et NaCl formé est filtré. Le solvant est éliminé par évaporation rotative et le solide obtenu est reprécipité dans un mélange MeOH/ether. Le solide est récupéré par centrifugation, rincé à l'aide d'ether puis séché. 60 mg (0.25 mmol, 6%) de produit désiré **13** sont récupérés sous la forme d'un solide beige. Le rendement n'a pas été optimisé.

Données analytiques de **13**:



Pf: 207°C

IR (pastille): 2978m, 2950m, 2918m, 2759m, 2631m, 2544m, 1738s, 1487m, 1426m, 1399s, 1384s, 1324m, 1293m, 1221m, 1192m, 1133m, 1099s, 1066m, 1011s, 969s, 914s, 839m, 824m, 719m, 667m, 620m, 547m

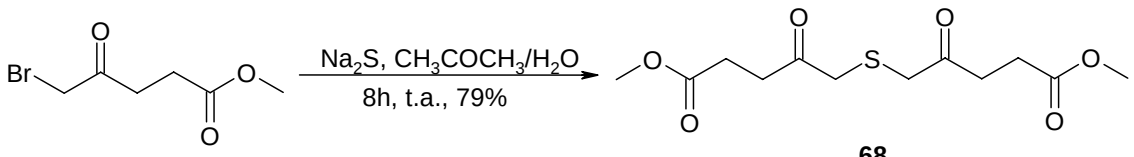
^{1}H-RMN (200 MHz, D_2O, 298 K): 4.08 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.74 (t, $^{3}J_{3-2}$ = 6.5, 4H, $H_2C(3)$), 2.46 (t, $^{3}J_{2-3}$ = 6.5, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, D_2O, 298 K): 204.0 (m, C(4)), 179.1 (C(1)), 53.9 (m, C(5)), 35.5 (C(3)), 29.3 (C(2))

MS (ESI): $[M+H]^+$ = 246.1, $[M+Na]^+$ = 268.1, $[M-H]^-$ = 244.1

HR-MS: 246.0976 $[M+H]^+$ (calculé 246.0978), 268.0796 $[M+Na]^+$ (calculé 268.0797)

11.4.16 Synthèse du 5-(4-methoxycarbonyl-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle 68

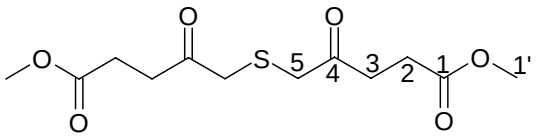


27
$C_6H_9BrO_3$
209.04

68
$C_{12}H_{18}O_6S$
290.34

A une solution de 10.02 g (47.9 mmol, 1.0 éq.) de **27** dans 120 ml d'acétone sont ajoutés goutte à goutte, sous azote et à 0°C, un mélange de 3.79 g (48.6 mmol, 1.0 éq.) de sulfure de sodium hydraté dans 25 ml d'eau. La solution jaune est laissée agiter à température ambiante pendant 8h puis les solvants sont éliminés par évaporation rotative. 10.84 g de brut jaune sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: hexane/acétate d'éthyle, 1:2). Lors de la dissolution du brut dans l'éluant, une partie du solide blanc **68** ne se dissout pas et est récupéré par filtration sur buchner. Après reprécipitation à froid dans un mélange MeOH/AcOEt, 5.48 g (18.9 mmol, 79%) de produit désiré **68** sont obtenus sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **68**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle, 1:2): 0.4 ($KMnO_4$)

Pf: 32°C

IR (pastille): 2950w, 2883w, 1735s, 1699s, 1436m, 1412s, 1382m, 1330s, 1292m, 1252m, 1205s, 1103m, 1020m, 991m, 864m, 627w

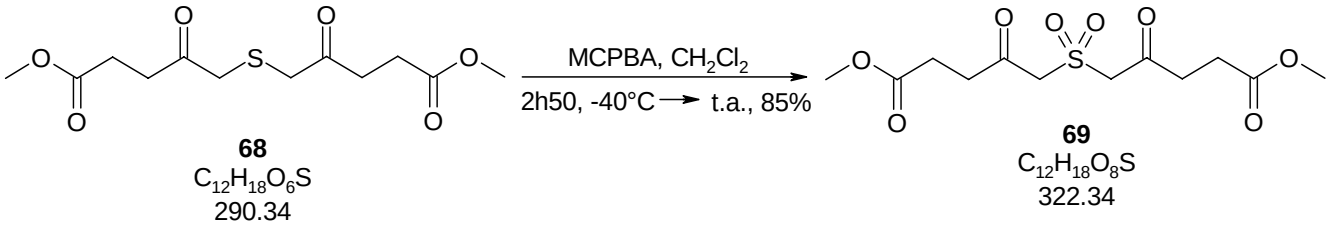
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 3.67 (s, 6H, $H_3C(1')$), 3.36 (s, 4H $H_2C(5)$), 2.88 (t, $^3J_{3\text{-}2}$ = 6.5, 4H, $H_2C(3)$), 2.61 (t, $^3J_{2\text{-}3}$ = 6.5, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 203.8 (C(4)), 173.3 (C(1)), 52.2 (C(1')), 41.0 (C(5)), 35.9 (C(3)), 28.2 (C(2))

MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 313.1

AE $C_{12}H_{18}O_6S$ (290.34): calc.: C 49.64, H 6.25; mes.: C 49.80, H 6.27

11.4.17 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle 69

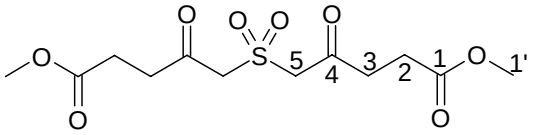


68
$C_{12}H_{18}O_6S$
290.34

69
$C_{12}H_{18}O_8S$
322.34

A une solution de 1.00 g (3.45 mmol, 1.0 éq.) de **68** dans 100 ml de dichlorométhane sont ajoutés goutte à goutte, à –40°C, un mélange de 2.06 g (11.9 mmol, 3.5 éq.) de MCPBA dans 80 ml de dichlorométhane. La solution blanche trouble obtenue est agitée 20 min à –40°C puis à t.a. Après quelques minutes le trouble blanc disparaît. La solution jaunâtre est agitée pendant 2h50 à température ambiante. 25 ml de $NaHSO_3$ saturée (sat.) sont ajoutés et la phase organique est lavée une fois avec une solution aqueuse de Na_2CO_3 sat. puis deux fois avec une solution aqueuse de NaCl sat.. Elle est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis le solvant est éliminé par évaporation rotative. 1.59 g de brut sont obtenus et purifiés par chromatographie flash (éluant: hexane/acétate d'éthyle, 1:2) puis reprécipités à froid dans un mélange méthanol/isopropylether pour donner 0.94 g (2.92 mmol, 85%) de produit désiré **69** sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **69**:



Rf (hexane/acétate d'éthyle, 1:2): 0.3 ($KMnO_4$)

Pf: 40°C

IR (pastille): 3001m, 2974m, 2957m, 2940m, 2921m, 1746s, 1717s, 1438m, 1416m, 1398m, 1383m, 1373m, 1364m, 1333m, 1314s, 1277m, 1257m, 1216s, 1196s, 1176s, 1142s, 1099m, 1081m, 1044w, 988m, 970m, 852m, 790m, 748m, 676w, 551m, 512m

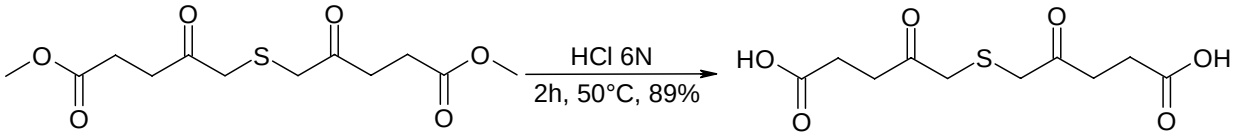
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.33 (s, 4H, $H_2C(5)$), 3.69 (s, 6H, $H_3C(1')$), 2.95 (t, $^3J_{3-2}$ = 6.3, 4H, $H_2C(3)$), 2.65 (t, $^3J_{2-3}$ = 6.3, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 197.9 (C(4)), 172.6 (C(1)), 62.9 (C5)), 52.2 (C(1')), 39.2 (C(3)), 27.6 (C(2))

MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 345.1

AE $C_{12}H_{18}O_8S$ (322.34): calc.: C 44.72, H 5.63; mes.: C 44.84, H 5.62

11.4.18 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butylsulfanyl)-4-oxo-pentanoique 14

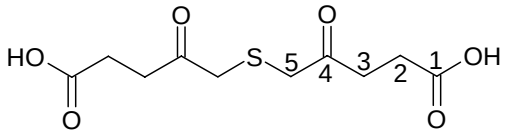


68
$C_{12}H_{18}O_6S$
290.34

14
$C_{10}H_{14}O_6S$
262.28

1.54 g (5.32 mmol, 1 éq.) de **68** et 75 ml d'HCl 6N sont agités à 50°C pendant 2h. Après refroidissement, l'eau est éliminée par évaporation rotative. 1.40 g de brut sont obtenus et purifiés par recristallisation dans 50 ml d'isopropanol. 1.24 g (4.74 mmol, 89%) de produit désiré **14** sont obtenus sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **14**:



Rf (méthanol): 0.7 ($KMnO_4$)

Pf: 156°C

IR (pastille): 3384-2537br, 1694s, 1445m, 1426m, 1408s, 1383s, 1364m, 1329s, 1285m, 1257m, 1228s, 1193m, 1143w, 1115w, 1096m, 1075m, 1040m, 907m, 888m, 865m, 618m, 525w, 505w

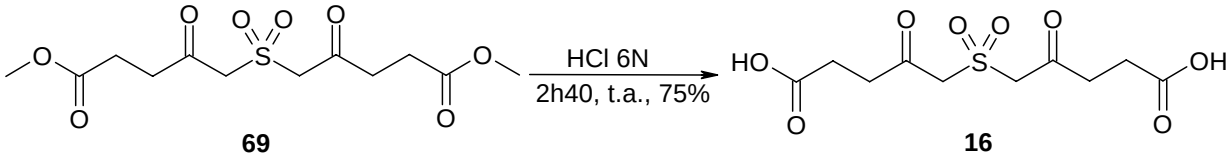
^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): 12.14 (s_l, 2H, COOH), 3.46 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.76 (t, $^3J_{3-2}$ = 6.5, 4H, $H_2C(3)$), 2.41 (t, $^3J_{2-3}$ = 6.5, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, DMSO, 298 K): 204.5 (C(4)), 173.6 (C(1)), 40.6 (C(5)), 35.4 (C(3)), 27.7 (C(2))

MS (ESI): $[M+Na]^+$= 285.1, $[M+H_2O]^+$ = 280.1, $[M+H]^+$ = 263.0

AE $C_{10}H_{14}O_6S$ (262.28): calc.: C 45.79, H 5.38; mes.: C 45.63, H 5.25

11.4.19 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfonyl)-4-oxo-pentanoique 16

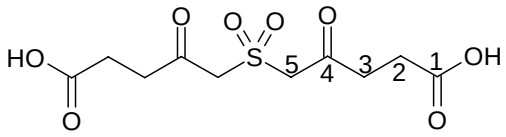


69
$C_{12}H_{18}O_8S$
322.34

16
$C_{10}H_{14}O_8S$
294.28

4.4 g (13.7 mmol, 1.0 éq.) de **69** et 400 ml d'HCl 6N sont agités à 50°C pendant 2h40. Après refroidissement, l'eau est éliminée par évaporation rotative. 4.53 g de brut sont obtenus et purifiés par recristallisation dans le THF. 3.02 g (10.3 mmol, 75%) de produit désiré **16** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **16**:



Pf: 156°C

IR (pastille): 3422-2565br, 2967s, 2921s, 1723s, 1697s, 1429s, 1400s, 1372m, 1361m, 1327s, 1300m, 1256s, 1237s, 1206m, 1186m, 1153m, 1119s, 1079s, 1036m, 1018m, 942m, 866m, 855m, 648w, 522w, 486m

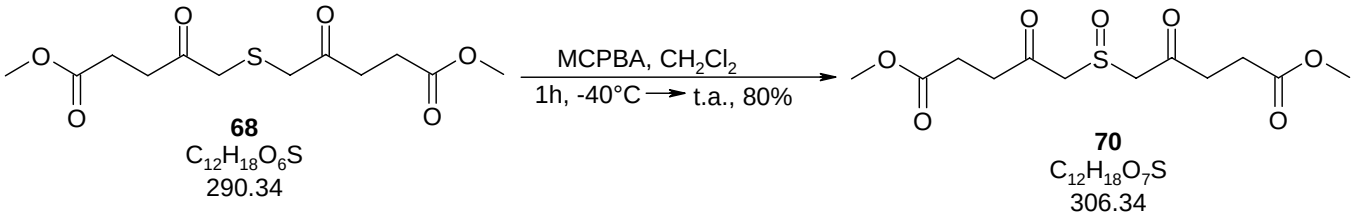
^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): 12.22 (s_l, 2H, COOH), 4.58 (s, 4H, $H_2C(5)$), 2.84 (t, $^3J_{3-2}$ = 6.5, 4H, $H_2C(3)$), 2.43 (t, $^3J_{2-3}$ = 6.5, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, DMSO, 298 K): 198.7 (C(4)), 173.3 (C(1)), 63.3 (C(5)), 38.7 (C(3)), 27.4 (C(2))

MS (ESI): $[M-H]^-$ = 292.9, $[2M-H]^-$ = 586.5

AE $C_{10}H_{14}O_8S$ (294.28): calc.: C 40.82, H 4.80; mes.: C 40.78, H 4.76

11.4.20 Synthèse du 5-(4-méthoxycarbonyl-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoate de méthyle 70

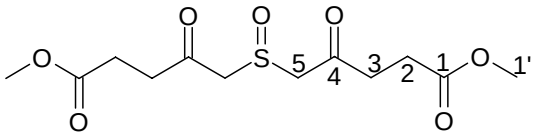


68
$C_{12}H_{18}O_6S$
290.34

70
$C_{12}H_{18}O_7S$
306.34

A une solution de 2.15 g (7.41 mmol, 1.0 éq.) de **68** dans 100 ml de dichlorométhane est ajouté goutte à goutte, à -40°C, une solution de 2.28 g (9.25 mmol, 1.2 éq.) de MCPBA dans 50 ml de dichlorométhane. La solution blanche trouble obtenue est agitée 20 min à -40°C puis à t.a. pendant 30 min. 20 ml d'une solution aqueuse de $NaHSO_3$ sat. sont ajoutés à la solution jaune et la phase organique est lavée une fois avec une solution aqueuse de Na_2CO_3 sat., deux fois avec une solution aqueuse de NaCl sat., séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis le solvant est éliminé par évaporation rotative. 2.70 g de résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (éluant: CH_2Cl_2/MeOH, 9:1) et reprécipité dans de l'isopropanol. 1.81 g (5.91 mmol, 80%) de produit désiré **70** sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **70**:



Rf (CH_2Cl_2/MeOH, 9:1): 0.3 ($KMnO_4$)

Pf: 97°C

IR (pastille): 2989m, 2950m, 2934m, 2887m, 1739s, 1712s, 1437s, 1426m, 1410s, 1380s, 1362m, 1329s, 1303m, 1252s, 1205s, 1186s, 1138m, 1102m, 1030s, 1002s, 876m, 866m, 745m, 719w, 708w, 624w

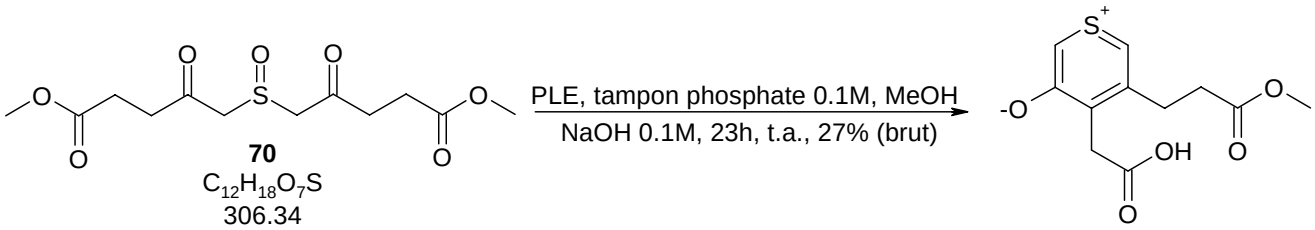
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 4.11 (d, $^2J_{5a\text{-}5b}$ = 14.2, 2H, $H_aC(5)$), 3.85 (d, $^2J_{5b\text{-}5a}$ = 14.2, 2H, $H_bC(5)$), 3.68 (s, 6H, $H_3C(1')$), 2.93 (dt, $^2J_{3a\text{-}3b}$ = 18.9, $^3J_{3a\text{-}2}$ = 6.6, 2H, $H_aC(3)$), 2.87 (dt, $^2J_{3b\text{-}3a}$ = 18.9, $^3J_{3b\text{-}2}$ = 6.2, 2H, $H_bC(3)$), 2.63 (dd, $^3J_{2\text{-}3a}$ = 6.6, $^3J_{2\text{-}3b}$ = 6.2, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 201.4 C(4)), 173.0 (C(1)), 61.0 (C(5)), 52.3 (C(1')), 40.2 (C(3)), 27.8 (C(2))

MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 329.1

AE $C_{12}H_{18}O_7S$ (306.34): calc.: C 47.05, H 5.92; mes.: C 47.24, H 5.91

11.4.21 Synthèse du 4-(carboxyméthyle)-5-(3-méthoxy-3-oxopropyl)-thiopyrylium-3-olate 71

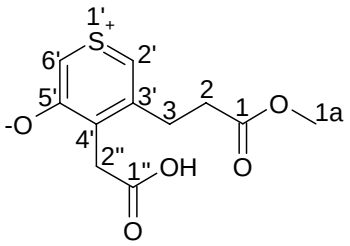


70
$C_{12}H_{18}O_7S$
306.34

71
$C_{11}H_{12}SO_5$
256.3

A une solution de 120 mg (0.39 mmol, 1 éq.) de **70** dans 1.5 ml de méthanol et 20 ml de tampon phosphate 0.1 M sont ajoutés à 3.4 mg (≥130 U/mg) de PLE. Le pH est maintenu à 7.6 par adjonction au pH-stat d'une solution de NaOH 0.1 M. Après 23h d'agitation à température ambiante, 3.3 ml (0.33 mmol, 0.85 éq.) de NaOH 0.1 M ont été ajoutés. La solution rose est amenée à pH = 2 à l'aide d'HCl conc., puis saturée en NaCl et extraite quatre fois avec AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur $MgSO_4$, filtrées et le solvant est éliminé par évaporation rotative. 26.9 mg (0.11 mmol, 27% rendement brut) de produit **71** sont obtenus sous la forme d'un solide brun-rose.

