

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES

**PORPHOBILINOGENE SYNTHASE  
(PBGs) *D'ESCHERICHIA COLI*:**

**ETUDES CINETIQUES  
ET RAYONS X**

**DEUX OUTILS PERMETTANT LA  
CARACTERISATION DU SITE  
ACTIF ET LA DETERMINATION  
DU MECANISME ENZYMATIQUE**

Thèse  
présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel  
pour l'obtention du grade de docteur ès Sciences  
par

**Eleonora Homberger-Zizzari**

de BULLE (FR)  
Chimiste diplômée de l'Université de Fribourg  
Mai 2002

Ce travail de thèse a été effectué d'avril 1998 à mai 2002 à l'institut de chimie de l'université de Neuchâtel dans le groupe du professeur Reinhard Neier. Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements pour l'opportunité offerte de travailler à l'interface de la chimie et la biochimie ainsi que pour la grande liberté de travail obtenue.

Je tiens également à remercier le professeur Peter Schürmann d'avoir mis à ma disposition ses laboratoires pour effectuer toutes les manipulations biochimiques nécessaires à ce travail de thèse, pour sa grande disponibilité, pour avoir corrigé mon manuscrit ainsi que pour avoir participé au jury de thèse.

Un grand merci également au professeur Gerd Folkers, de l'ETHZ, qui a pris part au jury de thèse.

Je remercie également le docteur Yves Balmer et Wanda Manieri pour leur grande disponibilité et pour tous les conseils donnés durant les manipulations biochimiques.

Je tiens aussi à remercier madame Moret, de l'institut de mathématique, qui a effectué les régressions non linéaires.

Je remercie tous les étudiants de deuxième année en chimie et en pharmacie qui ont assisté aux exercices de chimie organique II (travail d'assistantat pendant 4 ans).

Merci aux membres du groupe : Dr. Christiane Bobilier-Neier, Dr. Caroline Engeloeh-Jarret, Dr. Frédéric Stauffer, Dr. Alain Greppi, Dr. Klaus Neuschütz, Dr. Pavel Bopal, Dr. Janette Bobal'ova, Dr. Elena Cires, Dr. Jean-Mary Simone, Dr. Jean-Philippe Roblin, Dr. Jörg Velker, Dr. Olivier Siri, Dr. Carole Soldermann, Dr. Nicolas Soldermann, Jean-Philippe Faurite, Michael Schmid, Olivier Vallat, Yann Berger, Sébastien Lanaspèze, Anne Bourry, Valentina Aureggi et Valeria Botomei.

Enfin je tiens à remercier tout particulièrement toute ma famille qui m'a soutenu moralement et financièrement durant toutes mes études.

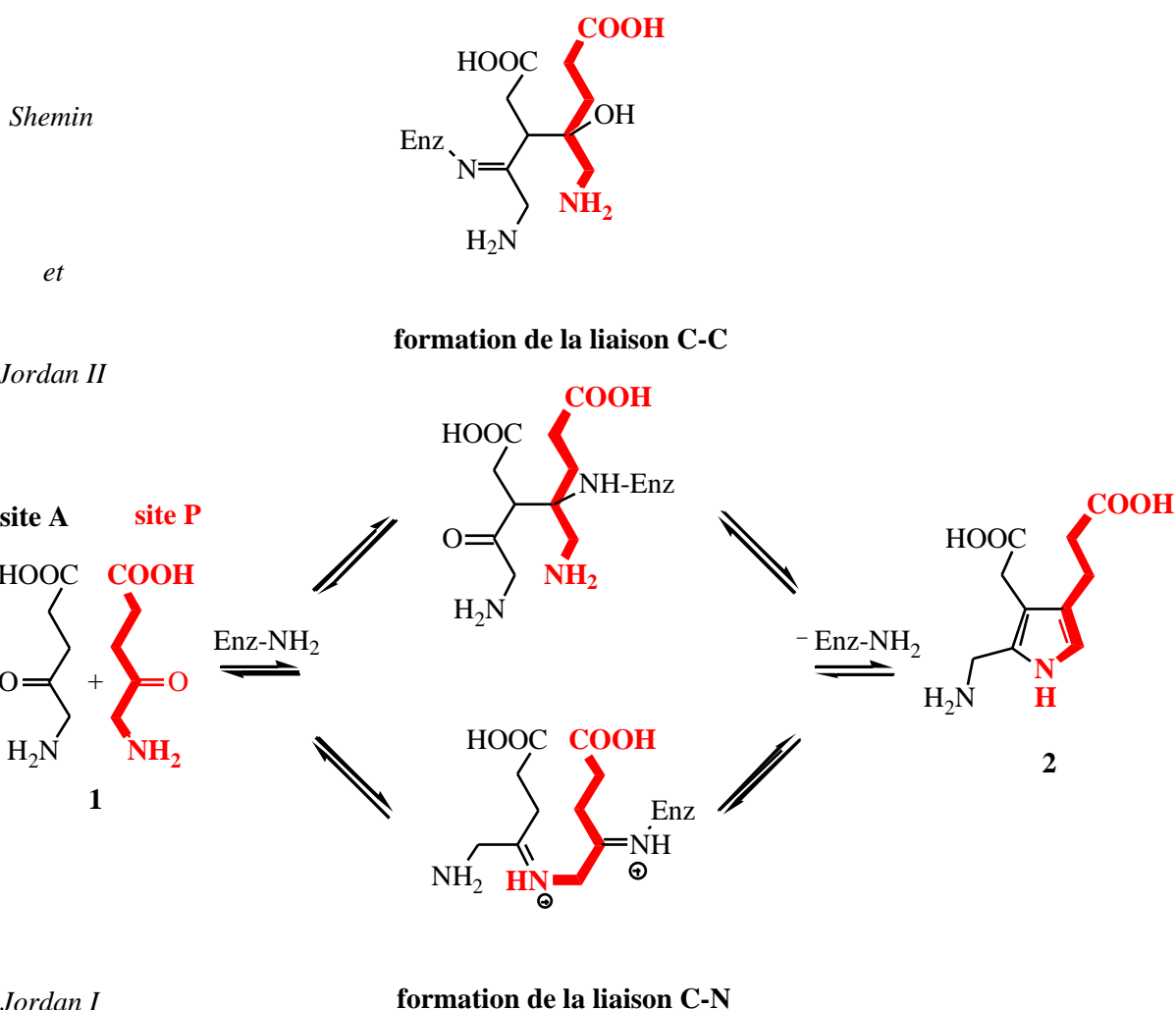
Ce travail a été soutenu financièrement par l'état de Neuchâtel.

*There may be many interpretations, but only one truth.*

*K. B. G. Torssell*

## Résumé

Le but de ce travail de thèse consistait à fournir de nouvelles informations afin d'étudier le mécanisme enzymatique proposé pour la transformation de deux molécules d'acide aminolévulinique (**1**) en porphobilinogène (**2**). Cette réaction est catalysée par une enzyme, la porphobilinogène synthase (PBGS, EC 4.2.1.24), qui est la deuxième enzyme impliquée dans la biosynthèse des composés tétrapyrroliques comme l'hème, la chlorophylle, etc. Trois mécanismes, abrégés *Shemin*, *Jordan I* et *Jordan II*, furent proposés. Les différences principales rencontrées sont le site de reconnaissance de la première molécule de substrat, soit le site A soit le site P, et la formation de la première liaison inter-substrat, soit une liaison C-C soit une liaison C-N.



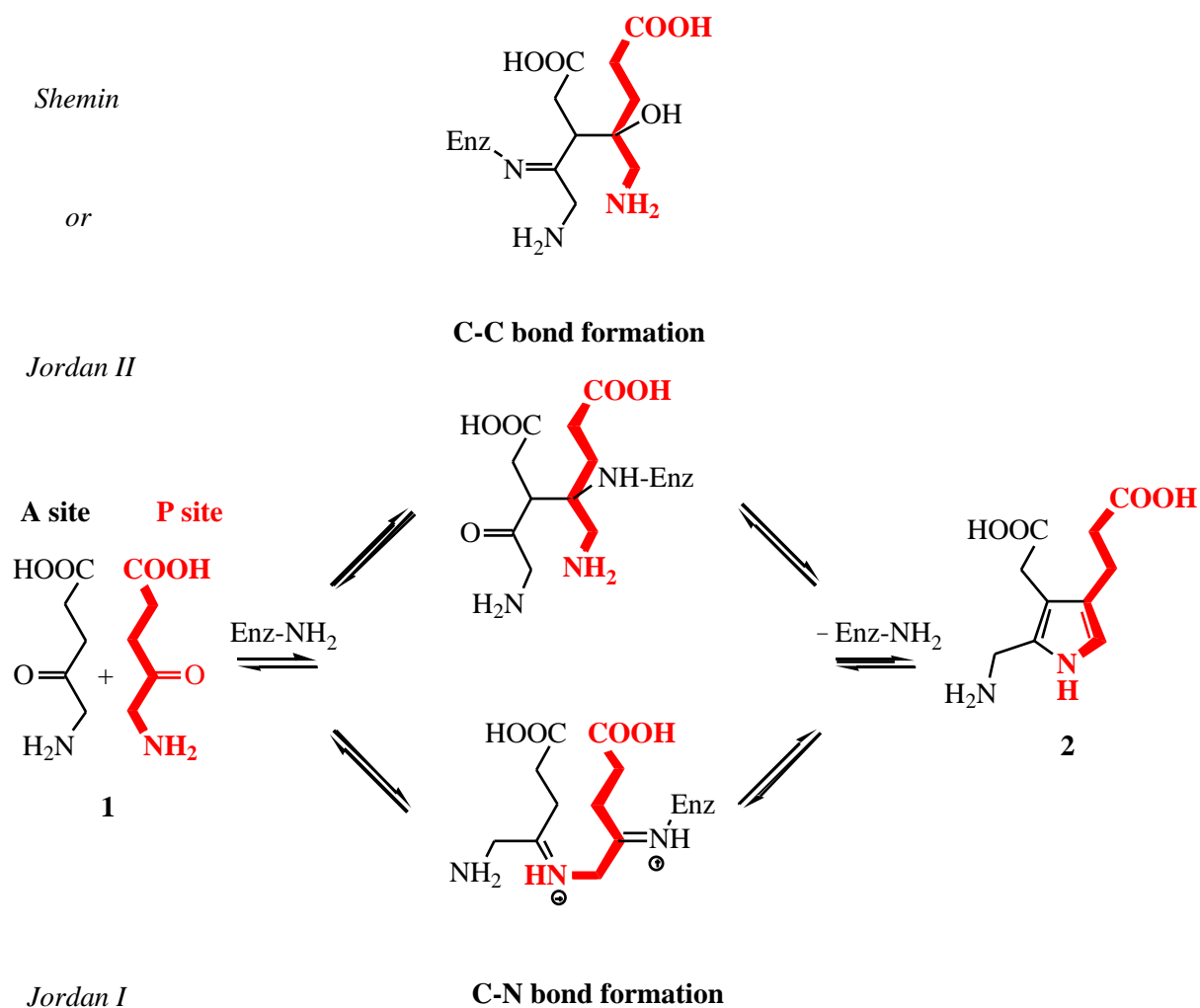
Uniquement la PBGS issue d'*Escherichia coli* fut utilisée dans nos expériences. Durant ce travail, une nouvelle charge d'enzyme fut isolée et purifiée. Une différence de stabilité fut rencontrée selon le type de tampons utilisé : phosphate de sodium ou de potassium. Les  $K_{M1}$  et  $K_{M2}$ , spécifiques pour le site P et pour le site A, furent déterminés et comparés au premier résultat obtenu par Engeloch-Jarret.

Divers inhibiteurs, soit des analogues de substrat, soit des analogues d'intermédiaires (*Jordan I*, *Jordan II* ou *Shemin*) furent testés sur la PBGS. L'analyse des données cinétiques ainsi que le type d'inhibition rencontrée nous permirent de faire des corrélations entre le site de reconnaissance impliqué (A ou P) et le type d'inhibition observé. L'ensemble des résultats obtenus nous incita à privilégier un des mécanismes cités ci-dessus.

La succinylacétone est reconnue comme un inhibiteur puissant de la PBGS et montrait un comportement du type slow binder avec la PBGS d'*E. coli*. Divers composés, analogues de cette succinylacétone, furent synthétisés et testés afin de mieux comprendre les raisons de cette forte interaction avec l'enzyme. Les composés  $\beta$ -dicétones étaient connus pour leur stabilisation au site actif des enzymes, possédant une lysine importante pour l'activité catalytique, via une amide vinylogue. La longueur d'onde de l'absorption ainsi que le coefficient d'extinction permirent de déterminer la configuration de l'amide vinylogue liée au site actif de l'enzyme (*trans-s-trans* ou *cis-s-trans/cis-s-cis*). La succinylacétone fut incubée avec la PBGS d'*E. coli* et le  $\lambda$  (en nm) ainsi que l' (en  $M^{-1} cm^{-1}$ ) furent calculés, ce qui permit de confirmer la configuration *cis-s-trans* au complexe succinylacétone-enzyme.

## Summary

The aim of this PhD thesis was to acquire new informations allowing the determination of the mechanism for the transformation of two  $\alpha$ -aminolevulinic acid molecules (**1**) into porphobilinogen (**2**). This reaction is catalysed by the enzyme porphobilinogen synthase (PBGs, EC 4.2.1.24), which is the second dedicated enzyme in the biosynthesis of tetrapyrrolic compounds such as heme, chlorophyll, etc. Three mechanisms, commonly called *Shemin*, *Jordan I* and *Jordan II*, have been proposed. The major differences between these mechanisms are the recognition site of the first substrate molecule, A site or P site, and the formation of the first inter-substrate bond, C-C bond or C-N bond.



The *E. coli* PBGS has been used for all experiments of this work. A new enzyme batch was isolated and purified. A difference in the enzyme stability was detected as a function of buffer used : sodium or potassium phosphate. The  $K_{M1}$  et  $K_{M2}$ , characteristic for the P site and the A site, were determined and compared to that obtained by Engeloch-Jarret.

Various inhibitors, such as substrate or intermediate analogues (*Jordan I*, *Jordan II* or *Shemin*) had been tested on the PBGS. The kinetic data analysis and the inhibition behaviour allowed us to correlate the involved recognition site with the observed inhibition type. All the results were in favour of one of the above mechanisms.

The succinylacetone is a potent inhibitor of the PBGS and showed a slow binding inhibition with the *E. coli* PBGS. Some compounds, analogues of the succinylacetone, were synthesized and tested with the aim of better understanding the strong interaction between the succinylacetone and the enzyme. The  $\alpha$ -diketone compounds were known to stabilize themselves as a vinylogous amide at the active site of enzymes, trapping an important active site lysine. The absorption wavelength and the extinction factor allowed us to distinguish between the different configurations of the vinylogous amide (*trans-s-trans* or *cis-s-cis/cis-s-trans*). Succinylacetone was incubated with *E. coli* PBGS and the  $\lambda_{max}$  (in nm) as the  $\epsilon_{max}$  (in  $M^{-1} cm^{-1}$ ) were calculated. The results confirmed the *cis-s-trans* configuration for the enzyme-inhibitor complex.

# 1 Introduction

## 1.1 Les sciences de la vie, aujourd'hui

De la découverte d'une substance, possédant un potentiel pharmaceutique intéressant, à sa commercialisation, en tant que médicament, 10 à 15 longues années peuvent s'écouler. La pression économique actuelle impose une identification, une optimisation et une distribution nettement plus rapides et évidemment à moindres frais. Afin de relever ce défi, une interconnexion très étroite entre les diverses disciplines des sciences de la vie est primordiale.

La génomique structurale, qui consiste à séquencer systématiquement le génome d'un organisme donné, a pris une importance capitale ces dernières années. Elle engendre une somme croissante d'informations. Cependant, aussi puissantes que soient les données issues de la recherche génomique, elles ne permettent pas à elles seules de comprendre toute la complexité d'un organisme vivant, car plusieurs informations capitales à la compréhension des systèmes biologiques échappent à son champ d'investigation. En effet, un même génome peut conduire à l'expression de différents ensembles de protéines, en fonction du cycle cellulaire, de la différenciation, des réponses à des stimuli biologiques ou physiques, etc. Il devient donc évident qu'une analyse systématique de la séquence d'ADN (genomics) doit s'associer à une analyse aussi systématique du protéome (proteomics).

## 1.2 Les tétrapyrroles dans les systèmes biologiques

Ce travail de recherche s'articule autour d'une enzyme, la porphobilinogène synthase (PBGS), qui catalyse une étape clef de la formation des tétrapyrroles, la formation du porphobilinogène (PBG, **2**) (voir schéma 1). L'intérêt apporté aux dérivés tétrapyrroliques est évident, vu que des fonctions vitales des systèmes vivants peuvent avoir lieu grâce aux métaux complexés à des systèmes tétrapyrroliques. Par exemple, la photosynthèse dépend des chlorophylles, qui sont des complexes de  $Mg^{2+}$ ; le système du transport de l'oxygène via la myoglobine et l'hémoglobine est basé sur les complexes de  $Fe^{2+}$ ; le transport des électrons, la réduction de l'oxygène et les réactions d'hydroxylation sont possibles grâce à

une famille de cytochromes basés eux aussi sur des complexes de  $Fe^{2+}$ ; la vitamine  $B_{12}$  est un complexe de  $Co^{3+}$  [1] [2] [3].

Cet ensemble de pigments macrocycliques portent le nom de «*pigments de la vie*» [4].

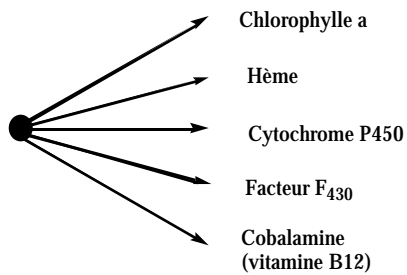
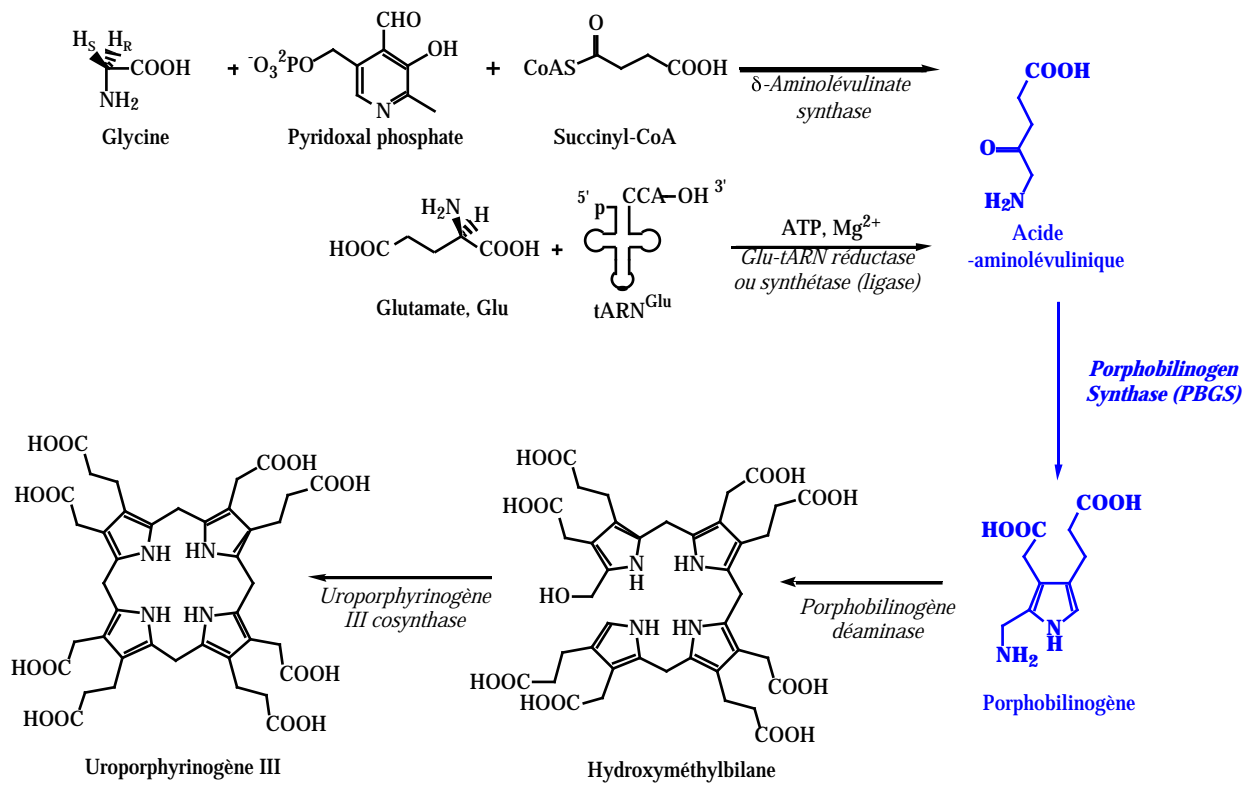
Le premier précurseur commun à tous les pigments macrocycliques est l'acide -aminolévulinique (ALA, **1**) (voir schéma 1) [1] [2]. Le tétrapyrrole est composé de huit molécules d'ALA (**1**). La première enzyme impliquée est l'ALA déshydratase (ou porphobilinogène synthase, PBGS). Elle catalyse la condensation asymétrique de deux molécules d'ALA (**1**) pour former un monopyrrole, le porphobilinogène (PBG, **2**). Cette réaction est essentiellement une synthèse de Knorr impliquant une condensation aldolique et une formation d'une base de Schiff accompagnées par l'élimination de deux molécules d'eau; on reviendra plus longuement sur cette séquence réactionnelle dans les prochains chapitres.

Le deuxième pas réactionnel est catalysé par la porphobilinogène désaminase (ou hydroxyméthylbilane synthase). Cette enzyme possède un cofacteur, le dipyrrométhane, qui lui sert d'amorce pour la polymérisation. En effet, le cofacteur fournit une liaison covalente pour les quatre molécules de substrat afin de former le produit cyclique; l'amorce permet l'élongation de la chaîne pas à pas en passant par divers complexes enzyme-substrat ( $ES$ ,  $ES_2$ ,  $ES_3$ ,  $ES_4$ ). Ce n'est qu'une fois le tétrapyrrole formé, que l'hydrolyse intervient en régénérant l'enzyme-cofacteur et en libérant le préuroporphyrinogène (ou hydroxyméthylbilane, **8**).

La cyclisation est attribuée à l'uroporphyrinogène III synthase (ou cosynthase). L'hydroxyméthylbilane (**8**) n'est pas stable au pH physiologique et cyclise spontanément en uroporphyrinogène I, le produit non réarrangé. Par contre, dans la nature, l'hydroxyméthylbilane (**8**) est intercepté par la cosynthase, qui le cyclise en effectuant un réarrangement du cycle D pour former l'uroporphyrinogène III (**9**). A partir de ce composé, la synthèse de l'hème, de la chlorophylle, des cytochromes, etc. est achevée par des enzymes spécifiques à chaque produit terminal.

Indépendamment des espèces considérées, la formation du tétrapyrrole à partir de l'ALA (**1**) a lieu en suivant la même séquence réactionnelle, au contraire de la formation de l'acide -aminolévulinique (**1**) qui est obtenue par deux biosynthèses totalement différentes (voir schéma 1). La réaction de la glycine (**3**) et le succinyl-CoA (**5**), catalysée par l'enzyme 5-

aminolévulinate synthase permet d'obtenir ALA (1), en une seule étape, chez les mammifères, les champignons, les levures et les bactéries, tandis que chez les plantes vertes, les algues et certaines bactéries, l'ALA (1) est synthétisé à partir du glutamate (6) via un processus multi-enzymatique impliquant un ARN de transfert <sup>[5]</sup>.



**Schéma 1** : Biosynthèse des tétrapyrroles

### **1.3 Maladies impliquant un dysfonctionnement du métabolisme de l'hème**

De nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des tétrapyrroles montrent, chez l'homme, des dysfonctionnements conduisant à des maladies connues sous le nom de porphyries.

#### **1.3.1 Les porphyries**

Les porphyries sont des troubles héréditaires ou acquis qui présentent une déficience partielle ou complète de l'activité d'une des huit enzymes impliquées dans le métabolisme de l'hème ce qui conduit à une accumulation des produits intermédiaires de sa biosynthèse <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup>. Les porphyries sont classées soit comme hépatiques (foie) soit comme érythropoïétiques (moelle osseuse), selon le site principal d'expression de l'enzyme déficiente correspondant à chaque trouble (voir tableau 1).

<b>Classification</b>	<b>Enzyme déficient</b>	<b>Symptôme principal</b>	<b>Excretion dans l'urine</b>	<b>Excretion dans les sels</b>
<i>Erythropoïétique</i>				
Porphyrie érythropoïétique congénitale	Uroporphyrinogène III synthase	Photosensibilité	Uroporphyrine Coproporphyrine	Coproporphyrine
Protoporphyrine érythropoïétique	Ferrochélatase	Photosensibilité		Protoporphyrine
<i>Hépatique</i>				
Porphyrie avec déficience de l'ALA synthase	ALA déshydratase	Neuroviscéral	ALA	
Porphyrie aiguë intermittente	PBG déaminase	Neuroviscéral	ALA, PBG	
Coproporphyrine héréditaire	Coproporphyrinogène oxydase	± Photosensibilité Neuroviscéral	ALA, PBG Coproporphyrine	
Variegate porphyria	Protoporphyrinogène oxydase	± Photosensibilité Neuroviscéral	ALA, PBG Coproporphyrine	Coproporphyrine Protoporphyrine
Porphyrie cutanée tarda	Uroporphyrinogène décarboxylase	Photosensibilité	Uroporphyrine Porphyrine 7-carboxylate	Isocoproporphyrine
Porphyrie hépatoporphyrinogène érythropoïétique	Uroporphyrinogène décarboxylase	Photosensibilité ± Neuroviscéral	Uroporphyrine Porphyrine 7-carboxylate	Isocoproporphyrine

**Tableau 1** : Classification des porphyries rencontrées majoritairement chez l'homme

### 1.3.1.1 Description des diverses porphyries rencontrées

#### • Porphyrie avec déficience de l'ALA déshydratase (ALADP)

L'ALADP est un trouble résultant d'une déficience de l'activité de l'ALA déshydratase. L'enzyme n'est plus fonctionnelle qu'à 2 % de sa valeur normale. Jusqu'à aujourd'hui, seulement trois cas ont été répertoriés. C'est donc le trouble le moins fréquemment rencontré.

#### •Porphyrie aiguë intermittente (AIP)

L'AIP est la forme la plus courante parmi les porphyries aiguës hépatiques. Les patients présentent une diminution de 50 % de l'activité de la porphobilinogène désaminase (PBG désaminase). Environ les 90 % des individus ayant hérité de cette déficience ne manifestent aucun symptôme durant toute leur vie. La maladie peut être latente pendant la puberté, et les symptômes sont plus fréquents chez la femme que chez l'homme. Des facteurs hormonaux, nutritionnels ou associés aux médicaments, peuvent aggraver la maladie.

#### •Porphyrie érythropoïétique congénitale (CEP)

La CEP est une maladie rare et est caractérisée par une remarquable photosensibilité de la peau. Le défaut génétique de ce trouble est une déficience de l'uroporphyrinogène III cosynthase (URO cosynthase), qui se manifeste généralement dès la naissance et qui résulte en l'accumulation et l'hyperexcretion d'uroporphyrinogène I et de coproporphyrinogène I.

#### •Porphyrie cutanae tarda (PCT)

La PCT caractérise un groupe hétérogène de porphyries qui peuvent être héritées ou, de manière plus générale, acquises. Les deux formes de la maladie montrent une diminution approximative de 50 % de l'activité de l'URO décarboxylase dans le foie. On observe une accumulation d'uroporphyrine I et de la porphyrine 7-carboxylate III dans l'urine.

#### •Porphyrie hépatoérythropoïétique (HEP)

L'HEP est une forme rare de porphyrie résultant d'une déficience de l'URO décarboxylase. L'HEP ne se distingue pas de la CEP et est caractérisée par une sévère photosensibilité et par une fragilité accrue de la peau chez les enfants, sans montrer une implication nette du foie.

#### •Coproporphyrine héréditaire (HCP)

L'HCP est très semblable à l'AIP, mais elle se manifeste généralement moins intensément. Les patients présentent une photosensibilité de la peau en plus des troubles neurologiques. La déficience génétique implique l'enzyme coproporphyrinogène oxydase (COPRO

oxydase). On observe donc une accumulation de coproporphyrine III dans l'urine et dans les sels.

#### •Variegata porphyria (VP)

La VP a été rencontrée dans diverses populations, mais elle est nettement plus diffuse parmi la communauté blanche d'Afrique du Sud. Cette déficience implique une mutation résultant en une diminution du 50 % de l'activité enzymatique de la protoporphyrinogène oxydase (PROTO oxydase). L'implication du foie est généralement légère ou inexistante. Les patients excrètent dans les sels de grandes quantités de porphyrines.

#### •Protoporphyrine érythropoïétique (EPP)

L'EPP est associée à une diminution de 50 % l'activité de la ferrochélatase. Ce défaut conduit à une accumulation de protoporphyrine dans les érythrocytes, le plasma et les sels. A cause de sa faible solubilité, la protoporphyrine n'est pas excrétée par l'urine.

#### 1.3.1.2 Mécanisme de la photosensibilité induite par les porphyrines

La photosensibilité cutanée manifeste dans les porphyries est due à l'absorption du rayonnement ultraviolet par les porphyrines à une longueur d'onde de 400 nm et à l'émission d'une fluorescence rouge intense. Les porphyrines, lorsqu'elles sont irradiées avec de la lumière ayant la longueur d'onde appropriée et en présence d'oxygène, impliquent des effets photodynamiques. L'énergie lumineuse absorbée par la porphyrine excite des électrons. La porphyrine, fonctionnant comme un sensibilisateur, produit de l'oxygène singulet qui endommagent les molécules, les cellules et les tissus. Les lipides insaturés sont des cibles privilégiées des espèces oxygénées activées. Les dommages causés à la membrane cellulaire et lysosomiale sont lourds de conséquence au niveau cellulaire. Le  $\beta$ -carotène, qui est un capteur bien connu des radicaux libres et de l'oxygène singulet, possède un effet photoprotecteur contre les porphyries. Cette substance, nommée également *provitamine A*, est un piègeur non stœchiométrique d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Une seule molécule peut inactiver des centaines de molécules d'oxygène singulet. L'énergie de l'oxygène singulet est aussi utilisée pour transformer la forme *cis* du  $\beta$ -carotène en son isomère *trans*.

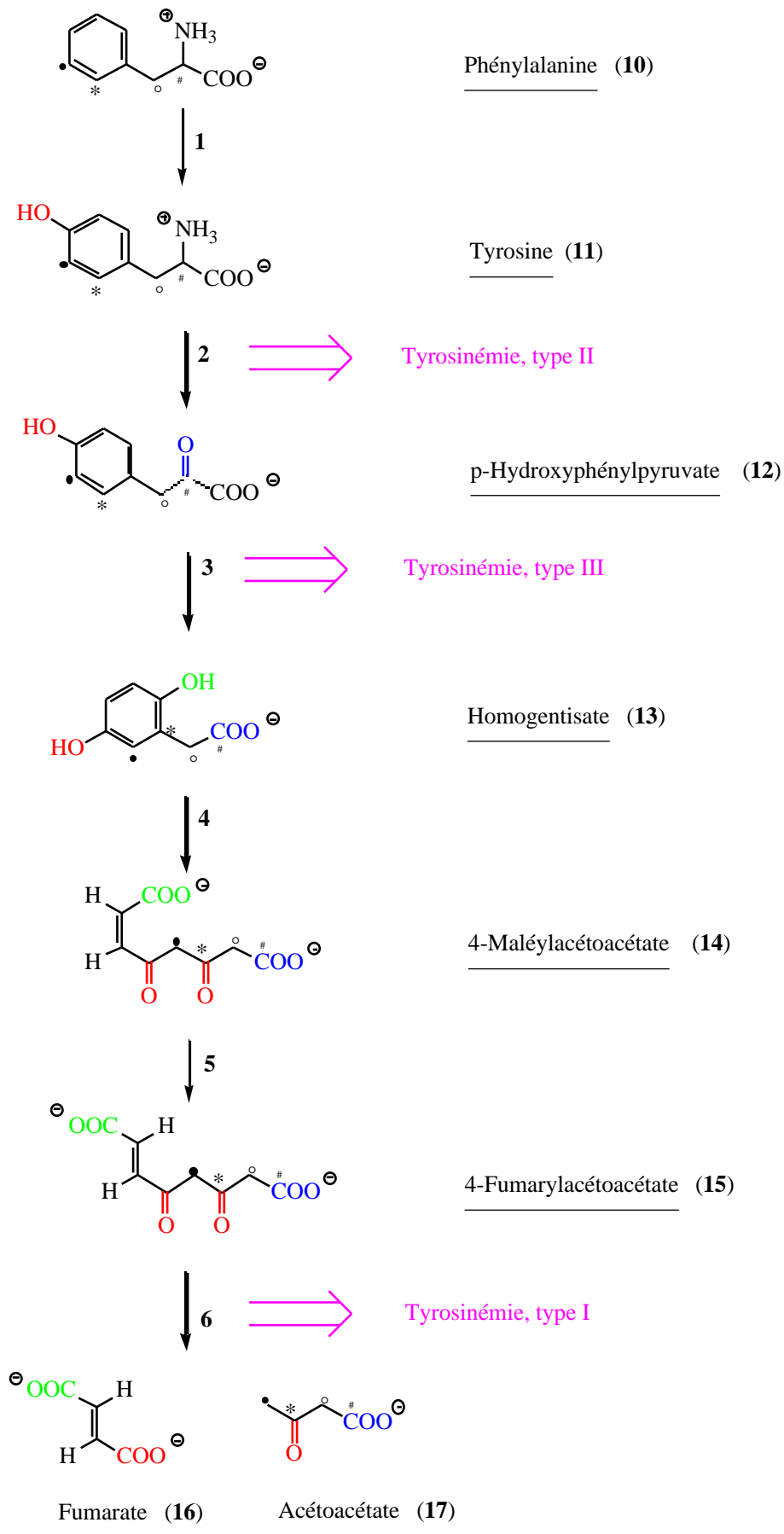
### 1.3.2 Les tyrosinémies

Certains patients atteints de tyrosinémie montrent des troubles caractéristiques rencontrés chez des malades souffrant de porphyrie. Il doit donc exister une interconnexion entre les deux maladies et les enzymes impliquées <sup>[8]</sup>.

La tyrosinémie est une maladie génétique du foie et des reins. Elle est causée par une activité réduite des enzymes impliquées dans la dégradation de la tyrosine <sup>[9]</sup>. Il existe trois types de tyrosinémie (voir schéma 2) :

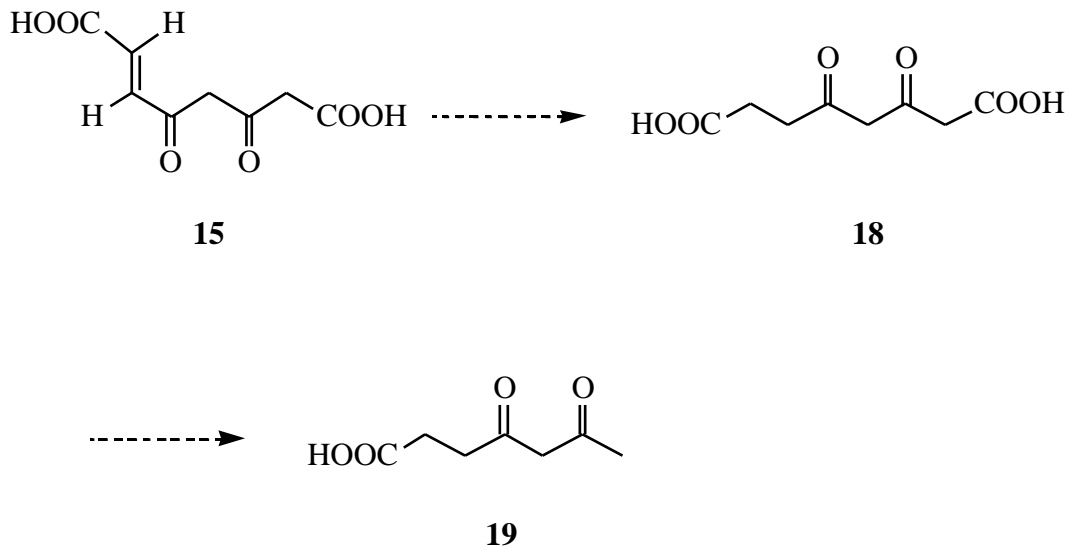
**Schéma 2** : Dégradation de la phénylalanine et de la tyrosine. Les six enzymes impliquées sont les suivants :

1. phénylalanine hydroxylase,
2. tyrosine aminotransférase,
3. p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase,
4. homogentisate dioxygénase,
5. maléylacétoacétate isomérase et
6. fumarylacétoacétase



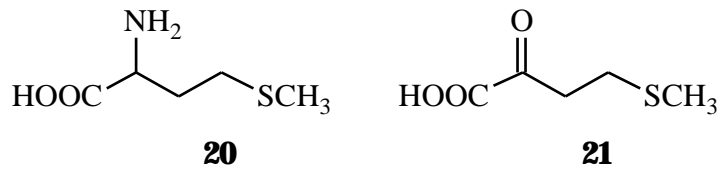
## •Tyrosinémie I

Elle est caractérisée par une déficience de la dernière enzyme de la dégradation de la tyrosine, l'hydrolase fumaryle acétoacétate (HFA). Il s'ensuit une accumulation du fumarylacétoacétate (**15**) qui est ensuite métabolisé en succinylacétoacétate (**18**) et succinylacétone (**19**)<sup>[8]</sup>. La succinylacétone (**19**) est un puissant inhibiteur de la PBGS<sup>[10]</sup>.



**Figure 1** : Dégradation du fumarylacétoacétate (**15**) en succinylacétone (**19**)

Les manifestations cliniques sont variées et apparaissent dans les premiers six mois à une année de vie chez les nourrissons. Ils incluent une insuffisance hépatique précoce avec des troubles graves de la coagulation, une cirrhose lentement progressive avec des nodules multiples et des troubles rénaux variables, et une insuffisance rénale avec fonction hépatique normale. Le cancer hépato-cellulaire survient chez environ un tiers des sujets. Les aspects visibles sont des diarrhées, de la fièvre, une irritabilité accrue, de la léthargie, des vomissements, une odeur caractéristique de chou impliquant les métabolites de la méthionine (ou acide 2-amino-4-(méthylmercapto) butyrique (**20**)), principalement l'acide -céto- -méthiolbutyrique (**21**), ainsi qu'un retard manifeste dans le développement.



La transplantation hépatique est le meilleur traitement.

•Tyrosinémie II

Elle est caractérisée par une déficience de la tyrosine aminotransférase (TAT) impliquant une accumulation de tyrosine dans le plasma et dans les tissus.

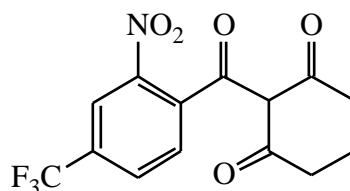
Cette accumulation de tyrosine résulte en des lésions oculo-cutanées. En effet, on peut observer la formation de cristaux intracellulaires, longs et minces, qui s'accumulent dans les yeux et dans la peau. Ces cristaux stimulent une réponse inflammatoire provoquant ainsi des lésions oculaires et cutanées. Les fonctions hépatiques et rénales ne sont aucunement affectées. Des retards dans le développement mental sont rencontrés, sans que l'intelligence soit endommagée. Les patients ont tendance à s'automutiler.

•Tyrosinémie III

Elle implique une diminution de l'activité de la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (4HPPD). On observe une accumulation et une excrétion accrue de tyrosine et de métabolites phénoliques.

Ce désordre est rare, seulement cinq cas ont été répertoriés jusqu'à aujourd'hui, et par conséquent les différents aspects cliniques de la maladie sont inconnus. Quelques symptômes rencontrés sont neurologiques impliquant un retard mental.

Cette enzyme est inhibée par le 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTCB, **22**), qui est utilisé dans le traitement de la tyrosinémie de type I.

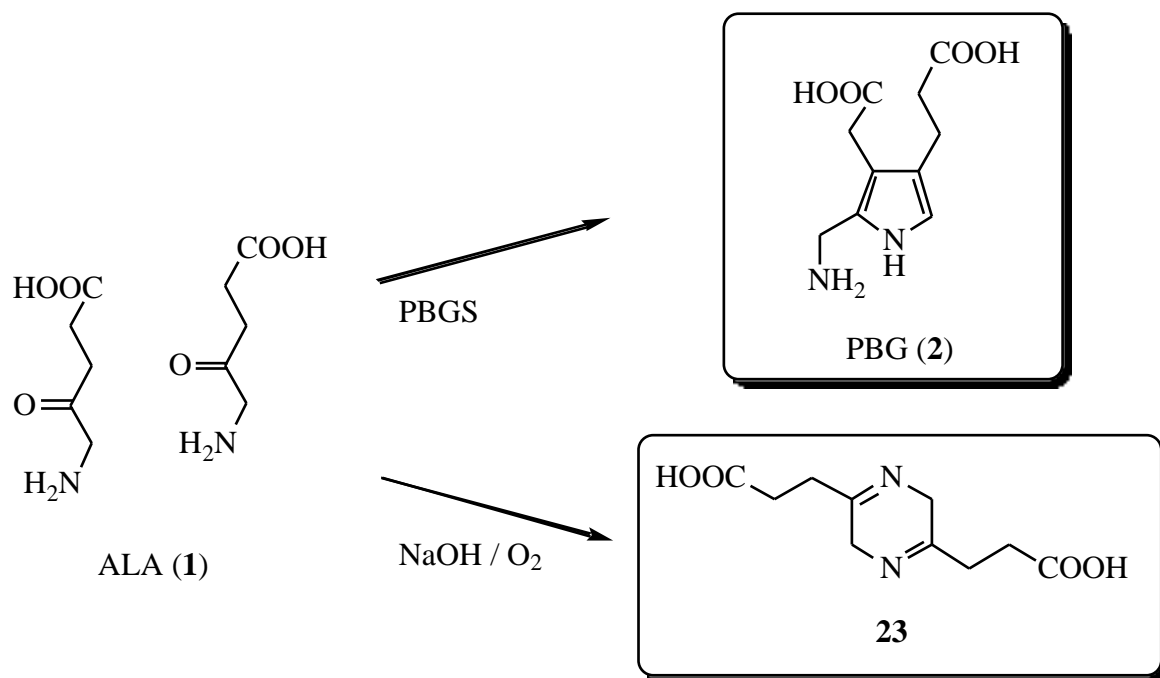


**22**

## 1.4 La porphobilinogène synthase

### 1.4.1 Les sources et les propriétés générales

La porphobilinogène synthase (PBGs), aussi appelé acide  $\alpha$ -aminolévulinique déshydratase (ALAD) (EC 4.2.1.24), catalyse, le deuxième pas réactionnel du métabolisme des tétrapyrroles. Elle permet de condenser, de manière asymétrique, deux molécules d'acide  $\alpha$ -aminolévulinique (ALA, **1**) pour former le porphobilinogène (PBG, **2**). Le PBG (**2**) fut aussi obtenu par Scott <sup>[11]</sup> en laissant à l'air libre une solution neutre d'hydrochlorure d'ALA (**1**) pendant 18 jours. Le rendement décrit était de 3 %. Une autre manière d'obtenir le PBG (**2**) consistait à remplacer la PBGS par une résine échangeuse d'ions, l'Amberlite IR-45, contenant des amines primaires et secondaires. Après 20 jours d'incubation, 10 % du pyrrole désiré étaient obtenus <sup>[12]</sup>. Le schéma biosynthétique est donc d'autant plus élégant que la condensation de deux molécules d'ALA (**1**) en milieu basique donnait un produit majoritaire symétrique, une pyrazine dicarboxylée **23** <sup>[13]</sup> (voir figure 2).



**Figure 2 :** Condensation enzymatique ou chimique de l'acide  $\alpha$ -aminolévulinique (1)

L'enzyme fut isolée pour la première fois par Gibson en 1955 du foie de bœuf <sup>[14]</sup>. Depuis, il fut démontré que l'enzyme existe dans pratiquement tous les organismes vivants. Bien que les propriétés catalytiques fondamentales de toutes les PBGS soient similaires, des différences dans la structure enzymatique primaire, dans le besoin des ions métalliques ainsi que dans la sensibilité aux tiols furent observées.

La disponibilité des séquences des cADN (homme <sup>[15]</sup>, rat <sup>[16]</sup>, levure <sup>[17]</sup>, *hemB* d'*E. coli* <sup>[18]</sup>, *hemB* de *Pseudomonas aeruginosa* <sup>[19]</sup> et bien d'autres) permet de comparer la séquence des acides aminés, de déterminer le pourcentage d'homologie ainsi que de mettre en évidence des domaines hautement conservés.

Les PBGS ont une taille variant entre 250 et 340 kDa. Elles présentent une structure quaternaire octamérique. Les PBGS sont grossièrement classées en deux catégories :

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

La PBGS provenant des cellules animales montre un maximum d'activité à un pH = 6.3-7.1 et en présence de ions Zn<sup>2+</sup> <sup>[20]</sup>, <sup>[21]</sup>, <sup>[22]</sup>. 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 celle animale, pH = 9.8 pour la levure et pH = 8.5 pour *E. coli* [23]. Comme 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 [5], [24]), mais elle diffère des autres PBGS eucaryotiques par son besoin en ion métallique. En effet, la PBGS des plantes utilise des ions  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  à la place de  $Zn^{2+}$ , tandis que celle des bactéries montre soit une non-nécessité de ions métalliques soit, comme dans le cas de *Rhodospseudomonas spheroides*, une activation par des ions  $K^+$  [25].

## 1.5 Les méthodes à disposition pour élucider un mécanisme enzymatique

Six méthodes principales peuvent être citées dans l'étude d'un mécanisme enzymatique :

- la mutagénèse dirigée
- la cinétique
- la détection d'intermédiaire
- la modification des chaînes latérales des acides aminés
- les rayons X
- la modélisation moléculaire

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.

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 envisagée.

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 méthode spectroscopique, d'autres sont piégés par modification chimique.

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 soit altéré et non pas plusieurs) et l'implication directe de la modification sur la catalyse (ce n'est pas parce qu'une modification inactive 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).

La méthode des rayons X est une technique qui fournit un nombre appréciable de données sur la structure de l'enzyme. 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. Cette méthode 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 de ions métalliques, etc.

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.

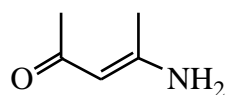
## 2 But du travail

Le but de ce travail de thèse consistait à apporter de nouveaux éléments permettant d'élucider le mécanisme utilisé par la porphobilinogène synthase d'*Escherichia coli* lors de la condensation de deux molécules d'acide  $\alpha$ -aminolévulinique (ALA, **1**) en porphobilinogène (PBG, **2**). Cette enzyme est particulière dans le fait qu'elle utilise deux substrats identiques et que ces deux molécules d'ALA (**1**) sont incorporées de manière différente dans le produit final. Afin de comprendre le processus catalytique, il est essentiel de pouvoir répondre aux questions suivantes :

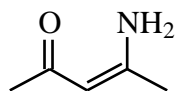
- quelles sont les transformations intervenantes dans le processus catalytique ?
- quels sont les acides aminés jouant un rôle essentiel dans la catalyse ?
- quels sont les acides aminés nécessaires pour la reconnaissance et l'orientation du substrat au site actif ?
- comment l'enzyme transforme-t-elle, pas à pas, les substrats en produit ?
- les résultats obtenus sont-ils cohérents ?

De nombreux inhibiteurs furent synthétisés dans notre groupe par Frédéric Stauffer dans l'optique d'imiter le substrat naturel ou des intermédiaires réactionnels postulés. Les interactions entre l'inhibiteur et la PBGS devaient être mises en évidence par les diverses variations chimiques, au niveau des groupes fonctionnels, par rapport au substrat naturel. Par suivi cinétique, nous pûmes déterminer le type d'inhibition (compétitif, incompétitif, mixte, slow binder ou irréversible) et l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme (constante d'inhibition). L'approche cinétique nous permit de définir l'importance des groupes fonctionnels présents sur le substrat naturel et l'environnement enzymatique impliqué dans la reconnaissance de ces groupes fonctionnels.

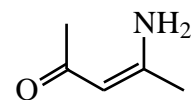
La détection d'un intermédiaire stabilisé au site actif fut possible grâce à l'utilisation de la succinylacétone (**19**), un inhibiteur puissant de la PBGS <sup>[26] [10]</sup>. Les composés  $\alpha$ -dicétones formaient une amide vinylogue, extrêmement stable, avec une lysine présente au site actif <sup>[27] [28] [29] [30]</sup>. Cette amide vinylogue possédait une absorption caractéristique dans le spectre UV/VIS dépendant de sa configuration (voir figure 3) <sup>[31] [32] [33] [34]</sup>.



$$\begin{aligned} & \textit{trans-s-trans} \\ & = 285-305 \text{ nm} \\ & = 25'000-35'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} & \textit{cis-s-cis/cis-s-trans} \\ & = 300-320 \text{ nm} \\ & = 10'000-20'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$



**Figure 3 :** Diverses configurations de l'amide vinylogue

La co-cristallisation d'inhibiteurs, imitant soit le substrat naturel soit un intermédiaire postulé du mécanisme, et l'analyse détaillée de la structure aux rayons X résultantes permirent de caractériser l'interaction de l'inhibiteur avec l'enzyme et d'utiliser les résultats obtenus pour définir la liaison du substrat naturel à l'enzyme et définir un mécanisme réactionnel. Les données résultantes des rayons X décrites dans le chapitre suivant sont prises exclusivement de la littérature, mais vue qu'elles constituent un des piliers de notre analyse, il était important de les décrire en détail.

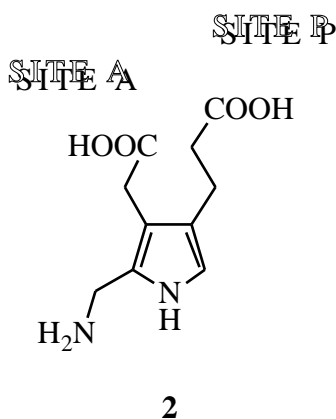
# 3 Données disponibles avant le début de ce travail

## 3.1 Les mécanismes postulés

La synthèse du PBG (**2**) est essentiellement une réaction du type Knorr impliquant une condensation aldolique et une formation d'une base de Schiff accompagnées d'une perte de deux molécules d'eau dans un ordre, encore jusqu'à présent, indéterminé.

Trois mécanismes principaux furent postulés dans la littérature pour interpréter le mécanisme de la PBGS. Ces mécanismes sont connus sous le nom de *Shemin*, *Jordan I* et *Jordan II*.

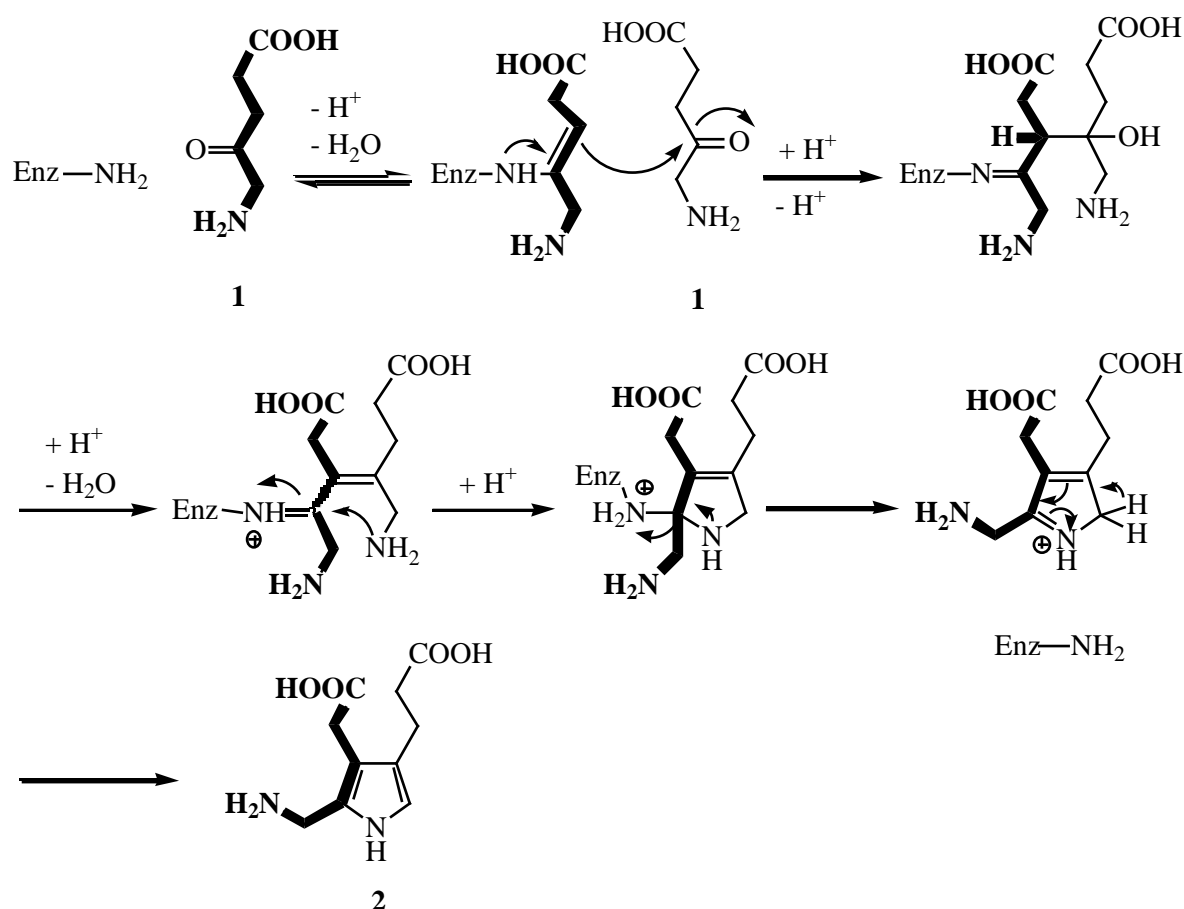
**Remarques** : les notions de site A et de site P ont été introduites afin de simplifier les raisonnements effectués au niveau du site actif. Le site A correspond au site de reconnaissance de l'ALA (**1**) qui forme la chaîne acétique du PBG (**2**) et le site P, au site de reconnaissance de l'ALA (**1**) qui forme la chaîne propionique du PBG (**2**).



**Figure 4** : Dénomination des deux sites de reconnaissance

Le mécanisme décrit dans les travaux effectués par Nandi et Shemin en 1968 <sup>[35]</sup> impliquait la reconnaissance de la première molécule de ALA (**1**) au site A de l'enzyme. La formation de la première liaison covalente entre l'enzyme et son substrat avait lieu via une base de Schiff entre une lysine présente au site actif et le groupe carbonyle de l'ALA (**1**). Une base

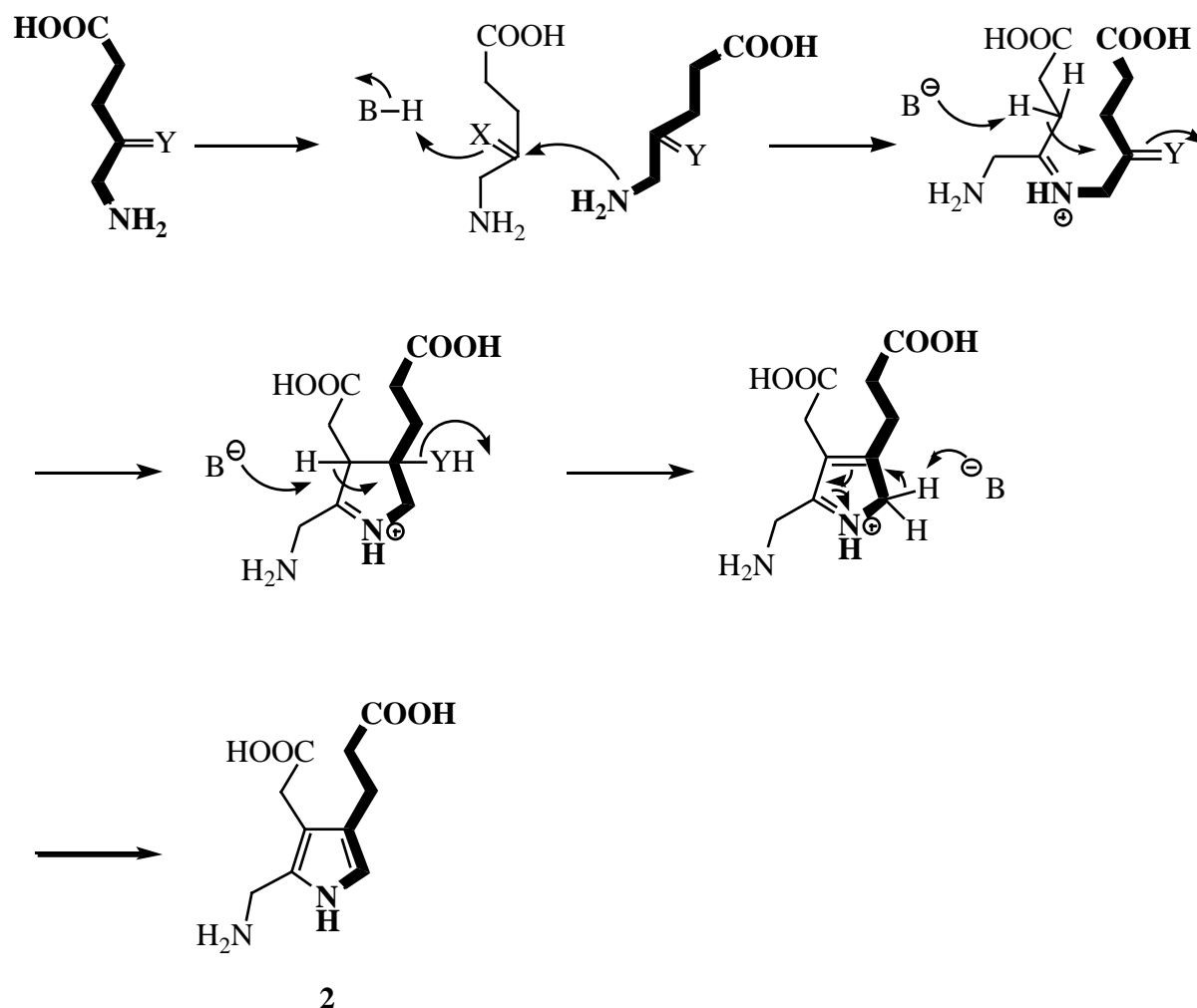
déprotonait ensuite le carbone C(4) de l'ALA (**1**). Ce carbanion effectuait une attaque nucléophile sur le groupe carbonyle de la seconde molécule de l'ALA (**1**). Nandi et Shemin postulèrent donc que la première liaison formée entre les deux molécules de substrat était la liaison carbone-carbone. L'enzyme catalysait ensuite l'élimination d'une molécule d'eau et la formation du pyrrole était obtenue par attaque nucléophile de l'amine de la seconde ALA (**1**) sur le carbone hautement réactif de la base de Schiff. L'aromatisation finale en PBG (**2**) libérait le produit du site actif de l'enzyme (voir schéma 3).



**Schéma 3** : Mécanisme *Shemin* <sup>[35]</sup>

Douze ans plus tard, Jordan effectua une étude très élégante en utilisant une technique <sup>14</sup>C *single-turnover* <sup>[36]</sup> : une petite quantité d'acide -aminolévulinique (**1**) marqué sur le carbone C(5) au <sup>14</sup>C (7.1 à 571 nmol) était ajoutée à l'enzyme (71.4 nmol) suivie par un large excès du substrat non marqué (60 μmol). Aussi longtemps que l'affinité de l'enzyme pour l'une des molécules de substrat était différente de celle pour l'autre et que la concentration en substrat marqué était égale ou inférieure à celle de l'enzyme, alors l'un des

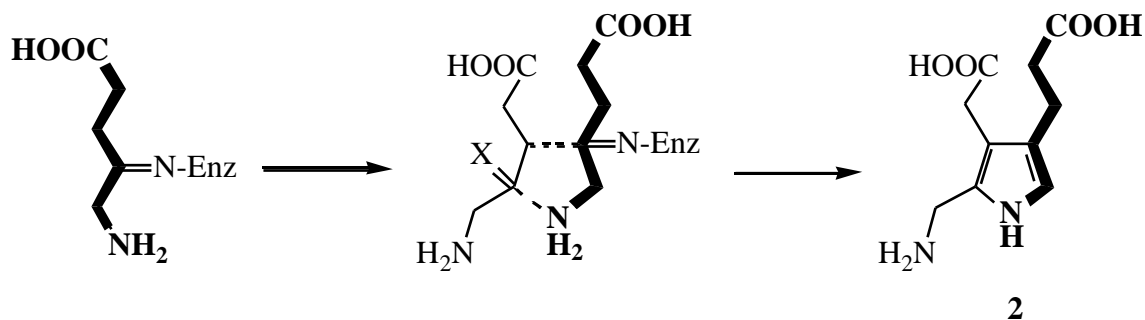
deux sites (A ou P) était occupé de manière préférentielle par le marquage. L'adjonction du substrat non marqué complétait le cycle catalytique en se liant au substrat marqué pour former le PBG (2). La molécule de ALA (1) liée en premier à la PBGS était celle qui donnait lieu à la chaîne propionique du PBG (2). Ce mécanisme est appelé *Jordan I* (voir schéma 4).



**Schéma 4** : Mécanisme *Jordan I* où X = O ou  $^+NH_2$ -Enz et Y =  $^+NH_2$ -Enz <sup>[36]</sup>

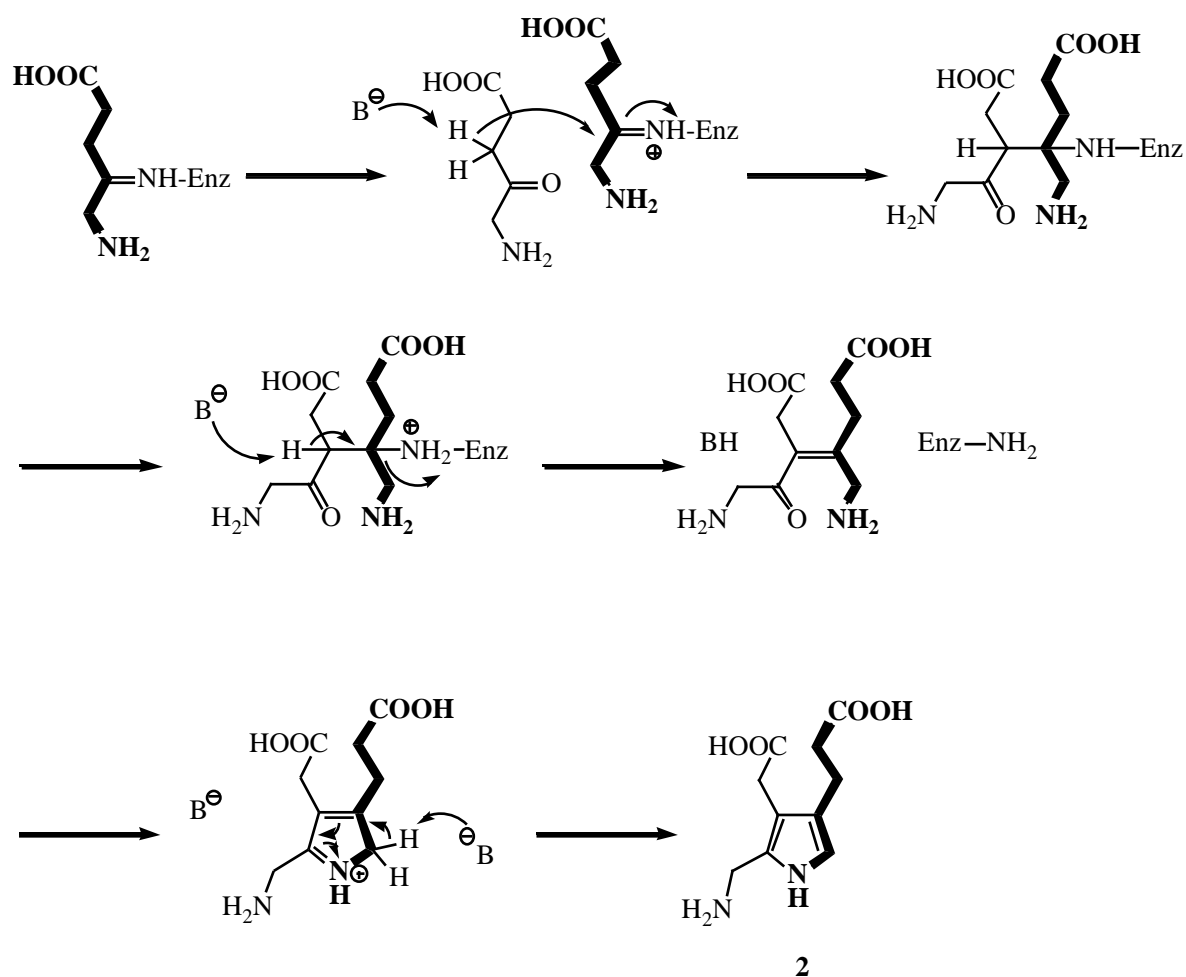
Le mécanisme *Jordan I* implique donc la reconnaissance de la première molécule de substrat au site P de l'enzyme et la première liaison entre les deux molécules de ALA (1) est la liaison carbone-azote. Il est important de remarquer que dans le schéma réactionnel proposé, la base de Schiff formée entre la première molécule de ALA (1) et la lysine du site actif était considérée comme acquise, par contre les auteurs laissèrent ouverte la discussion concernant le système de reconnaissance de la seconde molécule d'ALA (1) au site A de l'enzyme. Ils envisagèrent la formation d'une seconde base de Schiff au site A de l'enzyme.

Quelques années plus tard, la possibilité que la première liaison entre les deux substrats était la formation de la liaison carbone-carbone fut envisagée, sans pour autant discréditer le mécanisme publié précédemment <sup>[37]</sup> (voir schéma 5). La formation d'une seconde base de Schiff était toujours d'actualité.



**Schéma 5** : Mécanisme postulé où aussi bien la formation de la liaison C-C que la liaison C-N sont envisagées comme première connexion entre les deux substrats et où  $X = O$  ou  $^+NH_2-Enz$  (mélange des mécanismes *Jordan I* et *Jordan II*) <sup>[37]</sup>

En 1991, Jordan sépara clairement les deux mécanismes proposés <sup>[38]</sup>. Des raisons stéréo-électroniques, non précisées, défavorisant le mécanisme *Jordan I*, il donna priorité au mécanisme *Jordan II* (voir schéma 6). La formation de la seconde base de Schiff n'était plus postulée dans la proposition de mécanisme.



**Schéma 6** : Mécanisme *Jordan II*<sup>[38]</sup>

Les mécanismes proposés depuis par Jordan sont tantôt du type *Jordan I*, tantôt du type *Jordan II*. Cette indécision nous montre bien qu'aux vues des résultats disponibles à l'heure actuelle, il n'est pas aisé de favoriser l'un ou l'autre des mécanismes.

**Remarque** : les schémas 3 à 6 ont été dessinés en conservant fidèlement l'idée originale des auteurs; il est clair que, certaines fois, la configuration tétraédrique autour du carbone n'est pas respectée.

### 3.2 Le phénomène de half-site reactivity

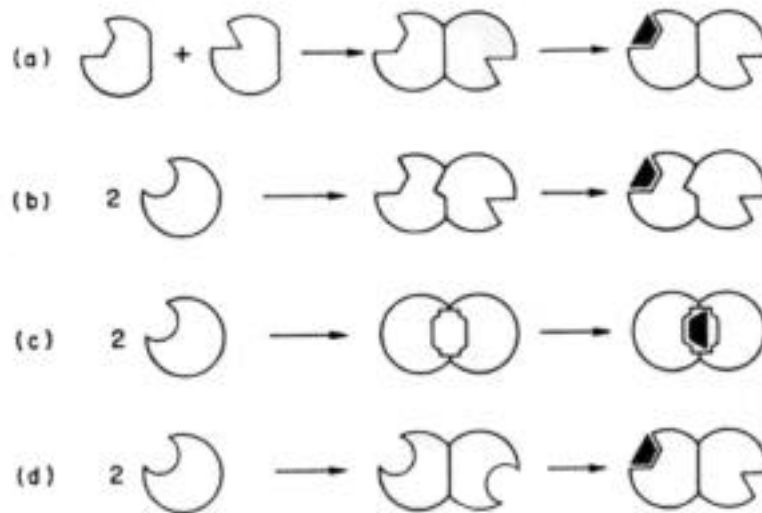
Des résultats non-publiés indiquèrent que seulement la moitié des sites actifs formait une base de Schiff avec le substrat naturel et donc que la PBGS pouvait montrer un phénomène de *half-site reactivity* <sup>[39]</sup> <sup>[40]</sup>. Ce phénomène fut largement étudié par Ladzdunski <sup>[41]</sup> et Levitzki <sup>[42-43]</sup>. Levitzki donna une définition de ce type de réactivité <sup>[42]</sup> :

- le phénomène de *half-site reactivity* est attribué aux protéines composées de sous-unités identiques possédant un nombre de sites actifs  $n$  qui réagissent avec le substrat naturel ou un inhibiteur de manière à ce que  $n/2$  sites actifs soient occupés lorsque l'enzyme est saturée avec le ligand.

Un nombre considérable d'enzymes, comme l'alcool déshydrogénase, la cholinestérase, la glutamine synthase pour n'en citer que quelques-unes, montrent ce type de réactivité. Quatre mécanismes furent envisagés afin d'expliquer ce phénomène; pour simplifier les raisonnements, le dimère fut choisi comme unité où un seul des monomères présentait un site actif fonctionnel (voir figure 5) :

- a. les sous-unités ne sont pas identiques, même si les tests conventionnels ne le mettent pas en évidence; ce changement peut survenir par remplacement d'un seul acide aminé, via des modifications post-transcriptionnelles, qui va altérer de manière significative le site de liaison du substrat
- b. deux chaînes polypeptidiques dimérisent de manière asymétrique et de là, les deux sites actifs ne sont pas identiques; ce type de dimérisation fut observée dans les cristaux de l'insuline <sup>[44]</sup> et donc cette possibilité est aussi probable
- c. les sites actifs peuvent être suffisamment proches pour que la liaison d'un substrat à l'un des sites bloque de manière stérique la liaison du second substrat ou repousse électrostatiquement ce dernier du site actif; le site actif peut aussi se situer à l'interface de deux sous-unités comme dans le cas de la L-ribulose-5-phosphate 4-épimérase <sup>[45]</sup>

- d. les deux sous-unités ainsi que les deux sites actifs sont totalement identiques tant que le substrat n'est pas lié; la liaison du substrat induit un changement conformationnel et ce changement est transmis, par des zones de contact, à la sous-unité voisine désactivant le site actif de cette dernière.



**Figure 5** : Quatre modèles expliquant le phénomène de half-site reactivity

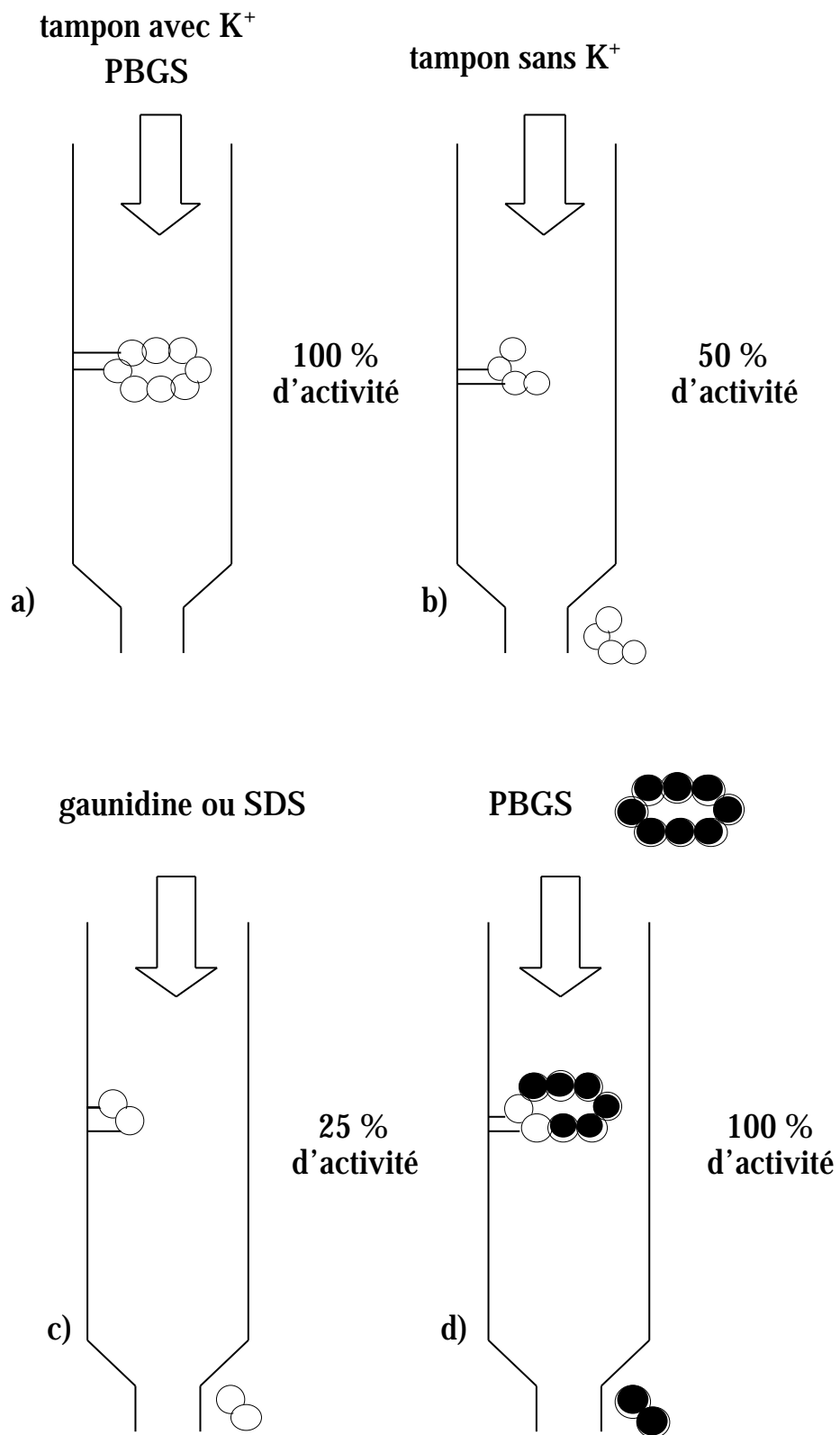
Cheh et Neilands <sup>[22]</sup>, en se référant à la PBGS, analysèrent de manière systématique l'application des mécanismes postulés par Levitzki :

- le mécanisme a) implique la présence de deux sous-unités différentes dans le dimère; une seule taille de sous-unités fut déterminée par SDS-PAGE de la PBGS; si le mécanisme a) doit être appliqué à la PBGS, il faut considérer que ses sous-unités sont suffisamment similaires pour ne pas pouvoir en détecter les différences, mais ces différences sont suffisamment importantes pour induire un comportement *half-site reactivity*
- aucune preuve ne fut apportée pour ou contre une dimérisation asymétrique, pour ou contre un effet d'encombrement stérique ainsi que pour ou contre une coopérativité négative.

Cheh et Neilands incubèrent la PBGS avec une concentration faible d'acide  $^{14}\text{C}$ -5-amino-lévulinique et de  $\text{NaBH}_4$ . Ils titrèrent ensuite l'activité enzymatique résiduelle et constatèrent qu'il suffisait de bloquer quatre sites actifs sur les huit pour obtenir une PBGS privée d'activité catalytique.

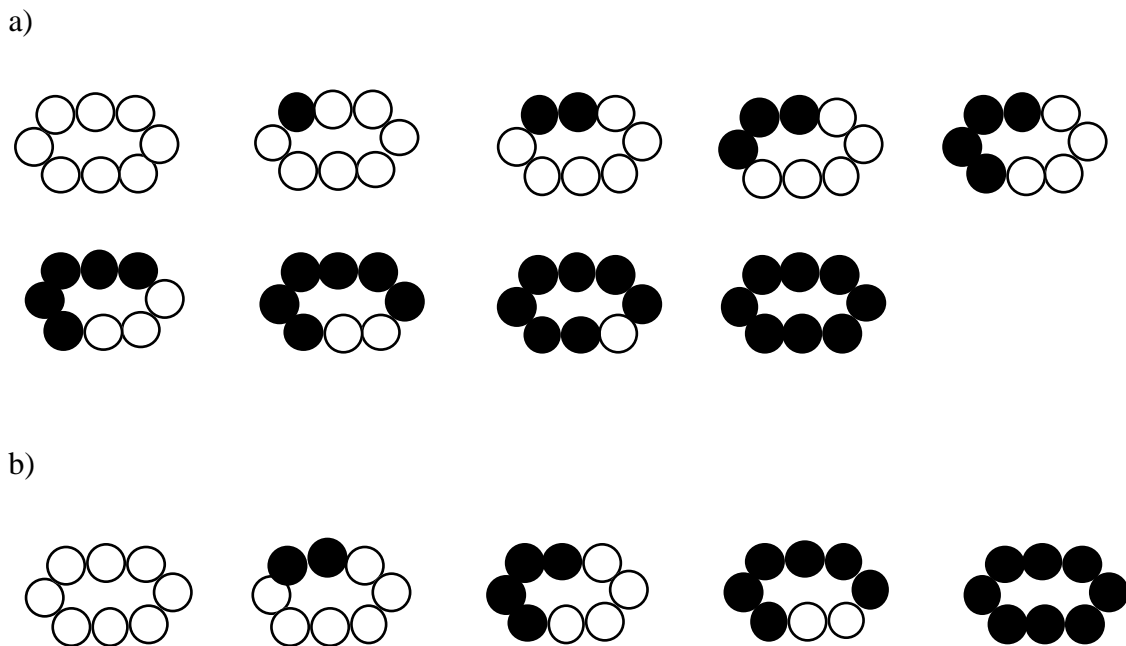
En piégeant la base de Schiff avec du  $\text{NaBH}_4$ , Shemin détermina que seulement quatre sous-unités sur les huit étaient attachées de manière covalente avec le substrat <sup>[46]</sup>. Il utilisa entre autres une technique élégante afin de mettre en évidence le phénomène de *half-site reactivity* : il immobilisa la PBGS sur une colonne de Sépharose. D'un point de vue théorique, il considéra que l'enzyme était attachée de manière covalente via des groupes fonctionnels amines autres que ceux qui sont nécessaires à la formation de la base de Schiff au site actif, et que l'enzyme était liée à la Sépharose par une ou deux de ses sous-unités, même si la PBGS n'était active qu'en ayant sa structure quaternaire intacte. Il supposa donc que la liaison de l'enzyme à la colonne se faisait sans distorsion de la structure quaternaire et donc sans inactivation de l'enzyme. Si c'était bien le cas, la stabilité enzymatique observée (la colonne contenant 1 mg de PBGS pouvait être utilisée un mois de manière ininterrompue à 37°C) devait s'expliquer soit par une forte interaction entre les sous-unités soit moins de huit sous-unités étaient requises pour l'activité. Il était difficile de tester ce raisonnement sur une enzyme en solution où l'état d'association ou de dissociation de l'octamère en ces sous-unités n'était pas contrôlable. Par contre, lorsque l'enzyme était liée à un support solide, la dissociation en sous-unités ainsi que l'activité des diverses sous-unités pouvaient être testées (voir figure 6). Il utilisa une PBGS issue de *R. spheroides*; cette enzyme était sensible à la présence de ions potassium. En effet, en absence de potassium, la PBGS se dissociait rapidement en tétramères. Il immobilisa l'enzyme sur la colonne en présence de  $\text{K}^+$  (a), puis lava la colonne avec un tampon contenant des ions métalliques jusqu'à ce plus aucune activité enzymatique n'était détectable dans l'éluat. Il changea ensuite d'éluant (tampon sans ion métallique). Vu que l'enzyme se dissociait sous ces conditions, une activité enzymatique était détectée dans l'éluat (b). De plus, vu que la protéine dans l'éluat était en solution, une réassociation des diverses sous-unités pouvait avoir lieu. Par contre, l'enzyme restant sur la colonne ne pouvait pas se réassocier et donc toute activité enzymatique résiduelle au niveau de la colonne devait être interprétée comme si quatre sous-unités ou moins étaient encore fonctionnelles. 50 % de l'activité fut retrouvée sur la colonne : le tétramère était apparemment actif. Sous des conditions dénaturantes (0.1 % de sodium dodécylsulfate ou 8 M de guanidine/HCl), seulement deux sous-unités par octamère restaient attachées de manière covalente à la colonne, vu que 25 % de l'activité était

retrouvée sur la colonne (c) <sup>[47]</sup>. L'interaction entre sous-unités semblait nettement plus forte que celle entre dimère ou tétramère. L'activité totale de l'enzyme liée à la colonne pouvait être récupérée en lavant la colonne soit avec l'enzyme native en solution soit avec de l'extrait brut du foie bovin (d).



**Figure 6:** Dissociation des sous-unités de la PBGS

Une manière d'étudier l'interaction entre les diverses sous-unités consistait à utiliser la technique d'hybridation : une PBGS acylée était hybridée avec une PBGS native. D'un point de vue statistique, neuf variantes auraient dû être obtenues, mais uniquement cinq furent séparées par électrophorèse <sup>[47]</sup>. L'hybridation avait donc lieu préférentiellement entre des dimères de l'enzyme native et l'enzyme acylée, plutôt qu'entre les monomères (voir figure 7).



**Figure 7 :** a) Distribution statistique des isozymes postulées. b) Distribution réellement obtenue

### 3.3 Les structures aux rayons X

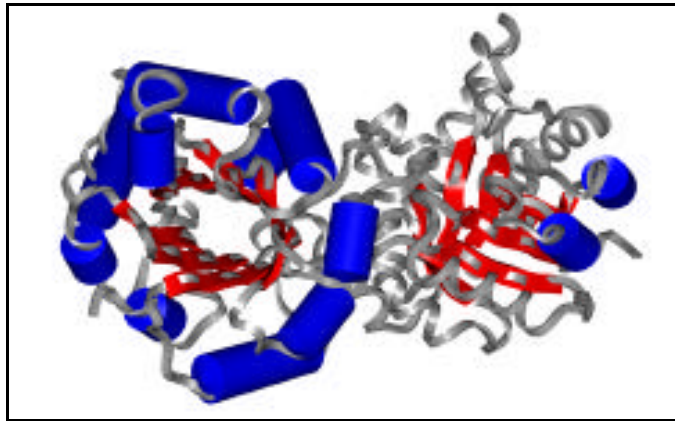
La publication de la première structure à haute résolution de la PBGS de la levure par Erskine *et al.* <sup>[48]</sup> ouvrit une porte vers le cœur de la protéine. En effet, l'organisation tridimensionnelle des acides aminés du site actif devenait accessible et dès lors, l'interaction entre ces divers acides aminés pouvait être analysée. Actuellement diverses structures à haute résolution sont disponibles :

- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* sans inhibiteur, résolution 2.3 Å, entrée PDB 1aw5 <sup>[49]</sup>

- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à l'acide  $\alpha$ -aminolévulinique, résolution 1.75 Å, entrée PDB 1h7o <sup>[50]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à l'acide lévulinique, résolution 2.15 Å, entrée PDB 1ylv <sup>[51]</sup>, résolution de 1.6 Å, entrée PDB 1h7n <sup>[50]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à l'acide 4,7-dioxosébacique, résolution 1.75 Å, entrée PDB 1eb3 <sup>[52]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à l'acide 4-oxosébacique, résolution 1.80 Å, entrée PDB 1gjp <sup>[52]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à l'acide 4-oxo-5-amino-hexanoïque, résolution 1.64 Å, entrée PDB 1h7p <sup>[50]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à la succinylacétone, résolution 2.0 Å, entrée PDB 1h7r <sup>[50]</sup>
- PBGS de *Saccharomyces cerevisiae* complexée à du plomb et du mercure, résolution 2.5 Å et 3.0 Å, entrée PDB 1qnv et 1qml <sup>[53]</sup>
- PBGS d'*Escherichia coli* complexée à l'acide lévulinique, résolution 2.0 Å, entrée PDB 1b4e <sup>[54]</sup>
- PBGS d'*Escherichia coli* complexée à l'acide 4,7-dioxosébacique, résolution 1.9 Å, entrée PDB 1i8j <sup>[55]</sup>
- PBGS de *Pseudomonas aeruginosa* complexée à l'acide lévulinique, résolution 1.67 Å, entrée PDB 1b4k <sup>[56]</sup>
- PBGS des érythrocytes humains complexés au PBG, résolution 2.83 Å, entrée PDB 1e51

### 3.3.1 Les caractéristiques communes aux PBGS cristallisées de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli*

La structure tertiaire de la PBGS est dominée par une unité ( , )<sub>8</sub> ou aussi appelée *TIM barrel* (tonneau TIM). La première protéine qui a été déterminée, ayant cette structure, était la triose phosphate isomérase (TIM) <sup>[57]</sup>. La partie centrale de cette unité est constituée de huit brins parallèles disposés les uns contre les autres comme les douves d'un tonneau. Les hélices qui relient les brins parallèles sont toutes localisées à l'extérieur du tonneau (voir figure 8).



**Figure 8 :** Représentation de la triose phosphate isomérase; les hélices sont en bleu et les feuillets en rouge (entrée PDB 1tph) (programme de dessin : Insight II)

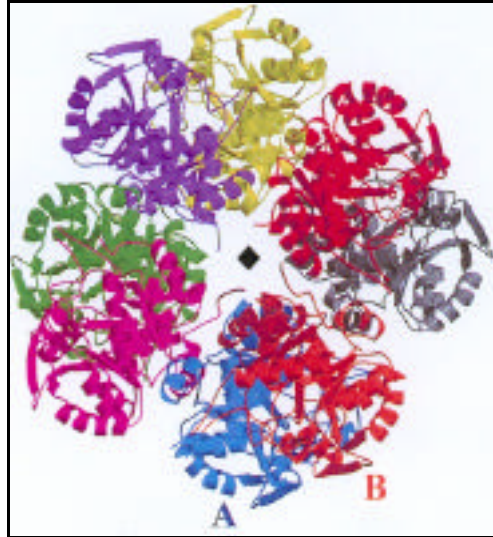
L'intérieur d'un tonneau est exclusivement formé par des chaînes latérales provenant de résidus de brins fortement comprimés qui donnent un cœur hydrophobe à l'ensemble de l'unité. La structure entière apparaît compacte et relativement peu flexible. Dans cette structure en *TIM barrel*, les sites de 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 <sup>[58]</sup>.

Remarque : si aucune indication n'est donnée, la numérotation correspond à l'enzyme issue de la levure, sinon tout autre source est citée.

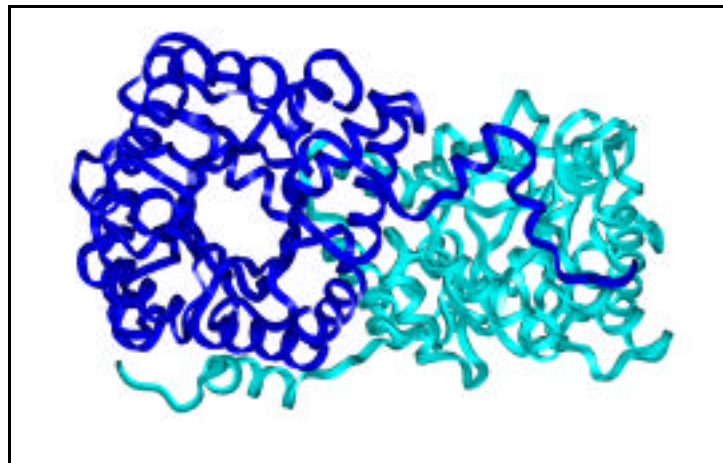
Par rapport à l'enzyme TIM, la PBGS montre une hélice supplémentaire, nommée 8 et formé par les résidus 289-302, située entre deux membres réguliers du *TIM barrel* ( 9 et 9) ainsi qu'un bras caractéristique à l'extrémité amino-terminale. Ces deux régions sont importantes pour les interactions quaternaires.

La PBGS présente une organisation octamérique (voir figure 9) avec un groupe de symétrie I422 ou D<sub>4</sub>. Les huit sous-unités sont normalement toutes identiques, excepté pour la PBGS de *P. aeruginosa* où une dissymétrie des monomères à l'intérieur du dimère fut observée <sup>[56]</sup>. 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 situait à l'interface des sous-unités <sup>[59]</sup>. Les interactions les plus intenses sont décrites pour les

contacts entre monomères lors de la formation d'un dimère <sup>[60]</sup>. Le bras de l'extrémité amino-terminale s'enroule autour de la sous-unité voisine, pour former un dimère de la forme 69, où 6 et 9 se situent dans des plans orthogonaux (voir figure 10).



**Figure 9** : Représentation de la structure octamérique de la PBGS



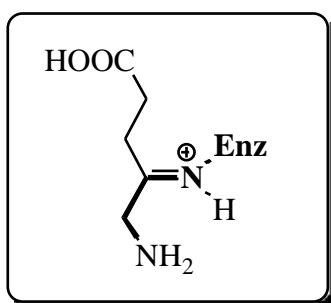
**Figure 10** : Représentation en forme de ruban du dimère de la PBGS. Les bras à l'extrémité amino-terminale s'enroule autour du monomère voisin

Les *loops* formant la cavité du site actif contiennent deux lysines adjacentes 210 et 263. La lysine 263 fut aussi déterminée via des méthodes biochimiques, au contraire de la Lys210. En effet dès les années 1960, il était supposé que la première molécule d'ALA (**1**) formait 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  $^{14}\text{C}$  sur le carbone C(4), avec la PBGS et effectua ensuite une réduction à l'aide du  $\text{NaBH}_4$  [35]. Cette manipulation inactivait l'enzyme et permettait d'introduire un substrat marqué au sein de l'enzyme. La protéine était ensuite isolée et l'activité enzymatique ainsi que la radioactivité était déterminée. L'inactivation de la PBGS n'était effective qu'en présence du substrat et la PBGS devenait radioactive lorsque le substrat se trouvait au site actif de l'enzyme. Shemin en conclua que le substrat formait une base de Schiff avec un groupe amino du site actif et que l'inactivation et l'incorporation de la radioactivité résultaient de la formation d'une amine secondaire après réduction de cette base de Schiff avec le  $\text{NaBH}_4$ . L'acide aminé responsable de la formation de la base de Schiff pouvait être une lysine. La confirmation de ce postulat fut apportée par Nandi en 1978 [61]. Il incuba la PBGS issue de *R. spheroides* avec de l'[4- $^{14}\text{C}$ ]-ALA, effectua la réduction avec du  $\text{NaBH}_4$  et hydrolysa la protéine. Il effectua une chromatographie bidimensionnelle qui montrait une tache majoritairement radioactive. Après oxydation du produit radioactif, obtenu après l'hydrolyse, avec du periodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ), le produit résultant était l'acide succinique confirmant la présence de l'ALA (**1**) dans le produit marqué. La nature de l'acide aminé liant l'ALA (**1**) fut déterminée par comparaison avec le produit synthétique, l'acide N- [4-(5-aminovalérique)]-lysine. Le produit synthétique ainsi que le produit obtenu par dialyse furent confrontés sur couche mince et les deux produits montraient bien un facteur d'élution identique. Nandi put donc conclure que c'était bien le groupe -amino d'une lysine qui formait la base de Schiff au site actif.

