

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES

**ETUDE DE LA PORPHOBILINOGENE  
SYNTHASE D'ESCHERICHIA COLI:  
INHIBITIONS SELECTIVES DES DEUX SITES  
ACTIFS**

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

**CAROLINE JARRET**

de MUNCHHOUSE (Haut-Rhin / France)  
Chimiste diplômée de l'E.N.S.C.Mulhouse  
Mai 1999

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

**Etudes de la porphobilinogène synthase de  
Escherichia coli : inhibitions sélectives des deux  
sites actifs**

de Mme Caroline Jarret

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. R. Neier (directeur de thèse), K. Bernauer,  
et J.-L. Reymond (Berne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 8 juin 1999

Le doyen:



F. Stoeckli

à mes parents,

à Thomas.

Le présent travail a été effectué d'octobre 1995 à mai 1999 à l'institut de chimie de Neuchâtel sous la direction du Professeur Reinhard Neier.

Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour les discussions intéressantes autant du point de vue scientifique que personnel et pour lesquelles il s'est toujours pris du temps. Je tiens également à le remercier pour sa confiance et la liberté de travail qu'il m'a donné durant ces trois dernières années.

Je tiens également à remercier les Professeurs K. Bernauer et J.-L. Reymond pour avoir participé à mon jury de thèse.

J'aimerais également remercier les étudiants de quatrième année qui ont pris part à mon travail de thèse lors des travaux pratiques avancés: Céline Gambs, Camille Perret, David Farine et Luc-Alexis Leuthold.

Un grand merci aux anciens et actuels membres du groupe: Yann Berger, Pavel Bobal, Janette Bobalova, André Chaperon, Elena Cires, Thomas Engeloch, Alain Greppi, Matthias Henz, Maurus Marty, Pierre-Yves Musard, Klaus Neuschütz, Jean-Philippe Roblin, Jean-Mary Simone, Olivier Siri, Carole Soldermann, Nicolas Soldermann, Frédéric Stauffer, Thomas Thyran, Jörg Velker et Eleonora Zizzari.

J'aimerais en particulier remercier Frédéric Stauffer qui m'a donné beaucoup de travail en synthétisant la majeure partie des composés, mais aussi pour son esprit critique qui a fait beaucoup avancer les choses. Un merci particulier également à Janette pour son aide lors de son stage post-doctoral.

Je remercie également le Professeur Kurt Faber et son groupe (Wolfgang, Ingrid, Romano, Ulf, Marijke...) pour leur chaleureux accueil à Graz durant mes trois mois de stage en biocatalyse.

Différentes personnes ont pris part au bon déroulement de ma thèse à un moment donné ou à un autre et je tiens à les en remercier chaleureusement: Christiane Bobillier (RMN 200 et plus), Heinz Bursian (RMN 400), Eric Francotte (HPLC préparative), Armelle Michel (spectre de masse), Jacqueline Moret (conseillère statistique), Christine Polart (spectre de masse), Claude Saturnin (HPLC chirale), Prof. P. Schürmann (biochimie) et Sandra Wermeille (colocataire tolérante).

J'aimerais également remercier ma famille et Thomas pour leur soutien autant financier que moral.

Je remercie le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique et le Fonds des Industries Chimiques Bâloises pour avoir soutenu financièrement ce travail.

# Abréviations

- ABS:** absorbance
- ADN:** acide désoxyribonucléique
- ATP:** adénosine triphosphate
- CCM:** chromatographie sur couche mince
- 5-CLA:** acide 5-chloro-lévluniquc
- Cx:** chaîne carbonée de X atomes
- DBU:** 1,8-diazobicyclo[5,4,0]-7-undécène
- DMF:** diméthyl-formamide
- E:** rapport énantiomérique
- ee:** excès énantiomérique
- ESMS:** spectroscopie de masse electrospray
- EXAFS:** extended X-ray absorption fine structure
- GC:** chromatographie en phase gazeuse
- HFA:** hydrolase fumaryle acétoacétate
- HPLC-MS:** chromatographie liquide haute performance couplée avec spectroscopie de masse  $K_d$ : constante de dissociation
- $K_i$ : constante d'inhibition;  $K_i'$ : pseudo-constante d'inhibition
- $K_m$ : constante de Michaelis-Menten
- $K_{m1}$ : constante de Michaelis-Menten du site P;  $K_{m2}$ : constante de Michaelis-Menten du site A
- $K_{mapp}$ : constante de Michaelis-Menten apparente
- L-Ala:** L-alanine
- m-Dap:** acide m-diamino-pimélique
- MMTS:** méthyl-méthane-thiosulfonate
- NaBH<sub>4</sub>:** tétrahydroborure de sodium
- PBG:** porphobilinogène; **PBGs:** porphobilinogène synthase
- Rf:** rapport frontal
- <sup>13</sup>C-(1H-,15N-) RMN:** résonance magnétique nucléaire du carbone <sup>13</sup>C
- rac:** mélange racémique
- RNA:** acide ribonucléique
- RT:** température ambiante
- SA:** succinyle acétone
- Site A:** site dans lequel la chaîne acétique du PBG se forme
- Site P:** site dans lequel la chaîne propionique du PBG se forme
- t-RNAGlu:** glutamyl-RNA de transfert
- UDP-N-Acétyl-muramyl:** uridine-diphosphate-N-acétyl-muramyl
- U.V.:** domaine ultra-violet
- V<sub>app</sub>:** vitesse apparente, **V<sub>max</sub>:** vitesse maximale
- λ<sub>max</sub>:** longueur d'onde d'absorbance maximale

## Résumé

Le but de ce travail est l'obtention d'informations sur le mécanisme adopté par la porphobilinogène synthase (PBGS, EC 4.2.1.24) par des études d'inhibition. La porphobilinogène synthase est la seconde enzyme impliquée dans la biosynthèse des produits tétrapyrroliques naturels et effectue la condensation non symétrique de deux molécules d'acide 5-amino-lévilinique (ALA, 1) en porphobilinogène (PBG, 2). Différents mécanismes ont été avancés concernant cette réaction enzymatique, passant soit par la formation d'une première liaison C-C (réaction de type aldol), soit par la formation d'une première liaison C-N (formation d'iminium).