Données analytiques de **71**:

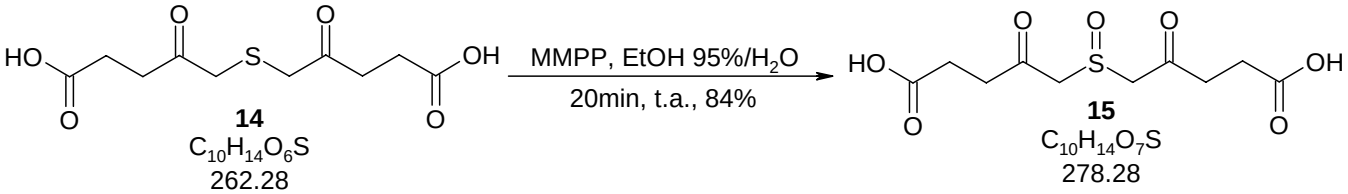


^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 9.98 (s, 1H, HC(2' ou 6')), 7.46 (s, 1H, HC(2' ou 6')), 4.01 (s, 2H, H_2C(2'')), 3.72 (s, 3H, H_3C(1a)), 2.92 (t, 2H, $^3J_{3\text{-}2}$ = 7.4, H_2C(3)), 2.71 (t, 2H, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.4, H_2C(2))

^{13}C-RMN (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 182.8 (C(2' ou 6')), 177.8, 170.1, 142.6, 140.2 (C(1, 3', 4', 5', 1'')), 130.8 (C(2' ou 6')), 52.7 (C(1a)), 33.7 (C(2)), 32.6 (C(2'')), 23.1 (C(3))

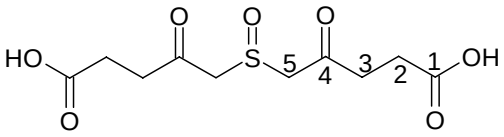
MS (ESI): $[M+Na]^+$ = 279.1, $[M+Na+MeOH]^+$ = 311.0, ms ms 279 $[M+Na-CO_2]^+$ = 234.9; $[M-H]^-$ = 255.0, ms ms 255 $[M-H-MeOH]^-$ = 222.7, ms ms 255 $[M-H-MeOH-CO_2]^-$ = 179.1

11.4.22 Synthèse de l'acide 5-(4-carboxy-2-oxo-butane-1-sulfinyl)-4-oxo-pentanoique 15



A un mélange hétérogène de 0.51 g (1.95 mmol, 1.0 éq.) de **14** dans 10 ml d'éthanol 95%, sont ajoutés 0.77 g (1.55 mmol, 0.8 éq.) de MMPP dissout dans 10 ml d'H_2O. Le mélange hétérogène devient homogène en chauffant légèrement à l'aide d'un foehn. Une fois le mélange homogène obtenu, laisser agiter à t.a. pendant 20 min. Le solide insoluble est filtré sur buchner et 247.0 mg (pureté RMN 98%) de solide **15** sont obtenus. Les solvants du filtrat sont éliminés par évaporation rotative et du méthanol est ajouté au résidu obtenu. Le solide insoluble est filtré sur buchner et 207.9 mg (pureté RMN 94%) de solide **15** sont obtenus. 454.9 mg de **15** (1.64 mmol, 84%), contaminés par 2 ou 6% de **16**, sont récupérés sous la forme d'un solide blanc.

Données analytiques de **15**:



Rf: (AcOEt/MeOH, 1:1): 0.12 ($KMnO_4$)

Pf: 172°C

IR (pastille): 3275-2886br, 1751m, 1700s, 1717s, 1446m, 1406m, 1357m, 1325m, 1301m, 1255w, 1230m, 1214m, 1166m, 1095m, 1031s, 1015m, 993m, 898w, 689w, 618w

^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO, 298 K): 12.18 (s, 2H, COOH), 4.13 (d, $^{2}J_{5a\text{-}5b}$ = 14.7, 2H, $H_aC(5)$), 4.03 (d, $^{2}J_{5b\text{-}5a}$ = 14.7, 2H, $H_bC(5)$), 2.80 (dt, $^{2}J_{3a\text{-}3b}$ = 18.3, $^{3}J_{3a\text{-}2}$ = 6.24, 2H, $H_aC(3)$), 2.76 (dt, $^{2}J_{3b\text{-}3a}$ = 18.3, $^{3}J_{3b\text{-}2}$ = 6.24, 2H, $H_bC(3)$), 2.44 (t, $^{3}J_{2\text{-}3}$ = 6.24, 4H, $H_2C(2)$)

^{13}C-RMN (100 MHz, DMSO, 298 K): 202.3 (C(4)), 173.5 (C(1)), 61.9 (C(5)), 38.7 (C(3)), 27.4 (C(2))

MS (ESI): $[M\text{-}H]^-$ = 277.3

12 Partie expérimentale biochimique

12.1 Appareils utilisés

Centrifugeuse :	Sorvall RC-50, type de rotor : SLA 3000 SS-34 Beckman L7-65, type de rotor: Ti 70,1 Centrifugeuse de table: mini spin, eppendorf
French press :	Thermo french pressure cell press, thermo electro corporation
Bain thermotatisé :	block thermostat BT 200, Klenifeld Labortechnik Thermo-boy mgw Lauda C12
Electrophorèse :	Bio Rad POWER PAC 300 (160 V)
Spectroscopie :	UV/Visible spectrophotomètre, Ultrospec 2000, pharmacia biotech
Ultrafiltration :	Stirred ultrafiltration cell, millipore Ultrafiltration membrane, NHWL 10’000, dia 44.5 mm
Dialyse :	Snake skin pleated dialysis tubing 10’000 MWCO, 22mm x 35 feet dry diameter, Pierce
Chromatographie :	Äkta purifier, amersham pharmacia biotech; programme UNICORN V3.21

12.2 Produits utilisés

Produits chimiques	Qualité	Provenance
Acide acétique	100% p.a.	Roth
Acide chlorhydrique	Puriss p.a.	Riedel-de-Haën
Acide éthylènediaminetetraacétique (EDTA)	p.a.	Merck
Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthane sulfonique (HEPES)	≥99.5%	Roth
Acide perchlorique	60%, p.a.	Merck
Acide trichloroacétique (TCA)		Merck
1,3-Bis[tris-(hydroxyméthyl) méthylamino]propane (BTP)	Minimum 99% titration	Sigma
Bleu de bromophénol		Fluka
Bleu de Coomassie		Roth
Chlorure de magnésium hexahydraté	p.a.	Merck
Chlorure de potassium	p.a.	Merck
Chlorure de sodium	p.a.	Merck
p-Diméthylamino-benzaldehyde (DMAB)	ACS reagent	Sigma
Ethanol	puriss	Riedel-de-Haën
Extrait de levure servabacter	Poudre	Serva
Glycérol (glycine)	99.5% anhydrous	Gerbu
Isopropanol	Puriss	Riedel-de-Haën
Octylphénolpoly(éthylèneglycoléther) (NP40)		BDH
t-Octylphénoxypolyéthoxyéthanol X-100 (triton X-100)		Sigma
Peptone from casein (tryptane)	Tryptic-readily soluble	Serva
Peroxodisulfate d’ammonium (APS)		Roth
Rhotiphorèse (acrylamide 30%)	Gel 30	Roth
Sodium dodécylsulfate (SDS)		Serva
Sulfate d’ammonium	Puriss p.a.	Fluka
N,N,N,N-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)		Roth
Thiogalactoside d’isopropyle (IPTG)		Fluka
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS)	≥99.5% p.a.	Roth

12.3 Travail microbiologique et biochimique

12.3.1 Milieux et tampons

12.3.1.1 Culture et isolation de la PBGS

LB I (1 L)	10	g	tryptane
	5	g	extrait de levure
	5	g	NaCl
	100	µg/ml	ampicilline
	0.4	%	glucose
LB II (1 L)	10	g	tryptane
	5	g	extrait de levure
	5	g	NaCl
	100	µg/ml	ampicilline
Tampon 1	50	mM	Tris – HCl pH=8.0
	100	mM	NaCl
	5	mM	$MgCl_2$
	0.05	%	NP40
	10	%	triton X-100

12.3.1.2 SDS-PAGE

Solution 1 (100 ml 4 x Tris)	18.2 g	Tris – HCl pH=8.8
	2 ml	SDS 20%
Solution 2 (100 ml 4 x Tris)	6.06 g	Tris – HCl pH=6.8
	2 ml	SDS 20%
Solution 3 (2 L 10 x Tris)	60.0 g	Tris
	288 g	glycine
	20.0 g	SDS

Quantité pour la formation de quatre gels :

Gel de séparation 12.5%	6.7	ml	acrylamide 30%
	4.0	ml	4 x Tris (solution 1) – HCl pH= 8.8
	5.3	ml	H_2O milli Q
	80	µl	APS 10%
	8	µl	TEMED

Gel de concentration 5.35 %	1.4	ml	acrylamide 30%
	2.0	ml	4 x Tris (solution 2) – HCl pH=6.8
	4.6	ml	H_2O milli Q
	30	µl	APS 10%
	20	µl	TEMED
Tampon de charge	2.4	ml	1M Tris – HCl pH=6.8
	4	ml	SDS 20%
	2.4	ml	glycine
	1 pointe de spatule de bleu de bromophénol		
Tampon de migration	1 x Tris (solution 3)		
Solution de coloration	10	%	acide acétique
	30	%	isopropanol
	0.25	%	bleu de Coomassie
Solution de décoloration	10	%	acide acétique
	30	%	éthanol

12.3.1.3 Purification par HIC (hydrophobic interactions chromatography)

Tampon A	50	mM	HEPES – HCl pH=8.0
	5	mM	$MgCl_2$
	20	%	$(NH_4)_2SO_4$
Tampon B	50	mM	HEPES – HCl pH=8.0
	5	mM	$MgCl_2$

12.3.1.4 Purification par AEC (anion exchange chromatography)

Tampon A’	50	mM	HEPES – HCl pH=7.5
	5	mM	$MgCl_2$
Tampon B’	50	mM	HEPES – HCl pH=7.5
	5	mM	$MgCl_2$
	1	M	KCl

12.3.1.5 Dialyse

Tampon 2	100	mM	TRIS – HCl pH=7.5
	10	mM	$MgCl_2$

12.3.1.6 Stockage de la protéine

Tampon 3	100	mM	TRIS – HCl pH=8.5
	10	mM	$MgCl_2$
	10	%	glycérol

12.3.1.7 Détermination de l'activité

Tampon cinétique :	100	mM	BTP – HCl pH=8.5
	100	mM	KCl
	10	mM	$MgCl_2$
Tampon stop :	25%		TCA
Réactif d'Ehrlich :	2.0	g	DMBA
	27.3	ml	acide acétique
	72.7	ml	HCl 37%
Tampon de dilution	1x		tampon cinétique
	2x		tampon stop

12.3.1.8 Tests d'inhibition

Solution ALA :	32 ou 16 mM		
Solution PBGS :	8 µg/ml		
Réactif d'Ehrlich :	10	ml	acide acétique
	10	ml	acide perchlorique
	0.4	g	DMAB
Tampon cinétique :	200	mM	BTP – HCl pH=8.5
	20	mM	$MgCl_2$
Tampon stop :	25 %		TCA

12.3.2 Construction du vecteur d'expression pLM_PBGS

Le vecteur d'expression pLM_PBGS a été construit et fournit par Linda Stith et Eileen K. Jaffe (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA). Le gène *P. aeruginosa hemB*, codant pour la PBGS, est excisé depuis le plasmide pGEX*hemb* [76] avec les deux enzymes de restrictions (*Nde*I et *Bam*HI) *via* mutagenèse (QuickChange). Ce gène est ensuite introduit dans le vecteur plasmide d'*Escherichia coli* (pET3a) générant ainsi pLM_PBGS. L'intégrité du plasmide construit est vérifiée par la détermination de la séquence ADN.

12.3.3 Production et purification de la PBGS

12.3.3.1 Préculture

Une colonie de BL21 (λDE3) contenant pLM_PBGS est récoltée dans la boîte de Pétri et transférée dans un ehrlenmeyer contenant 500 ml de LB I préalablement stérilisé. L'opération est effectuée deux fois. Les deux ehrlenmeyers sont agités à 37°C pendant une nuit.

Les deux précultures sont centrifugées à 5000 rpm, à 4°C pendant 10 min (centrifugeuse Sorvall). Le milieu est jeté et les deux culots sont resuspendus dans 500 ml chacun du milieu LB II stérilisé.

12.3.3.2 Induction

100 μM d' IPTG sont ajoutés et les ehrlenmeyers sont agités à 18°C pendant une nuit. Les solutions sont centrifugés à 5000 rpm, à 4°C, pendant 10 min (centrifugeuse Sorvall). La solution est jetée et les culots peuvent être purifiés.

12.3.3.3 Inhibiteurs de protéase, french press et précipitation au sulfate d'ammonium

Le culot est resuspendu dans le tampon 1 afin d'être lysé.

Une tablette d'inhibiteurs de protéase est ajoutée et dissoute dans la solution.

La solution est dissociée à l'aide de la french press (2 x 2000 Ib/in.^{2}). Les cellules mortes sont enlevées par centrifugation à 50000 rpm, à 4°C, pendant 45 min (centrifugeuse Beckman). Le culot est jeté et le surnageant est récupéré.

Une précipitation à 25% de sulfate d'ammonium est ensuite effectuée. 2.88 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés, par petite portion, sous agitation à 4°C. Le surnageant est agité pendant une nuit à 4°C avant d'être centrifugé à 13'000 rpm, à 4°C, pendant 20 min (centrifugeuse Sorvall). Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 10 ml maximum de tampon B HIC et une nouvelle fois centrifugé à 13'000 rpm, à 4°C, pendant 20 min (centrifugeuse Beckman). Le surnageant est ensuite filtré et injecté sur la première colonne de purification.

12.3.3.4 Purification par HIC (hydrophobic interactions chromatography)

Le surnageant (V=10 ml) est chargé sur la première colonne de purification, la phénylsépharose (Tableau 17). Les tampons sont filtrés et dégazés.

Diamètre du tube	16 mm
Volume de colonne	10 ml
Limite de pression	1.0 MPa
Longueur d'onde	280 nm
Vitesse d'élution	1 ml/min
Volume d'injection	10 ml
Volume du tampon A pour le lavage de la colonne	3 x 10 ml
Taille des fractions	5 ml
Concentration au départ du tampon B	0 %
Longueur du gradient	12 bases
Concentration finale du tampon B	100 %
Volume du tampon B pour le nettoyage	2 x 10ml

Tableau 17 : caractéristiques de la purification par HIC

12.3.3.5 SDS-PAGE après HIC

La présence de la PBGS dans les diverses fractions est déterminée par SDS-PAGE.

Le gel de séparation est d'abord préparé puis déposé sur son support. De l'isopropanol est versé au-dessus du gel, pour éviter tout contact avec l'air, puis le gel est laissé polymériser pendant 1 heure. L'isopropanol est enlevé et le gel de concentration est ensuite versé et laissé polymériser pendant 30 minutes.

Les échantillons sont préparés : 20 µl de fractions
5 µl de tampon de charge

Lorsque les gels sont prêts, les échantillons sont chargés ainsi qu'une référence (HMW : high molecular weight proteins) puis la migration se fait dans le tampon de migration. Les protéines sont ensuite colorées et le surplus de colorant est éliminé avec la solution correspondante.

Les fractions contenant la protéine sont réunies (V=105 ml) et directement injectées dans la deuxième colonne de purification.

12.3.3.6 Purification par AEC (anion exchange chromatography)

La solution contenant la protéine (V=105 ml) est chargée sur la deuxième colonne de purification, la DEAE sépharose (Tableau 18). Les tampons sont filtrés et dégazés.

Diamètre du tube	16 mm
Volume de colonne	25 ml
Limite de pression	0.3 MPa
Longueur d'onde	280 nm
Vitesse d'élution	2 ml/min
Volume d'injection	105 ml
Volume du tampon A' pour le lavage de la colonne	3 x 25 ml
Taille des fractions	10 ml
Concentration au départ du tampon B'	0 %
Longueur du gradient 1	8 base
Concentration intermédiaire du tampon B'	99 %
Volume du tampon B' à 99%	40 ml
Longueur du gradient 2	1 base
Concentration finale du tampon B'	100 %
Volume du tampon B' pour le nettoyage	2 x 25ml

Tableau 18 : Caractéristiques de la purification par AEC

12.3.3.7 SDS-PAGE après AEC

La présence de la PBGS dans les diverses fractions est déterminée par SDS-PAGE.

Les gels sont préparés de la même manière que décrite dans le chapitre 1.3.2.5.

Les échantillons sont préparés : 5 µl de fractions
20 µl d'H_2O
5 µl de tampon de charge

Les fractions contenant la protéine sont réunies (V=100 ml) afin d'être concentrées.

12.3.3.8 Concentration des fractions et dialyse

Les fractions réunies sont concentrées sur une membrane (NHWL 10'000, dia 44.5 mm) jusqu'à un volume de 15 ml. Finalement, une dialyse est effectuée sur la solution contenant la protéine. La solution est versée dans le «tube» à dialyse et ce dernier est plongé dans le tampon 2 légèrement agité à 4°C. Après 5 h, le tampon est changé. Ce processus est effectué trois fois.

12.3.3.9 Détermination de la quantité de protéine

La détermination de la quantité de protéine se fait en mesurant l'absorption de la solution contenant la protéine à 280 nm dans des cuvettes en quartz. Des dilutions sont nécessaires afin d'obtenir des valeurs d'absorption entre 0.1 et 0.9.

La concentration se calcule à partir de la relation Lambert-Beer :

$$A = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

A : absorbance
c : concentration [M]
d : longueur de la cuve, d=1 cm
ε : coefficient d'extinction, ε=28020 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

L'absorbance est calculé pour deux dilutions semblables (1:100), et pour une dilution (1:5). Une moyenne sur les trois mesures est faite.

A (moyen) = 15.47
PM (dimère protéine) = 37800 g/mol

$$c = 552.1\ \mu M \text{ ou } c = 20.87\ mg/ml$$

12.3.3.10 Stockage de la protéine

10 ml de la solution protéinée sont stockés dans la glace à 4°C.
Les 5 ml restant sont stockés à -18°C après avoir subi une dialyse dans le tampon 3. Les 5 ml sont répartis dans des eppendorfs de 1 ml pour le stockage. La concentration est recalculée en mesurant l'absorbance à 280 nm dans des cuves en quartz: c = 28.55 mg/ml.