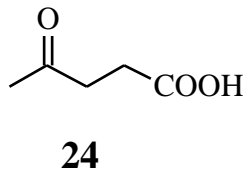
En utilisant une PBGS, présentant des résidus cystéines modifiée avec l'agent alkylant MMTS (méthylméthanethiosulfonate), donc une PBGS exempte de ions métalliques, Jaffe et al effectuèrent diverses études de la base de Schiff en utilisant la RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  [62] [63] [64].

Les résultats obtenus furent les suivants :

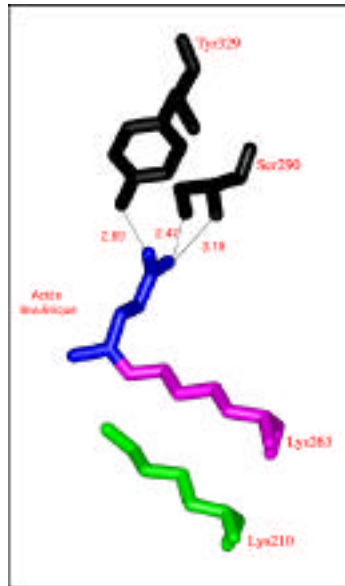
- la base de Schiff était de manière prédominante sous forme d'imine
- l'imine montrait une configuration *trans* (voir figure 11)
- l'imine était dans un état protoné et l'amine libre sur le carbone C(5) de l'ALA (**1**) était dans un état non protoné



**Figure 11** : Configuration de la base de Schiff selon Jaffe

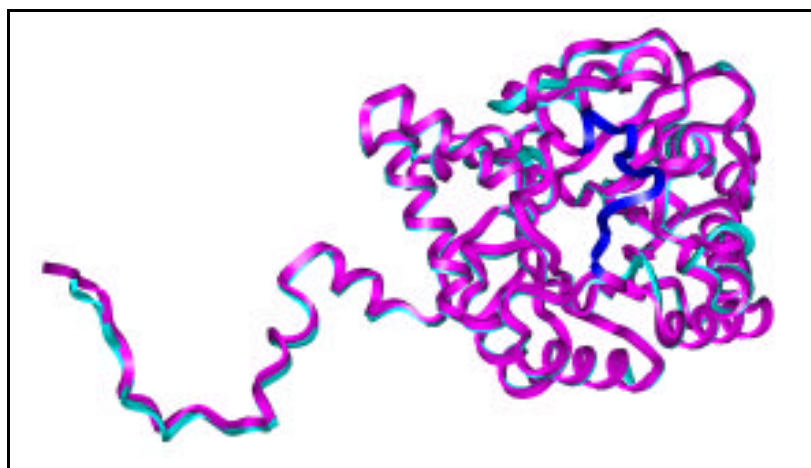


Les enzymes co-cristallisées avec l'acide lévulinique (**24**) apportèrent des informations sur la reconnaissance du groupe carboxylate au site P de l'enzyme <sup>[54]</sup> <sup>[51]</sup>. L'inhibiteur était lié à l'enzyme via une base de Schiff, comme prévue avec la Lys263. Le carboxylate de l'inhibiteur formait des ponts hydrogène avec le groupe OH de la Ser290 et de la Tyr329, et avec l'azote de la chaîne principale de la Ser290 (voir figure 12).

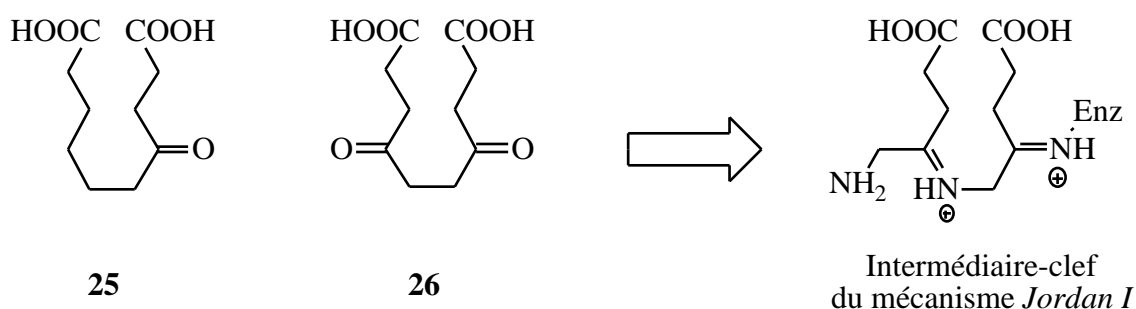


**Figure 12** : Reconnaissance du carboxylate via des ponts d'hydrogène avec la Ser290 et la Tyr329 (en noir).  
 Les deux lysines sont aussi représentées : la Lys263, en violet, formant la base de Schiff avec l'acide lévulinique, en bleu, et la Lys210 en vert

La structure de la PBGS ne contenant pas l'inhibiteur présentait un *loop* entre les résidus 217 et 235 mal défini. Pour la protéine complexée à l'acide lévulinique, tous les acides aminés appartenant à ce *loop* montraient une densité électronique nettement mieux définie, ce qui pouvait amener à penser que la présence de l'inhibiteur avait un effet d'organisation très marqué. Cette région devenait donc plus ordonnée et/ou adoptait une autre conformation en présence du substrat. Elle pouvait donc jouer le rôle d'un *lid* (couvercle) ouvrant et fermant l'accès au site actif (voir figure 13).



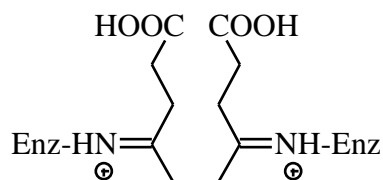
**Figure 13** : Superposition de monomères de la PBGS : sans inhibiteur (bleu clair) et complexé à l'acide lévulinique (violet). Le *lid* est représenté par le ruban en bleu foncé



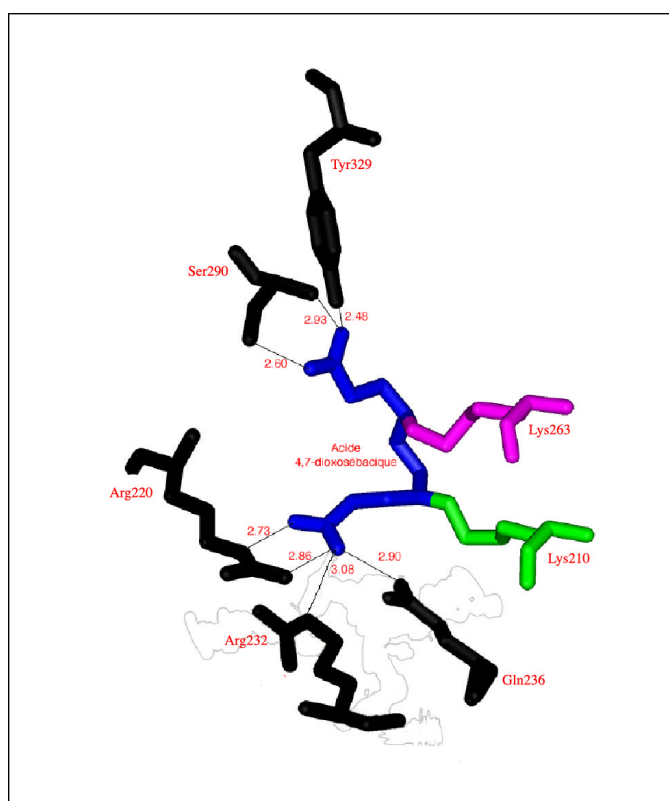
**Figure 14** : Deux composés imitant l'intermédiaire-clef du mécanisme *Jordan I*

L'analyse des structures contenant l'acide 4-oxo-sébacique (**25**) et l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) permet d'avoir une idée plus précise des interactions mises en jeu aussi bien au site P qu'au site A <sup>[52]</sup> <sup>[55]</sup>. En effet, ces deux composés étaient deux diacides comportant un squelette de dix atomes de carbones. Cette structure imitait l'intermédiaire-clef postulé dans le mécanisme de *Jordan I* (voir figure 14). Les deux groupes carboxyliques étaient à une distance idéale pour pouvoir interagir, de manière simultanée, aux deux sites de reconnaissance de l'enzyme <sup>[65]</sup>. De manière similaire à l'acide lévulinique (**24**), la reconnaissance du groupe carboxylate au site P s'effectuait via la Ser290 et la Tyr329. Le *lid* (résidus 215 à 235) se trouvait sous une conformation nettement plus ordonnée une fois l'inhibiteur lié au site actif. La reconnaissance du groupe carboxylate au site A avait lieu via des ponts d'hydrogène avec l'Arg220, l'Arg232 et la Gln236 (voir figure 16). Il est important de noter la formation d'une deuxième base de Schiff avec la Lys210 au site A de l'enzyme

(voir figure 15). Cette deuxième base de Schiff pouvait imiter la formation d'une liaison covalente au site A entre le substrat et la Lys210 de la PBGS.



**Figure 15** : Formation d'une double base de Schiff avec le composé 4,7-dioxosébacique (**26**)

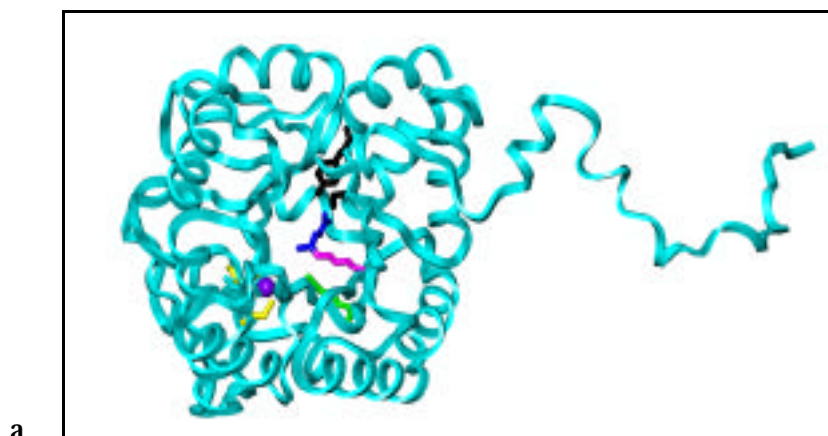


**Figure 16**: Reconnaissance du carboxylate au site A et au site P par complexation de la PBGS avec l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) en bleu. Au site P, le carboxylate forme des ponts d'hydrogène avec la Ser290 et la Tyr329 (en noir), au site A avec l'Arg220, l'Arg232 et la Gln236 (en noir). Les deux lysines sont aussi représentées : la Lys263, en violet, et la Lys210, en vert, formant la double base de Schiff avec l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) en bleu

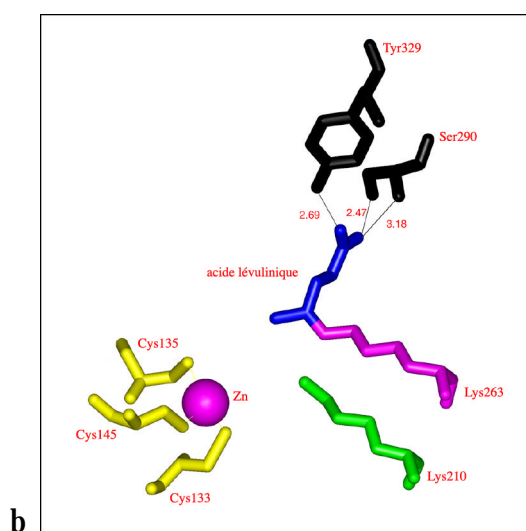
### **3.3.2 L'organisation des ions métalliques au site actif de la PBGS : comparaison entre les enzymes isolées de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli***

Les PBGS issues de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Escherichia coli* sont des enzymes contenant du zinc tandis que la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa* est une enzyme contenant du magnésium. Les rayons X montrèrent que la disposition des ions métalliques au site actif ainsi que l'activité catalytique impliquée n'étaient pas identiques pour les deux groupes.

Les données récoltées par Erskine et al. <sup>[48]</sup> <sup>[51]</sup> et Warren et al. <sup>[66]</sup> de la PBGS de la levure montraient la présence de deux zincs 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 était bien défini et présentait une géométrie de coordination tétraédrique) et un second zinc lié à une histidine et à une cystéine (His142, Cys234), présentant une densité électronique nettement moins bien définie et se trouvant dans une région assez éloignée des deux lysines (voir figure 17). Ces deux sites furent mis également en évidence par méthodes biochimiques <sup>[67]</sup>. Les analyses EXAF de Dent <sup>[68]</sup> 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 précédait le domaine de liaison du métal et que sa chaîne latérale était totalement ensevelie dans un environnement hydrophobe et donc qu'elle n'était pas accessible.



a



b

**Figure 17 :** a) Monomère de la PBGS issue de la levure complexé à l'acide lévulinique (**24**, en bleu) présentant le site de liaison du zinc bien défini (le zinc, en violet, et les trois cystéines, en jaune). b) Vue agrandie du site actif comprenant entre autres la Lys263 (en violet) formant la base de Schiff avec l'inhibiteur, la Lys210 (en vert). L'acide carboxylique de l'inhibiteur est reconnu par la Ser290 et la Tyr329 (en noir)

La structure de l'enzyme isolée d'*E. coli* et analysée par Erskine et al. mit en évidence trois sites de liaison pour le zinc (voir figure 18) <sup>[54]</sup>. La Lys195 se trouvait à une distance de 5 Å d'un ion zinc entouré de trois cystéines (Cys120, 122, 130) et d'une molécule de solvant (H<sub>2</sub>O) montrant une géométrie de coordination tétraédrique, correspondant au site du zinc extrêmement bien défini dans la structure cristalline de l'enzyme isolée de la levure.

Adjacent à la chaîne secondaire de la Lys195 se trouvait une cavité remplie d'eau et contenant entre autres un deuxième atome de zinc coordonné de manière octaédrique par un oxygène du Glu232 et par cinq molécules d'eau. Ces molécules d'eau formaient des ponts d'hydrogènes avec l'Asp169, la Gln171 et l'Asp236 voisins. Le groupe NH<sub>2</sub> de la Lys195 se trouvait à une distance de 11 Å de ce zinc, il était donc difficile d'envisager un rôle catalytique direct pour ce zinc. Par contre, il était probable qu'il participait de manière significative à la stabilité de l'octamère, car l'Arg12', appartenant à la sous-unité voisine, formait un pont hydrogène avec le Glu232 qui était lié au métal. Ce site paraissait être le site le plus probable pour la liaison du ion magnésium (activateur de la PGBS issue d'*E. coli*).

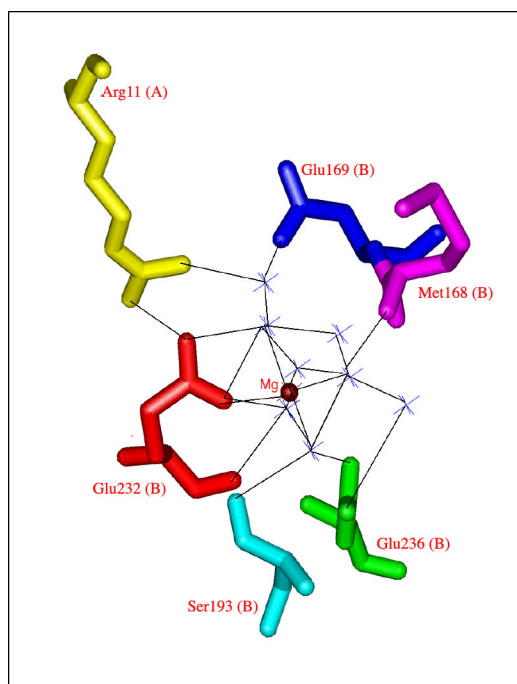
Chez *E. coli*, il existait un troisième site de liaison pour le zinc impliquant le Glu40 et l'His84. Ce site se trouvait dans une région peu conservée; il n'avait donc probablement pas une importance significative pour la catalyse.



**Figure 18** : Représentation sous forme de ruban de la PGBS issue d'*E. coli* montrant les résidus importants du site actif (Lys247 en violet, Lys195 en vert, Cys120, 122, 130 en jaune coordonnées à un atome de zinc en violet portant une molécule d'eau en rouge; le second atome de zinc en violet se coordonne au Glu232 en noir et à cinq molécules d'eau, en rouge, dont seulement deux ont été définies; le troisième atome de zinc se lie au Glu40 et à l'His84 en noir)

La structure analysée par Kervinen et al. d'*E. coli* <sup>[55]</sup> possédait le site d'activation allostérique occupé par un ion magnésium et non pas par un zinc comme celle analysée par Erskine et al. <sup>[54]</sup>. Les détails moléculaires sont représentés dans la figure 19. Comme

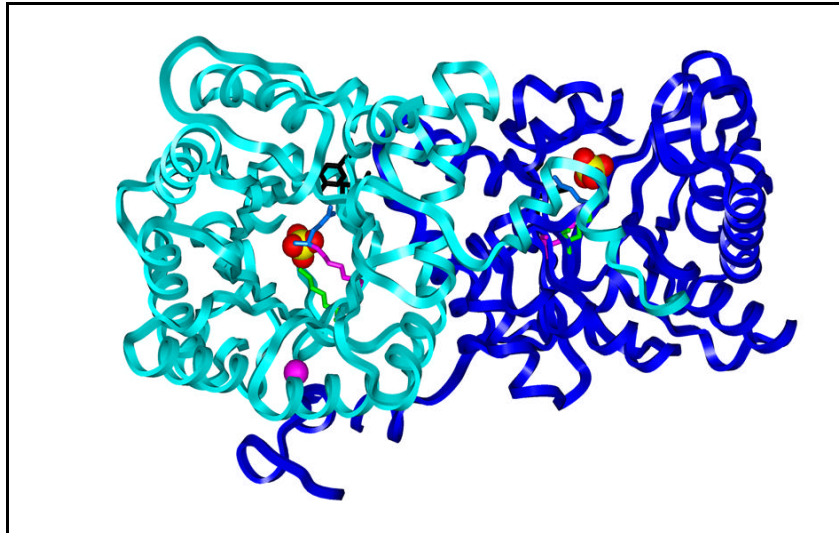
conséquence de la présence du réseau de ponts salins autour de ce magnésium, un rôle de maintien de la structure quaternaire pouvait être attribué au métal.



**Figure 19** : Sphère de coordination du magnésium au site de liaison allostérique de la PBGS d'*E. coli*

La structure minimale analysée par Kervinen et al. de la PBGS d'*E. coli* complexée à l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) était un dimère <sup>[55]</sup>. Les deux monomères contenaient l'inhibiteur et chaque monomère présentait le *lid* recouvrant le site actif avec une densité électronique bien définie. Cette structure ne permettait donc pas d'éclaircir le phénomène de *half-site reactivity* observée.

Le dimère résolu pour *P. aeruginosa* complexé à l'acide lévulinique (**24**) montrait un monomère A actif (ou fermé) et un monomère B inactif (ou ouvert) (voir figure 20) <sup>[56]</sup>. Le site actif dans le monomère A était isolé du solvant extérieur par le *lid* bien défini, tandis que pour le monomère B, le site actif était accessible depuis l'extérieur, car le *lid*, pour ce monomère, ne présentait pas une densité électronique bien définie. L'ordre observé pour le monomère A était nécessaire pour séparer le site actif du solvant extérieur et pour obtenir une enzyme catalytiquement fonctionnelle.



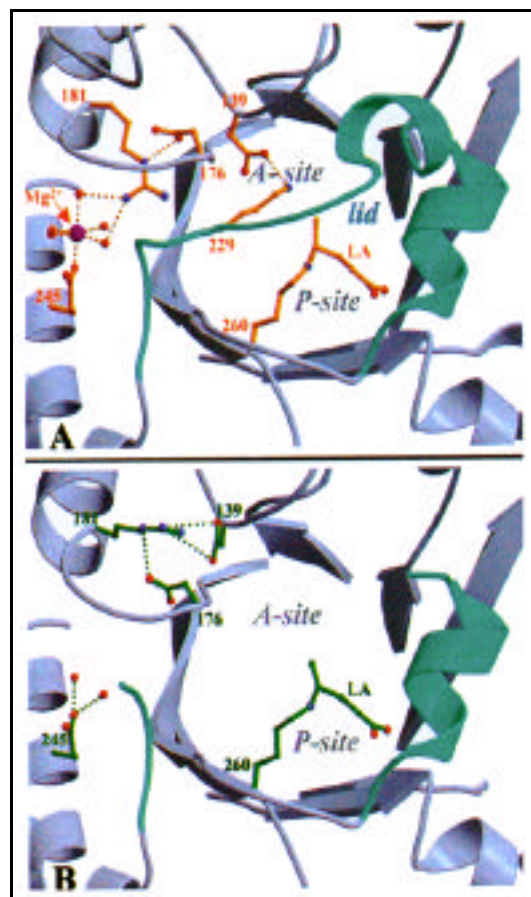
**Figure 20** : Représentation sous forme de ruban du dimère de la PBGS issue de *Pseudomonas aeruginosa* montrant les résidus importants du site actif (Lys260 en violet, Lys205 en vert, Tyr324 et Ser286 en noir, ion magnésium en violet, le sulfate en rouge et jaune)

Dans le monomère A, un ion sulfate était présent au site A. Le site A, au contraire du site P, était nettement plus hydrophile et contenait un grand nombre de résidus polaires qui interagissaient soit les uns avec les autres soit avec le ion sulfate via un réseau de molécules de solvant. De plus, deux acides aminées appartenant au *lid*, la Lys229 et l'Arg215, interagissaient avec ce ion sulfate. Dans le monomère B, on observait aussi la présence d'un ion sulfate, mais celui-ci possédait une densité électronique plus faible et ne formait des ponts d'hydrogène qu'avec l'Arg215, vu l'absence de la Lys229 (non définie).

Dans le cas de la PBGS de la levure, le zinc se coordonnait à trois cystéines. Ces cystéines étaient structurellement corrélées à l'Ala129, à l'Asp131 et à l'Asp139 de la PBGS de *P. aeruginosa*. Dans le monomère A, les chaînes secondaires de ces résidus étaient dirigées vers le site A, tandis que dans le monomère B, la chaîne secondaire de l'Asp139 adoptait une conformation totalement différente. Aucune densité électronique ne dévoilait la présence d'un ion magnésium près des aspartates ou autre part dans le site actif.

Dans le dimère, le magnésium se liait au site d'activation allostérique. Ce site n'était occupé que dans le monomère A où le magnésium était coordonné de manière octaédrique au Glu245 et à cinq molécules d'eau. Ce site était situé dans une poche à la surface de la protéine et bien ancré à celle-ci via des résidus hautement conservés, comme l'Asp179, l'Arg181, l'Asp249 et

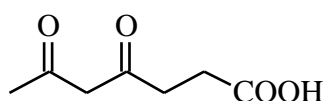
l'Arg19' appartenant au monomère B, et via ses propres ligands. En regardant de plus près le site de liaison du magnésium et le site actif dans chaque monomère, on pouvait remarquer des différences subtiles. En effet, les conformations des chaînes secondaires de l'Asp139 et l'Arg181 n'étaient pas identiques. Dans le monomère A, l'Arg181 interagissait via son N<sup>1</sup> avec deux molécules d'eau de la sphère de coordination du magnésium. Dans le monomère B, l'Arg181 interagissait avec l'Asp139. Cette interaction faisait que la chaîne secondaire de l'Asp139 pointait en dehors du site actif. Dans le monomère A, cet Asp139 était dirigé vers le site actif, et interagissait avec la Lys229 appartenant au *lid*. Dans le monomère B, cette lysine n'était pas définie. On pouvait donc postuler que l'Arg181 servait d'interrupteur en couplant ou découplant le Mg<sup>2+</sup> et le site actif. A l'état "inactif", aucun magnésium n'était lié; l'Arg181 déplaçait la chaîne secondaire de l'Asp139 vers l'extérieur du site actif. L'activation de l'enzyme avait lieu par liaison du magnésium et l'Arg181 interagissait cette fois avec des molécules de solvants en permettant ainsi à l'Asp139 de participer à la catalyse ou/et en réorganisant le *lid* au-dessus du site actif (voir figure 21).



**Figure 21** : Activation allostérique de la PBGS; comparaison des sites actifs des monomères A et B

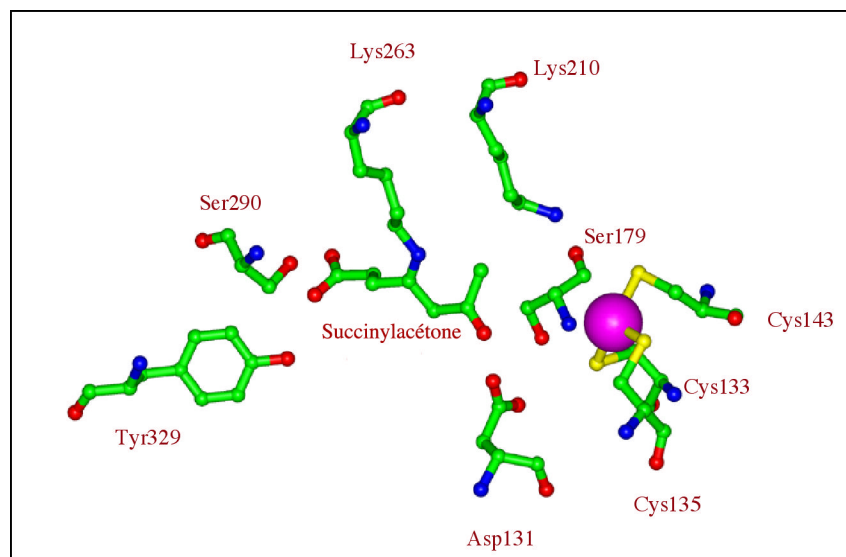
### 3.3.3 Les informations apportées par d'autres inhibiteurs que l'acide lévulinique (24) et l'acide 4,7-dioxosébacique (26)

Récemment, Erskine et al. publièrent toute une nouvelle série de structures cristallographiques de la PBGS complexée à divers inhibiteurs ainsi qu'au substrat naturel [50]. L'ALA (1) différait de l'acide lévulinique (24) par la présence d'un groupe amino en position 5 qui formait des ponts d'hydrogène avec l'Asp131 et la Ser179, ce qui impliquait que ces deux acides aminés pouvaient avoir un rôle potentiel dans la séquence réactionnelle.

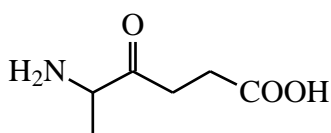


19

La succinylacétone (19) possédait un groupe céto à la place du groupe amino du substrat naturel. Ce groupe céto formait aussi des ponts d'hydrogène avec l'Asp131 et la Ser179 (voir figure 22). Il est important de signaler que la succinylacétone (19) était présente au site actif de l'enzyme sous une forme *cis-s-trans* (en tenant compte de la base de Schiff et du groupe céto). Dans le complexe succinylacétone-enzyme, la chaîne latérale de la Lys210 était déplacée exceptionnellement de 2 Å, permettant ainsi à la succinylacétone (19) de s'adapter à la cavité du site actif. Une des conséquences de ce déplacement était une désorganisation au niveau du *lid*, particulièrement dans la région comprenant les acides aminés de 225 à 235. Ce changement conformationnel important était attribué à un effet de collision en chaîne ne provenant finalement que d'une modification conformationnelle locale de la Lys210 lors de la liaison de la succinylacétone (19) à la Lys263. Il était intéressant de remarquer la présence d'une autre petite région désorganisée (résidus 22-23) sur le bras amino-terminal de monomère adjacent. Ces résidus étaient pris en sandwich entre le *lid* du site actif et le *TIM barrel* de deux dimères adjacents. Tout changement conformationnel au niveau du site actif d'un dimère pouvait donc être répercuté aux dimères voisins *via* cette région et donc la liaison du substrat ou d'un inhibiteur à un monomère pouvait influencer le *turnover* des monomères voisins.

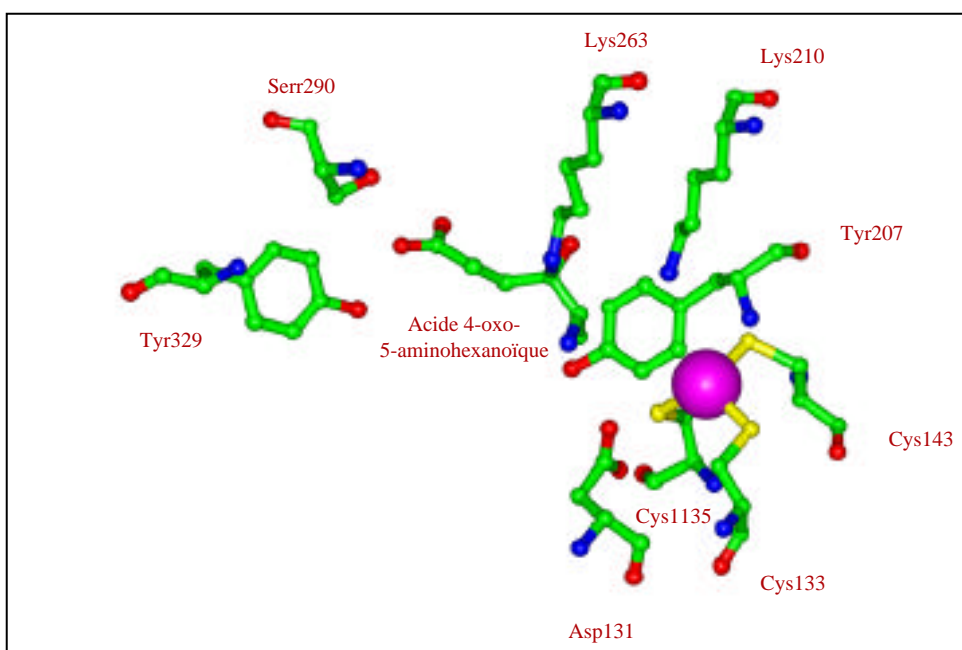


**Figure 22** : Acides aminés important impliqués dans la liaison de la succinylacétone au site actif de la PBGS



27

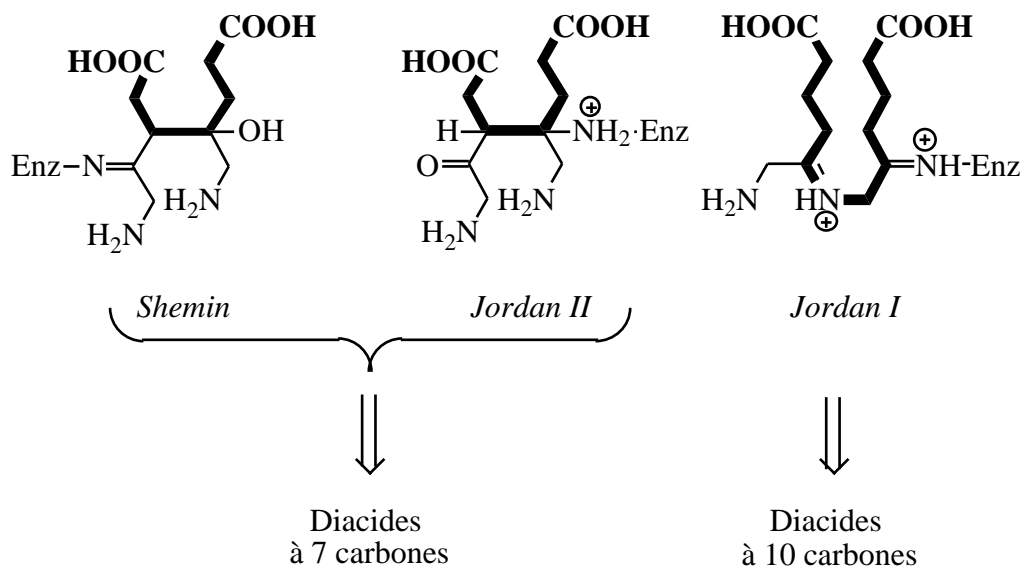
L'acide 4-oxo-5-amino-hexanoïque (**27**) était un composé intéressant. En effet il se complexait à la Lys263 de la PBGS sous forme d'une carbinolamine (voir figure 23). Une des étapes lors de la formation de la base de Schiff passe par un tel intermédiaire et il est donc possible que la présence du groupe méthyle que possède cet inhibiteur par rapport à l'ALA (**1**) permettait de stabiliser ce complexe peu commun. Cette structure singulière était maintenue par divers ponts d'hydrogène entre l'amine et la Tyr207 et l'Asp131, et l'alcool et la Lys210. Cette structure donnait un rôle important à la Lys210 dans la stabilisation de la forme carbinolamine.



**Figure 23** : Carbinolamine

### 3.4 Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse de Caroline Engeloche-Jarret

A un moment donné dans la séquence réactionnelle transformant les deux molécules d'ALA (1) en PBG (2), un intermédiaire dicarboxylate à longue chaîne est formé. Pour un intermédiaire du type *Shemin* ou *Jordan II*, l'acide présente une chaîne à sept carbones, tandis que pour un intermédiaire de type *Jordan I*, la chaîne comprend dix carbones (voir figure 24).

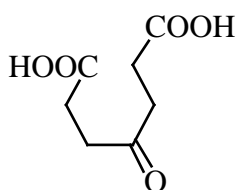


**Figure 24** : Intermédiaires diacides obtenus selon le mécanisme considéré : *Shemin*, *Jordan I* et *Jordan II*

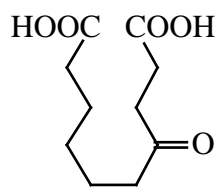
Engeloch-Jarret testa divers acides dicarboxyliques. Le plus petit présentait une chaîne à cinq carbones et le plus long, une chaîne à 12 carbones. Les acides dicarboxyliques C<sub>5</sub> à C<sub>7</sub> présentaient un comportement compétitif et interagissaient donc au niveau du site A. Les C<sub>8</sub> et C<sub>9</sub> étaient des inhibiteurs incompétitifs et impliquaient aussi bien le site A que le site P; le C<sub>10</sub> était irréversible tandis que les C<sub>11</sub> et C<sub>12</sub> étaient des slow-binders.

Les points importants qui se dégagent des résultats obtenus lors des divers tests étaient les suivants :

- Les diacides qui ne possédaient pas une fonction carbonyle à une des positions par rapport au carboxylate étaient des inhibiteurs compétitifs modérés.
- Si on remplaçait la fonction carbonyle par une fonction amide, en absence du deuxième groupe carbonyle, on obtenait un inhibiteur compétitif assez faible, l'amide ne formant pas une base de Schiff avec la lysine.



28

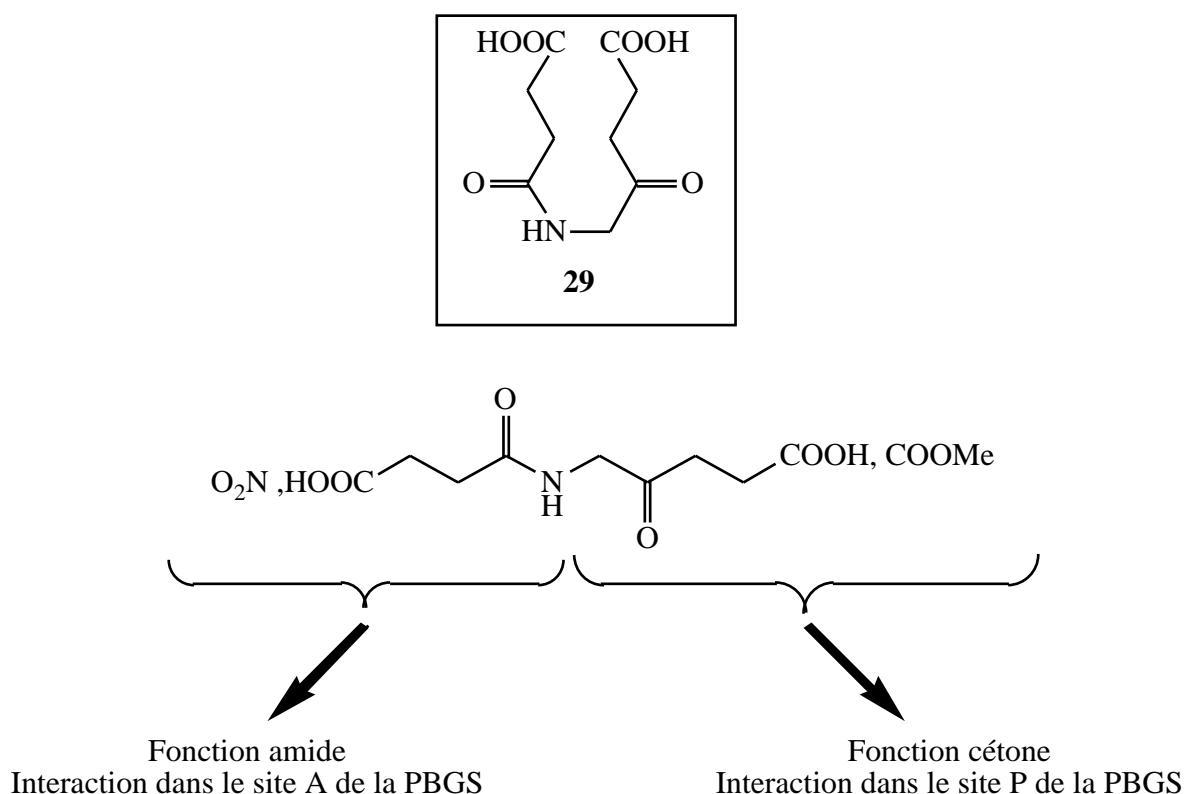


25

- Le résultat le plus important de cette série était la différence rencontrée entre le comportement de l'acide 4-oxopimélique (C<sub>7</sub>, imitant l'intermédiaire de *Shemin* ou de *Jordan II*, **28**) et l'acide 4-oxosébacique (C<sub>10</sub>, imitant l'intermédiaire de *Jordan I*, **25**). Le composé **28** montrait un comportement compétitif tandis que le composé **25** était irréversible.

A partir de ces résultats, le mécanisme postulé était celui de *Jordan I*: reconnaissance de la première molécule d'ALA (**1**) au site P et formation de la liaison C-N comme première liaison intermoléculaire.

Il était intéressant de savoir s'il était possible de modifier le type d'inhibition en jouant sur les différences d'affinité de l'enzyme pour la position 1. A partir d'un diacide C<sub>10</sub> (**29**) comprenant un carbonyle sur une des positions et une amide sur l'autre des positions (une partie pouvant former la base de Schiff tandis que l'autre pas), il était possible de définir dans quel site avaient lieu les diverses inhibitions observées. Une structure-type put être développée pour un diacide mixte irréversible (voir figure 25).

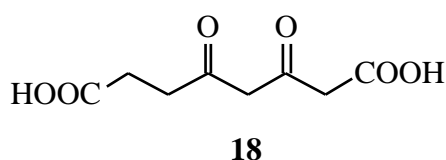
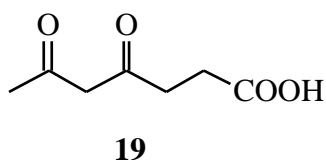


**Figure 25** : Structure-type d'un diacide mixte irréversible

La publication dans ChemBioChem traite en détails des résultats concernant ces diacides mixtes (voir chapitre 4.6).

### 3.5 La littérature existante sur les inhibiteurs de la PBGS

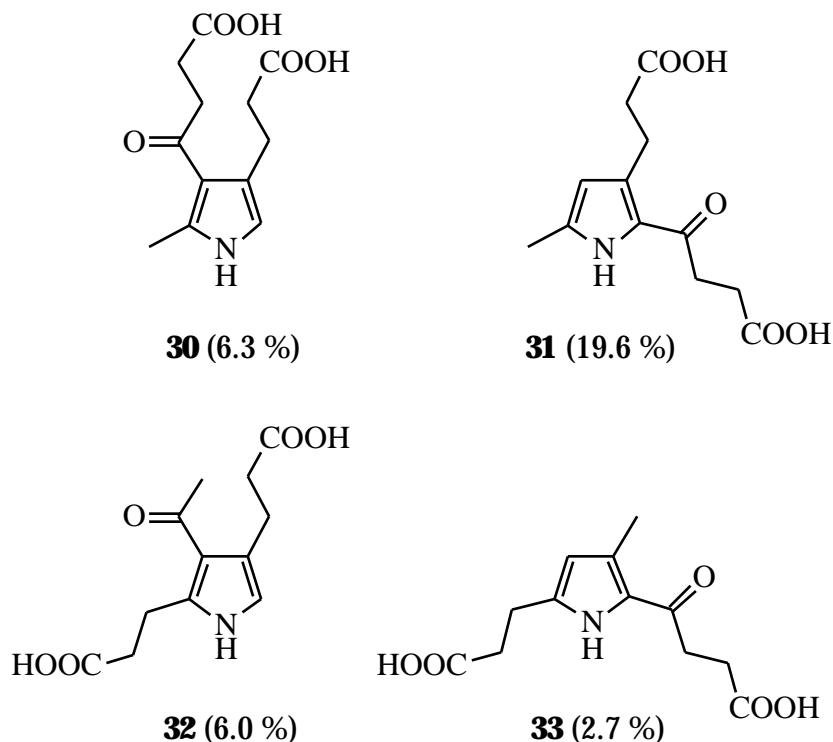
De nombreux patients, qui souffraient de tyrosiménié, montraient des symptômes caractéristiques d'une porphyrie aiguë et excrétaient de manière excessive de l'ALA (**1**) dans les urines. Lindblad et al. en 1977 isolèrent de l'urine de ces patients deux métabolites provenant de la dégradation anormale de la tyrosine : l'acide 4,6-dioxoheptanoïque ou succinylacétone (**19**) et l'acide 3,5-dioxo-octane-1,8-dioïque (**18**)<sup>[8]</sup>.



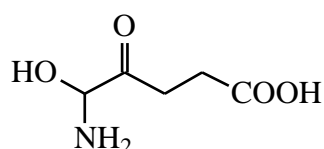
Les travaux effectués par Tschudy<sup>[10]</sup> et par Ebert<sup>[26]</sup> purent démontrer l'efficacité de cet inhibiteur sur la PBGS. En effet des concentrations de l'ordre de  $10^{-8}$  M suffisaient à inhiber l'enzyme. De plus, ils pouvaient observer une inhibition dépendante du temps, caractéristique d'un inhibiteur irréversible. L'activité enzymatique ne pouvait pas être régénérée par dialyse. Ils suggéraient que l'inhibiteur se liât au site actif à l'endroit même de la formation de la base de Schiff entre l'enzyme et le substrat naturel (ALA, **1**). Des études similaires furent effectuées sur les feuilles de l'orge par Meller et Gassman<sup>[69]</sup> <sup>[70]</sup>. En comparant les effets de l'acide lévulinique (**24**) et de la succinylacétone (**19**), ils déterminèrent que la succinylacétone (**19**) était un inhibiteur 1000 fois plus puissant que l'acide lévulinique (**24**). De plus, les deux inhibiteurs entravaient l'incorporation des acides aminés et leur reconversion en protéines.

Brumm et Friedman, en 1981,<sup>[71]</sup> constatèrent la présence d'une grande quantité d'un composé qui répondait positivement au réactif d'Ehrlich. Ce composé se formait probablement de manière non enzymatique. Ils postulèrent la formation d'un pyrrole par réaction du type Knorr entre la succinylacétone (**19**) et l'ALA (**1**). Ce SA-pyrrole (comme ils le nommèrent, **30**) montrait une inhibition nettement plus importante que la succinylacétone (**19**) :  $K_I(\text{succ}) = 400 \mu\text{M}$  et  $K_I(\text{SA-pyrrole}) = 5 \mu\text{M}$ . La synthèse de ce SA-

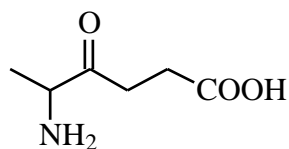
pyrrole (**30**), qui pouvait être considéré comme un pyrrole-mixte, avait été effectuée dans nos laboratoires <sup>[72]</sup>. Il en résulta la formation de quatre composés (**30** à **33**). Les mesures effectuées par Brumm et Friedman utilisaient le mélange des deux inhibiteurs, la succinylacétone (**19**) et le SA-pyrrole (**30**), pour mesurer les  $K_I$  et de plus, le SA-pyrrole (**30**) réagissait aussi avec le réactif d'Ehrlich; les deux auteurs n'expliquèrent pas de quelle manière ils pouvaient négliger cette absorbance concurrente.



Les derniers résultats concernant la succinylacétone (**19**) furent fournis par Senior et al. <sup>[73]</sup>. En comparant trois sources d'enzyme *Pisum sativum*, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*, ils constatèrent que l'inhibiteur montrait une efficacité de 2000 à 3000 fois supérieure sur la PBGS de *Pisum sativum* que sur les deux autres sources ( $K_I$  (*P. sativum*) = 0.3  $\mu$ M,  $K_I$  (*E. coli*) = 0.8 mM et  $K_I$  (*S. cerevisiae*) = 0.78 mM). Pour déterminer l'efficacité du SA-pyrrole (**30**), ce dernier fut synthétisé et testé sur les trois sources d'enzyme. Vu que ce SA-pyrrole (**30**) ne montrait aucune inhibition, ils conclurent que la succinylacétone (**19**) était à elle seule la molécule responsable de l'inhibition.

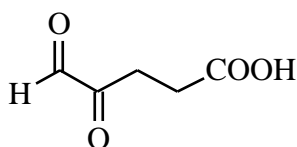


**34**

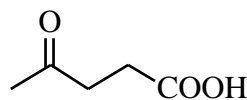


**27**

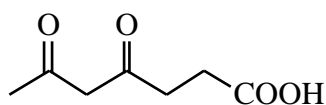
Perlman et al. <sup>[74]</sup>, testèrent l'acide 2-méthyl-2-aminolévulinique ou acide 4-oxo-5-amino-6-hydroxy hexanoïque (**34**) et comme contrôle l'acide 4-oxo-5-amino-hexanoïque (**27**) sur la PBGS issue de *Propionibacterium shermanii*. Les deux inhibiteurs montraient un comportement compétitif. Le composé **34**, avec un  $K_I = 0.73 \mu\text{M}$  (*Rhodospseudomonas spheroides*,  $K_I = 0.28 \mu\text{M}$ ) était donc un bon inhibiteur. Le composé **27** avait un  $K_I = 12.1 \mu\text{M}$ .



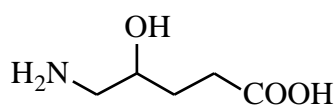
**35**



**24**



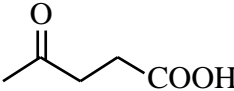
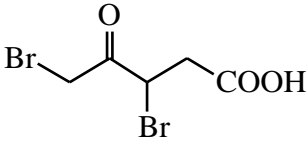
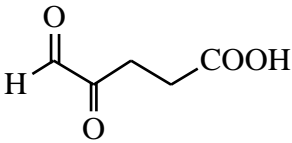
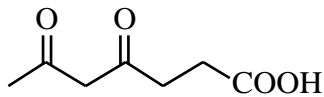
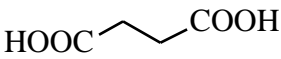
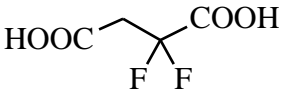
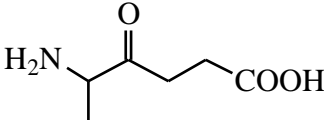
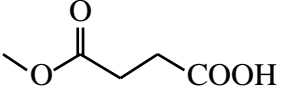
**19**



**36**

Un autre inhibiteur intéressant de la PBGS était l'acide 4,5-dioxovalérate (**35**). Ce composé était un intermédiaire connu dans le cycle succinate-glycine et pouvait être soit un précurseur de l'ALA (**1**) soit un métabolite <sup>[75]</sup>. Pour la PBGS issue de *Chlorella regularis*, cet inhibiteur présentait un  $K_I = 1.4 \text{ mM}$  <sup>[75]</sup> et pour celle issue d'*Erythrobacter sp.* OCh114, il montrait un  $K_I = 0.65 \text{ mM}$  <sup>[76]</sup>. D'autres inhibiteurs furent testés dans le cadre de ces travaux sur la PBGS issue d'*Erythrobacter sp.* OCh114 : l'acide lévulinique (**24**,  $K_I = 0.8 \text{ mM}$ ), l'acide 4,6-dioxoheptanoïque ou succinylacétone (**19**,  $K_I = 11 \mu\text{M}$ ) et l'acide 4-hydroxy-5-aminovalérique (**36**,  $K_I = 2.4 \text{ mM}$ ). Tous les trois composés avaient un comportement compétitif.

Afin de montrer de manière quasi définitive les différences ou les similitudes entre des PBGS obtenues de diverses sources (enzyme de bactérie, de plante, de levure, enzyme à zinc ou à magnésium), une étude détaillée fut entreprise par Senior et al. sur trois souches différentes de PBGS : *Escherichia coli*, *Pisum sativum* et *Saccharomyces cerevisiae* [73]. Les résultats obtenus pour les divers inhibiteurs testés sont listés dans le tableau qui suit :

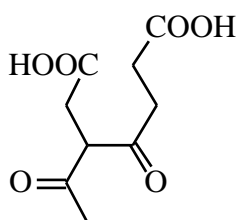
		<b>K<sub>I</sub> (en mM)</b> <b>pour</b> <i>P.sativum</i>	<b>K<sub>I</sub> (en mM)</b> <b>pour</b> <i>S.cerevisiae</i>	<b>K<sub>I</sub> (en mM)</b> <b>pour</b> <i>E. coli</i>
	<b>24</b>	1.0 comp.	2.0 comp.	2.7 comp.
	<b>37</b>	1.0 comp.	1.2 comp.	2.0 comp.
	<b>35</b>	1.0 non déterminé	non déterminé non déterminé	8.0 non déterminé
	<b>19</b>	0.3 10 <sup>-3</sup> comp.	0.78 comp.	0.8 comp.
	<b>38</b>	> 20	> 20	> 20
	<b>39</b>	7.0 comp.	7.5 comp.	7.5 comp.
	<b>27</b>	0.8 incomp.	0.2 incomp.	0.2 incomp.
	<b>40</b>	1.5 incomp.	3.0 incomp.	3.0 incomp.

	<b>41</b>	3.0 comp.	4.0 comp.	6.0 comp.
	<b>42</b>	1.0 comp.	2.0 comp.	2.0 comp.
	<b>43</b>	1.0 comp.	1.5 comp.	2.5 comp.
	<b>44</b>	1.5	0.5	1.5

**Tableau 2 :** Comparaison des KI pour divers inhibiteurs sur la PBGS issue de *P. sativum*, *E. coli* et *S. cerevisiae*

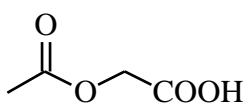
L'acide lévulinique (**24**) agissait comme un inhibiteur compétitif et montrait un  $K_I$  quasi similaire pour les trois sources de PBGS. Ce résultat indiquait que la présence de l'amine terminale n'était pas absolument nécessaire pour la liaison à l'enzyme. Des résultats similaires furent obtenus avec l'acide 3,5-dibromolévulinique (**37**); aucune alkylation de l'enzyme n'était observée, vue la réversibilité de l'inhibition. La succinylacétone (**19**) inhibait aussi de manière compétitive les trois enzymes, mais avec une activité bien différente. En effet, elle était un inhibiteur extrêmement puissant de la PBGS issue de *P. sativum* avec un  $K_I = 0.3 \mu\text{M}$ , qui était 1000 fois plus petit que celui observé pour la PBGS issue de la levure ou d'*E. coli* ( $K_I = 0.78 \text{ mM}$  et  $K_I = 0.8 \text{ mM}$ ). Senior et al. essayèrent d'imputer cette différence d'inhibition au fait que la PBGS issue des pois était une enzyme à magnésium, au contraire des deux autres qui étaient des enzymes à zinc. Si cette inhibition importante provenait de la chélation du magnésium, alors une augmentation de la concentration en magnésium lors du test aurait dû diminuer cette inhibition, ce qui n'était pas le cas. De plus, l'acide 4,5-dioxovalérique (**35**), qui est aussi un chélateur potentiel du magnésium, n'était pas un inhibiteur aussi puissant que la succinylacétone (**19**) et ne présentait pas cette préférence pour l'enzyme issue des pois. Ils ne réussirent donc pas à analyser clairement cette différence. L'acide 4-oxo-5-aminohexanoïque (**27**) et l'ester méthylique de l'acide succinique (**40**) présentaient une inhibition de type incompétitif et étaient jusque-là les premiers inhibiteurs incompétitifs décrits. Senior et al. furent les premiers à s'intéresser de manière un peu plus systématique aux composés diacides. L'acide succinique (**38**) ne montrait

pratiquement aucune inhibition et son dérivé difluoro (**39**) était un inhibiteur compétitif modéré. Ils observèrent également qu'en augmentant la longueur de la chaîne (composés **41** à **44**), la cinétique de l'inhibition passait d'un comportement compétitif (composés **41** à **43**) à un comportement incompétitif (composé **44**). Un inhibiteur très intéressant était celui présenté par Cheung et al en 1997 <sup>[77]</sup>, l'acide 3-acétyl-4-oxoheptane-1,7-dioïque (**45**). Ce composé **45** pouvait en effet imiter l'intermédiaire *Shemin* ou *Jordan II*. Une inhibition dépendante du temps fut observée pour ce composé **45**.

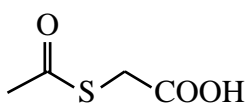


**45**

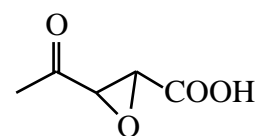
Appleton et al. publièrent en 1998 des analogues 3-oxo **46** et **47**, et 3-thio **48** et **49** de l'acide lévulinique (**24**) et de l'ALA (**1**), ainsi que des composés ayant un groupe époxyde en position 2-3 ou 5-6 **50** et **51** <sup>[78]</sup>. Les composés 3-thio **48** et **49** ainsi que le composé **50** étaient des inhibiteurs puissants de la PBGS issue de *Bacillus subtilis*, car ils modifiaient de manière irréversible un nucléophile de l'enzyme, probablement une lysine appartenant au site actif.



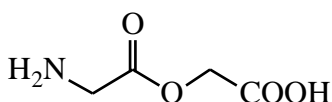
**46**, pas d'inhibition



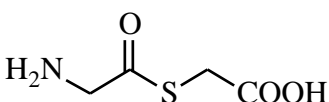
**48**,  $K_I = 100$  mM



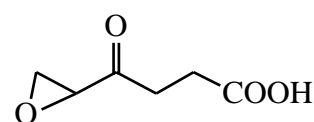
**50**,  $K_I = 6.5$  mM



**47**,  $K_I = 26$  mM

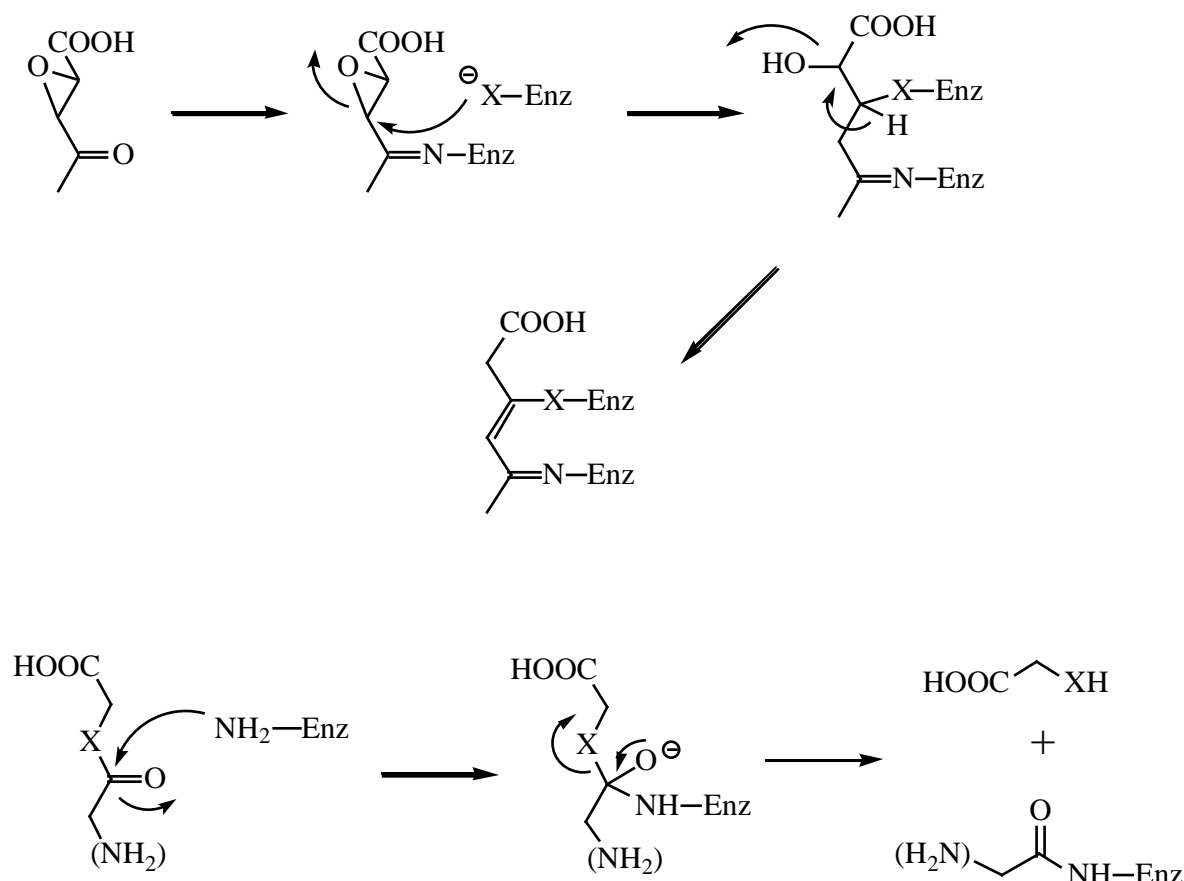


**49**,  $K_I = 1.15$  mM



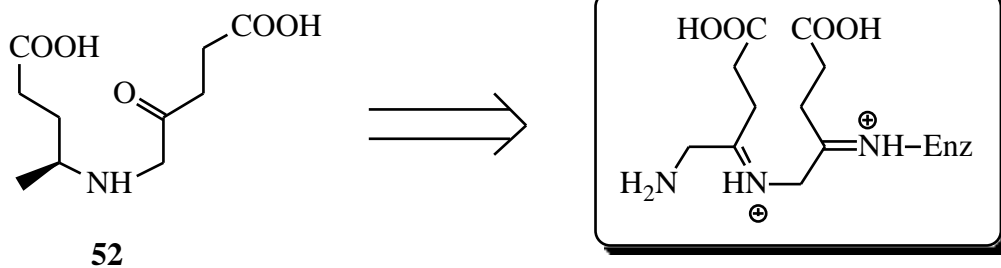
**51**,  $K_I = 1.4$  mM

Une tentative d'explication du mécanisme d'acylation de l'enzyme par les composés **47**, **48** et **49** ainsi que du mécanisme d'alkylation par les époxydes est développée dans le schéma 7 qui suit :



**Schéma 7** : Proposition de mécanisme pour la réaction de l'époxyde **50** et des composés **47**, **48** et **49** avec la PBGS (où X = O ou S)

Un point intéressant des résultats publiés par Appleton et al. était la synthèse d'un inhibiteur qui imitait un des intermédiaires postulés lors des propositions de mécanisme pour la PBGS et plus particulièrement qui imitait un bisubstrat (voir figure 26). Ce composé racémique **52** ne présentait malheureusement aucune inhibition sur la PBGS issue de *Bacillus subtilis*. Par contre, il montrait une légère inhibition avec la PBGS issue du foie de bœuf ( $K_I = 5 \text{ mM}$ ). De plus, ce composé racémique **52** se liait de manière nettement moins efficace à la PBGS que l'acide lévulinique (**24**) ( $K_I = 0.22 \text{ mM}$ ).



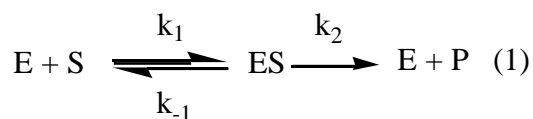
**Figure 26** : Analogue de l'intermédiaire postulé par Jordan (mécanisme *Jordan I*) et testé par Appleton et al.

## 3.6 La cinétique enzymatique et les inhibitions

### 3.6.1 La cinétique

#### 3.6.1.1 L'équation de Michaelis-Menten

Vers la fin du XIXe siècle, de nombreuses études furent menées pour expliquer le développement des réactions impliquant des enzymes <sup>[79]</sup>. La première équation de vitesse postulée par Henri en 1903 tenait compte que la vitesse initiale d'une réaction enzymatique était directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme, mais que cette vitesse augmentait de manière non linéaire avec des concentrations en substrat croissantes jusqu'à atteindre une limite maximale. On peut visualiser le cycle catalytique de la manière suivante :



L'expression générale décrivant la vitesse de cette réaction est :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (2)$$

La vitesse totale de la formation du complexe ES est donnée par la différence entre les vitesses de formation et de dégradation :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad (3)$$

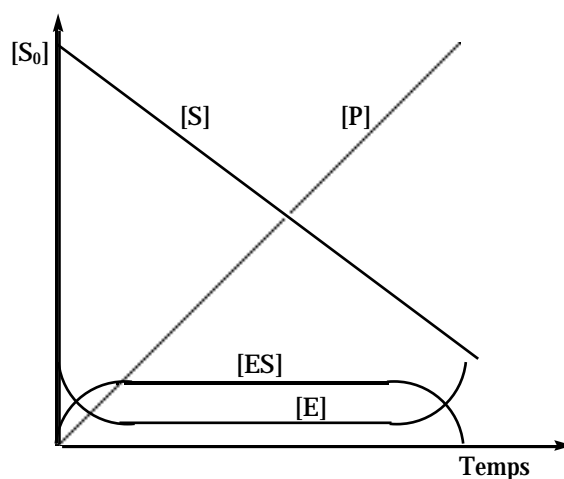
Cette équation ne peut être interprétée que si l'on émet les deux postulats suivants :

- en 1913, Michaelis et Menten admirent que  $k_{-1} \gg k_2$ , ce qui impliquait que la première étape de la réaction pouvait atteindre un équilibre <sup>[80]</sup> :

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] [S]}{[ES]} \quad (4)$$

où  $K_S$  représentait la constante de dissociation de la première étape de la réaction

- en 1925, Briggs et Haldane admirent un état stationnaire du complexe enzyme-substrat. La figure 23 montre comment les diverses entités en solution se comportent durant la réaction. Si on ne tient pas compte du début de la réaction, appelée phase transitoire, qui a un temps de vie de quelques millisecondes, la concentration en ES reste pratiquement constante jusqu'à ce que le substrat commence à manquer. La vitesse de formation du complexe ES doit être quasi égale à sa vitesse de dégradation et donc on peut écrire l'équation suivante :



**Figure 27** : Evolution des entités d'une réaction simple du type Michaelis-Menten

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (5)$$

Pour pouvoir utiliser ces équations cinétiques, il faut les exprimer en fonction d'entités quantitativement mesurables, comme la concentration totale enzymatique :

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (6)$$

En combinant les équations (3), (5) et (6), on obtient l'expression suivante :

$$[ES] = \frac{[E]_t [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

où  $K_M$ , la constante de Michaelis-Menten, qui permet de mesurer l'affinité d'un substrat à l'enzyme, est définie comme suit :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8)$$

La vitesse initiale d'une réaction peut s'exprimer à partir des entités mesurables  $E_t$  et  $S$  :

$$v = \frac{d[P]}{dt} \Big|_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_t [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

On doit encore définir la vitesse maximale  $V_{max}$  d'une réaction; cette vitesse n'est atteinte que lorsque l'enzyme est saturée par une concentration élevée en substrat :

$$V_{max} = k_2 [E]_t \quad (10)$$

En combinant les équations (8) et (9), on obtient l'équation de Michaelis-Menten, équation étant à la base de la cinétique enzymatique :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

Il est très difficile de déterminer les valeurs de  $v$ , de  $V_{max}$  ainsi que la constante de Michaelis-Menten,  $K_M$ , directement à partir du graphique de  $v$  en fonction de  $[S]$ . Pour

contourner cette difficulté, l'équation (11) peut être réarrangée de manières différentes afin de permettre des représentations graphiques linéaires.

L'équation de Lineweaver-Burk :  $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$  (12)

L'équation de Eadie-Hofstee :  $v = V_{\max} - \frac{v}{[S]} K_M$  (13)

L'équation de Hanes :  $\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S]$  (14)

### 3.6.2 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 inhibent 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.

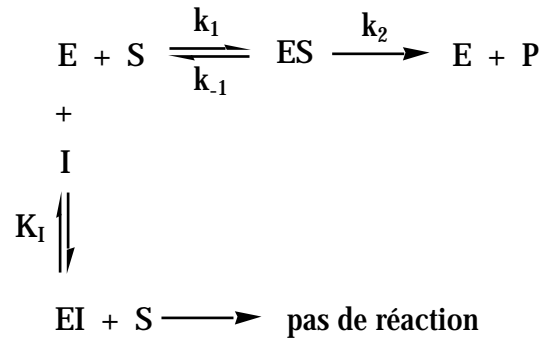
Les inhibiteurs peuvent agir de plusieurs façons avec l'enzyme et donc la cinétique enzymatique est un outil important pour différencier ces divers mécanismes.

#### 3.6.2.1 L'inhibition compétitive

De manière classique, 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.

Le modèle général pour une inhibition compétitive est donné par le schéma suivant :



**Schéma 8** : Inhibition compétitive

On admet que l'inhibiteur I se lie de manière réversible à l'enzyme et est en équilibre rapide avec lui. On peut donc définir la constante d'équilibre de l'inhibition  $K_I$  comme suit :

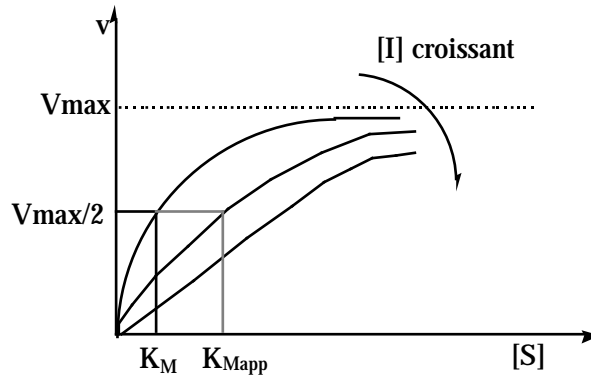
$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (15)$$

et que le complexe enzyme-inhibiteur EI est catalytiquement inactif. Un inhibiteur compétitif interagit donc en diminuant la concentration de l'enzyme libre disponible pour le substrat. La vitesse de la réaction doit être modifiée afin de tenir compte de l'inhibition :

$$v = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_t [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (16)$$

Pour simplifier, on peut définir le facteur  $\alpha$  comme étant égal à  $1 + [I]/K_I$ . L'équation (16) représente l'équation de Michaelis-Menten avec le  $K_M$  modulé par le facteur  $\alpha$  qui est exprimé en fonction de la concentration de l'inhibiteur. La figure 28 montre les courbes en fonction des diverses valeurs de  $\alpha$ . On peut remarquer que lorsque [S] tend vers l'infini, v tend vers  $V_{max}$  pour toute valeur de  $\alpha$ . Plus le facteur  $\alpha$  est important, plus la concentration en substrat doit être élevée pour atteindre le  $V_{max}$ . L'inhibiteur n'affecte donc pas le

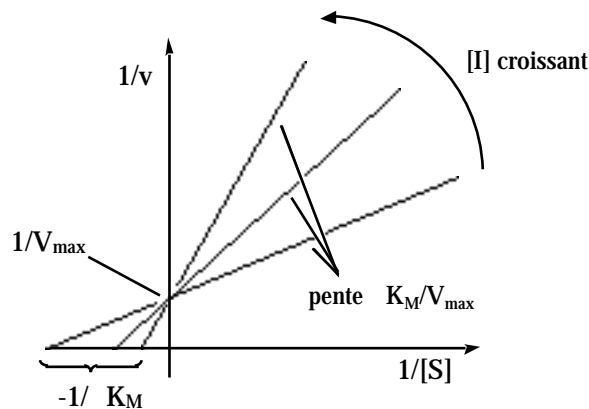
*turnover* de l'enzyme. Il aurait plutôt tendance à faire apparaître le substrat plus dilué qu'il ne l'est réellement, ou à montrer un  $K_M$  plus grand qu'il ne l'est; on observe donc un  $K_{Mapp}$ .



**Figure 28** : Représentation graphique de la vitesse ( $v$ ) en fonction de la concentration en substrat ( $[S]$ ) en présence de diverses concentrations d'un inhibiteur ( $[I]$ ) compétitif

A partir de l'équation (16), il est possible d'obtenir l'équation de Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive et les courbes qui en découlent (voir figure 29) :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (17)$$



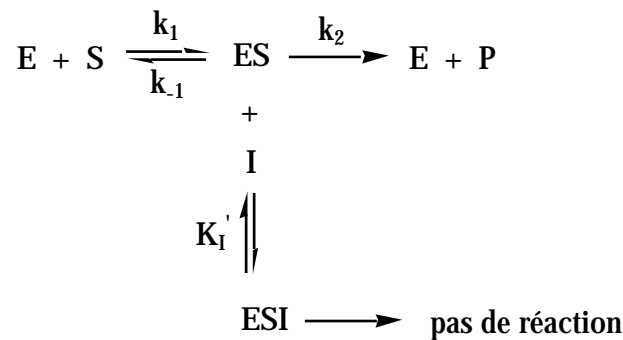
**Figure 29** : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour un inhibiteur compétitif

### 3.6.2.2 L'inhibition incompétitive

Un inhibiteur incompétitif ne peut pas se lier à l'enzyme libre. Il ne peut se lier qu'au complexe *enzyme-substrat* (voir schéma 9). Cette situation peut s'expliquer de deux manières :

- le substrat est directement impliqué dans la liaison de l'inhibiteur,
- le substrat apporte une modification conformationnelle d'un site de liaison de l'inhibiteur qui devient accessible.

Une fois que l'inhibiteur est lié à l'enzyme, cette dernière ne peut plus transformer le substrat en produit.



**Schéma 9** : Inhibition incompétitive

L'inhibiteur I se lie de manière réversible au complexe enzyme-substrat et est en équilibre rapide avec lui. On peut donc définir la constante d'équilibre d'inhibition  $K_I'$  comme suit :

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (18)$$

La liaison de l'inhibiteur incompétitif, qui ne doit pas nécessairement être un analogue du substrat, peut impliquer un changement de conformation au site actif de l'enzyme rendant celui-ci catalytiquement inactif. Si l'inhibiteur ne se lie que strictement à l'enzyme, il peut modifier l'activité catalytique sans pour autant modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

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

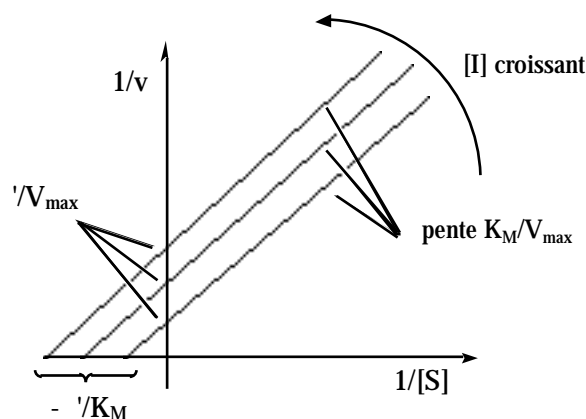
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + a' [S]} \quad \text{où } a' = 1 + \frac{[I]}{K_I'} \quad (19)$$

Si on analyse de plus près cette équation, on peut observer que pour des concentrations élevées en substrat, la vitesse  $v$  s'approche de manière asymptotique de la valeur  $V_{\max}/a'$ . Au contraire d'une inhibition compétitive, les effets de l'inhibition incompétitive ne sont pas annulés par des concentrations élevées en substrat. Pour des concentrations faibles, lorsque  $[S] \ll K_M$ , l'effet d'un inhibiteur incompétitif devient insignifiant (à l'inverse d'une inhibition compétitive).

La double réciproque de l'équation (19) est :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{a'}{V_{\max}} \quad (20)$$

En effectuant une série de graphiques du type Lineweaver-Burk, on obtient des droites parallèles pour une inhibition incompétitive (voir figure 30). La pente a une valeur  $K_M/V_{\max}$  et les courbes interceptent l'axe des  $x$  au point  $-1/K_M$  et des  $y$  au point  $1/V_{\max}$ . Pour ce type d'inhibition, autant le  $K_M$  que le  $V_{\max}$  sont affectés par la présence de l'inhibiteur.



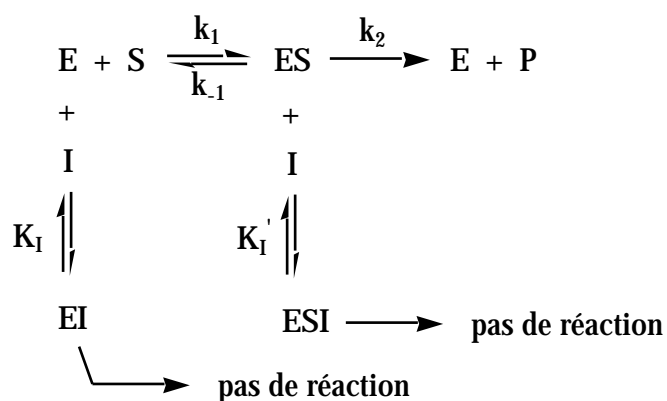
**Figure 30** : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour un inhibiteur incompétitif

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.

### 3.6.2.3 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 et l'on peut appliquer le modèle suivant :



**Schéma 10** : Inhibition mixte

Dans ce cas, on admet que la liaison de l'inhibiteur soit dans les deux situations réversibles, mais les constantes d'équilibre d'inhibition sont différentes :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (15) \quad \text{et} \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (18)$$

Il est probable qu'un inhibiteur mixte se lie aussi bien au site du substrat qu'au site de la catalyse.

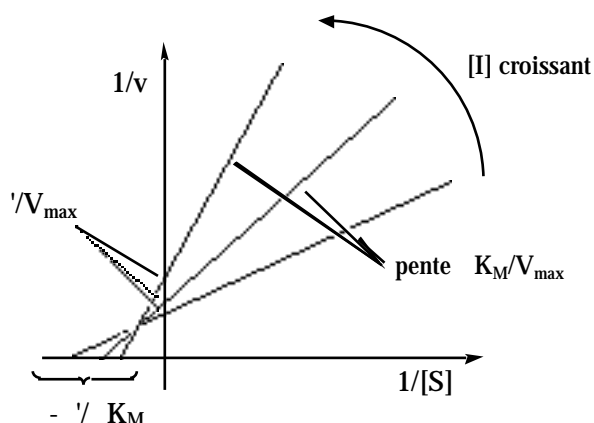
L'équation de Michaelis-Menten pour une inhibition mixte devient :

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S] + \frac{[S][I]}{K_I}} \quad (21)$$

et la double réciproque est :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (22)$$

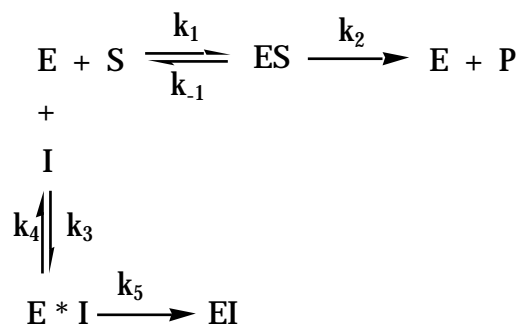
Cette équation décrit une droite de pente  $K_M/V_{max}$  qui intercepte l'axe des y au point  $1/V_{max}$  et des x au point  $-1/K_M$  (voir figure 31).



**Figure 31** : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour un inhibiteur mixte

### 3.6.2.4 L'inhibition irréversible <sup>[81]</sup>

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. En général, il y a formation d'une liaison covalente.



**Schéma 11** : 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. Vu que généralement l'étape déterminant la vitesse est celle transformant le complexe ES en EP 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. Au contraire d'une inhibition réversible qui établit rapidement l'équilibre entre l'inhibiteur et l'enzyme, une inhibition irréversible est progressive et augmente avec le temps jusqu'à ce que tout l'inhibiteur ou toute l'enzyme soit transformé en un complexe *enzyme-inhibiteur*.

Si du substrat est ajouté, une fois la réaction complétée entre l'inhibiteur et l'enzyme, le système obtenu va obéir à nouveau aux lois de Michaelis-Menten. La valeur du  $K_M$  va donc être identique, mais l'on observera un  $V_{max'}$  (plus petit) plutôt que le  $V_{max}$  :

- en absence d'un inhibiteur :  $V_{max} = k_{cat} [E_0]$  (23)

- en présence d'un inhibiteur :  $V_{max'} = k_{cat} ([E_0] - [I_0])$  (24)

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

### 3.6.2.5 L'inhibition slow-binder

On définit un inhibiteur classique comme une substance exerçant son pouvoir d'inhibition à des concentrations considérablement supérieures à celle de l'enzyme. Il existe par contre des substances qui sont des inhibiteurs à des concentrations comparables à celles de l'enzyme. Easson et Stedman<sup>[82]</sup> furent les premiers à mentionner ce type de comportement. En effet, en étudiant l'effet d'un inhibiteur, la prostigmine, sur la choline estérase, ils rencontrèrent des difficultés à montrer la nature réversible de la réaction entre l'enzyme et l'inhibiteur. En postulant la réversibilité de cette réaction, ils supposèrent que la vitesse de la dissociation du complexe était nettement plus lente que celle de la formation du complexe. L'équilibre était atteint après neuf heures et donc il fallait estimer qu'un intervalle de temps nettement plus important était nécessaire pour enlever l'inhibiteur de l'enzyme par dialyse.

Une description quantitative de ce type de comportement ne peut pas se baser sur les équations de Michaelis-Menten; en effet les lois de Michaelis-Menten impliquent que la

concentration de l'enzyme totale soit nettement inférieure à la concentration totale de l'inhibiteur. Pour ce genre de substance, cette approximation n'est plus valable. Vu que ces inhibiteurs interagissent à des concentrations comparables à celle de l'enzyme, la formation du complexe enzyme-inhibiteur résulte en une diminution drastique de la concentration de l'inhibiteur; il faut donc tenir compte de cette réduction pour définir le comportement cinétique.

Il est important de souligner que ces inhibiteurs montrent bien des comportements *réversibles*. 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 <sup>[83]</sup> :

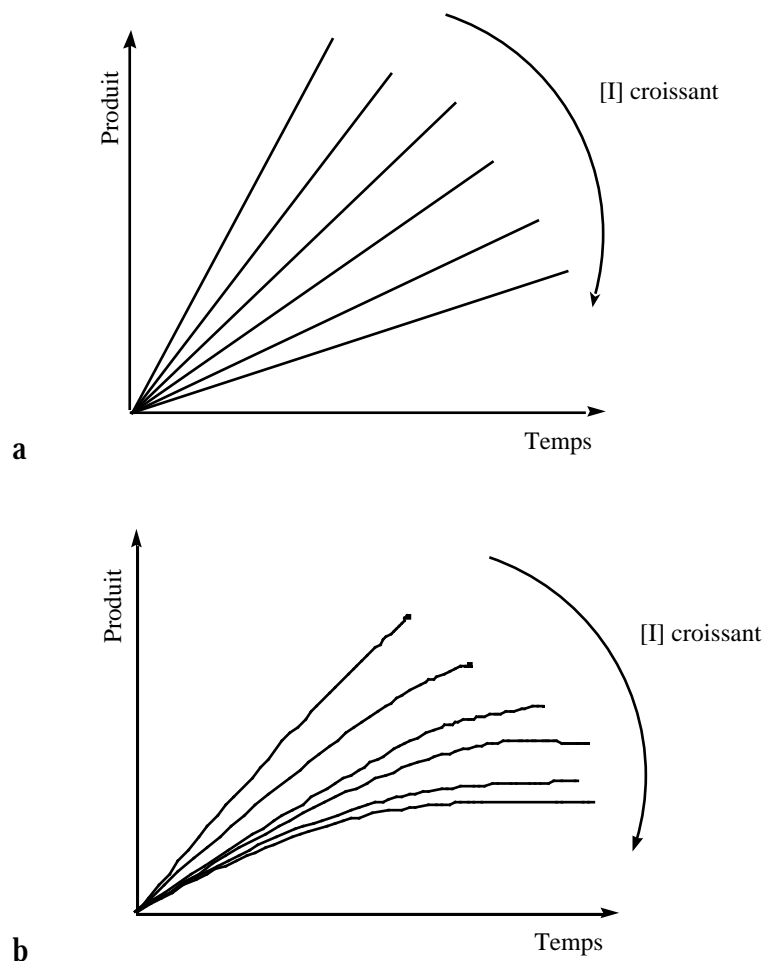
Classe d'inhibiteur	Caractéristiques	
	Rapport $[I]_{tot}/[E]_{tot}$	Etablissement de l'équilibre $E + I \rightleftharpoons EI$
<i>classique</i>	$[I]_{tot} \gg [E]_{tot}$	rapide
<i>tight binding</i>	$[I]_{tot} \approx [E]_{tot}$	rapide
<i>slow binding</i>	$[I]_{tot} \gg [E]_{tot}$	lent
<i>slow, tight binding</i>	$[I]_{tot} \approx [E]_{tot}$	lent

Les équations permettant de définir la cinétique des inhibiteurs *tight binding*, *slow binding* et *slow tight binding* furent d'abord élaborées grossièrement par Easson et Stedman <sup>[82]</sup>, puis affinées par les études menées par Morrison <sup>[84]</sup> et par Cha <sup>[85]</sup>.

La dépendance de l'inhibition par rapport au temps est un comportement connu depuis longtemps et est attribuée à des inhibiteurs irréversibles, comme les réactifs chimiques modifiant de manière spécifique des acides aminés, ou à des substances provoquant l'inactivation de l'enzyme. Morrison et Walsh <sup>[83]</sup> donnèrent une définition permettant de caractériser l'inhibition dépendante du temps pour des inhibiteurs réversibles : "*Such compounds have been called slow binding inhibitors to convey the idea that binding is the establishment of the equilibria between enzyme, inhibitor, and enzyme-inhibitor complexes, occurs slowly on the steady-state scale of seconds to minutes*". La formation du complexe

enzyme-inhibiteur, présentant une durée de vie de la seconde à la minute, est dominée par des vitesses de dissociation lentes et par des vitesses de formation lentes ou rapides. Par comparaison, dans le cas d'un inhibiteur classique, l'équilibre est atteint en quelques millisecondes.

Il est intéressant de comparer les courbes obtenues lors d'une inhibition causée par un inhibiteur classique et par un inhibiteur slow binding (voir figure 32). En présence d'un inhibiteur classique, la vitesse de la réaction reste linéaire tant qu'il reste du substrat à disposition. Pour un inhibiteur slow binding, durant les premières millisecondes, les courbes sont identiques à celles obtenues pour un inhibiteur classique; il y a donc une première phase extrêmement rapide de la réaction qui est suivie par un état quasi stationnaire présentant une vitesse de réaction nettement plus lente. Cette vitesse diminue lorsqu'on augmente la concentration de l'inhibiteur slow binding.



**Figure 32** : Courbes comparant l'effet d'un inhibiteur classique (a) et d'un inhibiteur slow binding (b) sur la formation du produit de la réaction enzymatique

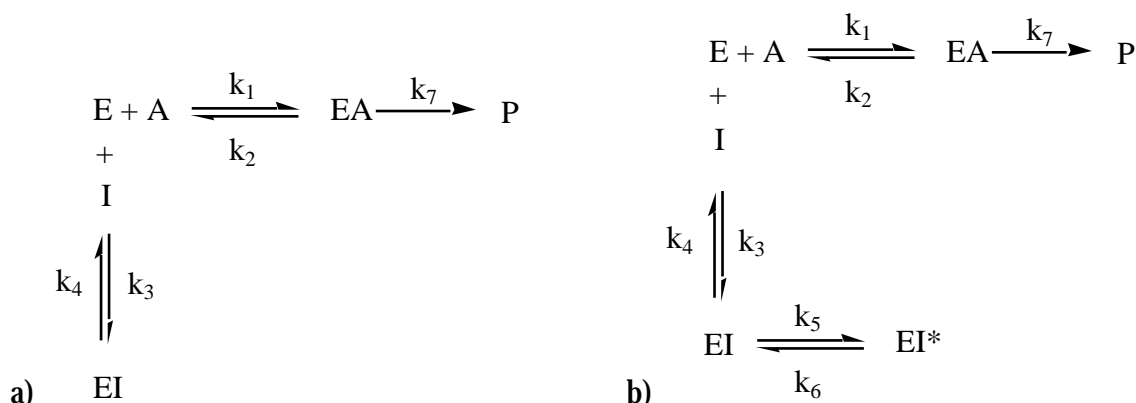
Si la vitesse de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur est tellement lente à devenir négligeable, on peut pratiquement parler d'inhibition irréversible.

La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme peut impliquer une simple, mais rapide interaction au niveau du site actif selon le mécanisme a) proposé dans le schéma 12. La constante de dissociation  $K_I$  pour la réaction  $E + I \rightleftharpoons EI$  est définie comme suit :

$$K_I = \frac{k_4}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (15)$$

L'inhibition slow binding peut aussi être obtenue à cause d'une faible valeur de la constante de vitesse  $k_3$ . Cette faible valeur de  $k_3$  peut être expliquée par des barrières énergiques rencontrées par l'inhibiteur lorsqu'il se lie au site actif de l'enzyme.

Si  $k_4 \ll k_3$ , alors la réaction apparaît comme étant irréversible.



**Schéma 12 :** Mécanismes de base proposés pour tenir compte de l'effet slow binding et slow tight binding sur la réaction enzymatique

L'effet slow binding peut aussi s'expliquer par la formation rapide d'un complexe enzyme-inhibiteur (EI) qui subit ensuite une lente isomérisation en un complexe  $EI^*$  selon le mécanisme b) proposé dans le schéma 12. L'équation pour la constante de dissociation  $K_I^*$  de ce complexe  $EI^*$  est :

$$K_I^* = \frac{[E][I]}{[EI] + [EI^*]} = \frac{K_I k_6}{k_5 + k_6} \quad (25)$$

Si  $k_5 \gg k_6$ ,  $K_I \gg K_I^*$  et l'équilibre est du côté de la formation du complexe  $EI^*$ . Si  $k_5 \ll k_6$ ,  $K_I \approx K_I^*$  et la formation du complexe  $EI^*$  devient insignifiante; l'inhibition est ramenée à un cas classique.

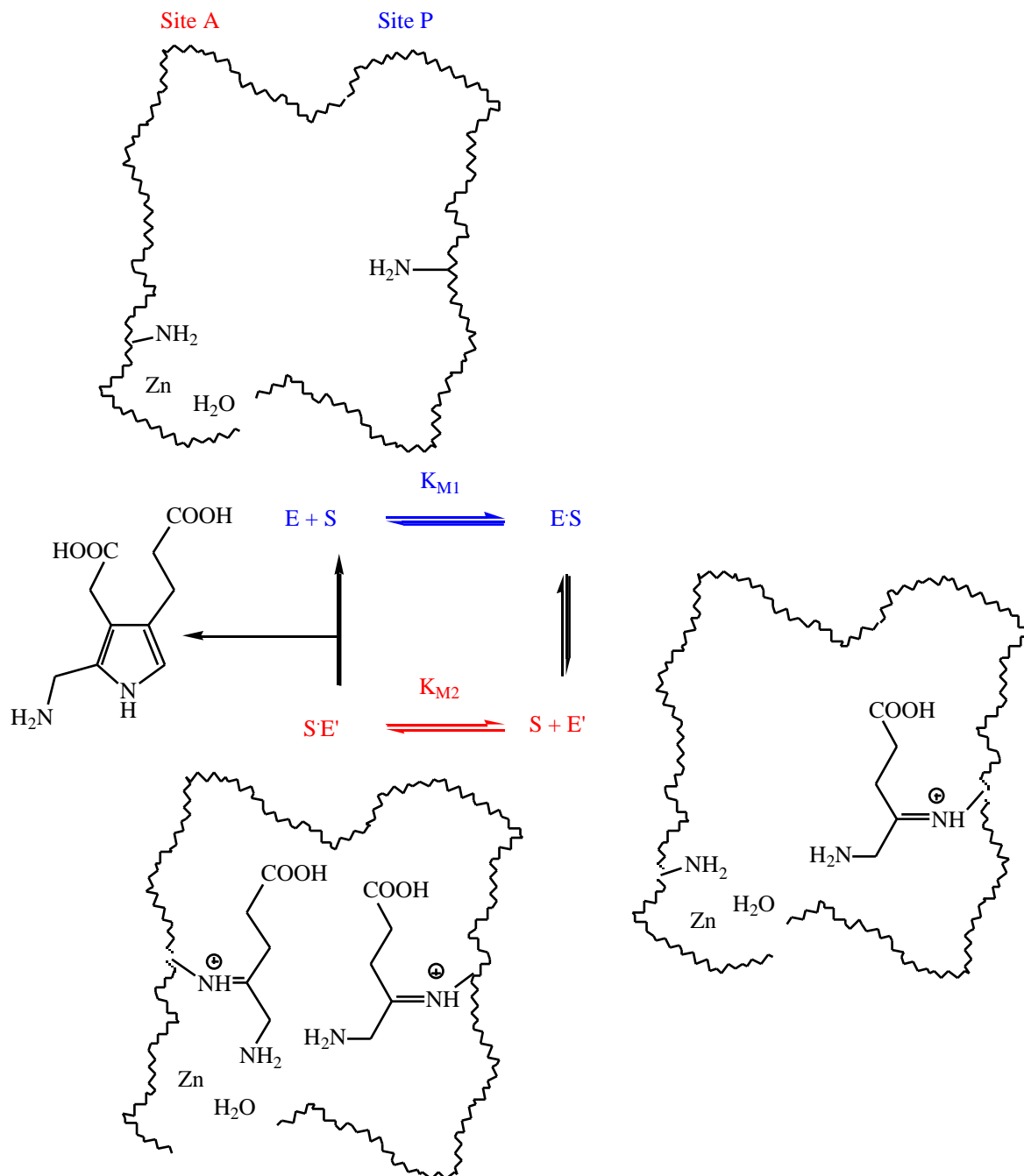
Une inhibition *slow binding* décrit l'augmentation de l'inhibition ou la diminution de la vitesse de la réaction en fonction du temps. Ainsi, pour une inhibition suivant le mécanisme b),  $K_I^*$  doit être plus petit que  $K_I$  et pour cela, comme on vient de le dire,  $k_5 \gg k_6$ . De plus, les valeurs de  $k_5$  et de  $k_6$  doivent être suffisamment grande pour que l'on puisse observer l'établissement de l'équilibre entre l'enzyme et l'inhibiteur. Mais si ces valeurs sont trop élevées, l'équilibre entre  $EI$  et  $EI^*$  va s'établir si rapidement, avant le début du suivi de la réaction, que l'on ne pourra pas observer la réaction d'isomérisation. Inversement, si ces valeurs sont trop basses, la formation du complexe  $EI^*$  ne pourra être observée tant qu'il n'y aura pas une utilisation importante de l'inhibiteur.

L'inhibition *slow binding* implique donc non seulement une conversion lente du complexe  $EI$  en  $EI^*$ , mais aussi que la vitesse d'isomérisation inverse ( $k_6$ ) soit plus petite que la vitesse d'isomérisation ( $k_5$ ). Dans une situation extrême, impliquant  $k_6$  tendant vers zéro, l'inhibiteur devient un inhibiteur irréversible *active-site directed*.