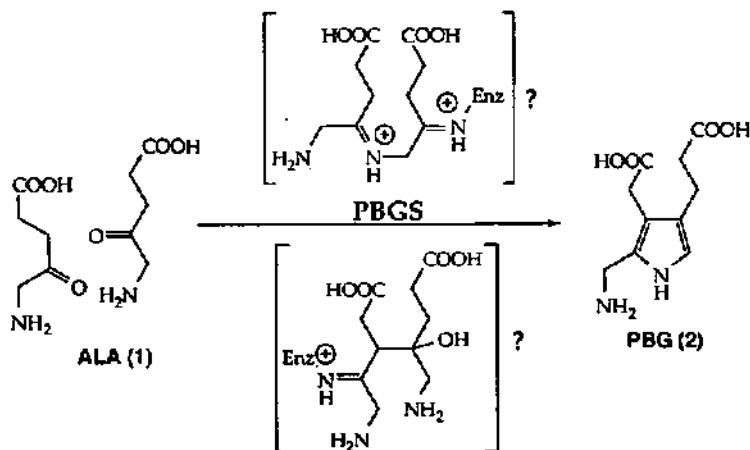


Figure A: Condensation enzymatique catalysée par la PBGS

Le même substrat doit donc être reconnu dans le site actif en deux différentes positions: le site A et le site P. Au cours de ce travail, nous avons pu estimer les constantes de Michaelis-Menten pour chaque site ce qui nous a permis de mieux comprendre la cinétique de Michaelis-Menten observée au cours de nos études cinétiques.

Ce travail repose essentiellement sur le test de 73 molécules susceptibles d'inhiber la porphobilinogène synthase issue de *E. coli*. Ces inhibiteurs sont soit des analogues de substrat, soit des analogues d'intermédiaires. L'analyse des différents types d'inhibition observés (compétitif, incompétitif, irréversible et slow-binder) nous a permis de faire des corrélations entre ces comportements et un site spécifique d'interaction (site A ou/et site P).

Une nouvelle classe d'inhibiteurs, appelée céto-diacides C<sub>10</sub>, inhibent spécifiquement les deux sites et par des variations de groupe aux extrémités de ces molécules (diacides à longue chaîne), nous avons été capables d'inhiber spécifiquement un site ou l'autre.

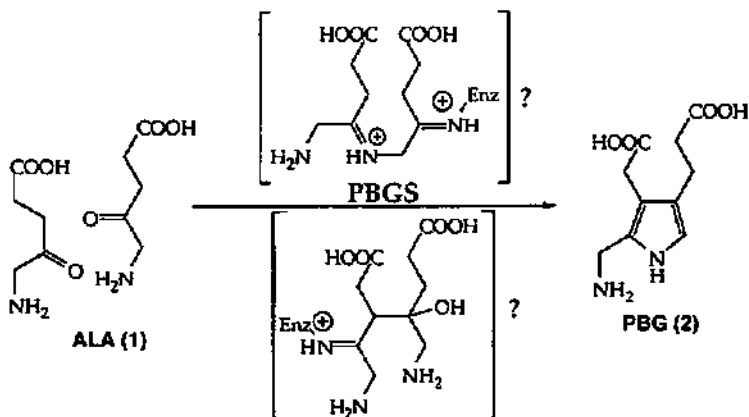
Les résultats des tests d'inhibition favorise nettement un mécanisme.

## Summary

This work describes inhibition studies of PBGS leading to a better understanding of the mechanism of this enzyme.

PBGS is the second enzyme involved in the biosynthesis of natural tetrapyrrolic compounds which condenses by an non symmetrical way two same substrates, the 5-amino-levulinic acid (ALA), to form porphobilinogen (PBG).

Different mechanisms were proposed involving either a first C-C bond formation (aldol reaction) between the two substrates or a first C-N bond formation (iminium formation).



**Scheme A:** Enzymatic condensation catalysed by PBGS

The substrate has to be recognised in the same active site at two different positions: the A-site and the P-site. During this work, it was possible to estimate the Michaelis-Menten constants of each site and so to better understand the Michaelis-Menten kinetic that we observed under our experimental conditions.

This work is essentially based on the testing of 73 potential inhibitors of the PBGS. These compounds are either analogues of the substrate or analogues of the proposed intermediates. The analysis of the different inhibition types (competitive, uncompetitive, irreversible or slow-binder) allow us to make correlations between the type of inhibition and a specific site of interaction (A or/and P-Site).

A new class of inhibitors, called keto-diacids C10, inhibit specifically the two sites and by variation of group at the extremities of these molecules (diacids with a long carbon chain), we were able to inhibit specifically one or the other site.

Results of inhibition studies give clearly preference to one of the mechanism.

## Sommaire

---

1. Introduction.....	1
1.1. La Biosynthèse de l'hème.....	1
1.1.1. Les pigments de la vie.....	1
1.1.2. Dérèglements et perturbations de la biosynthèse de l'hème.....	4
1.1.2.1. Les porphyrines.....	4
1.1.2.2. La Tyrosinémie.....	5
1.2. La porphobilinogène synthase (PBGs).....	6
1.2.1. Propositions mécanistiques.....	6
1.2.1.1. La PBGS: une énigme mécanistique.....	6
1.2.1.2. Mécanisme selon Shemin.....	8
1.2.1.3. Mécanismes selon Jordan.....	9
1.2.1.4. Remarques.....	11
1.2.2. Caractéristiques de la PBGS.....	12
1.2.2.1. Isolation et structures.....	12
1.2.2.2. Rôle des métaux.....	13
1.2.3. Structure rayons-X de la PBGS issue de levure.....	16
2. Travaux déjà effectués dans le groupe et but du travail.....	20
2.1. Travaux antérieurs du groupe.....	20
2.1.1. Travaux effectués dans le cadre de la thèse de R. Lüönd.....	21
2.1.2. Travaux effectués dans le cadre de la thèse de M. Henz.....	23
2.2. Les analogues d'intermédiaires.....	25
2.2.1. Généralités.....	25
2.2.2. But du travail.....	26
3. Etudes d'inhibition.....	27
3.1. Cinétique enzymatique.....	27
3.1.1. L'équation de Michaelis-Menten.....	27
3.1.2. Détermination des paramètres cinétiques.....	28
3.1.2.1. Utilisation du graphe de Michaelis-Menten.....	28
3.1.2.2. Utilisation du graphe de Lineweaver-Burk.....	28
3.1.2.3. Utilisation du graphe de Eadie-Hofstee.....	29
3.1.2.4. Utilisation du graphe de Hanes.....	29
3.2. Cinétique de la PBGS.....	30
3.2.1. La PBGS: deux substrats identiques, un produit.....	30
3.2.2. Autre exemple d'enzyme deux substrats identiques - un produit: la D-alanine : D-alanine ligase.....	32
3.2.3. Calcul de $K_{m1}$ et $K_{m2}$ .....	35
3.3. Types d'inhibitions rencontrés.....	39
3.3.1. Inhibition compétitive.....	40