12.3.4 Détermination des paramètres de la PBGS

12.3.4.1 Détermination de l'activité

230 µl de différentes concentrations (Tableau 19) de PBGS dans le tampon cinétique sont placés à 37°C. 20 µl d'ALA **5** 100 mM, préalablement conditionnés à 37°C, sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 15 min à 37°C. Pour arrêter la réaction, 220 µl du mélange sont ajoutés à 220 µl de tampon stop placé dans de la glace. Les eppendorfs sont centrifugés pendant 2 min à 15'300 rpm. 400 µl du surnageant sont ensuite prélevés et mélangés avec 400 µl du réactif d'Ehrlich.

Eppendorfs	**Solution PBGS [µl]**	**Solution PBGS [µM]**	**Tampon cinétique [µl]**	**$[PBGS]_{finale}$ [µM]**	**Solution ALA 5 100mM [µl]**
1	0	0.0552	230	0	20
2	4.5		225.5	0.001	20
3	9.1		220.9	0.002	20
4	22.6		207.4	0.005	20
5	31.7		198.3	0.007	20
6	4.5	0.552	225.5	0.01	20
7	6.8		223.2	0.015	20
8	9.1		220.9	0.02	20
9	13.6		216.4	0.03	20
10	18.1		211.9	0.04	20
11	22.6		207.4	0.05	20
12	31.7		198.3	0.07	20
13	36.2		193.8	0.08	20
14	4.5	5.52	225.5	0.1	20
15	5.4		224.6	0.12	20
16	6.8		223.2	0.15	20
17	9.1		220.9	0.2	20
18	13.6		216.4	0.3	20
19	18.1		211.9	0.4	20
20	22.6		207.4	0.5	20
21	27.2		202.8	0.6	20
22	31.7		198.3	0.7	20
23	36.2		193.8	0.8	20
24	45.3		184.7	1	20

Tableau 19 : Conditions utilisées pour la détermination de l'activité de la PBGS

Après 10 à 15 minutes, la coloration rose violet typique est quantifiée par spectrophotométrie UV/VIS et l'absorbance maximale est obtenue en prenant la valeur à 555 nm. Les valeurs d'absorbance doivent se situer entre 0.1 et 0.9, donc des dilutions, à l'aide du tampon de dilution, sont effectuées quand cela s'avérait nécessaire. Chaque mesure est faite deux fois et une moyenne est calculée pour l'absorbance. (Annexe 2 dans chapitre 12).

12.3.4.2 Détermination de K_M et k_{cat}

Le schéma de pipetage est le suivant (Tableau 20) et la solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 µg/ml [µL]**	**Tampon cinétique [µL]**	**H_20 [µL]**	**Solution ALA 5 32 mM [µL]**	**$[ALA]_{finale}$ [mM]**
blanc	200	100	100	0	0
1	200	100	97.5	2.5	0.2
2	200	100	95	5	0.4
3	200	100	92.5	7.5	0.6
4	200	100	90	10	0.8
5	200	100	87.5	12.5	1
6	200	100	82.5	17.5	1.4
7	200	100	75	25	2
8	200	100	65	35	2.8
9	200	100	50	50	4

Tableau 20 : Conditions utilisées pour la détermination de K_M et k_{cat} de la PBGS

Les eppendorfs, une fois remplis, sont placés dans un thermostat à 37°C et préincubés pendant 10 minutes. Le substrat est additionné selon les volumes indiqués ci-dessus et le mélange résultant est incubé pendant 15 minutes. 350 µL du mélange sont ensuite prélevés et additionnés à 350 µL de tampon stop placé dans de la glace. Après centrifugation (13'500 rpm, 3 min), 450 µL du surnageant sont ajoutés à 450 µL du réactif d'Ehrlich. La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 555 nm. Chaque mesure est faite deux fois et une moyenne est calculée pour l'absorbance. (Annexe 2 dans chapitre 12).

12.4 Etude cinétique de la PBGS

12.4.1 Préparation de la solution de l'inhibiteur

Une quantité appropriée d'inhibiteur est dissoute dans l'eau de manière à obtenir des valeurs d'absorption comprises entre 0.1 et 0.9. Si l'inhibiteur est peu soluble dans l'eau, il est dissout directement dans deux équivalents d'une solution NaOH.

12.4.2 Détermination des valeurs IC_{50}

Des solutions en concentrations différentes en inhibiteur sont préparées de telle manière que pour chaque concentration d'inhibiteur, 50 µL sont prélevés pour les tests. Treize concentrations entre 125 mM et $125 \cdot 10^{-6}$ mM en inhibiteur sont préparées. Il y a toujours deux

eppendorfs par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière décrite dans le Tableau 21. La solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées dans un thermostat à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 μg/ml [μL]**	**Tampon cinétique [μL]**	**Solution inhibiteur [μL]**	**H_2O [μL]**	**Solution ALA 5 16 mM [μL]**
blanc	-	200	-	150	50
1 à 13	200	100	50	-	50
sans inhibition	200	100	-	50	50

Tableau 21 : Conditions utilisées pour la détermination des valeurs IC_{50} des inhibiteurs

Les eppendorfs, une fois remplis, sont placés dans un thermostat à 37°C et préincubés pendant 30 minutes. Le substrat est ensuite ajouté et le mélange résultant est incubé pendant 15 minutes. 350 μL du mélange sont ensuite prélevés et additionnés à 350 μL de tampon stop placé dans la glace. Après centrifugation (13'500 rpm, 3 min), 450 μL du surnageant sont ajoutés à 450 μL du réactif d'Ehrlich. La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 555 nm. (Annexe 3 dans chapitre 12).

12.4.3 Détermination de la dépendance ou indépendance du temps des inhibiteurs

Pour ces tests, différents temps de préincubation sont utilisés. Il y a toujours deux eppendorfs par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière suivante (Tableau 22). La solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées dans un thermostat à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 μg/ml [μL]**	**Tampon cinétique [μL]**	**Solution inhibiteur [μL]**	**H_2O [μL]**	**Solution ALA 5 16 mM [μL]**
blanc	-	200	-	150	50
1 à 13	200	100	50	-	50
sans inhibition	200	100	-	50	50

Tableau 22 : Conditions utilisées pour la détermination de la dépendance ou indépendance du temps des inhibiteurs

Les eppendorfs, une fois remplis, sont placés dans un thermostat à 37°C. Les temps de préincubation varient entre : 30 min, 20 min, 15 min, 10 min, 5 min, 2 min, 1 min, 30 sec. Le substrat est ensuite ajouté et le mélange résultant est incubé pendant 15 minutes. 350 µL du mélange sont ensuite prélevés et additionnés à 350 µL de tampon stop placé dans la glace. Après centrifugation (13'500 rpm, 3 min), 450 µL du surnageant sont ajoutés à 450 µL du réactif d'Ehrlich. La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 555 nm. (Annexe 4 dans chapitre 12).

12.4.4 Test cinétique suivant Michaelis-Menten [100]

Il y a toujours deux eppendorfs par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière décrite dans le Tableau 23. La solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées dans un thermostat à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 µg/ml [µL]**	**Tampon cinétique [µL]**	**Solution inhibiteur [µL]**	**H_2O [µL]**	**Solution ALA 5 16 mM [µL]**
blanc	200	100	50	50	-
1	200	100	50	47.5	2.5
2	200	100	50	45	5
3	200	100	50	42.5	7.5
4	200	100	50	40	10
5	200	100	50	37.5	12.5
6	200	100	50	32.5	17.5
7	200	100	50	25	25
8	200	100	50	15	35
9	200	100	50	0	50

Tableau 23 : Conditions utilisées pour la détermination de K_I à l'aide des lois de Michaelis-Menten

Les eppendorfs, une fois remplis, sont placés dans un thermostat à 37°C et préincubés pendant 10 minutes. Le substrat est ensuite ajouté et le mélange résultant est incubé pendant 15 minutes. 350 µL du mélange sont ensuite prélevés et ajoutés à 350 µL de tampon stop placé dans de la glace. Après centrifugation (13'500 rpm, 3 min), 450 µL du surnageant sont ajoutés à 450 µL du réactif d'Ehrlich. La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 555 nm. (Annexe 5 dans chapitre 12).

12.4.5 Détermination de K_I pour les inhibiteurs dépendants du temps [109]

Des solutions en concentrations différentes en inhibiteur sont préparées de telle manière que pour chaque concentration d'inhibiteur, 50 µL sont prélevés pour les tests. Cinq concentrations différentes en inhibiteur sont préparées. Pour chaque concentration d'inhibiteur, les mesures sont faits pour des temps de préincubation différent. Il y a toujours deux eppendorfs par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière décrite dans le Tableau 24. La solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées dans un thermostat à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 µg/ml [µL]**	**Tampon cinétique [µL]**	**Solution inhibiteur [µL]**	**H_2O [µL]**	**Solution ALA 5 16 mM [µL]**
blanc	-	200	-	150	50
1 à 7	200	100	50	-	50
sans inhibition	200	100	-	50	50

Tableau 24 : Conditions utilisées pour la détermination de K_I pour les inhibiteurs dépendants du temps

La procédure est la même que celle qui est décrite dans les chapitres précédents. (Annexe 6 dans chapitre 12).

12.4.6 Détermination du type d'inhibition pour les inhibiteurs dépendants du temps

Cinq concentrations différentes pour le substrat sont préparées. Pour chaque concentration de substrat les mesures sont faites pour des temps de préincubation différents. Il y a toujours deux eppendorfs par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière décrite dans le Tableau 25. La solution d'ALA **5** n'est ajoutée qu'après la préincubation. Les solutions sont placées dans un thermostat à 37°C.

Eppendorfs	**Solution PBGS 8 µg/ml [µL]**	**Tampon cinétique [µL]**	**Solution inhibiteur [µL]**	**H_2O [µL]**	**Solution ALA 5 16 mM [µL]**
blanc	-	200	-	197.5, 195, 187.5, 175, 150	2.5, 5, 12.5, 25, 50
1 à 6	200	100	50	47.5, 45, 37.5, 25,0	2.5, 5, 12.5, 25, 50
sans inhibition	200	100	-	97.5, 95, 87.5, 75,50	2.5, 5, 12.5, 25, 50

Tableau 25 : Conditions utilisées pour la détermination du type d'inhibition pour les inhibiteurs dépendants du temps

La procédure est la même que celle qui est décrite dans les chapitres précédents. (Annexe 7 dans chapitre 12).

12.5 Cristallisations et détermination des structures

Les solution de protéines contenant les inhibiteurs sont préparées en mélangeant des aliquots de la solution de protéine (20 mg/ml protéine, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.5) et des solutions d'inhibiteurs, pour les concentrations finales voir le Tableau 26. Les conditions de cristallisation ont été identifiées en utilisant Crystal Screen^{TM}, Crystal Screen 2^{TM}, Low ionic Strength Screen^{TM}, Natrix^{TM} and Crystal Screen Cryo$_{TM}$ sparse matrix screens (hampton Research. Aliso Viejo, USA) in 96-well sitting-drop CrystalClear strip racks (Douglas Instruments, UK) and 3 ml of reservoir plus 3 ml of protein solution drop. Ainsi, les conditions initiales déterminées aussi bien que les conditions « *wild-type* » de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* ont été optimisé par une méthode de « *hanging-drop, vapor-diffusion* » employant 5 µl de la solution de protéine et 5 ml de la solution réservoir (Tableau 26).

Avant la collection des données cristallographiques, les cristaux ont été lavés dans une solution cryo-protectrice pendant 5 secondes puis rapidement gelés dans de l'azote liquide (Tableau 27).

La collection des données est effectuée dans des conditions cryogéniques utilisant la longueur d'onde CuKα et le diffractomètre Rigaku-MSC R-Axis IV^{++} image plate ou une radiation synchrotron (PSF, BESSY, Berlin, Germany, beamline BL1, λ = 0.98010 Å) utilisant le détecteur MAR Research CCD (Tableau 27).

Les structures de la PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* complexées avec les inhibiteurs ont été résolues par transformées de Fourrier, utilisant le modèle amélioré de la PBGS « *wild-type »* (PDB-code 1b4k). Ceci a été suivi par plusieurs cycles d'affinement utilisant REFMAC5 [185, 186] et ARP/wARP [187] et une construction manuelle modèle utilisant l'oxygène [188]. Les ions Na^+, K^+, Mg^{2+} et Cl^- ainsi que les multimères de l'éthylèneglycol ont été incorporé afin de correspondre avec la densité électronique, les facteurs de température et la sphère de coordination. Dans certains cas, deux ou trois des acides aminés ont été modélisés. La qualité des structures a été vérifiée utilisant PROCHECK [189] et WhatIf [190].

L'analyse des interactions entre la protéine et les inhibiteurs a été facilitée par l'utilisation de ligplot [191]. Les superpositions ont été crées en utilisant lsqkab [185]. Les images sont produites par PyMOL (DeLano Scientific LLC, South San Fransisco, USA).

Les structures peuvent être visualisées sur Protein Data Bank (Tableau 27).

Structures	5-OH-LA/*Pa*PBGS	éther/*Pa*PBGS	amine/*Pa*PBGS
Solution protéine	10 mg/ml protéine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM 5-OH-LA sodium salt	10 mg/ml protéine, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM éther	10 mg/ml protéine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1mM NaCl, 1 mM amine monosodium salt
Solution réservoir	9.0 % (w/v) PEG-4000, 180 mM KCl, 9 mM $CaCl_2$, 0.05 Na-cacodylate, pH 6.0	12.0 % (w/v) PEG-8000, 340 mM Li_2SO_4, 20 % (v/v) glycérol	18.0 % (w/v) PEG-3350, 200 mM $LiNO_3$
Solution cryo-protectrice	20 % (v/v) PEG 400 + 80 % solution réservoir	Le cristal est directement gelé dans sa solution mère	20 % (v/v) PEG 400 + 80 % solution réservoir

Structures	thioéther/*Pa*PBGS	sulfoxyde/*Pa*PBGS	sulfone/*Pa*PBGS
Solution protéine	10 mg/ml protéine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM thioéther disodium salt	10 mg/ml protéine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM sulfoxyde disodium salt	10 mg/ml protéine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM sulfone disodium salt
Solution réservoir	17.0 % (w/v) PEG-3350, 120 mM Na-tartrate	18.0 % (w/v) PEG-3350, 220 mM LiCl	31.0 % (v/v) PEG-400, 100 mM Na-HEPES, pH 7.5, 180 mM $MgCl_2$
Solution cryo-protectrice	20 % (v/v) PEG 400 +80 % solution réservoir	20 % (v/v) PEG 400 + 80 % solution réservoir	10 % (v/v) PEG 400 + 90 % solution réservoir

Tableau 26 : Crystallisation and cryo data

Structures	5-OH-LA **36**	Ether **12**	Amine **13**	Thioéther **14**	Sulfoxyde **15**	Sulfone **16**
Structure determination						
Space group	$P42_12$	$P42_12$	$P42_12$	$P42_12$	$P42_12$	$P42_12$
Cell dimension: a; b; c (Å)	126.31; 126.31, 85.48	127.54; 127.54; 85.79	126.88; 126.88; 86.10	127.20; 127.20; 85.85	125.51; 125.51; 86.77	125.60; 125.60; 86.57
Total reflections[a] Unique reflections	418190 37881	798378 117544	433644 55853	467805 44731	297780 45985	339607 55920
Resolution range (Å)[b]	40.2-2.15 (2.23-2.15)	38.10-1.48 (1.51-1.48)	40.13-1.90 (1.94-1.90)	34.26-2.05 (2.10-2.05)	39.68-2.02 (2.07-2.02)	39.50-1.93 (1.98-1.93)
Completeness (%)[b]	99.2 (99.5)	96.2 (98.2)	98.8 (95.2)	97.8 (97.7)	99.8 (99.8)	95.0 (93.4)
Redundancy[b]	11.0 (9.9)	6.8 (6.1)	7.8 (7.0)	10.5 (9.5)	6.5 (6.0)	6.1 (5.5)
R_{merge}[b] I/σ_I[b]	12.6 (45.6) 16.7 (4.9)	8.0 (36.0) 19.3 (3.1)	16.3 (48.3) 9.9 (2.0)	12.3 (46.2) 14.5 (4.3)	4.1 (22.6) 38.0 (4.17)	11.6 (47.9) 11.7 (3.46)
Temperature factor ($Å^2$)	22.5	10.6	19.2	20.9	17.9	20.3
Refinement						
Resolution range used for refinement (Å)[d]	89.8-2.15	90.17-1.48	89.8-1.90	89.8-2.05	89.8-2.02	89.8-1.93
Reflections[a]	35917	107399	52367	41499	43556	47003
No-H protein atoms / dimer	6020	6841	6349	6273	6395	6180
Solvent molecules / dimer	456	968	723	659	654	639

Structures	5-OH-LA **36**	Ether **12**	Amine **13**	Thioéther **14**	Sulfoxyde **15**	Sulfone **16**
Ions / dimer: Na^+; K^+; Mg^{2+}; Cl^-	-; 2; 2; 2	-; -; 2; -	-; -; 2; -	2; -; 2; -	-; -; 2; 1	2; -; 7; 2
Average B-factor ($Å^2$)	17.70	11.31	18.02	18.43	15.63	19.11
R-factor (%); R_{free} (%)[e]	15.5; 20.4	14.91; 17.11	15.99; 20.12	14.66; 20.11	14.48; 18.33	15.13; 18.63
Ramachandran plot[f]: most favoured regions; additionally allowed; generously allowed (%)	92.6; 6.8; 0.4	94.1; 5.9; 0.0	94.6; 5.4; 0.0	93.5; 6.5;0.0	93.4; 6.6; 0.0	93.0; 6.8; 0.0
R.m.s. deviation from ideality: bond lenghts (Å); bond angles (deg.)[g]	0.017; 1.696	0.008; 1.249	0.016; 1.525	0.016; 1.497	0.015; 1.474	0.015; 1.469
Estimate overall coordinate error, based on maximum lihkelyhood (Å)	0.112	0.036	0.089	0.097	0.088	0.085
Beamline	home source	Bessy, PSF, BL1	Bessy, PSF, BL1	home source	Bessy, PSF, BL1	Bessy, PSF, BL1
PDB code	2c13	2c15	2c14	2c19	2c16	2c18

[a]: $> 1\ \sigma$

[b]: value for shell of highest resolution in parentheses

[c]: $R_{merge} = 100\ (\Sigma h,_i\ |I_{h,i}\ I_h|/\ \Sigma_{h,i}\ I_{h,i}\ )$, where summation is over all observations $I_{h,i}$ contributing to the reflection intensities I_h

[d]: F_c for range 87.71-20.0 Å

[e]: 5% of data were omitted from refinement [192]