### 3.6.3 La PBGS : deux substrats identiques et un produit

#### 3.6.3.1 La cinétique enzymatique de la PBGS

La PBGS catalyse une réaction impliquant la condensation de deux substrats identiques (voir schéma 13). On serait donc en droit d'attendre une cinétique de second ordre, pourtant les données expérimentales montrent assez clairement une cinétique de premier ordre, comme celle décrite par les équations de Michaelis-Menten. Malheureusement, il n'est pas vraiment concevable d'expliquer la cinétique observée simplement par les lois de Michaelis-Menten.



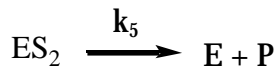
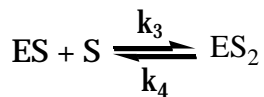
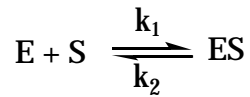
**Schéma 13 :** Cinétique de la PBGS (où  $E' = E S$ )

Les premiers qui se sont évertués à trouver les équations applicables à la PBGS furent Granick et Mauzerall en 1958 <sup>[86]</sup>. En se basant sur leurs études, deux schémas réactionnels doivent être considérés :

a)



b)



**Schéma 14** : Deux propositions pour expliquer la cinétique de la PBGS

Le schéma 14a) montre une première condensation non enzymatique conduisant à la formation d'un dimère, une imine, qui ensuite sert de substrat à la réaction enzymatique. Si cette condensation était l'étape déterminante pour la vitesse, alors la concentration de l'enzyme ne pourrait influencer en aucune manière la vitesse de formation du produit. Si cette première étape était extrêmement rapide et que seulement une faible quantité de  $S_2$  était formée, on devrait alors observer une cinétique de second ordre, ce qui n'est pas le cas. Vu que moins de 10 % du substrat S était trouvé sous la forme imine à  $\text{pH} = 6.8$ , ce postulat réactionnel fut rejeté.

La formation du complexe  $ES_2$  pour le schéma 14b) 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, vu qu'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.

En appliquant le concept de *steady-state* au schéma 14b), il est possible de décrire la cinétique rencontrée pour la PBGS; la vitesse initiale est décrite par l'équation suivante :

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \left[ \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right] \frac{1}{S_0} + \frac{k_2}{k_1} \frac{k_4 + k_5}{k_3} \frac{1}{S_0^2}} \quad (26)$$

Pour pouvoir observer une cinétique de Michaelis-Menten, on doit simplifier l'équation ci-dessus et pour cela, on doit négliger le terme  $1/S_0^2$ ; ce terme devient négligeable dans le cas où (voir annexe 1) :

$$S_0 \frac{k_2}{k_1 + \frac{k_3 k_5}{k_4 + k_5}} \quad (27)$$

et  $k_5$  est petit

L'équation simplifiée de Granick-Mauzerall est donc la suivante :

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \left[ \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right] \frac{1}{S_0}} = \frac{k_5 E_0 S_0}{S_0 + \left[ \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right]} \quad (28)$$

Il est important de pouvoir déterminer les constantes de Michaelis-Menten pour les deux substrats se liant à l'enzyme. La méthode de calcul utilisée pour déterminer les deux  $K_M$  se réfère à celle mise au point par Neuhaus <sup>[87]</sup> et reprise par Zawadzke et al. <sup>[88]</sup> et par Ellsworth et al. <sup>[89]</sup> pour la D-alanine : D-alanine ligase. En effet, cette enzyme est aussi une enzyme à deux substrats identiques conduisant à un seul produit; elle présente deux sites de reconnaissance, chaque site étant spécifique à l'un des deux substrats et possédant un  $K_M$  propre. On peut schématiser la séquence réactionnelle de la PBGS ainsi que définir l'équation de la vitesse de la manière suivante (voir annexe 2) :



$$K_{M1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{et} \quad K_{M2} = \frac{[ES][S]}{[ES_2]} \quad (30)$$

$$\frac{dP}{dt} = v = \frac{V_{\max} [S]^2}{K_{M1} K_{M2} + K_{M2} [S] + ([S])^2} \quad (31)$$

Comme pour les relations suivant les lois de Michaelis-Menten, il est possible d'obtenir la double réciproque de l'équation 31 ainsi que cette même équation réarrangée de manière à pouvoir évaluer directement les  $K_{M1}$  et  $K_{M2}$  :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_{M2}}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{K_{M1} K_{M2}}{V_{\max}} \frac{1}{([S])^2} \quad (32)$$

$$[S] \left( \frac{1}{v} - \frac{1}{V_{\max}} \right) = \frac{K_{M2}}{V_{\max}} + \frac{K_{M1} K_{M2}}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (33)$$

A partir de l'équation 32, qui est une équation du type parabolique, il est possible de déterminer le  $V_{\max}$  en traçant une courbe  $1/v$  en fonction de  $1/[S]$  et en effectuant une régression du type polynomiale du second degré; le  $V_{\max}$  est obtenu en prenant la valeur inverse de la constante  $M0$  (définie par Kaleidagraph). L'équation 33 est une relation linéaire. En dessinant le graphique correspondant à cette équation 33, c'est-à-dire une droite  $[S] (1/v - 1/V_{\max})$  en fonction de  $1/[S]$ ,  $K_{M2}$  peut être évalué à partir de l'ordonnée à l'origine tandis que  $K_{M1}$  à partir de la pente de cette droite. La vitesse  $v$  est calculée à partir de l'équation suivante :

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{n \text{ ABS } 10^6}{l t} \quad (\text{unité : } \mu\text{M/min}) \quad (34)$$

où  $l = 1 \text{ cm}$ ,  $\epsilon = 62'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , ABS = absorbance à 554 nm,  $n$  = facteur de dilution (3.33)

Selon les calculs effectués par Engeloach-Jarret<sup>[90]</sup>, pour pouvoir observer une influence du terme  $1/([S])^2$  sur  $1/v$ , il est nécessaire que la concentration du substrat se situe entre les deux valeurs de  $K_M$ , c'est-à-dire qu'il faut utiliser dans les tests des concentrations inférieures à 80  $\mu\text{M}$  de l'ALA (1) (valeur correspondant au  $K_{M2}$ ). Les premières mesures donnèrent une valeur pour  $K_{M1} = 4.9 \mu\text{M}$  et pour  $K_{M2} = 66 \mu\text{M}$ .

### 3.6.3.2 Les inhibitions appliquées à une enzyme à deux substrats identiques comme la PBGS

#### 3.6.3.2.1 L'inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif, dans le cas de la PBGS, entre en compétition avec la liaison du second substrat. Par analogie aux équations définies pour la D-alanine:D-alanine ligase <sup>[89]</sup>, l'équation de la vitesse pour un tel inhibiteur est la suivante :

$$v = \frac{V_{\max} [S]^2}{K_{M1} K_{M2} + K_{M2} [S] \left[ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + [S]^2} \quad (35)$$

Il est possible d'apporter une simplification à cette équation 35, lorsqu'on travaille dans un domaine de concentration pour le substrat équivalant au  $K_{M2}$ . Dans le cas de la D-alanine:D-alanine ligase, ils posent que  $K_{M1} \ll K_{M2}$ , vu que le  $K_{M1}$  est 1000 fois plus petit que le  $K_{M2}$  pour leur enzyme, et il est donc possible de négliger le terme  $K_{M1} K_{M2}$  du dénominateur; dans ces conditions, l'équation 35 devient équivalente à l'équation 36 :

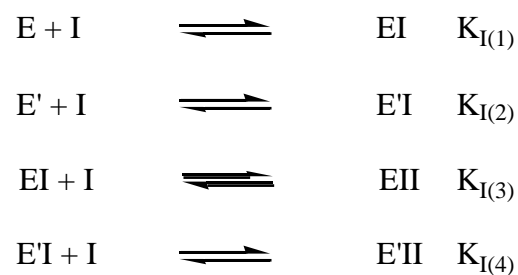
$$v = \frac{V_{\max} [S]^2}{K_{M2} [S] \left[ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + [S]^2} \quad (36)$$

Il est important de déterminer si cette équation simplifiée 36 peut être utilisée comme base dans les tests d'inhibition. Pour cela, de manière analogue aux calculs effectués pour la réaction non inhibée (voir chapitre 4.2, tableau 7), il est possible de calculer le pourcentage d'erreur sur la vitesse; vu que l'on peut poser que le facteur  $(1 + [I]/K_I)$  a comme valeur minimale 1, l'équation 36 se réduit à l'équation de Michalis-Menten et le pourcentage d'erreur est équivalent à celui calculé pour la réaction non inhibée. Dans le domaine de concentrations choisi pour les tests d'inhibition (80  $\mu\text{M}$  - 400  $\mu\text{M}$ ), l'équation de Michaelis-Menten peut être utilisée sans autre.

### 3.6.3.2.2 L'inhibition incompétitive

Le comportement incompétitif, dans le cas d'une enzyme à deux substrats identiques comme la PBGS, est nettement plus difficile à interpréter que dans le cas d'un comportement compétitif. En effet, les inhibiteurs incompétitifs interagissent aussi bien dans le site A que dans le site P, amenant donc à des interactions nettement plus complexes avec l'enzyme.

Le schéma d'inhibition peut être décrit de la manière suivante :



**Schéma 15** : Description de l'inhibition pour un inhibiteur incompétitif, inhibition dans les deux sites

L'expression de la vitesse devient complexe puisqu'il faut tenir compte de plusieurs constantes d'inhibition (équation développée par Engeloch-Jarret) :

$$v = \frac{V_{\max} [S]^2}{K_{M1} K_{M2} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{I(1)}} + \frac{[I]^2}{K_{I(1)} K_{I(3)}} \right) + K_{M2} [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_{I(2)}} + \frac{[I] K_{M1}}{K_{I(1)} K_{I(4)}} \right) + [S]^2}$$

## 4 Résultats et Discussion

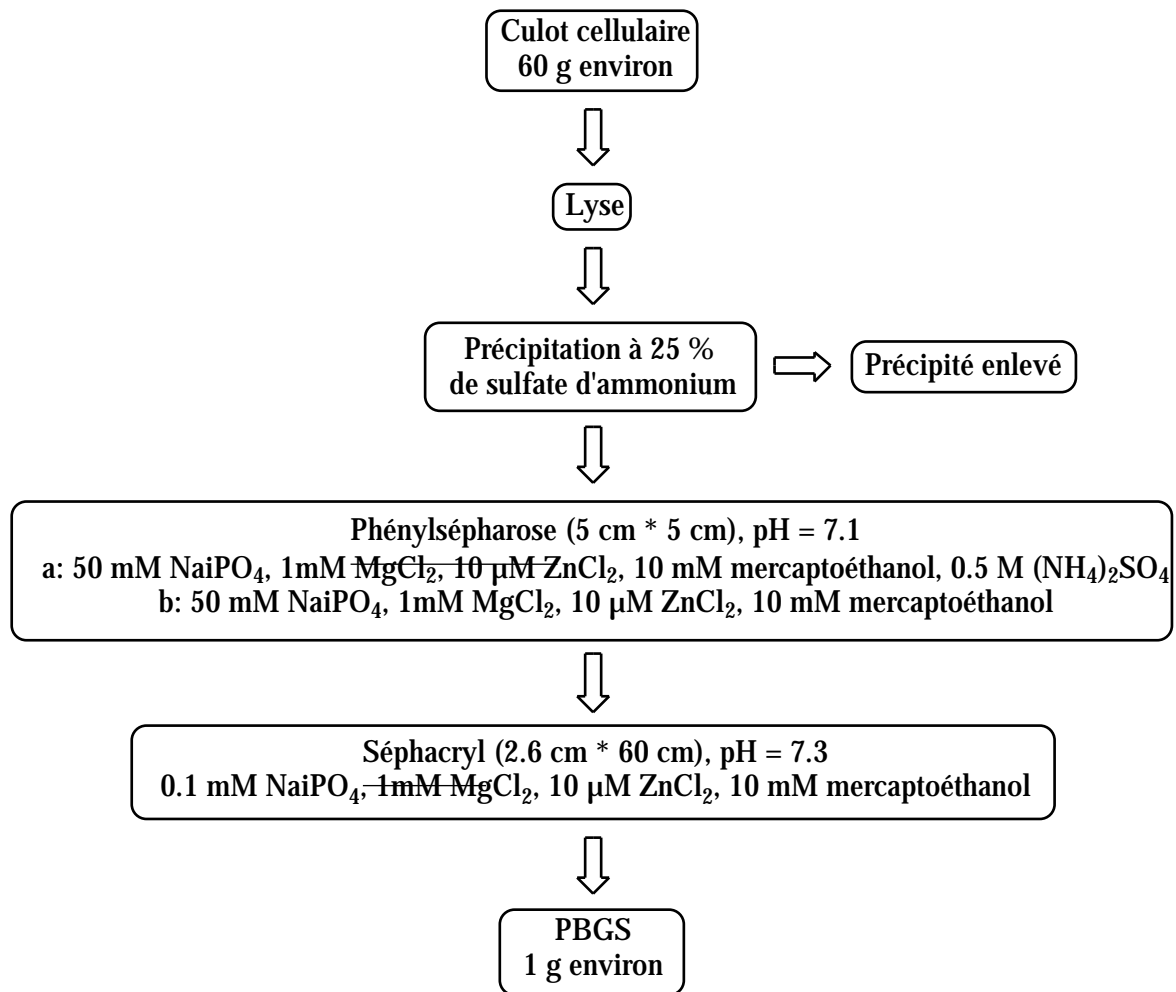
### 4.1 La purification de la PBGS

La purification de l'enzyme issue d'*E. coli* était basée sur la méthode mise au point par Henz<sup>[91]</sup>. Les bactéries contenaient le plasmide pUC 19 ainsi que le gène *hemB* codant pour la PBGS<sup>[18]</sup>.

Les bactéries étaient stockées dans des Eppendorfs à -80°C. Pour initier une nouvelle culture, il suffisait de gratter à l'aide d'une anse stérile et sous hotte un des Eppendorfs contenant les bactéries sans les décongeler et d'étaler les bactéries prélevées sur une boîte de Pétri avec un milieu d'agar (LB + 60 µg/ml d'ampicilline). La boîte était incubée dans une étuve à 37°C pendant une nuit.

Les précultures étaient constituées de 50 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (75 mg/ml) et d'une colonie récupérée sur la boîte de Pétri. Les solutions étaient placées dans un incubateur et y étaient laissées sous une agitation de 230 rpm à 37°C pendant une nuit, jusqu'à ce que la solution devînt trouble. Après centrifugation, le culot avec les nouvelles colonies était transféré dans une nouvelle préculture de 500 ml (LB + 75 mg/ml d'ampicilline) et placé à nouveau dans l'incubateur sous une agitation de 230 rpm à 37°C pendant 2 h environ. Cette préculture était ajoutée au milieu de culture final comprenant du chlorure de sodium (100 g), de l'extrait de levure (50 g), de la tryptone (100 g), de l'ampicilline (10 ml, 75 mg/ml) et de l'huile (20 ml, comme anti-mousse) pour un volume total de 10 l d'eau bidistillée. La culture était placée sous une agitation de 200 rpm à 37°C sous un flux d'air (12 l/min) pendant 24 h.

Les 10 l de culture étaient ensuite centrifugés et l'on obtenait environ 60 g de culot. La purification se déroulait de la manière suivante :



**Figure 33** : Processus de purification

Le culot était resuspendu dans au maximum 100 ml de tampon phosphate de sodium (pH = 7.3, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  et 10 mM mercaptoéthanol). Les cellules étaient lysées lorsqu'on ajoutait du lysozyme (1 mg/ml de solution) et que l'on laissait la solution 1 h à température ambiante. La solution était congelée à  $-20^\circ\text{C}$  pendant une nuit pour finir la lyse.

La solution était décongelée et de la benzonase (1  $\mu\text{l}$ /10 ml de solution) était ajoutée afin de casser les liaisons de l'ADN et de l'ARN. Après une incubation de 10 min à température ambiante, la solution était centrifugée à 20'000 rpm à  $4^\circ\text{C}$  pendant 20 min. Le surnageant était mélangé à une solution contenant une tablette d'inhibiteurs de protéases dans du tampon phosphate (pH = 7.6, 5 ml, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  et 10 mM mercaptoéthanol) et laissé 1 h à  $4^\circ\text{C}$ . Cette tablette contenait de l'EDTA; vu que pour la fonctionnalité de l'enzyme, le magnésium était nécessaire, la tablette était dissoute d'abord

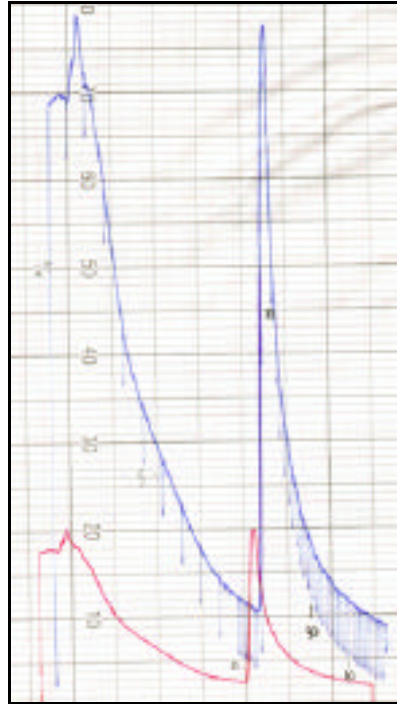
dans le tampon pour que l'EDTA précipitât sous forme de complexe avec le magnésium et ensuite cette solution était ajoutée au surnageant.

L'étape suivante consistait 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 3) relativement à une saturation totale à 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
Initial concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C	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	63.4
	15	2.8	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	11.3	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.3
	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	0

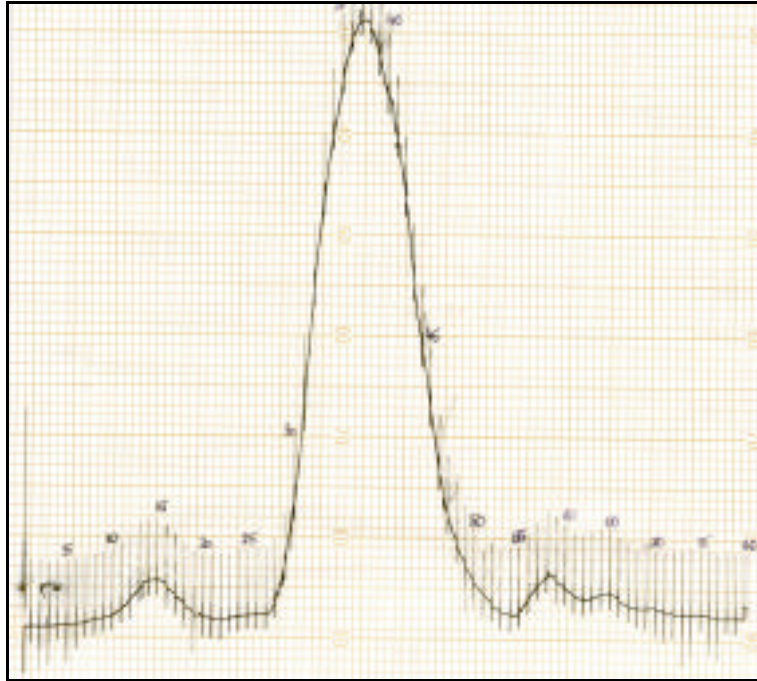
**Tableau 3** : Quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour obtenir la concentration désirée

Le sel était ajouté en petite quantité à chaque fois et l'on attendait qu'il fût totalement dissous avant d'ajouter la nouvelle portion. Une fois que tout le sel était utilisé, la solution était laissée pendant 20 min à 4°C, puis centrifugée à 20'000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant était chargé sur une colonne apolaire, la phénylsépharose; l'ADN et l'ARN n'étaient pas retenus par cette colonne et donc ils éluaient en premier; la PBGS, qui était une protéine très hydrophobe, éluait nettement plus tard. La figure 34 montre le chromatogramme d'éluion suivi à 280 nm. Les acides nucléiques apparaissaient dans les premiers dix tubes et étaient élués avec un tampon phosphate contenant du sulfate d'ammonium (pH = 7.1, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM ZnCl<sub>2</sub> et 10 mM mercaptoéthanol, 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La PBGS était récupérée dans les tubes compris dans le deuxième pic du chromatogramme; l'éluion était effectuée avec le même tampon que la première partie, mais sans le sulfate d'ammonium. La présence de la PBGS dans les tubes était vérifiée par SDS-PAGE 12 %. Une fois tous les tubes contenant la PBGS réunis, la solution était ultra-concentrée à l'aide d'une membrane XM = 50 d'Amicon jusqu'à un volume final de 10 ml.



**Figure 34** : Chromatogramme obtenu après la phénylsépharose

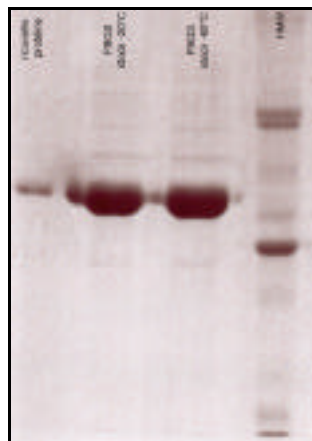
La solution obtenue après la concentration était divisée en quatre échantillons et chaque échantillon était chargé l'un après l'autre sur la Séphacryl S300, colonne à exclusion de taille. L'élution était effectuée avec un tampon phosphate (pH = 7.3, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  et 10 mM mercaptoéthanol). Les tubes appartenant au pic d'élution principal dans le chromatogramme contenaient pour la plupart la PBGS (figure 35). Sa présence était de toute manière testée, comme dans le cas de la phénylsépharose, par SDS-PAGE 12 %.



**Figure 35** : Chromatogramme d'élution après la Séphacryl S300

Les tubes contenant la PBGS étaient réunis et la solution obtenue était ultra-concentrée jusqu'à un volume final de 10 ml à l'aide d'une nouvelle membrane XM = 50 d'Amicon.

La protéine obtenue était comparée par SDS-PAGE 12 % à celle isolée par Henz <sup>[91]</sup>, un échantillon était prélevé de la réserve à -80°C et un autre de la réserve à -20°C; la protéine isolée était identique à celle des réserves (voir figure 36).



**Figure 36** : Gel SDS-PAGE 12 % de comparaison entre la PBGS nouvellement isolée et les stocks à -80°C et à -20°C

Pour déterminer l'activité spécifique de la PBGS, on devait tout d'abord connaître la quantité précise de protéine que l'on avait isolée. Pour connaître cette donnée, on utilisa le test colorimétrique mis au point par Bradford <sup>[92]</sup>.

Les valeurs d'absorbance obtenues pour la PBGS selon la méthode décrite dans la partie expérimentale de ce travail (voir chapitre 5.3.2.12) sont comparées à celles obtenues pour une courbe-étalon et de là, on obtenait la quantité de protéine isolée (en mg/ml).

Pour connaître l'activité spécifique, il fallait encore déterminer la quantité de PBG formé lorsqu'on additionnait 200 µl d'une solution de ALA (**1**, 0.5 mg/ml). Cette valeur était obtenue à l'aide du réactif d'Ehrlich (voir chapitre 5.3.2.13).

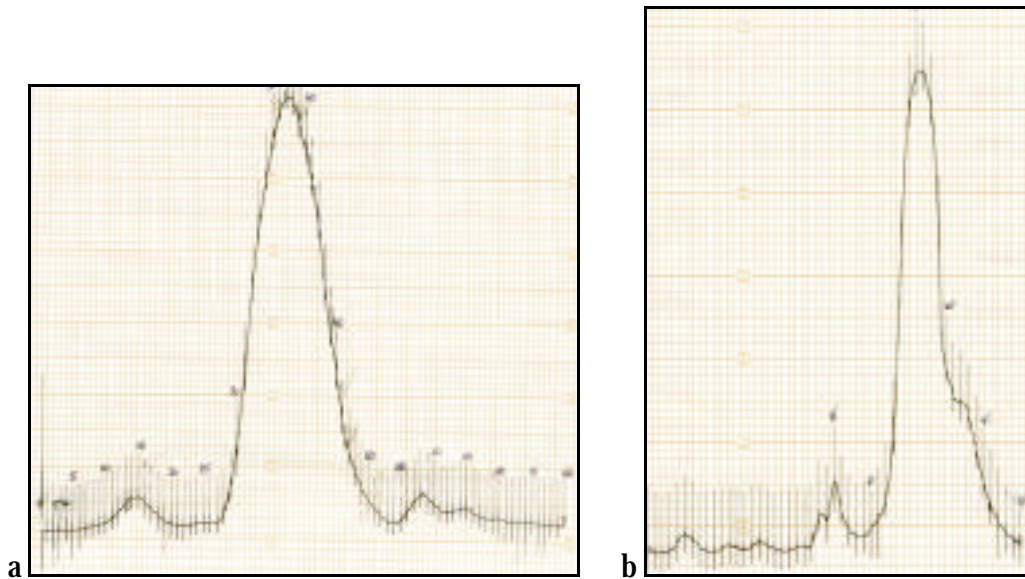
Lors de ce travail, deux charges de PBGS furent obtenues avec les caractéristiques suivantes

	<b>Charge 1</b>	<b>Charge 2</b>
<b>Volume final</b>	10 ml	6 ml
<b>Quantité de protéine</b>	15.66 mg/ml	45.36 mg/ml
<b>Activité spécifique</b>	0.611 U/mg	0.499 U/mg
<b>Activité</b>	9.568 U/ml	22.63 U/ml
<b>Nombre total d'unité</b>	95.68 U	135.81 U
<b>1 portion, environ 1 U</b>	91.84 µl	42.89 µl

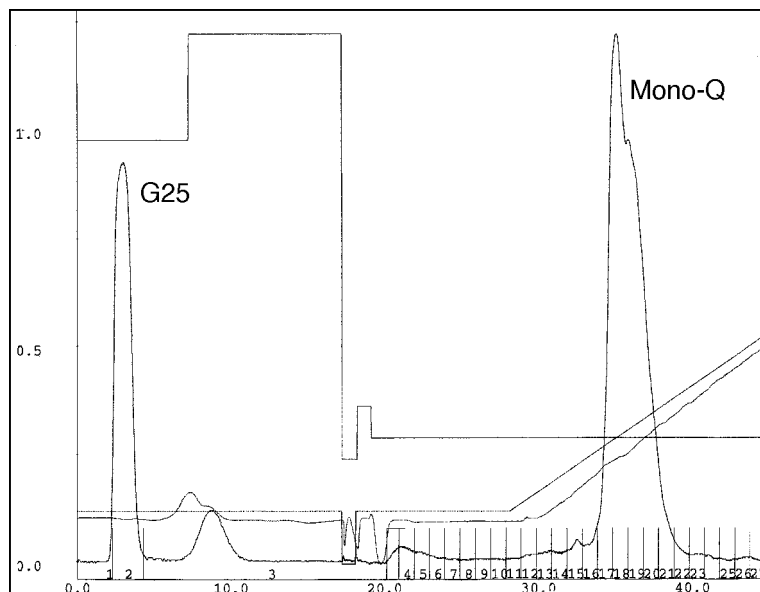
Les deux charges furent ensuite divisées en portion d'environ 1 U chacune selon les valeurs indiquées dans le tableau ci-dessus et congelées à -80°C avec un volume identique de glycérine.

#### **4.1.1 Problème de stabilité**

On put constater durant les diverses étapes de purification que la protéine n'était pas stable dans un tampon phosphate de potassium. En effet les chromatogrammes obtenus après les Séphacryls S300 ainsi qu'après une MonoQ (FPLC, colonne échangeuse anionique) présentaient un coude au niveau du pic principal (voir figure 37 et 38).

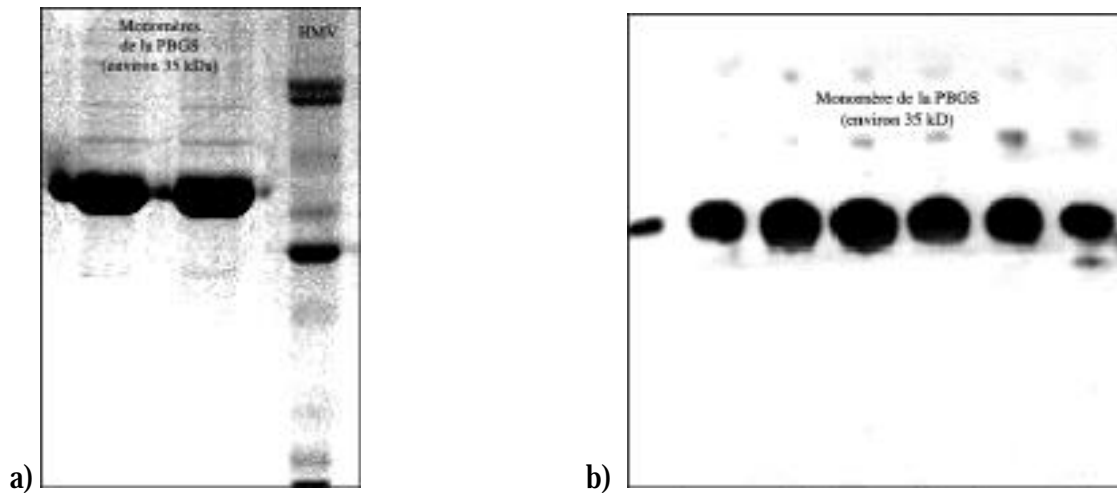


**Figure 37** : Le chromatogramme a) est obtenu dans un tampon phosphate de sodium, le chromatogramme b) dans un tampon phosphate de potassium (après la Séphacryl S300)



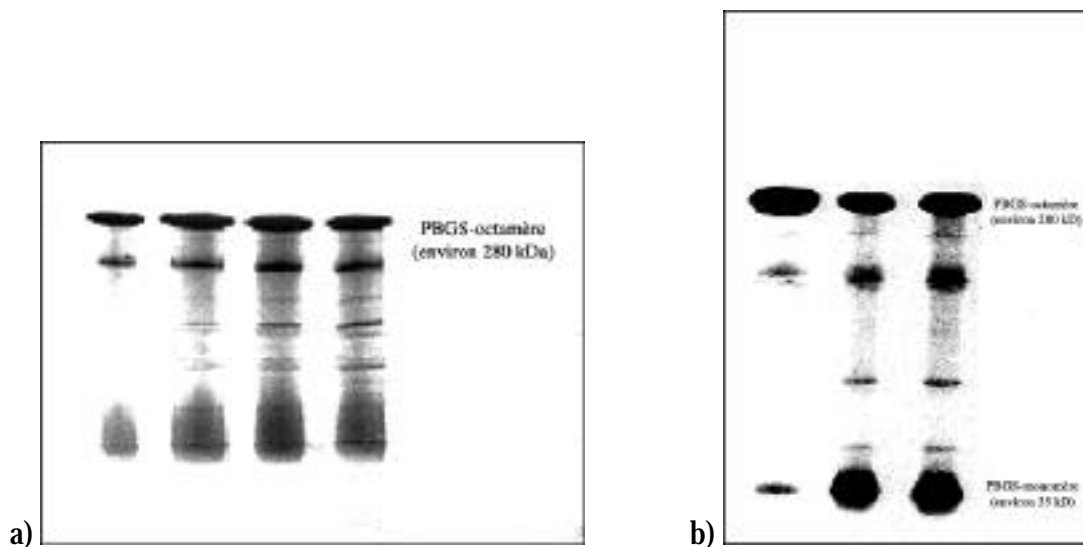
**Figure 38** : Chromatogramme obtenu après passage de la PBGS sur une MonoQ (FPLC)

Les SDS-PAGE 12 % de contrôle obtenus pour la PBGS en solution dans un tampon phosphate de sodium et dans un tampon phosphate de potassium (voir figure 39) n'apportaient pas de grandes indications sur la stabilité de la protéine. En effet, ces gels contenaient du SDS qui dénaturait la protéine, et donc on n'observait que la présence du monomère sur les gels, et il n'y avait pas de différences entre les deux tampons utilisés.



**Figure 39** : Gels SDS-PAGE 12 %. a) PBGS en solution dans un tampon phosphate de potassium et b) dans un tampon phosphate de sodium

Par contre, si l'on comparait des PAGE natifs, on pouvait se rendre compte que l'enzyme dans un milieu qui contenait du potassium se dégradait probablement en ses diverses sous-unités; le monomère étant le moins lourd, il migrerait le plus vite (voir figure 40).



**Figure 40** : Comparaison des gels natifs de la PBGS purifiée dans un milieu contenant du sodium (a) et du potassium (b)

Une autre manière de vérifier la stabilité de la PBGS dans les deux tampons consistait à déterminer le  $K_M$  de l'enzyme sur une longue période. La figure 41 montre les variations observées sur 78 h du  $K_M$  pour l'enzyme dans un tampon contenant du potassium ou du

sodium. Il était clair que l'amplitude des variations pour l'enzyme dans un tampon de phosphate potassium était nettement plus important que celle observée dans un tampon de phosphate de sodium. On pouvait donc conclure sans ambiguïté que la PBGS n'était nullement stable en présence de potassium.



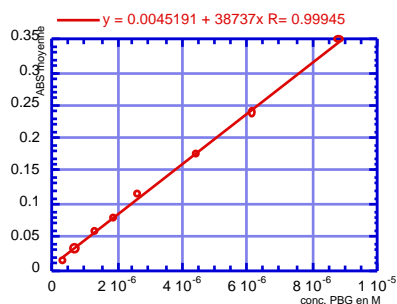
**Figure 41** : Graphique représentant les variations de  $K_M$  observées pour la PBGS dans un tampon phosphate de sodium et phosphate de potassium (la ligne continue correspond aux mesures effectuées dans un tampon contenant du sodium, la ligne pointillée à celles effectuées dans un tampon contenant du potassium)

Il était difficile d'attribuer un rôle bien défini au sodium, mais il était plus que probable qu'il interagissait d'une manière spécifique avec la structure quaternaire de la PBGS en stabilisant les interactions entre dimères afin de garder la PBGS sous une forme octamérique. Le potassium ne semblait pas pouvoir jouer ce rôle, et la PBGS se trouvait plutôt sous forme de monomères en solution.

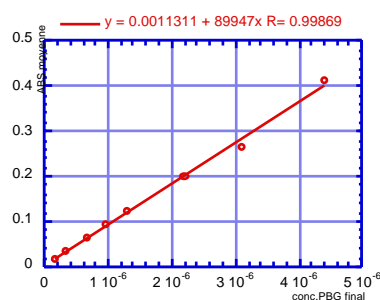
## 4.2 Les tests d'inhibition

Pour pouvoir confirmer les premières valeurs de  $K_{M1}$  et de  $K_{M2}$  obtenues par Engeloche-Jarret <sup>[90]</sup>, on dut d'abord vérifier la linéarité des réactifs utilisés, comme le réactif d'Ehrlich et le réactif de stop, à diverses dilutions.

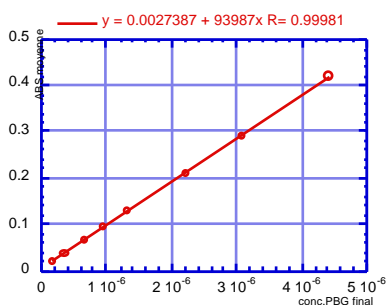
On testa la linéarité du complexe PBG-Ehrlich en utilisant du réactif d'Ehrlich 1x, 2x et 4x concentré. Les diverses concentrations de PBG (2) furent choisies de manière à obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0.01 et 0.5. La figure 42 présente les courbes correspondant aux valeurs obtenues pour chaque concentration. Comme on pouvait le voir à partir des courbes, même avec une solution d'Ehrlich 4x concentrée, la linéarité était conservée.



a



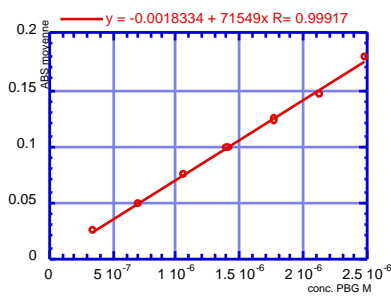
b



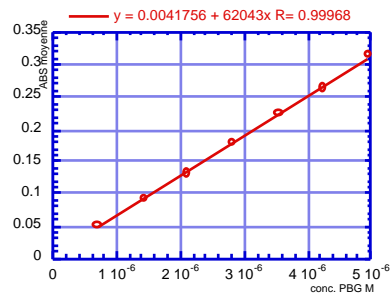
c

**Figure 42** : Graphiques correspondant aux valeurs obtenues pour les diverses dilutions du réactif d'Ehrlich a) 1x, b) 2x et c) 4x

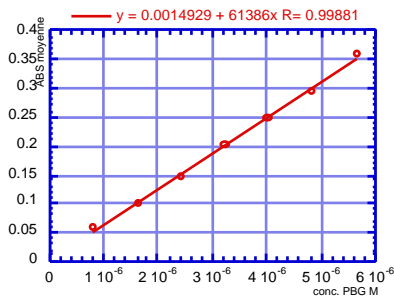
De l'enzyme fut ensuite ajoutée à la solution de PBG pour connaître son influence sur le complexe PBG-Ehrlich. En même temps, on fit varier la dilution du tampon stop (1x, 2x et 4x concentré). La figure 43 montre les courbes obtenues. Comme précédemment, la linéarité était conservée.



a



b

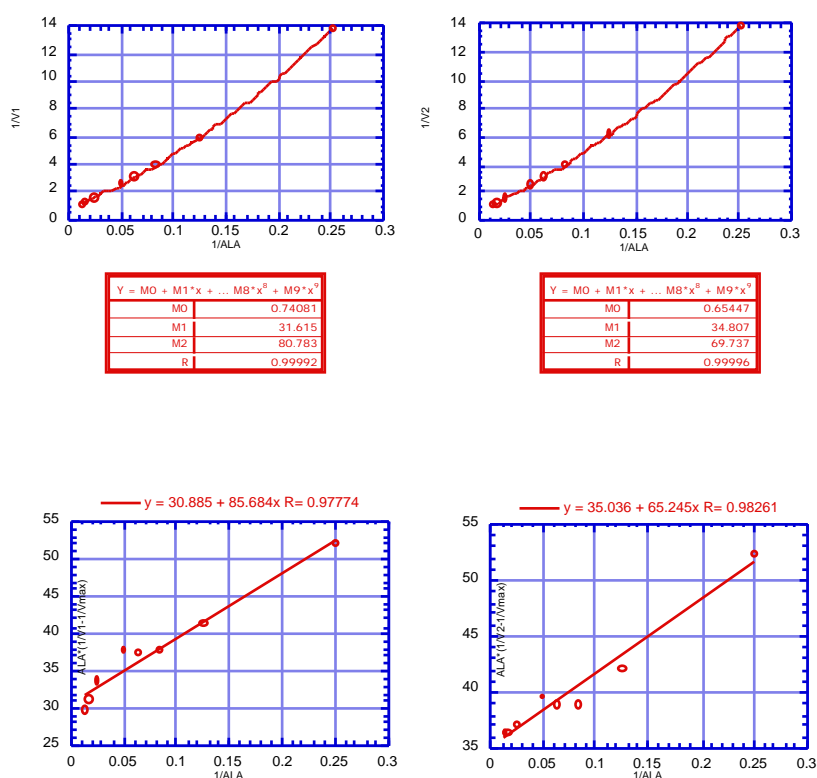


c

**Figure 43 :** Graphiques représentant l'influence des variations de dilution du réactif stop sur le complexe PBG-Ehrlich, en présence de l'enzyme, a) Ehrlich 1x et stop 1x, b) Ehrlich 4x et stop 2x et c) Ehrlich 4x et stop 4x

Huit tests furent effectués afin de déterminer les valeurs de  $K_{M1}$  et  $K_{M2}$  en utilisant du réactif d'Ehrlich et du réactif stop 4x dilués. Le mode opératoire est décrit dans la partie expérimentale (voir chapitre 5.4.3). Les valeurs obtenues ainsi que les graphiques correspondants pour deux des huit tests sont décrits dans la figure 44. Les valeurs ainsi que les graphiques pour les six autres tests se trouvent dans l'annexe 3. Les valeurs numériques furent obtenues en utilisant les équations (32), (33) et (34) décrites dans le chapitre 3.6.3.1.

	ALA ( $\mu\text{M}$ )	ABS 1	ABS 2	V 1	V 2	Y 1	Y 2
1	3.97	0.043	0.043	0.072	0.072	52.00	52.35
2	7.95	0.100	0.096	0.168	0.161	41.42	42.11
3	11.91	0.152	0.149	0.255	0.250	37.81	38.84
4	15.89	0.192	0.191	0.323	0.321	37.48	38.86
5	19.85	0.225	0.230	0.378	0.387	37.80	39.53
6	39.70	0.375	0.375	0.630	0.630	33.59	37.05
7	58.55	0.471	0.474	0.791	0.797	31.13	36.32
8	74.40	0.521	0.418	0.876	0.870	29.87	36.35



**Figure 44** : Tableau regroupant les mesures d'absorbance, les valeurs pour la vitesse  $v$  ainsi que les valeurs de  $[S]$   $(1/v - 1/V_{\max}) = y$

Le tableau 4 reprend les valeurs de  $V_{\max}$ , de  $K_{M1}$  et de  $K_{M2}$  pour les huit tests effectués. Pour les trois constantes, les valeurs moyennes sont aussi données.

	<b>Vmax</b> <b>(<math>\mu\text{M min}^{-1}</math>)</b>	<b>K<sub>M1</sub></b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>K<sub>M2</sub></b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>1</b>	1.35	2.77	41.69
<b>2</b>	1.53	1.86	53.61
<b>3</b>	1.36	2.82	42.73
<b>4</b>	1.35	2.88	42.06
<b>5</b>	1.81	1.85	60.71
<b>6</b>	1.29	1.80	42.10
<b>7</b>	1.37	2.10	43.75
<b>8</b>	1.28	1.76	44.35
<b>moyenne</b>	<b>1.42</b>	<b>2.23</b>	<b>46.38</b>

**Tableau 4 :** Récapitulatif des valeurs obtenues pour les huit tests

Afin de se situer dans un domaine d'erreur acceptable pour la cinétique (environ 15 % d'erreur), Henz détermina que la quantité d'ALA (1) transformé en PBG (2) ne devait pas dépasser 50 % <sup>[91]</sup>. Une manière de vérifier si les valeurs obtenues pour les K<sub>M</sub> étaient cohérentes consistait à déterminer la quantité de substrat transformé en PBG (2) par rapport aux mesures d'absorption effectuées. Le tableau 5 montre quelles doivent être les concentrations de PBG (2) pour 100 % et 50 % de transformation ainsi que les absorbances correspondantes. Le tableau 6 résume les valeurs d'absorbance obtenues lors des huit tests ainsi que le pourcentage de transformation s'y rapportant.

<b>ALA</b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>100 % de ALA</b> <b>transformé en PBG</b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Absorbance</b>	<b>50 % de ALA</b> <b>transformé en</b> <b>PBG (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Absorbance</b>
3.97	1.985	0.123	0.9925	0.062
7.95	3.975	0.246	1.9875	0.123
11.91	5.955	0.369	2.9775	0.185
15.89	7.945	0.493	3.9725	0.247
19.85	9.925	0.615	4.9625	0.308
39.70	19.8500	1.231	9.9250	0.616
58.55	29.2750	1.815	14.6375	0.908
74.40	37.2000	2.306	18.6000	1.153

**Tableau 5 :** Calcul du pourcentage de l'ALA (1) transformé en PBG (2) pour 100 % et 50 % de conversion

<b>ALA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Valeurs d'absorbance obtenues lors des huit tests</b>	<b>Valeurs moyennes</b>	<b>% de ALA transformé en PBG</b>
3.97	0.043, 0.043, 0.042, 0.042, 0.047, 0.046, 0.046, 0.044	0.044	36
7.95	0.100, 0.096, 0.099, 0.100, 0.104, 0.104, 0.101, 0.100	0.101	41
11.91	0.152, 0.149, 0.147, 0.145, 0.145, 0.154, 0.144, 0.144	0.148	40
15.89	0.192, 0.191, 0.188, 0.190, 0.201, 0.207, 0.201, 0.204	0.197	40
19.85	0.225, 0.230, 0.229, 0.228, 0.223, 0.246, 0.228, 0.224	0.229	37
39.70	0.375, 0.375, 0.376, 0.376, 0.380, 0.422, 0.384, 0.373	0.383	31
58.55	0.471, 0.474, 0.465, 0.469, 0.411, 0.516, 0.411, 0.409	0.453	25
74.40	0.521, 0.418, 0.518, 0.522, 0.515, 0.512, 0.515, 0.512	0.504	22

**Tableau 6 :** Pourcentage de conversion de l'ALA (6) en PBG (7) lors des huit tests

Le pourcentage de transformation ne dépassant pas les 41 % dans le domaine de concentration choisi, les valeurs obtenues peuvent être donc utilisées.

Il était aussi important de vérifier quelles étaient les concentrations minimales de substrat que l'on pouvait utiliser sans engendrer des erreurs importantes sur la mesure de la vitesse. Il suffisait pour cela de calculer le pourcentage d'erreur entre la valeur de vitesse mesurée à l'aide de l'équation de la cinétique pour deux substrats identiques et la valeur de la vitesse obtenue par l'équation simplifiée (Michaelis-Menten). Le tableau 7 montre les résultats obtenus.

<b>ALA en <math>\mu\text{M}</math></b>	$v = \frac{V_{\max} [S]^2}{K_{M1} K_{M2} + K_{M2} [S] + ([S])^2}$	$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_{M2} + [S]}$	<b>% d'erreur</b>
3.97	0.0520	0.0788	34
19.85	0.2779	0.2997	7.3
39.7	0.4477	0.4612	2.9
80	0.6266	0.633	1
400	0.8956	0.8961	0.06

**Tableau 7 :** Pourcentage d'erreur dû à la simplification de l'équation de la vitesse

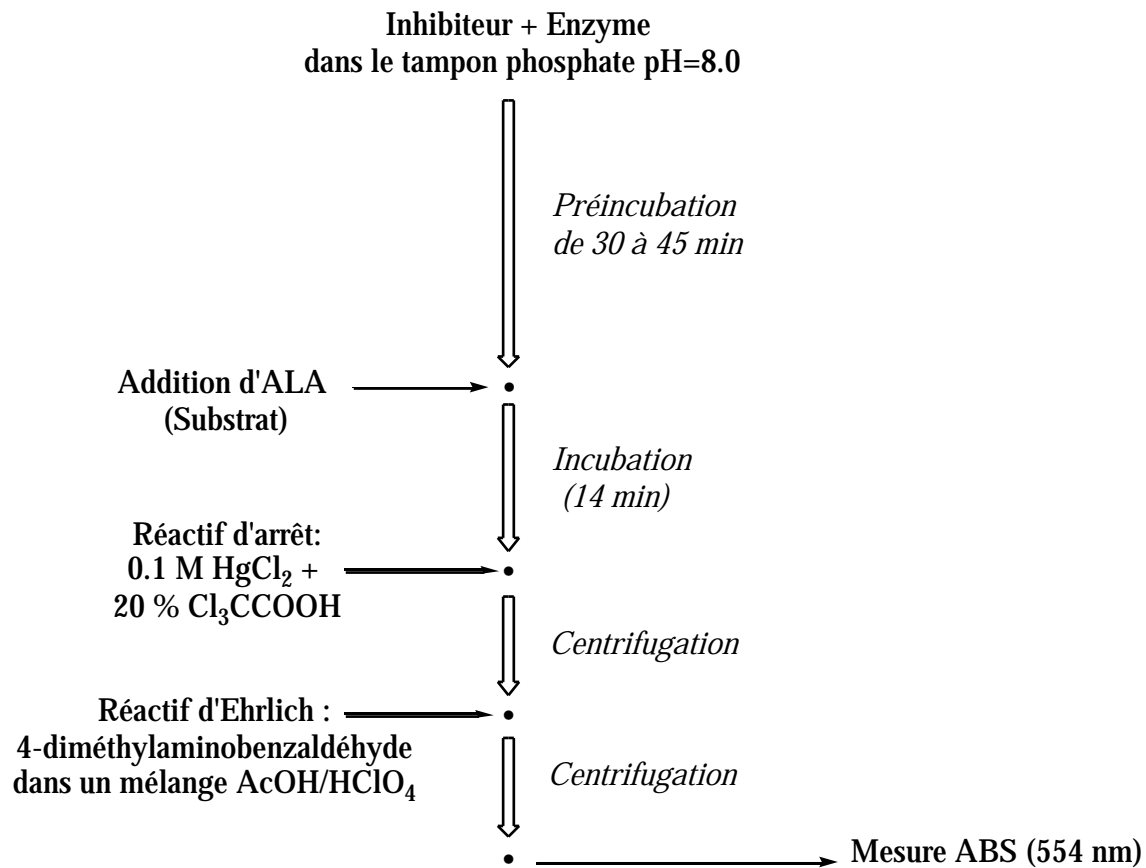
Dans l'intervalle de concentrations choisies pour les tests d'inhibitions (80  $\mu\text{M}$  à 400  $\mu\text{M}$ ), l'erreur engendrée allait de 1 % pour la concentration la plus faible à 0.06 % pour la concentration la plus élevée. Par contre dans le test permettant de déterminer les  $K_M$ , il n'était pas possible d'utiliser l'équation simplifiée vu qu'on obtenait jusqu'à 34 % d'erreur.

#### **4.2.1 La procédure des tests d'inhibition**

Le test utilisait 48 tubes de 10 ml contenant une concentration croissante de l'inhibiteur par rapport au substrat naturel, ALA (1). La concentration de l'ALA (1) était fixée de la même manière pour tous les essais et elles variaient dans un intervalle de 79.5  $\mu\text{M}$  à 397.0  $\mu\text{M}$ .

La concentration de l'inhibiteur était choisie de manière à ce que les valeurs d'absorbance se situaient dans un intervalle compris entre 0.1 et 0.9 et que la différence entre les valeurs d'absorbance du blanc et des échantillons contenant l'inhibiteur ne devait pas être trop importante (maximum 0.3).

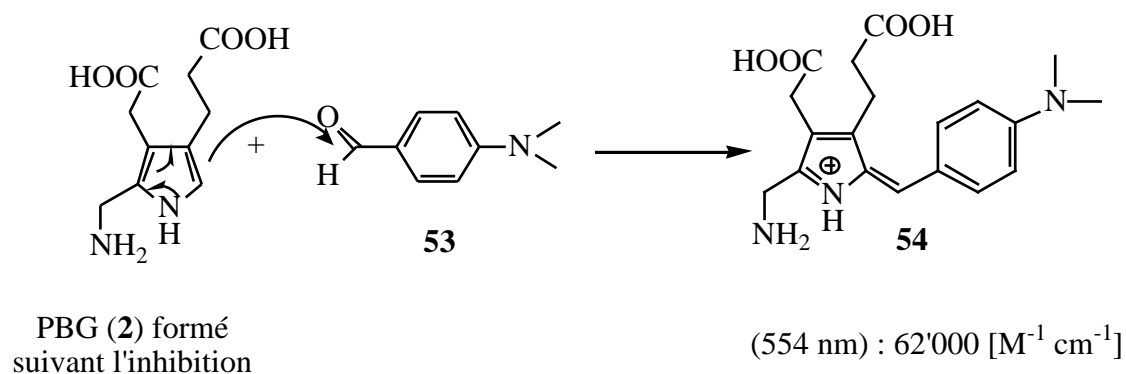
Le test d'inhibition se déroulait de la manière suivante :



**Figure 45** : Test d'inhibition

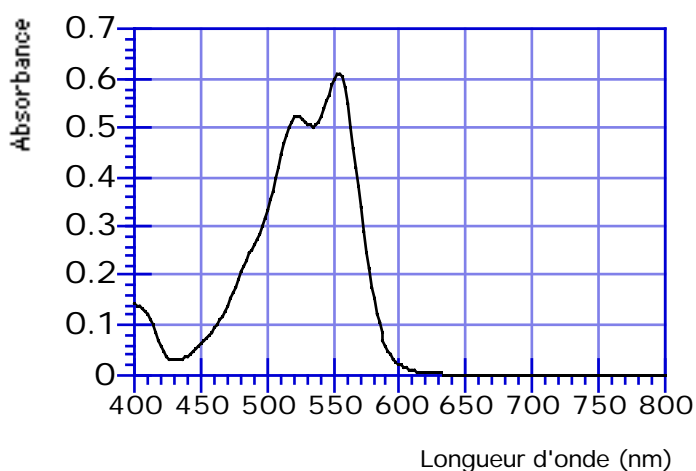
La première partie de l'expérience consistait à préincuber, pendant 30 min et dans un bain thermostaté à 37°C, l'inhibiteur avec l'enzyme et le tampon phosphate de sodium à un pH = 8.0. Le tampon était préparé avec 0.1 M de phosphate de sodium, 10 µM de chlorure de zinc, 10 mM de chlorure de magnésium et 12.3 mM de mercaptoéthanol, qui permettait d'éviter la formation de ponts disulfures entre des cystéines adjacentes catalytiquement importantes. Une fois le temps de préincubation atteint, on ajoutait des quantités variables, mais prédéfinies d'ALA (1). Le temps d'incubation était fixé à 14 min. La réaction enzymatique était arrêtée par adjonction d'une solution d'acide trichloroacétique contenant du chlorure de mercure. Les sels de mercure permettaient de faire précipiter le mercaptoéthanol et l'acide trichloroacétique la protéine. Une fois la solution centrifugée, le surnageant réagissait ensuite avec un volume équivalent du réactif d'Ehrlich (4-diméthylaminobenzaldéhyde, 53). L'absorbance était mesurée après une seconde centrifugation. Les valeurs étaient relevées à une longueur d'onde de 554 nm et correspondaient à la formation d'un complexe entre le réactif d'Ehrlich et le

porphobilinogène (**2**) (voir figure 46). Les solutions obtenues présentaient des dégradés de rose et la couleur était proportionnelle à la quantité de porphobilinogène (**2**) formé.



**Figure 46** : Réaction du réactif d'Ehrlich avec le porphobilinogène (**2**)

Le chromophore **54** obtenu montrait un coefficient d'extinction de 62'000 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> à 554 nm. Le spectre visible de ce chromophore est présenté dans la figure 47. Deux maxima sont obtenus, l'un à 524 nm et l'autre à 554 nm, on n'utilise que le deuxième, le plus intense, pour la détermination de la quantité de PBG.



**Figure 47** : Spectre d'absorption du chromophore **54**

Une fois connue la quantité de PBG formée, il était possible de calculer la vitesse de la réaction. Les valeurs d'absorbance étaient introduites dans les méthodes graphiques à

disposition (Michaelis-Menten, Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk, Hanes) et de là les valeurs pour le  $K_M$ , le  $V_{max}$  et le  $K_I$  pouvaient être déterminées (voir chapitre 4.2.3).

#### 4.2.2 La préparation de la solution de l'inhibiteur

La quantité de l'inhibiteur à tester était dissoute dans 10 ou 20 ml de tampon phosphate. Il était possible de rencontrer des problèmes de solubilité selon la polarité des substances testées. Le comportement de la PBGS en présence de divers cosolvants miscibles à l'eau, comme le dioxane, l'acétonitrile, le DMF et le DMSO, fut suivi par Henz <sup>[91]</sup>. Pour une teneur en dioxane de 1.6 %, l'activité de la PBGS diminuait de 15 %, tandis que l'acétonitrile l'activait d'environ 3 %. Le DMSO et le DMF, jusqu'à une teneur de 1.3 %, n'influençaient d'aucune manière l'activité de la PBGS. Vu que la majeure partie des inhibiteurs insolubles devenait soluble en présence de DMSO, ce cosolvant fut ajouté dans les cas difficiles.

#### 4.2.3 L'analyse des résultats obtenus par les inhibitions

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

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{n \text{ ABS } 10^6}{l t}$$

où  $l = 1 \text{ cm}$

$= 62'000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

$t = 14 \text{ min}$

ABS = absorbance à 554 nm

$n =$  facteur de dilution, 3.33

En connaissant la vitesse initiale et les diverses valeurs de l'absorbance, il était possible de calculer le  $K_M$  et le  $V_{max}$  à partir des relations de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk, de Hanes et de Eadie-Hofstee :

**Michaelis-Menten (1)**

$$v = \frac{V_{\max} [ALA]}{K_{Mapp} + [ALA]}$$

**Lineweaver-Burk (2)**

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_{Mapp}}{V_{\max}} \frac{1}{[ALA]}$$

**Hanes (3)**

$$\frac{[ALA]}{v} = \frac{K_{Mapp}}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [ALA]$$

**Eadie-Hofstee (4)**

$$v = V_{\max} - \frac{v}{[ALA]} K_{Mapp}$$

Le type de comportement que présentait l'inhibiteur pouvait être déduit par l'allure des courbes ainsi que par les variations du  $K_M$  et du  $V_{\max}$ . Les valeurs du  $K_M$  et du  $V_{\max}$  données pour chaque inhibiteur étaient en fait la moyenne des valeurs obtenues à partir des quatre graphiques de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes et Michaelis-Menten.

**4.2.4 L'inhibition compétitive**

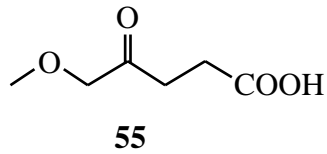
Un inhibiteur compétitif était caractérisé par un  $V_{\max}$  plus ou moins stable et par un  $K_M$  croissant en fonction de l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. La constante d'inhibition était calculée de la manière suivante; le  $K_M$  est la valeur obtenue sans inhibiteur :

$$K_{Mapp} = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad K_I = \frac{1}{\left( \frac{K_{Mapp}}{K_M} \right) - 1} [I]$$

Une autre manière de calculer la valeur du  $K_I$  était de faire un graphique contenant la concentration de l'inhibiteur en  $\mu\text{M}$  en ordonnée et la valeur de la pente de Lineweaver-Burk en abscisse (par convenance, cette méthode est appelée méthode \*\*). L'expression de la pente contenait la valeur de la constante d'inhibition :

$$\text{pente} = \frac{K_M}{V_{\max} K_I} [I] + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

L'acide 5-méthoxy-4-oxopentanoïque (**55**) est un exemple d'inhibiteur compétitif et voici les valeurs ainsi que les courbes qui lui sont propres :

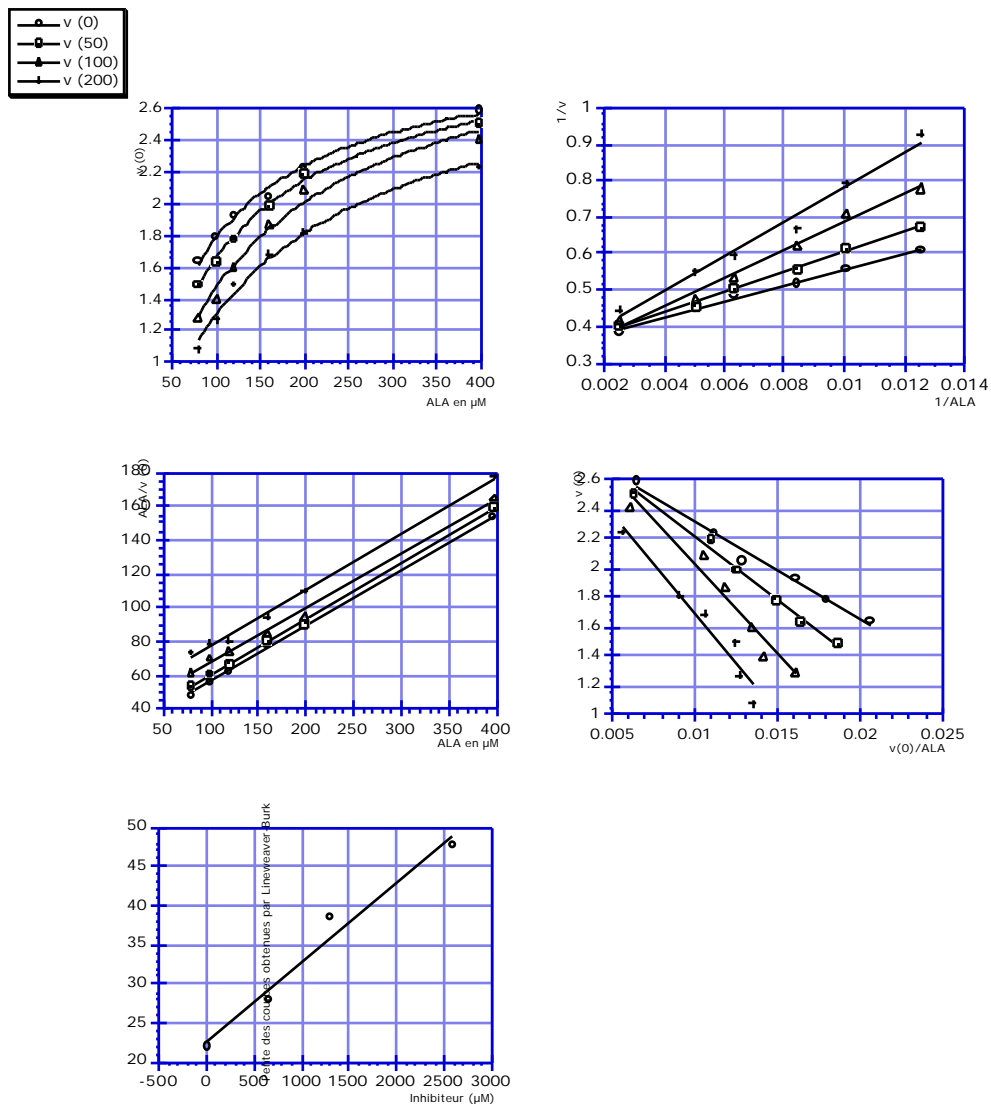


ALA	[Inhibiteur]			
	0 $\mu$ l	50 $\mu$ l 648 $\mu$ M	100 $\mu$ l 1296 $\mu$ M	200 $\mu$ l 2592 $\mu$ M
39.7 $\mu$ M	0.437	0.400	0.315	0.292
	0.417	0.374	0.352	0.262
79.4 $\mu$ M	0.469	0.414	0.342	0.318
	0.460	0.436	0.389	0.339
119.2 $\mu$ M	0.501	0.459	0.424	0.385
	0.501	0.468	0.411	0.392
158.9 $\mu$ M	0.538	0.523	0.500	0.440
	0.528	0.507	0.475	0.436
198.6 $\mu$ M	0.589	0.573	0.553	0.461
	0.573	0.567	0.535	0.483
397.3 $\mu$ M	0.697	0.663	0.633	0.589
	0.653	0.642	0.624	0.577
$V_{max}$ (1)	3.01	3.06	3.18	3.01
$K_{Mapp}$ (1)	68.88	85.09	116.39	131.68
$K_I$ (1)		2753	1879	2843
$V_{max}$ (2)	2.96	3.07	3.31	3.25
$K_{Mapp}$ (2)	65.19	85.90	127.95	155.01
$K_I$ (2)		2040	1346	1881
$V_{max}$ (3)	3.04	3.04	3.13	3.00
$K_{Mapp}$ (3)	71.19	83.51	112.58	131.46
$K_I$ (3)		(3744)	2229	3062
$V_{max}$ (4)	2.98	3.07	3.22	3.05
$K_{Mapp}$ (4)	66.71	85.59	120.71	136.58
$K_I$ (4)		2290	1601	2475

$K_I$  (selon la pente et la concentration d'inhibiteur) : 2230

Valeurs moyennes  $K_I$  (1) : 2492,  $K_I$  (2) : 1756,  $K_I$  (3) : 2646,  $K_I$  (4) : 2122

**Tableau 8** : Valeurs obtenues lors du test d'inhibition de l'acide 5-méthoxy-4-oxopentanoïque (55)



**Figure 48 :** Courbes de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk, de Hanes, d'Eadie-Hofstee et de la méthode\*\* pour l'acide 5-méthoxy-4-oxopentanoïque (55), un inhibiteur compétitif

#### 4.2.5 L'inhibition incompétitive

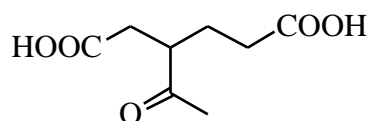
Si les valeurs de  $K_M$  et de  $V_{max}$  diminuaient pour des concentrations croissantes d'inhibiteur, cela signifierait que l'on se trouvait en présence d'un inhibiteur incompétitif. La constante d'inhibition était calculée comme suit :

$$K_{Mapp} = \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad K_I = \frac{1}{\left(\frac{K_M}{K_{Mapp}}\right) - 1} \quad [I]$$

et dans le cas incompétitif, en dessinant la concentration de l'inhibiteur en fonction de la valeur inverse des  $K_{Mapp}$  déterminés, on obtenait l'expression suivante :

$$\frac{1}{K_{Mapp}} = \frac{1}{K_M} \left[ \frac{1}{K_I} [I] + 1 \right]$$

Les courbes et les valeurs obtenues pour l'acide 3-acétyladipique (**56**) sont caractéristiques d'un inhibiteur incompétitif.



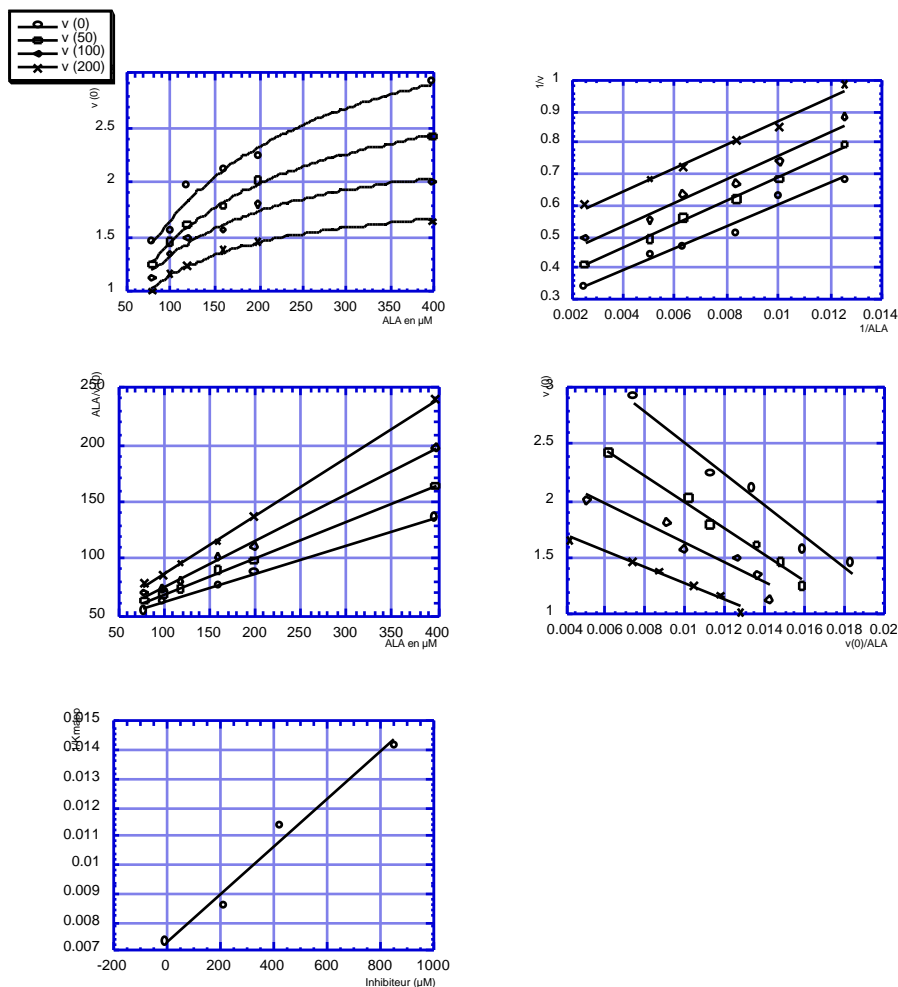
**56**

ALA	Inhibiteur			
	0 $\mu$ l	50 $\mu$ l 213 $\mu$ M	100 $\mu$ l 426 $\mu$ M	200 $\mu$ l 852 $\mu$ M
39.7 $\mu$ M	0.374	0.332	0.317	0.268
	0.386	0.324	0.273	0.260
79.4 $\mu$ M	0.435	0.390	0.355	0.305
	0.398	0.373	0.350	0.306
119.2 $\mu$ M	0.518	0.416	0.397	0.315
	0.505	0.425	0.383	0.332
158.9 $\mu$ M	0.540	0.451	0.404	0.362
	0.563	0.482	0.416	0.360
198.6 $\mu$ M	0.615	0.529	0.461	0.380
	0.552	0.524	0.479	0.380
397.3 $\mu$ M	0.768	0.626	0.508	0.412
	0.756	0.636	0.540	0.449
$V_{max}$ (1)	3.87	3.14	2.48	1.96
$K_{Mapp}$ (1)	132.84	115.13	85.35	69.06
$K_I$ (1)		1385	766	923
$V_{max}$ (2)	3.97	3.13	2.45	1.94
$K_{Mapp}$ (2)	144.39	114.56	82.3	66.97
$K_I$ (2)		818	565	737
$V_{max}$ (3)	3.87	3.19	2.57	2.01
$K_{Mapp}$ (3)	132.79	119.65	95.95	74.69
$K_I$ (3)		1940	1110	1095
$V_{max}$ (4)	3.87	3.15	2.50	1.97
$K_{Mapp}$ (4)	136.76	116.33	87.20	78.80
$K_I$ (4)		1213	750	915

$K_I$  (selon la pente et la concentration d'inhibiteur) : 869

Valeurs moyennes  $K_I$  (1) : 1025,  $K_I$  (2) : 707,  $K_I$  (3) : 1382,  $K_I$  (4) : 959

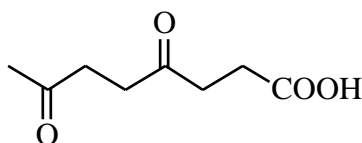
**Tableau 9** : Valeurs obtenues lors du test d'inhibition de l'acide 3-acétyladipique (56)



**Figure 49** : Courbes de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk, de Hanes, d'Eadie-Hofstee et de la méthode\*\* pour l'acide 3-acétyladipique (**56**), un inhibiteur incompétitif

#### 4.2.6 L'inhibition slow-binder / irréversible

Certaines substances montraient un comportement d'inhibition mal défini. On pouvait les confondre avec des inhibiteurs incompétitifs vu que le  $V_{max}$  et le  $K_{Mapp}$  diminuaient; l'acide 4,7-dioxooctanoïque (**57**) présentait ce genre de comportement.



**57**

ALA	Inhibiteur			
	0 $\mu$ l	50 $\mu$ l 96.6 $\mu$ M	100 $\mu$ l 193.34 $\mu$ M	200 $\mu$ l 386.67 $\mu$ M
39.7 $\mu$ M	0.343	0.265	0.227	0.186
	0.344	0.263	0.231	0.186
79.4 $\mu$ M	0.427	0.324	0.263	0.211
	0.419	0.308	0.254	0.204
119.2 $\mu$ M	0.461	(0.478)	0.293	0.234
	0.455	(0.478)	0.277	0.232
158.9 $\mu$ M	0.527	0.391	(0.531)	0.239
	0.517	0.373	(0.533)	0.215
198.6 $\mu$ M	0.550	0.375	0.324	0.252
	0.525	0.381	0.322	0.254
397.3 $\mu$ M	0.611	0.427	0.353	0.277
	0.600	0.423	0.356	0.283
$V_{max}$ (1)	3.09	2.01	1.63	1.22
$K_{Mapp}$ (1)	98	73	65	54
$K_I$ (1)		290	387	488
$V_{max}$ (2)	2.84	1.92	1.58	1.21
$K_{Mapp}$ (2)	78	63	59	53
$K_I$ (2)		400	618	803
$V_{max}$ (3)	2.37	1.69	1.41	1.09
$K_{Mapp}$ (3)	116	56	39	22
$K_I$ (3)		89	96	92
$V_{max}$ (4)	039	0.56	0.67	0.86
$K_{Mapp}$ (4)	37	33	32	32
$K_I$ (4)		667	1242	2477

**Tableau 10 :** Valeurs obtenues lors du test d'inhibition de l'acide 4,7-dioxooctanoïque (57)

La différenciation entre le comportement incompétitif et slow binder/irréversible s'effectuait en suivant l'inhibition au cours du temps. En effet, si l'on observait une augmentation de l'inhibition, c'est-à-dire si la différence d'absorbance entre le blanc et l'échantillon augmentait au cours du temps, cela signifiait que l'on se trouvait en présence d'un inhibiteur qui n'était pas incompétitif, mais d'un inhibiteur soit irréversible soit slow binder. Le tableau 11

montre l'évolution dans le temps de l'incubation de l'acide 4,7-dioxooctanoïque (**57**) avec la PBGS :

Temps	Essai	Inhibit.	PBGS	Tamp	ALA	Abs
30 min	1	0	400	900	200	0.781
30 min	2	0	400	900	200	0.764
30 min	3	400	400	500	200	0.434
30 min	4	400	400	500	200	0.423
90 min	1'	0	400	900	200	0.755
90 min	2'	0	400	900	200	0.757
90 min	3'	400	400	500	200	0.146
90 min	4'	400	400	500	200	0.143
30 min	5	0	400	1000	100	0.679
30 min	6	0	400	1000	100	0.723
30 min	7	400	400	600	100	0.384
30 min	8	400	400	600	100	0.349
90 min	5'	0	400	1000	100	0.590
90 min	6'	0	400	1000	100	0.670
90 min	7'	400	400	600	100	0.141
90 min	8'	400	400	600	100	0.150
30 min	9	0	400	1050	50	0.469
30 min	10	0	400	1050	50	0.521
30 min	11	400	400	650	50	0.251
30 min	12	400	400	650	50	0.253
90 min	9'	0	400	1050	50	0.478
90 min	10'	0	400	1050	50	0.508
90 min	11'	400	400	650	50	0.111
90 min	12'	400	400	650	50	0.123

**Tableau 11** : Evolution de l'absorbance pour le composé **57** selon le temps

Pour différencier un inhibiteur slow binder d'un inhibiteur irréversible (ou tight slow binder), il fallait effectuer une dialyse et vérifier s'il était possible de récupérer une partie de l'activité spécifique après environ 70 h de dialyse. Si plus de 20 % d'activité enzymatique était récupérée, on était en présence d'un inhibiteur slow binder, sinon c'était un irréversible. Les

valeurs de dialyse obtenues pour l'acide 4,7-dioxooctanoïque (57) sont résumées dans le tableau 12 et donc le produit 57 était considéré comme un inhibiteur irréversible.

	<b>Blanc</b>	<b>Acide 4,7-dioxooctanoïque (58)</b>
Activité spécifique après 24 h d'incubation à 37°C	0.470	0.048
Pourcentage par rapport au blanc	--	10.21 %
Activité spécifique après 72 h de dialyse à 4°C	0.585	0.054
Pourcentage par rapport au blanc	--	9.23 %

**Tableau 12 :** Valeurs obtenues durant la dialyse du composé 57

#### 4.2.7 La 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, très bon, bon, faible et non inhibiteur). La constante que nous avons utilisée comme standard est la valeur du  $K_{M2} = 46 \mu\text{M}$ , constante disponible directement à partir des tests d'inhibition. Un excellent inhibiteur présente un  $K_I$  dans le même ordre de grandeur de la constante  $K_{M2}$ .

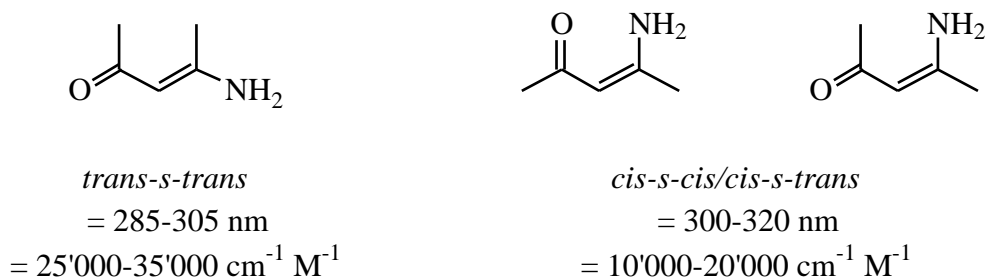
Le tableau 13 donne une bonne idée de la puissance d'un inhibiteur par rapport au  $K_I$  observé :

<b>Qualité de l'inhibition</b>	<b>Constante d'inhibition</b>
inhibiteur excellent	< 100 $\mu\text{M}$
inhibiteur très bon	entre 100 $\mu\text{M}$ et 1000 $\mu\text{M}$
inhibiteur bon	entre 1000 $\mu\text{M}$ et 10'000 $\mu\text{M}$
inhibiteur faible	> 10'000 $\mu\text{M}$
non inhibiteur	> 100'000 $\mu\text{M}$

**Tableau 13 :** Classification des inhibiteurs

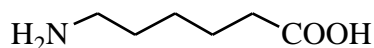
### 4.3 La détermination de l'amide vinylogue avec les composés dicétones

Il était connu de la littérature que les substances comportant une unité 1,3-dicétone formaient une base de Schiff avec une lysine au site actif de l'enzyme, qui se stabilisait ensuite par tautomérisation en une amide vinylogue <sup>[27] [30] [28] [29]</sup>. Cette amide vinylogue possédait une absorption caractéristique dans le spectre UV/VIS dépendante de sa configuration (voir figure 50) <sup>[31] [32] [33] [34]</sup>.



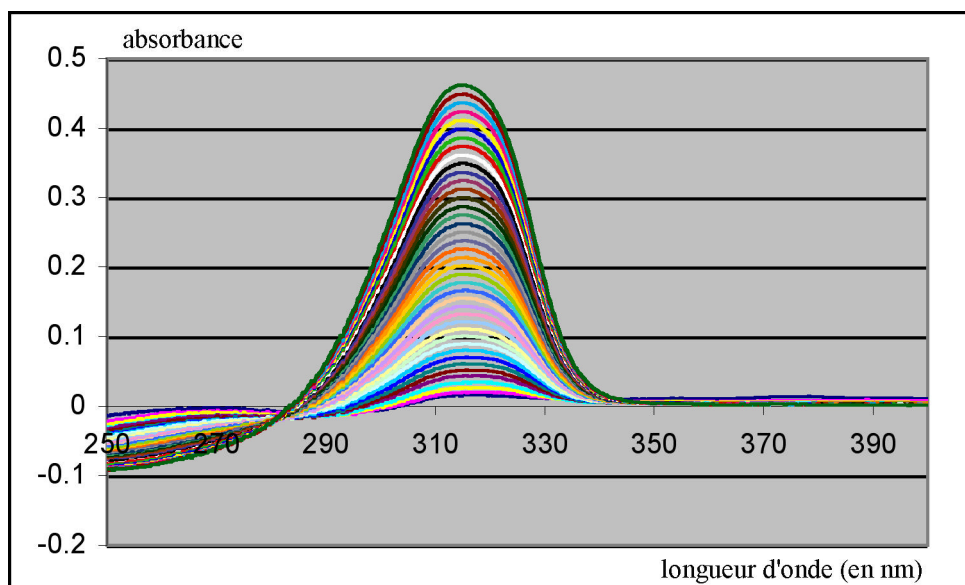
**Figure 50** : Diverses configurations de l'amide vinylogue

Afin de déterminer si la succinylacétone (**19**) se comportait de la même manière au site actif de la PBGS, un suivi de la réaction par UV/VIS fut entrepris dans nos laboratoires. Un test préliminaire fut effectué en incubant la succinylacétone (**19**) avec l'acide 6-aminocaproïque (**58**) ; cet acide nous permettait de simuler la formation d'une base de Schiff entre la succinylacétone (**19**) et une lysine de l'enzyme.



**58**

La formation de l'amide vinylogue fut suivie, par mesure UV/VIS, tout d'abord pendant 20 h pour connaître la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. Les spectres furent mesurés toutes les 30 min (voir figure 50). Le maximum d'absorbance était détecté à 314 nm.

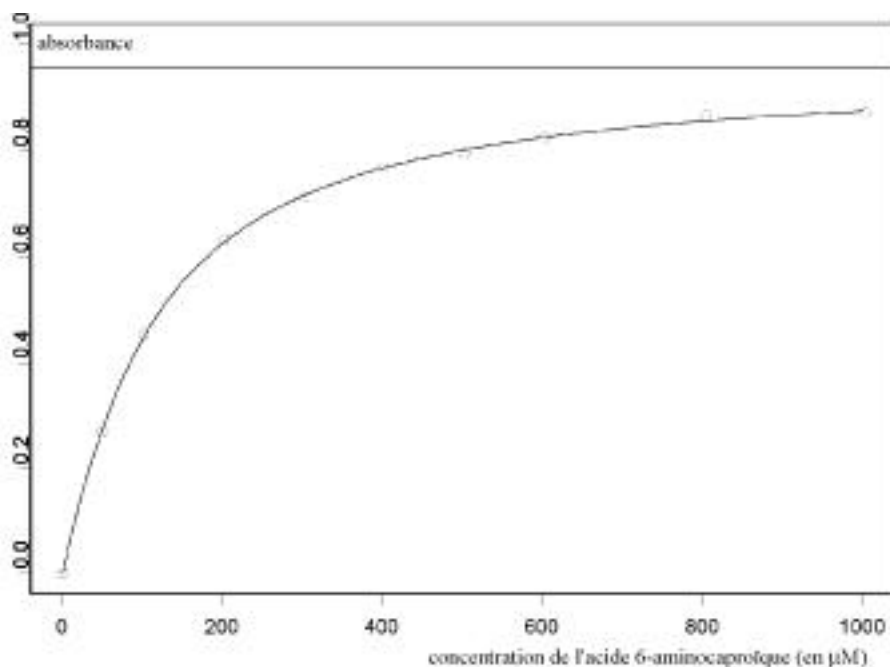


**Figure 50** : Suivi de la formation de l'amide vinylogue entre la succinylacétone (**19**, 50  $\mu\text{M}$ ) et l'acide 6-aminocaproïque (**58**, 100 mM)

Ensuite, la formation de cette amide vinylogue fut suivie pendant 64 h en utilisant une concentration fixe de succinylacétone (51.22  $\mu\text{M}$ , **19**) et en variant la concentration de l'acide 6-aminocaproïque (50  $\mu\text{M}$  à 1000  $\mu\text{M}$ , **58**). La figure 51 montre la courbe de saturation. A partir de cette courbe, nous pûmes calculer l'absorbance à l'infinie ainsi que la constante de formation de l'amide vinylogue ( $A_{\text{inf}} = 0.956$  et  $K_S = 88 \mu\text{M}$ ) en utilisant l'équation suivante (voir chapitre 5.5) :

$$y = \frac{K_S + x + 50 \pm \sqrt{(K_S + x + 50)^2 - 200x}}{100} A$$

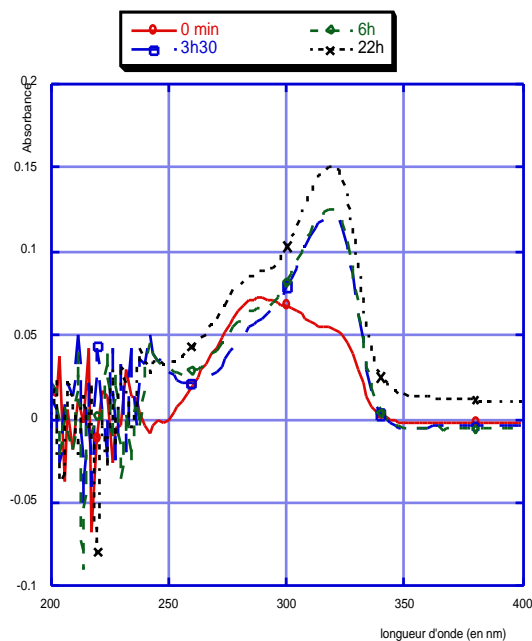
- où  $K_S$  = constante de dissociation du complexe succinylacétone-acide 6-aminocaproïque  
 $x$  = concentration de l'acide 6-aminocaproïque (en  $\mu\text{M}$ )  
 $y$  = absorbance du complexe succinylacétone-enzyme



**Figure 51** : Courbe de saturation. La concentration de la succinylacétone (**19**) était de 51.22  $\mu\text{M}$  et neuf concentrations différentes d'acide 6-aminocaproïque (**58**) furent utilisées (50.09  $\mu\text{M}$ , 101.71  $\mu\text{M}$ , 201.25  $\mu\text{M}$ , 302.09  $\mu\text{M}$ , 401.63  $\mu\text{M}$ , 502.25  $\mu\text{M}$ , 602.66  $\mu\text{M}$ , 803.04  $\mu\text{M}$  et 1002.77  $\mu\text{M}$ )

Le coefficient d'extinction calculé pour le complexe formé entre la succinylacétone (**19**, 51.22  $\mu\text{M}$ ) et l'acide 6-aminocaproïque (**58**) était de  $18'665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La longueur d'onde ainsi que le coefficient d'extinction obtenus sont caractéristiques pour une forme *cis-s-trans* ou *cis-s-cis* de l'amide vinylogue.

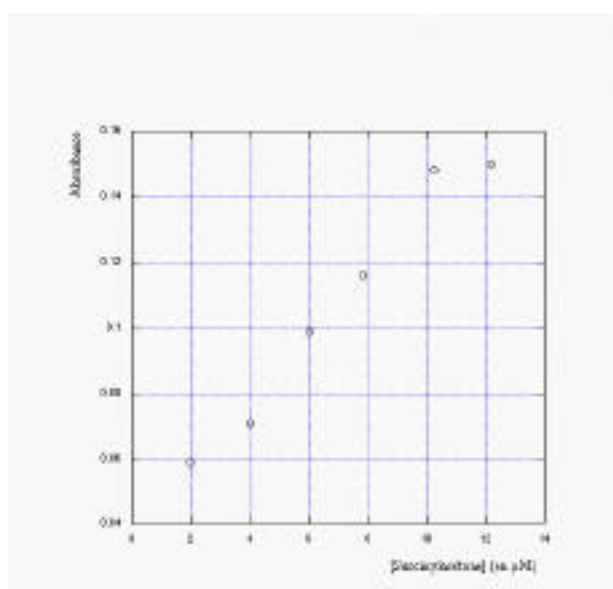
Notre intention était d'appliquer les mêmes conditions en utilisant cette fois-ci l'enzyme à la place de l'acide 6-aminocaproïque (**58**). Malheureusement, la saturation complète de l'enzyme ne put être obtenue, car pour des concentrations élevées en succinylacétone (**19**) (supérieures à 15  $\mu\text{M}$ ), l'absorbance de la succinylacétone (**19**) dans la zone de mesure (250 nm à 350 nm) recouvrait l'absorbance de l'amide vinylogue en formation. Pour cette raison, les valeurs obtenues ne permettaient pas de déterminer l'allure de la courbe pour des concentrations supérieures à 15  $\mu\text{M}$  de succinylacétone (**19**) (voir figure 53). L'absorbance était mesurée à une longueur d'onde de 320 nm (voir figure 52).



**Figure 52** : Courbes de la formation de l'amide vinylogue au site actif de la PBGS; la concentration de la succinylacétone (**19**) était de 12  $\mu\text{M}$  et la concentration de la PBGS était de 14.1  $\mu\text{M}$  (monomères)

Les valeurs d'absorbance suivantes furent déterminées lors du suivi de la formation de l'amide vinylogue au site actif de la PBGS (concentration des monomères = 14.1  $\mu\text{M}$ ) :

Succinylacétone (en $\mu\text{M}$ )	Absorbance observée
2.0	0.059
4.0	0.071
6.0	0.099
7.8	0.116
10.24	0.148
12.19	0.150



**Figure 53** : Valeurs d'absorbance et courbe de saturation pour la formation de l'amide vinylogue avec l'enzyme ([monomère] = 14.1  $\mu\text{M}$ )

La courbe de saturation, passant par les points obtenus expérimentalement, dérivait de l'équation suivante (voir chapitre 5.5) :

$$y = \frac{K_S + x + [enz] - \sqrt{(K_S + x + [enz])^2 - 4 [enz] x}}{2 [enz]}$$

A

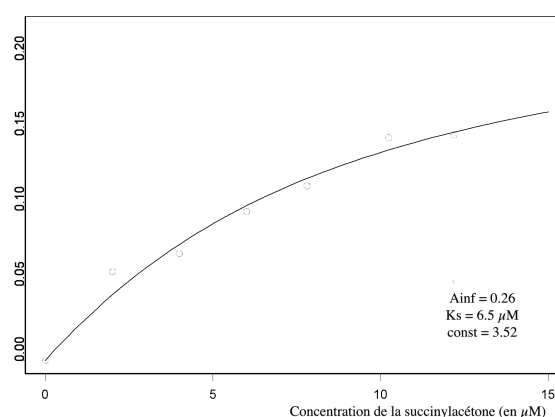
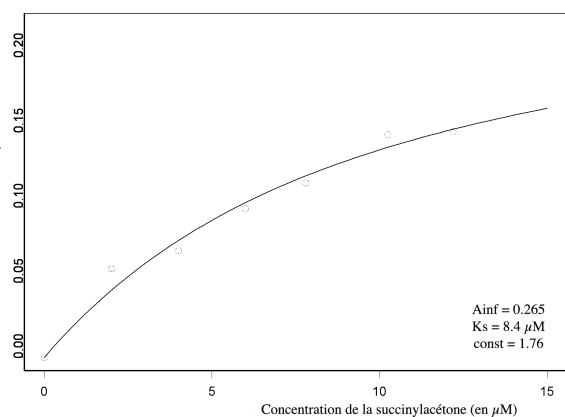
où  $K_S$  = constante de dissociation du complexe succinylacétone-enzyme

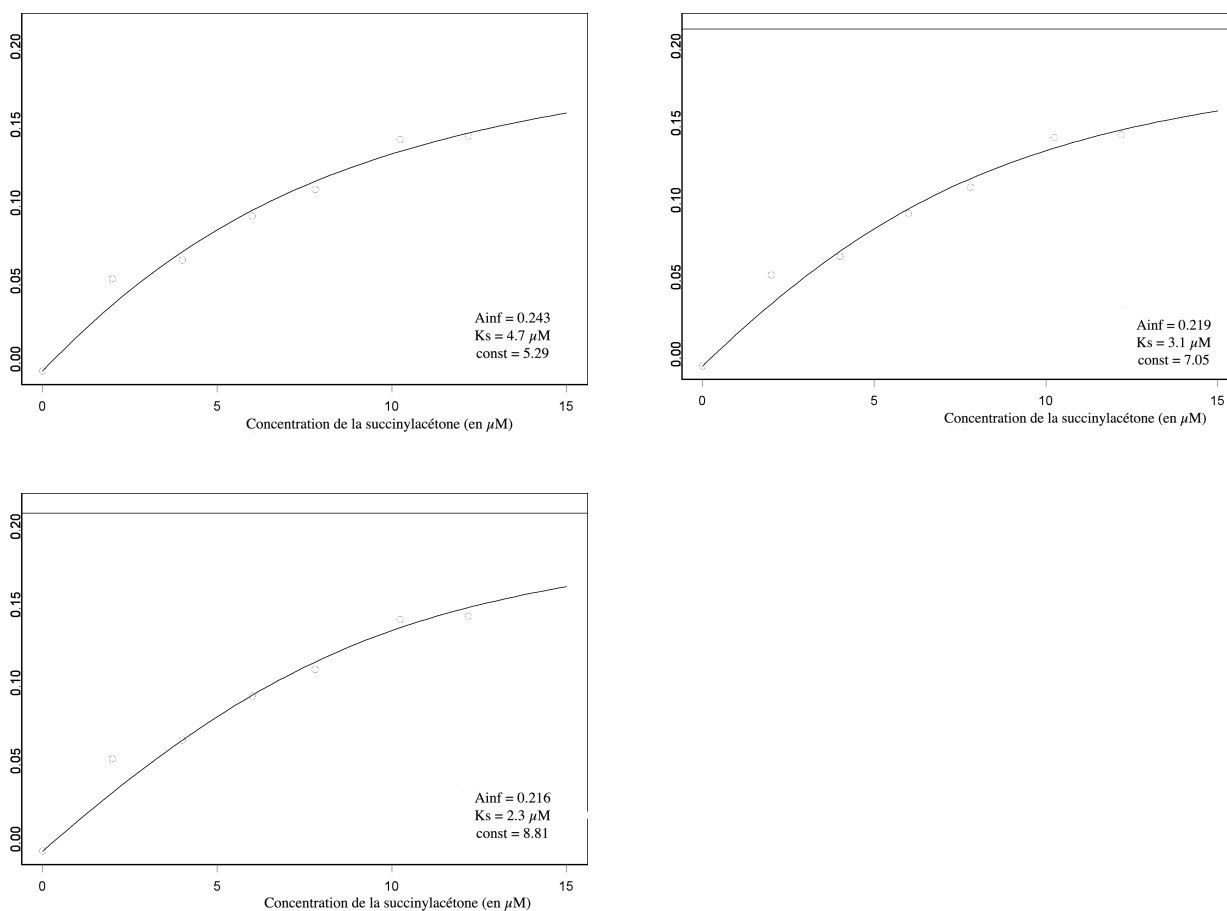
$x$  = concentration de la succinylacétone (en  $\mu\text{M}$ )

$y$  = absorbance du complexe succinylacétone-enzyme

La concentration enzymatique utilisée lors des tests était de  $14.1 \mu\text{M}$  (on considérait la concentration des monomères).