## Sommaire

---

3.3.2.	Inhibition incompétitive/mixte .....	44
3.3.3.	Inhibition irréversible.....	47
3.3.4.	Le cas slow-binder.....	49
3.4.	Littérature existante.....	52
3.4.1.	Inhibition de la PBGS par la Succinyle acétone et ses dérivés .....	52
3.4.2.	Inhibition de la PBGS par des composés diacides .....	54
3.4.3.	Inhibitions de la PBGS par des composés fluorés.....	55
3.5.	Test d'inhibition.....	56
3.5.1.	Procédure.....	56
3.5.2.	Préparation de la solution d'inhibiteur.....	58
4.	Résultats des tests d'inhibition .....	59
4.1.	Exploitations des résultats d'inhibition.....	59
4.1.1.	Inhibition réversible.....	59
4.1.2.	Inhibition irréversible/slow-binder .....	62
4.1.3.	Classification des inhibiteurs: .....	65
4.2.	Résultats.....	66
4.2.1.	Les analogues de substrat.....	66
4.2.1.1.	Variation en position 1 .....	66
4.2.1.2.	Variation en position 3 .....	67
4.2.1.3.	Variation en position 4 .....	68
4.2.1.4.	Variation en position 5 .....	68
4.2.1.5.	Double variation.....	70
4.2.1.6.	Autres composés testés .....	70
4.2.2.	La famille des composés $\beta$ -dicétones .....	71
4.2.3.	Les analogues d'intermédiaires .....	76
4.2.3.1.	Les diacides .....	76
4.2.3.2.	Les dérivés mixtes.....	78
5.	Discussion des résultats concernant les tests d'inhibition.....	81
5.1.	Hypothèses de travail mécanistiques.....	81
5.2.	Discussions des résultats.....	82
5.2.1.	Analogues de substrat.....	82
5.2.2.	Les composés $\beta$ -dicétones .....	91
5.2.3.	Les analogues d'intermédiaires .....	99
5.2.3.1.	Les diacides .....	99
5.2.3.2.	Les dérivés mixtes .....	103
5.3.	Conclusions mécanistiques .....	106
6.	Synthèse d'inhibiteurs.....	110

6.1. Hydrolyse énantiosélective de diols nitrés (Stage effectué dans le groupe du Pr. K. Faber, T-U Graz).....	110
6.1.1. Objectifs.....	110
6.1.2. Les époxyhydrolases.....	110
6.1.2.1. Rôle des époxyhydrolases.....	110
6.1.2.2. Structure des époxyhydrolases.....	112
6.1.2.3. Mécanisme des époxyhydrolases.....	112
6.1.3. Synthèses des dérivés nitrés.....	114
6.1.3.1. Synthèse du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (rac-121) et du 2-méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (rac-122).....	114
6.1.3.2. Remarques générales concernant le travail avec les microorganismes et les époxydes.....	116
6.1.4. Le screening.....	117
6.1.5. Détermination de l'énantiosélectivité.....	118
6.1.5.1. Estimation de l'excès énantiomérique.....	118
6.1.5.2. Résultats concernant les excès énantiomériques.....	119
6.1.6. Conclusion.....	120
6.2. Travaux concernant les analogues d'intermédiaire de Shemin.....	120
6.2.1. Synthèse et séparation du mélange de stéréoisomères du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle.....	120
6.2.2. Amélioration d'une étape de la synthèse du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle (130).....	123
6.3. Synthèse d'un analogue de substrat: le 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25).....	127
6.3.1. Synthèse du 4-nitro-butane-2-one (24).....	127
6.3.2. Synthèse du 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138).....	127
6.3.3. Synthèse du 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139).....	128
6.3.4. Synthèse 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25).....	129
7. Conclusions.....	130
7.1. Conclusions générales.....	130
7.2. Perspectives.....	131
8. Partie expérimentale biochimique et bioorganique.....	134
8.1. Appareils et produits utilisés.....	134
8.1.1. Chromatographie gazeuse (TU-Graz).....	134
8.1.2. Produits chimiques.....	134
8.2. Travaux biochimiques.....	135
8.2.1. Détermination des constantes Km pour les deux sites.....	135
8.2.2. Test d'inhibition et détermination des constantes cinétiques.....	135
8.2.3. Test de différenciation réversible/irréversible, slow-binder.....	136
8.2.4. Estimation de l'activité spécifique.....	137
8.2.5. Dialyse.....	138