[f]: calculated using Procheck [189]

[g]: calculated using Whatif [190]

Tableau 27 : X-ray and refinement data

13 Annexe

13.1 Annexe 1

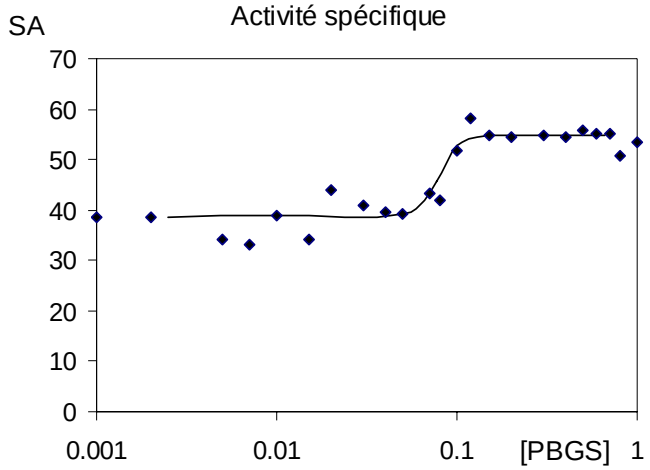
Structures à haute résolution disponible :

- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) sans inhibiteur, résolution 2.30 Å, entrée PDB 1aw5 [193]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à l'acide 5-aminolévulinique, résolution 1.75 Å, entrée PDB 1h7o [43]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à l'acide lévulinique, résolution 2.15 Å, entrée PDB 1ylv [70]; résolution 1.60 Å, entrée PDB 1h7n [43]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à l'acide 4,7-dioxosébacique, résolution 1.75 Å, entrée PDB 1eb3 [85]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à l'acide 4-oxosébacique, résolution 1.80 Å, entrée PDB 1gjp [85]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à l'acide 4-oxo-5-aminohexanoique, résolution 1.64 Å, entrée PDB 1h7p [43]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à la succinylacétone, résolution 2.00 Å, entrée PDB 1h7r [43]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à du plomb et du mercure, résolution 2.50 Å et 3.00 Å, entrée PDB 1qnv et 1qml [194]
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) complexée à un intermédiaire cyclique, résolution 1.60 Å, entrée PDB 1ohl [90]
- PBGS d'*Escherichia coli* complexée à l'acide lévulinique, résolution 2.00 Å, entrée PDB 1b4e [44]
- PBGS d'*Escherichia coli* complexée à l'acide 4,7-dioxosébacique, résolution 1.90 Å, entrée PDB 1i8j [45] et résolution 1.70 Å, entrée PDB 1l6s [86]
- PBGS d'*Escherichia coli* complexée à l'acide 4-oxosébacique, résolution 1.90 Å, entrée PDB 1l6y [86]
- PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* complexée à l'acide lévulinique, résolution 1.67 Å, entrée PDB 1b4k [41]
- PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* complexée à l'acide 5-fluorolévulinique, résolution 1.66 Å, entrée PDB 1gzg [46]
- PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* : introduction pas à pas d'un site de liaison métallique, résolution 2.20 Å, entrée PDB 1w54; résolution 1.70 Å, entrée PDB 1w56; résolution 1.60 Å, entrée PDB 1w5m; résolution 1.65 Å, entrée PDB 1w5n; résolution 1.85 Å, entrée PDB 1w50; 1.55 Å, entrée PDB 1w5p; résolution 1.40 Å, entrée PDB 1w5q [77]
- PBGS des érythrocytes humains complexée au PBG, résolution 2.83 Å, entrée PDB 1e51
- PBGS d'un mutant humain F12L complexée à l'acide 5-aminolévulinique, résolution 2.20 Å, entrée PDB 1pv8 [91]
- PBGS de *Chlorobium vibrioforme* complexée à l'acide lévulinique, résolution 2.60 Å, entrée PDB 1w1z [48]
- PBGS de levure complexée à l'acide 5-hydroxylévulinique, résolution 1.90 Å, entrée PBD 1w31 [179]

13.2 Annexe 2

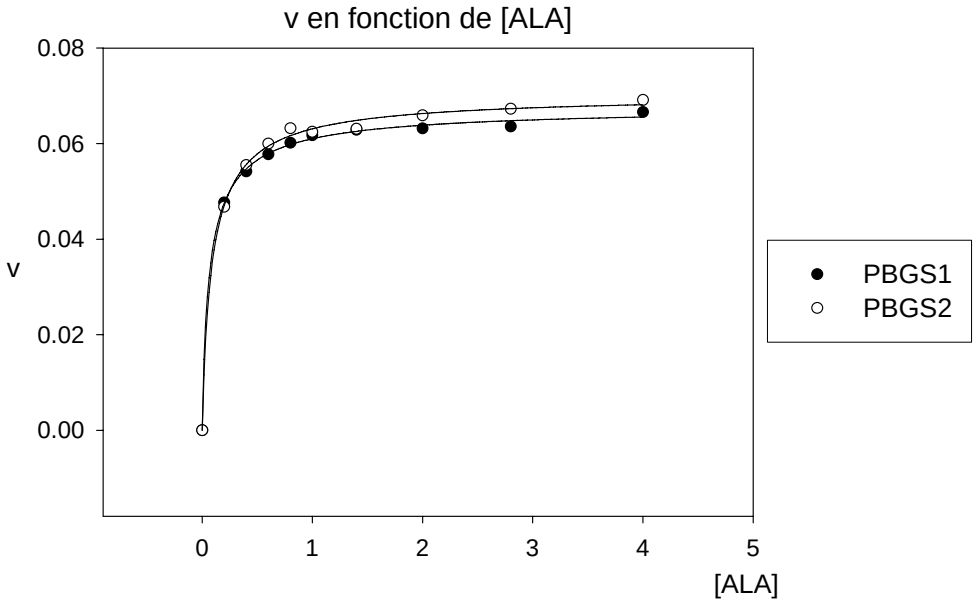
Activité spécifique de la PBGS :

PBGS [48]	A	Dilution	PBGS [48]	A	Dilution
0	0.000	-	0.08	0.134	1:4
	0.000			0.105	
0.001	0.006		0.1	0.223	
	0.005			0.148	
0.002	0.011		0.12	0.261	
	0.011			0.239	
0.005	0.028		0.15	0.295	
	0.021			0.293	
0.007	0.037		0.2	0.395	
	0.029			0.384	
0.01	0.065		0.3	0.388	1:6
	0.046			0.394	
0.015	0.093		0.4	0.514	
	0.053			0.522	
0.02	0.130		0.5	0.654	
	0.121			0.676	
0.03	0.180		0.6	0.776	
	0.171			0.805	
0.04	0.261		0.7	0.683	1:8
	0.192			0.692	
0.05	0.338		0.8	0.758	
	0.221			0.693	
0.07	0.435		1	0.943	
	0.429			0.965	



Détermination de K_M et k_{cat} de la PBGS :

ALA [48]	A	
0	0.000	0.000
	0.000	0.000
0.2	0.673	0.626
	0.618	0.641
0.4	0.741	0.747
	0.727	0.756
0.6	0.792	0.833
	0.773	0.793
0.8	0.813	0.841
	0.817	0.872
1.0	0.854	0.845
	0.818	0.847
1.4	0.858	0.847
	0.846	0.862
2.0	0.847	0.877
	0.865	0.909
2.8	0.879	0.940
	0.843	0.883
4	0.906	0.944
	0.898	0.929
V_{max}	0.068	0.070
K_M	0.113	0.115
k_{cat}	0.642	0.665
	V_{max} = 0.069 mM/h **K_M = 0.114 mM** **k_{cat} = 0.654 1/s**	



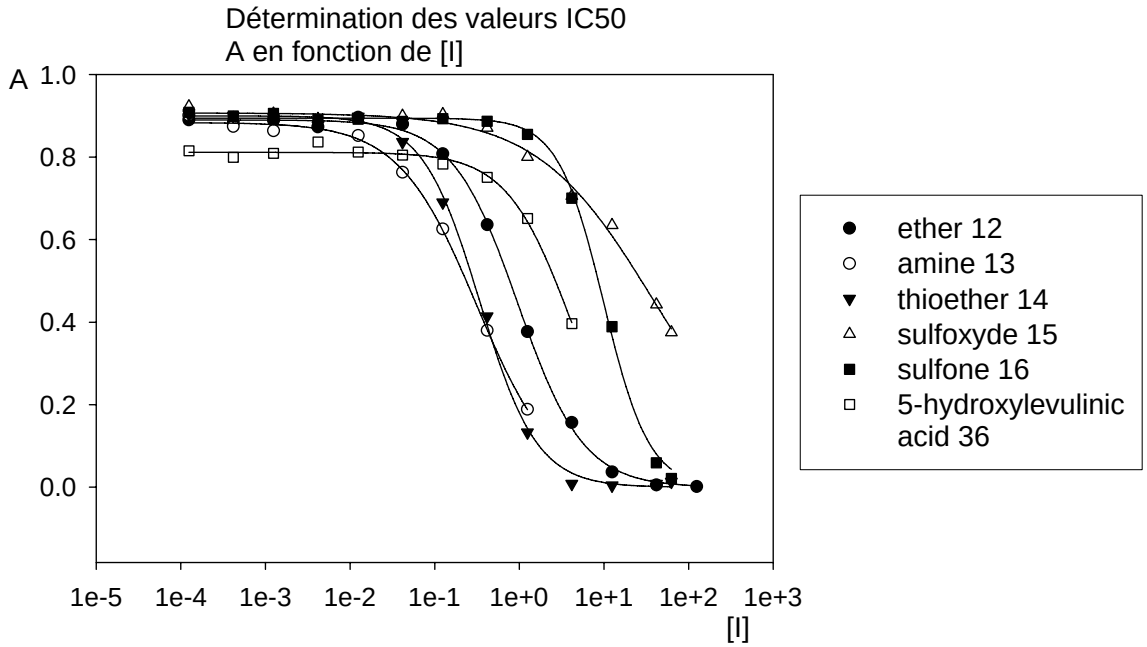
13.3 Annexe 3

Détermination des valeurs IC_{50} :

Concentration en **12** [48]	A		Concentration en **36** [48]	A	
0	0	0	0	0	0
125	0.001	0.003	-	-	-
42.0	0.002	0.009	-	-	-
12.5	0.033	0.041	-	-	-
4.20	0.154	0.160	4.20	0.443	0.349
1.25	0.374	0.380	1.25	0.660	0.642
0.42	0.624	0.648	0.42	0.759	0.742
0.125	0.792	0.824	0.125	0.798	0.768
$4.20\cdot10^{-2}$	0.869	0.890	$4.20\cdot10^{-2}$	0.772	0.837
$1.25\cdot10^{-2}$	0.880	0.912	$1.25\cdot10^{-2}$	0.792	0.832
$4.20\cdot10^{-3}$	0.865	0.881	$4.20\cdot10^{-3}$	0.852	0.821
$1.25\cdot10^{-3}$	0.874	0.903	$1.25\cdot10^{-3}$	0.808	0.809
$4.20\cdot10^{-4}$	0.881	0.882	$4.20\cdot10^{-4}$	0.809	0.789
$1.25\cdot10^{-4}$	0.877	0.903	$1.25\cdot10^{-4}$	0.819	0.811
IC_{50} = 0.963 mM **h = 1.125**			**IC_{50} = 4.046 mM** **h = 1.142**		

Concentration en **13** [48]	A		Concentration en **14** [48]	A	
0	0	0	0	0	0
125	-	-	62.5	0.011	0.016
42.0	-	-	42.0	0.010	0.007
6.25	0.276	0.326	6.25	0.005	0.004
4.20	0.177	0.202	4.20	0.009	0.008
1.25	0.189	0.192	1.25	0.129	0.137
0.42	0.380	0.393	0.42	0.432	0.396
0.125	0.626	0.645	0.125	0.689	0.691
$4.20\cdot10^{-2}$	0.763	0.795	$4.20\cdot10^{-2}$	0.826	0.847
$1.25\cdot10^{-2}$	0.852	0.878	$1.25\cdot10^{-2}$	0.889	0.907
$4.20\cdot10^{-3}$	0.783	0.778	$4.20\cdot10^{-3}$	0.802	0.845
$1.25\cdot10^{-3}$	0.864	0.866	$1.25\cdot10^{-3}$	0.909	0.885
$4.20\cdot10^{-4}$	0.874	0.874	$4.20\cdot10^{-4}$	0.894	0.904
$1.25\cdot10^{-4}$	0.901	0.866	$1.25\cdot10^{-4}$	0.899	0.908
IC_{50} = 0.313 mM **h = 0.945**			**IC_{50} = 0.342 mM** **h = 1.286**		

Concentration en **15** [48]	A		Concentration en **16** [48]	A	
0	0	0	0	0	0
62	0.359	0.391	62	0.018	0.025
42.0	0.452	0.433	42.0	0.054	0.065
12.5	0.633	0.637	12.5	0.389	0.410
4.20	0.726	0.685	4.20	0.711	0.690
1.25	0.816	0.784	1.25	0.866	0.844
0.42	0.881	0.860	0.42	0.890	0.883
0.125	0.930	0.877	0.125	0.909	0.877
$4.20\cdot10^{-2}$	0.931	0.868	$4.20\cdot10^{-2}$	0.903	0.869
$1.25\cdot10^{-2}$	0.888	0.896	$1.25\cdot10^{-2}$	0.908	0.876
$4.20\cdot10^{-3}$	0.904	0.880	$4.20\cdot10^{-3}$	0.895	0.886
$1.25\cdot10^{-3}$	0.920	0.890	$1.25\cdot10^{-3}$	0.917	0.894
$4.20\cdot10^{-4}$	0.905	0.883	$4.20\cdot10^{-4}$	0.902	0.897
$1.25\cdot10^{-4}$	0.934	0.911	$1.25\cdot10^{-4}$	0.918	0.899
IC_{50} = 38.38 mM **h = 0.636**			**IC_{50} = 9.938 mM** **h = 1.615**		

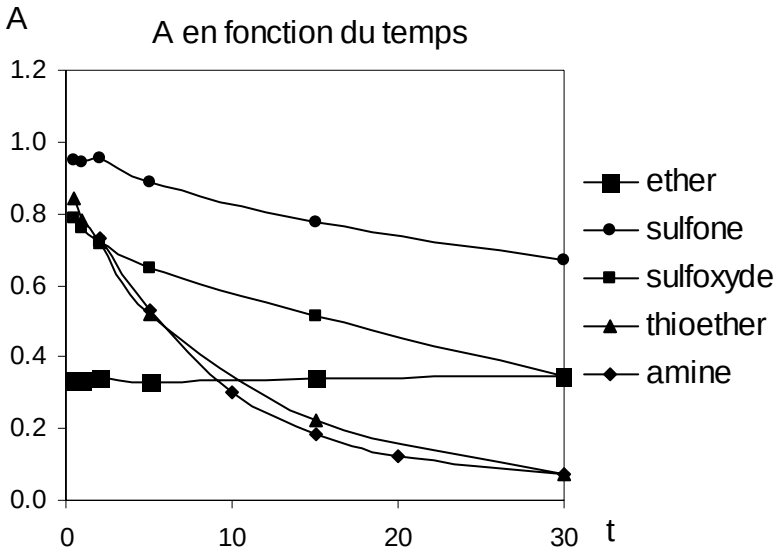


13.4 Annexe 4

Détermination de l'influence du temps de préincubation sur le mode d'inhibition :

Temps de préincubation [min]	Composé **12**	Composé **14**	Composé **15**	Composé **16**
	0.963 mM	0.355 mM	38.38 mM	9.938 mM
30	0.346	0.076	0.333	0.685
	0.347	0.074	0.356	0.656
15	0.335	0.228	0.523	0.789
	0.345	0.221	0.505	0.763
5	0.335	0.510	0.660	0.883
	0.329	0.526	0.639	0.891
2	0.348	0.717	0.723	0.957
	0.336	0.719	0.722	0.951
1	0.335	0.788	0.769	0.913
	0.337	0.779	0.745	0.975
0.5	0.333	0.827	0.804	0.935
	0.342	0.864	0.773	0.958
	Indépendant du temps	Dépendant du temps	Dépendant du temps	Dépendant du temps

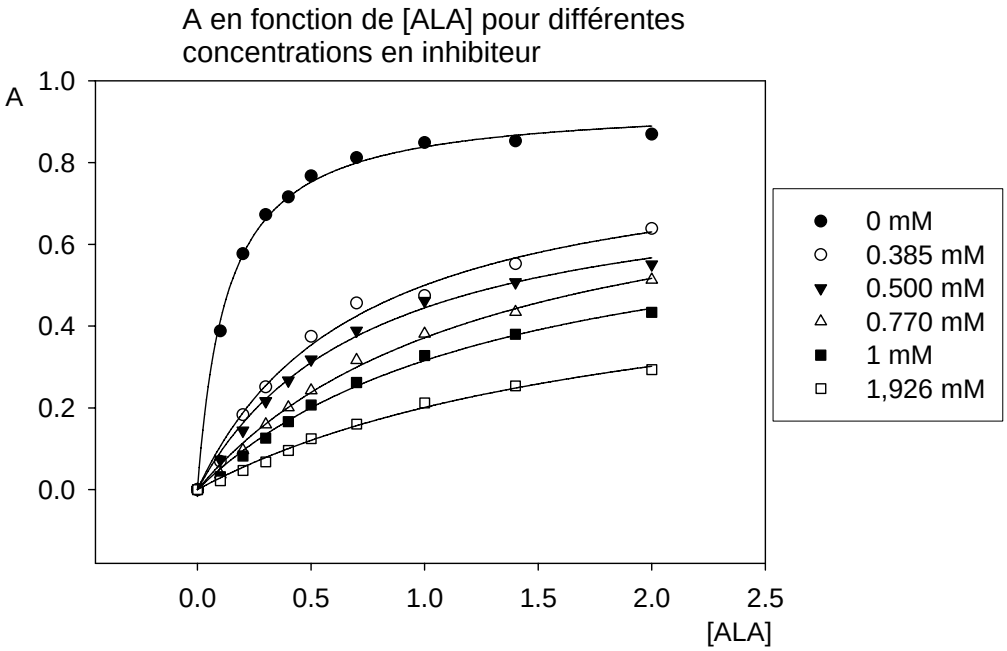
Temps de préincubation [min]	Composé **13**
	3 mM
30	0.074
	0.073
20	0.122
	0.120
15	0.188
	0.182
10	0.295
	0.313
5	0.526
	0.539
2	0.747
	0.719
	Dépendant du temps