Lorsqu'on remplaçait, dans l'équation ci-dessus, la  $[enz]$  par  $14.1 \mu\text{M}$ , les paramètres ne convergeaient pas. On ne pouvait justifier ce résultat que d'une seule manière : l'enzyme n'utilisait pas ces huit sites catalytiques lors de la réaction avec la succinylacétone (**19**). Les mêmes résultats furent obtenus lorsqu'on utilisait une concentration enzymatique de  $12.3 \mu\text{M}$  (concentration correspondant à 7 sites actifs) et de  $10.6 \mu\text{M}$  (concentration correspondant à 6 sites actifs). Par contre, une convergence était observée pour des concentrations de  $8.81 \mu\text{M}$ ,  $7.05 \mu\text{M}$ ,  $5.29 \mu\text{M}$ ,  $3.52 \mu\text{M}$  et  $1.76 \mu\text{M}$  (concentrations correspondant à 5, 4, 3, 2 et 1 site(s) actif(s)). Les régressions non linéaires suivantes furent obtenues pour les concentrations où une convergence était observée (programme utilisé S-plus) :





**Figure 54** : Régressions non linéaires obtenues pour les concentrations où une convergence était observée

Le tableau 14 résume les valeurs de l'absorbance calculées à l'infini ( $A_{inf}$ ), les valeurs de la constante de dissociation du complexe enzyme-succinylacétone ( $K_S$ ) et les coefficients d'extinction correspondants. Les valeurs de l'erreur standard sur les deux constantes  $A_{inf}$  et  $K_S$  sont aussi indiquées.

<b>Enzyme (en <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>A_{inf}</math></b>	<b>Erreur</b>	<b><math>K_S</math> (en <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Erreur</b>
1.7625	0.2652	0.0507	8.3669	3.2255
3.5250	0.2498	0.0528	6.4827	3.1606
5.2875	0.2337	0.0576	4.6841	3.1891
7.0500	0.2186	0.0714	3.1030	3.5377
8.8125	0.2162	0.1259	2.2640	5.6261

<b>Enzyme (en <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Coefficient d'extinction (en <math>\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}</math>)</b>
1.7625	150'568
3.5250	73'864
5.2875	49'936
7.0500	31'064
8.8125	24'518

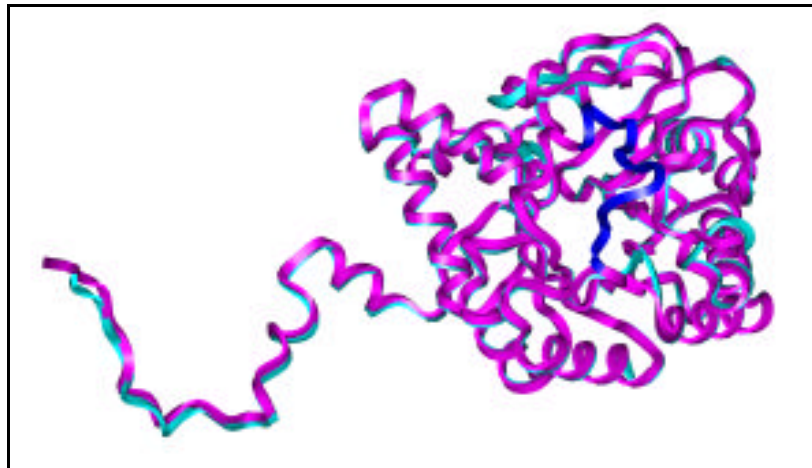
**Tableau 14** : Résumé des valeurs obtenues

En considérant les résultats obtenus et surtout les erreurs standard calculées pour les deux constantes  $A_{\text{inf}}$  et  $K_S$ , il ne nous était pas possible d'établir, de manière définitive, le nombre de sites utilisés par la PBGS durant sa réaction avec la succinylacétone (**19**). Il était par contre, tout à fait clair, que l'enzyme n'utilisait ni 8, ni 7, ni 6 de ses sites, puisque les paramètres ne convergeaient absolument pas pour les concentrations correspondantes. Par contre, en tenant compte des travaux antérieurs effectués dans d'autres groupes de recherche, une concentration enzymatique de 7.05  $\mu\text{M}$ , correspondant à l'utilisation de quatre sites actifs sur les huit présents, nous semblait être justifiable et donc, un phénomène de *half-site reactivity* n'était pas à exclure. La conformation de l'amide vinylogue formée au site actif de l'enzyme ne put être déterminée sans ambiguïté. En effet, la longueur d'onde de 320 nm, correspondant au maximum d'absorbance, indiquerait une conformation du type *cis-s-cis* ou *cis-s-trans*, par contre selon le coefficient d'extinction calculé, on serait en présence d'une conformation du type *trans-s-trans*. Il est clair que les courbes obtenus ne discriminaient ni l'une ni l'autre des conformations. Par contre, vu que les coefficients d'extinction pour une occupation majoritaire des sites actif se situaient proches de la valeur attendue, il était plus que probable que la conformation observée aurait été de la forme *cis-s-cis* ou *cis-s-trans*, si les courbes étaient plus précises.

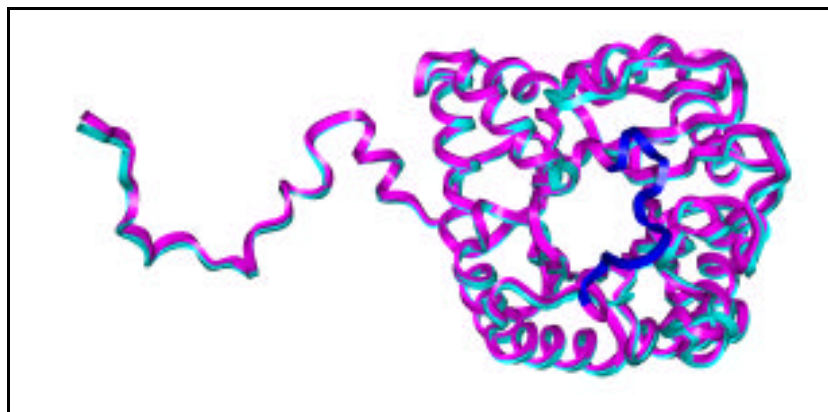
La publication dans Helvetica donne de plus amples détails concernant ces résultats.

#### 4.4 La PBGS et un *fit induit*

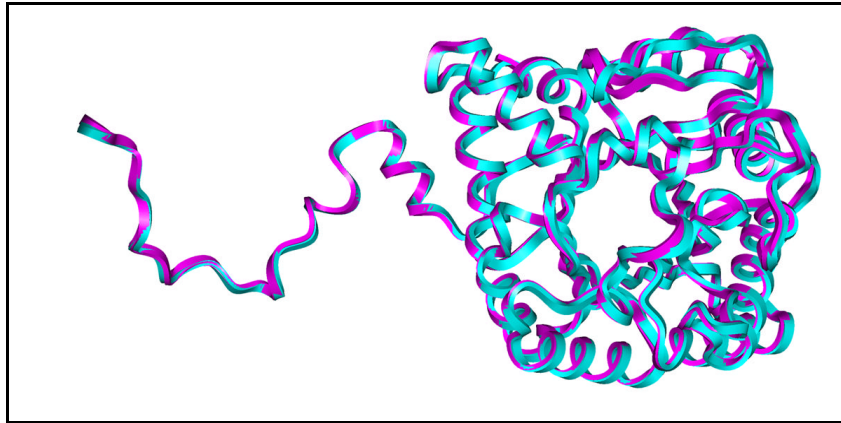
Il était intéressant de déterminer si la présence de l'inhibiteur au site actif modifiait d'une manière quelconque la conformation de celui-ci, qu'il y avait donc un *fit induit*. Les figures 55a, b, c et 56a, b, c représentent la superposition de deux structures en forme de ruban et la superposition des acides aminés importants du site actif respectivement :



a

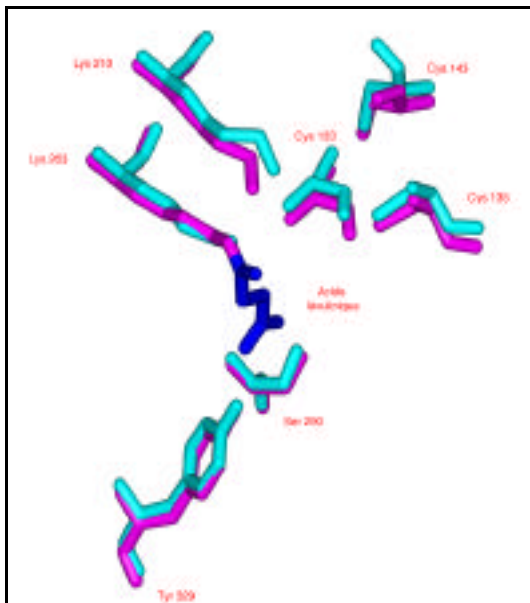


b

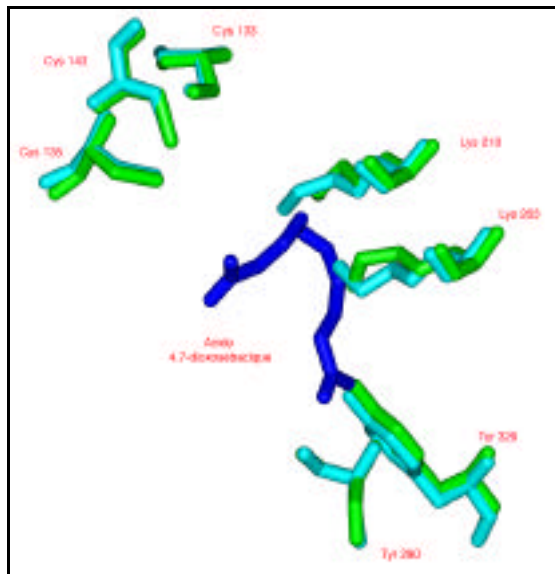


c

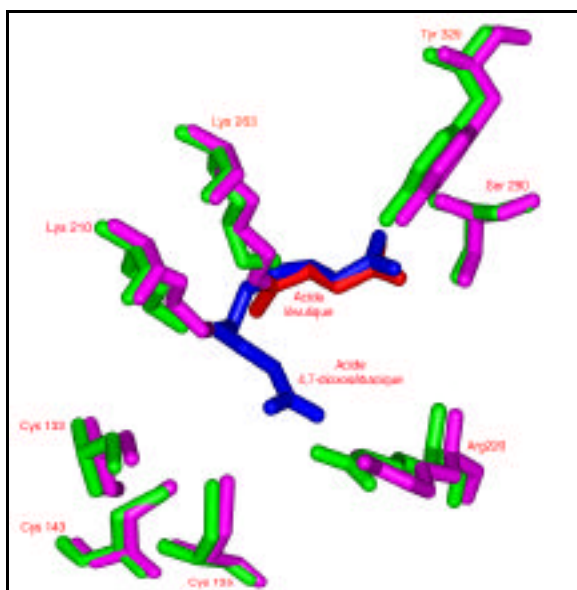
**Figure 55** : Superposition des monomères. a) PBGS sans inhibiteur (bleu) et avec l'acide lévulinique (**24**) (violet). b) PBGS sans inhibiteur (bleu) et avec l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) (violet). c) PBGS avec l'acide lévulinique (bleu) et l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) (violet). Le *lid* est représenté en bleu foncé



a



b



c

**Figure 56** : Superposition des acides aminés importants du site actif. a) PBGS sans inhibiteur (bleu) et avec l'acide lévulinique (**24**) (violet). b) PBGS sans inhibiteur (bleu) et avec l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) (vert). c) PBGS avec l'acide lévulinique (**24**) (violet) et l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) (vert)

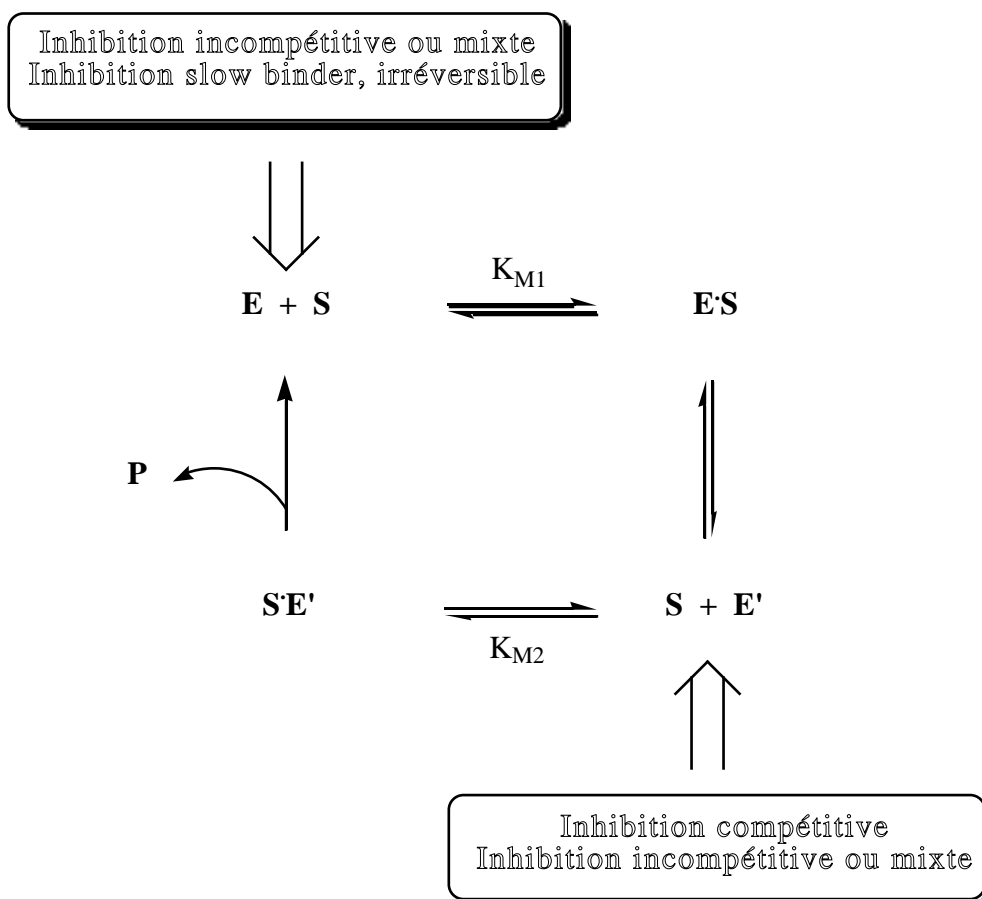
Selon les structures de la PBGS représentées sous forme de ruban (voir figures 55a, b, c), il ne semble pas y avoir une modification générale et visible de la conformation du monomère, à part sur quelques structures secondaires assez éloignées du site actif et donc peu probable d'avoir une importance catégorique sur le mécanisme réactionnel. Si on effectuait un agrandissement au niveau du site actif (voir figures 56a, b, c), on pouvait constater un léger réarrangement des acides aminés-clef du site actif, mais rien de bien considérable. Il ne semblait donc pas y avoir un *fit induit* lors de la liaison de l'inhibiteur. L'inhibiteur pouvait donc se lier au site actif de l'enzyme sans contraindre cette dernière à adopter une nouvelle conformation. Aucun acide aminé important au site actif ne subissait donc une modification drastique de sa position originale et la liaison de l'inhibiteur au site actif n'induisait aucune modification de la structure tertiaire du monomère via des déplacements en chaîne d'acides aminés. Ces considérations nous amenaient donc à conclure que l'acide lévulinique (**24**) et que l'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) présentaient des structures semblables à des intermédiaires apparaissant dans la transformation de l'ALA (**6**) en PBG (**2**) et que l'enzyme n'avait que peu de difficultés à les accepter au niveau du site actif.

## 4.5 Les hypothèses de travail appliquées à l'étude du mécanisme

Tous les résultats obtenus lors des tests d'inhibition sont discutés dans les chapitres qui suivent en accord avec les points suivants :

- la porphobilinogène synthase possède deux sites de reconnaissance distincts pour chacun de ses deux substrats, nommés site A et P (par rapport aux chaînes acétique et propionique résultantes sur le PBG) [35]
- la séquence de reconnaissance des deux substrats est la suivante : la première molécule d'ALA (**1**) est reconnue au site P et la seconde au site A [36]
- les constantes de Michaelis-Menten calculées sont de 2.23  $\mu\text{M}$  pour le site P ( $K_{M1}$ ) et de 46.38  $\mu\text{M}$  pour le site A ( $K_{M2}$ )
- la constante  $K_M$  dérivée de la cinétique de Michaelis-Menten pour les inhibiteurs compétitifs correspond à la reconnaissance du second substrat au niveau du site A
- le site actif contient deux lysines : une des lysines forme la base de Schiff avec la première molécule de ALA (**1**) [61]; la seconde lysine formerait une seconde base de Schiff avec la seconde molécule de substrat selon les résultats obtenus par rayons X [52] [55]
- la première base de Schiff est de configuration *trans* entre l'azote de la lysine et le carbone C(5) de l'ALA selon les résultats RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  déterminés par Jaffe [63] [64]
- le carboxylate au site P est reconnue par une sérine et une tyrosine [54] [51] et le carboxylate au site A par deux arginines et une glutamine [52] [55]
- les rayons X ont montré la présence d'un zinc entouré de trois cystéines et d'une molécule d'eau au niveau du site A (ion métallique important pour la catalyse) [49] [54]
- les divers types d'inhibition rencontrés sont classés de la manière suivante :

1. compétitif : l'inhibiteur est en compétition directe avec la liaison du second substrat au site A
2. compétitif/mixte, incompétitif/mixte, incompétitif : l'inhibiteur interagit aussi bien au site A qu'au site P, mais à des degrés différents
3. slow-binder, irréversible : l'inhibiteur se lie essentiellement au site P.



**Schéma 15** : 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. Ces analyses sont corrélées à des inhibiteurs appartenant à un même groupe de modification et dont les résultats ont été soit discutés par Caroline Engloch-Jarret <sup>[90]</sup> soit par Matthias Henz <sup>[91]</sup>. Toutes les données récoltées devraient créer un tableau général de l'environnement présent autour des substrats naturels au site catalytique de l'enzyme.

## **4.6 Inhibition studies of Porphobilinogen Synthase isolated from *Escherichia coli* differentiating between the two recognition sites.**

Frédéric Stauffer,<sup>[a]</sup> Eleonora Zizzari,<sup>[b]</sup> Caroline Engeloch-Jarret,<sup>[c]</sup> Jean-Philippe Faurite,<sup>[b]</sup> Janette Bobálová<sup>[d]</sup> and Reinhard Neier\*<sup>[b]</sup>

A European Journal of Chemical Biology  
CHEMBIOCHEM (2001), 2, 343-354

[a] Dr. F. Stauffer, Department of Chemistry and Skaggs Institute for Chemical Biology,

1055N, Torrey Pines Rd, BCC-483 La Jolla, CA 92037 (USA)

[b] Prof. Dr. R. Neier, E. Zizzari, J.-P. Faurite, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Neuchâtel, Av. de Bellevaux 51, Case postale 2, Neuchâtel 2007 (Switzerland), Fax (+41) 32/718-2511, E-mail: reinhard.neier@ich.unine.ch

[c] Dr. C. Engeloch-Jarret, Institute of Organic Chemistry, University of Basel, St-Johanns-Ring 19, 4056 Basel (Switzerland)

[d] Dr. J. Bobálová, Department of Physiology and Biology, University of Nevada School of Medicine, Anderson Medical Building 352, Reno, NV 89557-0046 (USA)

### **4.6.1 Abstract**

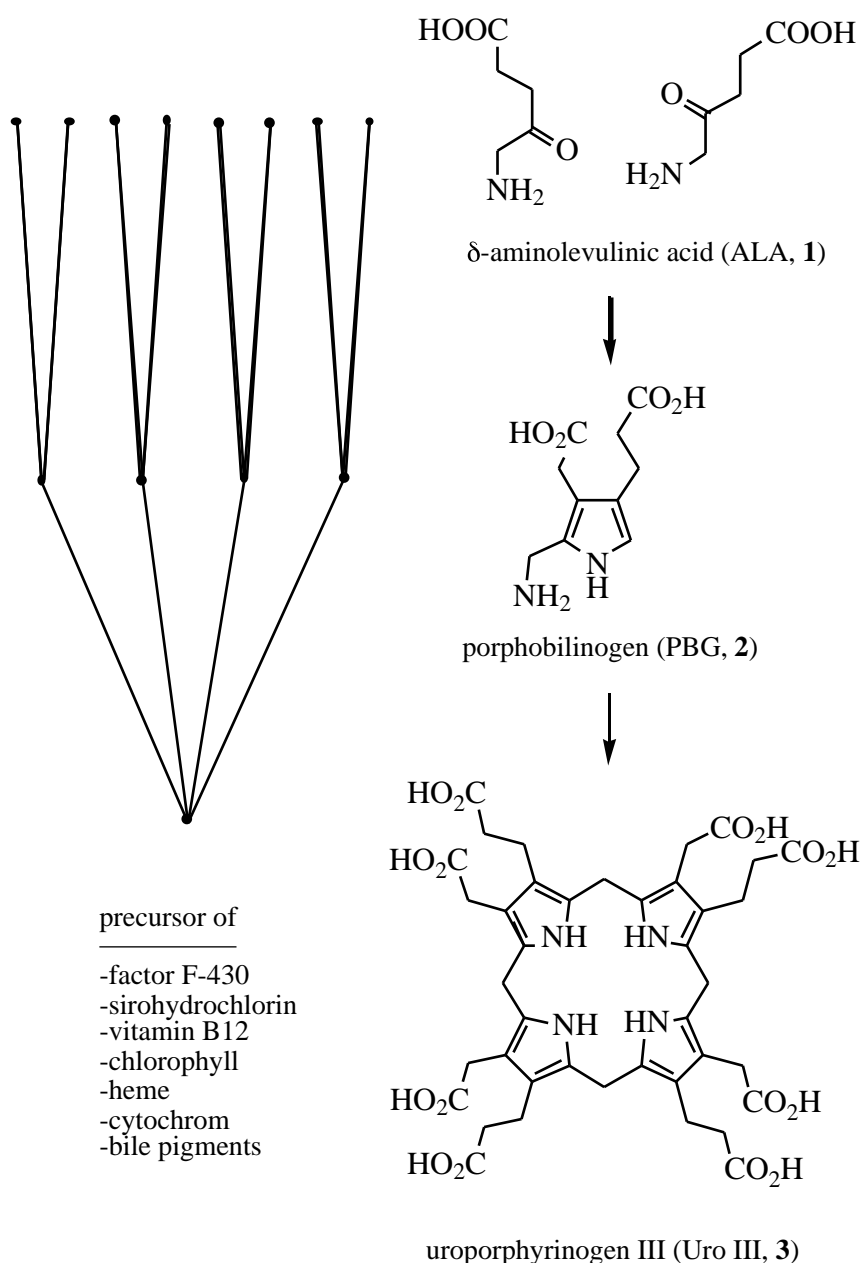
Porphobilinogen synthase condenses two molecules of 5-aminolevulinate in an asymmetric way. This unusual transformation requires a selective recognition and differentiation between the substrate ending up in the A side or in the P side of porphobilinogen. Studies of inhibitors based on the key intermediate first postulated by Jordan allowed differentiation of the two recognition sites. The P site whose structure is known from X-ray studies tolerates ester functions well. The A site gives a very strong interaction with nitro groups but is not very tolerant towards ester functions. This differentiation is a central factor in the asymmetric handling of the two identical substrates. Finally it could be shown that the keto group at the A site is not only essential for the recognition, but that an increase in electrophilicity of the C-atom also increases the inhibition potency considerably. This has important consequences for the recognition process at the A site, whose exact structure is not yet known.

## 4.6.2 Keywords

Biosynthesis - Enzyme inhibitors - Intermediates Porphobilinogen - Porphynoids

## 4.6.3 Introduction

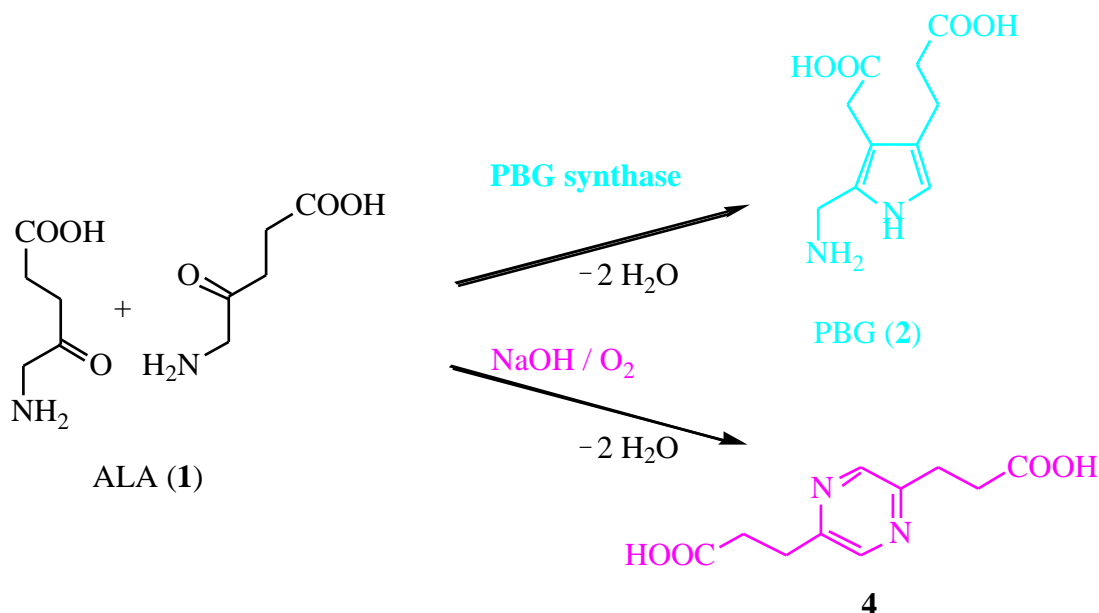
The biosynthesis of the tetrapyrrolic skeleton of the «pigments of life»<sup>[1]</sup> has fascinated chemists and biologists since their discovery and their structure determination.<sup>[2]</sup> Starting from the first dedicated intermediate in the biosynthesis of the tetrapyrrolic dyes, 5-aminolevulinic acid (ALA, **1**), the macrocyclic skeleton is synthesized in only three enzyme-catalyzed steps in a highly convergent way (see Scheme 1).<sup>[3]</sup> Two condensation steps lead first to porphobilinogen (PBG, **2**)<sup>[4,5]</sup> and then to the linear hydroxybilane, which cyclizes and rearranges to the common precursor of all pigments of life, uroporphyrinogen III (Uro III, **3**).<sup>[6]</sup> The synthetic efficiency of the biosynthesis and the importance of the tetrapyrrolic cofactors have further enhanced the interest in studies of the biosynthetic pathway.



**Scheme 1** : The convergent biosynthesis of uroporphyrinogen III (**3**) from eight molecules of 5-aminolevulinic acid (**1**), as determined by the biosynthetic and synthetic studies of the groups of Akhtar, Arigoni, Battersby, Eschenmoser, Jordan, Müller, Scott, Shemin and Thauer (for a review of this pathway see <sup>[71]</sup>). On the left the retrosynthetic tree for the transformation of eight molecules of 5-aminolevulinic acid (**1**) into four molecules of porphobilinogen (**2**) and finally into one molecule of uroporphyrinogen III (**3**) is symbolically represented

In this three-step sequence, the first step, formation of PBG (**2**), cannot easily be imitated by chemists (see Scheme 2).<sup>[7-14]</sup> In contrast to this observation the tetramerisation and cyclisation have been shown to occur in the presence of acids forming the natural

regioisomer, uro III (**3**) as the major product.<sup>[15]</sup> However the chemical condensation of ALA (**1**) in the presence of oxygen gives an appreciable amount of the oxidized pyrazine **4**.<sup>[16]</sup> In the absence of oxygen, the symmetric diimine is formed as major product and a small amount of pseudo-PBG has been observed as side product.<sup>[17,18]</sup> Treating ALA (**1**) with Amberlite TR-45 for a long time has been reported to give some PBG (**2**).<sup>[16,17]</sup>



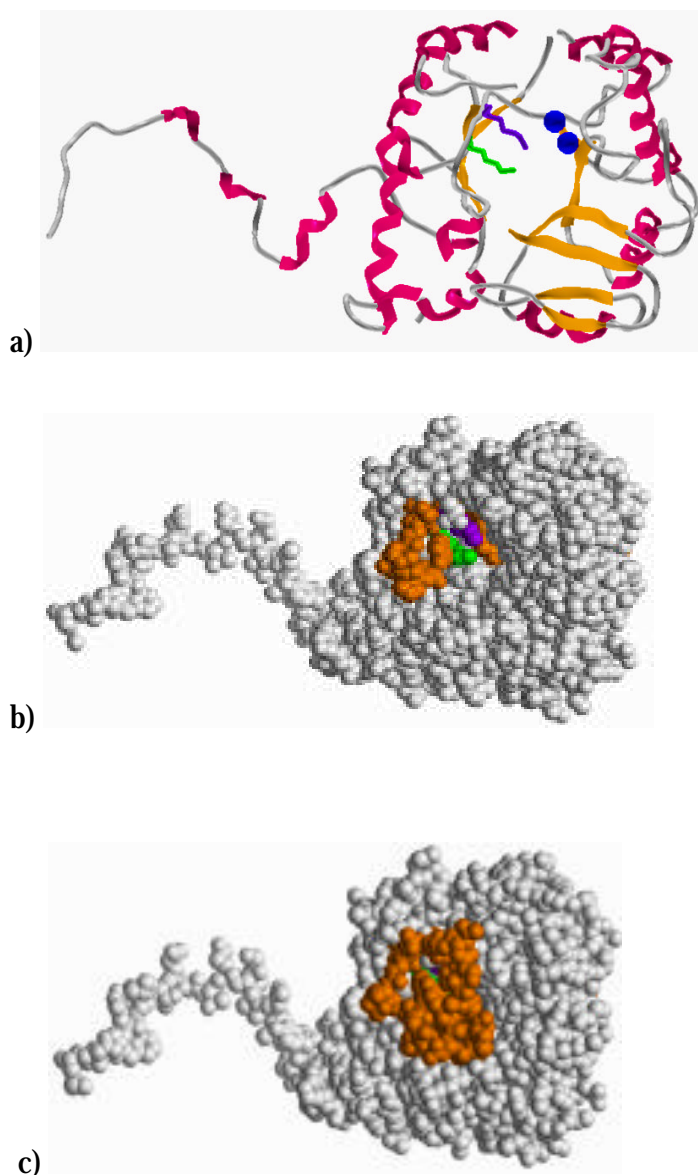
**Scheme 2 :** The dichotomy between the biosynthetic and the chemical dimerisation of 5-aminolevulinic acid

Porphobilinogen synthase (PBGS, E.C. 4.2.1.24), also called 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD), the enzyme responsible for the nonsymmetrical condensation of the two molecules of ALA (**1**) has been isolated and studied for a long time.<sup>[19]</sup> PBGS is widely distributed in bacteria, plants, animals and humans.<sup>[14]</sup> All PBGSs studied so far share a considerable degree of homology<sup>[20]</sup> and most enzymes were shown to be present as octamers.<sup>[21,22]</sup> In early studies it could be shown that a Schiff base between ALA (**1**) and a Lys located in the active site of PBGS can be trapped by reduction with NaBH<sub>4</sub>.<sup>[23]</sup> This result was one of the important motivations to draw a close mechanistic analogy between PBGS and the aldolases of type I.<sup>[23]</sup>

The influence on the catalytic activity of PBGS of bivalent metal ions like Zn<sup>II</sup> and Mg<sup>II</sup> was recognized and intensively studied.<sup>[24]</sup> For the Zn<sup>II</sup>-containing enzymes, the three Cys binding the metal ion could be identified.<sup>[25]</sup> For the Mg<sup>II</sup>-containing enzymes it was assumed that the aspartate-rich region replacing the zinc finger element would form the

ligands for the metal ion. One of the most important findings was the determination of the sequence of recognition of the two substrates. Using an elegant pulse labeling experiment Jordan and Seehra could demonstrate that the first ALA (**1**) recognized by PBGS will form the propionic acid sidechain of PBG (**2**).<sup>[26]</sup> ALA (**1**) forming the propionic acid sidechain will first interact with the P site of the enzyme and the second ALA-molecule will interact with the A site.<sup>[26]</sup> Based on this finding an alternative mechanism for the transformation of ALA (**1**) to PBG (**2**) was proposed.<sup>[6,26,27]</sup> An impressive effort allowed characterization of the complexes between modified PBGS and its natural substrate ALA (**1**) by sophisticated NMR-techniques.<sup>[28]</sup> These spectroscopic measurements identified the Schiff base formed with the P site of the enzyme and gave indications about the protonation state of both this enzyme substrate complex and the product enzyme complex.<sup>[28,29]</sup>

Molecular biology has allowed the determination and comparison of the sequence of PBGSs from many sources.<sup>[20]</sup> More importantly it became possible to overexpress this enzyme. In recent years the high-resolution X-ray structures of PBGS from three different sources have been published.<sup>[25,30-32]</sup> The structures of the enzymes with an empty active site and of the enzymes containing one of the classical inhibitors levulinic acid are now available (Brookhaven Protein Data Bank, PDB entries 1aw5, 1ylv, 1b4k). The overall structures of the PBGS from the three sources *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are very similar. The three enzymes crystallize as an octamer, which is a tetramer of a dimer. The overall structure of the protein corresponds to a TIM-barrel (see Figure 1a).<sup>[25,33]</sup> The *N*-terminal arm is responsible for a large number of contacts between the two units of the homodimer. The Zn<sup>II</sup> ion present in the active site is held by three Cys (Cys133, Cys135 and Cys143, numbering for PBGS from *S. cerevisiae*). The X-ray structure of PBGS showed not only the Lys (Lys263 for PBGS from *S. cerevisiae*) identified by the reduction with NaBH<sub>4</sub> but also the presence of a second Lys in the active site (Lys210, numbering for PBGS from *S. cerevisiae*). The structures containing levulinic acid at the P site clearly indicated the formation of the Schiff base between the carbonyl group and the  $\alpha$ -amino group of Lys263 (PBGS from *S. cerevisiae*) and the hydrogen bonding of the carboxylate to Tyr329 and Ser290 (numbering for PBGS from *S. cerevisiae*).



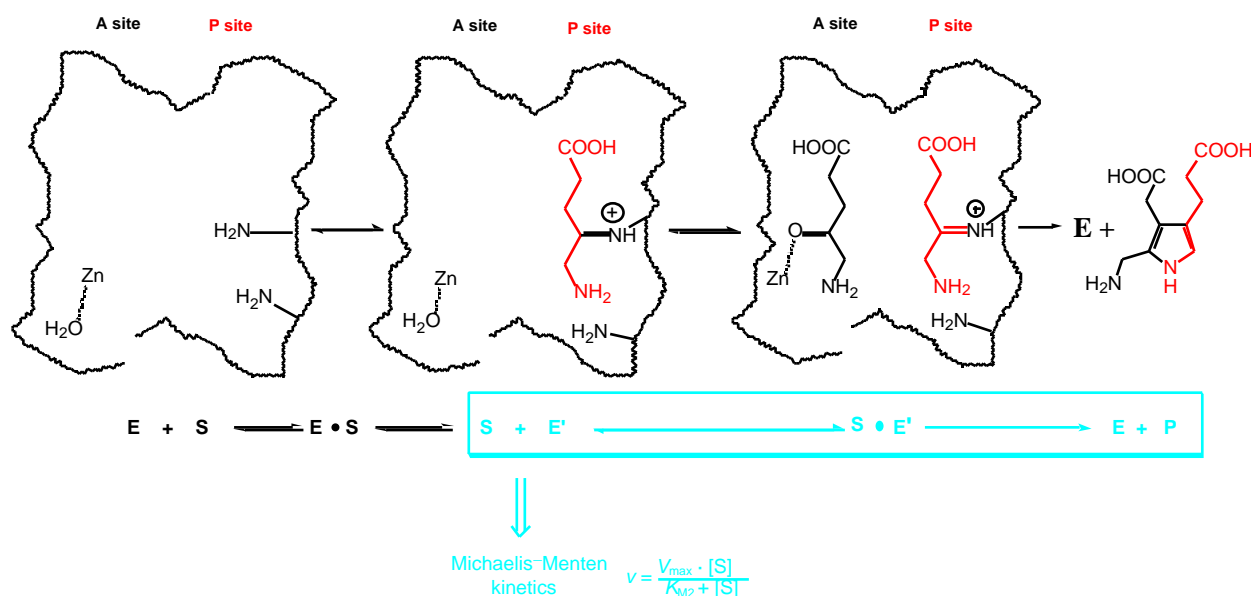
**Figure 1 :** 1a) PBGS from *S. cerevisiae*. The TIM barrel structure and the *N*-terminal arm are clearly visible in the schematic presentation of the elements of the secondary structure. The two Lys of the active site are coloured in green for Lys263 and in magenta for Lys210; the two Zn (II) ions are coloured in blue. 1b) PBGS without an inhibitor bound to the active site in a space filling model. The lid part of the enzyme is coloured in orange. The active site is accessible from the outside. 1c) The structure of PBGS bound to levulinate. The lid is much more structured and covers almost totally the active site. The two Lys of the active site are not accessible from the outside. This structures have been drawn using the coordinates deposited in the Brookhaven Protein Databank (PDB entries 1aw5 and 1ylv which are respectively at 2.3 Å and 2.15 Å resolution), and using SYBYL 6.6 (TRIPOS inc. St Louis)

The structures of PBGS not containing the inhibitor bound to the active site were not well resolved in the region of the amino acids 220 to 233. When the inhibitor was bound to the enzyme this lid covers tightly the active site (see Figure 1b and 1c). The structure of PBGS from *P. aeruginosa* could be determined with a high resolution.<sup>[30]</sup> The overall structure is similar to those observed for the two other PBGSs resolved. Within the same crystal the two active sites of the asymmetric dimer were occupied by a single molecule of levulinic acid, but only one site was completely closed by the lid. Only one Mg<sup>II</sup> is present per dimer. The Mg<sup>II</sup> is not positioned at the active site, but at the interface between the two subunits.<sup>[30]</sup> A catalytic role has been attributed to the Zn<sup>II</sup>-ions present in the active site. The Mg<sup>II</sup> must play another role and an allosteric interaction of the metal ion has been proposed inducing the complete closure of the lid.<sup>[30]</sup>

Right from the beginning of the studies of PBGS, inhibition experiments were undertaken to explore the active site of the enzyme.<sup>[34-36]</sup> Our group has studied the inhibition behaviour of PBGS isolated from *Rhodobacter spheroides* and from *E. coli*.<sup>[14,37]</sup> The goal of our systematic studies is to characterize the recognition sites of PBGS sufficiently, so that adequate analogs of the postulated intermediates can be synthesized and their inhibition behaviour can be tested. The long-term objective is to obtain information relevant for the detailed understanding of the mechanism and at the same time to have a collection of adequate inhibitors available suited for co-crystallization with the enzyme.

Several groups have made significant contributions to our knowledge of the inhibition behaviour of substrate analogs.<sup>[14,36,39]</sup> These systematic studies have been facilitated by the availability of large quantities of recombinant PBGS from organisms like *E. coli*, *S. cerevisiae* and *Pisum sativum*.<sup>[38]</sup> Only recently we could show that the kinetics of PBGS depends highly on the concentration of the natural substrate used during the test.<sup>[41]</sup> Using concentrations between 4-80 mM a parabolic curve is observed if an inverse plot (1/S against 1/v) is used to analyse the experimental results. This parabolic curve is compatible with a mechanism where two substrate molecules are sequentially recognized at the active site of the enzyme (see Figure 2). The Michaelis-Menten constants for the two sites can be calculated  $K_{M1} = 4.6$  mM and  $K_{M2} = 66$  mM. If however substrate concentrations between 80-400 mM are used, simple Michaelis-Menten kinetics are observed. This behaviour has been interpreted as the consequence of saturating the first recognition site of PBGS and thereby observing only the competition between our inhibitors and the recognition of the second substrate by the enzyme saturated at the P site with the natural substrate.

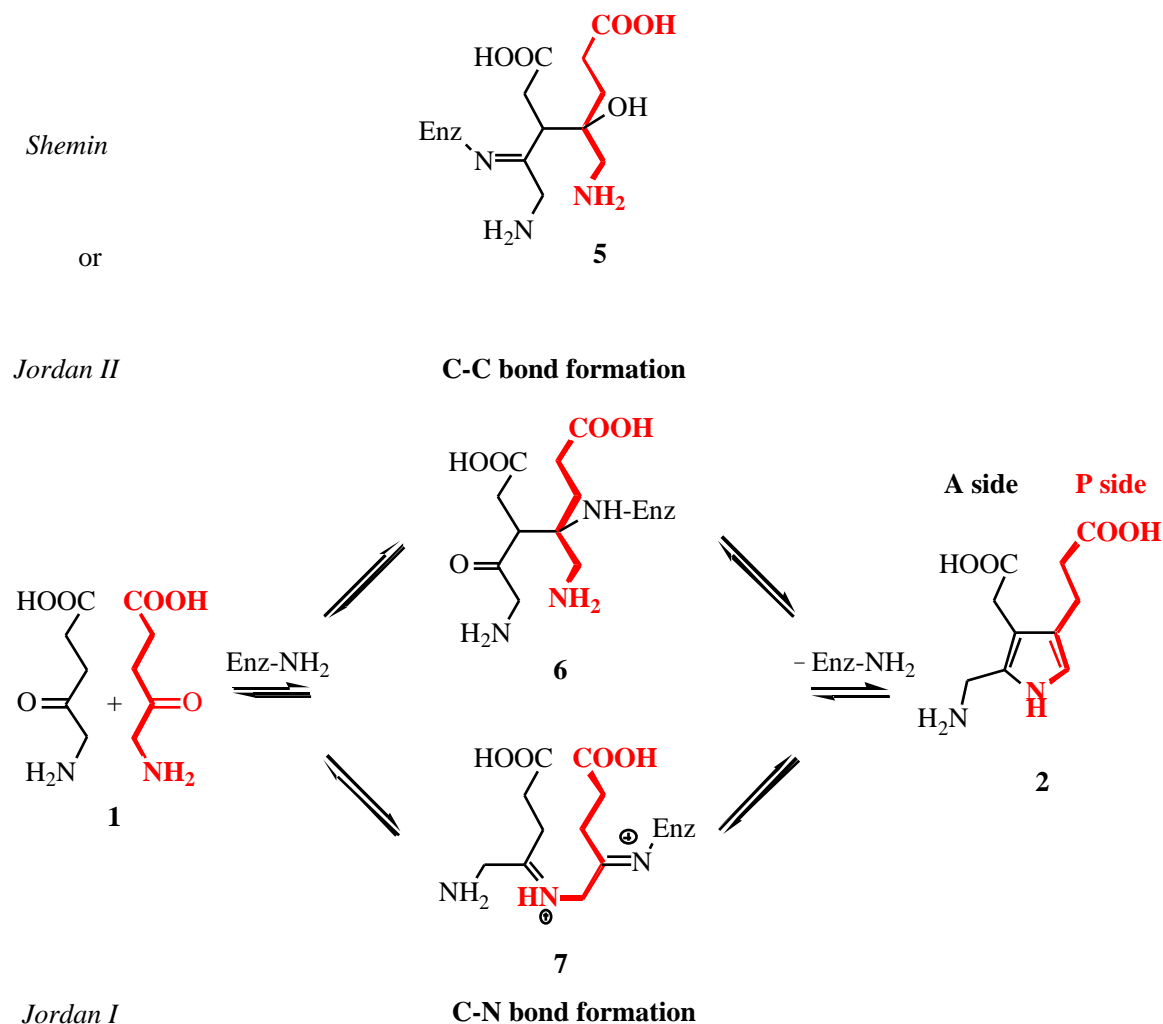
This peculiarity of PBGS allows one to draw conclusions not only from the size of the inhibition constants, but also from the change in inhibition behaviour. We interpret pure competitive inhibition as a consequence of competition between the natural substrate and the inhibitor for the A site of the enzyme. Observation of mixed or uncompetitive inhibition is a clear sign for a more complex interaction; probably the inhibitor competes with the natural substrate also for the P site. In the absence of functional groups capable of forming irreversible covalent bonds with the enzyme, slow binding or even irreversible inhibition is an indication that several functional groups interact synergistically with the amino acids of the active site. It is probable that interactions at both sites of the enzyme, the A and the P site are responsible for this behaviour.



**Figure 2 :** Mechanistic and kinetic interpretation of the fact that a Michaelis-menten kinetics is observed for the inhibition of the PBGS

PBGS will recognize two  $\delta$ -amino acids **1** first, which will be transformed into an aromatic amino dicarboxylic acid **2**. Whatever is the mechanism of this transformation at one point an aliphatic dicarboxylic acid must be present as intermediate. In a recent study we have shown that aliphatic  $\gamma$ -ketodicarboxylates are recognized by PBGS.<sup>[41]</sup> The chain length is an important factor determining the inhibition behaviour as well as the size of the inhibition constant. 4-Oxo-pimelic acid is a moderate competitive inhibitor whereas 4-oxo-sebacic acid is an irreversible inhibitor. We have interpreted this significant change in the inhibition

behaviour as a function of the chain length as a hint in favour of the mechanism first proposed by Jordan (see Scheme 3 mechanism *Jordan I*).<sup>[41]</sup>



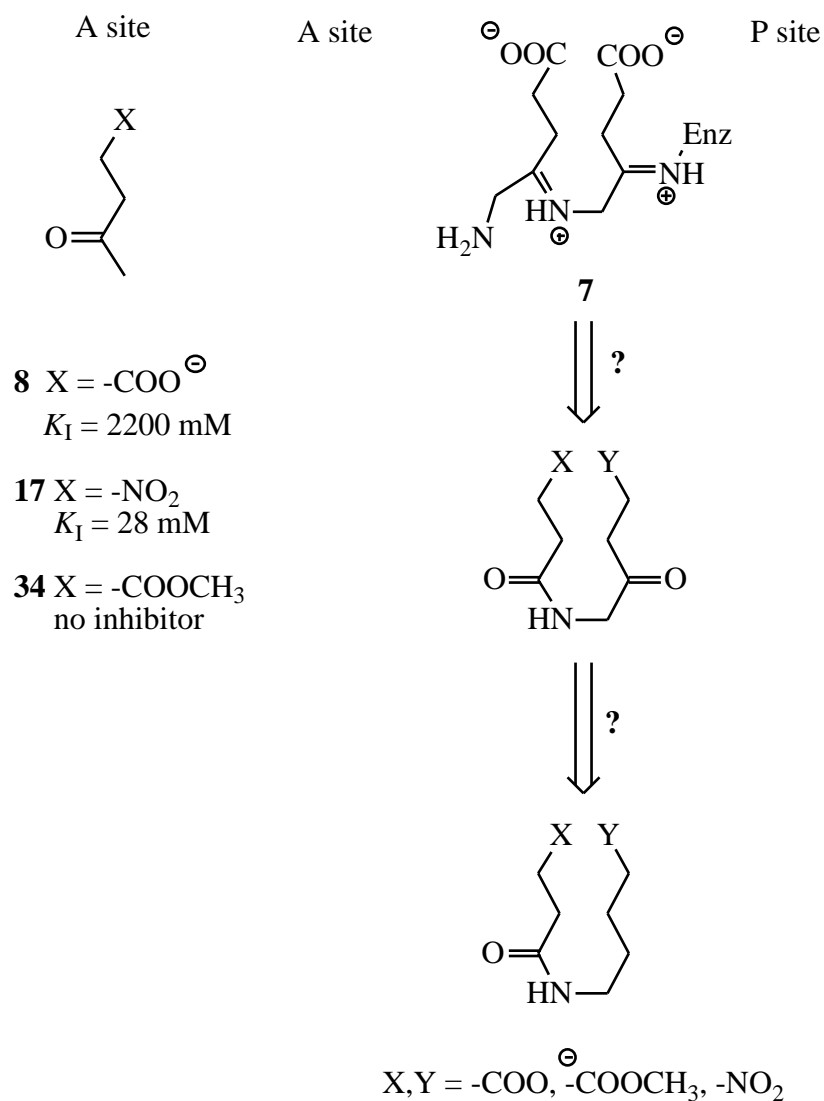
**Scheme 3**: The three key intermediates postulated by Shemin and Jordan for the biosynthesis of PBG (**2**)

Concentrating the mechanistic analysis on the key step, which will connect for the first time the two identical substrates thereby creating the differentiation between the two ALA-molecules (**1**), three proposals have been discussed. The first proposal made by Shemin over 30 years ago used a close analogy with the aldolases of type I as a guide line. The central point of this mechanism is the formation of a Schiff base between the enzyme and the A side substrate. This Schiff base is then transformed into its enamine that has the correct reactivity to form the crucial C-C bond leading to the intermediate **5**. Despite the attractiveness from the mechanistic point of view <sup>[23]</sup>, this proposal has been largely dismissed due to the fact that Shemin proposed the recognition of the A side substrate first.

This is clearly not compatible with the results of Jordan's pulse-labeling experiments. The formation of the same C-C bond has been proposed by Jordan later (*Jordan II*) forming the intermediate **6** as key compound joining the two-substrate molecules for the first time.<sup>[6]</sup> His proposal incorporates the sequence of recognition events. The mechanism postulated by Jordan first (*Jordan I*) proposes the formation of the key intermediate **7** which involves the Schiff base between the two reacting starting materials. This mechanism has the advantage of following the mechanism proposed for the Knorr pyrrole synthesis.<sup>[40]</sup> However it has been recognized that stereoelectronically this ring closure reaction is not favorable.<sup>[42]</sup> It is worth mentioning that it has not been possible to trap this second Schiff base despite considerable efforts.<sup>[43]</sup>

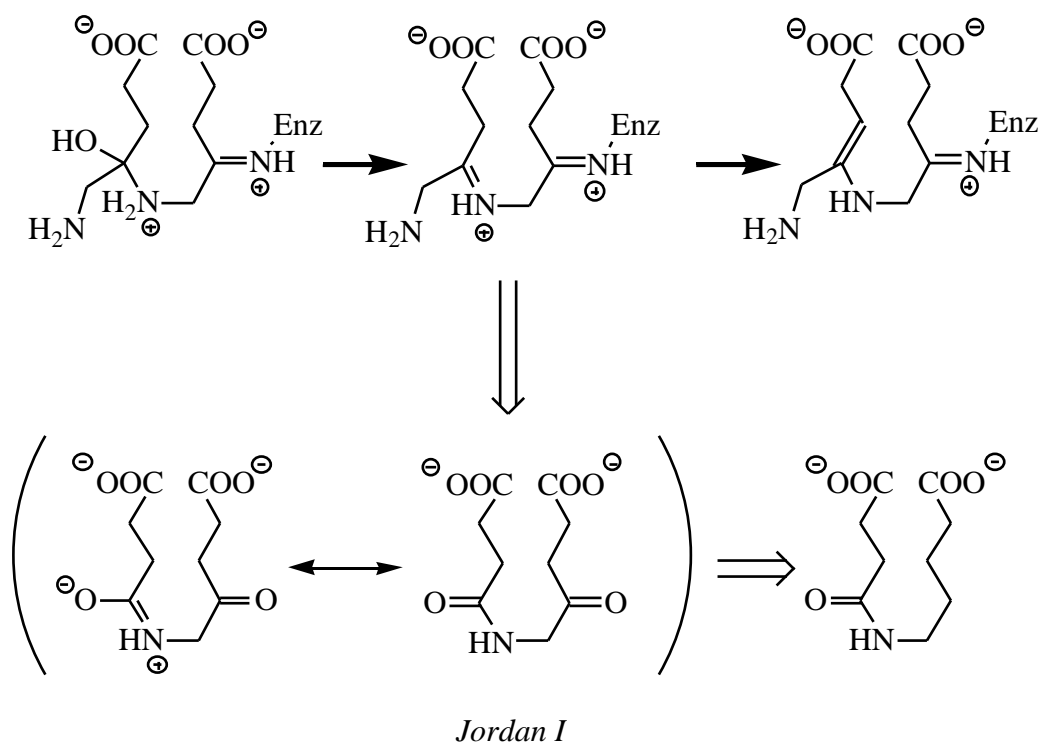
#### **4.6.4 Results and Discussion**

Studies with substrate analogs giving competitive inhibition behaviour had shown that for a good recognition the  $\alpha$ -keto function was necessary.<sup>[44,45]</sup> Replacing the amino group of the substrate had no significant influence. This result is compatible with our kinetic interpretation postulating the interaction of these inhibitors at the A site. The amino group at this position does not undergo any change during the reaction. Finally the carboxylate is important for a good recognition. Replacing the carboxylate by an ester reduces the affinity considerably; usually  $K_I$  increases by at least a factor of 10-20. The carboxylate function can be substituted by a nitro group and a considerable increase of the affinity can be observed:  $K_I$  decreases by a factor of about 100. Synthesizing and testing dicarboxylates and analogs thereof, which contain the three functional groups mentioned above should allow analysis not only of the recognition selectivity at the A site, but also at the P site (see Scheme 4).



**Scheme 4** : The "Jordan I" intermediate compared to the simplified structures used to construct families of inhibitors. The inhibition potency of the substrate analogs **8**, **17**, **34** has been determined for comparison with the inhibition constants of the more complex analogs of intermediates [37,45,70]

To be able to work out this analysis, the inhibitors have to be recognized at both sites and we have to be able to predict the orientation of the inhibitor in the active site. The analysis of all the reported inhibition studies of PBGS indicates that replacing the keto function of an inhibitor reduces substantially its affinity for the A site. We hoped however that the A site would be more tolerant against the introduction of an amide function than the P site where a keto function is necessary to form the Schiff base.

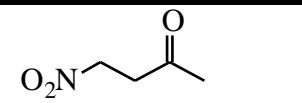
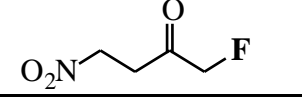
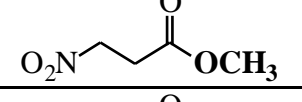
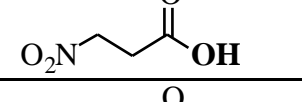
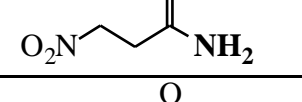
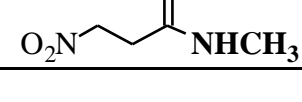


**Scheme 5** : Part of the *Jordan I* mechanism compared with the analogs containing an amide function as central part

Introducing an amide function at this position could have additional advantages (see Scheme 5). The key intermediate of the *Jordan I* mechanism possesses an iminium ion connecting the C4 of the A side ALA with the amino group of the P side ALA. Also in the next step in the formation of the enamine, the C4 stays  $sp^2$  hybridized. This double bond character was not all imitated when we were using the dioxosebacic acid as inhibitor. An amide function should at least partially imitate this double bond character. At the same time the amide mimics also the charge distribution found in the iminium ion and to some extent also the polarity as found when the amine of the P side substrate is attacking the carbonyl function of the A side substrate. The major problem in using an amide function resides in the fact that there is a restricted rotation around this partial C-N double bond. It is known that the *s-trans* conformer is preferred in solution for secondary amides whereas we have to suppose that the diacids are bound in a conformation, which is near to the relative position of the two-carboxylate groups as they are found in the product.

Structure	Compound	K <sub>I</sub> (μM)	Type of inhibition / Remarks
	<b>8</b>	2200	Competitive
	<b>9</b>	85	Competitive
	<b>10</b>	38400	Competitive
	<b>11</b>	12500	Competitive
	<b>12</b>	36400	Competitive
	<b>13</b>	24500	Competitive
	<b>14</b>	18200	Competitive
	<b>15</b>	18800	Competitive
	<b>16</b>	150000	Inhibition undetected

**Table 1 :** Inhibition tests with substrate analogues varying the keto function

Structure	Compound	K <sub>I</sub> (μM)	Type of inhibition / Remarks
	<b>17</b>	28	Competitive
	<b>18</b>	21	Competitive
	<b>19</b>	1880	Competitive
	<b>20</b>	44900	Competitive
	<b>21</b>	--	Interference with the Ehrlich's reaction
	<b>22</b>	222800	Competitive

**Table 2 :** Inhibition tests with substrate analogues containing a nitro function instead of the carboxylate

In view of these arguments we decided to study a series of substrate analogs first to obtain data that should allow to evaluate the importance of the replacement of the -keto function by an amide (see Table 1 and 2). The comparison of the inhibition potency of the nitro compounds (see Table 2) with the corresponding carboxylates (see Table 1) shows that in three out of five cases the nitro compound is better recognized than the carboxylate. The difference between the nitro compound and the carboxylates is usually considerable. In the case of compounds **17** and **8** the nitro compound is almost 80 times better recognized than the carboxylate. The difference for the -fluoroketones **18** and **9** is however rather small : recognition of the nitro compound is only better by a factor of four. The introduction of an -fluoro substituent increases the electrophilicity of the C-atom of the ketone and should reduce the nucleophilicity of the O-atom of the ketone. The inhibition potency seems to be considerably increased by this change in electron density. This comes as a surprise, because most hypotheses published so far have assumed that the keto function acts as a ligand for a Lewis acid.<sup>[46-49]</sup> It has been speculated that Zn<sup>II</sup> would function as the Lewis acid, which activates the ketone and facilitates thereby the transformation into the enol or the enolate ion. The observation of this strong increase in inhibition potency is not in accordance with these postulated interactions with the enzyme active site. The combination of two factors which individually increase the inhibition potency seems not to be additive. The nitro fluoro compound **18** shows only a slight decrease of K<sub>I</sub> compared to the nitro ketone **17** whereas

the introduction of the fluoro substituent into levulinic acid decreases the  $K_I$  considerably: change of  $K_I$  from 2'200 mM for **8** to 85 mM for compound **9**. Changing the keto function for a carboxylate function or amide function thereof reduces the inhibition potency considerably. The  $K_I$  of the compounds **20** and **22** where the keto function has been replaced by a deactivated carbonyl is a factor of 1600 respectively 8000 bigger than the  $K_I$  for the standard compound **17**. The amide cannot be considered to be an inhibitor at all because the  $K_I$  is so much bigger than the  $K_M$  of the natural substrate.

The inhibition constant for the primary amide compound **21** could not be determined because this inhibitor interfered with the Ehrlich's reaction, which is used to determine the amount of PBG formed.<sup>[50]</sup> The comparison of the series of compounds where the modification of the keto function into an amide respectively into an ester function has been made at the end of the chain or within the chain is quite interesting. Introducing an amide at the end of the chain could mimic the imine or the iminium ion **7** between the two substrate molecules in the mechanism Jordan I (see Scheme 4). The amide and to some extent also the ester in the chain could be considered as a mimic for the enamine or the enolate necessary for the ring closure reaction. Comparing the inhibitors **10** and **12** with the compounds **13** and **15** shows that there is at most a slight difference between those two arrangements of the functional groups. All of these compounds are weak or even very weak inhibitors judged from the values of their  $K_I$ . A very interesting observation is the fact that introducing the amino function at the end of the chain, with the hope of adding another recognition site and thereby increasing the affinity to the active site does not influence the  $K_I$ -value in the expected direction. The values for compound **13** and **14** are almost identical. In the case of the amides **15** and **16** the introduction of the additional amino function transforms a weak inhibitor into a compound that is not recognized any more by the enzyme, an observation that has already been reported by Leeper.<sup>[51]</sup> This shows that we cannot expect simple additivity for our series of inhibitors. If the interaction at one site is optimal, the trials to improve the inhibition potency by adding additional functional groups in the hope to increase the number of contacts are often not successful. The other clear conclusion is that for inhibitors that interact at the A site of the enzyme the replacement of the keto function by an amide reduces the inhibition potency substantially. As amides should be good ligands for Lewis acids also this observation is surprising, but the conclusion goes in the same direction as the one drawn from the introduction of the fluoro substituent in position 5.

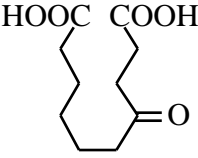
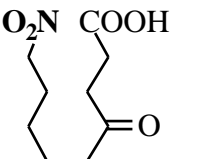
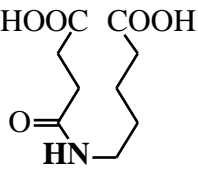
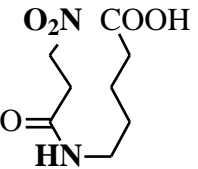
A final point has to be discussed in this context. The nitro function seems to imitate the carboxylate very well. The nitro analogs are often better recognized than the carboxylates themselves. Those cases where the introduction of a nitro group has considerably enhanced the recognition have been shown to be due to the interaction of the nitronate anion with the active site of the enzyme. Careful titration of the compounds **17** and **22** allowed us to determine the  $pK_a$ -values. It was necessary to wait 5 minutes after each addition of base, so that the equilibrium was established. The  $pK_a$  of **17** and **22** were 8.05 and 8.68 respectively. This means that a considerable percentage of our inhibitors are present in its deprotonated form. Without spectroscopic information on the enzyme inhibitor complex we cannot be sure which form is present on the surface of the active site. However it seems to us reasonable to assume that the negatively charged nitronate could be an excellent substitute for the carboxylate. This would be an additional reason why the nitro compounds are in general so excellent inhibitors for PBGS.<sup>[37]</sup>

Structure	Compound	K <sub>I</sub> (μM)	Type of inhibition / Remarks
	<b>23</b>	--	Irreversible
	<b>24</b>	243	Uncompetitive
	<b>25</b>	--	Irreversible
	<b>26</b>	--	Irreversible
	<b>27</b>	--	Irreversible
	<b>28</b>	20	Competitive/ Mixed
	<b>29</b>	30	Competitive/ Mixed

**Table 3 :** Inhibition tests with analogues of the "Jordan I" key intermediate

The studies of a series of linear dicarboxylic acid containing one or two keto functions had shown that PBGS is very sensitive for the chain length. The sebacic acid derivatives close analogs of the postulated key intermediate of the Jordan I mechanism, showed in general the highest inhibition efficiency.<sup>[41]</sup> It was shown also that a three-point interaction was in general sufficient for an excellent recognition of the inhibitor at the active site. Based on these results we synthesized a series of analogs, where we kept the keto function and the relative arrangements of the functional groups constant (see Table 3). Instead of the second keto function, which should be recognized at the A, site, we introduced an amide. Keeping this basic skeleton constant, we varied the groups at the end of the chain from carboxylate to ester or nitro group. We synthesized most of the variations of these end-groups in order to analyse the recognition selectivity at the two sites of the enzyme. The compound **23**, which contains two carboxylates, was our standard for this series of tests. This compound was an irreversible inhibitor as are the corresponding diketone or the 4-oxo-sebacic acid. Despite the substantial reduction of recognition of an amide at the A site, which we had established before, compound **23**, interacts strongly with the active site of PBGS. Changing the carboxylate at the A site against a methyl ester function, compound **24**, reduced the interaction considerably and an uncompetitive inhibitor with a  $K_I$  of 243 mM was obtained. The uncompetitive inhibition behaviour is a good indication that our inhibitor still interacts not only at the A site but probably at both sites at the same time. However the potency of this inhibitor is strongly reduced as was expected from the studies of the substrate analogs. Simply changing the position of the ester group from the A site to the P site, compound **25**, gave again an irreversible inhibitor. This observation is compatible with a greater tolerance at the P site for an ester function than at the A site. The amino acids responsible for the interaction with the P side carboxylate are known from the X-ray studies of PBGS containing levulinate bound to the active site.<sup>[36,39,40]</sup> The carboxyl group of the levulinic acid forms three hydrogen bonds: one with the Tyr312 and two with the Ser273. It can be envisaged that with a methyl ester function only a partial disruption of the hydrogen bridges occurs. This would explain a reduction in recognition without a total loss. The fact that the A site recognition seems to be less tolerant for esters is in favour of an on-off mechanism for the recognition. The interaction could be possibly due to hydrogen bridges to only one amino acid. This interpretation will have to be tested as soon as the A site of PBGS can be identified with the help of X-ray analysis. Introducing a nitro function at the A site like in **26** and **27** still gives irreversible inhibition. This result is expected and in complete accordance with the results from the substrate analogs. Introduction of the nitro group at the P site, compounds **28** and **29**, gives competitive/mixed inhibitors. These

inhibitors are slightly better than the inhibitor containing the ester function at the A site, compound **24**, but their inhibition behaviour and their  $K_I$  of 20 respectively 30 mM indicate that the nitro group is by far not such a good group at the P site than it is at the A site. It seems clear from these results that PBGS has two distinct recognition mechanisms for the two carboxylates. The P side carboxylate can be replaced by an ester function with only a slight loss in activity. Replacing the P side carboxylate by a nitro group is much less favorable. However, at the A site the nitro group is by far the best group to obtain a high affinity. The ester function is not well tolerated at this part of the active site. The tolerance of the P site for the ester function is compatible with the structural knowledge. For the rationalisation of the inversed behaviour of the A site, we have to wait for the results of X-ray analysis, which should allow us to identify the groups responsible for the recognition mechanism.

Structure	Compound	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	Type of inhibition / Remarks
	<b>30</b>	--	Irreversible
	<b>31</b>	4100	Competitive
	<b>32</b>	22900	Competitive
	<b>33</b>	18200	Competitive/ Activator

**Table 4 :** Inhibition tests with analogues of the 4-oxosebacic acid

Finally a minimal version of the analogs of the Jordan I intermediate was tested (see Table 4). The 4-oxosebacic acid (**30**) is an irreversible inhibitor.<sup>[41]</sup> The nitro analog **31** is a competitive inhibitor with a  $K_I$  of 4100 mM. Probably this compound is not any more recognized as an analog of the intermediate, but it is a substrate analog with a long chain. This result is in agreement with the observation reported above. When the keto function is replaced by an amide function, one obtains very weak competitive inhibitors like **32** and **33**. It is clear that the lack of the keto function is not compensated by the correct chain length and the presence of two carboxylate functions. The  $K_I$  are in the order of 20'000 mM, which is very weak.

#### 4.6.5 Conclusion

We could show that replacing the keto function at the A site is not well tolerated for substrate analogs. However an increase in the electrophilicity of the C-atom of the keto function increases the inhibition potency considerably. This is compatible with an important interaction with a nucleophile but not really in accordance with an interaction with a Lewis acid like the  $Zn^{II}$ . The amide function is however well tolerated at the A site if it is incorporated in an analog of the *Jordan I* key intermediate. This observation allowed us to distinguish the recognition selectivity at both sites of the enzyme. The P site of the enzyme tolerates the substitution of the carboxylate by an ester. The nitro function is accepted but does not give an increase in inhibition potential. This result can be interpreted on the basis of the knowledge of the structure of PBGS. On the other hand the A site accepts the replacement of the carboxylate by a nitro function very well, in most cases a considerable increase in the interaction can be observed. Esters at the A site are however not tolerated.

This study shows clearly the potential importance of systematic studies of specifically designed inhibitors to increase our knowledge about the active site of enzymes. It is clear that definitive proof of the observed results will have to wait until adequate X-ray structures become available. Finally it is important to realize that we have interpreted our results on the basis of the postulated key intermediates. However at this stage it is difficult if not impossible to distinguish between the hypothesis based on the binding of intermediates and a hypothesis based on the recognition of a bisubstrate.<sup>[52]</sup> Answers to this question will need further experiments.

## 4.6.6 Experimental section

### Biochemistry.

**Materials:** *E. coli* (CR 261) was a gift from C. Roessner of Texas A&M University. Production of *E. coli* and purification of PBGS have been described previously.<sup>[53]</sup>

**PBGS assay and determination of kinetic constants:** The PBGS assay is a colorimetric assay based on the reaction between PBG and 4-dimethylaminobenzaldehyde<sup>[50]</sup>, the so-called Ehrlich's reagent.

The assay for *E. coli* PBGS contained 4-6.4 µg PBGS and the inhibitor in 1.5 ml of 0.1 M NaP (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O and 10 µM ZnCl<sub>2</sub>). The preincubation took place at 37°C for 30-45 min. The substrate was added in varying the concentration and the solution was incubated for 14 min, after which the PBGS-catalyzed reaction was stopped by adding 1 ml of the stop reagent (20 % trichloroacetic acid, 10 mM HgCl<sub>2</sub>) at 0°C. After centrifugation (4 min, 3600 g) 1 ml of the supernatant was treated with 1 ml of Ehrlich's reagent (1.1 g 4-dimethylaminobenzaldehyde in 20 ml perchloric acid and 35 ml acetic acid). This solution was centrifuged (4 min, 3600 g) for a second time. The quantity of product formed was determined by measuring the absorbance at 554 nm ( $\epsilon = 62000 \text{ [mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)]}$ ).

The type of inhibition was determined using Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk and Hanes plots. The K<sub>I</sub> values shown in the different tables are the average of at least three independent assays. K<sub>I</sub> values were calculated from the apparent K<sub>M</sub> deduced from the hyperbolic plot, typical for Michaelis-Menten kinetics.

**Estimation of the specific activity:** Protein concentration was estimated by the Bio-Rad Protein Assay using the color change of the Coomassie Brilliant Blue-G-250. This color change is followed by measuring the absorbance at 596 nm.<sup>[54]</sup> The concentration of our protein is deduced by comparison with a standard curve. Using the value together with the rate of PBG formation allows the specific activity to be calculated.

**Dialysis assay:** 4-6.4 µg PBGS were dissolved in 10 ml of 0.1 M NaP (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O and 10 µM ZnCl<sub>2</sub>). 4 ml of this solution was placed in two different 5 ml tubes, one containing 2.5-10 mg of the inhibitor and the second (without inhibitor) was used as a reference. After 24 h at r.t., the specific activities were determined. 1 ml of each solution was placed in a dialysis tube and separately dialyzed against 1.5 l of 0.1 M NaP (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O and 10 µM ZnCl<sub>2</sub>). After 66 h dialysis at 4°C, the specific activities were again determined.

## Chemistry.

**General:** THF (purum, Fluka) was distilled over K and benzophenone under N<sub>2</sub>; the other solvents (puriss., Fluka) were used without further treatment. TLC: silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Aluminium, 0.2 mm; Merck). Flash column chromatography: silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Fluka) at *ca.* 0.2 bar. m.p.: Büchi 510 apparatus, uncorrected. IR spectra: Perkin-Elmer-1720 X FT-IR spectrophotometer; absorption bands in cm<sup>-1</sup>. NMR Spectra: Bruker AMX-400 and Bruker Avance 400 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz), Varian Gemini XL-200 and Varian Gemini 2000 (<sup>1</sup>H: 200 MHz, <sup>13</sup>C 50 MHz); chemical shifts *d* in ppm from external reference Me<sub>4</sub>Si (*d* = 0 ppm) to lower field; temperature 298 K; coupling constant *J* in Hz; solvent and special experiment stated. EI-MS (70 eV) and CI-MS (NH<sub>3</sub> as ionisation gas): Nermag RC 30-10. ESI-MS and APCI: Finnigan LCQ. HRMS : Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II (ESI(positive, negative)-MS). GC : Perkin Elmer SIGMA 3B, Dual FID Chromatograph, SE 54 column (Macherey Nagel, l = 25 m, ID = 0.32 mm, df = 0.25 µm), P (program : 5 min at 70°C, to 150°C at 8°C/min, 10 min at 150°C). Elemental analysis were performed by the Microanalytical Laboratory of Ciba-Specialty SA, Marly and by "l'Ecole d'Ingénieur" of Fribourg.

**Starting Materials:** (4-Nitro-2-oxo-1-butyl)ammonium chloride (**35**)<sup>[55]</sup>, monobenzyl succinate (**36**)<sup>[56]</sup>, (4-carboxy-2-oxo-1-butyl)ammonium chloride (**1**)<sup>[57]</sup> were synthesised according to the literature. (4-Methoxycarbonyl-2-oxo-1-butyl)ammonium chloride (**37**), a commercial sample (>98 %, Sigma) as well as a specifically synthesized sample were used. 3-Methoxycarbonylpropionyl chloride (purum, Fluka, **38**) as well as all the other starting materials were commercially available (Fluka or Aldrich).

Levulinic acid (**8**), succinic acid (**11**), acetoxyacetic (**13**), N-acetyl glycine (**15**) and glycineglycine (**16**), 3-nitropropionic acid (**20**) and mono-methylsuccinate (**10**) are commercially available (Fluka or Aldrich). 5-Fluoro-levulinic acid (**9**)<sup>[58, 59]</sup>, amino-acetic acid carboxymethylester (**14**)<sup>[60]</sup> and 4-nitro-butan-2-one (**17**)<sup>[61, 62]</sup> were synthesised according to the literature.

The synthesis and characterization of the following starting materials or intermediates is available as supporting information: 3-nitropropionyl chloride (**39**), 1-diazo-4-nitro-butanone (**40**), [(4-benzyloxycarbonyl)-1-butyl]ammonium p-toluenesulfonate (**41**), [4-(methoxycarbonyl)-1-butyl] ammonium p-toluenesulfonate (**42**), [4-(benzyloxycarbonyl)-2-oxo-1-butyl]ammonium p-toluenesulfonate (**43**), methyl 5-[(3-nitropropionyl)amino] pentanoate (**44**), benzyl 5-[[3-(benzyloxycarbonyl)propionyl]amino] pentanoate (**45**), benzyl 5-[[3-(benzyloxy carbonyl)propionyl]amino]-4-oxo-pentanoate (**46**), methyl 5-[[3-(benzyloxycarbonyl)propionyl]amino]-4-oxopentanoate (**47**), benzyl 5-[[3-(methoxycarbonyl)propionyl] amino]-4-oxopentanoate (**48**), methyl 4-oxo-4-(2-oxocyclohexyl)butyrate (**49**), ethyl 9-bromo-4-oxononanoate (**50**), intermediate (**51**), ethyl 9-nitro-4-oxononanoic acid (**52**).

**N-Methylsuccinamic acid (12):** To an ice cooled solution of succinic anhydride (2.0 g, 20 mmol) in ethanol (10 ml), an 8 M solution of methylamine in ethanol (5.5 ml, 44 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 0°C for 90 min and then 1 h at r.t.. Evaporation of the solvent, addition of 1 M HCl (40 ml) and ethyl acetate (50 ml), saturation with NaCl, extraction with ethyl acetate (8 50 ml), drying over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (1.65 g, 63 %). Subsequent purification

by recrystallisation in THF/ether yielded **12** (1.0 g, 38 %): white solid. m.p. 108°C (lit.<sup>[64]</sup> = 111°C).  $R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, UV+KMnO<sub>4</sub>) = 0.12. IR (KBr liquid film): 3600-2400(m), 3356(vs), 2981(m), 2929(m), 2732(m), 2642(m), 2546(m), 1715(s), 1635(s), 1569(s), 1455(m), 1422(s), 1413(s), 1370(m), 1337(m), 1277(m), 1239(s), 1179(s), 1163(s), 1085(m), 1028(m), 986(m), 960(m), 939(m), 839(m), 703(m), 556(m). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.28 ("t", <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> ≅ 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.41 ("t", <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> ≅ 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-HN</sub> ≅ 4.8, 3H, H<sub>3</sub>C(15)); 7.76 (m, 1H, HN); 12.06 (s, 1H, HO). <sup>13</sup>C-NMR(50 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 25.5 C(5); 29.2, 30.0 C(2), C(3); 171.4, 174.0 C(1), C(4). ESI(negative)-MS: 130 [M-1]<sup>-</sup>, 112 [M-1-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 86 [M-1-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.

**1-Fluoro-4-nitro-butan-2-one (18)**<sup>[63]</sup>: In a high density polyethylene container (HDPE) containing HF pyridine (10 ml) at 15°C was added over 30 min a solution of 1-diazo-4-nitrobutan-2-one (**40**, 1.43 g, 10 mmol) in ether (15 ml). The reaction mixture was stirred for 2 h at r.t.. Work-up with water (20 ml) followed by extraction of the aqueous layer with chloroform (6 50 ml), washing of the organic layers with anhydrous KF, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (610 mg, 45 %) as an orange liquid. Subsequent purification by flash chromatography (silica gel; hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1) gave the final product **18** (260 mg, 19 %, GC(P)>99 %, t<sub>r</sub> = 9.6): pure liquid.  $R_f$  (ethyl acetate/hexane 2:1, UV+KMnO<sub>4</sub>) = 0.48. IR (KBr liquid film): 3028(w), 2973(w), 2933(w), 1745(s), 1558(vs), 1427(m), 1398(m), 1378(s), 1082(m), 1045(m), 998(m). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.25 (td, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 5.9, <sup>4</sup>J<sub>3-F</sub> = 2.1, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 4.72 (t, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 6.0, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 4.92 (d, <sup>2</sup>J<sub>1-F</sub> = 47.4, 2H, H<sub>2</sub>C(1)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 34.4 C(3); 67.9 C(4); 84.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>1-F</sub> = 184, 1C, C(1)); 202.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>2-F</sub> = 21, 1C, C(2)). <sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.16 (t, <sup>2</sup>J<sub>F-H5</sub> = 47.7, 1F, FC(5)). ESI(positive)-MS: 136 [M+1]<sup>+</sup>, 89 [M+1-HNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. HR-MS [M+Na]: 158.02211 (calcd for C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>FNO<sub>3</sub>: 158.02239).

**Methyl 3-nitropropionate (19)**: Under N<sub>2</sub> to an ice cooled solution of 3-nitropropionic acid (2.51 g, 19.8 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), oxalyl chloride (3.54 g, 21 mmol) and DMF (1 drop) were added. The reaction mixture was stirred for 15 min at 0°C and then for 2 h 45 at r.t.. Half of the solvent was evaporated, ice cooled and methanol (5 ml) dropwise was added; the mixture was stirred for 10 min at 0°C and 20 min at r.t.. Evaporation of the solvent gave a crude product as a yellowish liquid; purification by bulb to bulb distillation (p = 0.5-0.07 mmHg, T = 60°C) yielded **19** (2.04 g, 78 %): colourless solid.  $R_f$  (ethyl acetate/hexane 1:1) = 0.47, UV+KMnO<sub>4</sub>. IR (KBr liquid film): 3009(w), 2960(w), 1739(s), 1558(vs), 1441(s), 1407(m), 1380(s), 1342(m), 1258(m), 1218(s), 1201(s), 1181(s), 872(m), 850(m). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.64 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.72 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1)); 2.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.0, 2H, H<sub>2</sub>C(2)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.9 C(1); 69.6 C(3); 52.3 C(1); 30.7 C(2).

**3-Nitro-propionamide (21)**<sup>[65]</sup>: To an 12 % ice cooled aqueous solution of NH<sub>3</sub> (10 ml), 3-nitro-propionyl chloride (**39**, 1.38 g, 10 mmol) was added. After 10 min, the reaction mixture was acidified to pH 1 with 32 % HCl saturated with NaCl. Extraction with ethyl acetate (8 40 ml), drying over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation of the solvent gave the crude solid (1.02 g, 86 %). Subsequent purification by preabsorbtion on silice and purification by flash chromatography (silica gel; ethyl acetate) yield **21** (401 mg, 77 %): white solid.  $R_f$  (ethyl acetate, UV+KMnO<sub>4</sub>) = 0.14. IR (KBr liquid film): 3394(s), 3203(m), 2973(w), 2927(w), 2855(m), 2799(m), 1710(s), 1663(s), 1630(s), 1555(vs), 1429(s), 1402(m), 1382(m), 1310(m), 1248(m), 595(m). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.72 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 6.0, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 4.66 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.0, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 7.03 (s, 1H, HN); 7.51 (s, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 16.4 C(6); 28.2 C(5); 36.5 C(2); 42.5 C(3); 178.2 C(1); 210.7 C(4).

***N*-Methyl-3-nitropropionamide (22)**: To an 8 M ice cooled solution of methylamine in ethanol (1.1 ml, 8.7 mmol), a solution of 3-nitropropionyl chloride (**39**, 543 mg, 3.95 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml) was added over 20 min. After 90 min the cooling bath was removed and the reaction mixture was stirred 2 h at r.t.. Addition of an 1 M aqueous solution of HF (20 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), extraction with ethyl acetate (3 30 ml), drying over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (1.46 g, >100 %) as a brownish oil. Subsequent purification by flash chromatography (silica gel; ethyl acetate/hexane 2:1) yielded **22** (401 mg, 77 %): white solid. *R*<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /ethyl acetate/methanol 10:1:1, UV+KMnO<sub>4</sub>) = 0.32. IR (KBr liquid film): 3337(s), 3305(s), 3114(w), 3022(w), 2945(m), 2924(m), 2851(w), 1674(s), 1645(vs), 1551(s), 1416(s), 1377(s), 1340(m), 1278(s), 1248(m), 1204(m), 1165(m), 1090(m), 1030(m), 952(m), 874(m), 738(m), 581(m), 492(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.78 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>4-HN</sub> = 4.8, 3H, H<sub>3</sub>C(4)); 2.81 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2-3</sub> = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 4.67 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3-2</sub> = 6.1, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 6.34 (s, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT) : 26.3 C(4); 32.2 C(2); 70.2 C(3); 169.0 C(1); ESI(positive)-MS: 155 [M+Na]<sup>+</sup>, 133 [M+1]<sup>+</sup>. Elemental analysis calcd (%) for C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (132.12): C 36.36, H 6.10, N 20.20; found C 36.10, H 6.15, N 21.76.

**5-Amino-*N*-(3-carboxypropionyl)-4-oxopentanoic acid (23)**: A solution of the ester **46** (300 mg, 0.73 mmol) and of 10 % Pd/C (30 mg) in THF (40 ml) was shaken under H<sub>2</sub> (4 bar) for 20 h. The reaction mixture was filtered on celite and the catalyst washed with THF (40 ml). The filtrate was evaporated to give the crude product (160 mg) as a white solid. Subsequent recrystallisation from THF/ether yielded **23** (85 mg, 61 %): white solid. m.p. 160-161°C (lit.<sup>[66]</sup> 197-199°C). *R*<sub>f</sub> 0.51 (ethyl acetate/methanol/acetic acid 8:1:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2300(m) (3039), 3386(m), 3341(m), 2942(m), 1724(s), 1691(vs), 1634(s), 1530(m), 1434(m), 1410(m), 1386(m), 1305(m), 1221(m), 1195(m), 630(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.36-2.47 (m, 6H, H<sub>2</sub>C(2,7,8)); 2.63 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3-2</sub> = 6.3, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.91 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>5-HN</sub> = 5.4, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 8.19 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HN-5</sub> = 5.5, 1H, HN); 10.75-11.45 (s, 2H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, DEPT, HETCOR): 27.6 C(2); 29.2, 29.8 C(7), C(8); 34.1 C(3); 48.5 C(5); 171.5 C(6); 173.8, 173.9 C(1), C(9); 205.9 C(4). ESI(negative)-MS: ms 230 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (230) 212 [M-1-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (230, 212) 194 [M-1-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms (230, 212, 194) 150 [M-1-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms-ms (230, 212, 194, 150) 122 [M-1-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>]<sup>-</sup>. Elemental analysis calcd (%) for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub> (231.20): C 46.75, H 5.67, N 6.06; found C 46.79, H 5.72, N 5.67.

**5-[[3-(Methyloxycarbonyl)propionyl]amino]-4-oxopentanoic acid (24)**: A solution of the ester **48** (335 mg, 1 mmol) and of 10 % Pd/C (35 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml) was shaken under H<sub>2</sub> (4 bar) for 16 h. The reaction mixture was filtered on celite and the catalyst washed with THF (20 ml). The filtrate was evaporated to give the crude product (260 mg) as a white solid. The recrystallisation from THF/hexane yielded **24** (166 mg, 68 %): white solid. m.p. 103-104°C. *R*<sub>f</sub> 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3500-2500(w) (3027), 3344(m), 2958(w), 2938(w), 1733(s), 1695(s), 1641(vs), 1521(m), 1437(m), 1411(m), 1376(m), 1354(m), 1310(m), 1196(m), 1173(m), 1140(m), 631(m), 493(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.40 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2-3</sub> = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.43 ("t", <sup>3</sup>*J*<sub>7-8</sub> or 8-7 ≅ 6.1, 2H, H<sub>2</sub>C(7 or 8)); 2.50 ("t", <sup>3</sup>*J*<sub>8-7</sub> or 7-8 ≅ 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(8 or 7)); 2.62 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3-2</sub> = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.57 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(10)); 3.92 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>5-HN</sub> = 5.6, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 8.22 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HN-5</sub> = 5.5, 1H, HN); 11.2-13.0 (s, 1H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 27.6 C(2); 28.8, 29.7 C(7), C(8); 34.7 C(3); 48.5 C(5); 51.5 C(10); 171.3 C(6); 172.9 C(9), 173.8 C(1); 205.8 C(4). ESI(negative)-MS: ms 244 [M-1]<sup>-</sup>, 212 [M-1-CH<sub>4</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms (244) 212 [M-1-CH<sub>3</sub>OH]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (244, 212) 194 [M-1-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms

(244, 212, ms-ms-ms (244, 212) 194 [M-1-CH<sub>4</sub>O-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms (244, 212, 194) 150 [M-1-CH<sub>4</sub>O-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms-ms (244, 212, 194, 150) 122 [M-1-CH<sub>4</sub>O-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-(CO or C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)]<sup>-</sup>. Elemental analysis calcd (%) for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub> (245.23): C 48.98, H 6.16, N 5.71; found C 48.78, H 6.27, N 5.82. HR-MS: 246.09720 (calcd for C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>6</sub>: 246.09721).

**3-[[4-(Methoxycarbonyl)-2-oxobutyl]carbamoyl]propionic acid (25):** A solution of the ester **47** (600 mg, 1.79 mmol) and of 10 % Pd/C (60 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 ml) was shaken under H<sub>2</sub> (4 bar) for 20 h. The reaction mixture was filtered on celite and the catalyst washed with THF (100 ml). The filtrate was evaporated to give the crude product (650 mg) as a white solid. The recrystallisation from THF/ether yielded **25** (350 mg, 80 %): white solid. m.p. 107°C. *R*<sub>f</sub> 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2500(m), 3348(s), 3063(m), 3027(m), 2958(m), 2927(m), 2858(m), 1730(s), 1718(vs), 1697(s), 1636(vs), 1525(s), 1441(m), 1423(m), 1394(m), 1384(m), 1357(s), 1311(m), 1286(m), 1202(s), 1184(m), 1140(m), 1107(m), 978(m), 635(m), 537(m), 492(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.38-2.44 (m, 4H, H<sub>2</sub>C(7,8)); 2.49 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2-3</sub> = 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.70 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3-2</sub> = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.58 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(10)); 3.93 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>5-HN</sub> = 5.6, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 8.19 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HN-5</sub> = 5.4, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 27.2 C(2); 29.2, 29.9 C(7), C(8); 33.9 C(3); 48.5 C(5); 51.5 C(10); 171.5 C(4); 172.7 C(9); 173.9 C(1); 205.7 C(6). EI-MS: 246 (6, [M+1]<sup>+</sup>), 228 (4, [M-OH]<sup>+</sup>), 214 (8, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 196 (10, [M-CH<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 168 (12, [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 140 (4, [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 131 (12, [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 115 (100, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 114 (16), 113 (40, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 101 (27, [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 87 (19, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 73 (12, [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 55 (27). Elemental analysis calcd (%) for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub> (245.23): C 48.98, H 6.16, N 5.71; found C 49.03, H 6.17, N 5.73.

**5-(3-Nitropropionylamino)-4-oxopentanoic acid (26):** To a solution of the ester **27** (565 mg, 2.3 mmol) in water (40 ml), a solution of pig liver esterase (4 mg, 130 U/mg) in buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4 ml) was added. The reaction mixture was maintained 9 h at pH 7.2 by adding 0.3 M NaOH then acidified to pH 1.5 with 32 % HCl, saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (8 50 ml). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated to give the crude product (400 mg) as a brown oil. Subsequent recrystallisation from THF yielded **26** (154 mg, 29 %): white solid. m.p. 148°C. *R*<sub>f</sub> 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 7:3, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2400(w) (3069), 3317(s), 2967(w), 2922(w), 1723(s), 1699(s), 1650(vs), 1550(s), 1433(m), 1422(m), 1407(m), 1398(m), 1389(m), 1270(m), 1234(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.41 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2-3</sub> = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.63 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3-2</sub> = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.84 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>7-8</sub> = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 3.97 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>5-HN</sub> = 5.5, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 4.69 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>8-7</sub> = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 8.40 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HN-5</sub> = 5.2, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 27.6 C(2); 31.2 C(7); 34.1 C(3); 48.5 C(5); 70.6 C(8); 169.0 C(6); 173.7 C(1); 205.4 C(4). ESI(negative)-MS: ms 231 [M-1]<sup>-</sup>, 184 [M-1-HNO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms (231) 184 [M-1-HNO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (231, 184) 166 [M-1-HNO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 140 [M-1-HNO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 112 [M-1-HNO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>]<sup>-</sup>. HR-MS: 255.058743 (calcd for C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>: 255.058750).

**Methyl 5-[(3-nitropropionyl)amino]-4-oxopentanoate (27):** To a solution of **37** (1.1 g, 6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), the acyl chloride **39** (808 mg, 6 mmol) was added dropwise under N<sub>2</sub> at 0°C followed by the addition of triethylamine (1.23 g, 12 mmol) over 30 min. The reaction mixture was stirred 1 h at 0°C and 1 h at r.t.. Work-up with 1 M HCl (30 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) followed by extraction of the aqueous layer with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 50 ml), drying of the organic layers over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (990 mg) as a yellow solid. Subsequent recrystallisation from ethyl acetate yielded **27** (657 mg, 44 %): white solid. m.p. 96°C. *R*<sub>f</sub> 0.51 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2800 (w), 3300(s), 3104(w), 3027(w), 2984(w), 2955(w),

2921(w), 2854(w), 1744(s), 1727(s), 1650(s), 1573(m), 1552(vs), 1442(m), 1411(m), 1403(m), 1377(m), 1366(m), 1348(m), 1282(m), 1213(m), 1181(m), 1097(m), 1031(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.63-2.67 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.72-2.76 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 3.66 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(6)); 4.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-HN</sub> = 4.7, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 4.69 (t, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 6.58 (s, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27.5 C(2); 32.1 C(8); 34.5 C(3); 49.3 C(5); 51.9 C(6); 69.9 C(9); 168.3 C(7); 172.8 C(1); 203.7 C(4). EI-MS: 246 (3, [M]<sup>+</sup>), 215 (2, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 115 (29, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 87 (11), 85 (14), 84 (37, [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 59 (22), 57 (14), 56 (13), 55 (100). Elemental analysis calcd (%) for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (246.22): C 43.90, H 5.73, N 11.38; found C 43.84, H 5.54, N 11.25.