## Sommaire

---

8.2.6.	Tableaux de résultats.....	139
8.3.	Travaux bioorganiques.....	160
8.3.1.	Mode opératoire du screening sur les époxydes rac-121 et rac-122.....	160
8.3.2.	Mode opératoire concernant les excès énantiomériques.....	160
9.	Partie expérimentale chimique.....	161
9.1.	Méthodes analytiques et appareils.....	161
9.1.1.	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	161
9.1.1.1.	Chromatographie sur colonne - chromatographie- flash.....	161
9.1.2.	Verreries, systèmes de chauffage et de refroidissement.....	161
9.1.3.	Solvants-Produits.....	162
9.2.	Synthèses.....	164
9.2.1.	Synthèse du 4-nitro-1-butène (124).....	164
9.2.2.	Synthèse du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (rac-121).....	164
9.2.3.	Synthèse du 4-nitro-butane-1,2-diol (rac-57).....	165
9.2.4.	Synthèse de l'ester du 3-méthyl-3-butène paratoluène sulfonique (126).....	166
9.2.5.	Synthèse du 4-Bromo-2-méthyl-1-butène (127).....	167
9.2.6.	Synthèse du 2-Méthyl-4-nitro-1-butène (128).....	168
9.2.7.	Synthèse du 2-Méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (rac-122).....	169
9.2.8.	Synthèse du 2-Méthyl-4-nitro-butane-1,2-diol (rac-149).....	170
9.2.9.	Synthèse du 3-bromo-4-oxopentanoate de méthyle (rac-135).....	171
9.2.10.	Synthèse du lévulinate de méthyle (133).....	172
9.2.11.	Synthèse du 4,4-diméthoxy-pentanoate de méthyle (132).....	173
9.2.12.	Synthèse du 4-triméthylsilyloxy-pentanoate de méthyle (131).....	173
9.2.13.	Synthèse du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle (130).....	175
9.2.14.	Synthèse du 4-triéthylsilyloxy-pentanoate de méthyle (E/Z-136).....	176
9.2.15.	Synthèse du 4-nitro-butane-2-one (24).....	177
9.2.16.	Synthèse du 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138).....	178
9.2.17.	Synthèse du 1-formyloxy- 4-nitro-butane-2-one (139).....	179
9.2.18.	Synthèse du 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25).....	179
10.	Bibliographie.....	181
11.	Annexes.....	186
11.1.	Annexe 1: Influence du terme quadratique de la relation double réciproque dans le cas de la D-alanine-D-alanine ligase.....	186
11.1.1.	Annexe 2: Graph de régression non linéaire.....	187
11.1.2.	Annexe 3: Séparation par chromatographie en phase de gazeuse chirale de rac-121 et rac-57.....	187

# 1. Introduction

## 1.1. La Biosynthèse de l'hème

### 1.1.1. Les pigments de la vie

La chlorophylle, pigment responsable de la photosynthèse des plantes, est largement associée dans l'esprit des gens à sa couleur verte. Cette association molécule/couleur se fait tout aussi facilement pour l'hème qui est identifié à la couleur rouge du sang [1,2]. Ces deux composés de couleur totalement différente ont en fait beaucoup en commun et en tout premier lieu, leur biosynthèse. Ces exemples de porphyrines font partie de la famille des pigments de la vie, désignée ainsi par Battersby [3,4] dans les années quatre-vingt. Les porphyrines sont des corps cycliques formés de quatre anneaux pyrroliques reliés par des ponts méthényles. Une de leurs propriétés caractéristiques est la formation de complexes avec les ions métalliques: le fer pour l'hème et le magnésium pour la chlorophylle. Dans la nature, ces métallo-porphyrines se conjuguent alors à des protéines pour former le groupe des pigments de la vie.

On compte parmi ces composés [5] (figure 1):

- les hémoglobines: ce sont des porphyrines contenant du fer et qui sont attachées à une protéine, la globine. Ces protéines conjuguées sont capables de s'unir à l'oxygène de façon réversible et véhiculent l'oxygène. Il existe différentes hémoglobines dont la structure diffère selon l'espèce animale mais aussi pour une même espèce animale selon l'âge et le tissu (myoglobines: pigments respiratoires que l'on trouve dans les cellules musculaires des vertébrés et des invertébrés).
- les cytochromes: ce sont des hémoprotéines qui servent d'agents de transport des électrons au cours des réactions d'oxydo-réduction. Différents cytochromes se différencient par la nature du groupement hème mais également par la nature de la chaîne polypeptidique. Le système du Cytochrome P-450 est par exemple très important au niveau de la détoxification (complexe Fe-CO) et métabolise les xénobiotiques dans le foie.
- la vitamine B<sub>12</sub> qui est un complexe de cobalt dont la forme co-enzyme est nécessaire à certaines enzymes catalysant des réactions de réarrangement (hydrogène transféré entre deux carbones adjacents) et des réactions de transfert de méthyle entre deux molécules.
- les produits cataboliques comme la bilirubine que l'on connaît sous le nom de pigments biliaires.
- la chlorophylle A dont découle la photosynthèse dans les chloroplastes.

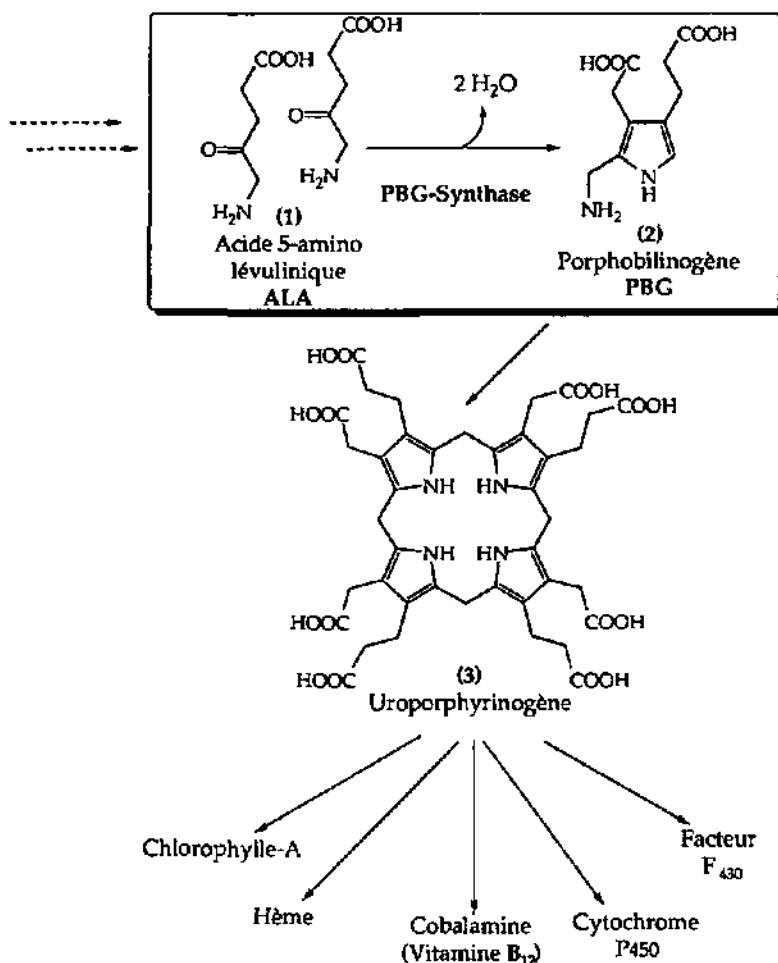


Figure 1: Biosynthèse des pigments de la vie

C'est l'acide 5-amino-lévulinique (1) qui est l'élément de base de chaque tétrapyrrole dans la nature. Chez certaines bactéries et dans les mitochondries de levure, des oiseaux et des mammifères, ce composé est formé lors du cycle de Shemin (figure 2)[6] alors que dans les chloroplastes des végétaux et des algues vertes et dans d'autres bactéries, notamment les eubactéries (*E. coli*, *B. subtilis*) les cyanobactéries et les archaebactéries, il est formé essentiellement en trois pas impliquant l'acide glutamique (6) fixé sur le  $t\text{RNA}^{\text{Glu}}$  (figure 2)[5,7,8].