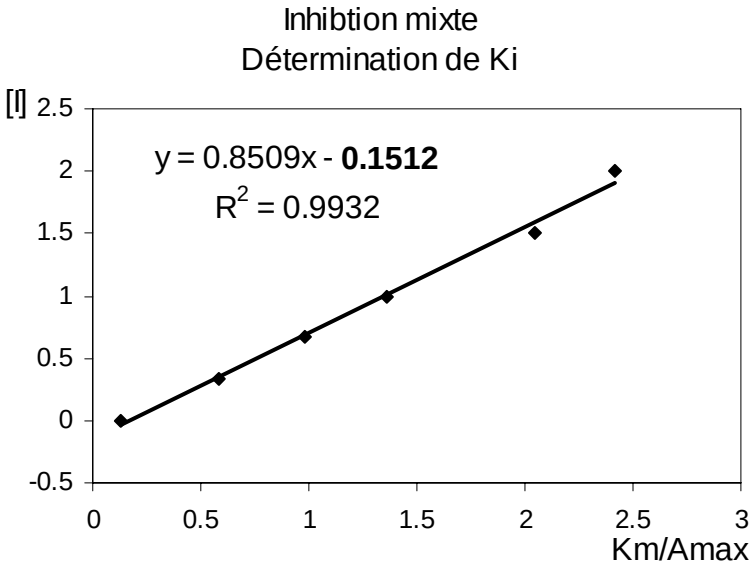


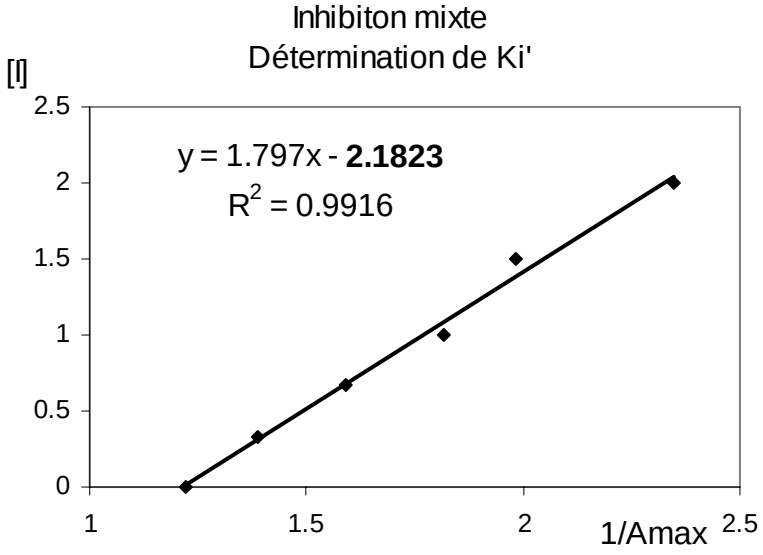
13.5 Annexe 5

Composé **12**

ALA [48]	**12** [mM]					
	0	0.385	0.500	0.770	1	1.926
0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
0.1	0.381	0.065	0.075	0.035	0.034	0.021
	0.395	0.073	0.072	0.039	0.029	0.022
0.2	0.572	0.183	0.145	0.102	0.086	0.047
	0.582	0.183	0.144	0.090	0.079	0.046
0.3	0.678	0.257	0.219	-	0.126	0.069
	0.667	0.246	0.214	0.159	0.126	0.066
0.4	0.710	-	0.265	0.200	0.167	0.094
	0.722	-	0.269	0.201	0.166	0.097
0.5	0.774	0.378	0.319	0.242	-	0.122
	0.761	0.372	0.318	0.243	0.207	0.127
0.7	0.797	0.460	0.390	0.316	0.265	0.161
	0.827	0.453	0.388	0.317	0.259	0.159
1	0.881	0.542	0.457	0.388	0.325	0.203
	0.817	0.407	0.467	0.374	0.331	0.221
1.4	0.849	0.547	0.506	0.434	0.382	0.247
	0.856	0.558	0.509	-	0.378	0.260
2	0.872	0.643	0.556	0.504	0.434	0.296
	0.867	0.634	0.546	0.522	0.433	0.291
K_{Mapp}	0.129	0.707	0.760	1.286	1.361	2.011
A_{max}	0.947	0.853	0.782	0.849	0.745	0.605
	Inhibiteur *fast binder* mixte : **K_I = 0.151 mM** **$K_{I'}$ = 2.182 mM**					

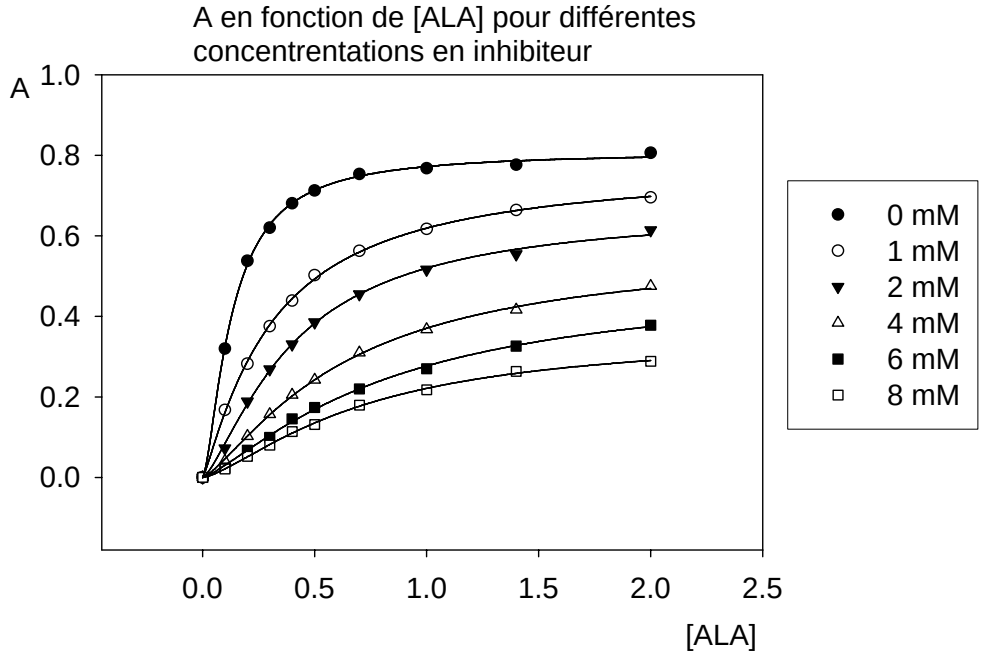

A en fonction de [ALA] pour différentes concentrations en inhibiteur
A
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
[ALA]
0 mM
0.385 mM
0.500 mM
0.770 mM
1 mM
1,926 mM

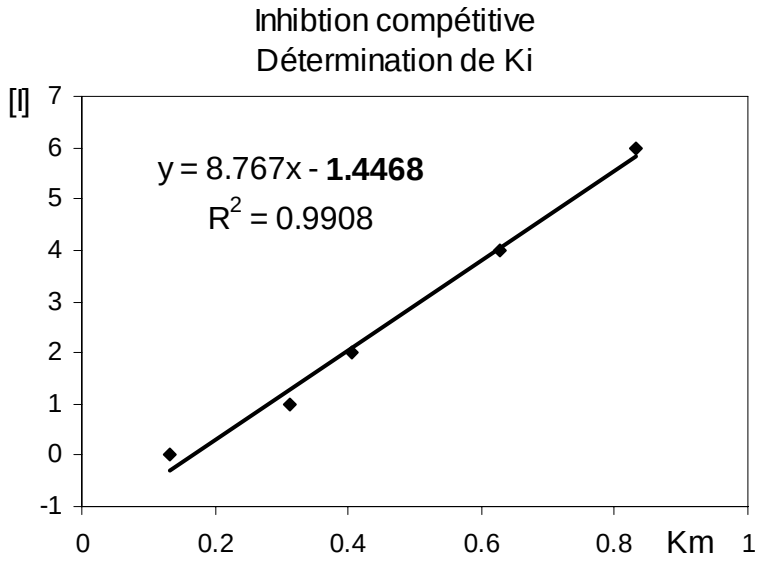

Inhibtion mixte
Détermination de Ki
[I]
y = 0.8509x - **0.1512**
R^2 = 0.9932
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
Km/Amax


Inhibiton mixte
Détermination de Ki'
[I]
y = 1.797x - **2.1823**
R^2 = 0.9916
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
1.5
2
2.5
1/Amax

Composé **36**

ALA [mM]	**36** [mM]				
	0	1	2	4	6
0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
0.1	0.316	0.136	0.075	0.039	0.024
	0.323	0.199	0.070	0.042	0.023
0.2	0.549	0.281	0.194	0.106	0.067
	0.527	0.283	0.183	0.099	0.068
0.3	0.613	0.362	0.272	0.151	0.104
	0.627	0.389	0.265	0.163	0.095
0.4	0.691	0.437	0.331	0.197	0.147
	0.670	0.441	0.330	0.212	0.144
0.5	0.737	0.503	0.391	0.247	0.171
	0.688	0.501	0.380	0.237	0.177
0.7	0.741	0.565	0.451	0.307	0.222
	0.766	0.560	0.459	0.312	0.218
1	0.799	0.604	0.540	0.369	0.274
	0.736	0.630	0.492	0.366	0.266
1.4	0.757	0.671	0.559	0.428	0.319
	0.796	0.657	0.550	0.405	0.333
2	0.855	0.696	0.617	0.463	0.388
	0.806	0.695	0.611	0.487	0.368
K_{Mapp}	0.135	0.366	0.560	1.056	1.537
A_{max}	0.879	0.839	0.810	0.737	0.679
	Inhibiteur *fast binder* compétitif : K_I = 1.447 mM				


A en fonction de [ALA] pour différentes concentrentations en inhibiteur
A
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
[ALA]
0 mM
1 mM
2 mM
4 mM
6 mM
8 mM

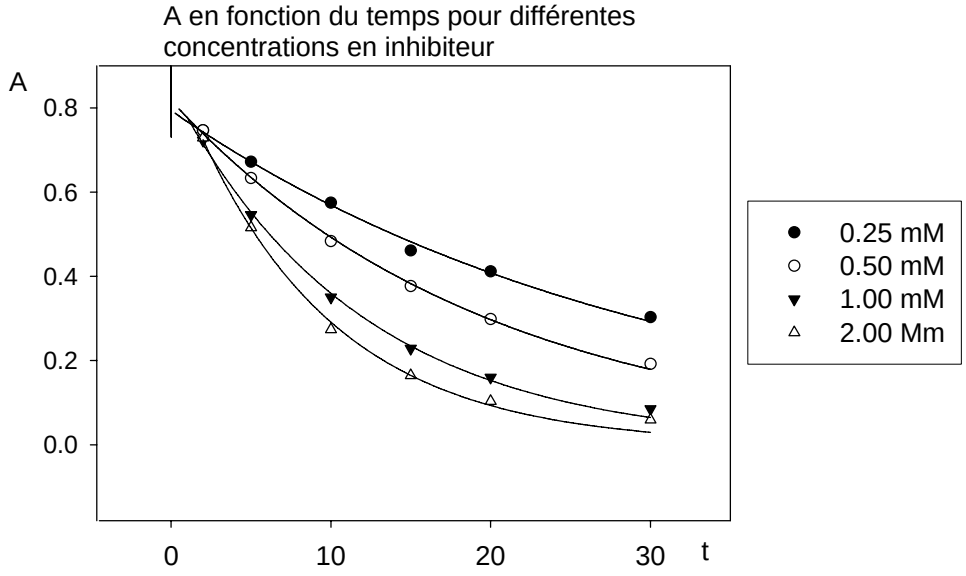

Inhibtion compétitive
Détermination de Ki
[I]
y = 8.767x - **1.4468**
R^2 = 0.9908
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
0.2
0.4
0.6
0.8
Km
1

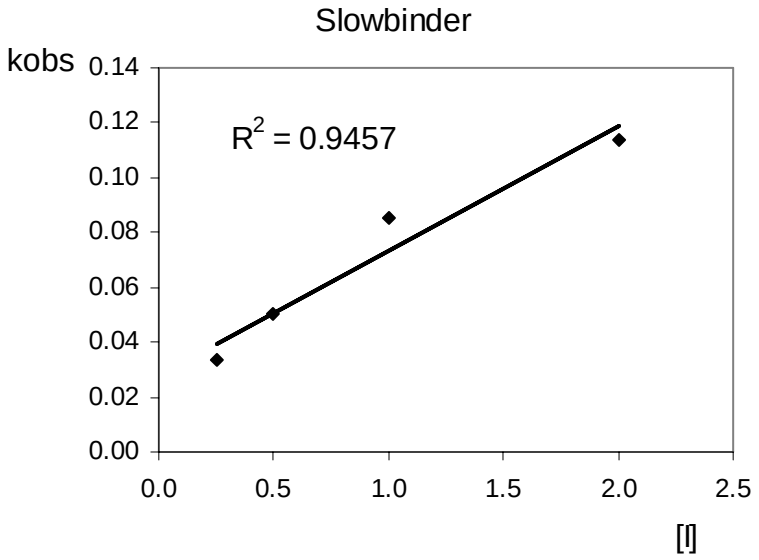
13.6 Annexe 6

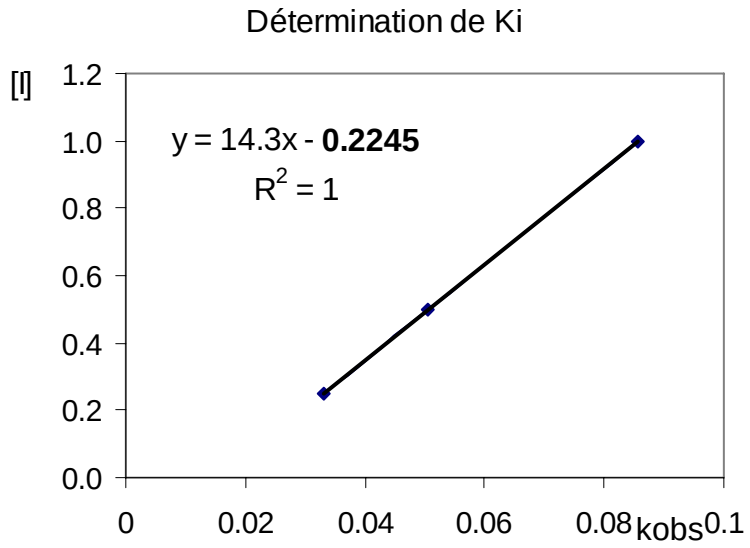
Détermination de K_I pour les composés dépendants du temps :

Composé **13**

Temps de préincubation [min]	**13** [mM]			
	0.25	0.5	1	2
30	0.303	0.194	0.086	0.060
	0.303	0.190	0.084	0.059
20	0.412	0.294	0.159	0.103
	0.411	0.303	0.161	0.104
15	0.462	0.389	0.228	0.168
	0.461	0.365	0.229	0.161
10	0.574	0.498	0.351	0.281
	0.575	0.469	0.350	0.266
5	0.658	0.650	0.542	0.525
	0.686	0.616	0.550	0.506
2	0.749	0.742	0.724	0.726
	0.744	0.751	0.721	0.732
k_{obs}	0.033	0.051	0.086	0.114
	Slow binder **K_I = 0.225 mM**			

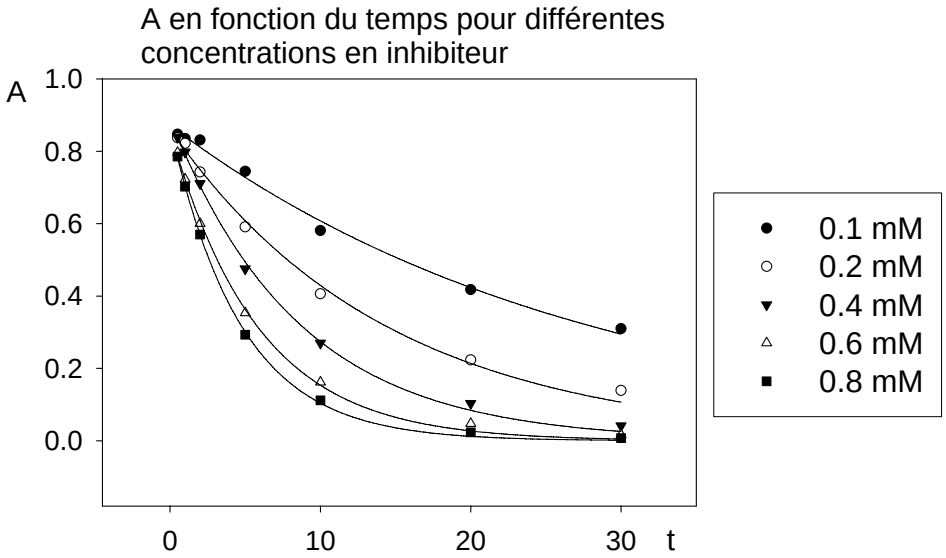


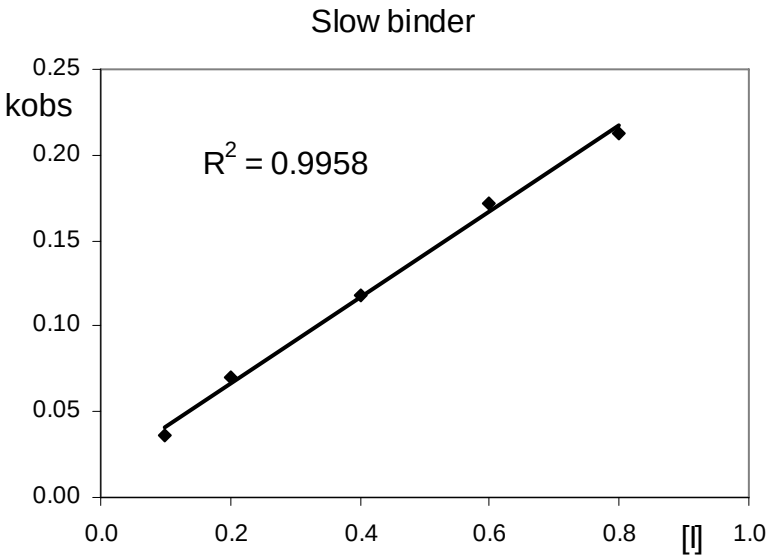

Slowbinder
kobs
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
R2 = 0.9457
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
[I]