**Methyl [(4-nitro-2-oxobutyl)carbamoyl]propionate (28):** To a solution of **35** (460 mg, 2.74 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), the acyl chloride **38** (808 mg, 6 mmol) was added dropwise under N<sub>2</sub> at 0°C followed by the addition of triethylamine (554 mg, 5.48 mmol) over 30 min. The reaction mixture was stirred 1 h at 0°C and 2 h at r.t.. Work-up with 1 M HCl (40 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) followed by extraction of the aqueous layer with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 40 ml), drying of the organic layers over MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (640 mg) as a yellow solid. Subsequent purification by flash chromatography (silica gel; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1) and recrystallisation from ethyl acetate yielded **28** (280 mg, 37 %): white solid. m.p. 101-102°C. R<sub>f</sub> 0.52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3700-2800(w), 3284(s), 3107(m), 2951(w), 2925(m), 1737(vs), 1641(s), 1573(s), 1551(s), 1433(s), 1419(s), 1390(s), 1356(m), 1341(m), 1277(m), 1252(m), 1193(s), 1176(s), 1104(m), 1066(m), 1035(m), 1016(m), 981(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.43-2.47 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.50-2.54 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.11 (t, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 5.8, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 3.58 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)); 3.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>6-HN</sub> = 5.7, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 4.70 (t, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 5.8, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 8.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-HN</sub> = 5.4, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, HETCOR): 28.8 C(3); 29.6 C(2); 35.6 C(8); 48.4 C(6); 51.4 C(5); 69.4 C(9); 171.4 C(4); 172.9 C(1); 204.0 C(7). CI-MS: 247 (10, [M+1]<sup>+</sup>), 232 (5, [M+1-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 215 (2, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 201 (12), 200 (100, [M-NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 168 (13, [M-CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>N]<sup>+</sup>), 132 (11, [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 115 (8, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 100 (5, [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 55 (8). Elemental analysis calcd (%) for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (246.22): C 43.90, H 5.73, N 11.38; found C 44.14, H 5.79, N 11.30.

**3-Nitro-N-(4-nitro-2-oxobutyl)propionamide (29):** To a suspension of **35** (100 mg, 0.59 mmol) in THF (30 ml), the acyl chloride **39** (79 mg, 0.59 mmol) was added under N<sub>2</sub> at 0°C followed by the addition of triethylamine (1 g, 10 mmol) over 30 min. The reaction mixture was stirred 1 h at 0°C and 1 h at r.t.. Work-up with 1 M HCl (30 ml) and ether (50 ml) followed by saturation with NaCl and extraction of the aqueous layer with ethyl acetate (6 30 ml), drying of the organic layers, filtration and evaporation of the solvent gave the crude product (130 mg) as a yellow solid. Subsequent purification by flash chromatography (silica gel; hexane/ethyl acetate 4:1) yielded **29** (41 mg, 30 %): white solid. m.p. 129-130°C. R<sub>f</sub> 0.56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3700-2800(m), 3293(s), 3103(w), 2973(w), 2917(w), 1732(s), 1683(m), 1651(s), 1561(s), 1541(vs), 1426(s), 1409(m), 1398(m), 1376(s), 1357(m), 1278(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.85 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 3.12 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-7</sub> = 5.7, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 4.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-HN</sub> = 5.6, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 4.70 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> or 7-6 = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(3 or 7)); 4.71 (t, <sup>3</sup>J<sub>7-6</sub> or 3-2 = 5.8, 2H, H<sub>2</sub>C(7 or 3)); 8.45 (t, <sup>3</sup>J<sub>HN-4</sub> = 5.4, 1H, HN). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 31.2, 35.6 C(2), C(6); 48.4 C(4); 69.4, 70.6 C(3), C(7); 169.2 C(1); 203.6 C(3). ESI(positive)-MS: 256 [M+Na]<sup>+</sup>, 251 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 234 [M+1]<sup>+</sup>, ms-ms (234) 187 [M+1-HNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, ms-ms-ms (234, 187) 140 [M+1-2HNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ms-ms-ms (234, 187, 140) 122 [M+1-2HNO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Elemental analysis calcd (%) for C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (232.19): C 36.06, H 4.75, N 18.02; found C 36.09, H 4.86, N 17.70.

**4-Oxodecandioic acid (30):** A solution of 87 % potassium hydroxide (2.3 g, 41.5 mmol) in water (2 ml) was heated at 100°C and the diketone **49** (2.2 g, 10.4 mmol) was added. After 3 min the solution was cooled with an ice bath and water (5 ml) and 32 % HCl (5 ml) were added. From the acidified solution a white solid precipitated which was filtered to give the crude product (1.85 g) as a white solid. Subsequent recrystallisation from THF/hexane yielded **30** (1.71 g, 76 %): white solid. m.p. 107°C (lit.<sup>[67]</sup> 109-110°C). *R<sub>f</sub>* 0.52 (ethyl acetate/methanol/acetic acid 7:2:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2300(m), 2938(m), 1698(vs), 1413(m), 1295(m), 1246(m), 1216(m), 1106(m), 938(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, COSY): 1.18-1.26 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 1.45 (qi, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> ≈ <sup>3</sup>J<sub>6-7</sub> = 7.8, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 1.47 (qi, <sup>3</sup>J<sub>8-7</sub> ≈ <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 7.6, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 2.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 7.4, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 2.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.62 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 12.02 (s, 2H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, HETCOR): 23.0 C(6); 24.4 C(8); 27.8 C(2); 28.2 C(7); 33.6 C(9); 36.7 C(3); 41.7 C(5); 173.9, 174.6 C(1), C(10); 209.2 C(4). EI-MS: 217 (2, [M+1]<sup>+</sup>), 199 (7, [M-OH]<sup>+</sup>), 181 (6, [M+1-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 153 (7), 143 (8, [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 125 (29, [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 116 (47, [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 101 (41, [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 98 (95, [C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 97 (30), 73 (77, [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 69 (100), 55 (55). C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> (216.23).

**9-Nitro-4-oxononanoate (31):** To a solution of the ester **52** (360 mg, 1.47 mmol) in water (40 ml), a solution of pig liver esterase (3 mg, 130 U/mg) in buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.3 ml) was added. The reaction mixture was maintained 5 h at pH 7.2 by adding 0.2 M NaOH then acidified to pH 1 with 32 % HCl, saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (6 50 ml). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated to give the crude product (320 mg) as a liquid. Subsequent purification by flash chromatography (silica gel; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 96:4) yielded **31** (186 mg, 58 %): white solid. m.p. 62-63°C. *R<sub>f</sub>* 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol 9:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3600-2400(m) (3043), 2938(m), 2893(m), 2869(m), 1722(s), 1704(s), 1551(vs), 1474(m), 1438(m), 1411(s), 1399(s), 1389(s), 1360(m), 1336(m), 1254(m), 1233(m), 1224(vs), 1191(m), 1152(m), 1108(m), 1075(m), 911(m), 633(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.36 ("qi", <sup>3</sup>J<sub>7-6</sub> ≈ <sup>3</sup>J<sub>7-8</sub> = 7.8, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 1.62 (tt, <sup>3</sup>J<sub>6-7</sub> = 7.8, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 1.99 (tt, <sup>3</sup>J<sub>8-7</sub> = 7.7, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 7.0, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 2.47 (t, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.59-2.62 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.67-2.70 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 4.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 7.0, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 9.7-11.0 (s, 1H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 22.7 C(6); 25.6 C(7); 27.0 C(8); 27.7 C(2); 36.7 C(3); 41.9 C(5); 75.3 C(9); 178.7 C(1); 208.3 C(4). ESI(negative)-MS: ms 216 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (216) 169 [M-1-HNO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (216, 169) 151 [M-1-HNO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 125 [M-1-HNO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 107 [M-1-HNO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. HR-MS: 240.0844 (calcd for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>5</sub>; 240.0842).

**5-[(3-Carboxypropionyl)amino]pentanoic acid (32):** A solution of the ester **45** (3.05 g, 7.7 mmol) and of 10 % Pd/C (300 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 ml) was shaken under H<sub>2</sub> (4 bar) for 20 h. The reaction mixture was filtered on celite and the catalyst washed with THF (40 ml). The filtrate was evaporated to give the crude product (1.77 g) as a white solid. The recrystallisation from THF/ether yielded **32** (1.29 g, 77 %): white solid. m.p. 141°C. *R<sub>f</sub>* 0.52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/methanol/acetic acid 8:1:1, KMnO<sub>4</sub>). IR (KBr): 3650-2300 (m), 3315(s), 3070(s), 2964(s), 2882(m), 1693(vs), 1629(s), 1552(s), 1473(m), 1463(m), 1431(s), 1321(s), 1271(m), 1203(s), 927(m), 680(m). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 1.33-1.41 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 1.43-1.51 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>7-8</sub> = 7.1, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 2.38 ("t", <sup>3</sup>J<sub>8-7</sub> ≈ 6.9, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 3.01 (td, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> ≈ 6.9, <sup>3</sup>J<sub>5-HN</sub> ≈ 5.5, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 7.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>HN-5</sub> = 5.5, 1H, HN); 10.8-11.9 (s, 2H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, DEPT, HETCOR): 22.1 C(3); 28.8 C(4); 29.6 C(8); 30.3 C(7); 33.6 C(2); 38.3 C(5); 171.0 C(6); 174.1, 174.6 C(1), C(9). CI-MS: 218 (100, [M+1]<sup>+</sup>), 200 (50, [M-OH]<sup>+</sup>), 182 (23, [M+1-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 174

(36,  $[M+1-CO_2]^+$ ), 118 (31,  $[C_4H_8NO_3]^+$ ), 100 (82,  $[C_4H_6NO_2]^+$ ). Elemental analysis calcd (%) for  $C_9H_{15}NO_5$  (217.22): C 49.76, H 6.96, N 6.45; found C 50.13, H 7.02, N 6.06. HR-MS: 240.08422 (calcd for  $C_9H_{15}NNaO_5$ : 240.08424).

**5-[(3-Nitropropionyl)amino]pentanoic acid (33):** To a solution of the ester **44** (1.2 g, 5.17 mmol) in water (50 ml), a solution of pig liver esterase (3 mg, 130 U/mg) in buffer  $(NH_4)_2SO_4$  (0.3 ml) was added. The reaction mixture was maintained 4 h at pH 7.3 by adding 0.5 M NaOH then acidified at pH 1.5 with 32 % HCl, saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (4 50 ml). The organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and the solvent was evaporated to give the crude product (1.01 g) as an orange solid. Subsequent recrystallisation from THF/ether yielded **33** (810 mg, 72 %): white solid. m.p. 81°C.  $R_f$  0.52 (ethyl acetate/methanol 2:1,  $KMnO_4$ ). IR (KBr): 3600-2400(m), 3298(s), 3071(m), 2948(m), 2878(m), 1692(s), 1638(s), 1551(vs), 1477(m), 1464(m), 1416(m), 1377(m), 1334(m), 1280(m), 1218(m), 1192(m), 924(m), 872(m), 681(m).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $d_6$ -DMSO): 1.35-1.42 (m, 2H,  $H_2C(4)$ ); 1.45-1.52 (m, 2H,  $H_2C(3)$ ); 2.20 (t,  $^3J_{2-3} = 7.3$ , 2H,  $H_2C(2)$ ); 2.73 (t,  $^3J_{7-8} = 6.0$ , 2H,  $H_2C(7)$ ); 3.04 (td,  $^3J_{5-4} = 7.0$ ,  $^3J_{5-HN} = 5.3$ , 2H,  $H_2C(5)$ ); 4.68 (t,  $^3J_{8-7} = 6.0$ , 2H,  $H_2C(8)$ ); 8.04 (t,  $^3J_{HN-5} = 5.3$ , 1H, HN); 12.00 (s, 1H, HO).  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $d_6$ -DMSO, HETCOR) : 21.9 C(3); 28.5 C(4); 31.4 C(7); 33.2 C(2); 38.2 C(5); 70.7 C(8); 168.3 C(6); 174.4 C(1). CI-MS: 236 (50,  $[M+18]^+$ ), 219 (100,  $[M+1]^+$ ), 201 (10,  $[M-OH]^+$ ), 187 (15), 172 (21,  $[M-NO_2]^+$ ), 101 (15). Elemental analysis calcd (%) for  $C_8H_{14}N_2O_5$  (218.21): C 44.03, H 6.47, N 12.84; found C 44.24, H 6.53, N 12.67.

## 4.6.7 Acknowledgements

We thank the Swiss National Science Foundation and the Foundation of the Basler Chemischen Industrie for financial support of our work.

## 4.6.8 References

- [1] A.R. Battersby, C.J.R. Fookes, G.W.J. Matcham, E. McDonald, *Nature* **1980**, *285*, 17-21.
- [2] B. Kräutler, *Chimia* **1987**, *41*, 277-292.
- [3] F.J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* **1989**, *6*, 171-203.
- [4] A.M. Cheh, J.B. Neilands, *Bonding and Structure* **1976**, *29*, 123-169.
- [5] D. Shemin, in *Methods in Enzymology Vol. XVII Part A*, (Eds.: S.P. Colowick, N.O. Kaplan), Academic Press, New York, **1970**, pp. 205-211.
- [6] P.M. Jordan, in *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, (Ed. : P.M. Jordan), Elsevier, Amsterdam, **1991**, pp. 1-66.
- [7] B. Frydman, S. Reil, M.E. Despuy, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2338-2342.
- [8] G.P. Arsenault, S.F. MacDonald, *Can. J. Chem.* **1961**, *39*, 2043-2055.
- [9] H. Plieninger, P. Hess, J. Ruppert, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 240-243.

- [10] M.I. Jones, C. Froussios, D.A. Evans, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 472-473.
- [11] B.J. Demopoulos, H.J. Anderson, C.E. Loader, K. Faber, *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 2415-2422.
- [12] K. Faber, H.J. Anderson, C.E. Loader, A.S. Daley, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 1046-1050.
- [13] M. Adamczyk, R.E. Reddy, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9121-9124.
- [14] R. Neier, in *Advances in Nitrogen Heterocycles Volume 2*, (Ed. : C.J. Moody), JAI Press Inc., Greenwich, **1996**, pp. 35-146.
- [15] D. Mauzerall, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2605-2609.
- [16] B. Franck, H. Stratman, *Heterocycles* **1981**, *15*, 919-923.
- [17] A.I. Scott, C.A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, *35*, 72-79.
- [18] R. Schmid, D. Shemin, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 506-507.
- [19] J.E. Falk, E.I.B. Dresel, E. Rimington, *Nature* **1953**, *172*, 292-294.
- [20] E.K. Jaffe, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 169-179.
- [21] D.L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1231-1235.
- [22] W. Wu, D. Shemin, K.E. Richards, R.C. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *69*, 1767-1770.
- [23] D.L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1236-1242.
- [24] R.M. Petrovich, S. Litwin, E.K. Jaffe, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8692-8699.
- [25] 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*, 1025-1031.
- [26] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 240-242.
- [27] P.M. Jordan, in *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, (Ed. : H.A. Dailey), McGraw-Hill, New York, **1990**, pp. 55-121.
- [28] E.K. Jaffe, G.D. Markham, L.S. Rajagopalan, *Biochem.* **1990**, *29*, 8345-8350.
- [29] E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochem.* **1988**, *27*, 4475-4481.
- [30] N. Frankenberg, P.T. Erskine, J.B. Cooper, P.M. Shoolingin-Jordan, D. Jahn, D.W. Heinz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *289(3)*, 591-602.
- [31] 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. Shoolingin-Jordan, *Biochem.* **1999**, *38*, 4266-4276.
- [32] P.T. Erskine, R. Newbold, J. Roper, A. Coker, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, S.P. Wood, J.B. Cooper, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1250-1256.
- [33] D.W. Banner, A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D.C. Philipps, C.I. Pogson, I.A. Wilson, *Nature* **1975**, *255*, 609-614.
- [34] S. Granick, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1101-1119.
- [35] S. Granick, D. Mauzerall, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1119-1140.

- [36] N. Senior, K. Brocklehurst, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.T. Erskine, P.M. Shoolingin Jordan, P. Thomas, M.J. Warren, *Biochem. J.* **1996**, *320*, 401-412.
- [37] R.M. Lüönd, J. Walker, R. Neier, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5005-5013.
- [38] C.J. Walker, G.H. Yu, J.D. Weinstein, *Plant Physiol. Bioch.* **1997**, *35*, 213-221.
- [39] D. Appleton, A.B. Duguid, S-K. Lee, Y-J. Ha, H-J. Ha, F.J. Leeper, *J. Chem.Soc. Perk. T.1* **1998**, *1*, 89-101.
- [40] R.J. Sundberg, in *Comprehensive heterocyclic Chemistry*, (Eds.: A.R. Katritzky, C.W. Rees, E.F. Scriven), Elsevier Science Ltd, Oxford, UK, **1996**, pp. 275-321.
- [41] C. Jarret, F. Stauffer, M.E. Henz, M. Marty, R.M. Lüönd, J. Bobálová, P. Schürmann, R. Neier, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 185-196.
- [42] E. Fabiano, B.R. Golding, *J. Chem. Soc. Perk. T.1* **1991**, 3371-3375.
- [43] E.K. Jaffe, oral communication, lecture 02/04/97 in Neuchâtel.
- [44] C. Jarret, PhD thesis, University of Neuchâtel(CH), **1999**.
- [45] M. Henz, PhD thesis, University of Neuchâtel(CH), **1997**.
- [46] A.M. Cheh, J.B. Neilands, Springer Verlag, Vol. 29, Berlin, **1976**, pp. 123-169.
- [47] E.K. Jaffe, W.K. Abrams, H.X. Kaempfen, K.A. Harris Jr., *Biochem.* **1992**, *31*, 2113-2123.
- [48] P. Spencer, P.M. Jordan, in *The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigments; Ciba Foundation Symposium 180*, (Eds.: D.J. Chadwick, K. Ackrill), J. Wiley & Sons, Chichester, **1994**, pp. 50-69.
- [49] E.K. Jaffe, M. Volin, C.B. Myers, W.R. Abrams, *Biochem.* **1994**, *33*, 11554-11562.
- [50] D. Mauzerall, S. Granick, *J. Biol. Chem.* **1956**, *219*, 435-446.
- [51] D. Appleton, A.B. Duguid, S.K.L. Lee, Y.J. Ha, H.J. Ha, F.J. Leeper, *J. Chem. Soc. Perk. T.1* **1998**, 89-101.
- [52] S. Hanessian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3160-3162; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3354-3356.
- [53] L.W. Mitchell, E.K. Jaffe, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 169-177.
- [54] M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1977**, *72*, 248-254.
- [55] F. Stauffer, C. Jarret, P. Bobal, R. Neier, *Chimia* **1997**, *51*, 420.
- [56] S.K. Sharma, M. Miller, S.M. Payne, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 357-367.
- [57] A. Greppi, PhD thesis, University of Neuchâtel (CH), **1999**.
- [58] H.J. Ha, S.K. Lee, Y.J. Ha, J.W. Park, *Synthetic Commun.* **1994**, *24*, 2557-2562.
- [59] H. Bertschy, PhD thesis, University of Fribourg, **1991**.
- [60] D. Appleton, F.J. Leeper, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1996**, *3*, 303-304.
- [61] R. Fusco, S. Rossi, *Chem. Ind.* **1957**, 1650.
- [62] T. Miyakoshi, S. Saito, J. Kumanotani, *Chem. Lett.* **1981**, 1677-1678.
- [63] D. Seebach, M.S. Hoekstra, G. Protschuk, *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 334-335; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1977**, *16*, 321-322.

- [64] P.H. McCabe, N.J. Milne, G.A. Sim, *J. Chem. Soc. Perk. T.2* **1989**, 1459-1462.
- [65] A. Carter, *J. Soc. Chem. Ind. London* **1943**, 62, 238.
- [66] A. Neuberger, J.J. Scott, *J. Chem. Soc. Perk. T.2* **1954**, 1820-1825.
- [67] S. Hünig, E. Lücke, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 652-662.
- [68] R.M. Lüönd, PhD thesis, University of Fribourg (CH), **1991**.
- [69] A.R. Battersby, F.J. Leeper, in *Topics in Current Chemistry*, (Eds.: F.J. Leeper, J.C. Vederas), Springer, Berlin, **1998**, pp. 143-165.

#### **4.6.9 Tableaux des résultats**

Les résultats des composés présentés dans cette publication sont en partie donnés dans les tableaux qui suivent. Les autres valeurs peuvent être trouvées dans les thèses de Matthias Henz <sup>[91]</sup> et de Caroline Engeloche-Jarret <sup>[90]</sup>.

Les diverses concentrations en inhibiteur sont données dans la deuxième ligne. Les valeurs de  $K_I$  sont obtenues par les méthodes de Michealis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee et Hanes.

ALA [ $\mu$ M]	composé 10				composé 12			
		5642	11284	22568		14433	28866	57732
79.4	0.428	0.382	0.334	0.284	0.397	0.342	0.256	0.069
	0.426	0.399	0.342	0.282	0.406	0.336	0.232	0.078
99.2	0.474	0.448	0.413	0.332	0.515	(0.285)	(0.182)	
	0.470	0.457	0.422	0.312	0.489	(0.392)	(0.203)	
119.1	0.514	0.495	0.459	0.367	0.548	0.450	0.288	(0.186)
	0.523	0.492	0.457	0.341	0.499	0.459	0.318	(0.183)
158.8	0.573	0.553	0.522	0.445	0.571	0.527	0.385	0.178
	0.580	0.553	0.528	0.426	0.614	0.486	0.403	0.155
198.5	0.589	0.576	0.540	0.480	0.668	0.509	0.446	0.186
	0.584	0.563	0.540	0.500	0.606	0.552	0.438	0.186
397.0	0.688	0.664	0.637	0.577	0.739	0.693	0.574	0.223
	0.671	0.649	0.636	0.551	0.774	0.684	0.546	0.241
$V_{max}$ (1)	3.05	3.07	3.04	2.96	3.63	3.47	3.25	1.48
$K_{Mapp}$ (1)	66	80	91	131	97	127	196	240
$K_I$ (1)		26598	29790	22915		46667	28282	39161
$V_{max}$ (2)	3.09	3.13	3.33	3.16	3.81	3.53	3.51	(4.17)
$K_{Mapp}$ (2)	70	82	115	152	109	133	226	(1056)
$K_I$ (2)		32912	17553	19265		65550	26892	
$V_{max}$ (3)	3.04	2.98	3.02	2.90	3.61	3.41	3.26	1.68
$K_{Mapp}$ (3)	65	72	90	127	96	127	273	306
$K_I$ (3)		52390	29338	23660		44696	15656	26391
$V_{max}$ (4)	3.06	3.05	3.09	3.02	3.63	3.44	3.31	1.25
$K_{Mapp}$ (4)	67	76	97	138	98	125	204	(187)
$K_I$ (4)		42002	25201	21297		52386	26687	
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 26434 $K_I$ (2): 23243 $K_I$ (3): 35129 $K_I$ (4): 29499				$K_I$ (1): 38037 $K_I$ (2): 46221 $K_I$ (3): 28914 $K_I$ (4): 39537			
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 4			

ALA [ $\mu$ M]	composé 18				composé 19			
			566	1132	2264	3	7	14
79.4	0.407	0.451	0.348	0.298	0.258	0.367	0.329	0.234
	0.412	0.438	0.339	0.303	0.270	0.372	0.328	0.243
99.2	0.459	0.490	0.407	0.351	0.307	0.411	0.366	0.278
	0.468	0.495	0.399	0.366	0.275	0.427	0.381	0.283
119.1	0.493	0.538	0.428	0.363	0.328	0.472	0.413	0.315
	0.496		0.442	0.400	0.331	0.459	0.411	0.315
158.8	0.553	0.576	0.499	0.451	0.383	0.510	0.452	0.356
	0.538	0.547	0.507	0.455	0.367	0.499	0.472	0.362
198.5	0.603	0.590	0.533	0.494	0.423	0.548	0.500	0.413
	0.589	0.598	0.542	0.477	0.421	0.551	0.499	0.412
397.0	0.687	0.732	0.628	0.566	0.495	0.605	0.585	0.492
	0.671	0.685	0.625	0.574	0.507	0.599	0.578	0.505
$V_{max}$ (1)	3.12	3.13	3.00	2.81	2.52	2.77	2.77	2.63
$K_{Mapp}$ (1)	77	66	95	106	119	(70)	91	142
$K_I$ (1)			1288	1868	2819		38	17
$V_{max}$ (2)	3.13	3.08	3.15	2.96	2.55	2.81	2.80	2.67
$K_{Mapp}$ (2)	78	64	107	120	123	(73)	94	147
$K_I$ (2)			842	1294	2656		34	16
$V_{max}$ (3)	3.15	3.17	2.99	2.78	2.50	2.88	2.85	2.75
$K_{Mapp}$ (3)	79	70	93	103	117	(79)	99	157
$K_I$ (3)			1723	2401	3372		28	14
$V_{max}$ (4)	3.10	3.09	3.06	2.85	2.54	2.71	2.71	2.60
$K_{Mapp}$ (4)	76	64	100	111	121	(66)	89	140
$K_I$ (4)			1006	1541	2542		41	17
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 28 $K_I$ (2): 25 $K_I$ (3): 21 $K_I$ (4): 29				$K_I$ (1): 1192 $K_I$ (2): 1597 $K_I$ (3): 2499 $K_I$ (4): 1696			
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 4				Nombre de tests: 6			

ALA [ $\mu$ M]	composé 20				composé 22			
		6204	12408	24816		20941	41882	83764
79.4	0.434	0.406	0.376	0.269	0.425	0.380	0.378	0.330
	0.444	0.401	0.369	0.278	0.394	0.389	0.362	0.336
99.2	0.490	0.458	0.436	0.333	0.464			
	0.489	0.458	0.427	0.333	0.466			
119.1	0.538	0.515	0.472	0.367	0.472	0.465	0.435	0.376
	0.535	0.525	0.450	0.362	0.474	0.450		0.384
158.8	0.610	0.577	0.544	0.450	0.568	0.508	0.478	0.442
	0.629	0.577	0.538	0.433	0.563	0.511	0.499	0.472
198.5	0.694	0.682	0.587	0.486	0.604	0.537	0.502	0.496
	0.680	0.677	0.597	0.466	0.569	0.544	0.505	0.432
397.0	0.751	0.717	0.699	0.604	0.696	0.669	0.642	0.597
	0.755	0.726	0.700	0.604	0.674	0.687	0.658	0.620
$V_{max}$ (1)	3.62	3.56	3.46	3.25	3.17	3.2	3.04	2.96
$K_{Mapp}$ (1)	88	96	110	156	81	98	(98)	115
$K_I$ (1)		68244	49632	32115		99778		199555
$V_{max}$ (2)	3.77	3.81	3.54	3.48	3.18	3.06	2.87	2.75
$K_{Mapp}$ (2)	98	114	116	178	81	87	(84)	102
$K_I$ (2)		37400	67557	30400		282704		323090
$V_{max}$ (3)	3.53	3.44	3.43	3.25	3.16	3.25	3.11	3.00
$K_{Mapp}$ (3)	82	88	107	136	80	102	104	120
$K_I$ (3)		84788	40698	37684		76149	139607	167528
$V_{max}$ (4)	3.67	3.62	3.49	3.30	3.16	3.12	2.93	2.82
$K_{Mapp}$ (4)	92	101	112	162	80	91	(89)	102
$K_I$ (4)		63419	57077	32615		152298		304596
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 49997 $K_I$ (2): 45119 $K_I$ (3): 54090 $K_I$ (4): 51037				$K_I$ (1): 149667 $K_I$ (2): 302897 $K_I$ (3): 127761 $K_I$ (4): 276393			
	Préincubation: 31 min Incubation: 14 min				Préincubation:31 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 5				Nombre de tests: 1			

ALA [ $\mu$ M]	composé <b>31</b>			
		2796	5592	11184
79.4	0.416	0.308	(0.271)	(0.143)
	0.453	0.351	(0.279)	(0.127)
99.2	0.558	0.376	0.269	0.127
	0.511	0.391		0.138
119.1	0.588	0.467	0.322	0.197
	0.595	0.468		0.157
158.8	0.675	0.500	0.421	0.216
	0.719	0.523	0.462	0.233
198.5	0.740	0.609	0.524	0.308
	0.745	0.635	0.526	0.293
397.0	0.889	0.725	0.690	0.451
	0.875	0.756	0.678	0.453
$V_{max}$ (1)	4.47	4.12	4.81	5.25
$K_{Mapp}$ (1)	118	167	314	791
$K_I$ (1)		6733	3367	1961
$V_{max}$ (2)	4.95	4.58	7.55	
$K_{Mapp}$ (2)	147	205	604	
$K_I$ (2)		7086	1799	
$V_{max}$ (3)	4.42	4.10	5.08	6.63
$K_{Mapp}$ (3)	115	167	351	1075
$K_I$ (3)		6183	2725	1340
$V_{max}$ (4)	4.56	4.19	4.63	3.63
$K_{Mapp}$ (4)	124	174	302	500
$K_I$ (4)		6934	3896	3688
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 4020 $K_I$ (2): 4443 $K_I$ (3): 3416 $K_I$ (4): 4839			
	Préincubation: 33 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 2			

## 4.7 Porphobilinogen Synthase : a Challenge for the Chemist?

Frédéric Stauffer, Eleonora Zizzari, Carole Soldermann-Pissot, Jean-Philippe Faurite, and Reinhard Neier\*

Chemical Biology/Biological Chemistry  
*Chimia* (2001), *55*, 314-319

\* *Correspondence*: Prof. Dr. R. Neier, Université de Neuchâtel, Institut de Chimie, Avenue Bellevaux 51, Case postale 2, CH-2007 Neuchâtel,

Tel.: ++41 32 718 2428, Fax: ++41 32 718 2511, E-mail: Reinhard.Neier@unine.ch

### 4.7.1 Abstract

The initial steps in the biosynthesis of the tetrapyrrolic dyes, called the «pigments of life», are highly convergent. The formation of porphobilinogen, the pyrrolic precursor of the tetrapyrrolic skeleton, uses as starting material  $\delta$ -aminolevulinate. This amino acid is dedicated to the biosynthesis of tetrapyrroles. However, the chemical condensation of  $\delta$ -aminolevulinate leads to a symmetric pyrazine. Attempts to imitate the biosynthesis using one of the proposed pathways for the biosynthesis of porphobilinogen as a guideline has allowed us to synthesize a protected precursor of porphobilinogen in an efficient way. Based on the two major proposals for the biosynthesis, a series of specifically synthesized inhibitors was also tested. The inhibition behaviour and the potency of the inhibitors expressed as their  $K_I$  value has unraveled an interesting relationship between the structure of the inhibitor and the strength of its interaction with the active site. The concerted use of mechanistic analysis, synthesis and kinetic studies of inhibitors has increased our knowledge about the enzyme porphobilinogen synthase. Structural studies of enzyme-inhibitor complexes will hopefully complement the kinetic results accumulated so far.

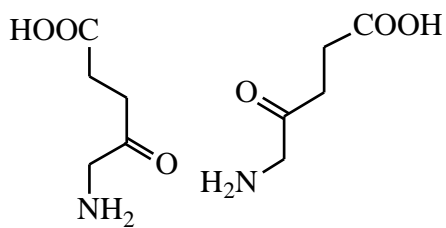
#### **4.7.2 Keywords**

-aminolevulinate, biosynthesis, inhibition, porphobilinogen, tetrapyrroles

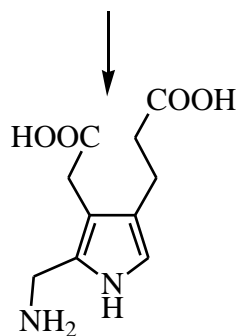
#### **4.7.3 Introduction : Importance, Biosynthesis and Prebiotic Synthesis of the Tetrapyrrolic «Pigments of Life»**

The tetrapyrrolic dyes, which have been called the «pigments of life» [1], have attracted the attention of chemists and biologists alike. The «pigments of life» are crucial cofactors for processes like photosynthesis, oxygen transport, and many oxidation processes just to mention a few of the most important process that require tetrapyrrolic cofactors [2].

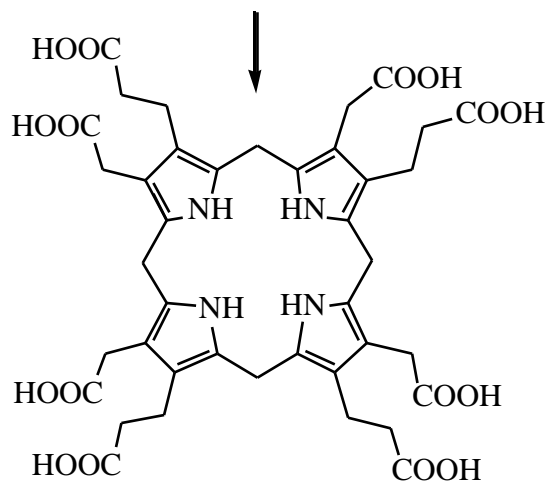
The obvious structural similarity of these cofactors used for widely different processes was interpreted as an indication of a common biosynthetic pathway, maybe even of a common prebiotic history of this class of compounds [3-8]. And, indeed, the tetrapyrrolic skeleton of all «pigments of life» is synthesized in a highly convergent way, starting with eight molecules of  $\delta$ -aminolevulinic acid (**1**).  $\delta$ -Aminolevulinic acid (**1**) is then condensed to porphobilinogen (**2**), which itself tetramerizes to form uroporphyrinogen III (**3**) (see scheme 1).



$\delta$ -aminolevulinic acid (ALA, **1**)



porphobilinogen (PBG, **2**)



uroporphyrinogen III (uro III, **3**)

precursor of

- factor F-430
- sirohydrochlorin
- vitamin B<sub>12</sub>
- chlorophyll
- heme
- cytochrom
- bile pigments

(Akhtar, Arigoni, Battersby, Eschenmoser, Jordan, Müller, Scott, Shemin, Thauer)

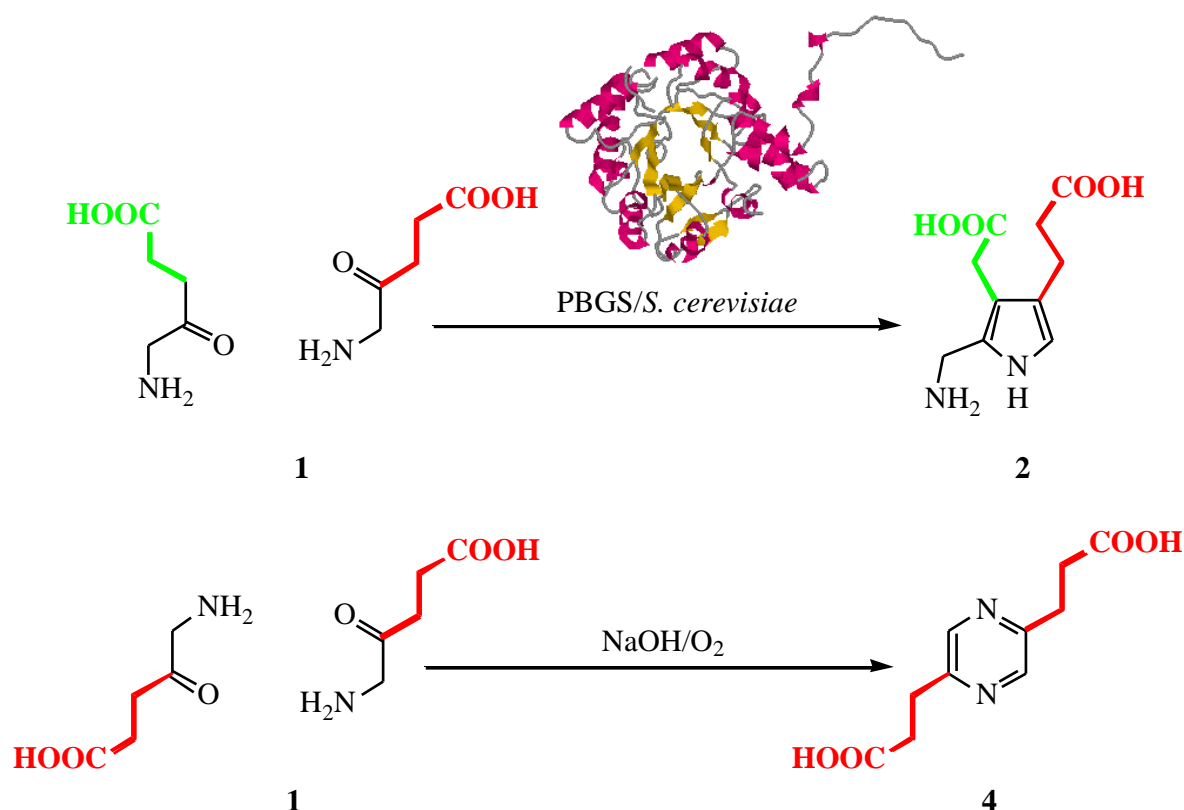
**Scheme 1** : Biosynthesis of uroporphyrinogen III (**3**)

The dimerisation of  $\delta$ -aminolevulinate (**1**) to porphobilinogen (**2**) and the tetramerisation of **2** are both exergonic [9,10]. This observation was considered as an argument in favour of a spontaneous formation of tetrapyrroles [4,5]. A series of remarkable experiments in the group of Eschenmoser at the ETH investigated whether tetrapyrroles can be formed under so called prebiotic conditions [11]. The astonishing outcome of these experiments was, that it is easier to reproduce the more complex, latter stages of the biosynthesis under prebiotic conditions than to simulate the dimerisation of **1**.

#### 4.7.4 The Challenge of the Biosynthesis of Porphobilinogen (**2**)

The tetramerisation of **2** could be achieved without the help of an enzyme [12]. Porphobilinogen (**2**) forms uroporphyrinogens I to IV upon heating in the presence of mineral acid. Based on this observation the enzymatic transformation has been called an example of a chemomimetic biosynthesis [6].

Chemists have not had the same success imitating the seemingly simpler dimerisation of  $\delta$ -aminolevulinic acid (**1**) to porphobilinogen (**2**) [13-17]. Chemical dimerisation of **1** can be easily achieved. Under conditions, which allow oxidation, either in air or by the addition of iodine, a symmetric dimer, pyrazine **4**, was obtained in good yields [18]. These observations raise questions about the mechanism of the transformation of **1** catalyzed by porphobilinogen synthase (= PBGS) and the reaction occurring in test-tube (see scheme 2).



**Scheme 2 :** Comparison of the chemical dimerisation of  $\alpha$ -aminolevulinic acid (1) with the porphobilinogen (2) biosynthesis catalyzed by the enzyme PBGS

The lack of success imitating the biosynthesis of porphobilinogen [19-22] is all the more surprising because the Knorr pyrrole synthesis is a synthetic method well known in heterocyclic chemistry [23-25]. The Knorr pyrrole synthesis yields pyrroles starting from an  $\alpha$ -amino-ketone and an appropriate carbonyl component. The importance of the «pigments of life» and the dichotomy between the chemical reactivity of  $\alpha$ -aminolevulinic acid (1) and the biochemical transformation were strong motivations to study the chemical synthesis and the biochemical formation of porphobilinogen (2) [15,20,21,26,27]. Since the beginning of organic chemistry, the desire to understand biological processes has been amalgamated with the wish to imitate nature [28-31].

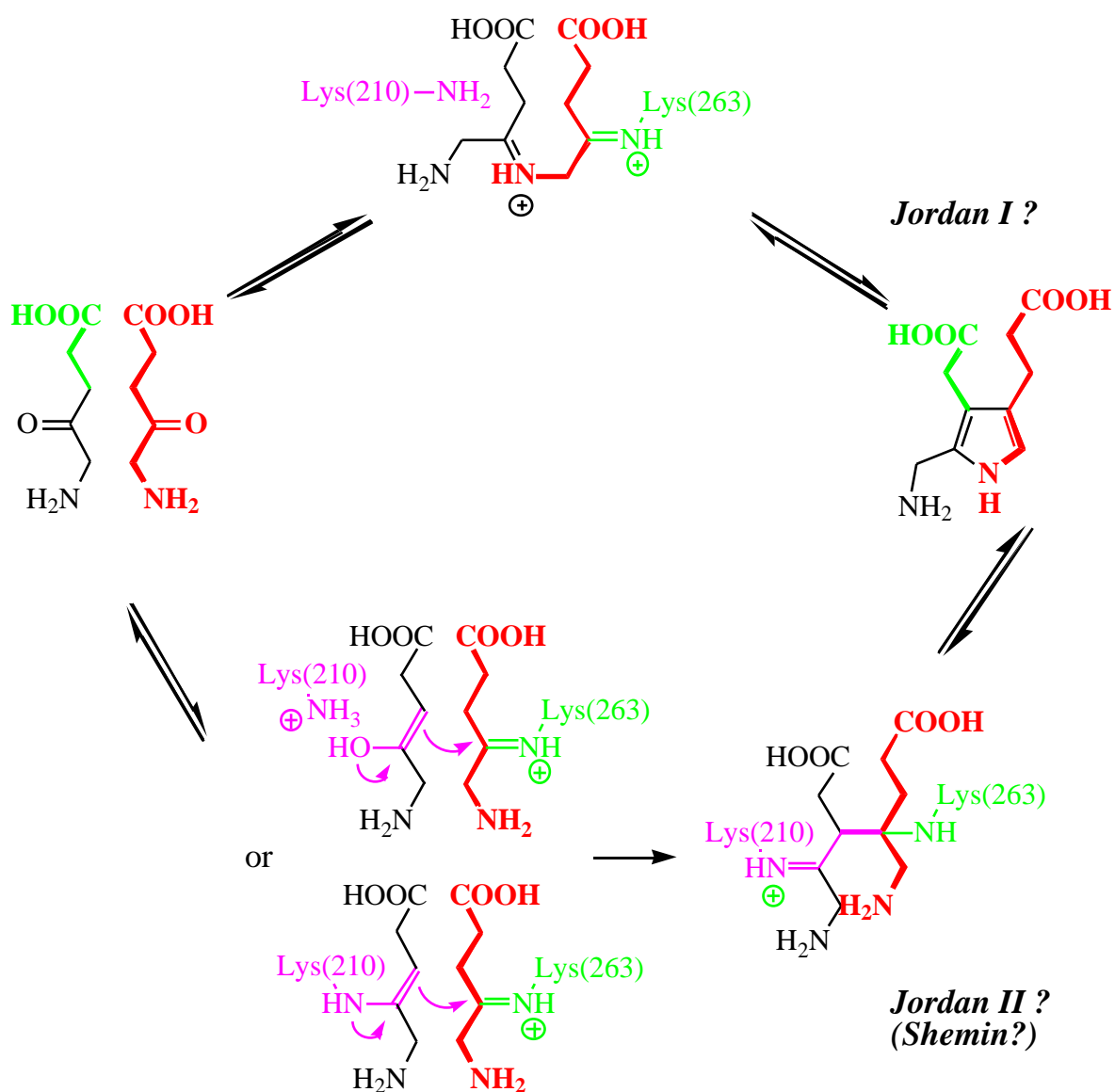
#### 4.7.5 Proposals for the Mechanism of Porphobilinogen Synthase

Kinetic and biochemical studies alone failed to reveal the sequence of mechanistic steps exploited by porphobilinogen synthase. As we now know, careful biochemical studies over a period of more than 30 years failed to identify all the important groups at the active site. X-ray structures of porphobilinogen synthase became available only very recently [32-34]. More importantly, the structures of porphobilinogen synthase co-crystallized with levulinic acid, a well-known competitive inhibitor, were solved as well [34-36]. These crystal structures increased our knowledge about porphobilinogen synthase dramatically.

Shemin was the first to propose a mechanism for porphobilinogen synthase drawing a close analogy between this enzyme and class I aldolases [37-39]. Starting from the results of his elegant single turnover experiments, Jordan postulated two alternative mechanisms for the formation of porphobilinogen (**2**), which are the basis of our research today (see scheme 3) [40-43]. Jordan initially suggested that the first bond connecting the two-substrate molecules is the carbon-nitrogen bond of the Schiff base. Only after this step, can the aldol reaction and subsequent elimination occur, leading to the five-membered nitrogen heterocycle. This mechanism closely follows the known mechanism of the Knorr pyrrole synthesis. In the alternative mechanism, the aldol reaction is postulated to occur first, forming the carbon-carbon bond joining the two substrates.

Despite the detailed structural information available, it is still not possible to discriminate between the two different mechanisms. This situation is typical for studies in bioorganic chemistry where more detailed knowledge often allows some of the initial questions to be answered, while raising new, even more intriguing problems. Under these circumstances, additional knowledge from model studies is necessary to guide future research on porphobilinogen synthase.

### C-N bond formation first



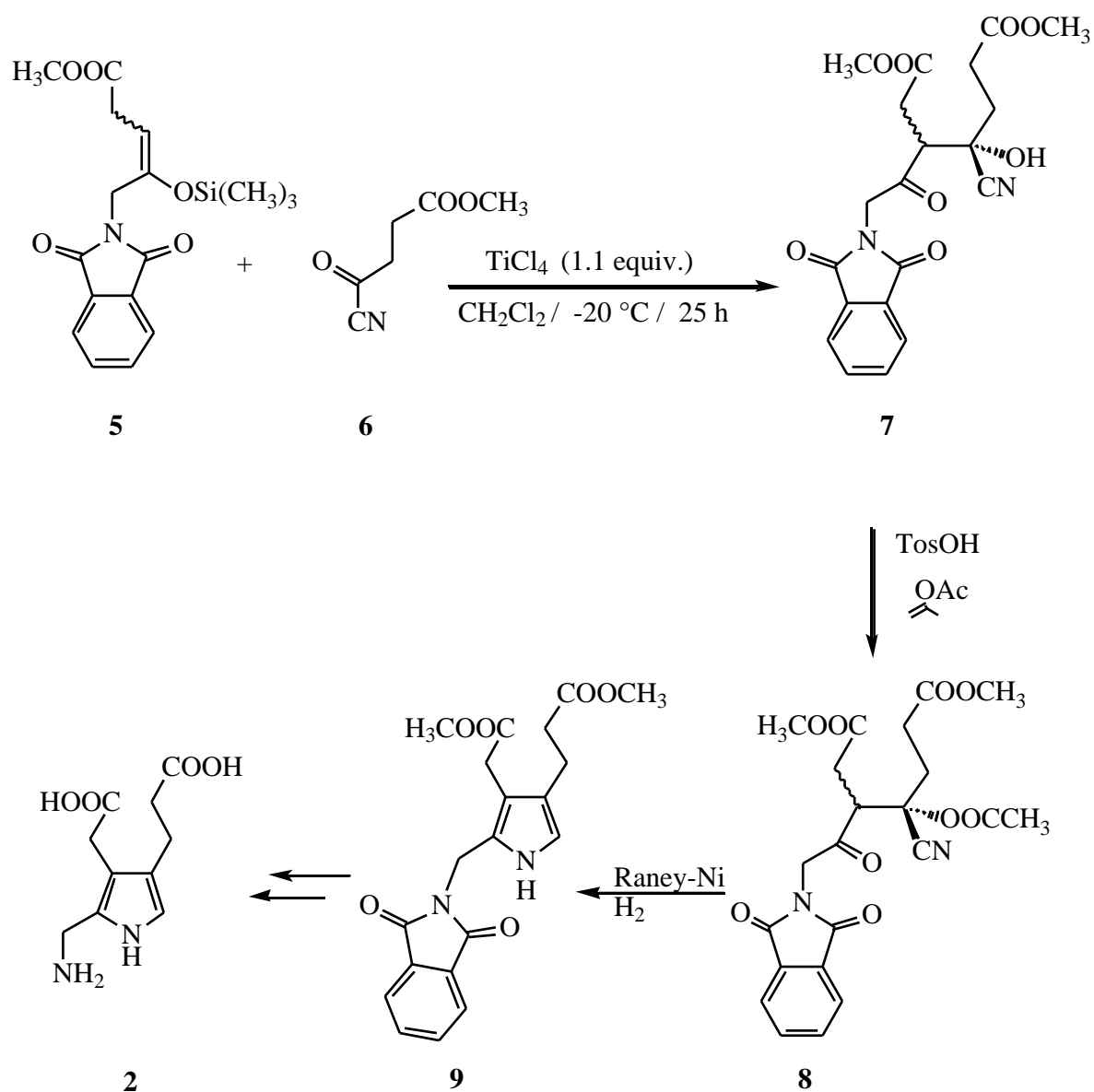
### C-C bond formation first

**Scheme 3** : The two main mechanistic proposals for porphobilinogen synthase

#### **4.7.6 Novel Pyrrole Synthesis based on the Shemin-Jordan Mechanism for the Biosynthesis**

Following the mechanistic proposals of Shemin and Jordan, one can ask whether pyrroles can be synthesized by imitating the sequence of transformations proposed for the biosynthesis of porphobilinogen (**2**).

Based on this mechanistically motivated question, a novel synthesis of pyrroles has been developed. The key step is the Mukaiyama crossed aldol reaction between regioselectively generated silyl enol ethers and acylcyanide (see scheme 4) [20,21]. The Mukaiyama crossed aldol reaction forms the crucial carbon-carbon bond [44,45]. This special type of Mukaiyama crossed aldol reaction imitates the postulated carbon-carbon bond formation but the oxidation state of the substrate incorporated at the P-side of porphobilinogen (**2**) has to be modified. Adjustment of the oxidation state proved to be more difficult than initially predicted. Removal of the protecting groups from the porphobilinogen derivative **8** over two steps has already been described in the literature [46,47].



**Scheme 4:** Synthesis of a protected form of porphobilinogen (**8**)

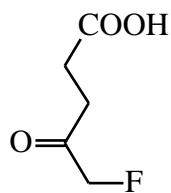
Our synthetic efforts have clearly shown that once the carbon-carbon bond has coupled the two substrates together, the rest of the process leading to the pyrrole is chemically easy and thermodynamically favoured. However, the conditions necessary to achieve this central bond formation are such that one hesitates to push the analogy between the chemistry in the flask and the chemistry on the enzyme surface too far.

#### **4.7.7 Inhibition Studies of Porphobilinogen Synthase from *Escherichia coli***

In recent year it has become possible to elicit catalytic antibodies using antigens imitating transition states of certain transformations [48-50]. This approach has its theoretical basis in Pauling's postulate that the active site of an enzyme should be complementary to the transition state of the catalysed reaction [51,52]. A corollary of these findings is the fact that the potency of many excellent inhibitors can be interpreted if a strong resemblance of these compounds to the structure of the transition state of the rate determining step is assumed [52]. In order to obtain further information on the biosynthesis of porphobilinogen synthase, we have undertaken a systematic search of the inhibition behaviour of this enzyme [19,53-56]. We intended to accumulate sufficient knowledge about the recognition site of porphobilinogen synthase so that conclusions about the mechanism could be deduced. Based on firm knowledge about the factors responsible for the recognition at the active site, it should be possible to interpret the whole body of experimental data in terms of a mechanism. Finally, we hoped that the best of our inhibitors would become good candidates for co-crystallization.

For the inhibition experiments, experimental conditions were chosen to give normal Michaelis-Menten kinetics with analogues of the substrate (see fig. 1). Under these conditions, the recognition of the second substrate at the A site of the enzyme is determined. When the inhibition behaviour of a specific inhibitor becomes more complex, this is a clear sign that not only competition for the binding of the second substrate at the A site plays a role, but that a double interaction can occur. If an inhibitor interacts with the A and the P site, this double interaction leads to mixed or uncompetitive inhibition. If the interaction becomes thermodynamically stronger than the interaction with the natural substrate, then slow tight binding can be observed. Under these experimental conditions the type and the site(s) of interaction of a specific inhibitor can be deduced from the inhibition type determined with the help of the kinetic analysis. Studying more than 100 inhibitors, this correlation could be verified and has become an important foundation for the interpretation of the experimental results.

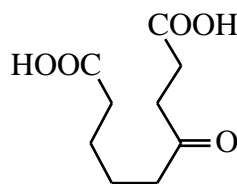
### Inhibition of substrate analogues



Competitive

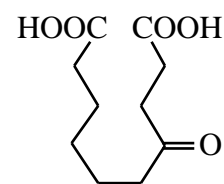
$K_I$  [ $\mu\text{M}$ ] : 85

### Inhibition of elongated substrate analogues



Uncompetitive

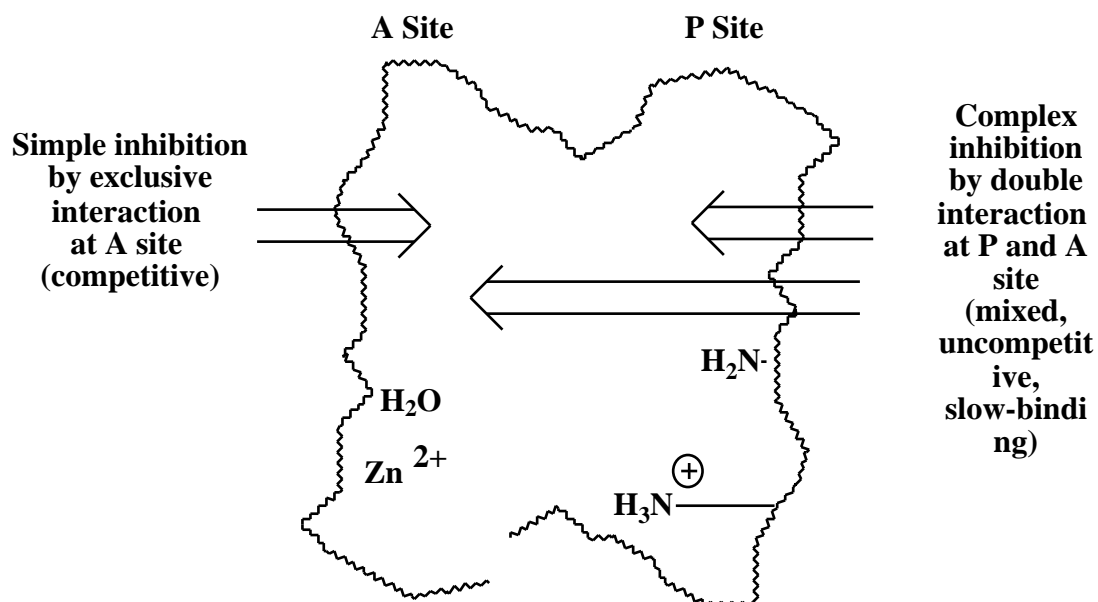
$K_I$  [ $\mu\text{M}$ ] : 403



Irreversible

not determined

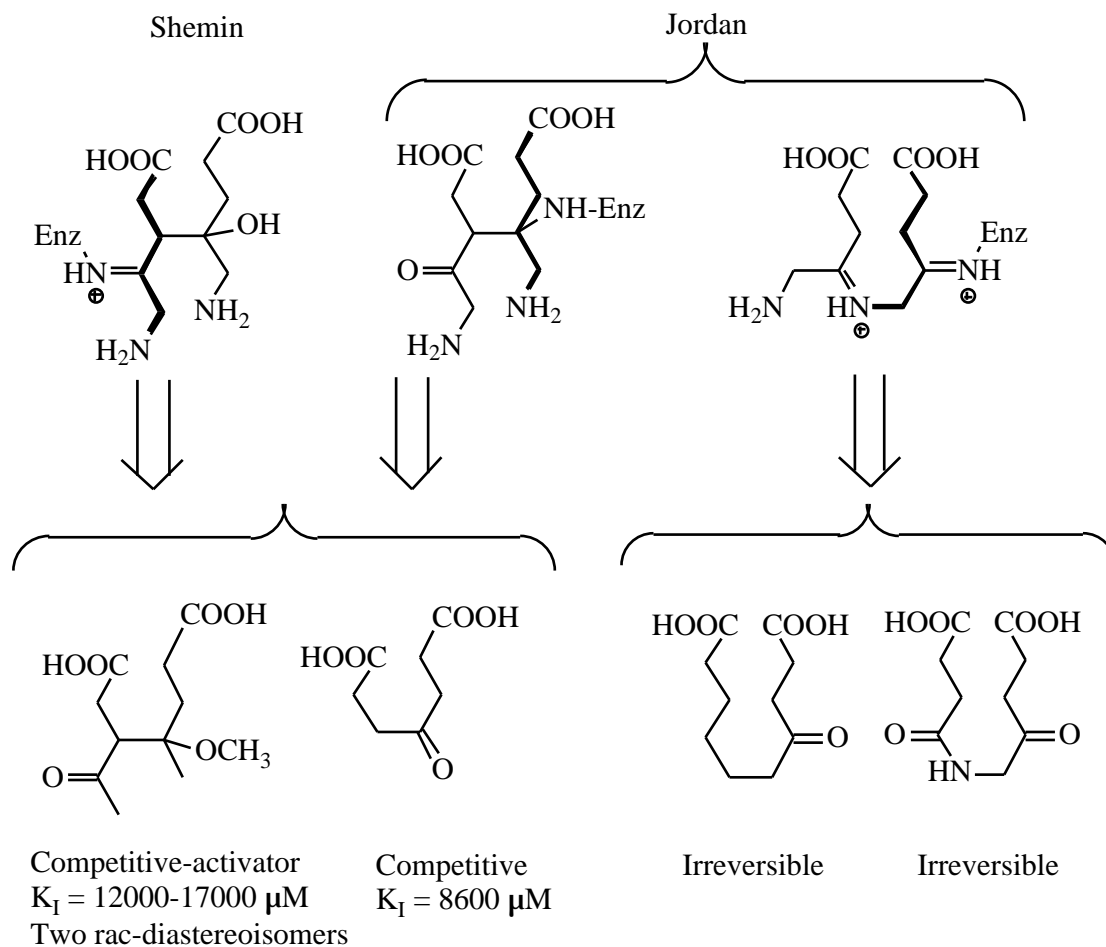
### Conclusion:



**Figure 1:** Inhibition type as a function of the sites of interaction

The most important application of this approach was the study of a series of diacids that were considered to be analogues of the postulated intermediates (see scheme 5).

Intermediates postulated by:



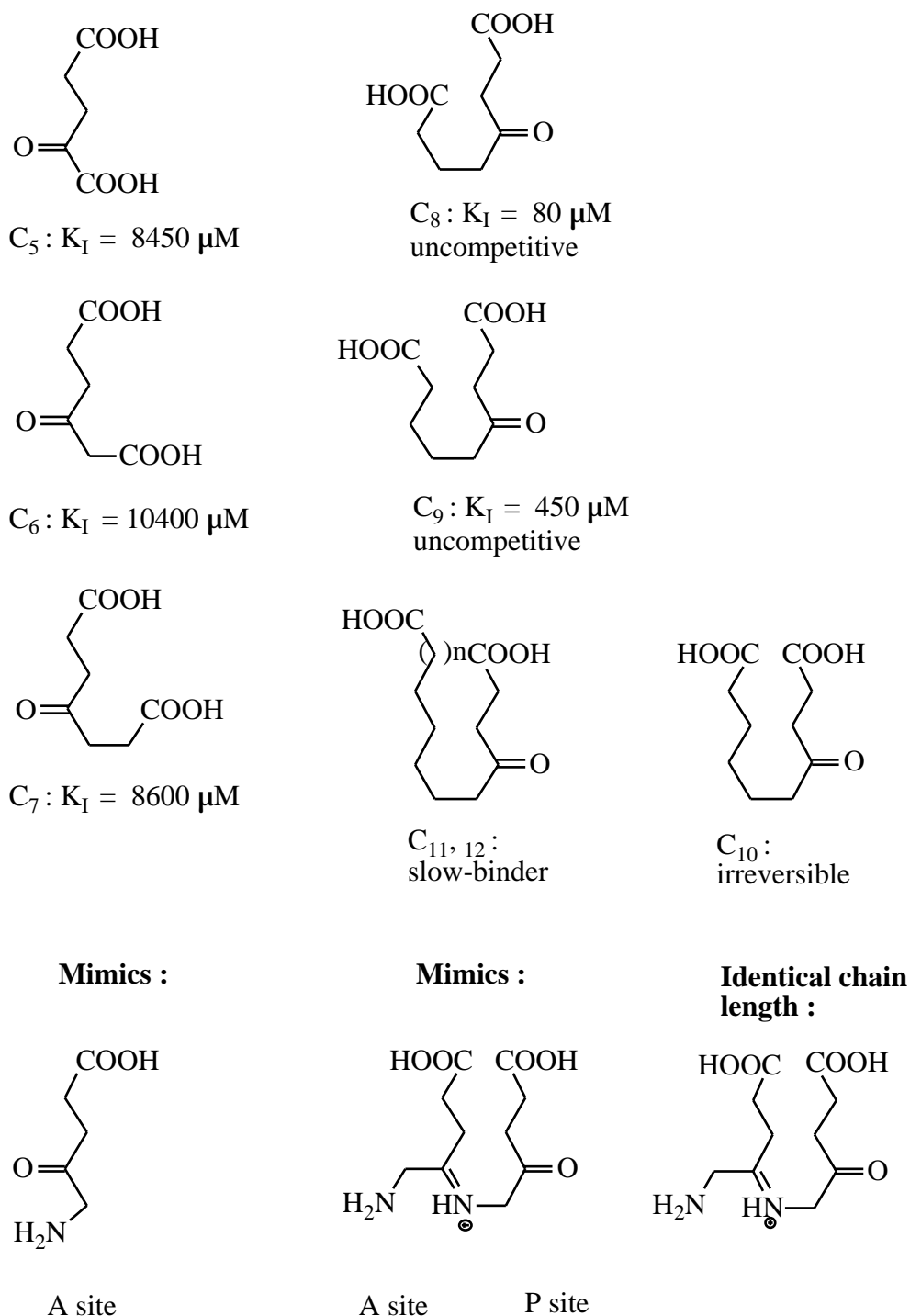
Inhibitors mimicking the postulated intermediates

**Scheme 5 :** Comparison of the structures postulated as intermediates by Shemin and Jordan respectively with diacids used as inhibitors

After the first bond between the two substrates is formed, a diacid is created in both postulated mechanisms. The difference between the two proposals is the fact that one diacid is a derivative of pimelic acid, whereas the alternative diacid intermediate is a derivative of sebacic acid. In order to optimize recognition of our inhibitors, we added a  $\beta$ -keto function, which allows the inhibitor to interact at three points with the active site.

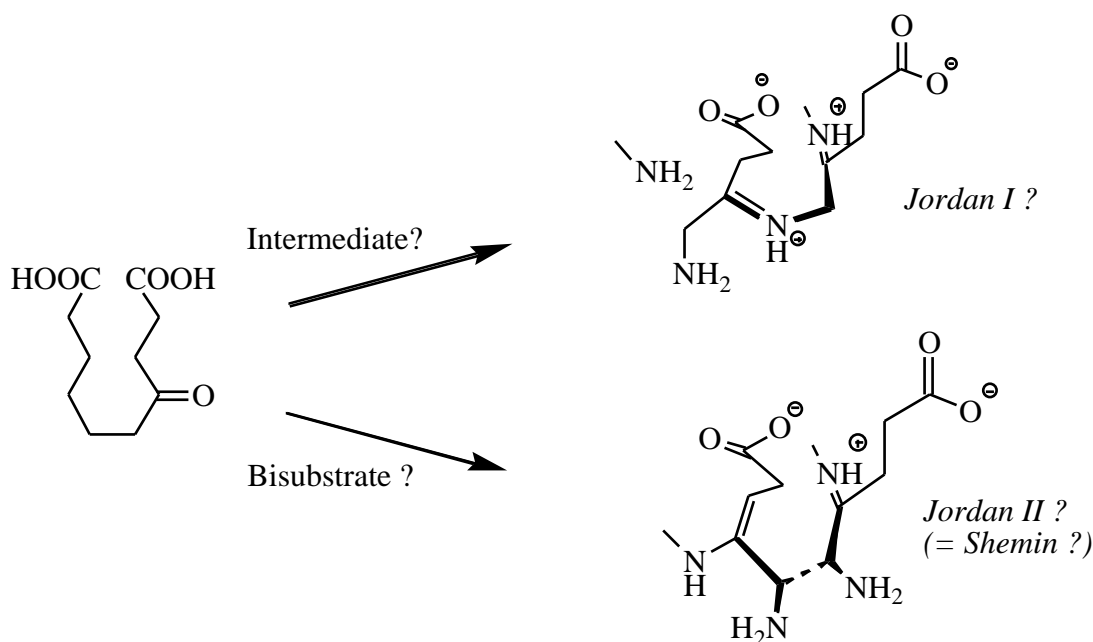
Systematic study of the  $\beta$ -keto dicarboxylic acids from C<sub>5</sub> to C<sub>12</sub> was very informative (see fig. 2). The first three dicarboxylic acids C<sub>5</sub> to C<sub>7</sub> are weak competitive inhibitors with large

inhibition constants corresponding to weak recognition. Going to C<sub>8</sub> and C<sub>9</sub>, the type of inhibition changes and the magnitude of the inhibition constant diminish dramatically. Under our conditions, C<sub>10</sub> is an irreversible inhibitor, but it is probably better classified as a slow tight-binding inhibitor. Finally, the dicarboxylic acids C<sub>11</sub> and C<sub>12</sub> are slow binders.



**Figure 2 :** Results of the inhibition studies of the  $\alpha$ -keto dicarboxylic acids C<sub>5</sub> to C<sub>12</sub>

The important conclusion from this series of inhibition studies is clear (see scheme 6). The  $\alpha$ -keto dicarboxylic acids, which resemble the intermediates initially postulated by Jordan, are tightly bound, and show essentially irreversible behaviour. The intermediate, which imitates the intermediate first postulated by Shemin and then incorporated in Jordan's second proposal, seems to be recognized "only" as an analogue of the substrate without any additional site of interaction with the enzyme. As a consequence, only a weak interaction between the  $C_7$  dicarboxylic acid and the enzyme is observed. The obvious interpretation of these results is that the 4-oxosebacic acid is recognized at the two carboxylic acid ends of the molecule and the keto function forms a Schiff base with the active site lysine of the enzyme as an additional point of recognition. This three-point recognition leads to quasi-irreversible inhibition. Inhibitors, which are too short or too long, still bind strongly to the active site, but they show either slow-binding behaviour or good recognition, which means a small  $K_I$  value and uncompetitive behaviour. Inhibitors, where the distance between the two carboxylic acid ends is too small, are only recognized as substrate analogues and therefore show competitive and not very efficient inhibition behaviour.



**Scheme 6:** Are the dicarboxylic acids analogues of the intermediate or analogues of the bisubstrate ?

The insights provided by the inhibition studies are mostly indirect but rather compelling. All the analogues that mimic an initial aldol reaction are weak inhibitors, whereas the inhibitors based on initial formation of a Schiff base show good inhibition potency or are even irreversible inactivators. Interpreted only from a structural point of view, the results

seem to be clear. Mechanistic interpretation of our findings is more difficult. At this stage we cannot be sure if our inhibitors are really analogues of the postulated intermediate or if they only happen to mimic the bisubstrate. We hope that co-crystallization of one or several of our inhibitors with the enzyme will be possible. These structures will contribute significantly to our understanding of the interaction of our inhibitors with the active site. The tools are probably now in place to solve the question of the sequence of the enzyme catalyzed reaction, but other problems are still not solved and we even do not know how to tackle them: 1) What is the chemical logic of this sequence ? 2) What is the relation of the actual biochemical mechanism to the hypothesis of a prebiotic formation of tetrapyrroles ?

In conclusion the sum of chemical, biochemical and X-ray studies has increased our knowledge about porphobilinogen synthase considerably. Despite this progress we are still quite far from the situation proposed by Feynman as a criterion for real understanding : What we cannot create we do not understand [49].

#### 4.7.8 References

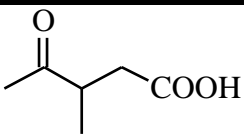
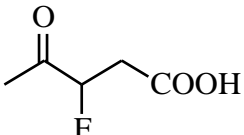
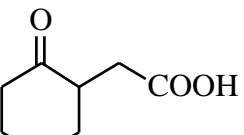
- [1] A.R. Battersby, *Natural Product Reports* **1987**, 4, 77.
- [2] B. Kräutler, *Chimia* **1987**, 41, 277.
- [3] M. Calvin, *Perspect. Biol. Med.* **1963**, 13, 45.
- [4] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5.
- [5] A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5.
- [6] A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 1.
- [7] N.H. Georgopadakou, A.I. Scott, *J. Theor. Biol.* **1977**, 69, 381.
- [8] A.W.D. Larkum, in 'Chlorophylls', Ed. H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, **1991**, p. 367.
- [9] P. George, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, 206, 84.
- [10] A.D. Adler, V. Varadi, P. George, *Enzyme* **1974**, 17, 43.
- [11] G. Ksander, G. Bold, R. Lattmann, C. Lehmann, T. Früh, Y.-B. Xiang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1115.
- [12] D. Mauzerall, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2605.
- [13] A. Valasinas, B. Frydman, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2991.
- [14] R.B. Frydman, B. Frydman, A. Valasinas, in 'The Porphyrins Vol. VI', Ed. D. Dolphin, Academic Press, New York, **1979**, p. 1.

- [15] R. Neier, In 'ECHET 96', Ed. H.S. Rzepa, J.P. Snyder, C. Leach, The Royal Society of Chemistry, London, **1997**, p. 112.
- [16] P. Bobal, R. Neier, *Trends Org. Chem.* **1997**, 6, 125.
- [17] R. Neier, *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, 37, 487.
- [18] B. Franck, H. Stratman, *Heterocycles* **1981**, 15, 919.
- [19] R. Neier, in 'Advances in Nitrogen Heterocycles', Ed. JAI Press Inc., Greenwich, Connecticut, **1996**, p. 35.
- [20] A.R. Chaperon, T.M. Engeloch, R. Neier, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 369.
- [21] A.R. Chaperon, T.M. Engeloch, R. Neier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 358.
- [22] A.I. Scott, C.A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, 35, 72.
- [23] H. Fischer, Organic Synthesis coll. vol II, Ed. John Wiley & Sons, New York, **1943**, p. 202.
- [24] A. Gossauer, in 'Der Chemie der Pyrrole', Ed. Springer-Verlag, Berlin, **1974**, p. 35.
- [25] H.A. Jackson, in 'Comprehensive Organic Chemistry', Ed. D. Barton, D. Ollis, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, **1997**, p. 275.
- [26] A. Meunier, R. Neier, *Synthesis* **1988**, 5, 381.
- [27] H. Bertschy, A. Meunier, R. Neier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 777.
- [28] I. Fleming, in 'Selected Organic Syntheses', J. Weiley & Sons, London, **1973**.
- [29] W.S. Johnson, *Accounts Chem. Res.* **1968**, 1, 1.
- [30] W.S. Johnson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 9.
- [31] E.E. van Tamelen, *Accounts Chem. Res.* **1975**, 5, 51.
- [32] 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.
- [33] 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 Sci.* **1997**, 6, 1774.
- [34] N. Frankenberg, P.T. Erskine, J.B. Cooper, P.M. Shoolingin-Jordan, D. Jahn, D.W. Heinz, *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 591.
- [35] 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. Shoolingin-Jordan, *Biochem.* **1999**, 38, 4266.
- [36] P.T. Erskine, R. Newbold, J. Roper, A. Coker, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, S.P. Wood, J.B. Cooper, *Protein Sci.* **1999**, 8, 1250.
- [37] D.L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1236.
- [38] D. Shemin, *Naturwissenschaften* **1970**, 57, 185.
- [39] D. Shemin, in 'The Enzymes', Ed. P.D. Boyer, Academic Press, New York, **1972**, p. 323.
- [40] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *FEBS Lett.* **1980**, 114(2), 283.

- [41] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 240.
- [42] P.M. Jordan, in 'Biosynthesis of Heme and Chlorophylls', Ed. H.A. Dailey, McGraw-Hill, New York, **1990**, p. 55.
- [43] P.M. Jordan, in 'Biosynthesis of Tetrapyrroles', Ed. P.M. Jordan, Elsevier, Amsterdam, **1991**, p. 1.
- [44] T. Mukaiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 817.
- [45] T. Mukaiyama, in 'Organic Reactions', Ed. W.G. Dauben, J. Wiley & Sons, New York, **1982**, p. 203.
- [46] G.W. Kenner, K.M. Smith, J.F. Unsworth, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 43.
- [47] G.W. Kenner, J. Rimmer, K.M. Smith, J.F. Unsworth, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 332.
- [48] K.M. Shokat, M.K. Ko, T.S. Scanlan, L. Kochersperger, S. Yonkovich, S. Thaisrivongs, P.G. Schultz, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1339.
- [49] L. Tingyu, R.A. Lerner, K.D. Janda, *Accounts Chem. Res.* **1997**, 30, 115.
- [50] D. Hilvert, *Pure Appl. Chem.* **1992**, 64, 1103.
- [51] L. Pauling, *Nature* **1948**, 161, 707.
- [52] P.A. Brady, J.K.M Sanders, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 327.
- [53] R.M. Lüönd, J. Walker, R. Neier, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5005.
- [54] F. Stauffer, C. Jarret, P. Bobal, R. Neier, *Chimia* **1997**, 51, 420.
- [55] P. Bobal, C. Jarret, F. Stauffer, R. Neier, *Chimia* **1997**, 531.
- [56] C. Jarret, F. Stauffer, M.E. Henz, M. Marty, R.M Lüönd, J. Bobalova, P. Schürmann, R. Neier, *Chemistry & Biology* **2000**, 7, 185.

## 4.8 Les résultats obtenus pour les inhibiteurs non publiés

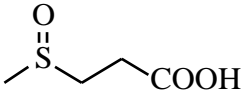
### 4.8.1 Variation en position 3

	N°	$K_M$ (en $\mu M$ )	$K_I$ (en $\mu M$ )	Type d'inhibition
	<b>59</b>	83	48'800	compétitif
	<b>60</b>	66	4'050	compétitif
	<b>61</b>	67	27'880	compétitif

**Tableau 15** : Résultats d'inhibition lors d'une variation de la position 3

L'introduction d'un substituant sur la position 3 conduisait à des inhibiteurs compétitifs moyens à mauvais. L'acide 3-fluorolévulinique (**60**) montrait un  $K_I = 4'050 \mu M$ . Le fait d'augmenter la taille du substituant amenait à des constantes d'inhibition nettement plus élevées ( $K_I = 48'800 \mu M$  pour l'acide 3-méthyllévulinique (**59**) et  $K_I = 27'880 \mu M$  pour le composé **61**).

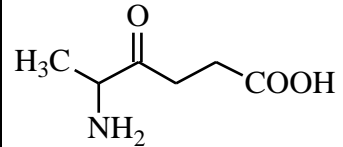
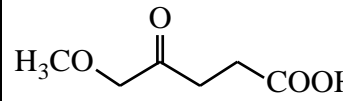
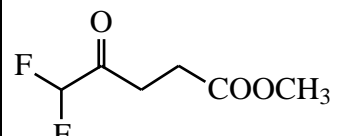
### 4.8.2 Variation en position 4

	N°	$K_M$ (en $\mu M$ )	$K_I$ (en $\mu M$ )	Type d'inhibition
	<b>62</b>	66	41'400	compétitif

**Tableau 16** : Résultats d'inhibition lors d'une variation de la position 4

La modification de la fonction carbonyle aboutissait à un inhibiteur compétitif faible **62** montrant un  $K_I = 41'400 \mu M$ .

### 4.8.3 Variation en position 5

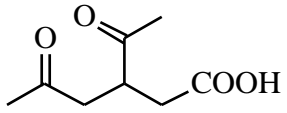
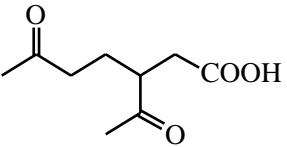
	N°	$K_M$ (en $\mu M$ )	$K_I$ (en $\mu M$ )	Type d'inhibition
	<b>27</b>	67	1'100	compétitif
	<b>55</b>	73	2'100	compétitif
	<b>63</b>	59	570	compétitif

**Tableau 17** : Résultats d'inhibition lors d'une variation de la position 5

Le composé **27** était l'analogue méthylé en position 5 du substrat naturel. Il agissait comme inhibiteur compétitif au site actif de l'enzyme et présentait un  $K_I = 1'100 \mu M$ . Il était deux fois mieux reconnu que l'acide lévulinique (**24**,  $K_I = 2'200 \mu M$ ). Le remplacement de la fonction amine par une fonction éther aboutissait à un comportement compétitif avec un  $K_I$

de l'ordre de celui de l'acide lévulinique (composé **55**,  $K_I = 2'100 \mu\text{M}$ ). Le composé difluoro **63** était un bon inhibiteur compétitif ( $K_I = 570 \text{ mM}$ ).

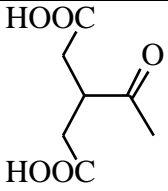
#### 4.8.4 Composés monoacides ramifiés

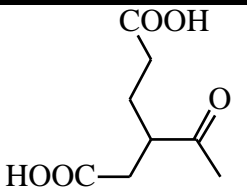
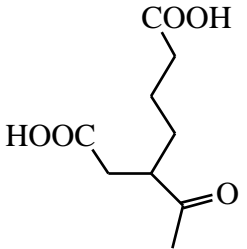
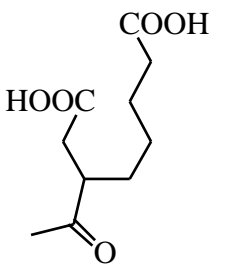
	N°	$K_M$ (en $\mu\text{M}$ )	$K_I$ (en $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	<b>64</b>	49	9'400	compétitif/mixte
	<b>65</b>	60	11'780	compétitif/mixte

**Tableau 18** : Résultats d'inhibition lors de l'utilisation des monoacides ramifiés

Les composés ramifiés par un groupe acétyle **64** et **65** interagissaient aussi bien au site P qu'au site A de l'enzyme et donc montraient des comportements compétitifs/mixtes. Ils étaient des inhibiteurs plutôt moyens ( $K_I = 9'400 \mu\text{M}$  pour le composé **64** et  $K_I = 11'780 \mu\text{M}$  pour le composé **65**).

#### 4.8.5 Composés diacides ramifiés

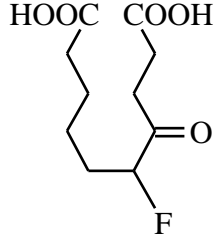
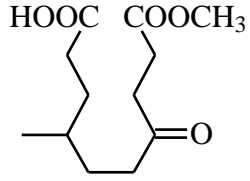
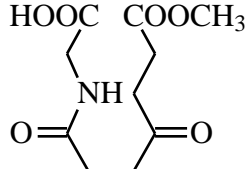
	N°	$K_M$ (en $\mu\text{M}$ )	$K_I$ (en $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	<b>66</b>	62	3'200	incompétitif

	<b>56</b>	94	1'310	incompétitif
	<b>67</b>	58	82	incompétitif
	<b>68</b>	89	5'960	compétitif

**Tableau 19 :** Résultats d'inhibition lors de l'utilisation des diacides ramifiés

Les composés diacides ramifiés étaient des substances intéressantes. En effet, l'allongement de la chaîne carbonée entre les deux fonctions acides permettait de passer d'un comportement incompétitif à un comportement compétitif. De plus, l'allongement de cette chaîne permettait de diminuer la constante d'inhibition dans la série des inhibiteurs incompétitifs (cas **56**, **66** et **67**). Le composé **68** devenait un inhibiteur compétitif avec un  $K_I = 5'960 \mu\text{M}$ .

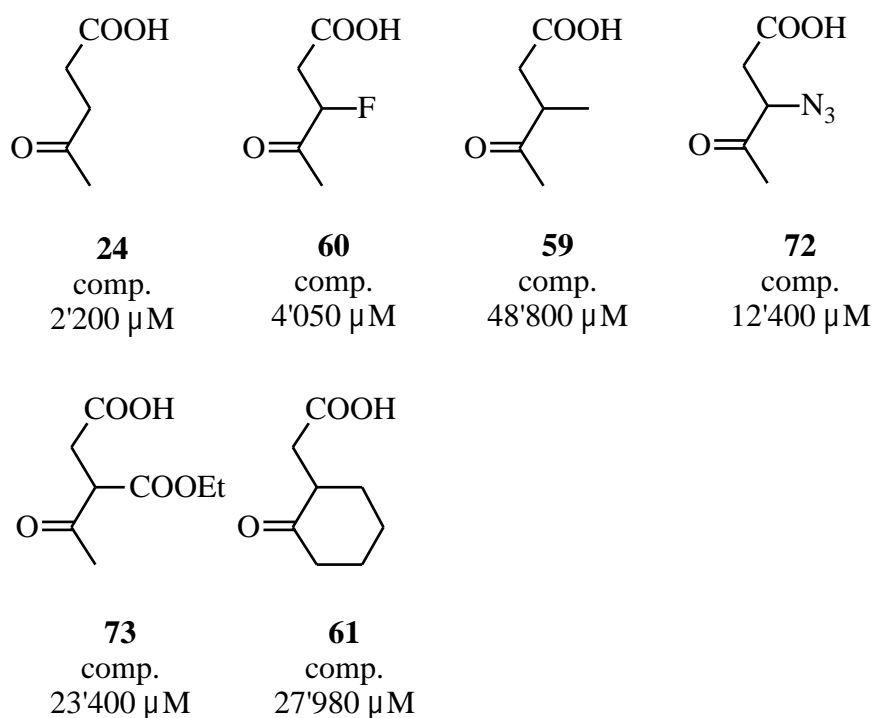
#### 4.8.6 Divers composés mixtes C10

	N°	$K_M$ (en $\mu M$ )	$K_I$ (en $\mu M$ )	Type d'inhibition
	<b>69</b>	--	--	irréversible
	<b>70</b>	63	11'280	compétitif/mixte
	<b>71</b>	--	--	irréversible

**Tableau 20** : Résultats d'inhibition des composés mixtes C10

Le diacide **69** et le composé mixte **71** étaient de très bons inhibiteurs et montraient un comportement irréversible. Le fait d'ajouter un groupe méthyle en position 7 du composé **70** provoquait un effet désastreux sur l'inhibition. En effet, on était alors en présence d'un comportement compétitif/mixte avec un  $K_I = 11'280 \mu M$ .

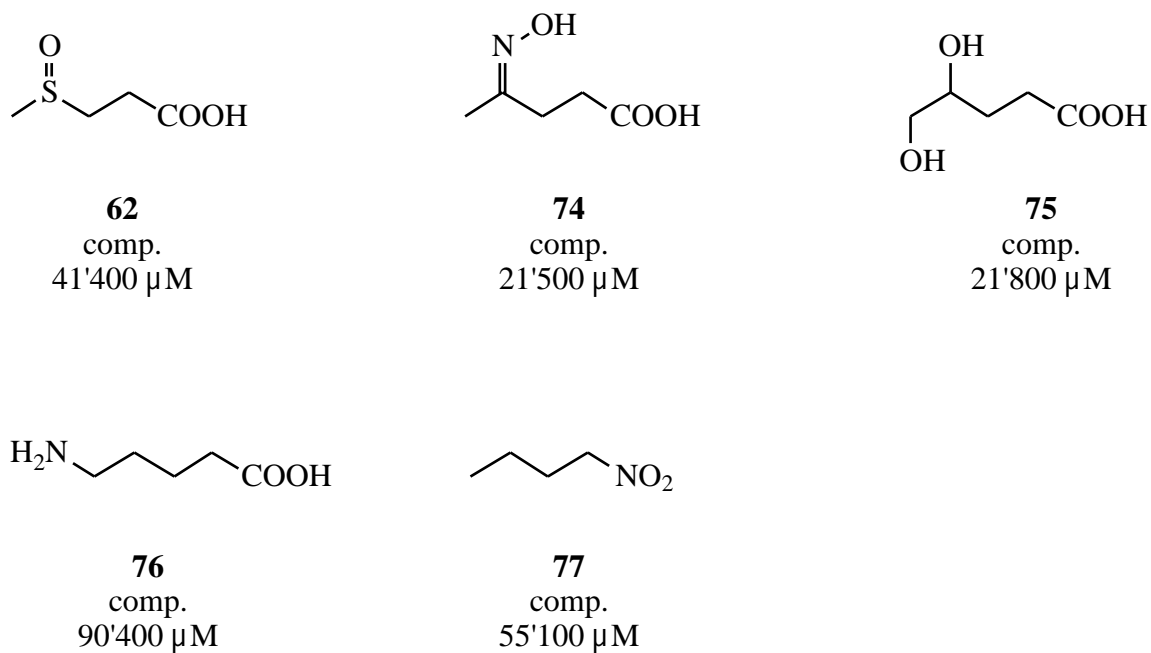
#### 4.8.7 Les analogues de substrat



**Figure 57** : Modification de la position 3

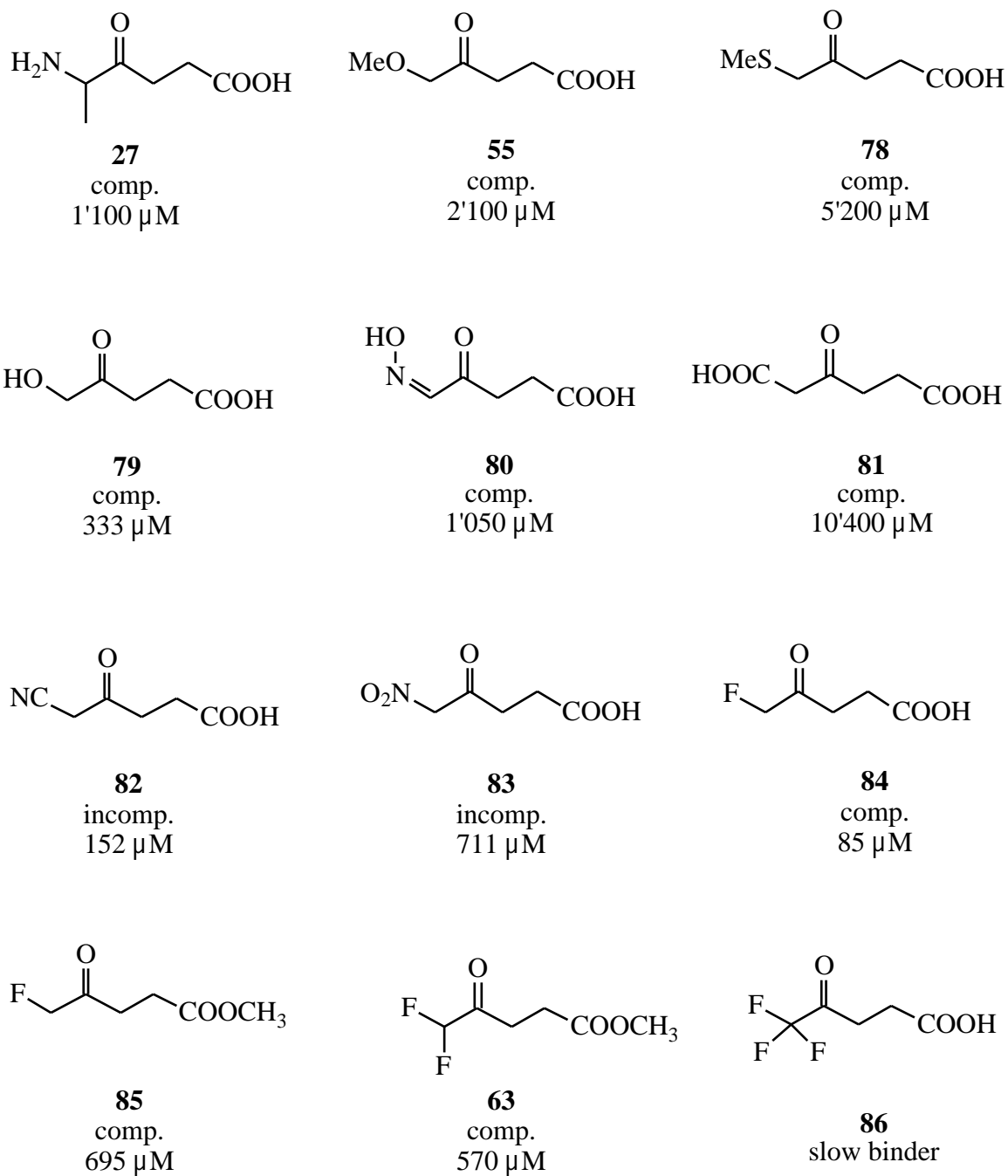
L'introduction d'un substituant plus ou moins volumineux en position 3 permettait de définir l'impact stérique de cette position au niveau du site A. En effet, les six composés dessinés ci-dessus présentaient une inhibition compétitive. Les  $K_I$  obtenus montraient clairement que l'on se trouvait en présence d'inhibiteurs plutôt faibles et donc que l'environnement enzymatique autour de cette position 3 ne tolérait pas la présence de substituants de ce type. Même l'acide 3-florolévulinique (**60**), dont l'atome de fluor est un analogue structural de l'atome d'hydrogène, possédait une constante d'inhibition deux fois plus importantes que l'acide lévulinique (**24**).

Une des étapes réactionnelles dans la transformation de l'ALA (**1**) en PBG (**2**) consiste à abstraire un proton de la position 3 de l'ALA au site A. La présence de groupes électro-attracteurs sur cette position (composé **73**) devait favoriser cette déprotonation et donc aboutir à une bonne reconnaissance de l'inhibiteur. Probablement pour des raisons stériques, cette activation était totalement étouffée.



**Figure 58** : Modification de la position 4

La suppression de la fonction cétone augmentait drastiquement la constante d'inhibition et conduisait à des mauvais inhibiteurs (composés **76** et **77**,  $K_I = 90'400 \mu\text{M}$  resp.  $K_I = 55'100 \mu\text{M}$ ). Le remplacement de cette fonction cétone par d'autres groupes fonctionnels comme un sulfoxyde (**62**), un alcool (**75**) ou une hydroxylamine (**74**) donnait également de mauvais inhibiteurs. Ce groupe carbonyle en position 4 jouait donc un rôle très important au niveau de la reconnaissance du substrat au site A de l'enzyme et devenait par conséquent irremplaçable.



**Figure 59** : Modification de la position 5

Le substrat naturel (ALA, **1**) était reconnu au site A avec une constante " $K_I = 50 \mu\text{M}$ ". La présence d'un groupe méthyle en position 5 accroissait cette constante d'un facteur 20 (composé **27**,  $K_I = 1'100 \mu\text{M}$ ); cette augmentation était probablement le résultat d'effets stériques. Il était intéressant, par contre, de comparer ce composé **27** à l'acide lévulinique (**24**). En effet, la présence de la fonction amine du composé **27** diminuait de moitié la constante d'inhibition par rapport à l'acide lévulinique (**24**). Cette fonction amine,

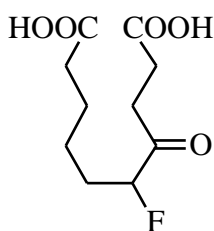
probablement via des interactions du type ponts d'hydrogène, stabilisait l'inhibiteur au niveau du site A et même la présence d'un groupe méthyle perturbateur n'était pas suffisante pour annihiler totalement cette stabilisation.