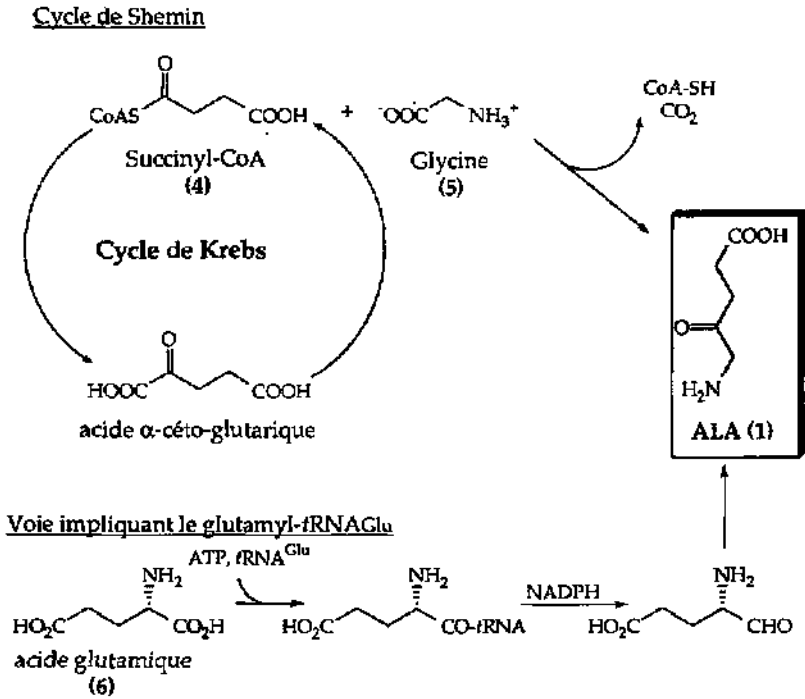


Figure 2: Synthèse de l'acide 5-amino-lévinique (1)

Le cycle de Shemin est une dérivation du cycle de Krebs au niveau du succinyl-CoA (4). Le succinyl-CoA réagit avec la glycine (5), puis cette étape est suivie par la décarboxylation de l' $\alpha$ -amino- $\beta$ -céto-adipate pour donner l'ALA, en présence de 5-aminolévulinatase synthétase, enzyme à phosphate pyridoxal [9-11]. L'ALA suit ensuite la formation de pyrrole. Cette première étape de formation d'ALA est en fait la réaction limitante de la biosynthèse de l'hème et la réaction dont l'activité est la plus fortement régulée par la concentration en hème [12].

Les étapes suivantes sont donc la formation du porphobilinogène (PBG), qui sera détaillée dans le chapitre 1.2., suivie par la formation d'hydroxyméthylbilane qui est le produit résultant d'une condensation linéaire de quatre molécules de PBG (1) en présence de hydroxyméthylbilane synthase. Si cette dernière enzyme est combinée à l'uroporphyrinogène III cosynthase, on obtient le précurseur commun aux pigments de la vie, l'uroporphyrinogène III (3) (figure 1). Suivent ensuite des réactions de décarboxylation, d'oxydation et d'insertion de métaux toutes gouvernées par des enzymes qui conduisent aux différents pigments [5]. Par exemple, pour la protoporphyrine IX qui est la porphyrine que l'on retrouve dans le groupe prosthétique de l'hème (figure 3), les substituants sur les cycles pyrroles subissent différentes transformations.

Les quatre chaînes acétiques subissent des décarboxylations pour aboutir à des groupes méthyles (uroporphyrinogène décarboxylase) et deux des quatre chaînes propioniques seront décarboxylées et déshydrogénées pour obtenir des groupements vinyles (coproporphyrinogène oxydase, protoporphyrinogène

synthase, protoporphyrinogène oxydase). La ferrochelatase se charge ensuite d'insérer l'ion ferreux.

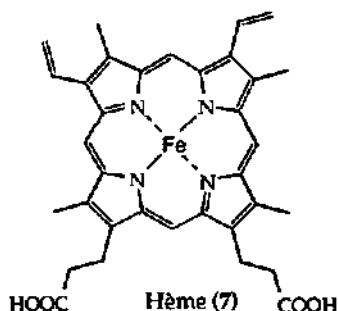


Figure 3: Structure de l'hème (7)

### 1.1.2. Dérèglements et perturbations de la biosynthèse de l'hème

#### 1.1.2.1. Les porphyries

Les porphyries constituent un groupe de maladies complexes, toutes caractérisées par un accroissement de l'excrétion des porphyrines ou des précurseurs des porphyrines [13]. Elles sont rares mais au moins sept différents types de porphyries ont été décrits, certaines porphyries étant héréditaires et d'autres acquises. Chaque porphyrie est induite par la déficience d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'hème [2] (Tableau 1). Les études des anomalies biochimiques et métaboliques caractérisant les porphyries, ont fourni beaucoup d'informations sur la pathogénèse et le traitement de ces maladies. Ces études ont également permis d'accroître les connaissances concernant la voie normale de synthèse de l'hème et sa régulation.

Porphyrie	Défaut enzymatique
Porphyrie ADP	Porphobilinogène synthase
Porphyrie aiguë à rechute	Hydroxyméthylbilane synthase
Porphyrie érythropoïétique	Uroporphyrinogène I synthase et/ou Uroporphyrinogène III cosynthase
Porphyria cutanea tarda	Uroporphyrinogène décarboxylase
Coproporphrie héréditaire	Coproporphyrinogène oxydase
Variegata porphyria	Protoporphyrinogène oxydase
Protoporphrie	Ferrochelatase

Tableau 1: Classification des porphyries humaines

Dans le cas d'une porphyrie aiguë à rechute qui résulte d'une déficience partielle de la hydroxyméthylbilane synthase (50 % de son activité normale), les malades excrètent des quantités massives de PBG et de ALA dans les urines.