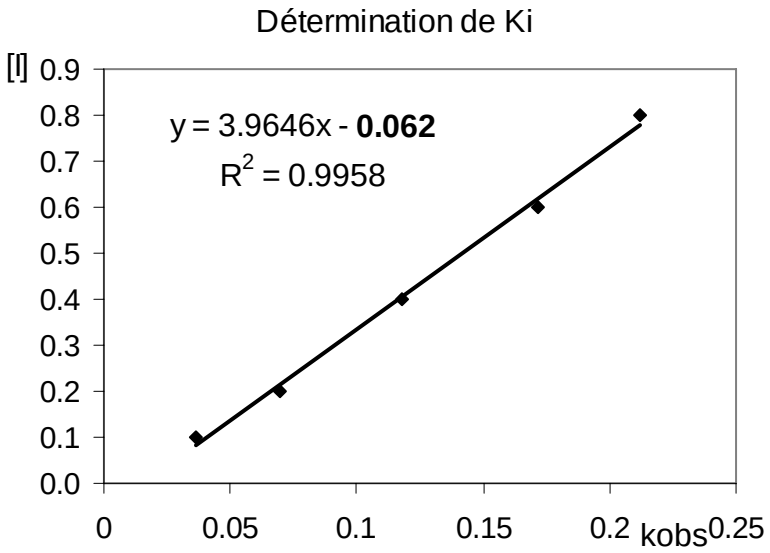

Détermination de Ki
[I]
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
y = 14.3x - 0.2245
R2 = 1
0
0.02
0.04
0.06
0.08
kobs
0.1

Composé **14**

Temps de préincubation [min]	**14** [mM]				
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
30	0.312	0.141	0.041	0.016	0.008
	0.308	0.137	0.042	0.017	0.007
20	0.429	0.224	0.103	0.047	0.025
	0.406	0.223	0.104	0.047	0.022
10	0.595	0.413	0.273	0.165	0.111
	0.566	0.400	0.267	0.159	0.113
5	0.727	0.591	0.474	0.346	0.296
	0.762	0.591	0.477	0.360	0.290
2	0.817	0.727	0.699	0.601	0.573
	0.845	0.758	0.723	0.599	0.567
1	0.835	0.827	0.793	0.719	0.700
	0.835	0.817	0.803	0.726	0.705
0.5	0.847	0.835	0.848	0.779	0.775
	0.847	0.840	0.831	0.813	0.795
k_{obs}	0.036	0.069	0.118	0.172	0.212
	Slow binder **K_I = 0.062 mM**				

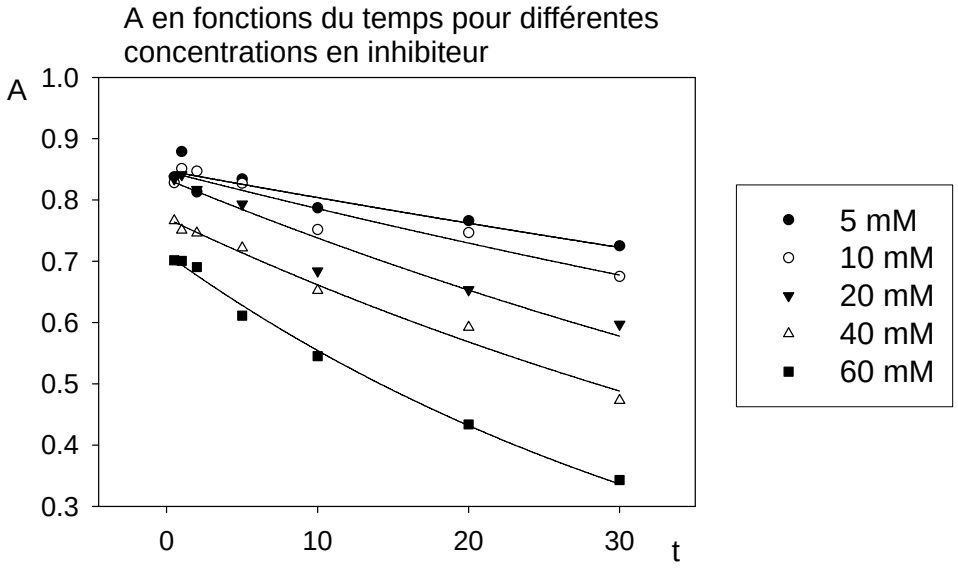


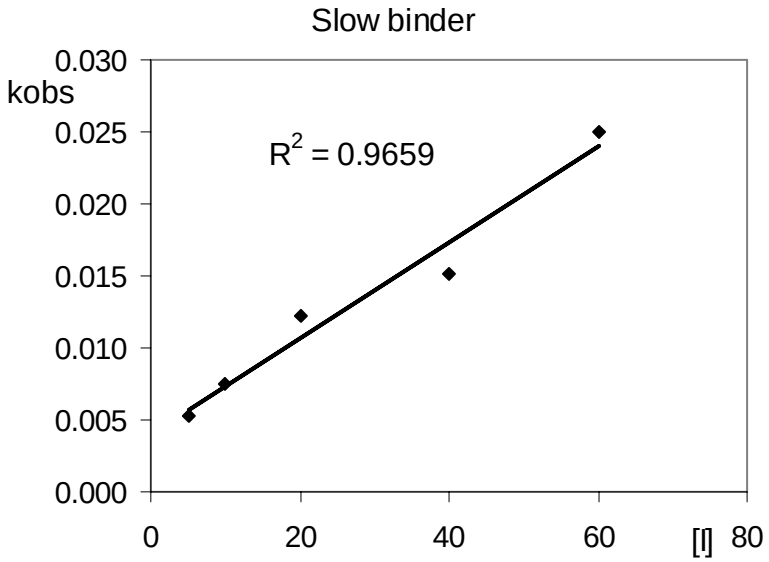

Slow binder
kobs
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
R^2 = 0.9958
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
[I]

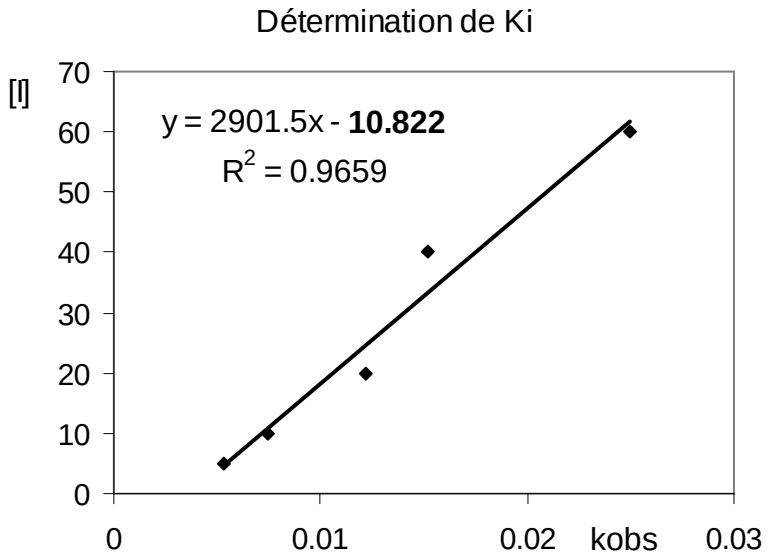

Détermination de Ki
[I]
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
y = 3.9646x - **0.062**
R^2 = 0.9958
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
kobs

Composé **15**

Temps de préincubation [min]	**15** [mM]				
	5	10	20	40	60
30	0.725	0.675	0.586	0.467	0.338
	0.725	0.675	0.608	0.478	0.348
20	0.766	0.739	0.665	0.592	0.435
	0.766	0.754	0.642	0.592	0.432
10	0.798	0.711	0.684	0.657	0.539
	0.776	0.792	0.684	0.647	0.551
5	0.830	0.802	0.792	0.716	0.619
	0.838	0.852	0.794	0.727	0.603
2	0.774	0.859	0.821	0.752	0.678
	0.852	0.835	0.813	0.740	0.703
1	0.893	0.866	0.842	0.748	0.694
	0.865	0.836	0.840	0.753	0.707
0.5	0.836	0.856	0.831	0.790	0.702
	0.839	0.800	0.838	0.742	0.701
k_{obs}	0.005	0.007	0.012	0.015	0.025
	Slow binder **K_I = 10.82 mM**				

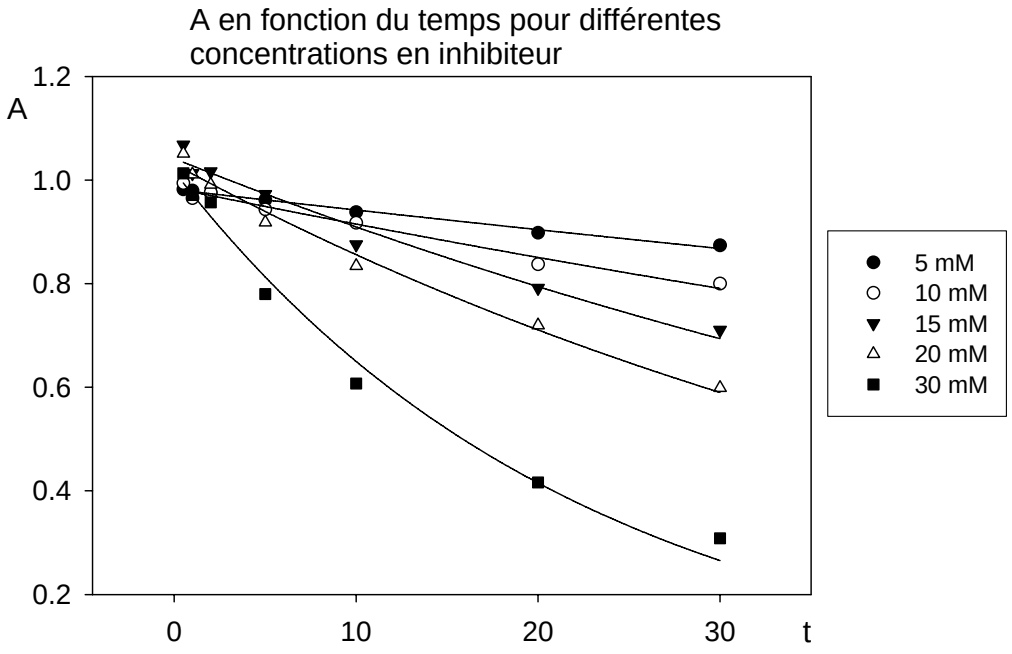


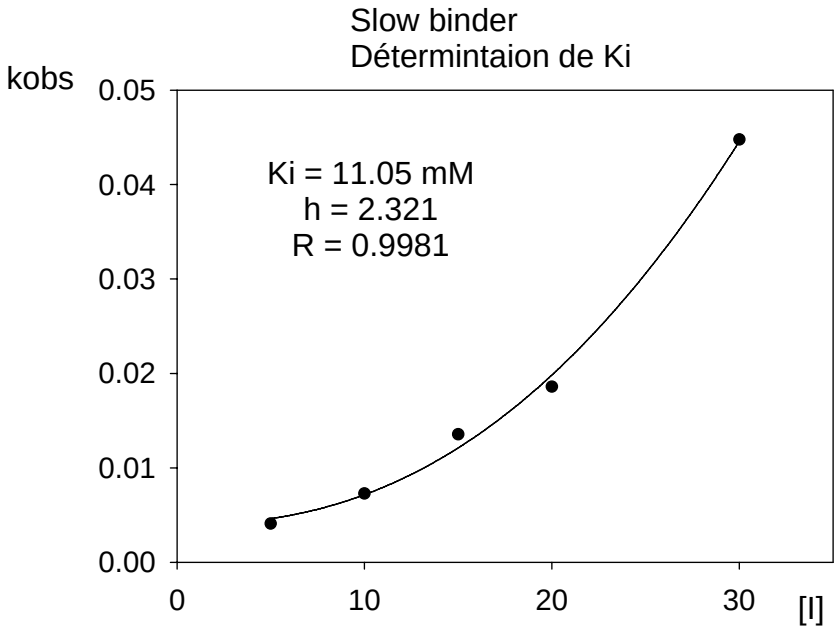

Slow binder
kobs
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
R^2 = 0.9659
0
20
40
60
[I]
80


Détermination de Ki
[I]
70
60
50
40
30
20
10
0
y = 2901.5x - **10.822**
R^2 = 0.9659
0
0.01
0.02
kobs
0.03

Composé **16**

Temps de préincubation [min]	**16** [mM]				
	5	10	15	20	30
30	0.872	0.800	0.710	0.593	0.305
	0.875	0.800	0.711	0.604	0.312
20	0.898	0.839	0.788	0.713	0.408
	0.898	0.836	0.795	0.726	0.425
10	0.936	0.906	0.862	0.833	0.611
	0.940	0.929	0.889	0.835	0.603
5	0.960	0.935	0.967	0.918	0.781
	0.963	0.951	0.978	0.918	0.779
2	0.964	0.976	1.008	0.999	0.963
	0.984	0.976	1.024	0.983	0.951
1	0.988	0.960	1.021	1.011	0.969
	0.971	0.970	1.005	1.011	0.973
0.5	0.971	0.973	1.068	1.028	0.994
	0.993	1.015	1.068	1.074	1.032
k_{obs}	$0.410 \cdot 10^{-2}$	$0.730 \cdot 10^{-2}$	$0.135 \cdot 10^{-1}$	$0.186 \cdot 10^{-1}$	$0.448 \cdot 10^{-1}$
	Slow binder **K_I = 11.05 mM** **h = 2.321**				



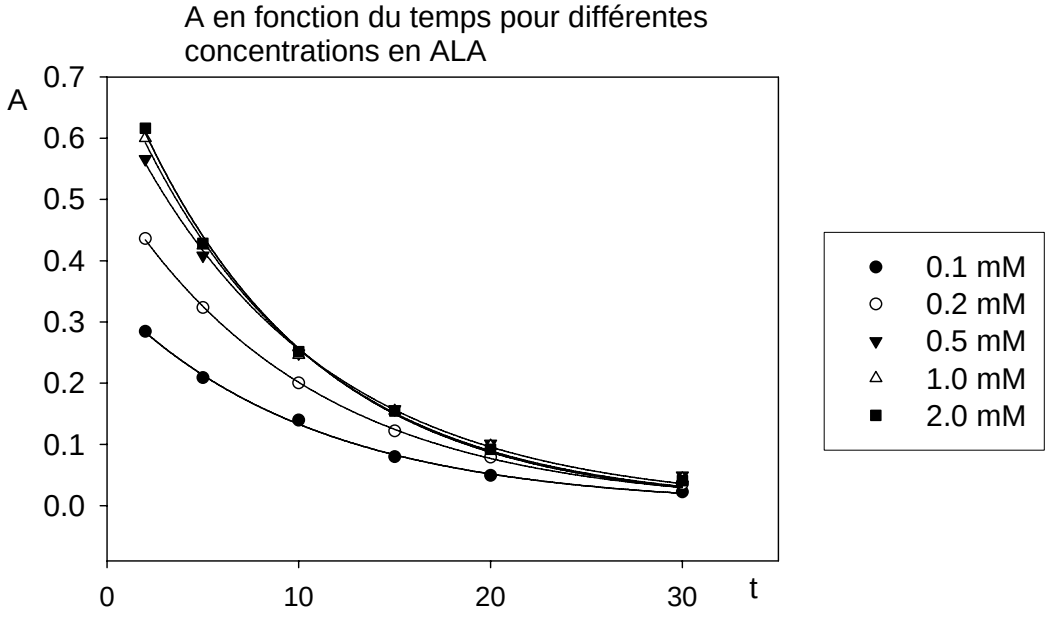

Slow binder
Détermintaion de Ki
kobs
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Ki = 11.05 mM
h = 2.321
R = 0.9981
0
10
20
30
[I]

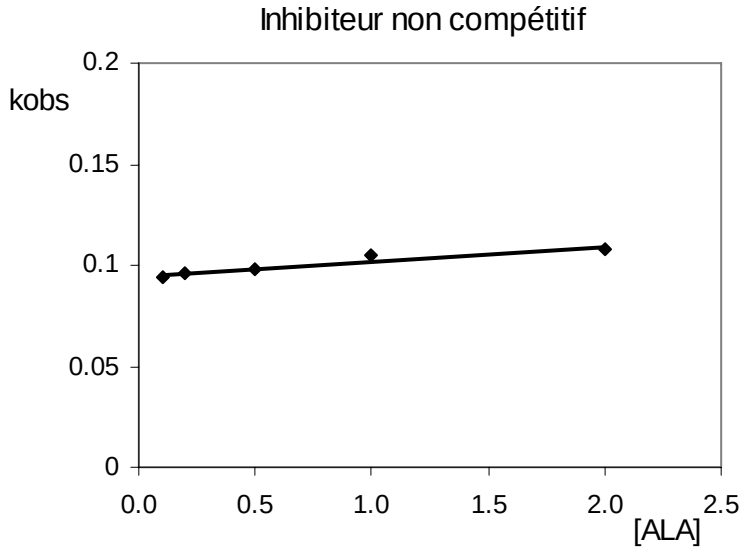
13.7 Annexe 7

Détermination du type d'inhibition pour les inhibiteurs dépendants du temps :

Composé **14**

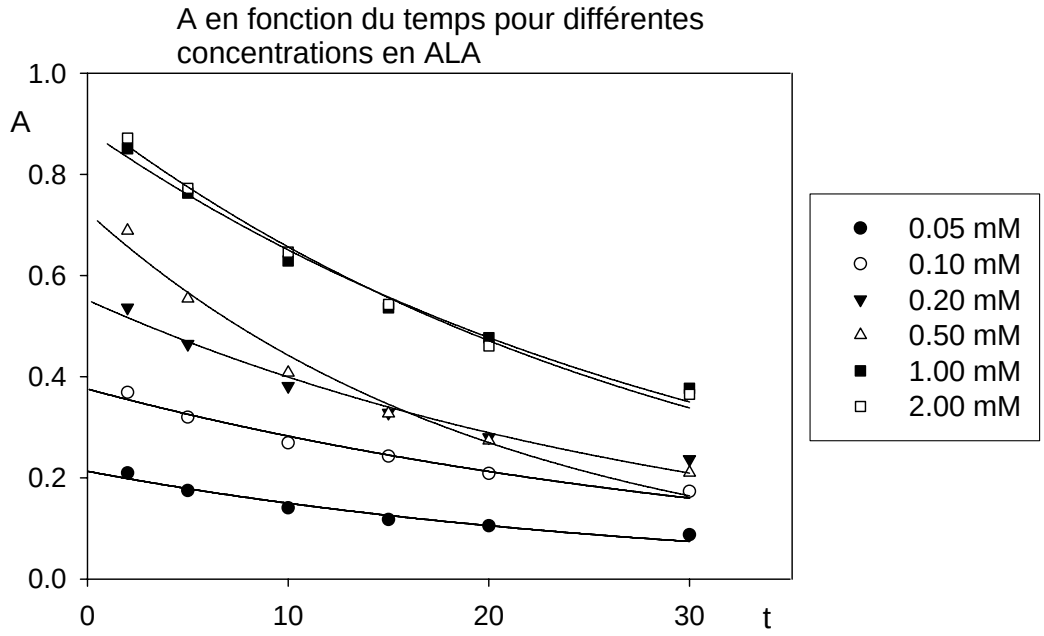
Temps de préincubation [min]	**14** : 0.4 mM				
	ALA [mM]				
	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
30	0.023	0.036	0.049	0.044	0.040
	0.022	0.035	0.048	0.044	0.042
20	0.049	0.078	0.098	0.098	0.091
	0.050	0.080	0.104	0.097	0.093
15	0.085	0.124	0.159	0.154	0.149
	0.075	0.120	0.156	0.155	0.160
10	0.161	0.197	0.245	0.247	0.247
	0.118	0.204	0.252	0.245	0.256
5	0.210	0.324	0.417	0.430	0.424
	0.208	0.323	0.400	0.419	0.433
2	0.291	0.438	0.557	0.588	0.610
	0.278	0.434	0.575	0.612	0.623
k_{obs}	$0.944 \cdot 10^{-1}$	$0.960 \cdot 10^{-1}$	$0.979 \cdot 10^{-1}$	$1.050 \cdot 10^{-1}$	$1.078 \cdot 10^{-1}$
	Type d'inhibition : non compétitif				