La fonction amine en position 5, même si elle était décrite comme faiblement contributive par rapport à la fonction cétone en position 4 ou carboxylate en position 1 <sup>[93]</sup>, permettait d'ancrer le substrat naturel au site A de l'enzyme via probablement des ponts d'hydrogène. Afin de mieux comprendre la reconnaissance enzymatique de cette fonction amine, divers groupes furent introduits : méthoxy (**55**), fluoro (**84**), hydrogène (**24**), hydroxy (**79**), oxime (**80**), carboxylate (**81**), cyano (**82**), nitro (**83**) et méthylsulfo (**78**). Il est important de constater qu'aucun de ces groupes fonctionnels ne remplaçait de manière efficace le groupe amino, à part le groupe fluoro, car tous présentaient une affinité pour le site A de l'enzyme moins importante que le substrat naturel.

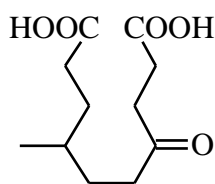
Une des premières analyses considérées était que le zinc présent au site A servait de pince afin d'ancrer le substrat. Aux vues des résultats obtenus, il était clair que ce rôle du zinc devait être mis de côté, car si l'on considérait l'analogue 5-fluoro de l'ALA (**84**), la présence du groupe fluoro aurait dû conduire à un inhibiteur extrêmement faible, vu que le fluor ne se coordonnait pas au zinc, et ce n'était pas le cas. Les rayons X mirent en évidence la formation d'une base de Schiff entre le substrat et une lysine de l'enzyme au site A <sup>[52]</sup> <sup>[55]</sup>. Dans cette optique, la présence d'un groupe électro-attracteur en de la cétone augmentait l'électrophilie du carbone et favorisait l'attaque du nucléophile, qui était, dans notre cas, la lysine. Cette possibilité retient actuellement toute notre attention.

Le composé difluoré **63** était six fois moins bien reconnu que le monofluoré **84**. Si l'on comparait le composé **85** au composé **84**, on se rendait compte que la modification de la fonction carboxylate en fonction ester augmentait d'un facteur 8 la constante d'inhibition; si on appliquait le même facteur 8 sur le composé **63** (ester), on obtenait une constante d'inhibition de 75  $\mu$ M pour le composé acide. Dans ces conditions, le composé difluoro (acide) était un peu mieux reconnu que le composé monofluoré **84**. Le composé trifluoré **86** montrait un comportement slow binder; il interagissait donc au site P de l'enzyme. Cet inhibiteur **86** pouvait stabiliser la forme iminium de la base de Schiff ou une forme carbinolamine.

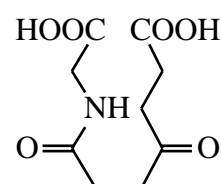
#### 4.8.8 Les composés diacides



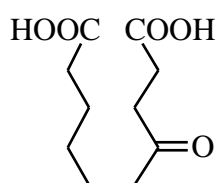
**69**  
Irréversible



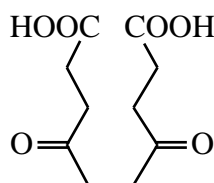
**70**  
Comp.  
11'280  $\mu$ M



**71**  
Irréversible



**25**  
Irréversible



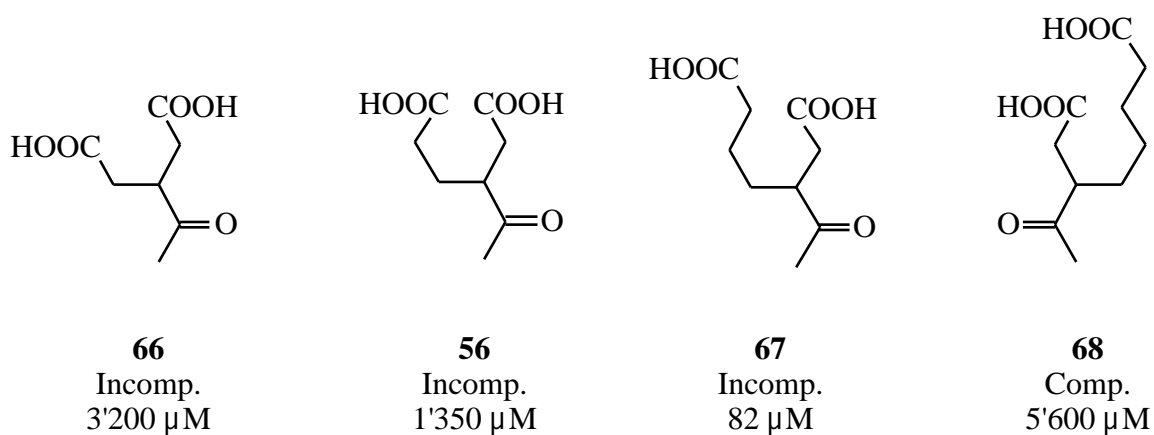
**26**  
Irréversible

**Figure 60** : Diacides C10

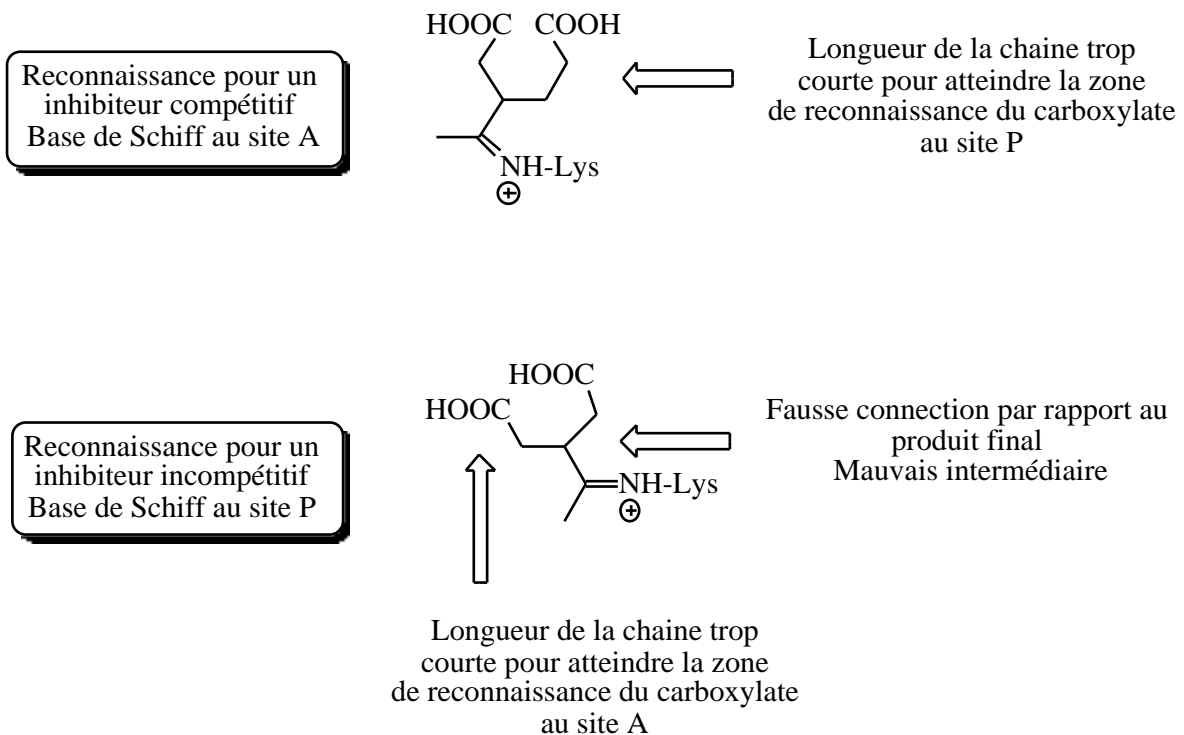
Les diacides C10 étaient des analogues de l'intermédiaire postulé dans le mécanisme *Jordan I*. L'acide 4,7-dioxosébacique (**26**) était un inhibiteur irréversible présentant quatre points de reconnaissance avec l'enzyme : les deux fonctions cétones et les deux fonctions carboxylates. Une fois au site actif, cet inhibiteur désactivait presque totalement l'enzyme. Il ne restait que 2 % de l'activité originale après 72 h de dialyse. L'introduction d'une fonction amide (composé **71**) au site A permettait tout de même de conserver une inhibition irréversible, mais après une dialyse de 72 h, 66 % de l'activité était récupéré. Une idée de l'importance de la gêne introduite par la fonction amide au site A était obtenue en comparant le composé **71** à l'acide 4-oxosébacique (**25**) où la fonction cétone avait été supprimée. L'acide 4-oxosébacique (**25**) inhibait encore d'environ 80 % l'activité de l'enzyme après une dialyse de 72 h. Sous les mêmes conditions, en présence du composé **71**, l'activité de la PBGS était encore de 66 %. Le remplacement de la fonction cétone par une fonction amide au site A n'était pas aussi contraignant que la suppression totale de cette fonction cétone. La présence de l'amide désactivait partiellement l'électrophilie du carbone et rendait celui-ci moins favorable pour une attaque nucléophile. Le remplacement de la fonction cétone par un

groupe méthyle était désastreux. Le composé **70** présentait une inhibition compétitive avec une constante  $K_I = 11'280 \mu\text{M}$ . Le composé **69** montrait trois points d'ancrage de l'inhibiteur au site actif de l'enzyme, mais la présence du groupe fluoro stabilisait l'imine une fois formée, ce qui permettait d'obtenir un inhibiteur irréversible extrêmement efficace.

La série de diacides testés, soit présentés ici soit discutés dans la thèse de Caroline Engeloch-Jarret <sup>[90]</sup> s'identifiaient avec l'intermédiaire-clef postulé dans le mécanisme *Jordan I*. Afin de discriminer entre les divers mécanismes proposés, il était important de tester des inhibiteurs qui imitaient l'intermédiaire-clef postulé dans le mécanisme *Jordan II/Shemin*. Les diacides présentés dans la figure 61 possédaient une fonction acétyle en d'un des acides carboxyliques et furent synthétisés dans l'optique décrite ci-dessus.



**Figure 61** : Diacides ramifiés



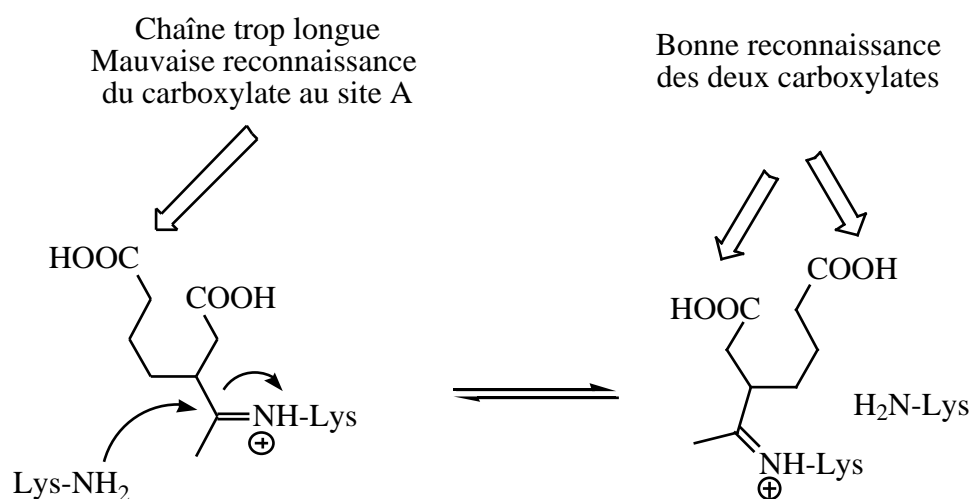
**Figure 62** : Reconnaissance des diacides ramifiés au site actif de l'enzyme

Les inhibiteurs **56**, **66**, **67** et **68** interagissaient au site actif de l'enzyme soit de manière compétitive soit de manière incompétitive et cette interaction pouvait être schématisée comme dans la figure 62 pour le composé **66**. Pour analyser les types de comportement obtenus ainsi que les  $K_I$  observés, il fallait tenir compte de deux aspects :

- si l'inhibiteur interagissait au site A de l'enzyme (dans ce cas de figure, l'inhibiteur était un analogue du substrat), la longueur de la chaîne séparant les deux fonctions carboxylates étaient importantes afin de permettre aux deux fonctions carboxylates d'atteindre leurs sites de reconnaissance respectifs
- si l'inhibition avait lieu dans le site P de l'enzyme, la connexion de la partie acétyle était erronée par rapport au produit final désiré et de plus, comme dans le cas d'un inhibiteur compétitif, la longueur de la chaîne séparant les deux fonctions carboxylates étaient importantes afin de permettre aux deux fonctions carboxylates d'atteindre leurs sites de reconnaissance respectifs

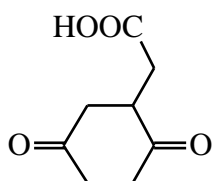
Les composés **56**, **66** et **68** possédaient des  $K_I$  d'un ordre de grandeur comparable et les différences d'un facteur 2 à 4 dans les valeurs rencontrées pouvaient probablement

s'expliquer par une modification du réseau de ponts d'hydrogène entourant l'inhibiteur au site actif de l'enzyme. Les variations du type d'inhibition étaient probablement concomitantes à la longueur de la chaîne entre les deux fonctions carboxylates et l'inhibiteur s'installait soit au site A soit au site P de manière à minimiser les problèmes stériques dus à une chaîne trop longue et de manière à rechercher les meilleures interactions pour les fonctions carboxylates dans leurs sites de reconnaissance respectifs lorsque la chaîne était trop courte. Le composé **67** est un inhibiteur très intéressant; en effet, il présentait une très bonne constante d'inhibition ( $K_I = 82 \mu\text{M}$ ). On pouvait envisager que ce composé **67** était tout d'abord reconnu au site P de l'enzyme, ce qui pouvait justifier son comportement incompétitif (voir figure 63). Dans ce cas de figure, le carboxylate au niveau du site A ne présentait pas une reconnaissance idéale, car la chaîne était trop longue. Il pouvait s'ensuivre une transamination par attaque de la seconde lysine (celle présente au site A) et peut-être une rotation au niveau du carbone C(3). Le composé se trouvait lié au niveau du site A et dans ce cas de figure, les deux groupes carboxylates étaient parfaitement reconnus dans leur site respectif. Il pouvait s'installer une sorte d'équilibre entre les deux cas de figure. Il est important de signaler que ce composé **67** est un diacide à 7 carbones, comme dans le cas de l'intermédiaire *Jordan II*, et que dans le deuxième de cas de figure, le système diacide est parfaitement aligné sur le site actif de l'enzyme.

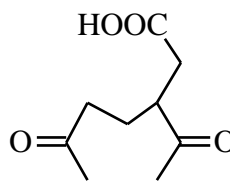


**Figure 63** : Proposition du mécanisme de reconnaissance de l'inhibiteur **67**

#### 4.8.9 Les dérivés ramifiés



**64**  
Comp./mixte  
9'400  $\mu\text{M}$



**65**  
Comp./mixte  
11'780  $\mu\text{M}$

**Figure 64** : Composés monoacides ramifiés

Ces deux composés **64** et **65** étaient intéressants, car on pouvait les envisager formant une double base de Schiff au site actif. Il est clair, aux vues des rayons X, que les deux lysines, catalytiquement importantes au site actif de l'enzyme, se trouvent dans des plans parallèles; il était donc impossible à ces deux inhibiteurs de pouvoir former cette double base de Schiff sans infliger une contrainte stérique considérable à tout le système. Ils interagissaient donc simplement comme analogues de substrat, sans pour autant avoir une très bonne reconnaissance : peut-être une gêne stérique due à la ramification.

## **4.9 Inhibition studies of the enzyme porphobilinogen synthase (PBGs) isolated from *E. coli* using $\beta$ -diketones as recognition elements**

Eleonora Homberger-Zizzari, Caroline Engeloch-Jarret, Frédéric Stauffer, Matthias Henz, Thomas Engeloch, Peter Schürmann and Reinhard Neier\*

Department of chemistry, faculty of science, University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, Case postale 2, 2007 Neuchâtel

Tel : 032/718.24.28

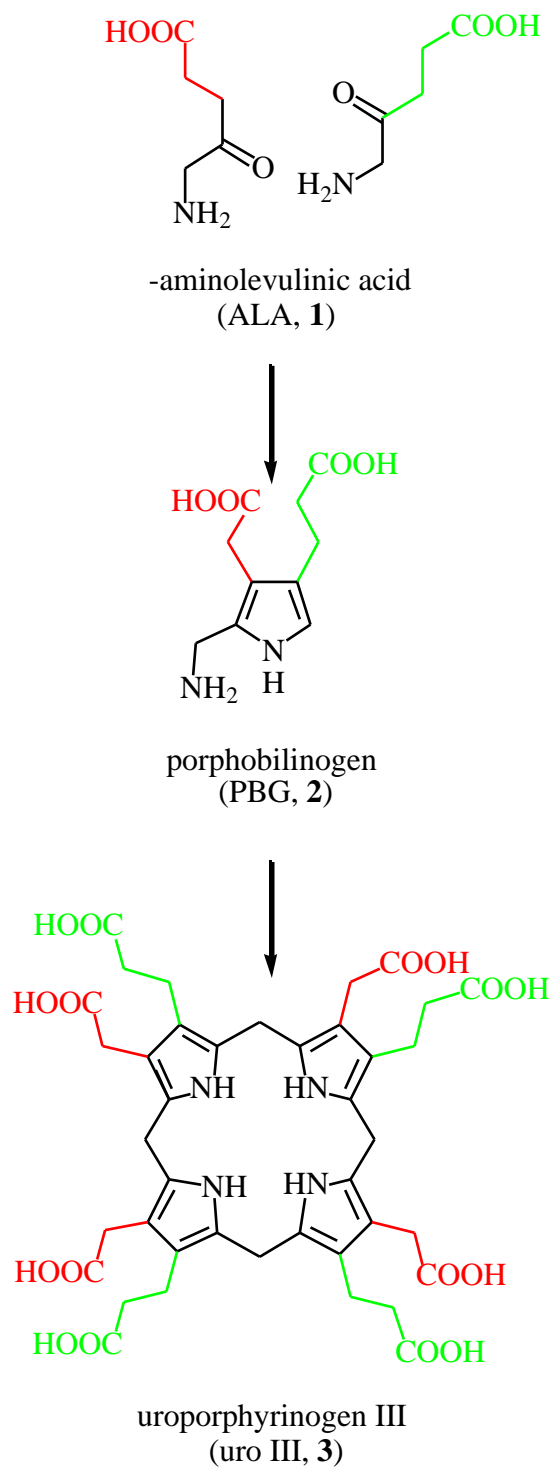
Fax : 032/718.25.11

E-mail : reinhard.neier@unine.ch

**Will be submitted to Helvetica Chimica Acta**

### **4.9.1 Introduction**

The tetrapyrrolic pigments of life are biosynthesized in a highly convergent way starting from amino levulinic acid (ALA, **1**) [1]. Condensation of this first dedicated intermediate leads to the reactive porphobilinogen (PBG, **2**) and then in a two-step process to the common precursor of all pigments of life, uroporphyrinogen III (Uro III, **3**) (see scheme 1) [2-8]. The elegance of this biosynthesis and the importance of these tetrapyrroles have attracted the interest of chemists and biologists over many years. The step leading from 5-aminolevulinic acid (ALA, **1**) to PBG (**2**) is deceptively simple and resembles structurally to a classic heterocyclic synthesis, the Knorr pyrrole synthesis. However, the chemical condensation of ALA (**1**) leads to a symmetric pyrazine instead of forming a pyrrole [9]. The only successful formation of PBG (**2**) from ALA (**1**) reported uses Amberlite TR45 as catalyst [9-10]. In contrast, the structurally more complicated tetramerisation of PBG (**2**) to Uro III (**3**) could be achieved easily by heating under acidic conditions [11]. The efficiency of the retrosynthetic approach used by the biosynthetic process combined with several chemical and biological observations have given rise to the idea that the pigments of life should belong to a collection of "natural products" already present in prebiotic times [12]. If tetrapyrroles resembling today's pigments of life should have been formed during prebiotic periods, an or several pathways to these structures should be detectable under appropriate chemical conditions. The comparison of such hypothetical prebiotic pathways with today's chemical processes should lead to important informations about the prebiotic evolution [13-17].



**Scheme 1** : Biosynthesis of uroporphyrinogen III (3)

The enzyme, porphobilinogen synthase (PBGS or 5-aminolevulinic acid dehydratase, ALAD, EC 4.2.1.24) responsible for the formation of porphobilinogen (2), has been detected in many classes of organisms [18]. At the end of 1997, the first X-ray structure of PBGS isolated from yeast has been published [19]. Since this first publication, structures of PBGS from two other sources (*E. coli*, *P. aeruginosa*) and the 3D-structures of several enzyme-inhibitor complexes have been reported [20-26]. The determination of the X-ray structures has confirmed certain mechanistic ideas obtained by biochemical studies. On top of the confirmation of the biochemical results, the crystal structures enlarged our knowledge of the precise nature of the active site considerably (see table 1).

<b>Knowledge acquired from biochemical studies</b>	<b>Knowledge confirmed and acquired from X-ray structures</b>	<b>Importance for the postulated mechanism</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Octamer</li> <li>• Half-site reactivity</li>   <li>• Zn<sup>2+</sup> coordinated to three Cys</li>   <li>• Recognition at the P site first</li> <li>• Formation of a Schiff base with the Lys247</li> <li>--</li> <li>--</li> <li>--</li> <li>--</li> <li>--</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Octamer</li> <li>• Evidence for half-site reactivity in <i>P. aeruginosa</i></li> <li>• Zn<sup>2+</sup> coordinated to three Cys</li>   <li>• Recognition at the P site first</li> <li>• Formation of a Schiff base with the Lys247</li> <li>• Eight independent sites in <i>E. coli</i> and <i>S. cerevisiae</i></li> <li>• Lid</li>   <li>• Mg<sup>2+</sup> coordinated to two Asp in <i>P. aeruginosa</i></li> <li>• Recognition of the P and A side carboxylate</li> <li>• Presence of a second important lysine (Lys195)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unknown</li> <li>• Unknown</li>   <li>• Structural</li> <li>• May be catalytic (Lewis acid, Zn-OH as a Bronsted base)</li> <li>• Sequence</li>   <li>• Activation of the C(4) of the first ALA</li> <li>• Unknown</li>   <li>• Sequestering of the active site</li> <li>• Regulation</li>   <li>• Docking and alignment of the two substrates</li> <li>• Adjustment of the pH or recognition of the second substrate</li> </ul>

**Table 1 :** Mechanistic interpretation of the biochemical and structural information obtained so far

All PBGS carefully studied so far have an octameric structure composed of a tetramer of dimers [27-28]. The results of labelling studies with low concentration  $^{14}\text{C}$ -5-aminolevulinate were interpreted as a consequence of half-site reactivity of PBGS[2]. Several biochemical studies using techniques as different as immobilising PBGS, trapping with  $\text{NaBH}_4$  the active site Schiff base formed with the natural substrate [28-31] and studying the enzyme activity using the holo-enzyme, the apo-enzyme and an enzyme modified with MMTS (methylmethanethiosulfate) [32] have all been interpreted as hinting towards half-site reactivity. However, the X-ray structures of the enzyme isolated from yeast and *E. coli* clearly showed that the active site of all the monomers were completely accessible from the outside. In the structures of these enzymes co-crystallised with levulinate as inhibitor all the eight sites per enzyme are occupied [21-23]. The only case where the X-ray structures gave a hint of the half-site reactivity is the structure reported for *P. aeruginosa* [25]. The communication between the two dimers is due to the presence of a  $\text{Mg}^{2+}$  cation at the interface between the two monomers. The presence of this metal cation induces a change in a hydrogen-bonding network which influences the arrangement of the amino acid side chains at the active site responsible for the recognition of the A side carboxylate. An impressive series of biochemical studies of the influence of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on the activity of PBGS have been reported [33]. The ligands responsible for the complex formation to the zinc had been identified by biochemical studies alone [34]. The X-ray structures confirmed these findings and allowed to describe the coordination sphere precisely. Kinetic studies of the influence of  $\text{Mg}^{2+}$  clearly demonstrated the importance of this cation on the activity of certain PBGS [19]. An unequivocal interpretation of this influence was difficult before the availability of the crystal structures of *P. aeruginosa* [25]. A highly elegant pulse labelling experiment demonstrated that the first ALA (**1**) recognized at the active site of PBGS will form the propionic acid side chain of PBG (**2**) [35]. This biochemical result was beautifully reconfirmed by the structure determinations of inhibitor-enzyme complexes using levulinic acid [21-23]. In all three enzymes, the levulinic acid is clearly bound to the P site of the enzyme. Historically, one of the first results obtained has been the identification of an active site lysine and its role in forming a Schiff base to ALA (**1**) [36-37].

The determination of the X-ray structures has not only confirmed many of the aspects determined by biochemical methods (octamer, half-site reactivity, Zn-finger near the active site, P site recognition first), but has allowed to determine details of the active site which had not been discovered before. The comparison of the structures of the empty enzymes

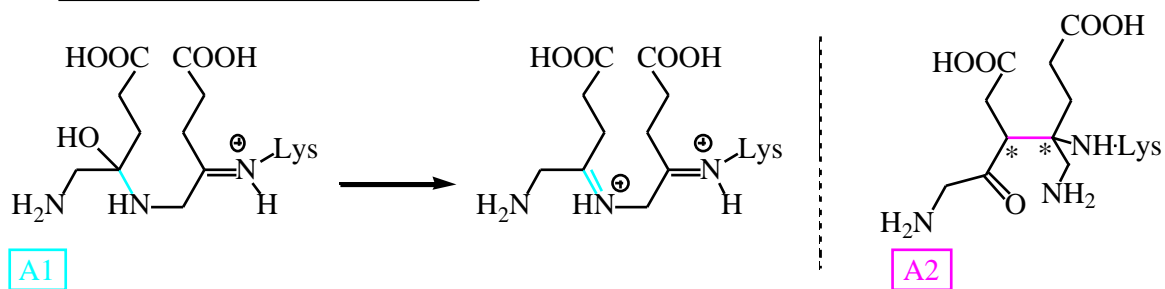
with the structures of the enzyme-inhibitor complexes allowed identifying a lid region, which covers the active site as soon as a molecule (inhibitor or substrate) is bound to the P site [21-23]. As long as the active site is empty, the lid region is less structured and the access to the active site from the solvent is free. The inhibitor-enzyme complexes not only showed the Schiff base responsible for the covalent binding of the substrate at the P site, but allowed the identification of at least two amino acids responsible for the recognition of the P side carboxylate of the substrate. The biggest surprise, however, was the presence of a second lysine at the active site. This lysine had not been identified by biochemical methods before. As soon as the presence of this lysine had been detected, point mutation allowed demonstrating that this second lysine is crucial for the activity of PBGS.

Despite the impressive efforts to study PBGS and its mechanism, many important questions are still open. The availability of crystal structures has allowed us to identify the side chains responsible for the recognition of the P side substrate (Ser273 and Tyr312, the *E. coli* amino acid numbering). However, only recently structures became available which identified the amino acid responsible for the recognition of the A side substrate [24, 26]. More importantly no unequivocal picture for the chemical transformations involved in the enzyme-catalysed mechanism has emerged so far. Especially the role of the second lysine has not been clearly demonstrated.

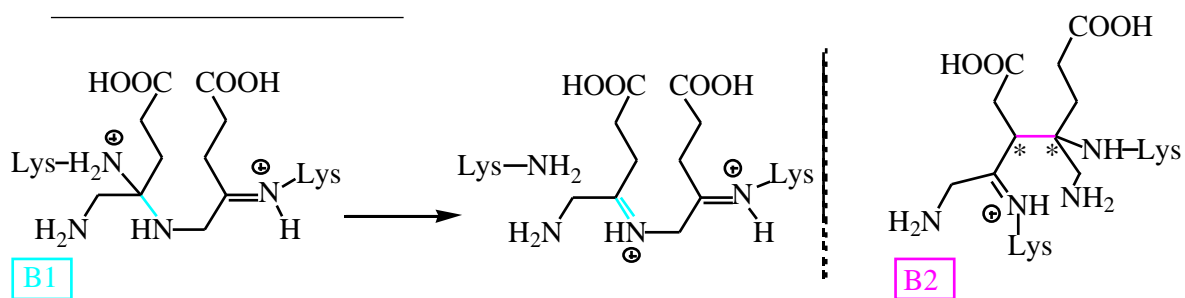
The enzyme catalysed transformation of two molecules of ALA (**1**) to PBG (**2**) is composed of many individual chemical steps. A number of pathways can be postulated and even today the experimental facts are not sufficient to deduce the exact mechanism. In order to circumvent this difficulty, it has been proposed to concentrate the analysis on the transformation of the substrate molecules alone. This approach provides a framework for the chemical analysis of the sequence of events. Postulating that the reaction, which will connect the two substrates for the first time, will be a key step in the enzymatic transformation, the different mechanistic proposals can be categorized [18, 38-39]. A priori, the A side or the P side substrate could form a Schiff base or both substrates could simultaneously form a Schiff base with the enzyme. The bond formation between the two substrates could be either the formation of a carbon-nitrogen bond (hemi-aminal or imine formation) or a C-C bond formation (aldol-like process) (see scheme 2). This analysis leads to six possible key intermediates (see scheme 2). Shemin proposed his first mechanism in 1968 drawing a close analogy between PBGS and class I aldolase (see scheme 2 C2) [36]. The postulated Schiff base to the A side ALA (**1**) only, followed by an aldol-like process

using the enamine tautomer as nucleophile. Twelve years later, Jordan postulated that the formation of the C-N bond occurs first (see scheme 2 A1) [35]. Based on the results of his elegant pulse labelling experiment, he had been able to show that the P side substrate forms the (first) Schiff base to the enzyme. Already in his early publication, he included the possibility of the double Schiff bond formation. Jordan draw an X at the position of the keto function of the A side substrate (see scheme 3 B) [35, 40]. This way of writing covers both possibilities A1 and B1 of the scheme 2 if imine formation is assumed as first step (compare scheme 2 and 3).

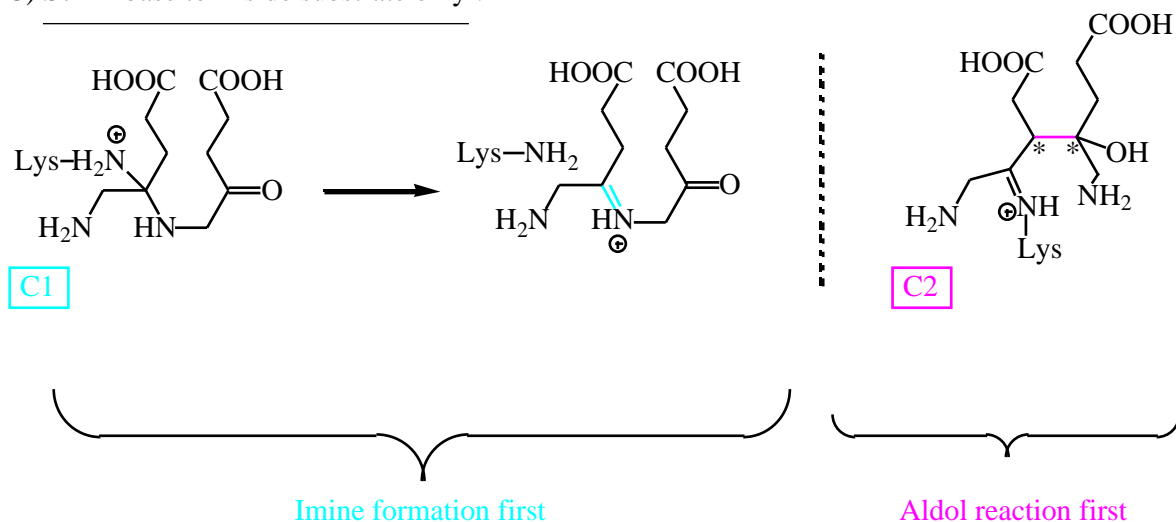
A) Schiff base to P side substrate only :



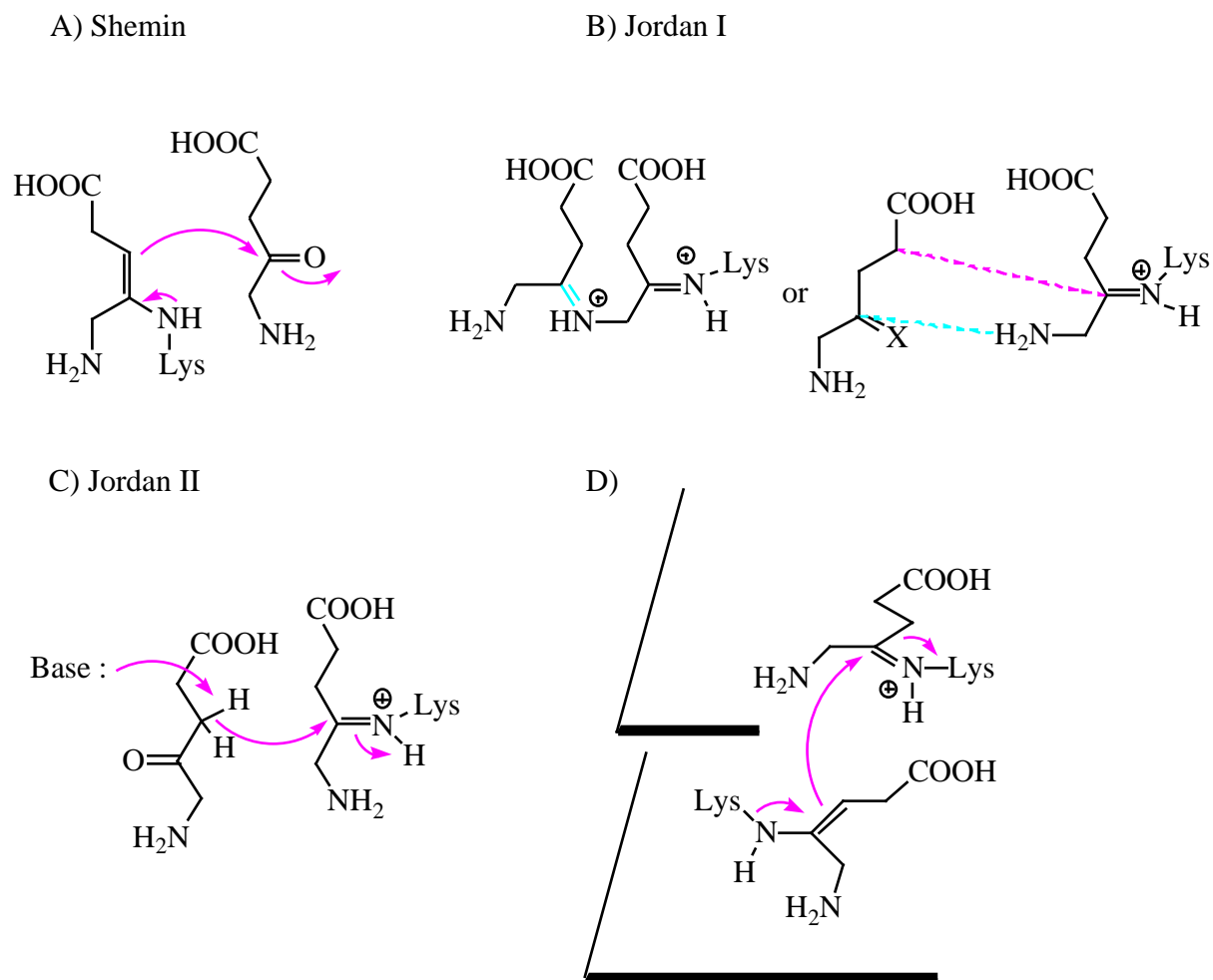
B) Schiff base to both substrates :



C) Schiff base to A side substrate only :



**Scheme 3 :** Postulated key intermediates. A) The initial proposal by Shemin based on the analogy to class I aldolase. B) First proposal by Jordan based on the results of the pulse labelling experiments (Jordan I). C) Second proposal by Jordan (Jordan II). D) Proposal assuming a bis-Schiff base



**Scheme 2** : Theoretically possible key intermediates. The formulas represent the six theoretically possible key intermediates, where the two substrates are bound for the first times together. The key intermediates are arranged according to the site(s) of the Schiff base formation and according to the sort of the bound formed first : A) Schiff base to the P side substrate; B) Schiff bases to both substrates; C) Schiff base to the A side substrate. The proposal C) is only of historical importance, because of the results of the pulse labelling experiments reported by Jordan. The key intermediates, where the C-N bound is formed first, are represented by two formula, the hemi-aminal respectively the aminal structures and the corresponding iminium structure. The assumption is that the transformation to the iminium structures should be fast. The two structures have been included in this scheme in order to make the comparison between the "imine pathway" and the "aldol pathway" more evident. No indication of the relative or the absolute configuration of the key intermediates is given. It is however assumed that a stereochemical unique pathway will be followed. The protonation state of the key intermediates has been drawn, so that they are compatible with an enzyme working around neutral pH and with the postulated reaction mechanism. However, it is clear that the enzyme surface at the active site

will provide a local pH environment that could and will change the protonation state of individual functional groups. The protonation state of neighbouring functional groups will also influence the pKa-value. The 5-amino group of both substrates has been written in their unprotonated state, because they are in close neighbourhood to the protonated Schiff base or to the iminium group respectively

Jordan postulated in 1991 a mechanism where the A side substrate as enol or as enolate forms the C-C bond via an aldol process (Jordan II, see scheme 3 C) [3, 41]. Finally, in 1996, a mechanism where both substrates are bound as Schiff base and an aldol-like process is the key step has been postulated (see scheme 3 D). This tentative mechanism was based on the assumption of a minimal functional dimer of PBGS where the active sites of two subunits would collaborate [18, 42].

Recent X-ray structures of PBGS co-crystallized with different tailor-made inhibitors has added important information about the mechanism of this enzyme. The irreversible inhibitor 4-oxosebacic acid and 4,7-dioxosebacic acid have been crystallized using PBGS isolated from yeast and from *E. coli* [24, 26]. These inhibitors were initially planned to imitate the intermediate postulated in the Jordan I mechanism (see scheme 3 B). The X-ray structures of the co-crystals provided a well-defined picture of the interaction of both substrate molecules with the corresponding amino acids located at the active site. The most surprising result was the finding that the 4,7-dioxosebacic acid forms a Schiff base as well with Lys247 and as well with Lys195. It has been known that the P side substrate forms the Schiff base with the Lys247. However before the determination of the X-ray structures of the co-crystals with 4,7-dioxosebacic acid, the role of the second lysine at the active site was postulated to adjust the pH. The presence of this double Schiff base in the co-crystals with 4,7-dioxosebacic acid can be the consequence of the irreversible trapping of the inhibitor in a process leading to a dead-end. The alternative interpretation is that this double Schiff base functions as an analogue of a bisubstrate and a mechanism based on this hypothesis can be proposed.

It is well known that the accumulation of the succinylacetone (**4**) due to a defect in the degradation of tyrosine leads to a strong irreversible inhibition of PBGS. The illness due to this defect is called tyrosinemia and has severe effects on the patients [43-44]. The medical importance of tyrosinemia and the possibility to study the interaction between b-diketons and the active site of PBGS with the help of UV/VIS spectroscopy leads us to a systematic study of the inhibition behaviour of a series of specifically synthesised b-diketones [45-48].

In order to characterize the structure and conformation of the enzyme-inhibitor complexes, the UV/VIS spectra of PBGS incubated with succinylacetone (**4**) were studied and the constant of the complex formation was determined from these data.

#### **4.9.2 Results and discussion**

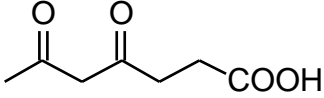
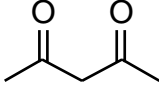
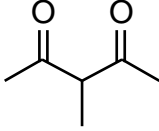
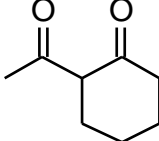
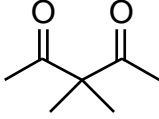
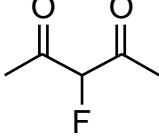
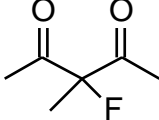
Succinylacetone (**4**) was described in the literature as the most efficient inhibitor for the PBGS. This compound is the prototypical  $\alpha$ -diketon used in our studies. Succinylacetone (**4**) shows slow binding with PBGS isolated from *E.coli*. With a concentration of 2.5  $\mu$ M, the enzymatic activity falls down to 42 % after 30 min and after 90 min we have only 24 % of the activity. A 70 h dialysis has permitted to recover 41 % of the activity (activity before dialysis : 9 %, activity at 70 h dialysis : 50 %). The slow binding of succinylacetone (**4**) has been interpreted as the consequence of the formation of a vinylogous amide between the  $\alpha$ -diketon and the lysine positioned at the P site of PBGS.

In order to confirm the formation of this vinylogous amide between 1,3-diketones and the active site lysine of PBGS, we tested analogues of succinylacetone (**4**). Various factors susceptible to influence the inhibition and the ease of formation of the vinylogous amides were examined. We varied steric factors and electronic factors; we checked the importance of the carboxylate group as well as the influence of the carbon backbone on the inhibition of the enzyme.

Many of the diketons tested were slow tight binders. The process which lead to the tight binding took often many hours (see below). In view of the slowness of the tight binding compared to the rates of formation of the Michaelis complex of these compounds, the reversible fast formation of the Michaelis complex to the active site of the enzyme could often be separated from the slow tight binding process. Using our standard conditions, inhibition experiments could be performed reproducibly and inhibition constants could be determined from the values obtained. However, the values obtained for the inhibition constants reported in the tables depend on the preincubation time and therefore comparison between these values should only be done with great caution.

To determine the importance of carboxylate on the recognition at the active site, the compounds indicated in the table 2 were tested. Acetylacetone (**5**) lacks the carboxylate

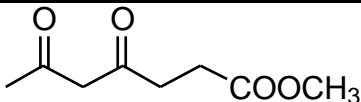
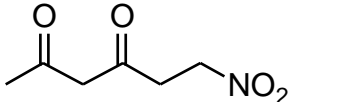
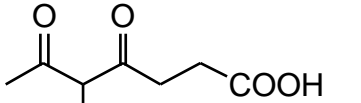
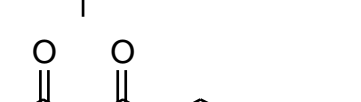
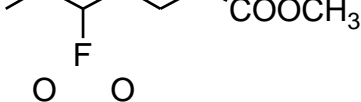
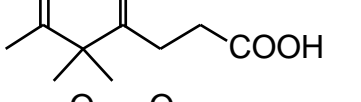
group, but still is a moderate inhibitor of PBGS. The inhibition constant is in the millimolar range. Subsequent tests showed that **5** is a slow binder. This behaviour is compatible with a strong but non-specific binding to the enzyme active site, via a Schiff base to one of the carbonyl first and the transformation to the vinylogous amide second. Introducing an additional methyl group at the central carbon atom (compound **6**), the inhibition behaviour is still slow binding, however the strength of the complex formed between the inhibitor **6** and the enzyme active site is at least four factors of ten smaller than the interaction observed with succinylacetone (**4**); a concentration of almost 20 mM are necessary to observe the slow binding behaviour. Introducing a  $\beta$ -diketon with a more bulky substituent, acetylcylohexanone (**7**), yields once again a slow binder with a efficiency similar to acetylacetone (**5**). Introducing two methyl groups at the central carbon atom (compound **8**) changed considerably the inhibition behaviour; it is obvious that the vinylogous amide is not any more accessible starting from the Schiff base formed with the lysine at the enzyme active site. The inhibition constant is almost a factor of ten bigger; the behaviour is uncompetitive. We can not unequivocally attribute the decrease in inhibition efficiency to one factor alone. It is clear that the vinylogous amide can not be formed, but the steric hindrance at the quaternary centre is also playing a role in reducing the binding constant. An interesting result, in this respect, is obtained by comparing the inhibition of the monofluoro compound **9**, and the monofluoro monomethyl compound **10**. Introducing the fluorine substituent should introduce minor steric hindrance, but should increase the reactivity of the  $\beta$ -diketone. This is exactly what can be observed when the inhibition results of the monomethyl compound **6** and the monofluoro compound **9** are compared. Both inhibitors are slow binder, but the monofluoro compound **9** is roughly three times more active. However, comparing the dimethyl compound **8** with the monomethyl monofluoro compound **10**, the observed change in the inhibition potential can not be explained based on electronic reason alone. The compound **8** is two times better recognized than the compound **10** ( $K_I = 31'000 \mu\text{M}$ ,  $K_I = 70'000 \mu\text{M}$ ). The replacement of one of the methyl groups in the compound **8** has not increased the inhibition potential.

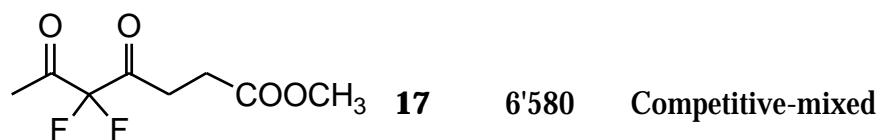
Compound	$K_I$ [ $\mu\text{M}$ ] (*)	Inhibition type	Concentration [mM]	Activity 30 min 90 min	
	<b>4</b>	1.4	Slow binder	0.0025	42% 24%
	<b>5</b>	3'680	Slow binder		
	<b>6</b>	-	Slow binder Rac	16	90% 82%
	<b>7</b>	5'520	Slow binder Rac		
	<b>8</b>	31'000	Uncompetitive- mixed		
	<b>9</b>	-	Slow binder Rac	6.86	92% 72%
	<b>10</b>	70'000	Uncompetitive- mixed		

**Table 2 :** \*The values for  $K_I$  for the slow binder **5** and **7** were obtained under standard conditions and are indicative for the formation of the Michaelis complex before the fixation which leads to slow binding

Molecules containing only a  $\beta$ -diketo function are moderately well recognized by the active site and lead to uncompetitive and slow binding inhibition. When the diketo function is joined to a  $\gamma$ -keto carboxylic acid carbon chain, highly effective inhibition can be observed. Steric hindrance at the diketo functionality is tolerated and the inhibition potential is maintained as long as the Schiff base formed with the lysine at the active site can be transformed into the tautomeric vinylogous amide. The activity of these compounds is increased when the electrophilicity of the carbonyl function is strengthened by the introduction of a fluorine substituent.

Based on these results, we tested the importance of the carboxylate, for the recognition, by changing the carboxylic acid to its methylester **11** and to the corresponding nitro compound **12** (see table 3). The nitro compound **12** had an inhibition constant of 15  $\mu\text{M}$  that is within one factor of ten of the concentration used for the slow binding with succinylacetone (**4**). This is an indication that the enzyme is tolerating the nitro substituent as replacement for the carboxylate. All three compounds **4**, **11** and **12** are in NMR solution mainly present in their enol form (ratio : enol to diketone = 3:1, 3:1, 4:1). Under the slightly basic condition of the inhibition test, the deprotonation of the enol form and of the methylene to the nitro group have probably very similar pKa (  $\text{pK}_a$  (acetylacetone) = 8.9,  $\text{pK}_a$  (nitrobutanone) = 8.05). The nitronate form is electronically and sterically very similar to the carboxylate and it is therefore probable that the nitro derivatives are recognized by the enzyme in their deprotonated forms. If the nitronate should really be the form of the compound **12** recognized by the enzyme active site the  $K_i$  observed would be too high.

Compound	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] (*)	Inhibition type	Concentration [mM]	Activity 30 min 90 min
 <b>11</b>	319	Slow binder		
 <b>12</b>	15	Uncompetitive-mixed		
 <b>13</b>	-	Slow binder Rac	0.077	75% 58%
 <b>14</b>	-	Slow binder Rac	1.32	65% 42%
 <b>15</b>	54'500	Competitive-mixed		
 <b>16</b>	50'200	Competitive-mixed		



**Table 3 :** \* The value for  $K_I$  for the slow binder **11** is obtained under standard conditions and is indicative for the formation of the Michaelis complex before the fixation which leads to slow binding

The ester **11** is a slow binder. The value of  $K_I$  obtained under standard conditions can therefore not directly be compared with the  $K_I$  values of other competitive inhibitors. The presence of a negative charge associated with the carboxylate is certainly necessary for a good recognition at the active site. The difference between the methylester and the carboxylate has already been observed for the substrate analogues. Pure substrate analogues inevitably show competitive inhibition. For the substrate analogues, the sequence of the inhibition potential has been : nitro analogue  $\gg$  carboxylate  $\gg$  methylester. The competitive inhibition of substrate analogues has been attributed to the competition between substrate and inhibitor only for the A site of the enzyme [38]. All our diketone inhibitors show either slow binding or uncompetitive inhibition. This indicates that these compounds interact (preferentially) with the P site of the enzyme. In contrast to the sequence of inhibition potential observed for substrate analogues, the diketones **4**, **11** and **12** are interacting according to the following sequence : carboxylate **4**  $\gg$  methylester **11**  $\gg$  nitro **12**. This observation is compatible with the interpretation that we observe a different recognition mechanism for inhibitors using diketones as structural motive. This change is in accordance with the hypothesis that the inhibition results of diketones are mainly due to their interaction with the P site, whereas substrate analogues exclusively interact with A site.

As with simple diketones, we tested the influence of introducing steric hindrance at the central carbon atom of the diketo function. Introduction of a methyl group (compound **13**) or a fluoro substituent (compound **14**) led to inhibitors, which show slow binding. The methyl substituted inhibitor **13** need almost 80  $\mu$ M concentration to reach similar inhibition as could be obtained for succinylacetone (**4**) where 2  $\mu$ M concentration was used. The interaction with the active site is a factor 30 less efficient when the additional methyl group is introduced. The equilibrium constant between the diketo form and the enol form is 70:30 in favour of the diketone, whereas in succinylacetone (**4**) only 25 % are present in the diketo form. Assuming that the equilibrium between the diketone and the enol form is fast,

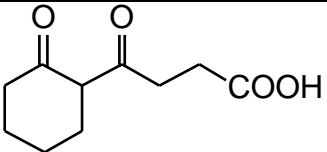
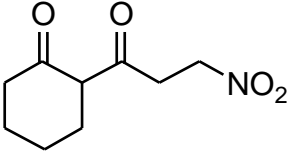
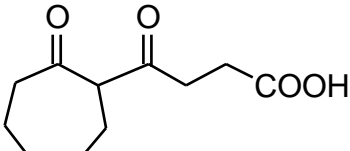
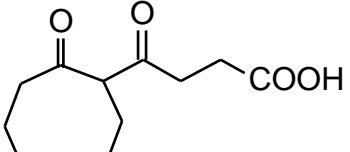
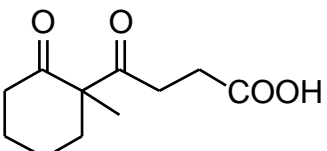
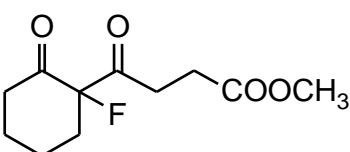
this difference in the equilibrium constant should not be the only reason for the difference in the inhibition potential. The most probable hypothesis would attribute the difference in the inhibition potency to the increased steric hindrance. For the fluoro compound **14**, our trials to hydrolyse the ester were not successful; we therefore tested the ester that showed slow binding behaviour, but only at millimolar concentration. This inhibition needs concentrations that are a factor 500 bigger than the one used for succinylacetone (**4**) and a factor 20 bigger than the monomethyl compound **13**. The inhibition behaviour of the unsubstituted methyl ester **11** and of the monofluoro methylester **14** is slow binding. The concentration needed for diminishing the activity of the enzyme is smaller for the compound **11** than for the compound **14**. This comparison shows that the inhibition with the monofluoro compound **14** is also subject to steric hindrance.

The introduction of two substituents renders the deprotonation at the central carbon atom impossible and will prevent the formation of the vinylogous amid. The strength of the inhibition should be considerably reduced (increase of  $K_I$ ). This has been observed for the two carboxylate compounds **15** and **16** where two methyl groups have been introduced at the central carbon atom. The  $K_I$  value of 54'500  $\mu\text{M}$  and 50'200  $\mu\text{M}$  and the competitive-mixed inhibition type are indicative for very weak inhibitors. The inhibition constant is even slightly bigger than that of the compound **8** lacking the carboxylate group, clearly indicating that the steric hindrance at the active site is such that a good fit to the surface of the active site is not any more possible. The difluoroester **17** shows the same inhibition behaviour as the dimethyl analogue **15**: competitive-mixed. However the inhibition constant is a factor of 8 smaller ( $K_I = 6'580 \mu\text{M}$ ). This sudden change is not obvious to interpret. However, the difluoro compound **17** still is a relatively weak inhibitor and the interaction with the functional groups at the active site is probably not very tight. Therefore, the docking of these inhibitors containing a quaternary centre on the active site may be relatively sloppy and probably less representative for the interaction of the substrate molecules with the enzyme than for the other diketones.

In conclusion, the diketo compounds containing a  $\beta$ -ketocarboxylate, a  $\beta$ -ketoester and a  $\beta$ -ketonitro function are preferentially recognized by the P site of the enzyme and all showed competitive-mixed, uncompetitive-mixed or slow binding behaviour. The strength of the interaction of the carboxylate, of the ester or of the nitro function with the P site of the enzyme is clearly different from the interaction of the carboxylate of the second substrate with A site. For the competitive inhibitors specific for the A site, the influence of

modifying the carboxylate group of the substrate leads to the following sequence for the inhibition constant  $K_I$  :  $-\text{NO}_2 \ll -\text{COOH} \ll -\text{COOCH}_3$ . For the diketones studied here, the sequence of the inhibition constant is however :  $-\text{COOH} \ll -\text{NO}_2 \ll -\text{COOCH}_3$ . Introducing steric strain at the diketo function reduces the strength of the interaction considerably and leads in the case of a quaternary centre to very weak inhibitors.

Assuming that our diketo inhibitors will bind in a one to one stoichiometry to the enzyme, the active site should have space available that is occupied normally by the second substrate. In order to test the permissiveness of PBGS towards additional steric bulk, diketo derivatives were synthesized and tested from various cycloalkanones (see table 4).

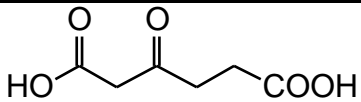
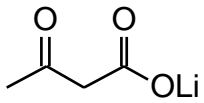
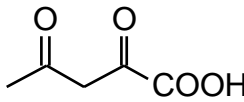
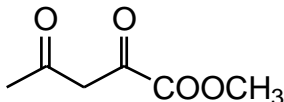
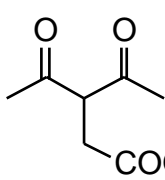
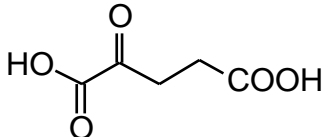
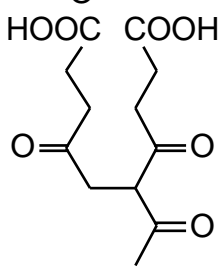
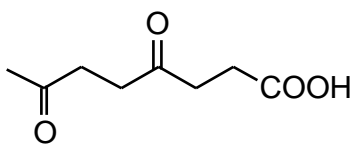
Compound	$K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]	Inhibition type	Concentration [mM]	Activity 30 min 90 min
 <b>18</b>	-	Slow binder Rac	0.44	56% 38%
 <b>19</b>	16	Competitive- mixed Rac		
 <b>20</b>	-	Slow binder Rac	0.58	76% 70%
 <b>21</b>	-	Slow binder Rac	0.77	86% 76%
 <b>22</b>	34'200	Competitive- mixed Rac		
 <b>23</b>	-	Slow binder Rac	0.88	92% 83%

**Table 4**

The cyclohexanone derivative (**18**), cycloheptanone derivative (**20**) and cyclooctanone (**21**) all show similar behaviour; they were slow binders which blocked after 90 min 24 % to 62 % of the enzyme activity with concentration ranging from 440  $\mu\text{M}$  to 770  $\mu\text{M}$ . The concentrations needed to obtain this strength of inhibition were 150 to 300 times higher than the concentration needed for succinylacetone (**4**). However, when these compounds are compared with the methylated derivative **13**, the ratio of concentrations necessary for similar inhibition was only a factor of 6 to 10 maximum. In conclusion, the enzyme seems to accept more easily additional bulk at the end of the chain of succinylacetone (**4**) than at the central carbon atom. The increase of the steric bulk decreased only gradually the inhibition potency of these compounds. The most surprising result of this series was the testing of a nitro analogue (**19**) containing a cyclohexanone ring. The inhibition behaviour was competitive-mixed and the inhibition constant ( $K_I = 16 \mu\text{M}$ ) was almost identical with the inhibition constant determined for the nitro analogue of the succinylacetone (**12**) ( $K_I = 15 \mu\text{M}$ ). We do not know if this difference in behaviour is due to a very tight binding of the carboxylate to the enzyme and a considerably reduced fit of the nitro analogue at the active site. However, if the carboxylate of the P site substrate fits very tightly to the enzyme, the strength of the interaction might not be compatible with slight changes of the conformation of our inhibitors on the active site necessary to accommodate the additional steric hindrance. In the case of the nitro compound, the more "sloppy" recognition might be more permissive for the additional steric strain introduced. Finally, we tested the importance of the formation of the vinylogous amide on the inhibition behaviour by blocking the deprotonation of the central carbon atom. The methylated compound **22** was once again a very weak competitive-mixed inhibitor with a  $K_I = 34'200 \mu\text{M}$ . The inhibition constant is in the same order of magnitude as for the non-cyclic compounds **15** and **16**. The slight decrease of the inhibition constant of the cyclohexanone derivative **22** can be representative for a non-polar environment at the enzyme active site that creates additional Van der Waals contacts. The monofluoro analogue **23** however showed a surprising behaviour. The 880  $\mu\text{M}$  necessary to blocked the 17 % of the activity are very near to the 440  $\mu\text{M}$  needed for the compound **18** to blocked 62 % of the activity. For the compound **21**, 770  $\mu\text{M}$  were necessary to block 24 % of the enzymatic activity, a value almost identical with the one obtained for **23**. This is all the more surprising, because once again we not only block the formation of the vinylogous amide, but we had to keep the ester function due to difficulties during hydrolysis. To keep the ester function is known to reduce the inhibition considerably. The comparison of the fluoro compound **23** containing the cyclohexanone ring

with the acyclic compound **14** shows once again that the introduction of the apolar six-member ring increases slightly the inhibition potency.

The results obtained from this series of compounds are a strong hint that an apolar pocket should be available at the enzyme active site surface where the A site substrate will be bound.

Compound	$K_I$ [ $\mu$ M]	Inhibition type	Concentration [mM]	Activity 30 min 90 min
	<b>24</b> 10'400	Competitive		
	<b>25</b> 39'500	Competitive		
	<b>26</b> -	Slow binder	-	-
	<b>27</b> -	Slow binder	1.89	59% 46%
	<b>28</b> 8'800	Competitive- mixed Rac		
	<b>29</b> 8'450	Competitive	0.45	89 % 68 %
	<b>30</b> -	Irreversible		
	<b>31</b> -	Irreversible	0.79	53% 22%

**Table 5**

The importance of the relative arrangement of carboxylic acid and the  $\beta$ -diketo function was tested using compounds **24** to **29**. In compound **24**, the diketo function was replaced by a  $\beta$ -keto carboxylate. Exchanging the ammonium group against a carboxylate group led to a weak competitive inhibitor; obviously the interaction to the P site is not strong enough to block the interaction with the natural substrate and only competition the A site of the enzyme can be observed. The lithium salt of the acetoacetate (**25**) is an extremely weak competitive inhibitor with an inhibition constant  $K_I$  of almost 40'000  $\mu$ M. Surprisingly, the methylester and the carboxylic acid of the acetopyruvic acid (**26** and **27** respectively) were slow binder, however millimolar concentration were necessary to obtain more than 50 % inhibition. For keeping the distance between the keto function and the carboxylic acid constant, compounds **28** and **29** were synthesized and tested. In the compound **28**, the carboxylic acid function was linked to the central carbone atom of the diketone giving a bifurcated arrangement. In the compound **29**, the carbone atom C(5) of the levulinic acid was oxidized and two keto acid structure units can be recognized in this structure : a  $\beta$ - and  $\gamma$ -keto carboxylic acid. Both compounds **28** and **29** were weak inhibitors with inhibition constants of 8'800  $\mu$ M and 8'450  $\mu$ M with an essentially competitive behaviour. This moderated to weak inhibition indicate that the linear arrangement between the  $\beta$ -diketo function and the carboxylic acid function are necessary for optimal recognition and that an  $\alpha$ -keto acid is not sufficiently activated to compete successfully with the substrate for the P site. In a trial to investigate if the  $\beta$ -diketo function is compatible with the introduction of structural elements that should imitate either a bis-substrate or an intermediate, compound **30** was synthesized. In this structure, the elements of succinylacetone (**4**) have been combined with the structure of 4,7-dioxosebacic acid. The inhibition behaviour of compound **30** was that of an irreversible inhibitor, however the concentration needed for reducing the activity by 62 % was of 450  $\mu$ M. This value corresponds to the value obtained for the compound **18**, the cyclohexanone derivative, but it is considerably higher than the value obtained for the methylated compound **13** with 77  $\mu$ M or for succinylacetone itself (**4**) with 2.5  $\mu$ M. This result seems to indicate that the compound **30** is not recognized as bis-substrate or as an analogue of an intermediate, but plays the role of a substituted succinylacetone. The X-ray structure known for the succinylacetone-enzyme complex and for the 4,7-dioxosebacic acid-enzyme complex are strong indicator that the binding of the  $\beta$ -diketo function to the P site prevents the molecule **30** to arrive at a conformation which allows to bind as a bis Schiff base. The binding of the  $\beta$ -diketo function leads to the vinylogous amide where the conformation at the central carbon is blocked. Thereby, the closed conformation, that has been observed for the 4,7-dioxosebacic acid, can not be reached. The last compound, we

tested in this series, was the compound **31**. In this compound, the carboxylic acid chain necessary for the binding at the A site has been left out. This compound still is an irreversible inhibitor that is unusual for an inactivated  $\alpha$ -keto carboxylic acid, but almost 800  $\mu$ M are necessary to obtain an inactivation of 78 %. This value is comparable with the value observed for the  $\alpha$ -diketones containing a cycloalcanane ring (compounds **18**, **20**, **21**). We interpret this behaviour as a consequence of the formation of the bis Schiff base, but the missing carboxylate at the A site reduced the inhibition potency considerably.

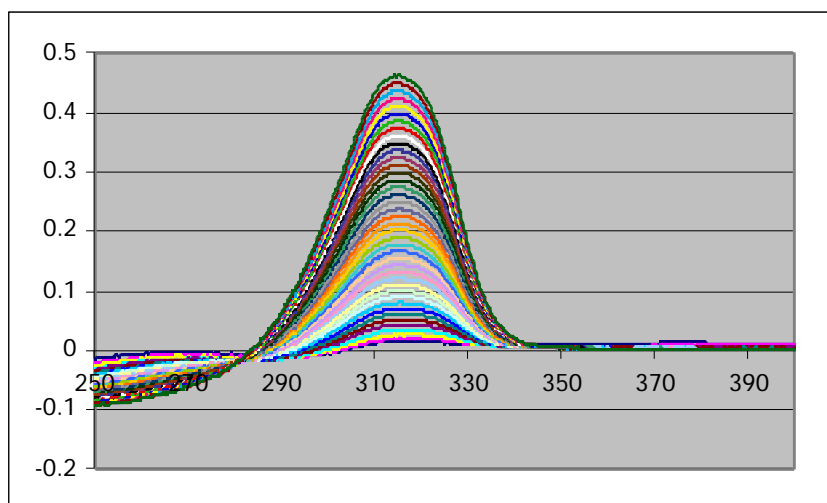
In conclusion, the inhibition by the  $\alpha$ -diketo function seems to be the consequence of a primordial interaction with the P site of the enzyme and the formation of a vinylogous amide. For an efficient irreversible or slow binding inhibition, the  $\alpha$ -diketo function must be linear connected to the carboxylic acid separated by two methylene groups. Changing the spacer between the diketone or the point of connection to the diketone (see compound **28**) is detrimental to the inhibition potency. In general, introducing apolar groups at the central carbon of the diketone reduced the efficiency of the recognition. Adding apolar cycloalcanes is moderately favourable to the interaction at the enzyme active site that indicated the presence of an apolar pocket. Blocking the formation of the vinylogous amid by introducing a quaternary centre at the central carbon atom creates very weak competitive inhibitors indeed, indicating that the specificity of the  $\alpha$ -diketons for the P site has been lost. Our trial to combine two recipes to create strong inhibition, namely the structural element of the 4,7-dioxosebacic acid with the structural element of succinylacetone (see compound **30**) was in vain. The effects of the two structural elements were not cumulated. The concentration necessary for irreversible inhibition was typical for an alkylated succinylacetone. Taking these results together with knowledge from the X-ray structures is a clear indication that the vinylogous amid with the P site lysine is formed, but renders the correct arrangement of the rest of the molecule impossible. Finally, compound **31** addresses the question of the importance of the second carboxylic acid for the recognition at the A site. Compound **31** is the first inactivated  $\alpha$ -keto acid that shows irreversible behaviour. The relatively high concentration necessary for blocking the activity, clearly demonstrates that the interaction of the second carboxylate with the A site of the enzyme is a major contributor to the strong inhibition observed for the 4,7-dioxosebacic acid.

The interpretations of our inhibitions results have clearly demonstrated the importance of the formation of the vinylogous amide of the diketone with the P site lysine. All the results

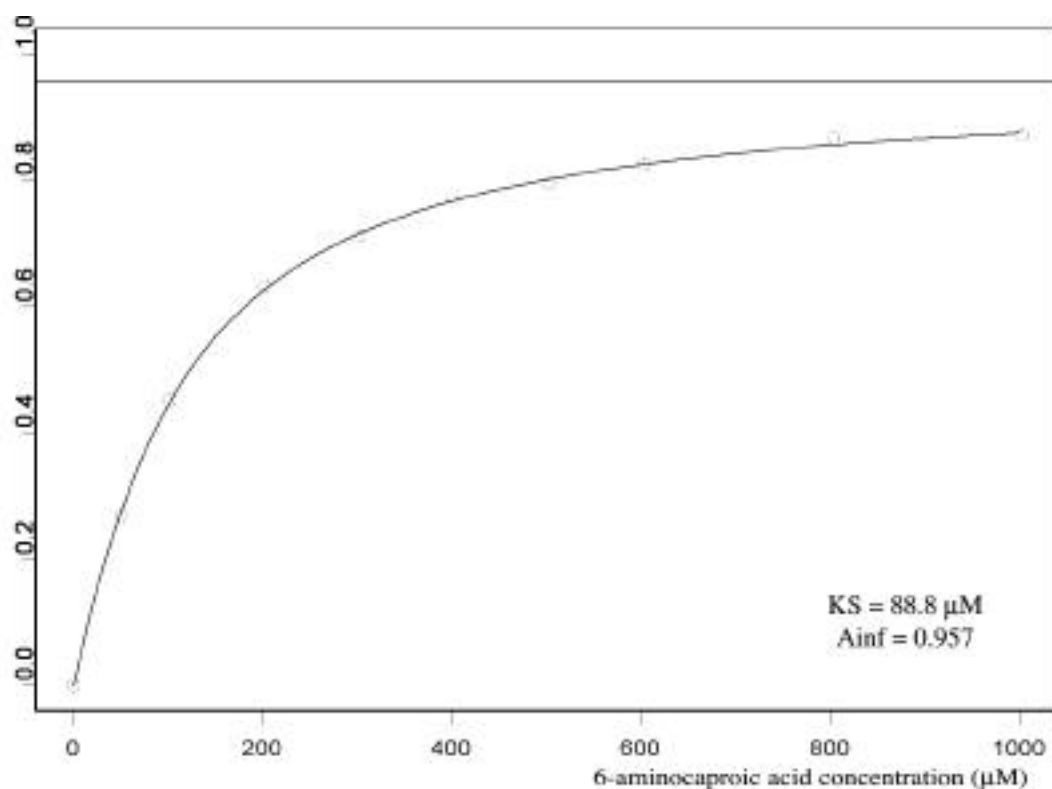
are compatible with the hypothesis that the formation of this vinylogous amide is the key to the understanding and the interpretation of the inhibition results.

It is well known that in solution the vinylogous amide prefers an hydrogen bounded set configuration. The structure of succinylacetone (**4**) bound to PBGS isolated from yeast surprisingly showed the presence of a vinylogous amide with an *E*-configuration around the double bond. In view of the importance of this key intermediate for the understanding of our results, we decided to study the formation of this intermediate with the help of UV/VIS spectroscopy. The UV/VIS spectra of the different stereoisomers of the vinylogous amide have been characterized [49]. The differences in the absorption wavelength and in the extinction coefficient should allow us to characterize the vinylogous amide bound to the enzyme and to attribute an configuration to this enzyme bound species.

As a model for our experiment with PBGS, we tested the formation of the vinylogous amide between 6-aminocaproic acid, as a substitute for the active site lysine, and succinylacetone (**4**). The formation of the vinylogous amide was detected at the absorption maximum of 314 nm (see figure 1). In order to obtain a saturation curve, a fixed concentration of succinylacetone (**4**) (51.2 mM) was mixed with increasing concentration of 6-aminocaproic acid (50 mM to 1000 mM). However, the rate of formation was extremely slow, especially for the low levels of 6-aminocaproic acid. In order to reach completion of the low levels, we had to wait 64 hours (see figure 2). Plotting the intensity of the UV/VIS absorption measured after 64 hours, a saturation curve was obtained. The equilibrium constant for dissociation obtained from this saturation curve is 88  $\mu\text{M}$ . The absorption wavelength and the absorption coefficient of 19'000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  calculated from the saturation curve are in accordance with a conformation of vinylogous amid corresponding to a *cis-s-trans* vinylogous amide. The values expected for the *trans-s-trans* compound would be an absorption wavelength of 290 nm and an absorption coefficient up to 30'000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . These values are sufficiently different for our observation that an unequivocal attribution of the conformation and configuration of the model compound can be made.

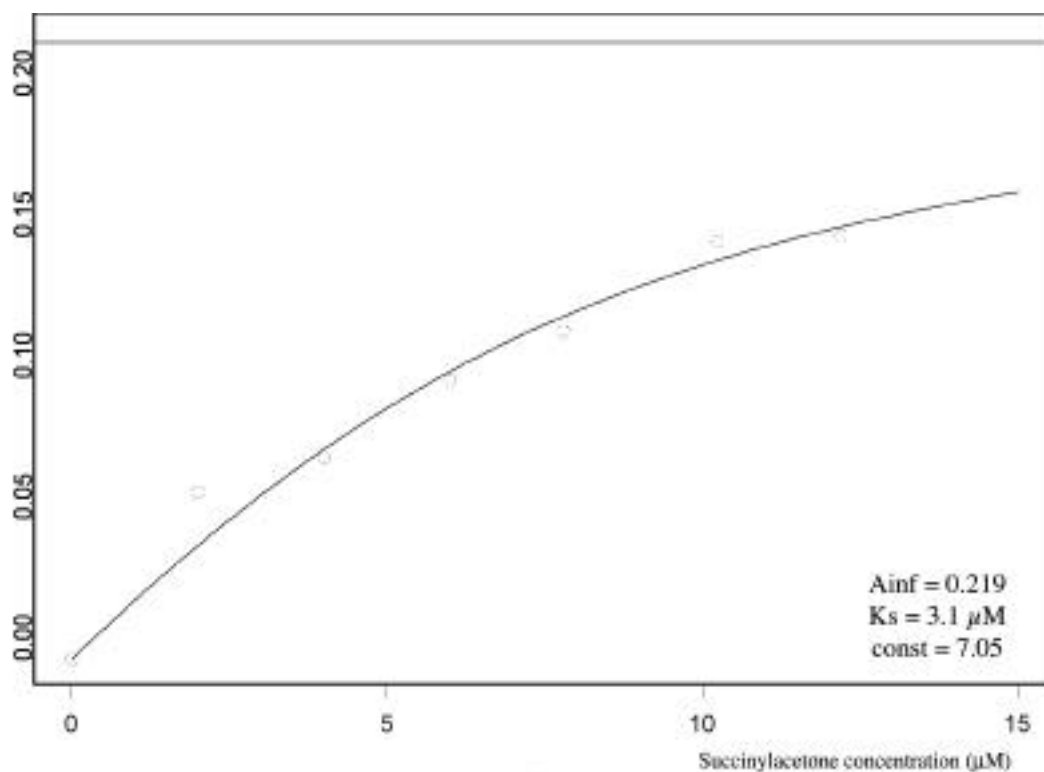


**Figure 1** : Spectra of the formation of the vinylogous amide between succinylacetone ( $50 \mu\text{M}$ ) and 6-aminocaproic acid ( $100 \mu\text{M}$ ); the maximum is detected at 314 nm



**Figure 2** : Saturation curve for the formation of the vinylogous amide between succinylacetone ( $51.22 \mu\text{M}$ ) and 6-aminocaproic acid ( $50 \mu\text{M} - 1000 \mu\text{M}$ )

To test the formation of the vinylogous amide with the enzyme, a constant concentration of the enzyme (14.1  $\mu\text{M}$  concentration of the monomeric units) was treated with increasing amounts of succinylacetone (**4**) (2  $\mu\text{M}$  to 12  $\mu\text{M}$ ). Unfortunately, we could not collect data at higher concentration of succinylacetone (**4**), because the absorbance of the diketone covered the band due to the formation of the vinylogous amid. Therefore, we only obtained values for the early part of the saturation curve that renders the interpretation of the data more difficult (see figure 3). On the other hand, the rate of formation of the vinylogous amide at the surface of the enzyme was much faster than the rate of the formation of our model compound. Already after 20 hours, completed formation of the complex was observed (see figure 2). The absorption maximum of the enzyme-inhibitor complex was found to be at 320 nm. The experimental curve was approximated using the theoretical equation describing the formation of the vinylogous amide and applying non-linear regression (Segel II.54 b). Despite the fact that we only have limited data, the experimental values could not be interpreted by statistical procedure using the theoretical equation. The parameters did not converge if an enzyme concentration of 14.1  $\mu\text{M}$ , corresponding to the presence of height equivalent active site per enzyme unit, was assumed. The parameters only converged under the assumption that five or less active sites per enzyme unit are present. The statistical interpretation using the assumption that only four sites are active during the process of formation of the vinylogous amide gave the following curve :



**Figure 3 :** Saturation curve of the formation of the vinylogous amide between succinylacetone (**4**) and the enzyme, assuming that only four active sites are occupied

This curve indicated a dissociation constant of  $3.1 \mu\text{M}$  and an extinction coefficient of  $31'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . However the data are not sufficient to differentiate between the hypothesis of half-site activity and the proposal using different formal concentrations of the active site. We have chosen for our interpretation the hypothesis of half-site reactivity, because the results clearly rules out the possibility that all the sites are reacting. However, assuming the interaction of succinylacetone (**4**) with five sites of the enzyme octamer would give a dissociation constant of  $2.3 \mu\text{M}$  and an extinction coefficient of  $24'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The results of both hypotheses are compatible with our expectations. We have no firm statistical basis to distinguish between these different hypotheses. We decided to use the half-site reactivity as the most probable working hypothesis. The absorption wavelength is once again in accordance with a *cis-s-trans* arrangement of the vinylogous amide. However, the absorption coefficient is higher than expected. This might be due to the fixed conformation, in which the inhibitor is bound to the enzyme We thereby have been able to observe spectroscopically directly the formation of the vinylogous amide and we can reconfirm the conformation of the vinylogous amide enzyme complex. More interestingly, the value observed for the dissociation constant of  $6.5 \mu\text{M}$  is in excellent agreement with the

value for irreversible inhibition of around 2.5  $\mu\text{M}$ , especially if we assumed half-site reactivity. These results raise a series of interesting questions: how can we reconcile the X-ray structures of succinylacetone-enzyme complex, showing full occupancy of all sites, with the spectroscopic observations in favour of half-site occupancy? Is there a mechanism which communicates the presence of the inhibitor on the active site of one unit to the active site of the second unit of the dimer? This communication between the two subunits of a dimer has been conclusively shown in the crystal structure of PBGS isolated from *P. aeruginosa* that has been refined to a very high resolution. Finally, what is the mechanism that allows blocking completely an active site on a subunit which is not in direct contact with the inhibitor? These questions are especially intriguing because all the active sites of the octamer are fully open to the solvent. Up to now, only the X-ray structures of *P. aeruginosa* have clearly shown half-site reactivity. The structures of PBGS from yeast and *E. coli* gave no hints. It will be important to check if the crystal structures and the reactivity in solution have a major difference in their behaviour, or if one will be able to obtain crystals from other sources that will indicate also the presence of half-site reactivity.

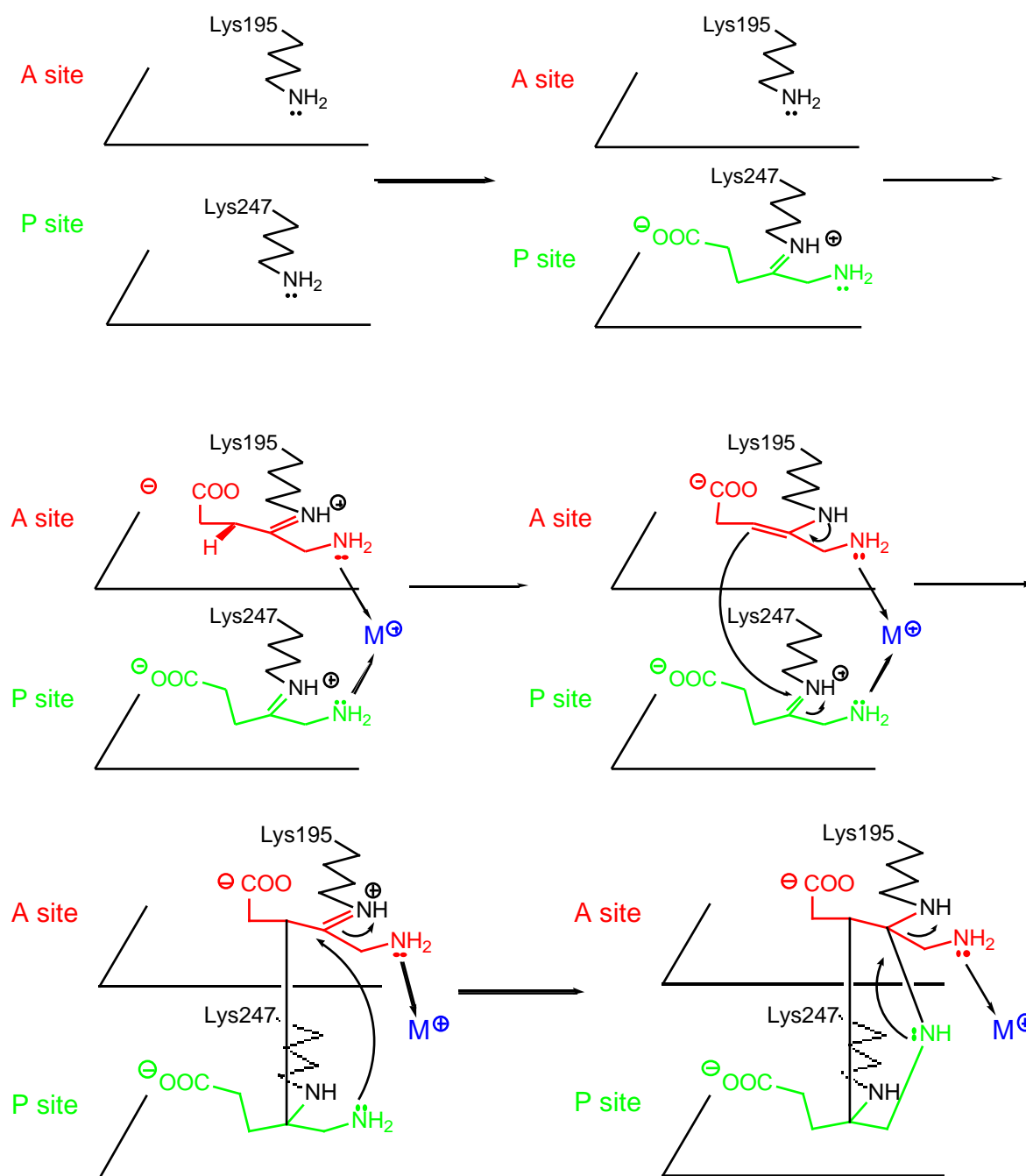
The X-ray structure of succinylacetone (**4**) bound to the active site was compatible with the formation of the vinylogous amide, however the resolution did not allow us to distinguish between the different tautomeric forms. We have finally been able to prove the formation of the vinylogous amide on the enzyme by observing its absorption spectra. The characterisation of this enzyme inhibitor complex between succinylacetone (**4**) and PBGS has allowed us to propose the conformation of this complex being *cis-s-trans* in complete agreement with the observation in the X-ray structure. On top of this structural information, the interpretation of the absorption data clearly indicated that not all the sites have been occupied by the inhibitor. The evaluation is in accordance with a half-site reactivity for succinylacetone (**4**).

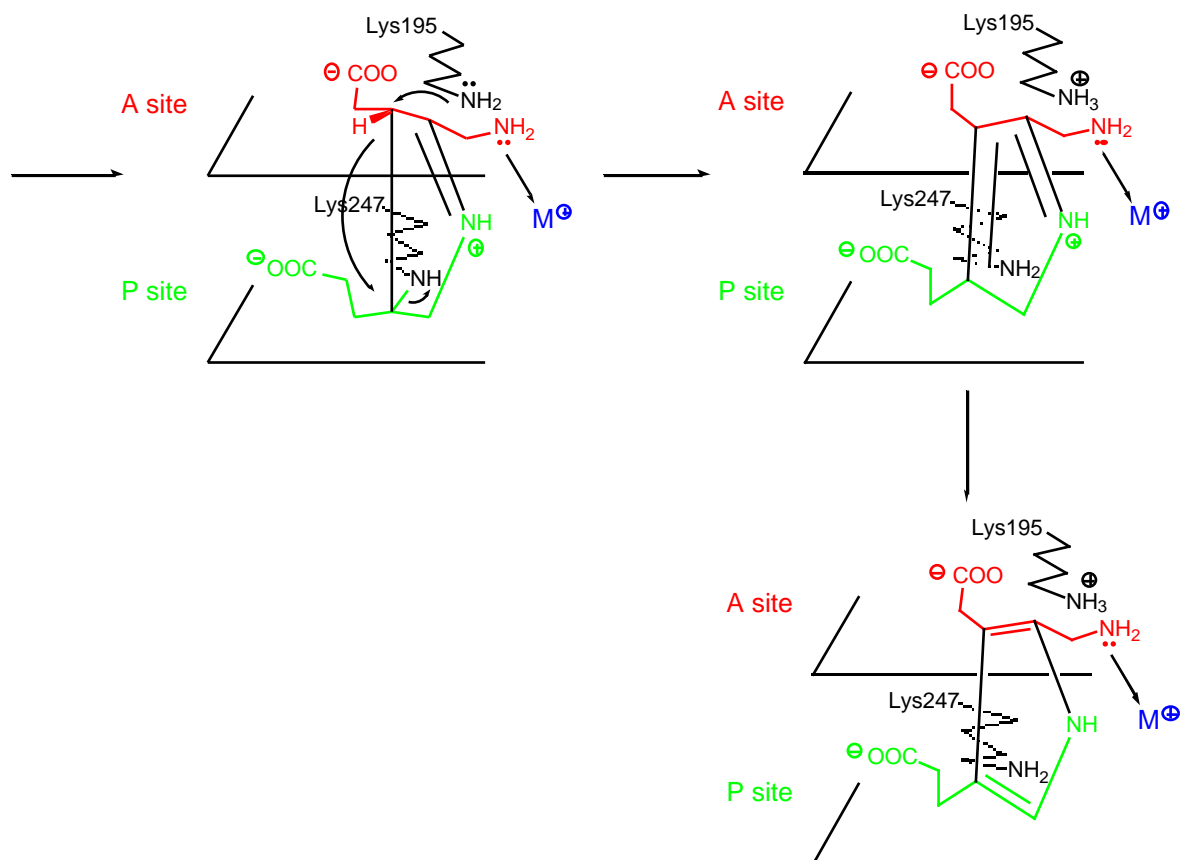
The stability of the conjugated system is an important factor, which contributes to the tight binding of this type of inhibitors to the P site of the enzyme. All our results are in full accordance with the proposal that the binding force of these  $\beta$ -diketones is influenced to a large extent by the stability of the vinylogous amide, which forms slowly on the enzyme active surface. The change in inhibition behaviour observed for the  $\beta$ -diketones, which are unable to form the vinylogous amides, was a good indication for this working hypothesis.

If one compares the X-ray structures of the inhibitors 4,7-dioxosebacic acid and 4-oxosebacic acid bound to the enzyme with the structure of the succinylacetone (**4**) bound to the enzyme, it is evident that  $\beta$ -diketones can not be used to create analogues of intermediates or of bis-substrates. The planar structure of the vinylogous amide formed on the enzyme active site prevents an arrangement of the two keto functions, which would allow forming a double Schiff base with the two lysines of the active site. Despite the fact that 4,7-dioxosebacic acid, 4-oxosebacic acid and succinylacetone (**4**) are all irreversible inhibitors of PBGS with a high affinity to the enzyme, the reasons for this tight binding are different. 4,7-dioxosebacic acid and 4-oxosebacic acid are bound to both parts of the active site, the P site and the A site, and gain their affinity by interactions at both sites, possibly by using similar interactions as the ones used by the bis-substrate. In contrary the succinylacetone (**4**) is tightly fixed to the P site only, due to the stability of the vinylogous amide formed.

All the knowleged we obtained until today have induced us to prefer the mechanism developed in the scheme 4 for the transformation of the two ALA (**1**) molecules into PBG (**2**). This mechanism is known as Jordan II. The first substrate is recognized at the P site of the enzyme where it makes a Schiff base with the Lys247, as demonstrated by Jordan in his elegant pulse labelling experiment [35]. The second substrate makes a Schiff base with the Lys195 at the A site of the enzyme, according to the X-ray structures of PBGS complexed with the 4,7-dioxosebacic acid [24, 26] and the 5-fluorolevunic acid (Frère et al, to be published). The Schiff base at the P site is present as an imminium, while the hybridization of the Schiff base at the A site corresponds to an enamine form. This complementarity of the reactive centers is necessary for the formation of the C-C bond. Independently of the sequence of the events, formation of the C-C bond first or of the C-N bond first, the P side substrate must be activated as a strong electrophile, and the enamine form is a good way to obtain this activation. One role of the enzyme is to prevent the amino group of the A side substrate to make parasitic reactions. Probably this is done by complexation of the amino group with a metal present at the active site. Probably, at the beginning of the reaction events, the amino group of the P side substrate is also complexed with the metal, but in less strong manner than the A side one, because it has to be free to react as a nucleophile in the following step. The first bond, we postulate to be formed, is the C-C one. From electronic standpoint, the reaction is allowed and followed the Bürgi-Dunitz angle of attack. This formed intermediate has undergo some conformation change (formation of a C-C bond, change of hybridization) and probably a series of hydrogen bonding will be disrupted or, in

any case, weakened. The amino group of the P side substrate is now free to attack the iminium form of the A side Schiff base, forming the intersubstrate Schiff base and cleaving the bond with the Lys195. This Lys195 will play then the role of a base; in this step, the bond between the preformed product and the enzyme is broken. The final aromatization is performed with the help of the Lys260, acting as a base. This final deprotonation is stereochemically controlled, given that only the pro-R hydrogen is abstracted [50]. The final aromatization will be the driving force for the whole reaction sequence.





**Scheme 4 :** Postulated mechanism

### 4.9.3 Experimental part

#### Biochemistry.

**Materials.** *E. coli* (CR 261) was a gift from C.Roessner of Texas A&M University. Production of *E. coli* and purification of PBGS have been described previously [51].

**PBGS assay and determination of kinetic constants.** The PBGS assay is a colorimetric assay based on the reaction between PBG and 4-dimethylaminobenzaldehyde [52], the so-called Ehrlich's reagent. The assay for *E. coli* PBGS contained 4-6.4  $\mu\text{g}$  PBGS and the inhibitor in 1.5 ml of 0.1 M NaIP ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  and 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ). The preincubation took place at 37°C for 30 - 45 min. The substrate was added in varying the concentration and the solution was incubated for 14 min, after which the PBGS-catalyzed reaction was stopped by adding 1 ml of the stop reagent (20 % trichloroacetic acid, 10 mM  $\text{HgCl}_2$ ) at 0°C. After centrifugation (4 min, 3600 g) 1 ml of the supernatant was treated with 1 ml of Ehrlich's reagent (1.1 g 4-dimethylaminobenzaldehyde in 20 ml perchloric acid and 35 ml acetic acid). This solution was centrifuged

(4 min, 3600 g) for a second time. The quantity of product formed was determined by measuring the absorbance at 554 nm ( $\epsilon = 62'000 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ ).

The type of inhibition was determined using Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk and Hanes plots. The  $K_i$  values shown in the different tables are the average of at least three independent assays.  $K_i$  values were calculated from the apparent  $K_M$  deduced from the hyperbolic plot, typical for Michaelis-Menten kinetics.

**Estimation of the specific activity.** The protein concentration was estimated by the Bio-Rad Protein Assay using the colour change of the Coomassie Brilliant Blue-G-250. This colour change is followed by measuring the absorbance at 596 nm [53]. The concentration of our protein is deduced by comparison with a standard curve. Using the value together with the rate of PBG formation allows the specific activity to be calculated.

**Dialysis assay.** 4-6.4  $\mu\text{g}$  PBGS were dissolved in 10 ml of 0.1 M NaIP ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  and 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ). 4 ml of this solution was placed in two different 5 ml tubes, one containing 2.5 - 10 mg of the inhibitor and the second (without inhibitor) was used as a reference. After 24 h at r.t., the specific activities were determined. 1 ml of each solution was placed in a dialysis tube and separately dialyzed against 1.5 l of 0.1 M NaIP ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  and 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ). After 66 h dialysis at 4°C, the specific activities were again determined.

### Chemistry.

**General.** THF (purum, Fluka) was distilled over potassium and benzophenone under  $\text{N}_2$ ; the other solvents (puriss., Fluka) were used without further treatment. TLC : silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Aluminium, 0.2 mm; Merck); the spots are detected by  $\text{KMnO}_4$  or UV/VIS. Flash column chromatography : silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Fluka) at ca. 0.2 bar. M.p. : Büchi 510 apparatus, uncorrected. IR spectra : Perkin-Elmer-1720 X FT-IR spectrophotometer; absorption bands in  $\text{cm}^{-1}$ . NMR Spectra : Bruker AMX-400 and Bruker Avance 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz), Varian Gemini XL-200 and Varian Gemini 2000 ( $^1\text{H}$ : 200 MHz,  $^{13}\text{C}$  50 MHz); chemical shifts  $\delta$  in ppm from external reference  $\text{Me}_4\text{Si}$  ( $\delta = 0$  ppm) to lower field; temperature 298 K; coupling constant  $J$  in Hz; solvent and special experiment stated. EI-MS (70 eV) and CI-MS ( $\text{NH}_3$  as ionisation gas) : Nermag RC 30-10. ESI-MS and APCI : Finnigan LCQ. HRMS : Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II (ESI (positive, negative)-MS). GC : Perkin Elmer SIGMA 3B, Dual FID Chromatograph, SE 54 column (Macherey Nagel, l = 25 m, ID = 0.32 mm, df = 0.25  $\mu\text{m}$ ), P (program : 5 min at 70°C, to 150°C at 8°C/min, 10 min at 150°C). Elemental analysis were performed by the Microanalytical Laboratory of Ciba-Specialty SA, Marly and by "l'Ecole d'Ingénieur" of Fribourg.