Ces deux composés sont incolores, mais le PBG exposé à la lumière et à l'air polymérise spontanément pour former des porphyrines colorées.

L'urine exposée à la lumière et à l'air devient donc rouge foncée ("porphyrus", mot grec pour pourpre) et après 10 à 30 minutes peut virer au noir. Le PBG et l'ALA sont dans le cas présent, essentiellement présents dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien. En fait le blocage partiel d'hydroxyméthylbilane synthase serait combiné à une augmentation de l'activité de l'ALA synthase, ces deux phénomènes provoquant l'accumulation massive de ALA et de PBG [12].

La porphyrie ADP (ALAD-Deficiency Porphyria) associée à la porphobilinogène synthase, l'enzyme qui nous intéresse de près, est extrêmement rare et ses symptômes sont vraiment similaires à ceux de la porphyrie aiguë à rechute évoquée précédemment [12].

Les manifestations cliniques dépendent du type de porphyrie impliquée. Les premiers symptômes de la maladie sont des douleurs abdominales et des vomissements. Pour des porphyries associées à des enzymes intervenant à la fin de la biosynthèse de l'hème, des problèmes dermatologiques tels que des brûlures de peau lors d'exposition au soleil sont courants. En effet, si le plasma sanguin a un taux élevé en porphyrines, celles-ci interagissent avec la lumière provoquant ainsi des dommages à la peau. Si les crises ne sont pas diagnostiquées et traitées à temps, elles peuvent entraîner des paralysies, avec atteinte des membres et des muscles respiratoires, voire des troubles psychiatriques (confusion, hallucinations) qui peuvent aboutir parfois à la folie.

Il est important de noter que certains de ces symptômes sont similaires à ceux rencontrés en cas d'empoisonnement au plomb [14,15] et de tyrosinémie ce qui a amené à des recoupements intéressants [16].

### 1.1.2.2. La Tyrosinémie

La découverte d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la PBGS, en l'occurrence celle des  $\beta$ -dicétones, est en fait le résultat de recherches effectuées dans le cadre d'identifier le lien possible entre deux maladies: la tyrosinémie et la porphyrie [16]

La tyrosinémie est une maladie génétique grave du foie et des reins qui se déclare le plus fréquemment après la naissance. C'est une maladie dite autosomale récessive, c'est-à-dire que les deux parents doivent présenter le gène de cette maladie. Malgré les thérapies intensives, la mort survient généralement entre 3 et 9 mois à la suite de déficiences hépatiques.

Ces enfants malades sont des candidats tout désignés aux transplantations du foie. Pour les patients plus âgés, il y a un développement de cirrhose avec un risque accru de cancer du foie [17].

La tyrosinémie est causée par une activité réduite de la dernière enzyme impliquée dans la dégradation de la tyrosine (8): l'hydrolase fumaryle acéto-acétate (HFA) [16]. Cette déficience entraîne l'accumulation de métabolites tels que l'acide fumaryl-acéto-acétique (12) et l'acide maleyl-acéto-acétique (9) d'où la formation de succinyle acéto-acétique (11) qui se retrouve dans le sang et les urines (figure 4). Cette caractéristique clinique sert de dépistage dans le diagnostic de la tyrosinémie.

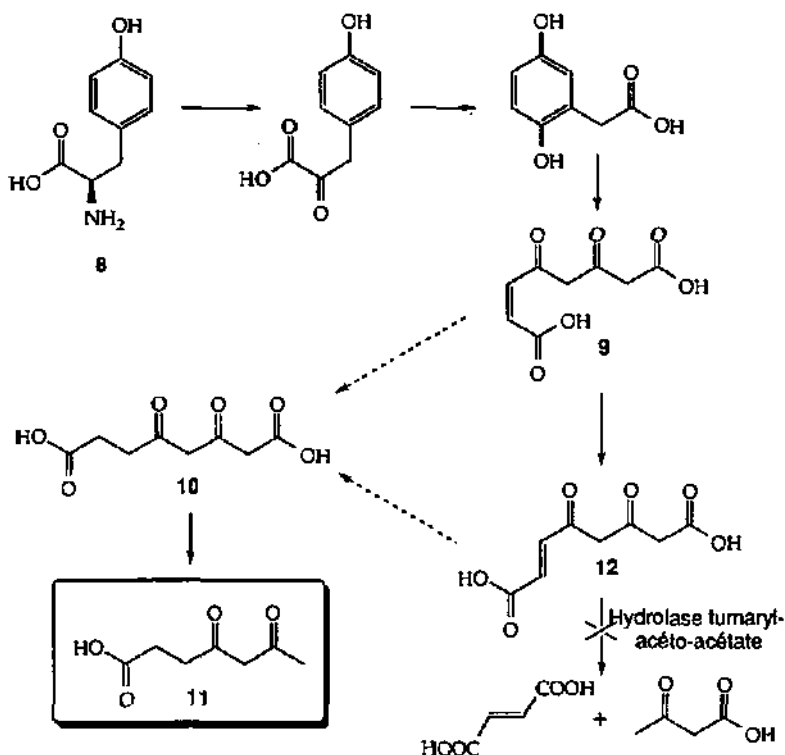


Figure 4: Dégradation anormale de la tyrosine (8)

Les troubles rénaux sont attribués à des effets toxiques secondaires du maleyle acéto-acétate (9).

Quant à la cause biochimique des problèmes neurologiques qui affectent les patients atteints de tyrosinémie, il s'avère que ces attaques présentent des similarités cliniques importantes avec les attaques sévères de porphyrie (déficiency des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème). Il y a donc des altérations en présence de succinyle acétone (11) du processus biosynthétique de l'hème.

Une excrétion anormale de ALA, observée chez des patients atteints de tyrosinémie, indique une inhibition de la PBGS, ce qui a poussé à désigner la succinyle acétone (11) comme un inhibiteur potentiel de cette enzyme [16]. Les différents tests d'inhibition effectués dans nos laboratoires n'ont pu que confirmer le potentiel inhibiteur important de ce composé 11 sur la PBGS.