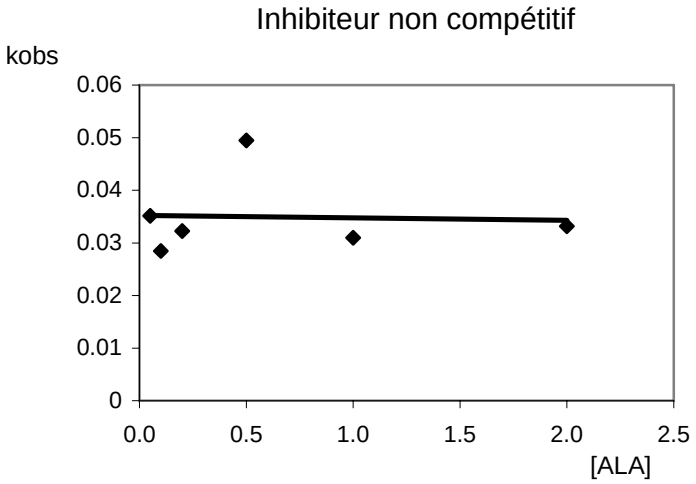



Inhibiteur non compétitif
kobs
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
[ALA]

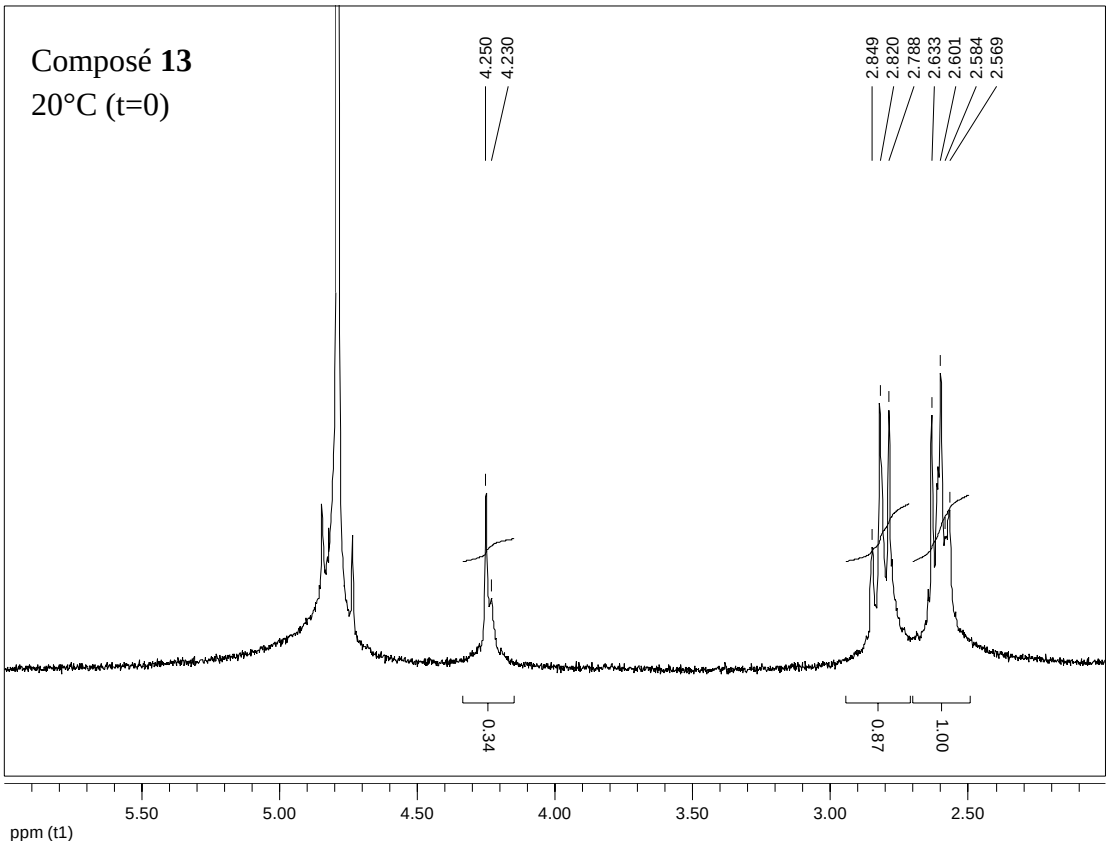
Composé **16**

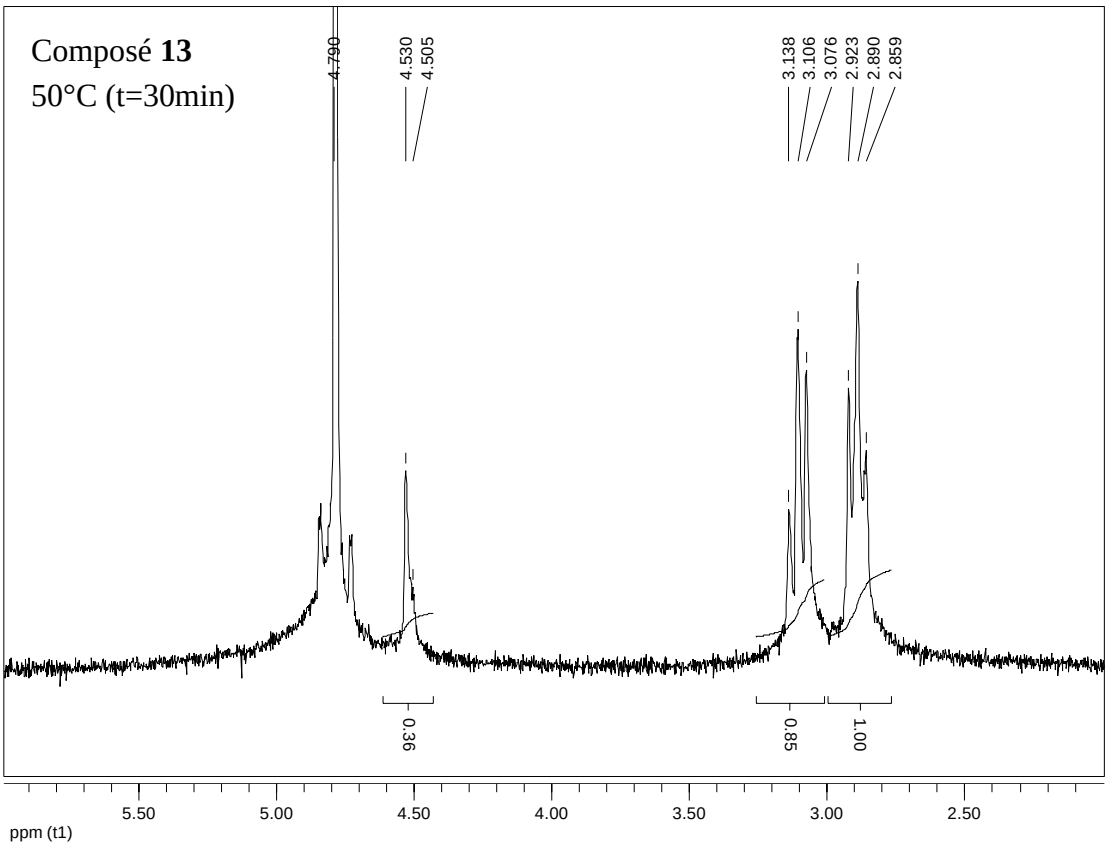
Temps de préincubation [min]	**16** : 30 mM					
	ALA [mM]					
	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2
30	0.088	0.175	0.165	0.210	0.388	0.361
	0.087	0.171	0.228	0.210	0.366	0.369
20	0.106	0.212	0.288	0.272	0.473	0.459
	0.104	0.205	0.272	0.275	0.481	0.462
15	0.115	0.242	0.326	0.332	0.547	0.539
	0.120	0.244	0.331	0.322	0.525	0.546
10	0.142	0.262	0.384	0.403	0.631	0.650
	0.139	0.276	0.379	0.412	0.627	0.642
5	0.175	0.318	0.461	0.554	0.758	0.774
	0.175	0.322	0.468	0.554	0.768	0.770
2	0.206	0.366	0.536	0.682	0.851	0.872
	0.213	0.372	0.537	0.695	0.851	0.871
k_{obs}	0.035	0.028	0.032	0.049	0.031	0.033
	Type d'inhibition : non compétitif					

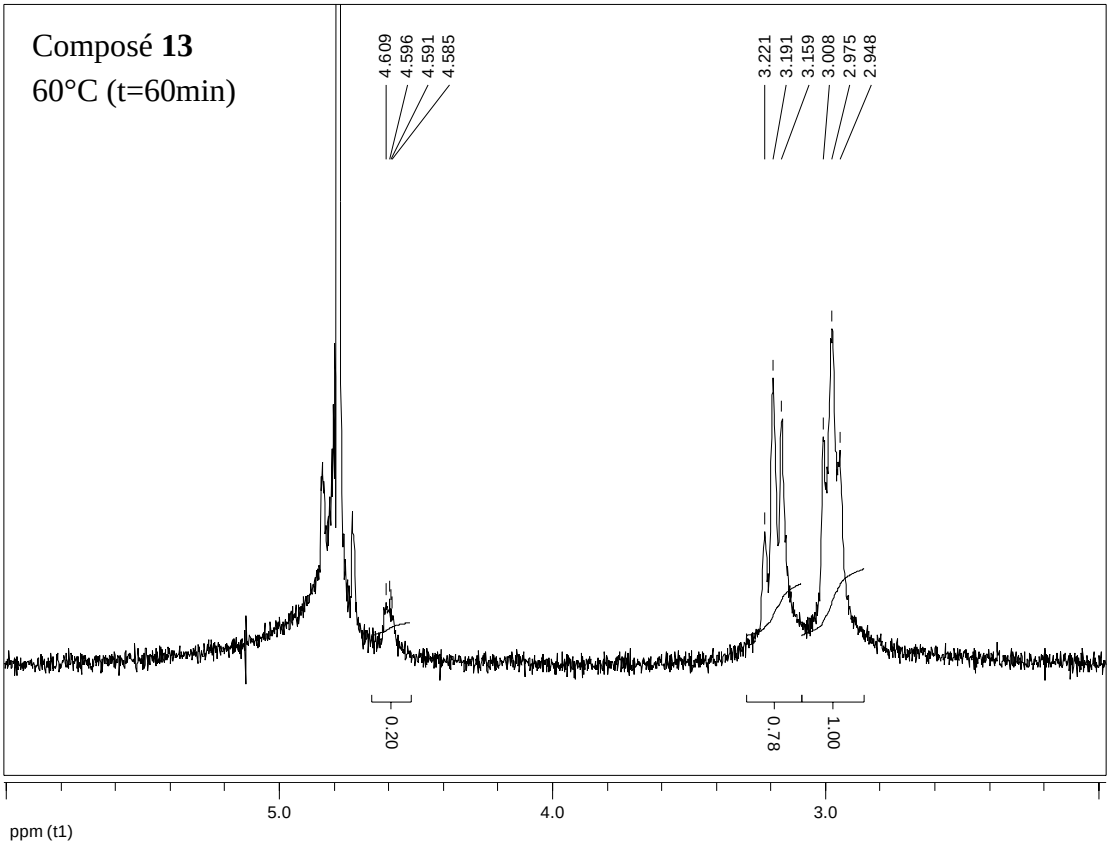


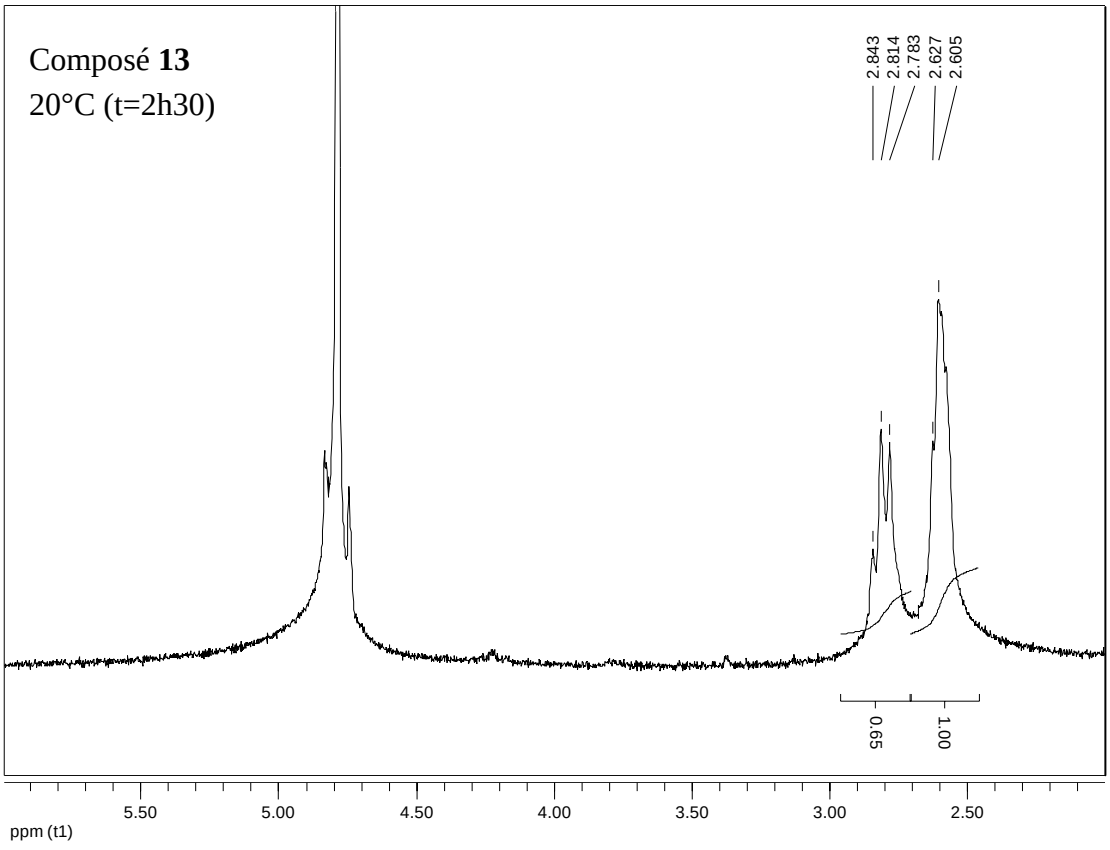

Inhibiteur non compétitif
kobs
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
[ALA]

13.8 Annexe 8


Composé **13**
20°C (t=0)
4.250
4.230
2.849
2.820
2.788
2.633
2.601
2.584
2.569
0.34
0.87
1.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
ppm (t1)


Composé **13**
50°C (t=30min)
4.790
4.530
4.505
3.138
3.106
3.076
2.923
2.890
2.859
0.36
0.85
1.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
ppm (t1)


Composé **13**
60°C (t=60min)
4.609
4.596
4.591
4.585
3.221
3.191
3.159
3.008
2.975
2.948
0.20
0.78
1.00
5.0
4.0
3.0
ppm (t1)


Composé **13**
20°C (t=2h30)
2.843
2.814
2.783
2.627
2.605
0.65
1.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
ppm (t1)

14 Bibliographie

[1] A.R. Battersby, *Science* **1994**, *264*, 1551.
[2] A.R. Battersby, K. Frobel, *Chemie in Unserer Zeit* **1982**, *16*, 124.
[3] F.J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* **1989**, *6*, 171.
[4] N.A. Carroll, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 425.
[5] A. Kappas, S. Sassa, R.A. Galbraith, Y. Nordmann, in *'The Porphyrias'*, J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredickson: New York, **1981**.
[6] K.B.G. Torssell, in *'Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach'*: Stockholm, **1997**, pp. 416.
[7] L.R. Milgrom, in *'The colour of life'*, Ed.: Oxford University Press: New York, **1997**, pp. 1.
[8] I. Fleming, in *'Selected Organic Syntheses'*, J. Wiley & Sons: London, **1973**.
[9] W.S. Johnson, *Accounts Chem. Res.* **1968**, *1*, 1.
[10] W.S. Johnson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 9.
[11] E.E. van Tamelen, *Accounts Chem. Res.* **1975**, *5*, 51.
[12] C. Soldermann-Pissot, PhD thesis, Université de Neuchâtel (Neuchâtel), **2002**.
[13] P.M. Jordan, in *'Biosynthesis of Tetrapyrolles'*, Ed.: P.M. Jordan, Elsevier: London, **1991**, p. 1.
[14] B. Franck, H. Stratman, *Heterocycles* **1981**, *15*, 919.
[15] A.I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, *Trans. N.Y. Acad Sci.* **1973**, *35*, 72.
[16] A.R. Butler, S. George, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7879.
[17] H. Fischer, in *'Organic Synthesis coll'*, Jonh Wiley & Sons: New York, **1943**, Vol. II, pp. 202.
[18] A. Gossauer, in *'Die Chemie der Pyrrole'*, Springer-Verlag: Berlin, **1974**.
[19] D.L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1236.
[20] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 240.
[21] K.D. Gibson, A. Neuberger, J.J. Scott, *Biochem. J.* **1955**, *61*, 618.
[22] J.G. Wetmur, D.F. Bishop, C. Cantelmo, R.J. Desnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 7703.
[23] T.R. Bishop, L.P. Frelin, S.H. Boyer, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 10115.
[24] A.M. Myers, M.D. Crivellone, T.J. Koener, A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16822.
[25] Y. Echelard, J. Dymertyszyn, M. Drolet, A. Sasarman, *Mol. Gen. Genet.* **1988**, *214*, 503.
[26] N. Frankenberg, T. Kittel, C. Hungerer, U. Römling, D. Jahn, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, *257*, 485.
[27] J.M. Li, C.S. Russell, S.D. Cosloy, *Gene* **1989**, *75*, 177.
[28] E.K. Jaffe, *Comments Inorg. Chem.* **1993**, *15*, 67.
[29] A.M. Cheh, J.B. Neilands, in *'Structure and bonding'*, **1976**, p. 123.
[30] H.W. Wen, D. Shemin, K.E. Richards, R.C. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **1974**, *71*, 1767.
[31] P.M. Anderson, R.J., Desnick, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6924.
[32] P.N.B. Gibbs, A.-G. Chaudhry, P.M. Jordan, *Biochem. J.* **1985**, *230*, 25.
[33] L.M. Borralho, C.H.D. Ortiz, A.D. Panek, J.R. Mattoon, *Yeast* **1990**, *6*, 319.
[34] P.M. Jordan, in *'Biosynthesis of Heme and Chlorophylls'*, Ed.: H.A. Dailey, McGraw-Hill: New-York, **1990**, p. 55.