**Starting materials.** Acetylacetone (**5**), 2-acetylcyclohexanone (**7**), 3-oxoadipic acid (**24**), lithium acetylacetae (**25**), 2,4-dioxopentanoic acid (**26**), 2,4-dioxopentanoic acid methylester (**27**), 2-oxoglutaric acid (**29**), and the selectfluor (1-chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane bis (tetrafluoroborate) (**32**) are commercially available (Fluka, Sigma, Avocado).

**Lithium 2-Chloroacetate (33).** To a suspension of LiH (1.98 g, 0.25 mol), first washed with hexane (3 · 50 ml) on CaH<sub>2</sub>, in THF (200 ml) was added acetic acid (24.57 g, 0.26 mol) dropwise during 1 h under N<sub>2</sub>. A white viscous suspension was formed. The mixture was stirred for 15 h at r.t., then filtered, washed with diethylether (3 · 30 ml). Evaporation of the solvent gave the product **33** (23.89 g, 0.238 mol) in 95 % yield.

**Succinylacetone (4,6-dioxoheptanoic acid) (4).** To a suspension of 50 % NaNH<sub>2</sub> in toluol (20.22 g, 0.259 mol) under Ar with an acetone cool bath where after carefully the toluol was sucked up with a pipette, and the Ar atmosphere was exchanged to a N<sub>2</sub> atmosphere, were added ammoniac (250 ml) and acetylacetone (10.21 g, 0.102 mol) in diethylether (15 ml) dropwise during 30 min. After the adjunction, the bath was removed and the mixture was stirred for 1 h at -50°C. After cooling, lithium chloroacetate (**33**) (10.08 g, 0.1 mol) was added, the mixture stirred for 1 h at -50°C, and then once again refluxed for 4 h. After adjunction of diethylether (200 ml), ammoniac was evaporated at r.t. in 2 h, and the remained solution was stirred for 5 min. After cooling, the solution was hydrolyzed with ice (10 g) and then with a mixture of ice (40 g) and HCl (32 %, 30 ml). Extraction with diethylether (3 · 50 ml), drying on MgSO<sub>4</sub>, filtration and evaporation, gave a yellow product (13.46 g, 0.085 mol) in a 85 % yield. The recrystallization in CHCl<sub>3</sub> - CCl<sub>4</sub> (1 : 1, 50 ml) yielded **4** (11.24 g, 0.071 mol, 71 %).

R<sub>f</sub> (AcOEt, KMnO<sub>4</sub>) : 0.22. M.p. : 62 - 63°C. IR (KBr) 3103s, 2937s, 2629m, 1696vs, 1648s, 1600s, 1446s, 1428s, 1411s, 1357s, 1328s, 1279m, 1248s, 1208s, 1139m, 1073m, 1015m, 912s, 809s, 774s, 654m, 623w, 566w, 529w, 509m, 486w. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7')); 2.70-2.61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(2,3) + 2H, CH<sub>2</sub> (3')); 2.82-2.79 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (2')); 3.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub> (5')); 5.51 (s, 1H, CH(5)); 9.9-8.9 (s, 1H, COOH). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) 23.6 (C(7)); 27.7 (C(2' or 3')); 28.6 (C(2 or 3)); 30.8 (C(7)); 33.3 (C(2 or 3)); 37.7 (C(2' or 3')); 57.8 (C(5)); 99.7 (C(5)); 178.2 (C(1')); 178.3 (C(1)); 187.3 (C(6)); 194.9 (C(4)); 202 (C(6)); 202.1 (C(4)). MS (EI) 158 (6); 140 (4); 125(4); 85 (20), 73(10); 70(21); 61(21); 45(23); 43(100).

**3-Methyl-2,4-pentandione (6).** To a solution of potassium carbonate (20.73 g, 150 mmol) in acetone (35 ml), 2,4-pentandione (16.27 g, 162.5 mmol) and iodomethane (35.49 g, 250 mmol) were added. The mixture was stirred for 14 h at 50°C, then filtered. The solid was washed with acetone (100 ml) and the filtrate was evaporated. Distillation (1° room pressure, 2° 70 mmHg), gave a mixture of products (10.75 g, 58 %) (1 % 2,4-pentandione and 5 % 3,3-dimethyl-2,4-pentandione). The products were solved in diethylether, extracted with NaOH (2 M), acidified with HCl (32 %), extracted with ethylacetate, and finally distilled (70 mmHg). The product **6** was obtained pure (58 %).

R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 1 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.39. B.p. (85 mmHg) : 99°C. IR (film) : 2989w, 2942w, 1755m, 1724s, 1704vs, 1615m, 1426m, 1360m, 1277m, 1230m, 1189m, 1160m, 1127m, 1085m, 994m. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketo (65 %) 1.31 (d, <sup>3</sup>J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>(6)); 2.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (1, 5)); 3.65 (q, <sup>3</sup>J = 7.1, 1H, CH(3)); enol form (35 %) 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (6)); 2.10 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (1, 5)); 16.42 (s(l), 1H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketo 12.2 C(6); 28.4 C(1, 5); 61.4 C(3); 204.9 C(2, 4); enol form 12.6 C(4); 23.1 C(1, 5); 104.6 C(3); 190.1 C(2, 4); MS (APCI) : ms 115 [M+1]<sup>+</sup>, ms-ms (115) 97 [M+1-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 73 [M+1-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**3,3-Dimethyl-2,4-pentandione (8).** To a solution of anhydrous potassium carbonate (13.82 g, 100 mmol) in acetone (30 ml) were added acetylacetone (5 g, 50 mmol) and iodomethane (21.3 g, 150 mmol). The solution was stirred for 24 h at 70°C, then iodomethane

(7.1 g, 50 mmol) was added and the solution was again stirred for 24 h at 70°C. The solvent was partially evaporated, the remaining solution was filtered and the solid was washed with acetone. The filtrate was evaporated and the solid was dissolved in diethylether (30 ml); NaOH (1 M, 30 ml) was added. The aqueous phase was extracted with diethylether (2 × 30 ml). The organic phases were joined and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. The crude product (2.42 g, 38 %) was distilled bulb to bulb to give the product **8** (1.98 g, 31 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.45. B.p. (60 mmHg) : 90 - 100°C. IR (film) : 2982m, 2938m, 2879w, 1719s, 1701vs, 1467m, 1427m, 1388m, 1358s, 1255m, 1210m, 1140m, 1112s, 962m. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>(6, 7)); 2.12 (s, 6H, CH<sub>3</sub>(1, 5)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 21.1 C(6, 7), 26.0 C(1, 5); 62.5 C(3); 207.7 C(2, 4). MS (APCI) : ms 129 [M+1]<sup>+</sup>, ms-ms (129) 111 [M+1- H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 87 [M+1-C<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**3-Fluoro-2,4-pentandione (9)**. To selectfluor (**32**, 3.72 g, 10 mmol), acetonitrile (40 ml) and 2,4-pentandione (1.0 g, 10 mmol) were added. The mixture was stirred for 24 h at r.t., then the solvent was evaporated. To the solid, HCl (1 M, 30 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) were added. Extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 50 ml), drying on MgSO<sub>4</sub>, filtration and bulb to bulb distillation gave the product **9** (370 mg, 31 %).

R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.29. B.p. (20 mmHg) : 60-70°C. IR (film) : 3017w, 2928w, 1745s, 1723vs, 1422m, 1362s, 1325m, 1271m, 1211m, 1173m, 1096s. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.25 (d, <sup>3</sup>J = 4.1, 6H, CH<sub>3</sub>(1, 5)); 5.21 (d, <sup>2</sup>J = 50.4, 1H, CH(3)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 26.1 C(1, 5); 98.3 (d, J = 200, 1C, C(3)); 199.2 (d, <sup>2</sup>J = 23, 1C, C(2, 4)). <sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 81.79 (qhept, <sup>3</sup>J = 22.0, <sup>4</sup>J = 4.2, 1F, CF(3)). <sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : -115.81 (dhept, <sup>2</sup>J = 50.3, <sup>4</sup>J = 4.0, 1F, CF(3)). MS (ESI(-)) : ms 117 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (117) 75 [M+1- C<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**3-Fluoro-3-methyl-2,4-pentandione (10)**. To selectfluor (**32**, 3.41 g, 9.64 mmol) were added 3-methyl-2,4-pentandione (**6**, 1 g, 8.76 mmol) and acetonitrile (40 ml) under N<sub>2</sub>. The solution was stirred for 18 h at r.t., then 4 h at 100°C. The solvent was distilled with a Vigreux column. The solid was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) and KHCO<sub>3</sub> (10 %, 30 ml) was added. The aqueous solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 50 ml) The joined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Bulb to bulb distillation gave the product **10** (540 mg, 47 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.61. B.p. (60 mmHg) : 70-80°C. IR (film) : 3011w, 2996w, 2943w, 1748s, 1721vs, 1422s, 1360s, 1217m, 1140s, 1123s, 1106s, 963m, 905m, 601m. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.62 (d, <sup>3</sup>J = 22.0, 3H, CH<sub>3</sub>(6)); 2.27 (d, <sup>4</sup>J = 4.0, 6H, CH<sub>3</sub>(1, 5)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 19.9 (d, <sup>2</sup>J = 23, 1C, C(6)); 25.3 C(1, 5); 103.7 (d, J = 194, 1C, C(3)); 202.2 (d, <sup>2</sup>J = 27, 1C, C(2, 4)). <sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : -81.79 (qhept, <sup>3</sup>J = 22.0, <sup>4</sup>J = 4.2, 1F, CF(3)). MS (EI) : 132 (6, M<sup>+</sup>), 88 (10, [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>), 86 (54), 85 (10), 84 (86, [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup>), 83 (14), 77 (15), 69 (13), 41 (100).

**4,6-dioxoheptanoic acid methylester (11)**. MeOH (25 ml) and some drops of CCl<sub>4</sub> were added carefully to Mg (8.26 g, 0.34 mol) under Ar. CO<sub>2</sub> was formed. MeOH (150 ml) was added until all Mg was solved. Acetoacetic acid tert-butylester (53.23 g, 0.336 mol) was added dropwise during 10 min, a milk like solution was formed, and the mixture was stirred for 1 h at 70°C. Filtration, washing with MeOH (70 ml), and evaporation of the solvent gave a magnesium complexe (80.71 g, 0.33 mol, 98%). To a suspension of the

magnesium complex (78.23 g, 0.32 mol) in diethylether (150 ml), 1-chlorosuccinic acid 4-methylester (54.82 g, 0.364 mol) was added dropwise under N<sub>2</sub>. The mixture H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M, 100 ml) was added. Extraction with diethylether (3 · 200 ml), washing of the organic phase with water (3 · 100 ml) and drying on MgSO<sub>4</sub> gave an yellowish oil (87.97 g). This oil was then stirred at 150°C for 30 min under N<sub>2</sub>; isobuten and CO<sub>2</sub> were formed. After cooling at r.t., diethylether (250 ml) was added. Extraction with NaOH (2 M, 100 ml, 50 ml and 25 ml), addition of cooled H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.8 M, 300 ml) on the basic phase, extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 · 200 ml), washing with a diluted NaHCO<sub>3</sub> solution, drying on MgSO<sub>4</sub>, filtration and distillation (65 - 68°C, 9 · 10<sup>-2</sup> mbar) gave the product **11** (22.21 g, 0.129 mol) in 40 % yield.

M.p. : 65 - 68°C, 9 · 10<sup>-2</sup> mbar. R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 1 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.36. IR(KBr) 3001vw, 2956w, 2850vw, 1739vs, 1709m, 1626m, 1439m, 1632m, 1322m, 1212m, 1172, 1137m, 1095w, 996w, 882w, 741w. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.67-2.57 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (2,3) + 2H, CH<sub>2</sub> (3)); 2.85-2.77 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (2)); 3.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub> (5)); 3.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (1<sup>1</sup>)); 3.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (1<sup>1</sup>)); 5.52 (s, 1H, CH(5)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 23.3 (C(7)); 27.3 (C(2' or 3')); 28.3 (C(2 or 3)); 30.4 (C(7)); 33.3 (C(2 or 3)); 37.6 (C(2' or 3')); 51.4 (C(1<sup>1</sup>, 1<sup>1</sup>)); 57.4 (C(5)); 99.4 (C(5)); 172.6 (C(1<sup>1</sup>, 1<sup>1</sup>)); 186.9 (C(6)); 194.9 (C(4)); 201.6 (C(6')); 202.1 (C(4')). MS (EI) 173(5); 172(29); 147(4); 141(18); 140(23); 125(17); 115(20); 99(41); 85(100); 70(15); 69(19); 61(17); 59(22); 55(39); 45(11); 43(100).

**3-Nitropropionyl chlorid (34)**. To 3-nitropropionic acid (2.4 g, 10 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml) and dimethylformamide (1 drop) were added under N<sub>2</sub>. The solution was ice cooled and oxalyl chlorid (2.8 g, 22 mmol) were added in 30 min. The mixture was stirred at r.t., then the solvent was evaporated. Bulb to bulb distillation under reduced pressure gave the product **34** (2.35 g, 88 %) as a colourless liquid.

B.p. (0.1 mmHg) : 60 - 70°C ([54] (4 mmHg) 78°C). IR (film) : 3026m, 2979m, 2932m, 1788s, 1561vs, 1425s, 1378s, 1359s, 1246m, 1202m, 1070s, 1005s, 944s, 896m, 863s, 713s, 652m, 620m, 588m, 532m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.56 (t, <sup>3</sup>J = 5.9, 2H, CH<sub>2</sub> (2)); 4.67 (t, <sup>3</sup>J = 5.9, 2H, CH<sub>2</sub>(3)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 42.6 C(2); 68.9 C(3); 170.9 C(1).

**6-Nitro-2,4-hexandione (12)**. To an ice-NaCl cooled solution of 2-trimethylsilyloxypropen (1.24 g, 9.5 mmol) in THF (10 ml), a solution of methylolithium (1.6 m, 6.26 ml, 10 mmol) in diethylether were added dropwise. The solution was stirred for 1 h at r.t.. The mixture was the cooled at -90°C and a solution of 3-nitropropionylchlorid (**34**, 1.19 g, 10 mmol) in THF (20 ml) was added at the same temperature. The mixture was taken to -60°C in 1h, and HCl (1 M, 30 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 ml) were added. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 · 30 ml). The organic phase was washed with a conc. solution of NaCl (30 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, AcOEt - hexane, 1 : 1) gave the product **12** (200 mg, 13 %) as a orange solid.

R<sub>f</sub> (AcOEt- hexane 3 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.51. M.p. < 25°C. IR (film) : 3037w, 3010w, 2976w, 2920w, 1729s, 1708s, 1627s, 1556vs, 1423s, 1377s, 1303m, 1252m, 1212m, 1145m, 1011m, 956m, 921m, 887m, 870m, 793m, 490m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (82 %) 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(1)); 3.00 (t, <sup>3</sup>J = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub>(5)); 4.67 (t, <sup>3</sup>J = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub> (6)); 5.55 (s, 1H, CH(3)); 14.87 (s, 1H, HO); diketon (18 %) 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(1)); 3.17 (t, <sup>3</sup>J = 5.9, 2H, CH<sub>2</sub>(5)); 3.69 (s, 2H, CH(3)) 4.64 (t, <sup>3</sup>J = 5.8, 2H, CH<sub>2</sub>(6)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT, HETCOR) : enol form 23.2 C(1); 35.5 C(5); 69.5 C(6); 99.9 C(3); 186.6, 192.5 C(2), C(4); diketon 30.9 C(1); 39.1

C(5); 57.5 C(3); 68.7 C(6); 199.5, 201.4 C(2), C(4). MS (ESI(+)) : 160 [M+1]<sup>+</sup>, 144 [M+1-CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 130 [M+1-NO]<sup>+</sup>, 117 [M+1-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 113 [M+1-HNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 60 [CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 59.

**5-Methyl-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (35).** To magnesium ethylate (6.3 g, 55 mmol) were added diethylether (20 ml) and 3-methyl-2,4-pentandione **6**, 5.7 g, 50 mmol) under N<sub>2</sub>. After 3 h at r.t., the solution was stirred for 1 h at 40°C, then cooled at -15°C; a solution of 3-methylcarbonylpropionylchlorid (9.03 g, 60 mmol) in diethylether (10 ml) was added. The solution was brought to r.t. in 20 h, then acidified at pH = 1 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M). The aqueous phase was extracted with diethylether (2 · 30 ml). The organic phase was stirred for 15 min with a solution of NH<sub>3</sub> (10 %, 50 ml). The aqueous solution was taken out and the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. The crude orange liquid was distilled at reduced pressure to obtain the product **35** (3.04 g, 33 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt -hexane 3 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.52. B.p. (0.07 mmHg) : 83°C. IR (film) : 3450w, 2990w, 2955m, 1737vs, 1703s, 1615m, 1439s, 1360s, 1321m, 1213s, 1171s, 1082m, 1019m, 987m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketon (67%) 1.23 (*d*, <sup>3</sup>J = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 2.09 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.48-2.56 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.62-2.77 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.56 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(9)); 3.64 (*q*, <sup>3</sup>J = 7.1, 1H, HC(5)); enol form (33 %) 1.76 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 1.98 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.48-2.56 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.62-2.77 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.58 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(9)); 16.08 (*s*, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : diketon 12.3 C(8), 27.4 C(2); 28.3 C(7); 35.8 C(3); 51.5 C(9); 61.0 C(5); 172.6 C(1); 204.6, 205.3 C(4), C(6); enol form 12.0 C(8); 21.6 C(7); 28.1 C(2); 31.5 C(3); 51.5 C(9); 104.2 C(5); 173.1 C(1); 184.8, 195 C(4); C(6). MS (EI) : 188 (18), 187 (52, [M+1]<sup>+</sup>), 186 (23), 156 (64), 155 (97, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 154 (41), 146 (10), 145 (64), 144 (85, [M-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 143 (33), 140 (17), 139 (23), 130 (12), 129 (18), 128 (21), 127 (36), 126 (55, [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 125 (46), 124 (22), 117 (12), 116 (87), 115 (100, [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 114 (35), 113 (85), 112 (90, [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 111 (18), 101 (14), 99 (42, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 87 (53, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 84 (15), 83 (22), 71 (10, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>), 59 (30), 57 (17), 56 (21), 55 (70).

**5-Methyl-4,6-dioxoheptanoic acid (13).** To 5-methyl-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (**35**, 410 mg, 2.2 mmol) were added phosphate buffer (50 ml, 0.1 M, pH = 7.8), and a solution of PLE (pig liver esterase, 2 mg, 130 U/mg) in ammonium sulfate buffer (3 M). The pH was maintained constant by adjunction of NaOH (0.25 M). After 4 h the solution was acidified to pH = 1.5 with concentrated HCl. The solution was saturated with NaCl and extracted with ethylacetate (4 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH, 97 : 3) of the yellowish liquid (420 mg) gave a crude white product (280 mg) which was recrystallized in chloroform and tetrachloromethane. The product **13** was obtained as a white solid (170 mg, 45 %).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.42. M.p. : 62°C. IR (KBr) : 3700-2300m(br) (3041), 2950m, 2932m, 2774w, 2692w, 1705vs, 1615m, 1446m, 1397s, 1373m, 1356m, 1333m, 1304m, 1260m, 1245m, 1181m, 976m, 947m, 931m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketon (71 %) 1.33 (*d*, <sup>3</sup>J = 7.1, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 2.17 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.62-2.71 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.68-2.84 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.71 (*q*, <sup>3</sup>J = 7.1, 1H, CH(5)); 10.70-11.35 (*s/l*), 1H, OH); enol form (29 %) 1.83 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 2.07 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.62-2.71 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.73-2.81 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 10.70-11.35 (*s/l*), 1H, COOH(1)); 16.15 (*s*, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : diketon 12.5 C(8); 27.7 C(2); 28.5 C(7); 35.6 C(3); 61.3 C(5); 178.5 C(1); 205.1, 205.2 C(4), C(6); enol form 12.2 C(8);

21.8 C(7); 28.3 C(2); 31.5 C(3); 104.4 C(5); 179.0 C(1); 184.7, 195.2 C(4), C(6). MS (ESI(-)) : ms 171 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (171) 129 [M-1-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 99 [C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (171, 99) 55 [C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>-</sup>.

**5-Fluoro-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (14).** To selectfluor (**32**, 3.9 g, 11 mmol) were added 4,6-dioxoheptanoic acid methylester (**11**, 1.72 g, 10 mmol) and acetonitrile (60 ml) under N<sub>2</sub>. The solution was stirred for 24 h at r.t. and then the solvent was evaporated. The solid was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) and HCl (1 M, 30 ml) was added. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × 30 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>2</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 4 : 1) gave a colourless liquid (1 g, 53 %) which was distilled bulb to bulb under reduced pressure to get a mixture of mono- and difluoro compound (830 mg, 44 %). The difluoro compound was eliminated by dissolving first the mixture in diethylether (10 ml), then extracting it with NaOH (1 M, 2 × 10 ml) and finally acidifying it with HCl (32 %). Extraction with ethylacetate and distillation gave the product **14** (505 mg, 27 %) as a colour less oil.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 1 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.36. B.p. (0.05 mmHg) : 70 - 80°C. IR (film) : 3005m, 2958s, 2852w, 1724vs, 1660m, 1605m, 1440s, 1417s, 1362s, 1324s, 1212s, 1180s, 1131s, 1090s, 1014s, 990m, 965m, 847m, 617m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketon (84 %) 2.26 (d, <sup>4</sup>J = 3.9, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.53-2.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.75-2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 5.27 (d, <sup>2</sup>J = 50.1, 1H, CH(5)); enol form (16 %) 2.08 (d, <sup>4</sup>J = 3.9, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.53-2.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.75-2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 12.51 (s/l, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketon 26.0 C(7), 27.1 C(d, <sup>4</sup>J = 2.1, 1C, C(2)); 33.1 C(3); 51.8 C(8); 98.3 (d, <sup>1</sup>J = 200, 1C, C(5)); 172.3 C(1); 198.8 (d, <sup>2</sup>J = 22, 1C, C(4 or 6)); 200.0 (d, <sup>2</sup>J = 23, 1C, C(6 or 4)); enol form 17.8 C(7); 27.4 C(2); 29.1 C(3); 51.7 C(8); 143.3 (d, <sup>1</sup>J = 225, 1C, C(5)); 172.6 C(1); 186.5 C(6 or 4). <sup>19</sup>F-RMN (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : diketon -118.36 (d(m), <sup>2</sup>J = 50.2, 1F, CF(5)); enol form -99.33 (s, 1F, CF(5)). MS (EI) : 191 (20, [M+1]<sup>+</sup>), 159 (21, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 158 (11), 148 (11, [M-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 130 (11), 129 (13, [M-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>FO]<sup>+</sup>), 117 (19), 116 (23), 115 (100, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 103 (18, [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>FO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 87 (25, [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

**5,5-Dimethyl-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (36).** To a solution sodium hydrid (112 mg, 4.66 mmol) in THF (20 ml) cooled at -25°C under N<sub>2</sub>, 5-methyl-4,6-dioxoheptanoic methylester (**35**, 791 mg, 4.25 mmol) was added dropwise. The solution was kept at -10°C for 45 min, then cooled at -30°C. Iodomethane (908 mg, 6.4 mmol) was added, and the mixture was taken to 0°C in 90 min, then stirred for 14 h at r.t.; diethylether (75 ml) was added. The solution was washed with water (25 ml), with NaOH (1 M, 2 × 25 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 2 : 1) gave the product **36** (600 mg, 71 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.58. B.p. (0.05 mmHg) : 70 - 80°C. IR (film) : 2981w, 2955w, 1739s, 1722s, 1700vs, 1467m, 1439m, 1387m, 1368m, 1358m, 1221m, 1173m, 1128m, 1081m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.35 (s, 6H, CH<sub>3</sub>(8, 9)); 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.56 (" t", <sup>3</sup>J ≅ 6.2, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.71 (" t", <sup>3</sup>J ≅ 6.5, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(10)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 21.4 C(8, 9), 26.1 C(7); 27.6 C(2); 33.0 C(3); 51.7 C(10); 62.1 C(5); 172.9 C(1); 207.6, 208.1 C(4), C(6). MS (EI) : 201 (2, [M+1]<sup>+</sup>), 169 (8, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 158 (36, [M-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 127 (34), 126 (52, [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 115 (100, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 111 (38), 87 (22), 86 (21), 85 (13), 71 (26), 70 (18), 69 (13), 59 (38), 57 (11), 56 (10), 55 (72).

**5,5-Dimethyl-4,6-dioxoheptanoic acid (15).** To 5,5-dimethyl-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (**36**, 580 mg, 2.9 mmol) were added phosphate buffer (40 ml, 0.1 M, pH = 7.8) and a solution of PLE (0.3 ml, 2.5 mg, 130 U/mg). The pH was kept constant by addition of NaOH (0.25 M). After 4 h, the solution was acidified with conc. HCl to pH = 1.5, saturated with NaCl and finally extracted with ethylacetate (3 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH, 97 : 3) gave the product **15** (350 mg, 64%) as a white solid.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.47. IR (film) : 3700-2400m(br), 2982m, 2938m, 1698vs, 1469m, 1401m, 1368m, 1359m, 1234m, 1167m, 1129m, 1079m, 968m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.35 (*s*, 6H, CH<sub>3</sub>(8, 9)); 2.10 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.60-2.63 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.69-2.72 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 9.5-10.9 (*s/l*), 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : 21.3 C(8, 9), 26.1 C(7); 27.7 C(2); 32.8 C(3); 62.1 C(5); 178.5 C(1); 207.7, 207.9 C(4), C(6). MS (DCI) : 204 (15, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 187 (10, [M+1]<sup>+</sup>), 170 (10), 169 (15, [M-HO]<sup>+</sup>), 128 (10), 127 (49, [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 126 (43), 111 (13), 101 (12, [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 87 (53), 86 (100, [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O]<sup>+</sup>), 85 (82), 84 (12), 83 (10), 78 (10), 73 (15), 71 (17), 70 (38), 69 (28), 68 (10), 58 (23), 57 (20), 56 (62), 55 (56).

**5,5,7-Trimethyl-4,6-dioxooctanoic acid methylester (37).** To an ice cooled solution of diisopropylamine (607 mg, 6 mmol) in THF (10 ml), a solution of butyllithium in hexane (1.5 M, 4 ml, 6 mmol) was added. The solution was first stirred for 30 min at 0°C, then at r.t. for 30 min. The solution was cooled at -50°C and diisopropylacetone (685 mg, 6 mmol) was added in 10 min. After 30 min, the solution was cooled at -80°C and a solution of 3-methoxycarbonylpropionylchlorid (903 mg, 6 mmol) in THF (20 ml) was added in 15 min at the same temperature. The mixture was taken to -60°C in 1 h; HCl (1 M) and diethylether (50 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (30 ml). The organic phase was washed with a concentrated solution of NaCl (20 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Bulb to bulb distillation gave the product **37** (1.05 g, 77%) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, KMnO<sub>2</sub>) : 0.62. B.p. (0.02 mmHg) : 80°C. IR (film) : 2977m, 2938m, 2877m, 1741s, 1720s, 1698vs, 1643m, 1470m, 1439m, 1412m, 1384m, 1369m, 1217m, 1174m, 1093m, 1039m, 1001m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.00 (*d*, <sup>3</sup>J = 6.7, 6H, CH<sub>3</sub>(8, 11)); 1.34 (*s*, 6H, CH<sub>3</sub>(9, 10)); 2.52 (*t*, <sup>3</sup>J = 6.5, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.71 (*t*, <sup>3</sup>J = 6.5, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 2.85 (*hept*, <sup>3</sup>J = 6.7, 1H, CH(7)); 3.63 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(12)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT, HETCOR) : 20.0 C(8, 11); 21.4 C(9, 10); 27.7 C(2); 33.3 C(3); 36.3 C(7); 51.7 C(12); 62.2 C(5); 172.9 C(1); 208.3, 214.3 C(4), C(6). MS (EI) : 229 (3, [M+1]<sup>+</sup>), 158 (9, [M-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>), 126 (18, [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 115 (28, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 111 (11), 97 (9), 87 (16), 86 (14), 85 (10), 84 (13), 83 (12), 72 (38, [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O]<sup>+</sup>), 60 (12), 59 (100), 58 (13), 56 (22).

**5,5,7-Trimethyl-4,6-dioxooctanoic acid (16).** To 5,5,7-trimethyl-4,6-dioxooctanoic acid methylester (**37**, 507 mg, 2 mmol) were added phosphate buffer (40 ml, 0.1 M, pH = 7.8) and a solution of PLE (0.25 ml, 2.5 mg, 130 U/mg). The pH was kept constant by addition of NaOH (0.25 M). After 10 h, the solution was taken to a pH = 9.5 and extracted with diethylether (20 ml), acidified with conc. HCl to pH = 1.5, saturated with NaCl and finally extracted with ethylacetate (4 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH, 95 : 5) gave the product **16** (330 mg, 77%) as a white solid.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.35. M.p.: 47°C. IR (KBr) : 3650-2400m(br) (3042), 2940s, 2876m, 2770m, 2688m, 1693vs, 1469m, 1419s, 1409s, 1383m, 1344m, 1261s, 1241s, 1207m, 1088m, 1103s, 938s. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) : 0.95 (*d*, <sup>3</sup>J = 6.7,

6H, CH<sub>3</sub>(8, 11)); 1.31 (s, 6H, CH<sub>3</sub>(9, 10)); 2.40 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.74 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 2.87 (*hept.*, <sup>3</sup>*J* = 6.7, 1H, CH(7)); 12.0-12.25 (*s(l)*, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO, HETCOR) : 20.0 C(8, 11); 21.1 C(9, 10); 27.7 C(2) (*h*); 33.0 C(3) (*h*); 36.0 C(7); 61.5 C(5); 173.5 C(1) (*h*); 209.6, 214.2 C(4), C(6). MS (DCI) : 233 (16), 232 (78, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 216 (11), 215 (100, [M+1]<sup>+</sup>), 197 (15, [M-HO]<sup>+</sup>), 144 (10, [C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 127 (16), 126 (30, [C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 99 (10), 98 (12), 97 (10), 88 (16), 87 (20, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 71 (21, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>), 70 (12), 58 (16), 55 (17).

**5,5-Difluoro-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (17).** To an ice cooled solution of sodium hydride (50.4 mg, 2.1 mmol) in THF (15 ml), 5-fluoro-4,6-dioxoheptanoic acid methylester (**14**, 400 mg, 2.1 mmol) was added under N<sub>2</sub>. After 30 min a solution of selectfluor (**32**, 820 mg, 2.3 mmol) in dimethylformamide (5 ml) was added. The mixture was stirred for 20 h at r.t., then water (30 ml) and diethylether (60 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (3 × 30 ml). The organic phase was washed with a conc. solution of NaCl (3 × 30 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Bulb to bulb distillation gave the product **17** (230 mg, 53 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.56. B.p. (0.05 mmHg) : 60°C. IR (film) : 3002w, 2959m, 2855w, 1746vs, 1741s, 1417m, 1364s, 1332m, 1220s, 1175s, 1153s, 1121s, 1090s, 1021m, 992m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.38 (*t*, <sup>4</sup>*J* = 1.7, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.67 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.99 (*" l"*, <sup>3</sup>*J* = 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.67 (*s*, 3H, CH(8)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 24.9 C(7), 26.9 C(2); 32.4 C(3); 52.1 C(8); 109.8 (*t*, *J* = 265, 1C, C(5)); 172.1 C(1); 196.1 (*t*, <sup>2</sup>*J* = 28, 1C, C(4 or 6)); 197.4 (*t*, <sup>2</sup>*J* = 28, 1C, C(6 or 4)). <sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : -39.98 (*s*, 2F, CF<sub>2</sub>(5)). MS (ESI(+)) : ms 209 [M+1]<sup>+</sup>, ms-ms (209) 195 [M+1-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 177 [M+1-CH<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>, 135 [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>F<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**4-Oxo-4-(2-oxocyclohexyl)butyric acid methylester (38).** To *N*-morpholine cyclohexene (4.18 g, 50 mmol), CHCl<sub>3</sub> (50 ml) and triethylamine (6.08 g, 60 mmol) were added [Hünig, 1959 #1111]. The mixture was stirred for 30 min at 35°C. A solution of 3-methoxycarbonylpropionylchlorid (8.28 g, 55 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (20 ml) was added in 10 min. After 1 h at 35°C, the solution was stirred at r.t. for 16 h, then HCl (20 %, 24 ml) was added, the mixture was stirred for 6 h at 65°C. After cooling, water (80 ml) was added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with CHCl<sub>3</sub> (3 × 100 ml). The organic phase was washed with HCl (1 M, 2 × 50 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Distillation at reduced pressure gave the product **38** (5.83 g, 52 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 3 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.58. M.p. (0.05 mmHg) : 99 - 100°C. IR (film) : 2941s, 2863s, 1733vs, 1615vs, 1417s, 1368s, 1213s, 1163vs, 1073m, 1027m, 991s, 964m, 922m, 878m, 848m, 825m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : enol form (89 %) 1.62-1.67 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(8, 9)); 2.28-2.33 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(10, 7)); 2.61 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.6, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.74 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.7, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.67 (*s*, 3H, CH<sub>2</sub>(11)); 15.36 (*s*, 1H, OH); diketone (11 %) 3.52 (*dd*, <sup>3</sup>*J* = 9.1, <sup>3</sup>*J* = 5.8, 1H, CH(5)); 3.64 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(11)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT, HETCOR) : enol form 21.3, 22.5 C(8), C(9); 23.3 C(10); 27.6 C(2); 30.2 C(7); 32.1 C(3); 51.6 C(11); 106.5 C(5); 173.3 C(1); 178.9 C(4); 200.5 C(6); diketone 23.0, 26.9, 28.7; 37.0 C(3); 42.0 C(7); 63.3 C(5); 173.0 C(1); 205.5, 208.0 C(4), C(6). MS (EI) : 212 (32, M<sup>+</sup>), 181 (19), 180 (23, [M-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>), 152 (44, [M-CH<sub>3</sub>OH-CO]<sup>+</sup>), 125 (100, [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 124 (28), 115 (30, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 97 (23, [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>), 79 (33), 77 (28), 69 (34, [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>), 67 (28), 59 (34), 55 (73).

**4-Oxo-4-(2-oxocyclohexyl)butyric acid (18).** To 4-oxo-4-(2-oxo cyclohexyl)butyric acid methylester (**38**, 1.2 g, 5.65 mmol), phosphate buffer (0.1 M, pH=7.8, 50 ml) and PLE (3 mg, 130 U/mg) in a ammonium sulfate buffer (3 M, 0.3 ml) were added. The pH was maintained constant by adjunction of a solution of NaOH (0.5 M). After 5 h, the mixture was acidified with conc. HCl to pH=1.5. The solution was saturated with NaCl and extracted with AcOEt (4 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Crystallization in AcOEt and hexane (twice) gave the product **18** (675 mg, 60 %) as a white solid.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 8 : 2, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.61. M.p. : 123 - 124°C ([55] 121-123°C). IR (film) : 3600-2400m(br) (3042), 2951m, 2936m, 2870m, 1708vs, 1624m, 1590m, 1438m, 1412m, 1396m, 1377m, 1353m, 1292m, 1255s, 1244s, 1206m, 1175m, 1131m, 928m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (89 %) 1.68-1.77 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(8, 9)); 2.39 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 5.7, 2H, CH<sub>2</sub>(7 or 10)); 2.41 (*"t"*, <sup>3</sup>*J*<sub>1</sub> = 4.6, 2H, CH<sub>2</sub>(10 or 7)); 2.57 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.81 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 11.95-12.50 (*s/l*), 1H, COOH); 15.51 (*s*, 1H, HO); diketon (11 %) 3.86 (*t*, <sup>3</sup>*J* ≅ 7.9, 1H, CH(5)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form 21.2, 22.2 C(8), C(9); 23.8 C(7 or 10); 27.6 C(2); 29.9 C(10 or 7); 32.3 C(3); 106.7 C(5); 173.9 C(1); 177.9 C(4); 202.1 C(6); diketon 22.9, 26.7, 27.8, 28.5 C(2, 8, 9, 10); 37.2 C(3); 41.8 C(7); 62.4 C(5); 173.8 C(1); 206.9, 208.8 C(4), C(6). MS (EI) : 198 (60, M<sup>+</sup>), 180 (30, [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 152 (36, [M-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup>), 151 (31), 125 (100, [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 124 (31), 97 (30, [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>), 96 (22), 91 (25), 83 (46, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>), 81 (22), 79 (45, [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 77 (37), 73 (28), 70 (35), 69 (44, [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>), 67 (27), 56 (45).

**2-(3-Nitropropionyl)-cyclohexanone (19).** To THF (15 ml), diisopropylamine (455 mg, 4.5 mmol) was added [56]. After cooling with ice, butyllithium in hexane (1.5 M, 3 ml, 4.5 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred first for 30 min at 0°C, then for 30 min at r.t.. The solution was cooled to -60°C and cyclohexanone (442 mg, 4.5 mmol) in THF (5 ml) was added. After 30 min, the mixture was cooled to -90°C and 3-nitropropionyl chlorid (**34**) (536 mg, 4.5 mmol) in THF (10 ml) was added during 15 min. The solution was taken to -60°C in 90 min., then HCl (1 M, 30 ml) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 ml) were added. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 · 30 ml); the organic phase was washed with a solution of saturated NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, diethylether - CCl<sub>4</sub>, 3 : 1) gave an orange solid which then was crystallized in hexane and diethylether. The product **19** (80 mg, 9 %) was obtained as a pink solid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane, 3 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.59. M.p. : 48°C. IR(film) : 2941m, 2923m, 2855w, 1622vs, 1560s, 1445m, 1424s, 1390m, 1375m, 1338m, 1302m, 1268m, 1250m, 1219m, 1170m, 871m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (97 %) 1.68-1.73 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(4), CH<sub>2</sub>(5)); 2.33-2.37 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(3), CH<sub>2</sub>(6)); 3.10 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.2, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 4.70 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.2, 2H, CH<sub>2</sub>(9)); 15.08 (*s*, 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : enol form 21.3, 22.5 C(4), C(5); 23.3 C(3); 30.3 C(6); 33.8 C(8); 69.1 C(9); 106.4 C(2); 180.2 C(7); 197.1 C(1).

**4-(2-Oxocycloheptyl)-4-oxobutyric acid methylester (39).** To THF (10 ml), diisopropylamine (1.52, 15 mmol) was added under N<sub>2</sub>. After cooling with ice, butyllithium in hexane (1.5 M, 10 ml, 15 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 30 min at r.t., then the solution was cooled to -60°C and cycloheptanone (1.68 g, 15 mmol) in THF (5 ml) was added. After 30 min, the mixture was cooled to -80°C and 3-methoxycarbonylpropionylchlorid (2.26 g, 15 mmol) in THF (10 ml). The solution was taken to -40°C during 90 min, then NH<sub>4</sub>Cl (10 %, 30 ml) and diethylether (70 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (3 · 50 ml);

the organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 5 : 1) gave a colourless liquid which then was distilled bulb to bulb. The product **39** (1.2 g, 35 %) was obtained.

$R_f$  (AcOEt - hexane 2 : 1,  $\text{KMnO}_4$ ) : 0.59. B.p. (0.03 mmHg) : 110°C. IR(film) : 2926s, 2854m, 1740vs, 1696m, 1596m, 1439s, 1366m, 1257m, 1206m, 1167s, 1134m, 1092m, 1070m, 1026m, 991m, 959m, 941m, 878m, 846m, 831m.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY) : enol form (55-60 %) 1.44-1.50 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(10)$ ); 1.53-1.59 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(8)$ ); 1.62-1.69 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(9)$ ); 2.30-2.32 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(11)$ ); 2.40-2.43 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(7)$ ); 2.53 (*t*,  $^3J = 7.1$ , 2H,  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.69 (*t*,  $^3J = 7.1$ , 2H,  $\text{CH}_2(3)$ ); 3.59 (*s*, 3H,  $\text{CH}_2(12)$ ); 16.34 (*s*, 1H, OH); diketon (40-45 %) 1.22-1.34 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(10)$ ); 1.28-1.39 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(9)$ ); 1.72-1.84 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(11)$ ); 1.72-1.87 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(9)$ ); 1.73-1.90 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(8)$ ); 1.78-1.90 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(10)$ ); 1.94-2.07 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(11)$ ); 2.40-2.57 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(7)$ ); 2.41-2.57 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.62-2.80 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(3)$ ); 3.56 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3(12)$ ); 3.61 (*dd*,  $^3J = 10.9$ ,  $^3J = 4.1$ , 1H, CH(5)).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HETCOR) : enol form 24.4 C(8); 25.7 C(11); 28.2 C(10); 28.6 C(2); 30.4 C(3); 31.4 C(9); 38.8 C(7); 51.5 C(12); 111.2 C(5); 173.0 C(1); 190.1, 195.7 C(4), C(6); diketon 24.6 C(8); 26.3 C(11); 27.5 C(2); 27.6 C(10); 29.7 C(9); 36.6 C(3); 43.0 C(7); 51.5 C(12); 66.3 C(5); 172.8 C(1); 205.0, 210.0 C(4), C(6). MS (EI) : 228 (25), 227 (100,  $[\text{M}+1]^+$ ), 226 (45), 209 (37,  $[\text{M-OH}]^+$ ), 196 (10), 195 (72,  $[\text{M-CH}_3\text{O}]^+$ ), 194 (13), 167 (17), 166 (28,  $[\text{M-C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ ), 165 (15), 139 (19,  $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$ ), 115 (99,  $[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3]^+$ ), 111 (14,  $[\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}]^+$ ), 87 (12), 55 (23).

**4-(2-Oxocycloheptyl)-4-oxobutyric acid (20)**. To 4-(2-oxocycloheptyl)-4-oxobutyric acid methylester (**39**, 1.22 g, 5.39 mmol), phosphate buffer (0.1 M, pH=7.8, 50 ml) and PLE (2 mg, 130 U/mg) in an ammonium sulfate buffer (3 M, 0.2 ml) were added. The pH was maintained constant by adjunction of a solution of NaOH (1 M). After 5 h 30, the mixture was acidified with conc. HCl to pH=1.5. The solution was saturated with NaCl and extracted with AcOEt (4 · 50 ml). The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated. Crystallization in AcOEt and hexane (twice) gave the product **20** (710 mg, 62 %) as a white solid.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH 9 : 1,  $\text{KMnO}_4$ ) : 0.40. M.p. : 87 - 88°C. IR(film) : 3600-2300m(br) (3033), 2971m, 2926m, 2866m, 2847m, 1714vs, 1585s, 1457m, 1412s, 1350m, 1333m, 1293m, 1250s, 1201m, 1183s, 983m, 966m, 943m.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY) : enol form (55 %) 1.52 (*qi*,  $^3J \cong 5.6$ , 2H,  $\text{CH}_2(10)$ ); 1.63 (*qi*,  $^3J \cong 5.5$ , 2H,  $\text{CH}_2(8)$ ); 1.72 (*qi*,  $^3J \cong 5.5$ , 2H,  $\text{CH}_2(9)$ ); 2.35-2.37 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(11)$ ); 2.45-2.51 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(7)$ ); 2.64 (*"t"*,  $^3J \cong 7.3$ , 2H,  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.75 (*"t"*,  $^3J \cong 7.0$ , 2H,  $\text{CH}_2(3)$ ); 11.57 (*s(l)*, 1H, COOH); 16.37 (*s*, 1H, COH); diketon (45 %) 1.27-1.37 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(10)$ ); 1.35-1.47 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(9)$ ); 1.46-1.56 (*m*, 1H,  $\text{CH}_A(8)$ ); 1.88-1.96 (*m*, 3H,  $\text{CH}_B(8)$ ,  $\text{CH}_B(9)$ ,  $\text{CH}_A(11)$ ); 1.88-1.96 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(10)$ ); 1.99-2.05 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(11)$ ); 2.53-2.68 (*m*, 4H,  $\text{CH}_2(2)$ ,  $\text{CH}_2(7)$ ); 2.59-2.68 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(3)$ ); 2.79-2.88 (*m*, 1H,  $\text{CH}_B(3)$ ); 3.67 (*dd*,  $^2J = 10.9$ ,  $^3J = 4.2$ , 1H, CH(5)); 11.57 (*s(l)*, 1H, OH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HETCOR) : enol form 24.5 C(8); 25.9 C(11); 28.2 C(10); 28.9 C(2); 30.3 C(3); 31.6 C(9); 38.9 C(7); 111.4 C(5); 178.9 C(1); 190.2, 195.8 C(4), C(6); diketon 24.8 C(8); 26.4 C(11); 27.7 C(10); 27.7 C(2); 29.8 C(9); 36.5 C(3); 43.0 C(7); 66.5 C(5); 172.6 C(1); 205.0, 210.5 C(4), C(6). MS (EI) : 212 (13,  $\text{M}^+$ ), 194 (15,  $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$ ), 166 (23,  $[\text{M-H}_2\text{O-CO}]^+$ ), 165 (10), 139 (48,  $[\text{M-C}_3\text{H}_5\text{O}_2]^+$ ), 124 (10), 112 (11), 111 (18,  $[\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}]^+$ ), 101 (14), 97 (12,  $[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}]^+$ ), 84 (13), 83 (17,  $[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}]^+$ ), 73 (12), 67 (12), 56 (11), 55 (100).

**4-(2-Oxocyclooctyl)-4-oxobutyric acid methylester (40)**. To THF (10 ml), diisopropylamine (1.52, 15 mmol) was added under  $\text{N}_2$ . After cooling with ice, butyllithium in hexane (1.5 M, 10 ml, 15 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred first for 30 min

at 0°C, then for 30 min at r.t.. The solution was cooled to -60°C and cyclooctanone (1.89 g, 15 mmol) in THF (5 ml) was added. After 30 min, the mixture was cooled to -80°C and 3-methoxycarbonylpropionylchlorid (2.26 g, 15 mmol) in THF (10 ml). The solution was taken to -50°C during 90 min, then NH<sub>4</sub>Cl (10 %, 30 ml) and diethylether (70 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (3 · 50 ml); the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 5 : 1) gave a colourless liquid which then was distilled bulb to bulb. The product **40** (1.95 g, 54 %) was obtained.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.61. B.p. (0.02 mmHg) : 120°C. IR(film) : 2927s, 2856m, 1741vs, 1694m, 1602s, 1473m, 1439s, 1413m, 1362s, 1334m, 1303m, 1220s, 1169s, 1144m, 1090m, 991m, 957m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : enol form (77 %) 1.43-1.53 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(9, 10)); 1.58 (*qi*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.0, 2H, CH<sub>2</sub>(11)); 1.72 (*qi*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.1, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 2.41-2.44 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(7)); 2.42 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.2, 2H, CH<sub>2</sub>(12)); 2.63 (*t*, <sup>3</sup>*J* = 6.8, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.81 (*"l"*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.9, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.67 (*s*, 3H, CH<sub>2</sub>(13)); 16.29 (*t*, <sup>4</sup>*J* = 0.9, 1H, HO); diketon (23 %) 1.33-1.44 (*m*, 1H, CH<sub>A</sub>(11)); 1.33-1.78 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(9, 10)); 1.64-1.78 (*m*, 1H, CH<sub>B</sub>(11)); 1.78-1.91 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 1.94-1.99 (*m*, 1H, CH<sub>A</sub>(12)); 2.13-2.25 (*m*, 1H, CH<sub>B</sub>(12)); 2.34 (*ddd*, <sup>2</sup>*J* = 13.1, <sup>3</sup>*J* = 5.7, <sup>3</sup>*J* = 3.7, 1H, CH<sub>A</sub>(7)); 2.50 (*dt*, <sup>2</sup>*J* = 17.3, <sup>3</sup>*J* = 6.4, 1H, CH<sub>A</sub>(2)); 2.58 (*dt*, <sup>2</sup>*J* = 17.3, <sup>2</sup>*J* = 6.4, 1H, CH<sub>B</sub>(2)); 2.73-2.77 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.63 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(3)); 3.67-3.71 (*m*, 1H, CH(5)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : enol form 24.4 C(12); 25.7 C(10); 26.3 C(9); 28.2 C(2); 28.5 C(8); 30.1 C(11); 31.4 C(3); 34.1 C(7); 51.6 C(13); 108.7 C(5); 173.2 C(1); 187.6, 196.8 C(4), C(6); diketon 24.5, 25.8, 26.4 C(9), C(10), C(11); 26.5 C(8); 27.5, 27.5 C(2), C(12); 36.3 C(3); 40.9 C(7); 51.6 C(3); 66.4 C(5); 172.8 C(1); 204.3, 212.8 C(4), C(6). MS (EI) : 241 (8), 240 (12, [M]<sup>+</sup>), 209 (16, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 180 (14, [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 153 (15, [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 137 (9), 125 (12), 124 (16, [M-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 115 (55, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 111 (31, [C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>), 109 (10), 96 (13), 95 (11), 91 (10), 87 (22, [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 83 (20), 82 (14), 81 (23), 79 (34), 77 (12), 69 (21), 68 (11), 67 (25), 59 (32), 56 (11), 55 (100).

**4-(2-Oxocyclooctyl)-4-oxobutyric acid (21).** To 4-(2-oxocycloheptyl)-4-oxobutyric acid methylester (**42**, 1.0 g, 4.16 mmol), phosphate buffer (0.1 M, pH=7.8, 50 ml) and PLE (25 mg, 19 U/mg) were added. The pH was maintained constant by adjunction of a solution of NaOH (1 M). After 24 h, the mixture was acidified with conc. HCl to pH=1.5. The solution was saturated with NaCl and extracted with AcOEt (4 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Crystallisation in AcOEt and hexane gave the product **21** (720 mg, 76 %) as a white solid.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.42. M.p. : 73°C. IR(film) : 3600-2300m(br) (3029), 2929s, 2910s, 2852s, 2767m, 2681m, 2589m, 1707vs, 1606s, 1480m, 1433s, 1411s, 1397s, 1364m, 1347s, 1331m, 1300m, 1261s, 1231s, 1215m, 1186m, 1172m, 1145m, 1088m, 947s, 888m, 852m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : enol form (77 %) 1.43-1.54 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>(9, 10)); 1.58 (*qi*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.0, 2H, CH<sub>2</sub>(11)); 1.69-1.76 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 2.42 (*t*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.2, 2H, CH<sub>2</sub>(12)); 2.43 (*t*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(7)); 2.68 (*"l"*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.8, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.82 (*"l"*, <sup>3</sup>*J* ≅ 6.6, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 16.25 (*s*, 1H, OH); diketon (23 %) 1.21-1.84 (*m*, 6H, CH<sub>2</sub>(9, 10, 11)); 1.79-1.90 (*m*, 1H, CH<sub>2</sub>(8)); 1.92-1.98 (*m*, 1H, CH<sub>A</sub>(12)); 2.14-2.25 (*m*, 1H, CH<sub>B</sub>(12)); 2.32 (*ddd*, <sup>2</sup>*J* = 13.0, <sup>3</sup>*J*<sub>7</sub> = 5.6, <sup>3</sup>*J* = 3.8, 1H, CH<sub>A</sub>(7)); 2.56-2.63 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.65-2.70 (*m*, 2H, CH<sub>B</sub>(7)); 2.73-2.79 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.69 (*dd*, <sup>3</sup>*J* = 12.1, <sup>3</sup>*J* = 2.8, 1H, CH(5)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : enol form 24.5 C(12); 25.8 C(10); 26.4 C(9); 28.4 C(2); 28.6 C(8); 30.1 C(11); 31.3 C(3); 34.2 C(7); 108.8 C(5); 179.0 C(1); 187.7, 196.7 C(4), C(6); diketo 24.6, 25.9, 26.4 C(9), C(10), C(11); 26.8 C(8); 27.4 C(12); 27.7 C(2); 36.0 C(3); 40.8 C(7); 66.5 C(5); 178.5 C(1); 204.2, 213.2 C(4), C(6). MS (ESI(-)) : ms 225 [M-]<sup>-</sup>, ms-ms (225) 207 [M-1-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 99 [C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>.

**4-(1-Methyl-2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid methylester (43).** To sodium hydrid (92 mg, 3.83 mmol), THF (15 ml) was added under N<sub>2</sub>. The suspension was cooled to -20°C and 4-(2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid methylester (**39**, 733 mg, 3.7 mmol) was added in 10 min. The mixture was heated to -10°C in 45 min, then cooled to -30°C and iodomethane (788 mg, 5.55 mol) was added. The mixture was taken to 0°C in 1 h 45, stirred for 14 h at r.t., then a solution of saturated NaCl (30 ml) and diethylether (50 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (2 × 50 ml). The organic phase was washed with a solution of saturated NaCl (30 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 2 : 1) gave the product **43** (660 mg, 84 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 3 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.60. B.p. (0.08 mmHg) : 114°C. IR (film) : 2941m, 2869m, 1739s, 1720m, 1698vs, 1452m, 1438m, 1212m, 1172m, 1124m, 1075m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(11)); 1.37-1.44 (m, 1H, CH<sub>A</sub>(10)); 1.55-1.65 (m, 1H, CH<sub>A</sub>(9)); 1.55-1.68 (m, 2H, CH<sub>A</sub>(8)); 1.89-1.97 (m, 1H, CH<sub>B</sub>(9)); 2.32-2.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(7)); 2.42-2.56 (m, 1H, CH<sub>B</sub>(10)); 2.42-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.68-2.80 (m, 1H, CH<sub>B</sub>(3)); 3.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(12)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : 21.1 C(11); 22.1 C(8); 27.1 C(9); 27.4 C(2); 32.5 C(3); 36.8 C(10); 41.1 C(7); 51.6 C(12); 63.1 C(5); 173.8 C(1); 207.6, 210.2 C(4), C(6). MS (DCI) : 244 (60, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 227 (80, [M+1]<sup>+</sup>), 195 (29, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 132 (16), 115 (30, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 100 (41), 99 (74, [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 58 (22), 56 (30), 55 (100).

**4-(1-Methyl-2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid (22).** To 4-(1-methyl-2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid methylester (**40**, 500 mg, 2.2 mmol), phosphate buffer (0.1 M, pH=7.8, 40 ml) and PLE (2 mg, 130 U/mg) in an ammonium sulfate buffer (3 M, 0.2 ml) were added. The pH was maintained constant by adjunction of a solution of NaOH (0.25 M). After 6 h, the mixture was acidified with conc. HCl to pH=1.5. The solution was saturated with NaCl and extracted with AcOEt (3 × 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH, 97 : 3 → 96 : 4) and crystallization in CHCl<sub>3</sub> - hexane gave the product **22** (288 mg, 61 %) as a white solid.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) : 0.54. M.p. : 82°C. IR (film) : 3600-2400m(br) (3041) 2950s, 2934s, 2866m, 1709s, 1693vs, 1455m, 1447m, 1434s, 1398s, 1365m, 1347m, 1293m, 1260s, 1224s, 1124m, 1078m, 1008m, 988m, 976m, 949m, 931m, 907m, 847m, 662m, 532m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (11)); 1.42-1.51 (m, 1H, CH<sub>A</sub>(10)); 1.60-1.69 (m, 1H, CH<sub>A</sub>(9)); 1.60-1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 1.93-2.02 (m, 1H, CH<sub>B</sub>(9)); 2.32-2.41 (m, 1H, CH<sub>A</sub>(7)); 2.42-2.54 (m, 2H, CH<sub>B</sub>(7), CH<sub>B</sub>(10)); 2.56-2.70 (m, 3H, CH<sub>2</sub>(2), CH<sub>A</sub>(3)); 2.75-2.85 (m, 1H, CH<sub>B</sub>(3)); 8.45-11.30 (s(l), 1H, OH). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : 21.2 C(11); 22.1 C(8); 27.2 C(9); 27.6 C(2); 32.4 C(3); 36.8 C(10); 41.2 C(7); 63.2 C(5); 178.5 C(1); 207.5, 210.5 C(4), C(6). MS (EI) : 212 (5, M<sup>+</sup>), 194 (4, [M-H<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 166 (6, [M-CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 151 (13, [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 112 (78, [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 101 (29, [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 97 (53, [C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 84 (18), 83 (26), 73 (16), 69 (22), 58 (20), 55 (100).

**4-(1-Fluoro-2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid methylester (23).** To NaH (48 mg, 2 mmol), THF (15 ml) was added under N<sub>2</sub>. The suspension was cooled to -20°C and 4-(2-oxocyclohexyl)-4-oxobutyric acid methylester (**39**, 425 mg, 2 mmol) was added in 10 min. The mixture was heated to -10°C in 45 min, then cooled to -30°C and selectfluor (**32**, 708 mg, 2 mmol) in dimethylformamide (3 ml) was added. The mixture was stirred for 72 h at r.t., then a solution of aqueous HCl (40 ml) and diethylether (150 ml) were added.

The aqueous phase was extracted with diethylether (50 ml). The organic phase was washed with a solution of saturated NaCl (2 · 30 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane - AcOEt, 2 : 1) gave the product **23** (285 mg, 62 %) as a colourless liquid.

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.62. IR (film) : 2954s, 2871m, 1737vs, 1719s, 1439s, 1421m, 1358s, 1316m, 1257m, 1212s, 1175s, 1136m, 1114s, 1071m, 1023m, 990m, 974m, 958m, 899m, 850m, 840m, 608m, 438m, 416m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY) : 1.71-1.82 (*m*, 1H, CH<sub>A</sub>(8)); 1.82-1.90 (*m*, 1H, CH<sub>A</sub>(9)); 1.91-2.04 (*m*, 3H, CH<sub>B</sub>(8), CH<sub>B</sub>(9), CH<sub>A</sub>(10)); 2.39-2.47 (*m*, 1H, CH<sub>B</sub>(10)); 2.55 (*ddd*, <sup>2</sup>*J* = 17.4, <sup>3</sup>*J* = 6.9, <sup>3</sup>*J* = 5.4, 1H, CH<sub>A</sub>(2)); 2.64 (*ddd*, <sup>2</sup>*J* ≅ 17.2, <sup>3</sup>*J* = 8.1, <sup>3</sup>*J* = 5.0, 1H, CH<sub>B</sub>C(2)); 2.80 (*dddd*, <sup>2</sup>*J* = 19.4, <sup>3</sup>*J* = 6.9, <sup>3</sup>*J* = 5.0, <sup>4</sup>*J* = 2.9, 1H, CH<sub>A</sub>(3)); 2.05 (*dddd*, <sup>2</sup>*J* = 19.4, <sup>3</sup>*J* = 8.0, <sup>3</sup>*J* = 5.3, <sup>4</sup>*J* = 3.5, 1H, CH<sub>B</sub>(3)); 3.66 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(11)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : 21.1 (*d*, <sup>3</sup>*J* = 8, 1C, C(9)); 26.3 C(8); 27.0 (*d*, <sup>4</sup>*J* = 3, 1C, C(9)); 32.8 C(3); 36.0 (*d*, <sup>2</sup>*J* = 20, 1C, C(10)); 40.1 C(7); 101.7 (*d*, <sup>1</sup>*J* = 197, 1C, C(5)); 172.6 C(1); 202.2 (*d*, <sup>2</sup>*J* = 18, 1C, C(4 or 6)); 204.7 (*d*, <sup>2</sup>*J* = 30, 1C, C(6 or 4)); MS (DCI) : 248 (6, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 231 (36, [M+1]<sup>+</sup>), 211 (16, [M-F]<sup>+</sup>), 182 (10, [M-CHFO]<sup>+</sup>), 150 (20, [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>FO]<sup>+</sup>), 129 (11), 116 (31), 115 (100, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 88 (13), 87 (32), 86 (33, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>F]<sup>+</sup>), 73 (32), 72 (12), 65 (11), 60 (34), 59 (40), 57 (11), 56 (59), 55 (76).

**3-Acetyllevulinic acid methylester (41)**. To a solution of acetylacetone (5 g, 50 mmol) in acetone (30 ml) with potassium iodid (1.7 g, 10 mmol) and potassium carbonate (3.3 g, 30 mmol), methylbromoacetate (5 g, 30 mmol) was added dropwise during 1 min. The mixture was stirred for 8 h at 60°C. The solution was filtered. Purification by bulb to bulb distillation (p = 0.1 mbar, T = 120°C) and chromatography (silica gel; hexane - AcOEt 2 : 1) gave the product **41** (2.7 g, 54 %).

R<sub>f</sub> (hexane - AcOEt, 2 : 1) : 0.25. IR(KBr) 3005w, 2956m, 1734vs, 1605m, 1438s, 1360s, 1256s, 1203s, 1163s, 1003m, 953m, 841w, 762w, 703w. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (40 %) 2.06 (*s*, 1H, HO(4)); 2.18 (*s*, 6H, CH<sub>3</sub>(5, 5')); 3.19 (*s*, CH<sub>2</sub>(5)); 3.62 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(1)); diketon (60 %) 2.79 (*d*, *J*=7.2, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 3.58 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>(1)); 4.07 (*t*, *J*=7.2, 1H, CH(3)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form 22.6 (C(5)); 32.2 (C(2)); 51.35 (C(6)); 103.9 (C(3)); 171.4 (C(1)); 191.3 (C(4)); diketon 29.1 (C(5)); 31.6 (C(2)); 51.3 (C(6)); 62.2 (C(3)); 171.1 (C(1)); 202 (C(4)). MS 172(11); 154(6); 130(77); 113(67); 98(100); 71(83); 55(30).

**3-Acetyllevulinic acid (28)**. 3-Acetyllevulinic acid methylester (**41**, 0.36 g, 0.002 mol) was hydrolyzed with PLE (400 μL) in a phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.5, 100 ml). After 1 h, the reaction was stopped with NaOH (0.5 N). The aqueous phase had a pH = 9 and was extracted with CHCl<sub>3</sub> (2 · 25 ml). HCl (4 N) and NaCl were added to the aqueous phase. After a 24 h continue diethylether extraction, purification with a chromatography (silica gel, hexane - acetone - acetic acid, 100 : 100 : 1) and then bulb to bulb distillation (p = 40 mbar, T = 170°C) gave the product **28** (0.11 g, 35 %).

R<sub>f</sub> (hexane - acetone - acetic acid, 100 : 100 : 1) : 0.64. IR (KBr) 3400-2600br, 2986s, 1709vs, 1417s, 1361s, 1233s, 1157s, 1042m, 951m, 759w, 678w, 611w. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (40 %) 2.06 (*s*, 1H, HO(4)); 2.14 (*s*, 6H, CH<sub>3</sub>(5, 5')); 3.28 (*s*, CH<sub>2</sub>(5)); diketon (60 %) 2.90 (*d*, 2H, <sup>7</sup>*J*=7.0, CH<sub>2</sub>(2)); 4.09 (*t*, *J*=7.1, 1H, CH(3)); 10.75 (*s*, 1H, C(1)). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form 23.34 (C(5)); 32.25 (C(2)); 51.35 (C(6)); 103.9 (C(3)); 177.74 (C(1)); 192.15(C(4)); diketon 29.65 (C(5)); 33.06 (C(2)); 51.3 (C(6)); 62.99 (C(3)); 177.65 (C(1)); 202.51 (C(4)). MS 158(7); 140(4); 130(77); 125(4); 113(17); 98(100); 71(44); 51(21).

**5-Bromolevulinic acid benzylester (42).** 5-Diazolevulinic acid benzylester (4.67 g, 20 mmol) and diethylether (30 ml) were mixed. After cooling with an ice bath, a solution of HBr (5.7 M) in acetic acid was added. The mixture was stirred 15 min at r.t., then a solution of KHCO<sub>3</sub> (10 %, 40 ml) and diethylether were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (3 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane : ethylacetate, 5 : 1) of the crude product, yellow liquid, gave a pure colourless liquid (5.27 g, 92 %).

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) = 0.62. IR (film) : 3065w, 3034w, 2945w, 1734vs, 1456m, 1388m, 1352m, 1316m, 1240m, 1213m, 1173s, 1079m, 752m, 699m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.4, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(5)); 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(6)); 7.29-7.39 (m, 5H, CH(8-12)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 28.1 (C(2)), 34.1 (C(5)); 34.2 (C(3)); 66.5 (C(6)); 128.1, 128.5 (C(8, 12)), C(9, 11); 128.2 (C(10)); 135.6 (C(7)); 171.9 (C(1)); 200.3 (C(4)). MS (ESI(+)) : 309, 307 [M+Na]<sup>+</sup>.

**4,6-Dioxoheptanoic acid benzylester (43).** To succinic acid monobenzylester (4.16 g, 20 mmol) were added CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 ml) and DMF (two drops). After cooling with an ice bath, oxalylchlorid (2.8 g, 22 mmol) was added dropwise. The solution was stirred for 30 min at 0°C and 3 h at r.t., then the solvent was totally evaporated. THF (20 ml) was added (solution number 1).

Aside, sodium hydrid (528 mg, 22 mmol) and THF (20 ml) were mixed, and after cooling with an ice bath, t-butylacetoacetate (3.16 g, 20 mmol) was added. After 30 min, the solution number 1 was added to the second solution via a canula. The mixture was stirred for 1 h at 0°C and 16 h at r.t., then HCl (1 M, 40 ml) and diethylether (40 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (2 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. To the red oil, trifluoroacetic acid (20 ml) was added and let to react for 1 h at 0°C, then the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane : AcOEt, 5 : 1) gave a colourless liquid (2 g, 40 %).

R<sub>f</sub> (AcOEt - hexane 2 : 1, UV + KMnO<sub>4</sub>) = 0.58. IR (film) : 3091w, 3066w, 3034w, 2956w, 1738vs, 1626s, 1498m, 1456m, 1418m, 1386m, 1358m, 1310m, 1212s, 1168s, 1137m, 1004m, 965m, 753m, 700m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : enol form (75 %) 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.62-2.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(2, 3)); 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 5.50 (s, 1H, CH(5)); 7.25-7.39 (m, 5H, CH(10-14)); 15.20 (s(l), 1H, OH); diketon (25 %) 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(7)); 2.62-2.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 6.3, 2H, CH<sub>2</sub>(3)); 3.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(5)), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(8)); 7.25-7.39 (m, 5H, CH(10-14)). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HETCOR) : enol form 23.5 (C(7)), 28.7 (C(2)); 33.3 (C(3)); 66.2 (C(8)); 99.6 (C(5)); 128.0, 128.3 (C(10, 14)), (C(11, 13)); 128.0 (C(12)); 135.6 (C(9)); 172.1 (C(1)); 187.4, 194.7 (C(4), (C(6)); diketon 27.7 (C(2)); 30.6 (C(7)); 37.7 (C(3)); 57.6 (C(5)); 66.3 (C(8)); 135.5 (C(9)); 201.7, 202.1 (C(4), (C(6)). MS (ESI(+)) : 371 [M+1]<sup>+</sup>.

**5-Acetyl-4,7-dioxodecandioic acid benzylester (44).** Sodium hydrid (170 mg, 7.09 mmol) and THF (15 ml) were mixed together. After cooling with an ice bath, 4,6-dioxoheptanoic acid benzylester (**43**, 1.6 g, 6.44 mmol) was added dropwise. After 30 min, 5-bromolevulinic acid benzylester (**42**) was added also dropwise. The solution was stirred for 2 h at 0°C and 16 h at r.t., then HCl (1 M, 50 ml) and diethylether (50 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (2 · 50 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. Flash chromatography (silica gel, hexane : AcOEt, 4 : 1 to 3:1) of the crude product, an orange oil, gave a colourless oil (2.55 g, 87 %).

$R_f$  (AcOEt - hexane 2 : 1, UV +  $\text{KMnO}_4$ ) = 0.48. IR (film) : 3065w, 3034w, 2917w, 1734vs, 1456m, 1408m, 1387m, 1355m, 1259m, 1169s, 1093m, 752m, 700m.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY) : diketo 2.22 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3(12)$ ); 2.58-2.70 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.62 (*t*,  $^3J_{9-8} = 6.7$ , 2H,  $\text{CH}_2(9)$ ); 2.71-2.78 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(8)$ ); 2.85 (*ddd*,  $^2J_{3A-3B} = 18.5$ ,  $^3J_{3A-2A \text{ ou } 2B} = 6.6$ ,  $^3J_{3A-2B \text{ ou } A} = 5.4$ , 1H,  $\text{CH}_A(3)$ ); 2.91 (*ddd*,  $^2J_{3B-3A} = 18.6$ ,  $^3J_{3B-2B \text{ ou } 2A} = 7.3$ ,  $^3J_{3A-2A \text{ ou } B} = 6.0$ , 1H,  $\text{CH}_B(3)$ ); 3.00 (*dd*,  $^2J_{6A-6B} = 18.2$ ,  $^3J_{6A-5} = 6.9$ , 1H,  $\text{CH}_A(6)$ ); 3.06 (*dd*,  $^2J_{6B-6A} = 18.2$ ,  $^3J_{6B-5} = 7.0$ , 1H,  $\text{CH}_B(6)$ ); 4.20 (*t*,  $^3J_{5-6A} = ^3J_{5-6B} = 6.9$ , 1H,  $\text{CH}(5)$ ); 5.09, 5.10 (*s*, 2H,  $\text{CH}_2(13)$ ), (*s*, 2H,  $\text{CH}_2(20)$ ); 7.29-7.38 (*m*, 10H,  $\text{CH}(15-19)$ ,  $\text{CH}(22-26)$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HETCOR) : 27.7, 28.8 (C(2)), (C(9)); 29.5 (C(2)); 36.6, 37.1 (C(3)), (C(8)); 40.8 (C(6)); 61.4 (C(5)); 66.4, 66.5 (C(13)), (C(20)); 128.1, 128.1, 128.2, 128.4 (C(15-19)), (C(22-26)); 135.5, 135.6 (C(14)), (C(21)); 172.1, 172.2 (C(1)), (C(10)); 202.2, 203.5 (C(4)), (C(11)); 205.8 (C(7)). MS (ESI(-)) : ms 451 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (451) 343 [M-1-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (451, 343) 235 [M-1-2 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>-</sup>, 191 [M-1-2 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms (451, 343, 235) 191 [M-1-2 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms-ms (451, 343, 235, 191) 173 [M-1-2 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 149 [M-1-2 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>.

**5-Acetyl-4,7-dioxodecanoic acid (30).** In a autoclave, to 5-acetyl-4,7-dioxodecanoic acid benzylester (**44**, 2.4 g, 5.3 mmol) were added THF (50 ml) and Pd/C (240 mg, 10 %). The mixture was stirred for 36 h under 4 bar pressure, then was filtered on celite and washed with THF (50 ml). The filtrate was evaporated, dried by co-evaporation with  $\text{CHCl}_3$ , and dried under high vacuum. The white solid was solved in THF and recrystallized with hexane. A white solid was obtained (1.23 g, 85 %).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH - AcOH 7 : 2 : 1, UV +  $\text{KMnO}_4$ ) = 0.47. M.p. = 123°C. IR (KBr) : 3600-2400w(br) (3025), 2963w, 2922w, 2761w, 2685w, 2564w, 1729s, 1712vs, 1698s, 1432m, 1398m, 1369m, 1350m, 1259m, 1235m, 1175m.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO, COSY) : 2.16 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3(12)$ ); 2.37 (*t*,  $^3J_{9-8} = 6.5$ , 2H,  $\text{CH}_2(9)$ ); 2.40 (*t*,  $^3J_{2-3} = 6.2$ , 2H,  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.67 (*t*,  $^3J_{8-9} = 6.5$ , 2H,  $\text{CH}_2(8)$ ); 2.77 (*dt*,  $^2J_{3A-3B} = 18.7$ ,  $^3J_{3A-2} = 6.1$ , 1H,  $\text{CH}_A(3)$ ); 2.85 (*dt*,  $^2J_{3B-3A} = 18.7$ ,  $^3J_{3B-2} = 6.6$ , 1H,  $\text{CH}_B(3)$ ); 2.95 (*dd*,  $^2J_{6A-6B} = 18.5$ ,  $^3J_{6A-5} = 6.8$ , 1H,  $\text{CH}_A(6)$ ); 3.01 (*dd*,  $^2J_{6B-6A} = 18.5$ ,  $^3J_{6B-5} = 7.5$ , 1H,  $\text{CH}_B(6)$ ); 4.22 (*t*,  $^3J_{5-6} = 6.9$ , 1H,  $\text{CH}(5)$ ); 11.8-12.45 (*s(l)*, 2H, OH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO, HETCOR) : 27.9 (C(2), 9); 29.8 (C(12)); 36.7 (C(8)); 37.2 (C(3)); 40.4 (C(6)); 61.0 (C(5)); 173.8, 173.9 (C(1)), (C(10)); 203.2, 205.0, 207.0 (C(4)), (C(7)), (C(11)). MS (ESI(-)) : ms 271 [M-1]<sup>-</sup>, ms-ms (271) 253 [M-1-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, ms-ms-ms (271, 253) 209 [M-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ms-ms-ms-ms (271, 253, 209) 165 [M-H<sub>2</sub>O-2 CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 123 [M-H<sub>2</sub>O-2 CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>.

**6-Tert-butylloxycarbonyl-4,7-dioxooctanoic acid methylester (45).** NaH (120 mg, 5 mmol) in THF (30 ml) was cooled with an ice bad and tert-butylacetoacetate (791 mg, 5 mmol) was added dropwise. After 30 min, 5-bromolevulinic acid methylester (1.05 g, 5 mmol) was added in 5 min. The mixture was stirred for 2 h at 0°C, then for 14 h at r.t.. HCl (30 ml, 1 M) and diethylether (50 ml) were added. The aqueous phase was extracted with diethylether (2 · 50 ml). The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and the solvent was evaporated. After flash chromatography (hexane - AcOEt 3 : 1) the product **45** was obtained a colourless liquid (1.32 g, 92 %).

$R_f$  (AcOEt - hexane, 3 : 1,  $\text{KMnO}_4$ ) : 0.59. IR (film) : 2980m, 2955m, 2935m, 1741s, 1718vs, 1439m, 1408m, 1396m, 1369s, 1259s, 1201s, 1175s, 1147s, 1105m, 846m.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.41 (*s*, 9H,  $\text{CH}_3(12-14)$ ); 2.29 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3(8)$ ); 2.45-2.64 (*m*, 2H  $\text{CH}_2(2)$ ); 2.68-2.81 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2(3)$ ); 2.88 (*dd*,  $^2J = 18.3$ ,  $^3J = 5.7$ , 1H,  $\text{CH}_A(5)$ ); 3.07 (*dd*,  $^2J = 18.2$ ,  $^3J = 8.3$ , 1H,  $\text{CH}_B(5)$ ); 3.63 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3(10)$ ); 3.92 (*dd*,  $^3J = 8.3$ ,  $^3J = 5.7$ , 1H,  $\text{CH}(6)$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 27.6 C(2); 27.7 C(12-14); 29.9 C(8); 36.8 C(3); 40.5

C(5); 51.7 C(10); 54.7 C(6); 82.3 C(11); 167.6 C(9); 172.9 C(1); 202.5 C(7); 206.1 C(4). MS (DCI) : 305 (17); 304 (100, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); 287 (23, [M+1]<sup>+</sup>); 248 (68, [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>); 231 (45, [M+1+C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>); 213 (21, [M+1+C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O]<sup>+</sup>); 187 (8, [M+1+C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

**4,7-Dioxooctanoic acid (31).** 6-Tertbutyloxycarbonyl-4-7-dioxooctanoic acid methylester (1 g, 3.49 mmol) in HCl (10 ml, 6 M) was heated at 90°C for 90 min, then the solvent was evaporated, then coevaporated with chloroform (2 · 30 ml). Flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 95 : 5) gave a white solid (458 mg, 76 %) which was solved in AcOEt and crystallized by adjunction of hexane to yield a white solid too (425 g, 71 %).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH 9 : 1, KMnO<sub>4</sub>) : 0.40. M.p. : 76°C (<sup>941</sup> [57] 67-69°C). IR (KBr) : 3600-2200m(br), 2419m, 1693vs, 1426m, 1408s, 1364m, 1331m 1236m, 1225m, 1106m, 904m, 886m. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(8)); 2.58 (t, <sup>3</sup>J = 6.5, 2H, CH(2)); 2.65-2.72 (m, 4H CH<sub>3</sub>(5, 6)); 2.74 (t, <sup>3</sup>J = 6.5, 2H, CH(3)); 10.40-10.80 (s, 1H, HO). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 27.6 C(2); 29.7 C(8); 35.8 C(5); 36.7 C(3); 36.8 C(6); 178.2 C(1); 207.3 - 207.5 C(7) - C(4). MS (DCI) : 191 (11); 190 (100, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); 173 (74, [M+1]<sup>+</sup>); 155 (73, [M-OH]<sup>+</sup>); 127 (6, [M-OH-CO]<sup>+</sup>); 99 (15); 98 (16, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

#### Formation of the vinylogous amide.

**Using the 6-aminocaproic acid.** A solution of succinylacetone (50 mM) and 6-aminocaproic acid (100 mM) was prepared in a phosphate buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O and 10 μM ZnCl<sub>2</sub>) in a final volume of 3.5 ml. The formation of the vinylogous amide was followed by UV/VIS spectroscopy during 20 h at r.t; a spectrum was taking every 30 min. The maximum of absorption was observed at 314 nm.

We prepared nine solutions containing succinylacetone (51.22 mM) and various concentrations of 6-aminocaproic acid (50.09 mM, 101.71 mM, 201.25 mM, 302.09 mM, 401.63 mM, 502.25 mM, 602.66 mM, 803.04 mM and 1002.77 mM) in a phosphate buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O and 10 μM ZnCl<sub>2</sub>) for a final volume of 3.5 ml. The formation of the vinylogous amide was followed for 64 h at 314 nm. The equation fitting the measured points was taking from Segel II.54 [49].

**Using the PBGS.** We prepared six solutions containing the PBGS (14.1 mM) and various concentrations of succinylacetone (2 mM, 4 mM, 6 mM, 7.8 mM, 10.24 mM, 12.19 mM) in a phosphate buffer (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mixture, pH = 8.1, 12.3 mM mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O and 10 μM ZnCl<sub>2</sub>) for a final volume of 3.5 ml. The formation of the vinylogous amide was followed for 22 h. The maximum of the absorption was measured at 320 nm. The equation fitting the measured points was taking from Segel II.54 [49].

#### 4.9.4 References

- [1] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald *Nature (London)* **1980**, 285, 17.
- [2] A. M. Cheh, J. B. Neilands *Bonding and Structure* **1976**, 29, 123.
- [3] P. M. Jordan In *Biosynthesis of Tetrapyrroles*; P. M. Jordan, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1991**, p. 1.
- [4] F. J. Leeper *Nat. Prod. Rep.* **1989**, 6, 171.
- [5] D. Shemin *Method. Enzymol.* **1970**, XVII Part A, 205.
- [6] A. R. Battersby, F. J. Leeper *Topics in Current Biology* **1998**, 195, 143.
- [7] M. Warren, P. M. Shoolingin-Jordan In *Heme, chlorophyll, and bilins : methods and protocols*; A. G. Smith, M. Witty, Eds.; Humana Press: Totowa, **2002**.
- [8] P. M. Shoolingin-Jordan, J. E. LeLean, A. J. Lloyd *Methods Enzymol.* **1997**, 281, 309.
- [9] B. Franck, H. Stratman *Heterocycles* **1981**, 15, 919.
- [10] A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **1973**, 35, 72.
- [11] D. Mauzerall *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2605.
- [12] G. Ksander, G. Bold, R. Lattmann, C. Lehmann, T. Früh, Y.-B. Xiang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1115.
- [13] M. Calvin *Perspect. Biol. Med.* **1963**, 13, 45.
- [14] A. Eschenmoser *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5.
- [15] A. Eschenmoser, E. Loewenthal *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 1.
- [16] N. H. Georgopadakou, A. I. Scott *J. theor. Biol.* **1977**, 69, 381.
- [17] A. W. D. Larkum In *Chlorophylls*, 1 ed.; H. Scheer, Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1991**, p. 367.
- [18] R. Neier In *Advances in Nitrogen Heterocycles*; JAI Press Inc.: Greenwich, Connecticut, **1996**, p. 35.
- [19] 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.
- [20] 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 Sci.* **1997**, 6, 1774.
- [21] 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. Shoolingin-Jordan *Biochem.* **1999**, 38, 4266.
- [22] P. T. Erskine, R. Newbold, J. Roper, A. Coker, M. J. Warren, P. M. Shoolingin-Jordan, S. P. Wood, J. B. Cooper *Protein Sci.* **1999**, 8, 1250.
- [23] P. T. Erskine, R. Newbold, A. A. Brindley, S. P. Wood, P. M. Shoolingin-Jordan, M. J. Warren, J. B. Cooper *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 133.
- [24] P. T. Erskine, L. Coates, R. Newbold, A. A. Brindley, F. Stauffer, S. P. Wood, M. J. Warren, J. B. Cooper, P. M. Shoolingin-Jordan, R. Neier *FEBS Lett.* **2001**, 503, 196.
- [25] N. Frankenberg, P. T. Erskine, J. B. Cooper, P. M. Shoolingin-Jordan, D. Jahn, D. W. Heinz *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 591.
- [26] J. Kervinen, E. K. Jaffe, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodaver, A. Zdanov *Biochem.* **2001**, 40, 8227.
- [27] D. L. Nandi, K. F. Baker-Cohen, D. Shemin *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1224.

- [28] W. H. Wu, D. Shemin, K. E. Richards, R. C. Williams *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71 (5), 1767.
- [29] D. Shemin *J. Biochem. (Tokyo)* **1976**, 79 (4), 37P.
- [30] D. Gurne, D. Shemin *Science* **1973**, 180, 1188.
- [31] D. Gurne, J. Chen, D. Shemin *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, 74 (4), 1383.
- [32] E. K. Jaffe, D. Hanes *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (20), 9348.
- [33] R. M. Petrovich, S. Litwin, E. K. Jaffe *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8692.
- [34] S. S. Hasnain, E. M. Wardell, C. D. Garner, M. Schlösser, D. Beyersmann *Biochem. J.* **1985**, 230, 625.
- [35] P. M. Jordan, J. S. Seehra *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 240.
- [36] D. L. Nandi, D. Shemin *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1236.
- [37] D. L. Nandi *Z. Naturforsch. Sect. C* **1978**, 33, 799.
- [38] C. Jarret, F. Stauffer, M. E. Henz, M. Marty, R. M. Lüönd, J. Bobalova, P. Schürmann, R. Neier *Chemistry & Biology* **2000**, 7, 185.
- [39] F. Stauffer, E. Zizzari, C. Engeloch-Jarret, J.-P. Faurite, J. Bobalova, R. Neier *ChemBioChem* **2001**, 2, 343.
- [40] P. M. Jordan, P. N. B. Gibbs *Biochem. J.* **1985**, 227, 1015.
- [41] P. Spencer, P. M. Jordan In *The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigments*; John Wiley & Sons, Ed.: Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, **1996**, p. 50.
- [42] R. Lüönd Untersuchung zum Enzymmechanismus der  $\delta$ -Aminolävulinat-Säure-Dehydratase aus *Rhodospseudomonas spheroides*; Thèse: Université de Fribourg, 1991.
- [43] B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, 74 (10), 4641.
- [44] D. P. Tschudy, R. A. Hess, B. C. Frykholm *J. Biol. Chem.* **1981**, 256(19), 9915.
- [45] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Périé *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 2043.
- [46] I. Fridovich *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1043.
- [47] W. Tagaki, J. P. Guthrie, F. H. Westheimer *Biochemistry* **1968**, 7, 905.
- [48] J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas *Science* **1995**, 270, 1797.
- [49] I. H. Segel In *Enzyme kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, 1 ed.; A Wiley-Interscience Publication, Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, **1975**.
- [50] A. G. Chaudhry, P. M. Jordan *Biochem. Soc. T.* **1976**, 4, 760.
- [51] L. W. Mitchell, E. K. Jaffe *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300 (1), 169.
- [52] D. Mauzerall, S. Granick *J. Biol. Chem.* **1956**, 219, 435.
- [53] M. M. Bradford *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [54] D. Seebach, M. S. Hoekstra, G. Protschuk *Angew. Chem.* **1977**, 89 (5), 334.
- [55] S. Hünig, E. Lücke *Chem. Ber.* **1959**, 92, 652.
- [56] D. Seebach, T. Weller, G. Protschuk, A. K. Beck, M. S. Hoekstra *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 716.
- [57] R. O. Pendarvis, K. G. Hampton *J. Org. Chem.* **1974**, 39 (15), 2289

#### **4.9.5 Tableaux des résultats**

Les résultats des composés présentés dans cette publication sont en partie donnés dans les tableaux qui suivent. Les autres valeurs peuvent être trouvées dans les thèses de Matthias Henz <sup>[91]</sup> et de Caroline Engeloche-Jarret <sup>[90]</sup>.

Les diverses concentrations en inhibiteur sont données dans la deuxième ligne. Les valeurs de  $K_I$  sont obtenues par les méthodes de Michealis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee et Hanes.

## Composé 17

ALA [ $\mu$ M]	composé 17			
		455	910	1820
79.4	0.489	0.289	0.250	0.152
	0.456	0.272	0.215	0.173
99.2	0.551	0.339	0.264	0.199
	0.540	0.352	0.274	0.201
119.1	0.563	0.368	0.298	0.244
	0.564	0.365	0.299	0.213
158.8	0.651	0.410	0.314	0.236
	0.635	0.396	0.320	0.233
198.5	0.679	0.411	0.343	0.253
	0.661	0.426	0.336	0.255
397.0	0.776	0.448	0.360	0.298
	0.751	0.466	0.377	0.283
$V_{\max}$ (1)	3.46	2.07	1.67	1.36
$K_{Mapp}$ (1)	68	61	61	81
$K_I$ (1)				9520
$V_{\max}$ (2)	3.51	2.21	1.74	1.44
$K_{Mapp}$ (2)	72	75	71	96
$K_I$ (2)				5460
$V_{\max}$ (3)	3.43	2.01	1.63	1.34
$K_{Mapp}$ (3)	67	55	56	79
$K_I$ (3)				10162
$V_{\max}$ (4)	3.47	2.08	1.68	1.37
$K_{Mapp}$ (4)	69	62	63	83
$K_I$ (4)				8970
Valeur moyenne		$K_I$ (1): 9520	$K_I$ (2): 5460	
		$K_I$ (3): 10'162	$K_I$ (4): 8970	
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 5			

Composé 21

<b>Essai</b>	<b>Inh</b>	<b>PBGS</b>	<b>Tamp</b>	<b>ALA</b>	<b>Abs</b>
1	0	400	900	200	0.810
2	0	400	900	200	0.787
3	400	400	500	200	0.663
4	400	400	500	200	0.675
1'	0	400	900	200	0.795
2'	0	400	900	200	0.777
3'	400	400	500	200	0.563
4'	400	400	500	200	0.558
5	0	400	1000	100	0.693
6	0	400	1000	100	0.707
7	400	400	600	100	0.618
8	400	400	600	100	0.622
5'	0	400	1000	100	0.696
6'	0	400	1000	100	0.722
7'	400	400	600	100	0.529
8'	400	400	600	100	0.522
9	0	400	1050	50	0.556
10	0	400	1050	50	0.607
11	400	400	650	50	0.484
12	400	400	650	50	0.511
9'	0	400	1050	50	0.604
10'	0	400	1050	50	0.578
11'	400	400	650	50	0.486
12'	400	400	650	50	0.503

Conc: 0.65 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 min

Composé 23

<b>Essai</b>	<b>Inh</b>	<b>PBGS</b>	<b>Tamp</b>	<b>ALA</b>	<b>Abs</b>
1	0	400	900	200	0.784
2	0	400	900	200	0.776
3	400	400	500	200	0.703
4	400	400	500	200	0.692
1'	0	400	900	200	0.762
2'	0	400	900	200	0.774
3'	400	400	500	200	0.646
4'	400	400	500	200	0.604
5	0	400	1000	100	0.695
6	0	400	1000	100	0.695
7	400	400	600	100	0.655
8	400	400	600	100	0.633
5'	0	400	1000	100	0.663
6'	0	400	1000	100	0.712
7'	400	400	600	100	0.580
8'	400	400	600	100	0.588
9	0	400	1050	50	0.554
10	0	400	1050	50	0.581
11	400	400	650	50	0.531
12	400	400	650	50	0.536
9'	0	400	1050	50	0.545
10'	0	400	1050	50	0.567
11'	400	400	650	50	0.459
12'	400	400	650	50	0.452

Conc: 0.76 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 m

Composé 30

<b>Essai</b>	<b>Inh</b>	<b>PBGS</b>	<b>Tamp</b>	<b>ALA</b>	<b>Abs</b>
1	0	400	900	200	0.874
2	0	400	900	200	0.886
3	400	400	500	200	0.785
4	400	400	500	200	0.746
1'	0	400	900	200	0.806
2'	0	400	900	200	0.797
3'	400	400	500	200	0.557
4'	400	400	500	200	0.548
5	0	400	1000	100	0.737
6	0	400	1000	100	0.751
7	400	400	600	100	0.650
8	400	400	600	100	0.662
5'	0	400	1000	100	0.654
6'	0	400	1000	100	0.577
7'	400	400	600	100	0.435
8'	400	400	600	100	0.365
9	0	400	1050	50	0.550
10	0	400	1050	50	0.511
11	400	400	650	50	0.469
12	400	400	650	50	0.496
9'	0	400	1050	50	0.420
10'	0	400	1050	50	0.400
11'	400	400	650	50	0.266
12'	400	400	650	50	0.314

Conc: 0.46 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 min

Composé 31

<b>Essai</b>	<b>Inh</b>	<b>PBGS</b>	<b>Tamp</b>	<b>ALA</b>	<b>Abs</b>
1	0	400	900	200	0.781
2	0	400	900	200	0.764
3	400	400	500	200	0.434
4	400	400	500	200	0.423
1'	0	400	900	200	0.755
2'	0	400	900	200	0.757
3'	400	400	500	200	0.146
4'	400	400	500	200	0.143
5	0	400	1000	100	0.679
6	0	400	1000	100	0.723
7	400	400	600	100	0.384
8	400	400	600	100	0.349
5'	0	400	1000	100	0.590
6'	0	400	1000	100	0.670
7'	400	400	600	100	0.141
8'	400	400	600	100	0.150
9	0	400	1050	50	0.469
10	0	400	1050	50	0.521
11	400	400	650	50	0.251
12	400	400	650	50	0.253
9'	0	400	1050	50	0.478
10'	0	400	1050	50	0.508
11'	400	400	650	50	0.111
12'	400	400	650	50	0.123

Conc: 0.51 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 min

# 5 Partie expérimentale

## 5.1 Appareils utilisés

Stérilisateur : Tecnoclav, Integra Biosciences, BST 300

Incubateur : HT, Infors AG

Fermenteur : 2 litres - Multigen, New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick, New Jersey, USA

: 10 litres - Bioengineering

Centrifugeuses : Beckmann CS-6R

: Centrifugeuse de table, MSE, Mistral 2000

: Sorvall RC 5C Plus

: Sorvall RC 5B

Bain thermostatisé : Haake F6 et Haake W15, Digitana AG

Récolteur de fractions : LKB, 7000 Ultrorac

: Frac 300

Electrophorèse : SDS-Page 12 %, 0.75 mm, Minigel, Système Lämmli

: PhastSystem, Pharmacia, Laboratory Separation Division, Uppsala, Sweden

Ultrafiltration : Cellule à ultrafiltration 8050, membrane Diaflo XM=50, Amicon

Spectroscopie : UV/Vis spectromètre, HP 8452A, spectromètre à diode array

## 5.2 Produits utilisés

Agar	Fluka, BioChemika
Acide acétique	Fluka, puriss p.a.
Acide 6-aminocaproïque	Fluka, puriss p.a.
Acide perchlorique	Fluka, puriss p.a.
Acide trichloroacétique	Fluka, puriss p.a.
Ampicilline	Boehringer Mannheim
Anti-mousse	Sigma
Benzonase	Merck

Bleu de Bromophénol	Fluka
Bleu de Coomassie	Fluka
Chlorure de sodium	Fluka, BioChemika
Chlorure de magnésium hexahydrate	Aldrich, microselect
Chlorure de mercure (II)	Fluka, puriss p.a.
Chlorure de zinc	Fluka, microselect
Complete <sup>TM</sup> , cocktail d'inhibiteurs de protéases	Boehringer Mannheim
Dihydrogénophosphate de sodium monohydrate	Acros
<i>p</i> -Diméthylamino-benzaldéhyde	Fluka, puriss p.a.
Extrait de levure	Fluka, BioChemika
Glycérol hydraté	Fluka, BioChemika
Glycine	Fluka, BioChemika
HMW	GibcoBRL
Hydrogénophosphate de sodium anhydre	Acros
Isopropanol	Fluka, purum
Lysozyme isolé du blanc d'oeuf de poulet	Fluka, BioChemika
Méthanol	Fluka, purum
Mercaptoéthanol	Acros
Peroxodisulfate d'ammonium (APS)	Fluka, BioChemika
Protogel	National Diagnostics
Sodium dodécylsulfate (SDS)	Serva
TEMED (N,N,N,N-tétraméthyléthylène-diamine)	Fluka, BioChemika

## 5.3 Travail microbiologique et biochimique

### 5.3.1 Milieux et tampons

#### 5.3.1.1 Culture et purification de la PBGS

LB (1 l)	10 g de NaCl
	5 g d'extrait de levure
	10 g de tryptone

LB (agar) LB  
15 g/l agar

Tampon phosphate pH=7.1 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   
10 mM mercaptoéthanol  
10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$   
(0.5 M sulfate d'ammonium)

Tampon phosphate pH=7.3 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   
10 mM mercaptoéthanol  
10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$

Tampon phosphate pH=7.6 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
100 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   
10 mM mercaptoéthanol  
100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$

### 5.3.1.2 SDS-PAGE

Solution 1L 1.5 M Tris-HCl pH=8.8

Solution 2 Protogel

Solution 4L 0.5 M Tris-HCl pH=6.8

Gel de séparation 12 % 2.68 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
2 ml solution 1L  
3.2 ml solution 2  
80  $\mu\text{l}$  SDS 10 %  
40  $\mu\text{l}$  APS  
10  $\mu\text{l}$  TEMED

<b>Gel de concentration 4 %</b>	<b>3.02 ml H<sub>2</sub>O</b> <b>1.25 ml solution 4L</b> <b>0.65 ml solution 2</b> <b>50 µl SDS 10 %</b> <b>25 µl APS</b> <b>10 µl TEMED</b>
<b>Tampon de charge</b>	<b>5.25 ml H<sub>2</sub>O</b> <b>1.2 ml solution 4L</b> <b>2 ml SDS 10 %</b> <b>1 ml glycérol 87 %</b> <b>50 µl bleu de Bromophénol</b>
<b>Tampon de migration</b>	<b>50 mM Tris pH=8.3</b> <b>384 mM glycine</b>
<b>Solution de fixation</b>	<b>25 % isopropanol</b> <b>10 % acide acétique</b>
<b>Solution de coloration</b>	<b>0.25 % bleu de Coomassie</b> <b>50 % méthanol</b> <b>10 % acide acétique</b>
<b>Solution de décoloration</b>	<b>7 % acide acétique</b> <b>5 % méthanol</b>

### 5.3.1.3 PhastSystem

<b>Solution de coloration</b>	<b>0.1 % solution PhastGel Bleu R</b> <b>30 % méthanol</b> <b>10 % acide acétique</b>
-------------------------------	---

**Solution de décoloration**                    **30 % méthanol**  
    **10 % acide acétique**  
    **60 % H<sub>2</sub>O**

**Solution de conservation**                **5 % glycérol**  
    **10 % acide acétique**  
    **85 % H<sub>2</sub>O**

#### 5.3.1.4 FPLC (fast protein liquid chromatography)

**Eluant**                    **A: 20 mM bis(tris)propane pH=6.5**  
    **0.02 % NaN<sub>3</sub>**

**B: 20 mM bis(tris)propane pH=6.5**  
    **0.02 % NaN<sub>3</sub>**  
    **1 M NaCl**

#### 5.3.1.5 Test d'inhibition

**Solution ALA 50**                    **50 mg d'ALA dans 10 ml H<sub>2</sub>O**

**Solution ALA 5**                    **1 ml de la solution ALA 50 dans 10 ml H<sub>2</sub>O**

**Réactif d'Ehrlich**                    **1.1 g p-diméthylaminobenzaldéhyde**  
    **20 ml acide perchlorique**  
    **35 ml acide acétique**

**Tampon, test d'inhibiton pH=8.0**        **0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**  
    **10 mM MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O**  
    **12.3 mM mercaptoéthanol**  
    **10 µM ZnCl<sub>2</sub>**

Tampon stop	10.87 g HgCl <sub>2</sub>
	80.2 g acide trichloroacétique
	400 ml H <sub>2</sub> O

### 5.3.2 Culture d' *Escherichia coli* et purification de la PBGS

#### 5.3.2.1 Réveil et maintien de la souche

La souche d' *E.coli* CR261, modifiée par le plasmide pUC19 et comprenant le gène *E. coli hemB* est stockée dans des Eppendorfs à -80°C. La souche originale a été donnée par le Dr. Ch. Roessner de l'université du Texas A & M. Sans décongeler la souche, sous hotte stérile, on gratte légèrement le contenu de l'Eppendorf et on l'étale sur une boîte de Pétri contenant du LB agar et de l'ampicilline (60 µg/ml). On place cette boîte à 37°C pendant une nuit.