## 1.2. La porphobilinogène synthase (PBGS)

### 1.2.1. Propositions mécanistiques

#### 1.2.1.1. La PBGS: une énigme mécanistique

La porphobilinogène synthase, appelée également acide 5-amino-lévilinique déshydratase (EC 4.2.24) est présente dans toutes les familles d'organismes qui synthétisent les tétrapyrroles, des archaebactéries aux mammifères [18]. Cette enzyme catalyse la dimérisation asymétrique de deux molécules d'ALA (1) pour former le PBG (2). Cette transformation est d'autant plus élégante que la transformation purement chimique conduit à un autre composé. Selon Scott [19], le traitement alcalin d'une solution d'ALA après plusieurs jours n'a conduit qu'à l'isolation de 3 % de PBG et à la formation d'un produit majoritaire à la structure non élucidée à ce moment-là. Différentes expériences [20] ont ensuite pu attribuer la structure du produit prédominant à une pyrazine dicarboxylée 13.

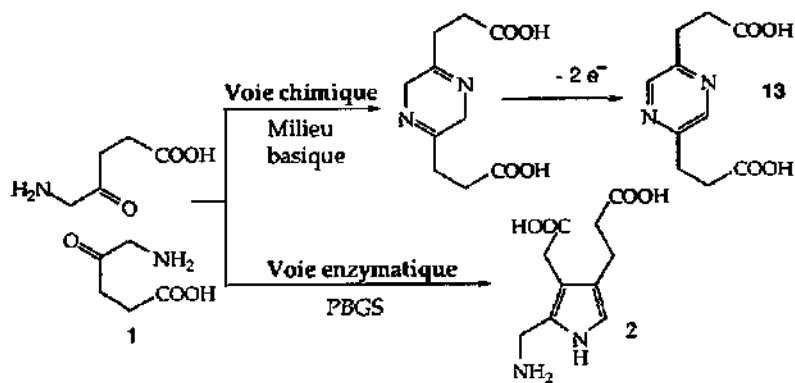


Figure 5: Condensations chimique et enzymatique de l'ALA (1)

En quelque sorte, l'enzyme utilise intelligemment une pseudo synthèse de Knorr [21] impliquant dans un ordre indéterminé une condensation aldol et la formation d'une base de Schiff.

Vu la grande réactivité des  $\beta$ -amino-cétones comme l'ALA, la grande réussite de cette enzyme est donc de conduire à la formation du PBG et non à celle de la pyrazine 13 (figure 5). Ce fin stratagème ne peut se faire que si cette enzyme reconnaît ses deux substrats identiques d'une façon totalement différente. Suivant ce raisonnement, on a introduit les notions de site A et site P; le site A étant l'endroit du site actif où la chaîne acététique du PBG se forme et le site P, celui où la chaîne propionique se forme (figure 6). La poche de l'enzyme PBGS est représentée schématiquement de la façon suivante:

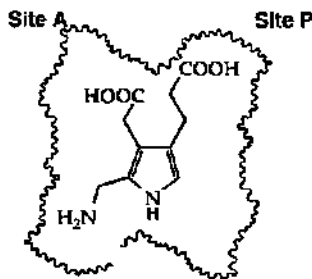


Figure 6: Site actif de la PBGS

Dans la littérature, on trouve en fait deux principaux mécanismes qui s'opposent. Le premier a été proposé par Shemin en 1968 [22], suivi un peu plus tard par celui de Jordan en 1980 [23]. Les deux présentent des intermédiaires différents et une suite de réactions inversée: la liaison C-C est formée en premier pour Shemin tandis que Jordan propose la formation de la liaison C-N comme première liaison formée (figure 7). Jordan proposa cependant un autre mécanisme allant dans la direction de celui de Shemin mais proposant néanmoins une modification du premier site d'interaction impliqué [18].

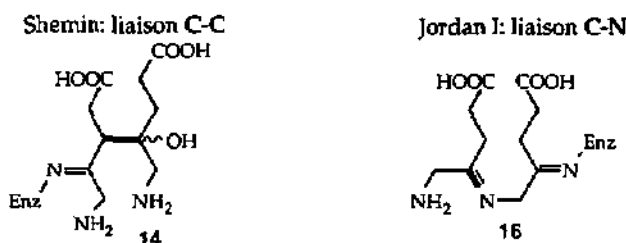


Figure 7: Principaux intermédiaires proposés

#### 1.2.1.2. Mécanisme selon Shemin [22,24]

Shemin propose en analogie avec la classe I des aldolases [25] un premier mécanisme basé sur des résultats obtenus à partir de PBGS isolée de *Rhodospseudomonas spheroides* [26]. Il postule que le premier substrat se fixe dans le site A via une base de Schiff et que la tautomérisation imine-énamine qui en résulte, active le méthylène en position 3 (figure 8). La réaction aldol peut ainsi suivre avec attaque nucléophile sur le carbonyle du second ALA. Il y a ensuite perte d'eau, cyclisation et enfin aromatisation pour obtenir le PBG.

#### Première liaison formée: liaison C-C par réaction aldol

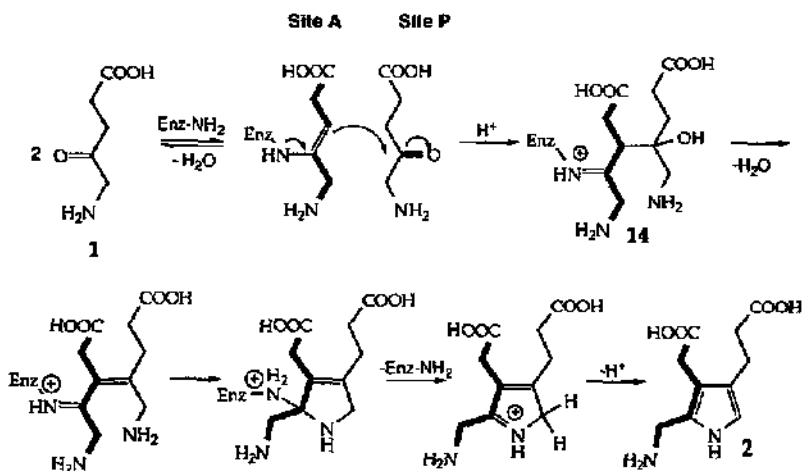


Figure 8: Mécanisme proposé par Shemin (1968).