[35] W. Liedgens, C. Lutz, H.A.W. Schneider, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *135*, 75.
[36] D. Shemin, *Method. Enzymol.* **1970**, *XVII Part A*, 205.
[37] D. Shemin, in *'The Enzymes'*, Ed.: P.D. Boyer, Academic Press: San Diego, **1972**, Vol. 7, p. 232.
[38] I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *570*, 167.
[39] R.M. Petrovich, S. Litwin, E.K. Jaffe, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8692.
[40] L.W. Mitchell, E.K. Jaffe, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 169.
[41] N. Frankenberg, P.T. Erskine. J.B. Cooper, P.M. Shoolingin-Jordan, D. Jahn, D.W. Heinz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 591.
[42] P.T. Erskine, N. Senior, S. Awan, R. Lambert, G. Lewis, I.J. Tickle, M. Sarwar, P. Spencer, P. Thomas, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, S.P. Wood, J.B. Cooper, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 1025.
[43] P.T. Erskine, R. Newbold, A.A. Brindley, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, M.J. Warren, *J. Mol. Biol.* **2001**, *312*, 133.
[44] P.T. Erskine, E. Norton, J.B. Cooper, R. Lambert, A. Coker, G. Lewis, P. Spencer, M. Sarwar, S.P. Wood, M.J. Warren, P.M. Schoolingin-Jordan, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4266.
[45] J. Kervinen, E.K. Jaffe, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodawer, A. Zdanov, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8227.
[46] F. Frere, W.-D. Schubert, F. Stauffer, N. Frankenberg, R. Neier, D. Jahn, D.W. Heinz, *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 237.
[47] N.L. Mills-Davies, PhD thesis, University of Southampton (Southampton), **2000**.
[48] L. Coates, G. Beaven, P.T. Erskine, S.I. Beale, Y.J. Avissar, R. Gill, F. Mohammed, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, J.B. Cooper, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 563.
[49] E.K. Jaffe, A. Shafinaz, L.W. Mitchell, K.M. Taylor, M. Volin, G.D. Markham, *Biochemistry* **1995**, *34*, 244.
[50] E.K. Jaffe, *J. Bioenerg. and Biomembr.* **1995**, *27*, 169.
[51] P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem. J.* **1994**, *300*, 373.
[52] I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Int. J. Biochem.* **1980**, *12*, 751.
[53] M.J. Warren, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, *TIBS* **1998**, *23*, 217.
[54] E.K. Jaffe, S. Balga, P.A. Michini, *Biol. Trace Element Res.* **1991**, *28*, 223.
[55] D.W. Banner, A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D.C: Philipps, C.I. Pogson, I.A. Wilson, *Nature* **1975**, *255*, 609.
[56] C. Branden, J. Tooze, in *'Introduction à la structure des protéines'*, Ed.: D.B. Université: Paris, **1991**, p. 43.
[57] E. Homberger-Zizzari, PhD thesis, Université de Neuchâtel (Neuchâtel), **2002**.
[58] D. Shemin, *Phil. Trans. R. Lond. section B* **1976**, *273*, 109.
[59] A.M. Del, C. Battle, A.M. Stella, *Int. J. Biochem.* **1978**, *9*, 861.
[60] N. Frankenberg, D.W. Heinz, D. Jahn, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13968.
[61] B.V. Plapp, in *'Methods in Enzymology'*, Ed.: D.L. Purich, Academic Press: San Diego, **1995**, p. 91.
[62] E. Norton, M. Sarwar, P.M. Shoolinggin-Jordan, *Biochem. Soc. Tr.* **1998**, *26*, S285.
[63] E.K. Jaffe, M. Volin, C.B. Myers, W.R. Abrams, *Biochemistry* **1994**, *33*, 11554.
[64] D.L. Nandi, *Z. Naturforsch. Sect. C* **1978**, *33*, 799.
[65] E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochem.* **1987**, *26*, 4258.
[66] E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochem.* **1988**, *27*, 4475.
[67] E.K. Jaffe, G.D. Markham, J.S. Rajadopalan, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8345.
[68] E.K. Jaffe, D. Hanes, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9348.
[69] N.M. Senior, K. Brocklehurst, J.B. Cooper, S.P. Wood, P. Erskine, P.M. Shoolingin-Jordan, P.G. Thomas, M.J. Warren, *Biochem. J.* **1996**, *320*, 401.

[70] P.T. Erskine, R. Newbold, J. Roper, A. Coker, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan S.P. Wood, J.B. Cooper, *Protein Science* **1999**, *8*, 1250.
[71] A.J. Dent, D. Beyersmann, C. Block, S.S. Hasnain, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7822.
[72] E.K. Jaffe, *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 25.
[73] D. Shemin, *J. Biochem. (Tokyo)* **1976**, *79*, 37P.
[74] L.W. Mitchell, M. Volin, K. Jaffe E., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24054.
[75] P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem. J.* **1995**, *305*, 151.
[76] N. Frankenberg, D. Jahn, E.K. Jaffe, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13976.
[77] F. Frère, H. Reents, W.-D. Schubert, D.W. Heinz, D. Jahn, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1059.
[78] S. Chauhan, M.R. O'Brian, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19823.
[79] C.E. Goodwin, F.J. Leeper, *Organic & biomolecular chemistry* **2003**, *1*, 1443.
[80] E.K. Jaffe, *Acta Cryst.* **2000**, *D56*, 115.
[81] R. Lüönd, J. Walker, R. Neier, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5005.
[82] R. Lüönd, PhD thesis, Université de Fribourg (Fribourg), **1991**.
[83] M.E. Henz, PhD thesis, Université de Neuchâtel (Neuchâtel), **1997**.
[84] F. Stauffer, E. Zizzari, C. Soldermann-Pissot, J.-P. Faurite, R. Neier, *Chimia* **2001**, *55*, 314.
[85] P.T. Erskine, L. Coates, R. Newbold, A.A. Brindley, F. Stauffer, S.P. Wood, M.J. Warren, J.B. Cooper, P.M. Shooling-Jordan, R. Neier, *FEBS Letters* **2001**, *503*, 196.
[86] E.K. Jaffe, J. Kervinen, J. Martins, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodawer, A. Zdanov, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19792.
[87] J. Kervinen, E.K. Jaffe, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodawer, A. Zdanov, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8227.
[88] C. Jarret, F. Stauffer, M.E. Henz, M. Marty, R.M. Luond, J. Bobalova, P. Schurmann, R. Neier, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 185.
[89] J. Kervinen, E.K. Jaffe, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodaver, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8227.
[90] P.T. Erskine, L. Coates, D. Butler, J.H. Youell, A.A. Brindley, S.P. Wood, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, J.B. Cooper, *Biochem. J.* **2003**, *373*, 733.
[91] S. Breinig, J. Kervinen, L. Stith, A.S. Wasson, R. Fairman, A. Wlodawer, A. Zdanov, E.K. Jaffe, *Nature Struct. Biol.* **2003**, *10*, 757.
[92] J. Kervinen, R.L.J. Dunbrack, S. Litwin, J. Martins, R.C. Scarrow, M. Volin, A.T. Yeung, E. Yoon, K. Jaffe E., *Biochemistry* **2000**, *39*, 9018.
[93] D. Shemin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 1383.
[94] L. Tang, L. Stith, K. Jaffe E., *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15786.
[95] D.W. Bollivar, C. Clauson, R. Lighthall, S. Forbes, B. Kokona, R. Fairman, L. Kundrat, K. Jaffe E., *BMC Biochemistry* **2004**, *5*.
[96] E.K. Jaffe, *Bioorganic Chemistry* **2004**, *32*, 316.
[97] F. Stauffer, E. Zizzari, C. Engeloch-Jarret, J.-P. Faurite, J. Bobalova, R. Neier, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 343.
[98] J.E. Baldwin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 734.
[99] A.G. Chaudhry, P.M. Jordan, *Biochem. Soc. T.* **1976**, *4*, 760.
[100] L. Stryer, in *'Biochemistry'*, Ed.: W.H. Freeman & Company: New York, **1995**.
[101] M. Michaelis, M.L. Menten, *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333.
[102] G.E. Briggs, J.B.S. Haldane, *Biochem. J.* **1925**, *19*, 338.
[103] A. Cornish-Bowden, in *'Enzyme Kinetics'*, Ed.: IRL PRESS: Oxford, **1988**.
[104] I.H. Segel, in *'Enzyme Kinetics'*, Ed.: Wiley, John & Sons, **1993**.
[105] L.H. Easson, E. Stedman, *Proc. R. Soc. London* **1936**, *127*, 142.
[106] J.F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *185*, 269.

[107] S. Cha, I. Scott, *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *24*, 2177.
[108] J.F. Morrison, C. T. Walsh, in *'Advances in enzymology'*, John Wiley & Sons: New-York, **1988**, p. 201.
[109] R.A. Copeland, in *'Enzymes, a pratical introduction to structure, mechanism and data analysis'*, Wiley-VCH: New York, **2000**, pp. 237.
[110] J.F. Morrison, *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 102.
[111] W.-X. Tsian, C.-L. Tsou, *BIochemistry* **1982**, *21*, 1028.
[112] S. Granick, D. Mauzerall, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1119.
[113] C. Engeloch-Jarret, PhD thesis, Université de Neuchâtel (Neuchâtel), **1999**.
[114] H. Bertschy, PhD thesis, Université de Fribourg, **1991**.
[115] Y. Berger, PhD thesis, Université de Neuchâtel, **2002**.
[116] C. Soldermann-Pissot, PhD thesis, Université de Neuchâtel, **2002**.
[117] L. Cottier, G. Descotes, L. Eymard, K. Rapp, *Synthesis* **1995**, 303.
[118] A.P. Marchand, G.M. Reddy, *Synthesis* **1991**, 198.
[119] C. Bernasconi, L. Cottier, G. Descotes, H. Nigay, J.C. Pardon, A. Wisniewski, *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1984**, 323.
[120] D.F. Taber, T.E. Christos, T.D. Neubert, D. Batra, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9673.
[121] Y. Rong, A.E. Ruoho, *Synthetic Commun.* **1999**, *29*, 2155.
[122] E. Fischer, K. Raske, *Ber.* **1909**, *42*, 1465.
[123] E. Fischer, B. Helferich, *Ann.* **1911**, *381*, 123.
[124] G.A. Molander, J.A. McKie, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 872.
[125] I.W. Still, W. Daoquan, *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **1991**, *62*, 83.
[126] T.W. Greene, P.G. Wuts, in *'Protective groups in organic synthesis'*, Ed.: J.W. sons, **1991**, p. 309.
[127] M. Bodanszky, in *'Peptide chemistry'*, Ed.: Springer-Verlag, **1993**, p. 74.
[128] F. Bottino, M. Di Grazia, P. Finocchiaro, F.R. Fronczek, A. Mamo, S. Pappalardo, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3521.
[129] G. Lee, M. Oka, H. Takemura, Y. Miyahara, N. Shimizu, T. Inazu, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8304.
[130] G. Jia, Z. Lim, Y. Zhang, *Heteroatom Chemistry* **1998**, *9*, 341.
[131] H. Shirai, N. Oda, *Bull. Nagoya City Univ. Pharm. School* **1954**, *No. 2*, 42.
[132] Y. Tsuzuki, K. Chiba, K. Mizuno, K. Tomita, K. Suzuki, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2989.
[133] D.L. Boger, R.P. Schaum, R.M. Garbaccio, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6329.
[134] P. Bey, C. Danzin, V. Van Dorsselaer, P. Mamont, M. Jung, C. Tardif, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 50.
[135] I. Lazar, *Synthetic Commun.* **1995**, *25*, 3181.
[136] E. Fischer, W. Livschitz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1915**, *48*, 360.
[137] R. Schönheimer, *Z. Physiol. Chem.* **1926**, *154*, 203.
[138] V. du Vigneaud, O.K. Behrens, *J. Biol. Chem.* **1937**, *117*, 27.
[139] A.G. Schultz, P.J. McCloskey, J.J. Court, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6493.
[140] N. Yamazaki, C. Kibayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1396.
[141] J. Kovacs, U.R. Ghatak, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 119.
[142] P.J. Kocienski, in *'Protecting groups'*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart-New York, **1994**, pp. 212.
[143] C.H. Heathcock, T.A. Blumenkopf, K.M. Smith, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1548.
[144] A.B. Smith, III, T.A. Rano, N. Chida, G.A. Sulikowski, J.L. Wood, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8008.
[145] J. Cossy, M. Cases, D.G. Pardo, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6153.
[146] W.D. Closson, S. Ji, S. Schulenberg, *J. Am. Chem. Soc* **1970**, *92*, 650.

[147] W.D. Closson, P.A. Wriede, S. Bank, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1581.
[148] N.D. Scott, J.F. Walker, V.L. Hansley, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 2442.
[149] S. Ji, L.B. Gortler, A. Waring, A.J. Battisti, S. Bank, W.D. Closson, P.A. Wriede, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5311.
[150] A.J. Birch, H. Smith, *Quart. Rev. (London)* **1958**, *12*, 17.
[151] E.H. Gold, E. Babad, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2208.
[152] P.J. Kocienski, in *'Protecting Groups'*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart-New York, **1994**, pp. 155.
[153] T. Tsunoda, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1357.
[154] D.S. Dood, A.C. Oehlschlager, N.H. Georgopapadakou, A.-M. Polak, P.G. Hartmann, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7227.
[155] D.S. Dood, A.C. Oehlschlager, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2794.
[156] W.R. McKay, G.R. Proctor, *J. Chem. Soc., Perk. T. 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1981**, 2443.
[157] J. Machin, D.M. Smith, *J. Chem.Soc., Perk. T. 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1979**, 1371.
[158] N. Frankenberg, D.W. Heinz, D. Janh, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13968.
[159] Y. Miyahara, *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, *16*, 1147.
[160] J. Nakayama, K. Yoshimura, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2709.
[161] M. Madesclaire, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5459.
[162] C. Märcker, *Ann.* **1865**, *136*, 75.
[163] L.N. Lewin, *J. Prakt. Chem.* **1928**, *118*, 282.
[164] L.N. Lewin, *J. Prakt. Chem.* **1928**, *119*, 211.
[165] L.N. Lewin, *J. Prakt. Chem.* **1930**, *127*, 77.
[166] L.N. Lewin, J. Tschulkoff, *J. Prakt. Chem.* **1930**, *128*, 171.
[167] P. Brougham, M.S. Cooper, D.A. Cummerson, H. Heaney, N. Thompson, *Synthesis* **1987**, 1015.
[168] N.A. Meanwell, M.J. Rosenfeld, J.J.K. Wright, C.L. Brassard, J.O. Buchanan, M.E. Federici, J.S. Fleming, S.M. Seiler, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 389.
[169] P.B. Jones, N.M. Parrish, T.A. Houston, A. Stapon, N.P. Bansal, J.D. Dick, C.A. Townsend, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3304.
[170] R.V. Hoffman, H.-O. Kim, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5107.
[171] A.-M. Faucher, P.W. White, C. Brochu, C. Grand-Maître, J. Rancourt, G. Fazal, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 18.
[172] D.A. Evans, T.C. Britton, J.A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6141.
[173] D.A. Evans, K.T. Chapman, J. Bisaha, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1238.
[174] D.S. Kemp, T.P. Curran, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4931.
[175] P.F. Schuda, J.L. Phillips, T.M. Morgan, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2742.
[176] F. Stauffer, PhD thesis, Université de Neuchâtel (Neuchâtel), **2000**.
[177] C. Jarret, PhD thesis, University of Neuchâtel (Neuchâtel), **1999**.
[178] K.M. Cheung, P. Spencer, M.P. Timko, P.M. Shoolingin-Jordan, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1148.
[179] P.T. Erskine, L. Coates, R. Newbold, A.A. Brindley, F. Stauffer, G.D.E. Beaven, R. Gill, A. Coker, S.P. Wood, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, R. Neier, J.B. Cooper, *Acta Cryst.* **2005**, *D61*, 1222.
[180] R.M. Petrovich, K. Jaffe E., *Biochemistry* **1997**, *36*, 13421.
[181] F. Frere, H. Reents, W.-D. Schubert, D.W. Heinz, D. Jahn, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1059.

[182] N.L. Mills-Davies, D. Thompson, J.B. Cooper, P.M. Shoolingin-Jordan, *Crystal structure of native human erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase* **2000**, RCSB Protein Data Bank; PDB Id: 1e51.
[183] P.N.B. Gibbs, P.M. Jordan, *Biochem. J.* **1986**, *236*, 447.
[184] R. Neier, *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, *37*, 487.
[185] N. Collaborative Computational Project, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1994**, *50*, 760.
[186] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, *53 (Pt3)*, 240.
[187] A. Perrakis, R. Morris, V.S. Lamzin, *Nature Struct. Biol.* **1999**, *6*, 458.
[188] T.A. Jones, J.-Y. Zou, S.W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr A Foundations of Crystallography* **1991**, *47*, 110.
[189] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26 (Pt 2)*, 283.
[190] R.W. Hooft, G. Vriend, C. Sander, E.E. Abola, *Nature* **1996**, *381*, 272.
[191] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, *Protein Eng* **1995**, *8*, 127.
[192] A.T. Brünger, *Nature* **1992**, *355*, 472.
[193] P.T. Erskine, N. Senior, S. Maignan, J. Cooper, R. Lambert, G. Lewis, P. Spencer, S. Awan, M. Warren, I.J. Tickle, P. Thomas, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, *Protein Science* **1997**, *6*, 1774.
[194] P.T. Erskine, E.M.H. Duke, I.J. Tickle, N.M. Senior, M.J. Warren, J.B. Cooper, *Acta Crystallogr., section D* **2000**, *56*, 421.