Une colonie est repiquée sur une nouvelle boîte de Pétri contenant du LB agar et de l'ampicilline (60 µg/ml) et placée à son tour à 37°C pendant une nuit.

Cette opération de repiquage est effectuée toutes les deux à trois semaines, mais au plus pendant deux mois. Passé ce délai, il faut à nouveau repartir de l'Eppendorf stocké à -80°C, car au bout d'un certain temps, les bactéries se fatiguent et ont tendance à éjecter le plasmide.

#### 5.3.2.2 Préculture

Le milieu LB ainsi que toute la verrerie utilisée sont stérilisés à 120°C pendant 1h. La solution stock d'ampicilline (75 mg/ml) est filtrée sur filtre stérile Millipore (porosité de 0.22 µM).

Sous hotte stérile, on prépare deux Ehrlenmeyers de 100 ml contenant chacun 50 ml de milieu LB et 50 µl d'une solution d'ampicilline (75 mg/ml). On récolte une colonie de la boîte de Pétri que l'on transfère dans les 50 ml de LB (opération effectuée pour les deux

Ehrlenmeyers). On place les deux Ehrlenmeyers dans un incubateur chauffé à 37°C et on laisse agiter à 230 rpm pendant une nuit.

Sous hotte, les deux précultures sont transférées dans deux tubes Falcon de 50 ml et centrifugées à 3800 rpm, à 4°C, pendant 10 min (centrifugeuse Beckmann). Toujours sous la hotte, le vieux milieu est jeté et les culots sont resuspendus dans un nouveau milieu, puis tous les deux sont transférés dans un Ehrlen de 1 l contenant 500 ml de LB et 500 µl d'une solution d'ampicilline (75 mg/ml) qui est mis à agiter à 37°C à 230 rpm pendant 2 h.

### 5.3.2.3 Culture

Le fermenteur de 10 l est stérilisé d'abord à l'eau, puis avec 10 l de milieu LB. Une fois le milieu refroidi, on ajoute, toujours sous conditions stériles, 10 ml d'une solution d'ampicilline (75 mg/ml) et 20 ml d'huile d'olive comme anti-mousse.

La préculture de 500 ml est transférée, sous hotte stérile, dans la bouteille utilisée spécialement pour l'adjonction de la préculture dans l'incubateur. Une fois cette opération effectuée, on ajoute la préculture aux 10 l de LB de l'incubateur. On laisse agiter à 37°C, à 200 rpm, pendant 24 h, avec un flux d'air de 12 l/min.

### 5.3.2.4 Extrait cellulaire brut

Les 10 l de culture sont centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min à 4 °C (Sorvall, GSA). Les culots sont resuspendus dans du tampon phosphate pH=7.3 (voir 5.3.1.1), au maximum 50 ml. On ajoute du lysozyme (1 mg/ml de solution), on laisse incuber pendant 1 h à température ambiante et l'on congèle la solution pour une nuit à -20°C (lyse de la paroi bactérienne).

Une fois la solution décongelée, on additionne de la benzonase (1 µl pour 10 ml de solution) pour la dégradation de l'ADN et de l'ARN et on laisse agiter pendant 10 min à température ambiante. On centrifuge le mélange pendant 20 min à 4°C et à 20'000 rpm (Sorvall, SS34). Le surnageant est récupéré.

### 5.3.2.5 Inhibiteurs de protéases et précipitation au sulfate d'ammonium

Une tablette contenant des inhibiteurs de protéases est dissoute dans 5 ml de tampon phosphate pH=7.6 (voir 5.3.1.1). La solution est ajoutée à la solution contenant l'extrait cellulaire brut et le tout est placé à 4°C, pendant 1 h, sous agitation.

On effectue ensuite une précipitation à 25 % de sulfate d'ammonium (voir annexe 4). Le sel est ajouté lentement à 4°C sous agitation. On laisse agir pendant 20 min. On centrifuge ensuite à 20'000 rpm (Sorvall, SS34), pendant 20 min, à 4°C. Le surnageant est conservé. L'adjonction du sulfate d'ammonium permet de rendre la solution protéinique hydrophobe. Les acides nucléiques contenus dans la solution restent hydrophyles.

### 5.3.2.6 Phénylsépharose

Le surnageant (environ 50 ml) est chargé sur la première colonne de purification, la phénylsépharose (5.2 6 cm). Les tampons sont filtrés et dégazés.

<b>vitesse d'élution</b>	175 ml/min (position 30 sur la pompe) 0.8 ml/pulse
<b>pompe</b>	P-1
<b>diamètre du tube</b>	d=3.1 mm
<b>UVICORD</b>	A=0.2
<b>sensibilité de l'intégrateur</b>	20 mV et 100 mV
<b>vitesse de déroulement du papier</b>	0.5 cm/h
<b>tubes 1 à 10</b>	n°3 (tube de 100 ml)
<b>tubes 11 à 70</b>	n°2 (tube de 20 ml)
<b>tampon A</b>	tampon phosphate pH=7.1 avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (voir 5.3.1.1)
<b>tampon B</b>	tampon phosphate pH=7.1 sans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (voir 5.3.1.1)
<b>équilibration de la colonne</b>	500 ml de tampon A
<b>élution</b>	80 pulses, tampon A, tubes 1 à 10 64 ml/tube 13 pulses, tampon B, tubes 11 à 70 10.4 ml/tube

### 5.3.2.7 SDS-PAGE

La présence de la PBGS dans les diverses fractions est déterminée par SDS-PAGE.

On prépare d'abord le gel de séparation (voir 5.3.1.2) qu'on laisse polymériser pendant 45 min sur son support. On coule ensuite le gel de concentration (voir 5.3.1.2) qu'on laisse polymériser pendant 30 min.

On prépare ensuite les échantillons : rapport (1:1) avec du tampon de charge. On les chauffe à 100°C pendant 5 min (linéarisation du polypeptide), puis on les place dans de la glace.

Lorsque les gels sont prêts, on peut charger les échantillons ainsi qu'une référence (HMW : high molecular weight proteins) et on les fait migrer à l'aide d'un tampon de migration (voir 5.3.1.2). Les protéines sont ensuite fixées sur le gel, colorées et le surplus de colorant est éliminé avec les solutions correspondantes (voir 5.3.1.2).

### 5.3.2.8 Concentration des fractions

Les fractions contenant la protéine sont réunies et concentrées sur une membrane XM=50 jusqu'à un volume de 15 ml. Il est impératif de contrôler que la protéine soit bien retenue par la membrane.

Une fois la concentration terminée, la membrane est lavée une première fois avec une solution 3 M de NaCl, une seconde fois avec de l'eau et est finalement stockée dans une solution de EtOH 20 % + 0.02 % NaN<sub>3</sub> (l'azoture est un inhibiteur d'enzymes contenant un hème, comme les peroxydases).

### 5.3.2.9 Séphacryl S300

La solution contenant la protéine, une fois concentrée, est divisée en quatre échantillons d'environ 4 ml chacun et chaque échantillon est chargé l'un après l'autre sur la Séphacryl S300. Le solvant est aussi filtré et dégazé.

<b>pompe</b>	3/100, 27 à 34 ml/h
<b>diamètre du tube</b>	d=1.3mm
<b>programme à introduire</b>	13 min/tube 10 7 racks (10 tubes/rack)
<b>sensibilité de l'intégrateur</b>	100 mV
<b>vitesse de déroulement du papier</b>	1 cm/h
<b>tampon</b>	tampon phosphate pH=7.3 (voir 5.3.1.1)

La présence de la protéine dans les diverses fractions est aussi testée par SDS-PAGE (voir 5.3.2.7). Une fois les fractions réunies, celles-ci sont concentrées sur une membrane XM=50 jusqu'à un volume final de 10 ml. Après concentration, la membrane est lavée et stockée de la même manière que précédemment.

Il est important de ne pas utiliser la même membrane lors de la concentration après la Phénylsépharose et après la Séphacryl 300, car il reste souvent des protéines sur la membrane, ce qui pourrait amener à une contamination.

#### 5.3.2.10 PhastSystem

Le kit fournit les gels SDS-PAGE, les gels natifs ainsi que tous les tampons nécessaires. Pour l'utilisation de l'appareillage, il faut se référer au manuel d'instruction qui l'accompagne. Les solutions à utiliser sont définies au chapitre 5.3.1.3.

#### 5.3.2.11 FPLC

2 ml de l'échantillon à analyser sont centrifugés à 14'000 rpm, pendant 20 min, à 4°C. 1 ml est injecté sur une FPLC pour contrôler sa pureté. La colonne utilisée est une Mono-Q, une échangeuse anionique. Les tampons utilisés sont listés au chapitre 5.3.1.4.

#### 5.3.2.12 Détermination de la quantité de protéine

Le Bio-Rad Protein Assay est basé sur la procédure de Bradford qui permet de lier un colorant à la protéine à déterminer et ainsi de mesurer de manière spectroscopique sa concentration totale. Cette procédure utilise le changement de couleur du colorant Coomassie brilliant blue G-250 en fonction de la réponse des diverses concentrations de la protéine. La longueur d'onde de la mesure se situe à 596 nm. Les diverses absorptions obtenues sont comparées à une courbe d'étalonnage utilisée comme référence (variation de concentration de l'albumine de sérum de bœuf (BSA), voir annexe 4). La concentration est donnée en mg/ml.

La solution contenant la protéine d'étude (ici la PBGS) est diluée de manière à ce que les absorptions obtenues se situent dans un intervalle compris entre 0.1 et 0.9.

<b>solution contenant la protéine (en µl)</b>	<b>quantité d'eau (en µl)</b>	<b>quantité de colorant (en µl)</b>
10	790	200
20	780	200
30	770	200
40	760	200
50	750	200
<b>blanc</b>	<b>800</b>	<b>200</b>

La concentration totale de la protéine est obtenue en utilisant l'équation linéaire obtenue de la courbe standard (voir annexe 4).

#### 5.3.2.13 Détermination de l'activité de la protéine

On prépare à chaque fois trois tubes identiques afin d'obtenir une valeur moyenne.

A 50 µl de la solution contenant la protéine sont ajoutés 1250 µl de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5). Le mélange est préincubé à 37°C pendant 30 min. On additionne ensuite 200 µl de ALA 5 (voir 5.3.1.5) et l'on incube encore 14 min. On arrête la réaction avec 1 ml de tampon stop (voir 5.3.1.5) et l'on place les tubes dans de la glace. Les tubes

sont centrifugés à 4500 rpm pendant 4 min (Mistral). On prélève 1 ml du surnageant que l'on mélange à 1 ml du réactif d'Ehrlich (voir 5.3.1.5) et l'on centrifuge à nouveau à 4500 rpm pendant 4 min. La solution qui présente une coloration rose violet typique est mesurée par spectrophotométrie UV/VIS et l'absorbance maximale est obtenue en prenant la valeur à 554 nm.

L'activité spécifique est obtenue par le calcul suivant :

$$SA = \frac{3.33 \cdot 10^6 \cdot \text{absorbance} \cdot 1.5}{62'000 \cdot 1 \cdot 50 \cdot \text{quantité de protéine} \cdot 14}$$

SA, unité = U/mg

3.33 = facteur de dilution

62'000 = coefficient d'extinction

temps = 14 min

quantité de protéine, unité = mg/ml

L'activité ainsi que le nombre d'unités sont calculés comme suit :

**activité (U/ml) = SA (en U/mg) · quantité de protéine (en mg/ml)**

**unités = activité (U/ml) · volume (ml)**

#### 5.3.2.14 Stockage de la protéine

La solution contenant la protéine est divisée en diverses fractions d'environ 1 U chacune et stockée dans des Eppendorfs de 1.5 ml à -80°C.

#### 5.3.2.15 Stabilité de la PBGS en présence de potassium ou de sodium

La stabilité de la PBGS en présence de tampon phosphate de sodium ou de potassium à pH=8.0 (voir 6.3.1.5, même concentration pour le potassium) a été suivie pendant 78 h. Un

Eppendorf de PBGS a été dilué dans 80 ml des tampons respectifs. Les tubes ont été remplis de la manière suivante (2 tubes par mesure) :

<b>Tubes</b>	<b>Solution de PBGS (en µl)</b>	<b>Tampon (en µl)</b>	<b>Solution de ALA 5 (en µl)</b>
1	400	900	200
2	400	1000	100
3	400	1020	80
4	400	1040	60
5	400	1050	50
6	400	1060	40

Les tubes, une fois remplis, sont placés dans un bain à 37°C et préincubés durant 30 min. Le substrat (ALA 5) est additionné selon les volumes indiqués dans le tableau ci-dessus et le mélange résultant est incubé pendant 14 min. On ajoute ensuite 1 ml de tampon stop (voir 6.3.1.5) afin d'arrêter la réaction enzymatique et les tubes sont placés dans de la glace. Après centrifugation (4500 rpm, 4 min, Mistral), 1 ml du surnageant est ajouté à 1 ml du réactif d'Ehrlich (voir 6.3.1.5) et le tout est à nouveau centrifugé (4500 rpm, 4 min, Mistral). La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 554 nm ( $=62'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

On calcule ensuite le  $K_M$  de la PBGS pour chacun des tampons selon les équations de Michalis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee et Hanes. On réalise ensuite un graphique des  $K_M$  en fonction du temps pour les deux tampons.

## **5.4 Etude enzymatique de la PBGS**

### **5.4.1 Courbe d'étalonnage du réactif d'Ehrlich complexé au PBG**

On a déterminé la linéarité des valeurs d'absorbance obtenues du complexe Ehrlich-PBG lorsqu'on utilise différentes dilutions du réactif d'Ehrlich.

On utilise un réactif d'Ehrlich 1x (voir 5.3.1.5) ainsi que 2x et 4x dilué.

On prépare une solution de PBG (MM=226.23 g/mol) de 2 mg dans 1 l de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5) (\*\*) et l'on effectue les dilutions suivantes afin d'obtenir 8 solutions différentes de PBG conduisant à des valeurs d'absorbance comprise entre 0.01 et 0.5.

<b>Tubes</b>	<b>Volume sol. finale (en ml)</b>	<b>Volume de sol. (**) (en ml)</b>	<b>Volume de tampon (en ml)</b>	<b>Concentration finale de PBG (en µg/ml)</b>	<b>Concentration finale de PBG (en M)</b>
1	100	4	96	0.08	$3.54 \cdot 10^{-7}$
2	100	8	92	0.016	$7.07 \cdot 10^{-7}$
3	100	15	85	0.3	$1.33 \cdot 10^{-6}$
4	100	22	78	0.44	$1.94 \cdot 10^{-6}$
5	100	30	70	0.6	$2.65 \cdot 10^{-6}$
6	100	50	50	1	$4.42 \cdot 10^{-6}$
7	100	70	30	1.4	$6.19 \cdot 10^{-6}$
8	100	100	--	2	$8.84 \cdot 10^{-6}$

On mélange 1 ml des solutions 1 à 8 avec 1 ml du réactif d'Ehrlich 1x, (ou avec 0.5 ml du réactif 2x ou avec 0.25 ml du réactif 4x). On effectue la mesure quatre fois pour chaque tube. Ensuite on représente, sur un graphique, l'absorbance moyenne en fonction de la quantité de PBG.

#### **5.4.2 Courbe d'étalonnage du PBG complexé au réactif d'Ehrlich en présence de l'enzyme et du tampon stop**

De la même manière que pour le chapitre 5.4.1, on détermine la linéarité des valeurs obtenues, mais cette fois en présence de l'enzyme et du tampon stop à trois concentrations différentes 1x (voir 5.3.1.5), 2x et 4x.

Pour obtenir le même volume final que pour les tests précédents, on dilue un Eppendorf d'enzyme dans 20 ml de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5). on obtient ainsi une solution d'enzyme 4x concentrée.

On prend une solution de PBG de 2 mg dans 1000 ml tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5) (\*\*).

<b>Tubes</b>	<b>Volume sol. finale (en µl)</b>	<b>Volume de sol. (**) (en µl)</b>	<b>Volume de tampon (en µl)</b>	<b>Volume de la solution d'enz. (en µl)</b>
1	1500	200	1200	100
2	1500	400	1000	100
3	1500	600	800	100
4	1500	800	600	100
5	1500	1000	400	100
6	1500	1200	200	100
7	1500	1400	--	100

On prépare les tubes selon le tableau ci-dessus (4 essais pour chaque tube). On les préincube à 37°C pendant 15 min, et on ajoute le tampon stop (1 ml de 1x concentré ou 0.5 ml de 2x concentré ou 0.25 ml de 4x concentré). On centrifuge les tubes à 4500 rpm pendant 4 min.

A 1 ml du surnageant, on ajoute 1 ml du réactif d'Ehrlich 1x concentré (ou 0.25 ml du réactif d'Ehrlich 4x concentré). On centrifuge à nouveau à 4500 rpm pendant 4 min. On mesure ensuite l'absorbance. L'absorbance moyenne est finalement représentée en fonction de la quantité de PBG.

#### **5.4.3 Détermination des constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) pour les deux sites**

On prépare une solution de ALA 0.5 mg dans 10 ml de tampon phosphate pH=8.0 (ALA 5) (voir 5.3.1.5) et un Eppendorf contenant la PBGS (environ 1.4 mg) est dilué dans 80 ml de tampon phosphate pH=8.0. Le schéma de pipetage est le suivant et la solution d'ALA 5 n'est ajoutée qu'après la préincubation :

<b>Tubes</b>	<b>Solution de PBGS (en µl)</b>	<b>Tampon (en µl)</b>	<b>Solution de ALA (en µl)</b>
1	400	1080	20
2	400	1060	40
3	400	1040	60
4	400	1020	80
5	400	1000	100
6	400	900	200
7	400	800	300
8	400	700	400

Les tubes, une fois remplis, sont placés dans un bain à 37°C et préincubés pour 15 min. Le substrat (ALA 5) est additionné selon les volumes indiqués dans le tableau ci-dessus et le mélange résultant est incubé pendant 14 min. On ajoute ensuite 1 ml de tampon stop (voir 6.3.1.5) afin d'arrêter la réaction enzymatique et les tubes sont placés dans de la glace. Après centrifugation (4500 rpm, 4 min, Mistral), 1 ml du surnageant est ajouté à 1 ml du réactif d'Ehrlich 1x (voir 6.3.1.5) et le tout est à nouveau centrifugé (4500 rpm, 4 min, Mistral). La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 554 nm ( $\epsilon = 62'000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **5.4.4 Préparation de la solution de l'inhibiteur**

On dissout une quantité appropriée d'inhibiteur dans 5 ou 10 ml de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5) de manière à obtenir des valeurs d'absorption comprises entre 0.1 et 0.8. Si l'inhibiteur est peu soluble dans le tampon, il est possible d'ajouter un peu de DMSO comme cosolvant, au vu des tests démontrant que, jusqu'à une teneur de 1.3 % en volume, aucune influence sur l'activité n'est rencontrée.

#### **5.4.5 Test d'inhibition**

Le test d'inhibition est effectué dans 48 tubes de 10 ml en polypropylène. On prépare du tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5) et un Eppendorf contenant la PBGS est dilué dans

80 ml de ce tampon. Il y a toujours deux tubes par mesure et ceux-ci sont remplis de la manière suivante; la solution d'ALA 5 (voir 5.3.1.5) n'est ajoutée qu'après la préincubation :

	<b>blanc</b>	<b>conc. I</b>	<b>conc. II</b>	<b>conc. III</b>
<b>inhibiteur (dilué dans le tampon phosphate pH=8.0)</b>	0 µl	50 µl	100 µl	200 µl
<b>solution de la PBGS</b>	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
<b>tampon phosphate pH=8.0</b>	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml
<b>solution ALA 5</b>	40, 50, 60, 80, 100, 200 µl	40, 50, 60, 80, 100, 200 µl	40, 50, 60, 80, 100, 200 µl	40, 50, 60, 80, 100, 200 µl

Les tubes, une fois remplis, sont placés dans un bain à 37°C et préincubés pour 30 min. Le substrat (ALA 5) est additionné selon les volumes indiqués dans le tableau ci-dessus et le mélange résultant est incubé pendant 14 min exactement. On ajoute ensuite 1 ml de tampon stop (voir 5.3.1.5) afin d'arrêter la réaction enzymatique et les tubes sont placés dans de la glace. Après centrifugation (4500 rpm, 4 min, Mistral), 1 ml du surnageant est ajouté à 1 ml du réactif d'Ehrlich 1x (voir 5.3.1.5) et le tout est à nouveau centrifugé (4500 rpm, 4 min, Mistral). La quantité de PBG formée est obtenue en mesurant l'absorbance à 554 nm ( = 62'000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Le type d'inhibition est déterminé selon l'allure des courbes obtenues dans les graphiques de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee et Hanes. Les valeurs de K<sub>Mapp</sub> et de K<sub>I</sub> sont déterminées par extrapolation des valeurs des courbes.

#### **5.4.6 Différenciation des inhibiteurs réversibles et irréversibles/slow-binder**

Afin de pouvoir déterminer si un inhibiteur possède un caractère réversible ou irréversible/slow binder, on modifie légèrement le test d'inhibition décrit dans le chapitre 5.4.5. En effet, on utilise deux temps différents de préincubation : celui de la première série de tubes est de 30 min et celui de la deuxième série est de 90 min. Le temps d'incubation avec l'ALA

5 reste de 14 min pour les deux séries. Ce test est effectué sur 12 tubes (toujours deux tubes par mesure) et le schéma de pipetage est le suivant :

	<b>blanc</b>	<b>conc. I</b>	<b>blanc'</b>	<b>conc. I'</b>
<b>inhibiteur (dilué dans le tampon phosphate pH=8.0)</b>	0 µl	400 µl	0 µl	400 µl
<b>solution de la PBGS</b>	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
<b>tampon phosphate pH=8.0</b>	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml	compléter à un volume de 1.5 ml
<b>solution ALA 5</b>	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl

On calcule l'activité (%) en effectuant un rapport entre la valeur d'absorbance de conc.I et celle du blanc et entre la valeur d'absorbance du conc.I' et du blanc'.

Si, en comparant l'activité obtenue après 30 min à celle obtenue après 90 min, celle-ci est plus ou moins stable, on considère que l'inhibiteur est réversible, mais si l'activité diminue, l'inhibiteur présente un caractère irréversible/slow-binder.

Le type d'inhibition irréversible ou slow binder est différencié par dialyse.

#### 5.4.7 Dialyse

Un Eppendorf contenant la PBGS est dilué dans 10 ml de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5). On remplit deux tubes de la manière suivante :

	<b>blanc</b>	<b>échantillon</b>
<b>solution de la PBGS</b>	4 ml	4 ml
<b>inhibiteur</b>	----	2.5 à 10 mg

Après 24 h d'incubation à 37°C, on détermine l'activité spécifique de la manière décrite dans le chapitre 5.3.2.3. En comparant la valeur obtenue pour l'échantillon et à celle obtenue pour le blanc, on obtient un rapport en %.

On prélève 1 ml de la solution du blanc ainsi que 1 ml de la solution de l'échantillon et chaque solution est placée dans un sachet de dialyse (1 10 cm). Chaque sachet est placé ensuite dans un Ehrlen de 2 l et dialysé dans 1 l de tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5) à 4°C. La dialyse se déroule pendant 72 h. Après 48 h, le tampon est changé et remplacé par du frais. Après les 72 h, on détermine à nouveau l'activité spécifique ainsi que le rapport entre l'échantillon et le blanc.

Si les deux rapports obtenus sont quasiment identiques ou ont diminué, l'inhibiteur est considéré comme irréversible, mais si le rapport après 72 h est plus élevé que celui pris au temps 0 h, alors l'inhibiteur est dit slow binder.

#### **5.4.8 Tableaux des résultats**

Les résultats obtenus pour les divers tests (pour les inhibiteurs non publiés) sont énumérés dans les tableaux qui suivent. Les concentrations utilisées pour les inhibiteurs sont données dans la deuxième ligne du tableau. Les valeurs des  $K_I$  (1),  $K_I$  (2),  $K_I$  (3) et  $K_I$  (4) sont extrapolées des graphiques de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk, d'Eadie-Hofstee et de Hanes.

Les derniers tableaux correspondent aux inhibiteurs à caractère irréversible/slow binder.

ALA [ $\mu$ M]	composé 59				composé 60			
		5474	10948	21896		4707	9414	18828
79.4	0.427	0.402	0.346	0.291	0.406	0.308	0.208	0.084
	0.424	0.404	0.368	0.287	0.421	0.306	0.200	0.080
99.2	0.474	0.443	0.428	0.340	0.449	0.341	0.236	0.108
	0.466	0.437	0.427	0.351	0.451	0.342	0.244	0.112
119.1	0.514	0.487	0.467	0.384	0.498	0.389	0.277	0.132
	0.503	0.481	0.454	0.380	0.499	0.381	0.261	0.126
158.8	0.559	0.548	0.484	0.453	0.546	0.445	0.338	0.171
	0.569	0.548	0.522	0.443	0.543	0.400	0.334	0.170
198.5	0.593	0.575	0.547	0.503	0.562	0.478	0.387	0.210
	0.585	0.574	0.541	0.480	0.570	0.483	0.390	0.208
397.0	0.726	0.683	0.672	0.622	0.652	0.579	0.488	0.327
	0.715	0.680	0.649	0.614	0.646	0.584	0.492	0.321
$V_{max}$ (1)	3.31	3.17	3.14	3.27	2.91	2.89	2.91	3.46
$K_{Mapp}$ (1)	84	(85)	97	147	65	118	207	702
$K_I$ (1)			70741	29195		5773	4309	1921
$V_{max}$ (2)	3.24	3.17	3.19	3.41	2.93	2.86	3.18	(9.05)
$K_{Mapp}$ (2)	79	85	101	161	67	115	243	(2117)
$K_I$ (2)		72074	39313	21095		6570	3584	(617)
$V_{max}$ (3)	3.34	3.17	3.15	3.26	2.90	2.89	2.91	4.04
$K_{Mapp}$ (3)	87		99	147	64	118	209	862
$K_I$ (3)			79373	31749		5479	4155	1510
$V_{max}$ (4)	3.27	3.17	3.13	3.31	2.91	2.88	2.99	3.36
$K_{Mapp}$ (4)	81	(84)	96	152	66	116	220	687
$K_I$ (4)			59120	24980		6213	4035	2001
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 49968 $K_I$ (2): 44161				$K_I$ (1): 4001 $K_I$ (2): 5077			
	$K_I$ (3): 55561 $K_I$ (4): 42050				$K_I$ (3): 3748 $K_I$ (4): 4083			
	Préincubation: 34 min    Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min    Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 1				Nombre de tests: 2			

ALA [ $\mu$ M]	composé 61				composé 62			
			7250	14500	29000			
79.4	0.516	0.452	0.420	0.388	0.292	0.486	0.391	0.272
	0.527	0.455	0.419	0.350	0.278	0.482	0.369	0.258
99.2	0.573	0.510	0.471	0.427	0.337	0.556	0.479	0.333
	0.582	0.507	0.456	0.429	0.335	0.548	0.443	0.319
119.1	0.664	0.545	0.501	0.456	0.367	0.577	0.501	0.345
	0.624	0.538	0.506	0.467	0.367	0.588	0.483	0.363
158.8	0.709	0.602	0.567	0.532	0.439	0.655	0.610	0.379
	0.674	0.600	0.559	0.522	0.436	0.648	0.591	0.380
198.5	0.718	0.619	0.598	0.574	0.471	0.691	0.639	0.446
	(0.698)	0.917	0.599	0.563	0.487	0.680	0.653	0.472
397.0	0.840	0.727	0.680	0.653	0.576	0.802	0.681	0.585
	0.831	0.692	0.672	0.629	0.574	0.768	0.677	0.577
$V_{max}$ (1)	3.74	3.16	3.09	3.04	2.96	3.57	3.34	3.11
$K_{Mapp}$ (1)	67	62	72	85	128	70	87	159
$K_I$ (1)			44950	39087	27242	(146998)	44099	19174
$V_{max}$ (2)	3.78	3.18	3.14	3.17	3.12	3.60	3.73	3.08
$K_{Mapp}$ (2)	69	64	75	95	144	73	116	156
$K_I$ (2)			42182	29935	23200	(113540)	19326	20881
$V_{max}$ (3)	3.74	3.15	3.06	2.98	2.93	3.54	3.18	3.12
$K_{Mapp}$ (3)	67	62	69	81	126	69	76	161
$K_I$ (3)			64214	47316	28094	(220497)	(97999)	18766
$V_{max}$ (4)	3.75	3.16	3.11	3.08	3.01	3.57	3.39	3.02
$K_{Mapp}$ (4)	67	63	73	89	134	71	92	150
$K_I$ (4)			45675	35135	25732	(110248)	35280	21253
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 31637		$K_I$ (2): 20104		$K_I$ (1): 37093		$K_I$ (2): 32750	
	$K_I$ (3): 18766		$K_I$ (4): 28267		$K_I$ (3): 46541		$K_I$ (4): 35514	
	Préincubation: 32 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 2			

ALA [ $\mu$ M]	composé 27				composé 52			
		182	364	728		648	1296	2592
79.4	0.485	0.344	0.297	0.196	0.437	0.400	0.315	0.292
	0.463	0.338	0.269	0.216	0.417	0.374	0.352	0.269
99.2	0.556	0.402	(0.347)	0.239	0.469	0.414	0.342	0.318
	0.577	0.415	(0.343)	0.235	0.460	0.436	0.389	0.339
119.1	0.619	0.446	0.344	0.259	0.501	0.459	0.424	0.385
	0.613	0.452	0.325	0.265	0.501	0.468	0.411	0.392
158.8	0.642	0.484	0.414	0.300	0.538	0.507	0.500	0.440
	0.658	0.492	0.403	0.302	0.528	0.523	0.475	0.436
198.5	0.688	0.508	0.442	0.332	0.589	0.573	0.553	0.461
	0.689	0.508	0.437	0.330	0.573	0.567	0.535	0.483
397.0	0.802	0.601	0.522	0.381	0.697	0.663	0.633	0.589
	0.781	0.600	0.523	0.387	0.653	0.642	0.624	0.577
$V_{max}$ (1)	3.57	2.78	2.53	1.89	3.01	3.06	3.18	3.01
$K_{Mapp}$ (1)	68	80	102	105	69	85	116	132
$K_I$ (1)		1031	728	1338		2795	1903	2839
$V_{max}$ (2)	3.70	2.90	2.55	1.98	2.96	3.07	3.31	3.25
$K_{Mapp}$ (2)	76	90	104	117	65	86	128	155
$K_I$ (2)		988	988	1349		2006	1337	1872
$V_{max}$ (3)	3.55	2.77	2.52	1.87	3.04	3.04	3.13	3.00
$K_{Mapp}$ (3)	67	79	101	102	71	84	113	131
$K_I$ (3)		1016	717	1394		3539	2191	3067
$V_{max}$ (4)	3.57	2.79	2.49	1.92	2.98	3.07	3.22	3.05
$K_{Mapp}$ (4)	69	81	98	110	67	86	121	137
$K_I$ (4)		1046	866	1225		2285	1608	2484
Valeur moyenne		$K_I$ (1): 1032 $K_I$ (2): 1108 $K_I$ (3): 1042 $K_I$ (4): 1046				$K_I$ (1): 2512 $K_I$ (2): 1738 $K_I$ (3): 2932 $K_I$ (4): 2125		
	Préincubation: 33 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests:			

ALA [ $\mu$ M]	composé <b>63</b>				composé <b>64</b>			
		456	912	1824		1719	3438	6876
79.4	0.507	0.337	0.265	0.185	0.459	0.306	0.274	0.208
	0.498	0.314	0.263	0.183	0.446	0.336	0.245	0.201
99.2	0.565	0.386	0.333	0.212	0.503	0.358	0.308	0.230
	0.551	0.388	0.309	0.209	0.490	0.351	0.310	0.243
119.1	0.577	0.418	0.342	0.242	0.532	0.389	0.354	0.254
	0.581	0.418	0.347	0.241	0.520	0.377	0.341	0.252
158.8	0.643	0.483	0.395	0.276	0.564	0.414	0.362	0.292
	0.640	0.487	0.394	0.286	0.513	(0.347)	0.363	0.287
198.5	0.659	0.524	0.403	0.293	0.577	0.422	0.392	0.310
	0.665	0.514	(0.380)	0.323	0.579	0.432	0.392	0.310
397.0	0.758	0.616	0.554	0.435	0.662	0.475	0.427	0.347
	0.741	0.624	0.556	0.440	0.643	0.468	0.433	0.374
$V_{max}$ (1)	3.16	3.09	3.04	2.96	2.77	2.06	1.97	1.71
$K_{Mapp}$ (1)	62	72	85	128	47	50	67	89
$K_I$ (1)		44950	39087	27242		(26931)	8079	7695
$V_{max}$ (2)	3.18	3.14	3.17	3.12	2.74	2.09	2.10	1.75
$K_{Mapp}$ (2)	64	75	95	144	46	54	81	96
$K_I$ (2)		42182	29935	23200		9884	4519	6326
$V_{max}$ (3)	3.15	3.06	2.98	2.93	2.81	2.03	1.92	1.69
$K_{Mapp}$ (3)	62	69	81	126	50	48	62	88
$K_I$ (3)		64214	47316	28094			14325	9047
$V_{max}$ (4)	3.16	3.11	3.08	3.01	2.75	2.07	1.98	1.72
$K_{Mapp}$ (4)	63	73	89	134	46	52	69	92
$K_I$ (4)		45675	35135	25732		13179	6876	6876
Valeur moyenne		$K_I$ (1): 37093 $K_I$ (3): 46541	$K_I$ (2): 32750 $K_I$ (4): 35514			$K_I$ (1): 7887 $K_I$ (3): 11686	$K_I$ (2): 69010 $K_I$ (4): 8977	
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 31 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3.				Nombre de tests: 2			

ALA [ $\mu$ M]	composé 65				composé 66			
			540	1080	2160	1231	2462	4924
79.4	0.467	0.450	0.427	0.398	0.372	0.418	0.400	0.326
	0.468	0.443	0.429	0.417	0.373	0.424	0.401	0.358
99.2	0.527	0.501	0.470	0.430	0.394	0.478	0.459	0.365
	0.517	0.498	0.456	0.444	0.396	0.483	0.447	0.371
119.1	0.556	0.506	0.495	0.462	0.425	0.512	0.489	0.414
	0.536	0.544	0.484	0.473	0.417	0.515	0.460	0.399
158.8	0.614	0.577	0.530	0.502	0.448	0.569	0.543	0.502
	0.610	0.575	0.532	0.491	0.451	0.578	0.550	0.503
198.5	0.636	0.593	0.560	0.522	0.472	0.605	0.565	0.527
	0.641	0.585	0.560	0.518	0.471	0.611	0.578	0.539
397.0	0.754	0.680	0.597	0.539	0.474	0.676	0.651	0.608
	0.715	0.654	0.591	0.543	0.489	0.676	0.651	0.613
$V_{max}$ (1)	3.28	2.90	2.50	2.31	2.05	3.08	2.98	3.02
$K_{Mapp}$ (1)	65	53	39	36	33	67	72	104
$K_I$ (1)			1504	2287	3564	(40007)	22861	8207
$V_{max}$ (2)	3.28	2.92	2.54	2.34	2.07	3.16	3.02	3.12
$K_{Mapp}$ (2)	65	54	42	38	35	73	76	113
$K_I$ (2)			1890	2565	3979	10002	14548	6668
$V_{max}$ (3)	3.28	2.90	2.43	2.26	1.99	3.03	2.94	2.96
$K_{Mapp}$ (3)	65	53	34	32	28	64	70	99
$K_I$ (3)			996	1646	2419		(32935)	9414
$V_{max}$ (4)	3.27	2.90	2.52	2.32	2.06	3.11	2.99	3.03
$K_{Mapp}$ (4)	65	53	41	37	34	70	73	106
$K_I$ (4)			1845	2498	3865	16003	20004	7806
Valeur moyenne	$K_I$ (1): 15534 $K_I$ (2): 10406				$K_I$ (1): 2452 $K_I$ (2): 2845			
	$K_I$ (3): 9414 $K_I$ (4): 14604				$K_I$ (3): 1687 $K_I$ (4): 2736			
	Préincubation: 30 min    Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min    Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 3			

ALA [ $\mu$ M]	composé 56				composé 67			
		193	386	772		102	204	408
79.4	0.429	0.391	0.357	0.301	0.398	0.283	0.248	0.208
	0.418	0.357	0.348	0.296	0.442	0.281	0.247	0.201
99.2	0.477	0.445	0.391	0.307	0.489	0.289	0.249	0.209
	0.480	0.415	0.395	0.343	0.488	0.287	0.255	0.211
119.1	0.502	0.485	0.415	0.370	0.485	0.315	0.270	0.220
		0.453	0.433		0.510	0.307	0.258	0.221
158.8	0.556	0.437	0.444	0.392	0.569	0.330	0.280	0.232
	0.543	0.530	0.444	0.387	0.553	0.232	0.281	0.235
198.5	0.603	0.530	0.489	0.369	0.582	0.336	0.284	0.238
	0.580	0.534	0.484		0.582	0.336	0.288	0.242
397.0	0.679	0.607	0.539	0.431	0.677	0.350	0.294	0.245
	0.727	0.615	0.534	0.433	0.651	0.353	0.289	0.243
$V_{max}$ (1)	3.19	2.74	2.35	1.89	2.96	1.46	1.20	1.01
$K_{Mapp}$ (1)	77	69	56	47	63	28	21	22
$K_I$ (1)		1665	1029	1209		82	102	
$V_{max}$ (2)	3.14	2.77	2.38	1.95	2.99	1.46	1.20	1.01
$K_{Mapp}$ (2)	74	71	59	53	65	29	21	23
$K_I$ (2)		(4568)	1518	1948		82	97	
$V_{max}$ (3)	3.23	2.75	2.34	1.85	2.94	1.44	1.17	0.98
$K_{Mapp}$ (3)	80	70	55	4285	62	26	18	19
$K_I$ (3)		1351	849	853		74	83	
$V_{max}$ (4)	3.16	2.73	2.36	1.90	2.96	1.46	1.20	1.01
$K_{Mapp}$ (4)	75	68	57	48	63	28	21	23
$K_I$ (4)		1875	1222	1372		82	102	
Valeur moyenne		$K_I$ (1): 1301 $K_I$ (3): 1018	$K_I$ (2): 1733 $K_I$ (4): 1490			$K_I$ (1): 92 $K_I$ (3): 79	$K_I$ (2): 90 $K_I$ (4): 92	
	Préincubation: min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 6				Nombre de tests: 2			

ALA [ $\mu$ M]	composé <b>68</b>				composé <b>70</b>			
		1622	3244	6448		2681	5362	10724
79.4	0.438	0.370	0.316	0.214	0.549	0.469	0.400	0.275
	0.428	0.337	0.320	0.206	0.513	0.474	0.416	0.289
99.2	0.488	0.423	0.368	0.256	0.605	0.529	0.472	0.328
	0.493	0.413	0.368	0.260	0.606	0.536	0.476	0.322
119.1	0.531	0.434	0.413	0.278	0.644	0.564	0.519	0.374
	0.532	0.463	0.407	0.254	0.631	0.561	0.500	0.361
158.8	0.592	0.514	0.467	0.377	0.694	0.609	0.521	0.407
	0.586	0.513	0.467	0.349	0.702	0.585	0.520	0.416
198.5	0.632	0.550	0.502	0.401	0.720	0.633	0.579	0.431
	0.599	0.548	0.478	0.403	0.709	(0.581)	0.556	0.435
397.0	0.702	0.610	0.587	0.497	0.837	0.702	0.633	0.547
	0.686	0.623	0.586	0.500	0.800	0.713	0.635	0.547
$V_{max}$ (1)	3.15	2.92	2.83	2.90	3.59	3.08	2.78	2.70
$K_{Mapp}$ (1)	68	83	99	193	57	53	56	115
$K_I$ (1)		7354	7116	3508				10539
$V_{max}$ (2)	3.21	3.08	2.94	3.27	3.63	3.10	2.83	2.73
$K_{Mapp}$ (2)	73	96	109	240	59	55	60	118
$K_I$ (2)		5148	6578	2763				10724
$V_{max}$ (3)	3.12	2.86	2.81	2.90	3.59	3.07	2.77	2.70
$K_{Mapp}$ (3)	66	78	97	196	57	53	56	116
$K_I$ (3)		8921	6907	3274				10360
$V_{max}$ (4)	3.17	2.96	2.86	2.92	3.59	3.08	2.78	2.69
$K_{Mapp}$ (4)	70	87	102	197	57	53	56	115
$K_I$ (4)		6679	7096	3554				10539
Valeur moyenne		$K_I$ (1):5993 $K_I$ (2): 4830 $K_I$ (3): 6367 $K_I$ (4): 5776				$K_I$ (1): 10539 $K_I$ (2): 10724 $K_I$ (3): 10360 $K_I$ (4): 10539		
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 7				Nombre de tests: 3			

composé **69**

<b>Essai</b>	<b>Inh</b>	<b>PBGS</b>	<b>Tamp</b>	<b>ALA</b>	<b>Abs</b>
1	0	400	900	200	0.857
2	0	400	900	200	0.871
3	400	400	500	200	0.580
4	400	400	500	200	0.581
1'	0	400	900	200	0.903
2'	0	400	900	200	0.900
3'	400	400	500	200	0.332
4'	400	400	500	200	0.369
5	0	400	1000	100	0.686
6	0	400	1000	100	0.708
7	400	400	600	100	0.525
8	400	400	600	100	0.518
5'	0	400	1000	100	0.763
6'	0	400	1000	100	0.757
7'	400	400	600	100	0.340
8'	400	400	600	100	0.340
9	0	400	1050	50	0.526
10	0	400	1050	50	0.510
11	400	400	650	50	0.385
12	400	400	650	50	0.273
9'	0	400	1050	50	0.547
10'	0	400	1050	50	0.552
11'	400	400	650	50	0.290
12'	400	400	650	50	0.274

Conc: 0.59 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 min

composé 71

Essai	Inh	PBGS	Tamp	ALA	Abs
1	0	400	900	200	0.888
2	0	400	900	200	0.882
3	400	400	500	200	0.744
4	400	400	500	200	0.755
1'	0	400	900	200	0.920
2'	0	400	900	200	0.901
3'	400	400	500	200	0.727
4'	400	400	500	200	0.708
5	0	400	1000	100	0.763
6	0	400	1000	100	0.703
7	400	400	600	100	0.641
8	400	400	600	100	0.652
5'	0	400	1000	100	0.670
6'	0	400	1000	100	0.745
7'	400	400	600	100	0.568
8'	400	400	600	100	0.576
9	0	400	1050	50	0.496
10	0	400	1050	50	0.505
11	400	400	650	50	0.435
12	400	400	650	50	0.449
9'	0	400	1050	50	0.559
10'	0	400	1050	50	0.533
11'	400	400	650	50	0.339
12'	400	400	650	50	0.414

Conc: 6.39 mg/ml

Temps incubation = 14 min

Temps préincubation 1 = 30 min

Temps préincubation 2 = 90 min

## 5.5 Détermination de l'énamine vinylogue par mesure UV/VIS

### 5.5.1 Utilisation de l'acide 6-aminocaproïque comme imitation de la lysine au site actif de l'enzyme

On prépare une solution de 50  $\mu\text{M}$  de succinylacétone et 100 mM d'acide 6-aminocaproïque dans du tampon phosphate pH = 8.0 (voir 5.3.1.5) dont le volume final est de 3.5 ml. On suit la formation de l'énamine vinylogue par UV/VIS pendant 20 h à température ambiante, en prenant un spectre toutes les 30 min. Le maximum d'absorption est obtenu à 314 nm.

On prépare diverses solutions contenant chacune 51.22  $\mu\text{M}$  de succinylacétone en faisant varier la concentration d'acide 6-aminocaproïque dans du tampon phosphate pH = 8.0 (0  $\mu\text{M}$ , 50.09  $\mu\text{M}$ , 101.71  $\mu\text{M}$ , 201.25  $\mu\text{M}$ , 302.09  $\mu\text{M}$ , 401.63  $\mu\text{M}$ , 502.25  $\mu\text{M}$ , 602.66  $\mu\text{M}$ , 803.04  $\mu\text{M}$  et 1002.77  $\mu\text{M}$ ) pour un volume final de 3.5 ml. On prend les valeurs UV/VIS après 64 h à 314 nm.

On rapporte les valeurs maximales d'absorbance en fonction de la concentration molaire de l'acide 6-aminocaproïque dans un graphique. La courbe reliant les points est la meilleure approximation de l'équation de Segel II-54b <sup>[79]</sup>.

A = absorbance à l'infinie

A = absorbance de l'amide vinylique à une concentration donnée  
= coefficient d'extinction de l'amide vinylogue

$[S]_t$  = concentration de la succinylacétone = [succ] = constante

$[E]_t$  = concentration de l'acide 6-aminocaproïque = [amine]

[ES] = concentration de l'amide vinylogue

$[E]_t$  = concentration totale de l'enzyme

l = longueur de la cuvette en quartz (1 cm)

$K_S$  = constante de dissociation l'amide vinylogue

$$\frac{[S]_t}{[ES]} = K_S \frac{1}{[E]_t - [ES]} + 1 \quad (1)$$

$$A = 1 - c = \frac{A}{1 - c} = \frac{A}{1 - [\text{succ}]}$$

$$[\text{ES}] = \frac{A}{1} = \frac{A}{\frac{A}{1 - [\text{succ}]}} = \frac{A}{A} \quad [\text{succ}]$$

remplacer cette équation dans (1)

$$\frac{\frac{[\text{succ}]}{A}}{\frac{A}{[\text{succ}]}} = K_S \frac{1}{[\text{amine}] - \frac{A}{A} [\text{succ}]} + 1$$

$$\frac{A}{A} = K_S \frac{1}{[\text{amine}] - \frac{A}{A} [\text{succ}]} + 1 \quad (2)$$

simplification :  $\frac{1}{x} = \frac{A}{A}$

$$\frac{1}{x} = K_S \frac{1}{[\text{amine}] - x [\text{succ}]} + 1 \quad | \quad [\text{amine}] - x [\text{succ}]$$

$$K_S = \frac{1}{x} ([\text{amine}] - x [\text{succ}]) - ([\text{amine}] - x [\text{succ}])$$

$$K_S = \left(\frac{1}{x} - 1\right) ([\text{amine}] - x [\text{succ}])$$

$$K_S = \left(\frac{A}{A} - 1\right) ([\text{amine}] - \frac{A}{A} [\text{succ}])$$

On définit  $A = y$ ,  $[\text{amine}] = x$  et  $[\text{succ}] = 50$  que l'on remplace dans l'équation (2)

$$\frac{A}{y} = K_S \frac{1}{x - \frac{y}{A} 50} + 1$$

$$\frac{A}{y} = \frac{K_S + x - \frac{y}{A} 50}{x - \frac{y}{A} 50}$$

$$K_S y + x y - \frac{y^2}{A} - 50 = A x - 50 y$$

$$-\frac{50}{A} y^2 + (K_S + x + 50) y - A x = 0$$

$$\frac{50}{A} y^2 - (K_S + x + 50) y + A x = 0$$

Equation du second degré, les solutions sont de la forme :  $\frac{b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$

$$y = \frac{K_S + x + 50 \pm \sqrt{(K_S + x + 50)^2 - 200x}}{\frac{100}{A}}$$

La courbe devant passer par l'origine, c'est la solution avec le moins devant la racine carrée qui va donner une courbe cohérente lors de la régression non linéaire.

### 5.5.2 Détermination au site actif de la PBGS

On prépare six tubes dans lesquels on ajoute une solution de succinylacétone de concentration variable (2, 4, 6, 7.8, 10.24 et 12.19  $\mu\text{M}$ ) ainsi que l'enzyme (14.10  $\mu\text{M}$ ). Le volume de chaque tube est de 3.5 ml; le volume manquant est complété avec du tampon phosphate pH=8.0 (voir 5.3.1.5). Le blanc contient la même concentration en enzyme que les six échantillons ainsi que le tampon phosphate pH = 8.0. Les sept solutions sont laissées réagir à température ambiante pendant 22 h environ. Le maximum de l'absorbance est mesuré à une longueur d'onde de 320 nm.

On rapporte les valeurs maximales d'absorbance en fonction de la concentration molaire de la succinylacétone dans un graphique. La courbe reliant les points est la meilleure approximation de l'équation de Segel II-54b <sup>[79]</sup>.

L'équation utilisée est développée de la même manière que sous le point 5.5.1, en tenant compte des concentrations intervenant dans le test. L'équation obtenue pour le y est la suivante :

$$y = \frac{K_S + x + [\text{enz}] \pm \sqrt{(K_S + x + [\text{enz}])^2 - 4 [\text{enz}] x}}{2 [\text{enz}]}$$

A

# 6 Annexes

## 6.1 Annexe 1

L'équation de la vitesse initiale de Granick et Mauzerall <sup>[95]</sup> s'appliquant à la PBGS est la suivante :

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \frac{1}{S_0} + \frac{k_2}{k_1} \frac{k_4 + k_5}{k_3} \frac{1}{S_0^2}}$$

Pour pouvoir appliquer l'approximation de *steady-state*, il faut remplir les deux conditions suivantes :

$$S_0 \frac{k_2}{k_1 + \frac{k_3 k_5}{k_4 + k_5}}$$

et  $k_5$  est petit pour que  $S_0 \frac{k_2}{k_1}$

Développement de l'inégalité obtenue :

- le deuxième terme du dénominateur doit être plus grand que le troisième terme du dénominateur

$$\frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \frac{1}{S_0} \frac{k_2}{k_1} \frac{k_4 + k_5}{k_3} \frac{1}{S_0^2}$$

$$\frac{k_4 + k_5}{k_3} \frac{1}{S_0} + \frac{k_5}{k_1} \frac{1}{S_0} \frac{k_2}{k_1} \frac{k_4 + k_5}{k_3} \frac{1}{S_0^2}$$

- on simplifie cette équation par  $\frac{k_3}{k_4 + k_5} S_0$

$$1 + \frac{k_5}{k_1} \frac{k_1}{k_4 + k_5} \frac{k_2}{k_1} \frac{1}{S_0}$$

- on multiplie chaque membre par  $k_1$

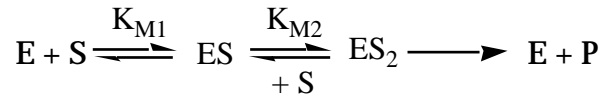
$$k_1 + k_5 \frac{k_3}{k_4 + k_5} k_2 \frac{1}{S_0}$$

- on réarrange les termes

$$\frac{1}{k_2} k_1 + k_5 \frac{k_3}{k_4 + k_5} \frac{1}{S_0} \quad \text{et de là, } S_0 = \frac{k_2}{k_1 + \frac{k_3 k_5}{k_4 + k_5}}$$

## 6.2 Annexe 2

Le schéma réactionnel pour une enzyme à deux substrats identiques formant un seul produit peut être décrite de la manière suivante :



où les constantes de Michaelis-Menten sont définis comme suit :

$$K_{M1} = \frac{[S][E]}{[ES]} \quad \text{et} \quad K_{M2} = \frac{[ES][S]}{[ES_2]}$$

et l'équation de la vitesse devient :  $\frac{dP}{dt} = v = \frac{V_{\max} ([S])^2}{K_{M1} K_{M2} + K_{M2} [S] + ([S])^2}$

Développement de cette dernière équation :

- $[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES] + [ES_2]$  (1)

$$[ES] = [E]_{\text{tot}} - [E] - [ES_2]$$
 (2)

- à partir des constantes de Michaelis-Menten, on met en évidence [E] et [ES]

$$K_{M1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad [E] = \frac{K_{M1} [ES]}{[S]} \quad (3)$$

$$K_{M2} = \frac{[ES][S]}{[ES_2]} \quad [ES] = \frac{K_{M2} [ES_2]}{[S]} \quad (4)$$

- on remplace l'équation (2) dans la (4)

$$\frac{K_{M2} [ES_2]}{[S]} = [E]_{\text{tot}} - [E] - [ES_2] \quad (5)$$

- on réarrange cette équation

$$[ES_2] = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2}} - \frac{[E] [S]}{K_{M2}} - \frac{[ES_2] [S]}{K_{M2}} \quad (6)$$

$$[ES_2] \left( 1 + \frac{[S]}{K_{M2}} \right) = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2}} - \frac{[E] [S]}{K_{M2}} \quad (7)$$

$$[ES_2] = \frac{\frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2}} - \frac{[E] [S]}{K_{M2}}}{1 + \frac{[S]}{K_{M2}}} \quad (8)$$

$$[ES_2] = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2} + [S]} - \frac{[E] [S]}{K_{M2} + [S]} \quad (9)$$

- on remplace l'équation (2) dans la (3)

$$[E] = \frac{K_{M1}}{[S]} [E]_{tot} - \frac{K_{M1}}{[S]} [E] - \frac{K_{M1}}{[S]} [ES_2] \quad (10)$$

- on réarrange cette équation

$$[E] \left( 1 + \frac{K_{M1}}{[S]} \right) = \frac{K_{M1}}{[S]} [E]_{tot} - \frac{K_{M1}}{[S]} [ES_2] \quad (11)$$

$$[E] = \frac{K_{M1} [E]_{tot}}{[S] + K_{M1}} - \frac{K_{M1} [ES_2]}{[S] + K_{M1}} \quad (12)$$

- on remplace l'équation (12) dans la (9)

$$[ES_2] = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2} + [S]} - \frac{K_{M1} [E]_{tot}}{[S] + K_{M1}} - \frac{K_{M1} [ES_2]}{[S] + K_{M1}} - \frac{[S]}{K_{M2} + [S]} \quad (13)$$

- on réarrange cette équation

$$[ES_2] = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2} + [S]} - \frac{K_{M1} [E]_{tot}}{[S] + K_{M1}} \frac{[S]}{K_{M2} + [S]} - \frac{K_{M1} [ES_2]}{[S] + K_{M1}} \frac{[S]}{K_{M2} + [S]} \quad (14)$$

$$[ES_2] \left( 1 - \frac{K_{M1} [S]}{([S] + K_{M1})(K_{M2} + [S])} \right) = \frac{[E]_{tot} [S]}{K_{M2} + [S]} - \frac{K_{M1} [E]_{tot} [S]}{([S] + K_{M1})(K_{M2} + [S])} \quad (15)$$

- on multiplie chaque membre par  $\frac{1}{([S] + K_{M1})([S] + K_{M2})}$

$$[ES_2] \left( [S] + K_{M1} \right) \left( [S] + K_{M2} \right) - K_{M1} [S] = [E]_{tot} \left( [S] + K_{M1} \right) - K_{M1} [S] [E]_{tot} \quad (16)$$

$$[ES_2] = \frac{[E]_{tot} \left( [S] \right)^2 + [E]_{tot} [S] K_{M1} - [E]_{tot} [S] K_{M1}}{\left( [S] + K_{M1} \right) \left( [S] + K_{M2} \right) - K_{M1} [S]} \quad (17)$$

- on sait que  $v = k_{cat} [ES_2]$

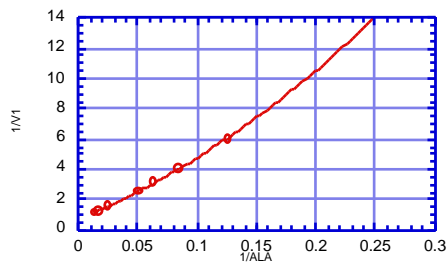
$$v = \frac{k_{cat} [E]_{tot} ([S])^2}{\left( ([S] + K_{M1}) \left( ([S] + K_{M2}) - K_{M1} \right) ([S]) \right)} \quad (18)$$

- on sait que  $V_{max} = [E]_{tot} k_{cat}$

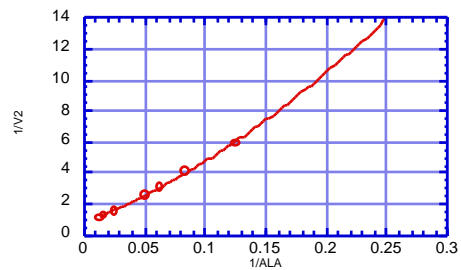
$$v = \frac{V_{max} ([S])^2}{K_{M1} K_{M2} + K_{M2} [S] + ([S])^2}$$

### 6.3 Annexe 3

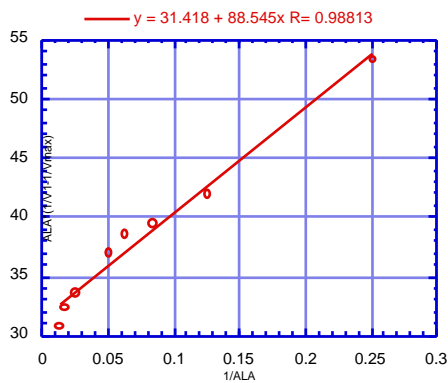
	ALA ( $\mu\text{M}$ )	ABS 1	ABS 2	V 1	V 2	Y 1	Y 2
1	3.97	0.042	0.042	0.071	0.071	53.33	53.31
2	7.95	0.099	0.100	0.166	0.168	41.94	41.90
3	11.91	0.147	0.145	0.247	0.244	39.46	39.39
4	15.89	0.188	0.190	0.316	0.319	38.61	38.53
5	19.85	0.229	0.228	0.384	0.393	36.99	36.88
6	39.70	0.376	0.376	0.632	0.632	33.64	33.43
7	58.55	0.465	0.469	0.781	0.788	32.42	32.10
8	74.40	0.518	0.522	0.870	0.877	30.77	30.36



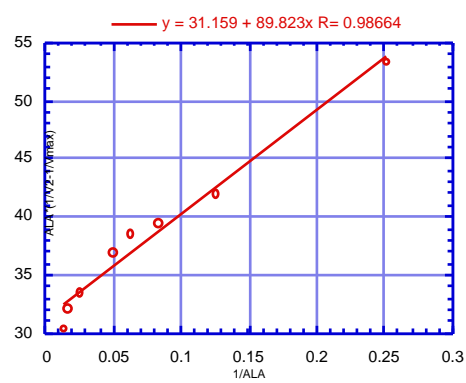
Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
M0	0.73567
M1	32.051
M2	84.267
R	0.99993



Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
M0	0.73804
M1	31.844
M2	84.965
R	0.99986

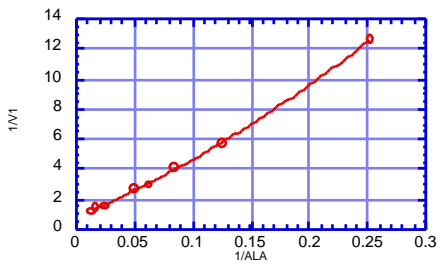


<b>Vmax</b>	1.36 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	42.73 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	2.82 $\mu\text{M}$

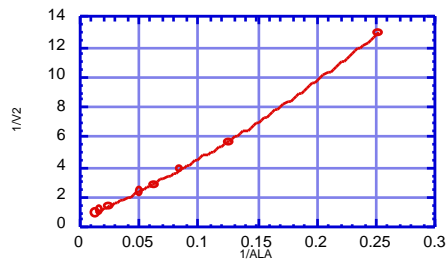


<b>Vmax</b>	1.35 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	42.06 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	2.88 $\mu\text{M}$

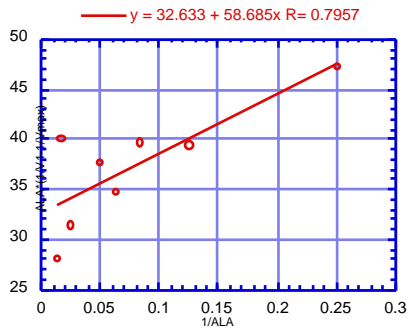
	ALA ( $\mu\text{M}$ )	ABS 1	ABS 2	V 1	V 2	Y 1	Y 2
<b>1</b>	3.97	0.047	0.046	0.074	0.079	47.19	49.17
<b>2</b>	7.95	0.104	0.104	0.183	0.175	39.32	41.10
<b>3</b>	11.91	0.145	0.154	0.245	0.244	39.65	39.44
<b>4</b>	15.89	0.201	0.207	0.341	0.338	34.73	36.90
<b>5</b>	19.85	0.223	0.246	0.371	0.375	37.58	37.05
<b>6</b>	39.70	0.380	0.422	0.641	0.639	31.40	34.05
<b>7</b>	58.55	0.411	0.516	0.701	0.691	40.06	36.78
<b>8</b>	74.40	0.516	0.590	0.857	0.867	21.13	33.94



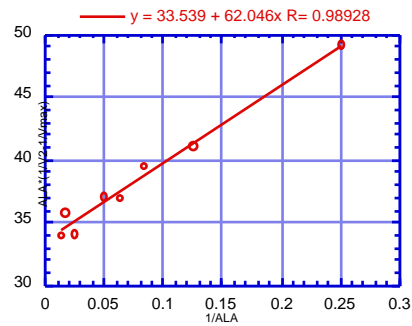
Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
MO	0.77366
M1	33.059
M2	55.96
R	0.99962



Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
MO	0.55266
M1	33.555
M2	61.925
R	0.99997

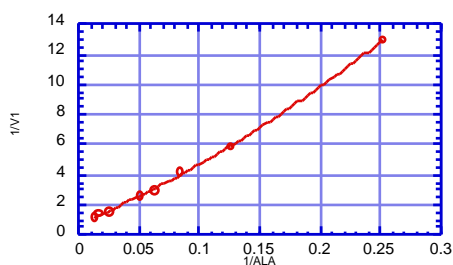


<b>Vmax</b>	1.29 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	42.10 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	1.80 $\mu\text{M}$

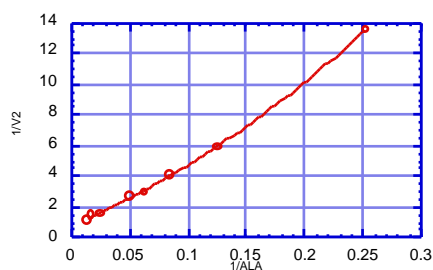


<b>Vmax</b>	1.81 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	60.71 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	1.85 $\mu\text{M}$

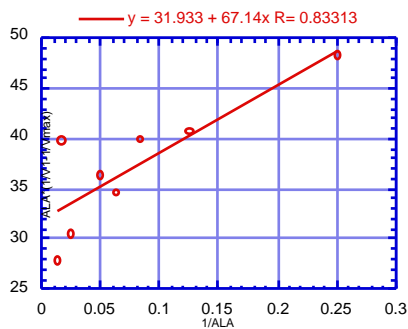
	ALA ( $\mu\text{M}$ )	ABS 1	ABS 2	V 1	V 2	Y 1	Y 2
1	3.97	0.046	0.044	0.077	0.074	48.26	50.77
2	7.95	0.101	0.100	0.170	0.168	40.63	41.51
3	11.91	0.144	0.144	0.242	0.242	39.91	40.53
4	15.89	0.201	0.204	0.338	0.343	34.63	34.75
5	19.85	0.228	0.224	0.383	0.376	36.30	38.25
6	39.70	0.384	0.373	0.645	0.627	30.51	34.36
7	58.55	0.411	0.409	0.691	0.687	39.70	43.18
8	74.40	0.515	0.512	0.865	0.860	27.84	32.17



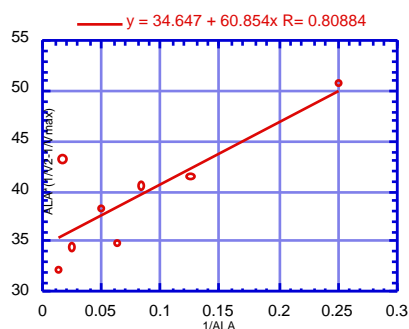
Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
MO	0.73145
M1	34.042
M2	57.229
R	0.9997



Y = MO + M1*x + ... M8*x <sup>8</sup> + M9*x <sup>9</sup>	
MO	0.78371
M1	32.103
M2	73.344
R	0.99968



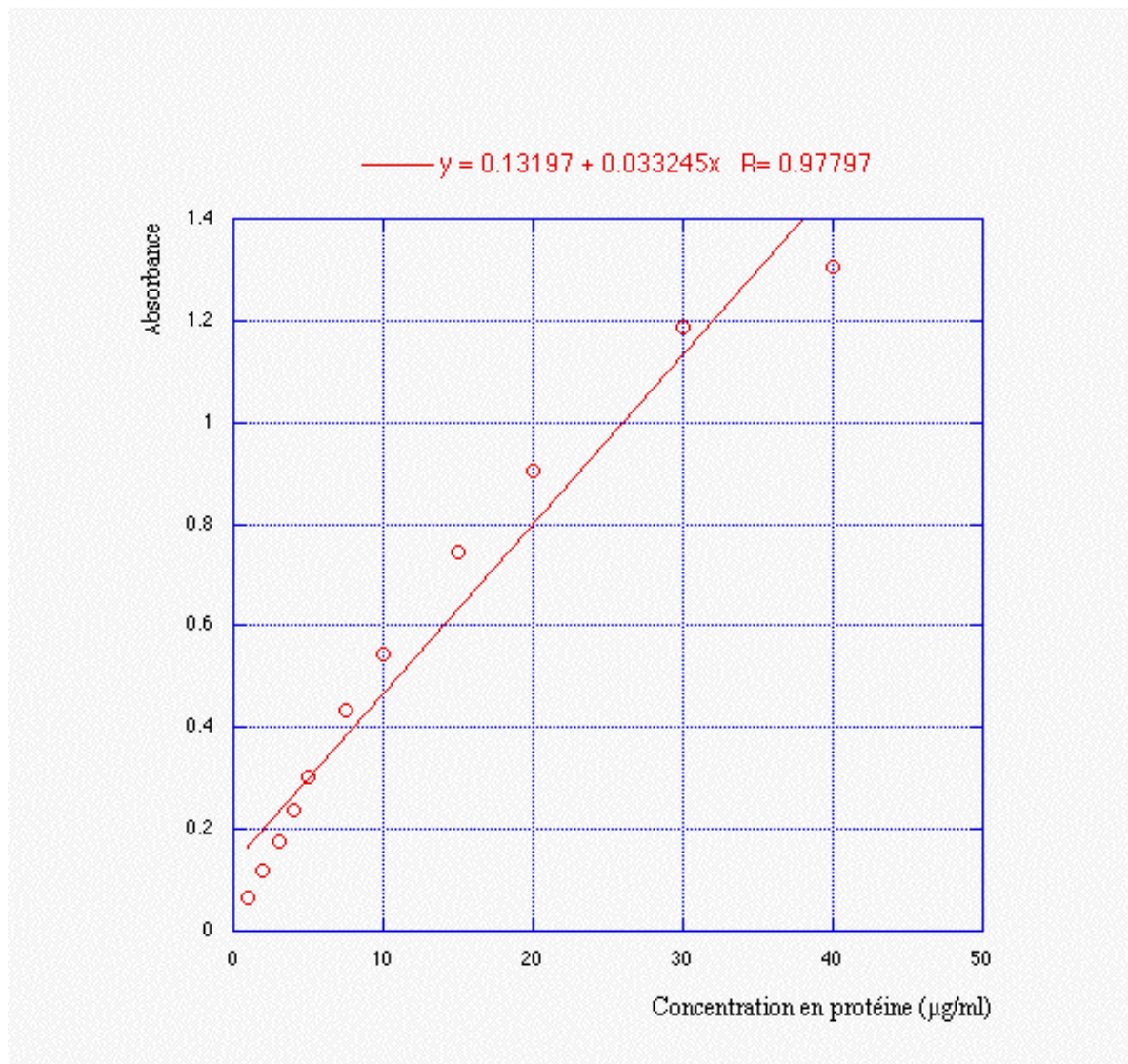
<b>Vmax</b>	1.37 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	43.75 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	2.10 $\mu\text{M}$



<b>Vmax</b>	1.28 $\mu\text{M min}^{-1}$
<b>Km<sub>1</sub></b>	44.35 $\mu\text{M}$
<b>Km<sub>2</sub></b>	1.76 $\mu\text{M}$

## 6.4 Annexe 4

Valeur d'absorbance	Concentration enzymatique ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.0669	1.0
0.1200	2.0
0.1763	3.0
0.2384	4.0
0.3015	5.0
0.4331	7.5
0.5446	10.0
0.7461	15.0
0.9053	20.0
1.1854	30.0
1.3052	40.0



## 7 Références

- [1] F. J. Leeper *Nat.Prod.Rep.* **1989**, 6, 171.
- [2] P. M. Shoolingin-Jordan *Biochem.Soc.Trans* **1998**, 26, 326.
- [3] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald *Nature (London)* **1980**, 285, 17.
- [4] A. R. Battersby *Natural Product Reports* **1987**, 4, 77.
- [5] P. M. Jordan In *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*; H. A. Dailey, Ed.; McGraw-Hill: New York, **1990**, p. 55.
- [6] A. Kappas, S. Sassa, R. A. Galbraith, Y. Nordmann *The porphyrias.* ; Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S.: New York, **1981**.
- [7] N. A. McCarroll *Anal.Chem.* **1995**, 67, 425.
- [8] B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1977**, 74 (10), 4641.
- [9] web *Tyrosinemia - Disease databank* **2001**.
- [10] D. P. Tschudy, R. A. Hess, B. C. Frykholm *J.Biol.Chem.* **1981**, 256(19), 9915.
- [11] J. J. Scott *Biochem.J.* **1956**, 62, 6.
- [12] A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara *Trans.N.Y.Acad.Sci.* **1973**, 35, 72.
- [13] B. Franck, H. Stratman *Heterocycles* **1981**, 15, 919.
- [14] K. D. Gibson, A. Neuberger, J. J. Scott *Biochem.J.* **1955**, 61, 618.
- [15] J. G. Wetmur, D. F. Bishop, C. Cantelmo, R. J. Desnick *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1986**, 83, 7703.
- [16] T. R. Bishop, L. P. Frelin, S. H. Boyer *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 10115.
- [17] A. M. Myers, M. D. Crivellone, T. J. Koerner, A. Tzagoloff *J.Biol.Chem.* **1987**, 262(35), 16822.
- [18] Y. Echelard, J. Dymetryszyn, M. Drolet, A. Sasarman *Mol.Gen.Genet.* **1988**, 214, 503.
- [19] N. Frankenberg, T. Kittel, C. Hungerer, U. Römling, D. Jahn *Mol.Gen.Genet.* **1998**, 257, 485.
- [20] P. M. Anderson, R. J. Desnick *J.Biol.Chem.* **1979**, 254 (15), 6924.
- [21] P. N. B. Gibbs, A.-G. Chaudhry, P. M. Jordan *Biochem.J.* **1985**, 230, 25.
- [22] A. M. Cheh, J. B. Neilands *Bonding and Structure* **1976**, 29, 123.

- [23] L. M. Borralho, C. H. D. Ortiz, A. D. Panek, J. R. Mattoon *Yeast* **1990**, *6*, 319.
- [24] W. Liedgens, C. Lutz, H. A. W. Schneider *Eur.J.Biochem.* **1983**, *135*, 75.
- [25] D. Shemin *Method.Enzymol.* **1970**, *XVII Part A*, 205.
- [26] P. S. Ebert, R. A. Hess, B. C. Frykholm, D. P. Tschudy  
*Biochem.Biophys.Res. Commun.* **1979**, *88 (4)*, 1382.
- [27] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Périé *Bioorg.Med.Chem.* **1996**, *4*, 2043.
- [28] I. Fridovich *J.Biol.Chem.* **1968**, *243*, 1043.
- [29] W. Tagaki, J. P. Guthrie, F. H. Westheimer *Biochemistry* **1968**, *7*, 905.
- [30] J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas *Science* **1995**, *270*, 1797.
- [31] D. L. Ostercamp *J.Org.Chem.* **1970**, *35 (5)*, 1632.
- [32] J. V. Greenhill *Chem.Soc.Rev.* **1977**, *6*, 277.
- [33] C. Kashima, M. Yamamoto, N. Sugiyama *J.Chem.Soc.* **1970**, *C*, 111.
- [34] J. V. Greenhill *J.Chem.Soc.* **1971**, *c*, 2699.
- [35] D. L. Nandi, D. Shemin *J.Biol.Chem.* **1968**, *243*, 1236.
- [36] P. M. Jordan, J. S. Seehra *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* **1980**, 240.
- [37] P. M. Jordan, P. N. B. Gibbs *Biochem.J.* **1985**, *227*, 1015.
- [38] P. M. Jordan In *Biosynthesis of Tetrapyrroles*; P. M. Jordan, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1991**, p. 1.
- [39] D. Shemin *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1975**, *244*, 348.
- [40] W. H. Wu, D. Shemin, K. E. Richards, R. C. Williams *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1974**, *71 (5)*, 1767.
- [41] M. Ladzunski *Prog.Bioorg.Chem.* **1974**, *3*, 81.
- [42] A. Levitzki, W. B. Stallcup, D. R. Koshland *Biochem.* **1971**, *10 (18)*, 3371.
- [43] A. Levitzki *Curr.Top.Cell.Regul.* **1976**, *10*, 1.
- [44] M. J. Adams, T. L. Blundell, E. J. Dodson, G. G. Dodson, M. Vijayan, E. N. Baker, M. M. Harding, D. C. Hodkin, B. Rimmer, S. Sheat *Nature* **1969**, *224*, 491.
- [45] Y. Luo, J. Samuel, S. C. Mosimann, J. E. Lee, M. E. Tanner, N. C. J. Strynadka  
*Biochem.* **2001**, *40*, 14763.
- [46] D. Shemin *J.Biochem. (Tokyo)* **1976**, *79 (4)*, 37P.
- [47] D. Gurne, J. Chen, D. Shemin *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1977**, *74 (4)*, 1383.
- [48] 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.

- [49] 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 Sci.* **1997**, *6*, 1774.
- [50] P. T. Erskine, R. Newbold, A. A. Brindley, S. P. Wood, P. M. Shoolingin-Jordan, M. J. Warren, J. B. Cooper *J.Mol.Biol.* **2001**, *312*, 133.
- [51] P. T. Erskine, R. Newbold, J. Roper, A. Coker, M. J. Warren, P. M. Shoolingin-Jordan, S. P. Wood, J. B. Cooper *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1250.
- [52] P. T. Erskine, L. Coates, R. Newbold, A. A. Brindley, F. Stauffer, S. P. Wood, M. J. Warren, J. B. Cooper, P. M. Shoolingin-Jordan, R. Neier *FEBS Lett.* **2001**, *503*, 196.
- [53] 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.
- [54] 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. Shoolingin-Jordan *Biochem.* **1999**, *38*, 4266.
- [55] J. Kervinen, E. K. Jaffe, F. Stauffer, R. Neier, A. Wlodaver, A. Zdanov *Biochem.* **2001**, *40*, 8227.
- [56] N. Frankenberg, P. T. Erskine, J. B. Cooper, P. M. Shoolingin-Jordan, D. Jahn, D. W. Heinz *J.Mol.Biol.* **1999**, *289*, 591.
- [57] D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. C. Philipps, C. I. Pogson, I. A. Wilson *Nature (London)* **1975**, *255*, 609.
- [58] C. Branden, J. Tooze In *Introduction à la structure des protéines*, 1 ed.; De Boeck UniversitÄ: Paris, **1991**, p. 43.
- [59] A. M. Del C. Battle, A. M. Stella *Int.J.Biochem.* **1978**, *9*, 861.
- [60] D. Shemin *Phil.Trans.R.Lond.section B* **1976**, *273*, 109.
- [61] D. L. Nandi *Z.Naturforsch.Sect.C* **1978**, *33*, 799.
- [62] E. K. Jaffe, G. D. Markham *Biochem.* **1987**, *26*, 4258.
- [63] E. K. Jaffe, G. D. Markham *Biochem.* **1988**, *27*, 4475.
- [64] E. K. Jaffe, G. D. Markham, J. S. Rajagopalan *Biochem.* **1990**, *29*, 8345.
- [65] C. Jarret, F. Stauffer, M. E. Henz, M. Marty, R. M. Lüönd, J. Bobalova, P. Schürmann, R. Neier *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 185.
- [66] M. J. Warren, J. B. Cooper, S. P. Wood, P. M. Shoolingin-Jordan *TIBS* **1998**, *23*, 217.
- [67] E. K. Jaffe, M. Volin, C. B. Myers, W. R. Abrams *Biochem.* **1994**, *33*, 11554.
- [68] A. J. Dent, D. Beyersmann, C. Block, S. S. Hasnain *Biochemistry* **1990**, *29*, 7822.
- [69] E. Meller, M. L. Gassman *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 728.

- [70] E. Meller, M. L. Gassman *Plant Physiol.* **1981**, 67, 1065.
- [71] P. J. Brumm, H. C. Friedmann *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 102, 854.
- [72] T. Engeloch Biomimetische und biosynthetische Studien zum mechanismus der Porphobilinogen-Synthase; Thèse: Université de Neuchâtel, 1998.
- [73] 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.
- [74] K. L. Perlman, U. Schömer, T. H. Williams, D. Perlman *J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A* **1981**, 34, 483.
- [75] Y. Shioi, M. Doi, T. Sasa *Plant Cell Physiol.* **1985**, 26, 379.
- [76] Y. Shioi, M. Doi *Plant Cell Physiol.* **1988**, 29(5), 843.
- [77] K. M. Cheung, P. Spencer, M. P. Timko, P. M. Shoolingin-Jordan *Biochemistry* **1997**, 36, 1148.
- [78] D. Appleton, A. B. Duguid, S. K. L. Lee, Y. J. Ha, H. J. Ha, F. J. Leeper *J. Chem. Soc. Perk. T.1* **1998**, 89.
- [79] I. H. Segel In *Enzyme kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, 1 ed.; A Wiley-Interscience Publication, Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, **1975**.
- [80] D. Voet, J. G. Voet *Biochemistry*, 2 ed.; John Wiley & Sons: New-York, 1995.
- [81] T. Palmer *Understanding Enzymes*, 4 ed.; Ellis Horwood, 1995.
- [82] L. H. Easson, E. Stedman *Proc. R. Soc. London B* **1936**, 127, 142.
- [83] J. F. Morrison, C. T. Walsh In *Advances in enzymology*, John Wiley & Sons: New-York, **1988**, p. 201.
- [84] J. F. Morrison *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 185, 269.
- [85] S. Cha *Biochem. Pharmacol.* **1975**, 24, 2177.
- [86] S. Granick, D. Mauzerall *J. Biol. Chem.* **1958**, 232, 1119.
- [87] F. C. Neuhaus *J. Biol. Chem.* **1962**, 237(10), 3128.
- [88] L. E. Zawadzke, T. D. H. Bugg, C. T. Walsh *Biochemistry* **1991**, 30, 1673.
- [89] B. A. Ellsworth, N. J. Tom, P. A. Bartlett *Curr. Biol.* **1996**, 3(1), 37.
- [90] C. Jarret Etude de la porphobilinogène synthase d'*Escherichia coli*: inhibitions sélectives des deux sites actifs.; Thèse: Université de Neuchâtel, 1999.
- [91] M. Henz Inhibitionsstudien zum Mechanismus der Porphobilinogen Synthase isoliert aus *Escherichia coli* CR 261; Thèse: Université de Neuchâtel, 1997.
- [92] M. M. Bradford *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.

- [93] R. Lüönd Untersuchung zum Enzymmechanismus der d-Aminolävulinsäure-Dehydratase aus *Rhodopseudomonas spheroides*.; Thèse: Université de Fribourg, 1991.
- [94] R. O. Pendarvis, K. G. Hampton *J. Org. Chem.* **1974**, 39 (15), 2289.
- [95] S. Granick *J. Biol. Chem.* **1958**, 232, 1119.

## 8 Table des matières

<b>1</b>	<b><i>Introduction.....</i></b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Les sciences de la vie, aujourd'hui.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Les tétrapyrroles dans les systèmes biologiques.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Maladies impliquant un dysfonctionnement du métabolisme de l'hème...12</b>	
1.3.1	Les porphyries.....	12
1.3.2	Les tyrosinémies.....	16
<b>1.4</b>	<b>La porphobilinogène synthase.....</b>	<b>20</b>
1.4.1	Les sources et les propriétés générales.....	20
<b>1.5</b>	<b>Les méthodes à disposition pour élucider un mécanisme enzymatique.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b><i>But du travail.....</i></b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b><i>Données disponibles avant le début de ce travail.....</i></b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Les mécanismes postulés.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Le phénomène de half-site reactivity.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Les structures aux rayons X.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Les caractéristiques communes aux PBGS cristallisées de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et d' <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.3.2	L'organisation des ions métalliques au site actif de la PBGS : comparaison entre les enzymes isolées de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et d' <i>Escherichia coli</i> .....	46
3.3.3	Les informations apportées par d'autres inhibiteurs que l'acide lévulinique (24) et l'acide 4,7-dioxosébacique (26).....	52
<b>3.4</b>	<b>Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse de Caroline Engeloch-Jarret.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5</b>	<b>La littérature existante sur les inhibiteurs de la PBGS.....</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>La cinétique enzymatique et les inhibitions.....</b>	<b>64</b>
3.6.1	La cinétique.....	64
3.6.2	Les inhibitions.....	67
3.6.3	La PBGS : deux substrats identiques et un produit.....	78
<b>4</b>	<b><i>Résultats et Discussion.....</i></b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>La purification de la PBGS.....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Problème de stabilité.....	90
<b>4.2</b>	<b>Les tests d'inhibition.....</b>	<b>93</b>

4.2.1	La procédure des tests d'inhibition	99
4.2.2	La préparation de la solution de l'inhibiteur	102
4.2.3	L'analyse des résultats obtenus par les inhibitions	102
4.2.4	L'inhibition compétitive	103
4.2.5	L'inhibition incompétitive	106
4.2.6	L'inhibition slow-binder / irréversible	109
4.2.7	La classification des inhibiteurs	112
<b>4.3</b>	<b>La détermination de l'amide vinylogue avec les composés dicétones.....</b>	<b>113</b>
<b>4.4</b>	<b>La PBGS et un <i>fit induit</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>4.5</b>	<b>Les hypothèses de travail appliquées à l'étude du mécanisme.....</b>	<b>123</b>
<b>4.6</b>	<b>Inhibition studies of Porphobilinogen Synthase isolated from <i>Escherichia coli</i> differentiating between the two recognition sites.....</b>	<b>125</b>
4.6.1	Abstract	125
4.6.2	Keywords	126
4.6.3	Introduction	126
4.6.4	Results and Discussion	134
4.6.5	Conclusion	144
4.6.6	Experimental section	145
4.6.7	Acknowledgements	152
4.6.8	References	152
4.6.9	Tableaux des résultats	155
<b>4.7</b>	<b>Porphobilinogen Synthase : a Challenge for the Chemist?.....</b>	<b>160</b>
4.7.1	Abstract	160
4.7.2	Keywords	161
4.7.3	Introduction : Importance, Biosynthesis and Prebiotic Synthesis of the Tetrapyrrolic «Pigments of Life»	161
4.7.4	The Challenge of the Biosynthesis of Porphobilinogen (2)	163
4.7.5	Proposals for the Mechanism of Porphobilinogen Synthase	165
4.7.6	Novel Pyrrole Synthesis based on the Shemin-Jordan Mechanism for the Biosynthesis	167
4.7.7	Inhibition Studies of Porphobilinogen Synthase from <i>Escherichia coli</i>	169
4.7.8	References	174
<b>4.8</b>	<b>Les résultats obtenus pour les inhibiteurs non publiés.....</b>	<b>177</b>
4.8.1	Variation en position 3	177
4.8.2	Variation en position 4	178

4.8.3	Variation en position 5	178
4.8.4	Composés monoacides ramifiés	179
4.8.5	Composés diacides ramifiés	179
4.8.6	Divers composés mixtes C10	181
4.8.7	Les analogues de substrat	182
4.8.8	Les composés diacides	186
4.8.9	Les dérivés ramifiés	190
<b>4.9</b>	<b>Inhibition studies of the enzyme porphobilinogen synthase (PBGs) isolated from <i>E. coli</i> using <math>\beta</math>-diketones as recognition elements.....</b>	<b>191</b>
4.9.1	Introduction	191
4.9.2	Results and discussion	200
4.9.3	Experimental part	218
4.9.4	References	235
4.9.5	Tableaux des résultats	237
<b>5</b>	<b><i>Partie expérimentale.....</i></b>	<b>243</b>
<b>5.1</b>	<b>Appareils utilisés.....</b>	<b>243</b>
<b>5.2</b>	<b>Produits utilisés.....</b>	<b>243</b>
<b>5.3</b>	<b>Travail microbiologique et biochimique.....</b>	<b>244</b>
5.3.1	Milieus et tampons	244
5.3.2	Culture d' <i>Escherichia coli</i> et purification de la PBGS	248
<b>5.4</b>	<b>Etude enzymatique de la PBGS.....</b>	<b>255</b>
5.4.1	Courbe d'étalonnage du réactif d'Ehrlich complexé au PBG	255
5.4.2	Courbe d'étalonnage du PBG complexé au réactif d'Ehrlich en présence de l'enzyme et du tampon stop	256
5.4.3	Détermination des constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) pour les deux sites	257
5.4.4	Préparation de la solution de l'inhibiteur	258
5.4.5	Test d'inhibition	258
5.4.6	Différenciation des inhibiteurs réversibles et irréversibles/slow-binder	259
5.4.7	Dialyse	260
5.4.8	Tableaux des résultats	261
<b>5.5</b>	<b>Détermination de l'énamine vinylogue par mesure UV/VIS.....</b>	<b>271</b>
5.5.1	Utilisation de l'acide 6-aminocaproïque comme imitation de la lysine au site actif de l'enzyme	271
5.5.2	Détermination au site actif de la PBGS	273
<b>6</b>	<b><i>Annexes.....</i></b>	<b>275</b>

<b>6.1</b>	<b>Annexe 1.....</b>	<b>275</b>
<b>6.2</b>	<b>Annexe 2.....</b>	<b>277</b>
<b>6.3</b>	<b>Annexe 3.....</b>	<b>280</b>
<b>6.4</b>	<b>Annexe 4.....</b>	<b>283</b>
<b>7</b>	<b><i>Références.....</i></b>	<b><i>284</i></b>
<b>8</b>	<b><i>Table des matières.....</i></b>	<b><i>289</i></b>