Shemin appuie son postulat sur plusieurs expériences. La première a été celle qui lui a permis de démontrer que le mécanisme passait bien par la formation d'une base de Schiff dans le site actif.

Pour cela, il a incubé l'enzyme avec du substrat radioactif et, après réduction avec  $\text{NaBH}_4$ , il a pu constater que l'enzyme contenait de la radioactivité [22]. Ceci permet de prouver qu'il y a bien eu par réduction de la base de Schiff, formation d'une liaison amine secondaire stable entre le substrat radioactif et la PBGS. Après avoir élucidé la présence d'une base de Schiff, Shemin tenta naturellement de savoir dans quel site se forme cette base de Schiff. Pour contourner le problème du double substrat identique qui complique les données, il tenta de former des pyrroles mixtes en espérant que la structure de ces derniers apporte des informations supplémentaires. Il conclut après avoir mélangé de l'acide lévulinique avec le substrat naturel, qu'il y avait eu formation du pyrrole mixte 15 (figure 9).

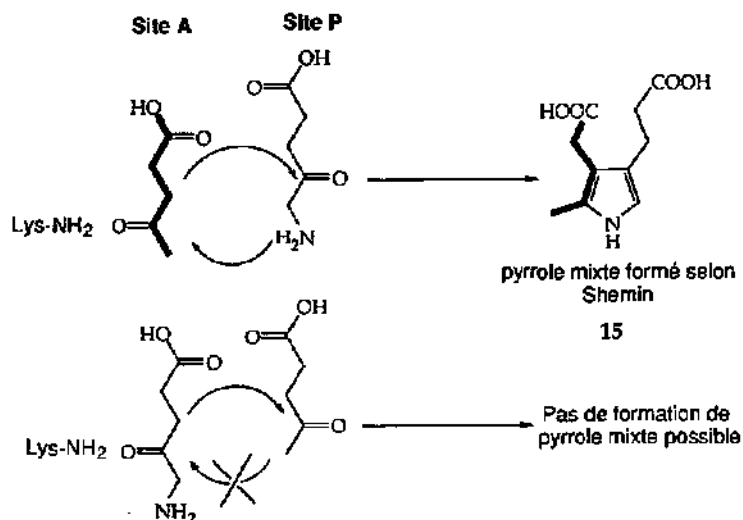


Figure 9: Formation d'un pyrrole mixte 15 selon Shemin [22]

Ce pyrrole mixte fut identifié par chromatographie sur couche mince, marquage et détection positive au réactif d'Ehrlich [22]. Aucune caractérisation chimique complète ne fut faite et cette structure a d'ailleurs été remise en cause lors de la répétition de ces expériences dans nos laboratoires [27]. R. Lüönd a démontré que la tâche supposée de ce pyrrole mixte n'éluait pas de la même manière que la référence préparée synthétiquement.

Le raisonnement de Shemin est le suivant: une seule structure de pyrrole mixte est possible et la chaîne acétique du pyrrole étant formé par l'acide lévulinique, celui-ci se fixe donc dans le site A. De plus, pour que le substrat reste le plus longtemps possible fixé à l'enzyme par une liaison covalente et pour que la séquence de réactions suivent par analogie celle des aldolases, Shemin proposa la formation d'une base de Schiff avec l'acide lévulinique dans le site A. Dans le cas inverse, il n'y aurait pas de possibilité de faire la cyclisation (figure 9).

### 1.2.1.3. Mécanismes selon Jordan [18,23]

Jordan a proposé deux mécanismes qui diffèrent dans la suite de réactions mais qui ont comme point commun le site de formation de la base de Schiff. Il détermine ce dernier comme étant le site P, à l'inverse de Shemin qui lui avait proposé le site A.

Il démontra également que la formation de la base de Schiff se fait par attaque d'une lysine [28]. Après réduction par  $\text{NaBH}_4$  de la PBGS en présence d'acide lévulinique, il a isolé et séquencé les peptides du site actif. Par comparaison à des références synthétiques, il a montré que l'acide lévulinique était fixé à une lysine.

Dans le premier mécanisme [23], il postule qu'après la formation de la première base de Schiff entre la lysine et le premier substrat, une seconde se forme entre le second ALA et le complexe enzyme-substrat (figure 10): celle-ci étant formée par attaque nucléophile de l'amine du complexe sur le carbonyle de l'ALA. La fermeture du cycle se fait par réaction aldol intramoléculaire et est suivie par une aromatisation pour former le PBG.

### Première liaison formée: liaison C-N par formation d'iminium

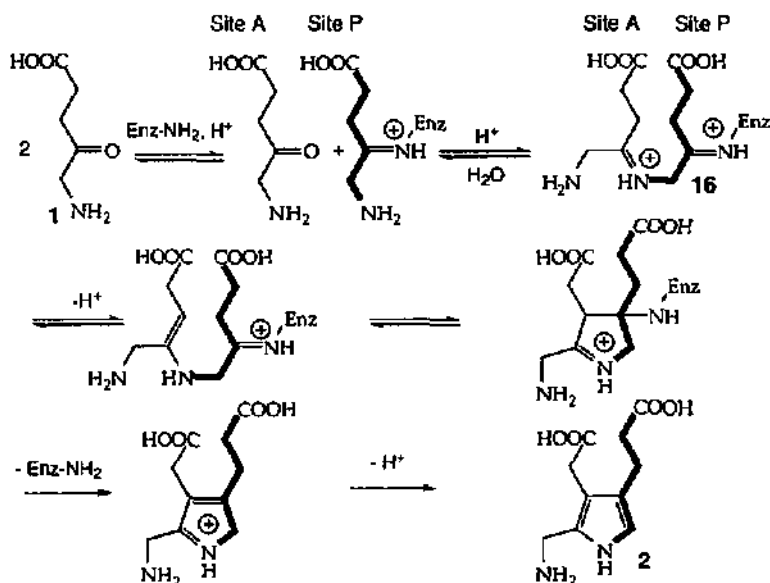


Figure 10: Mécanisme Jordan I (1980).

Jordan proposa plus tard un second mécanisme [18]. La formation de la base de Schiff a toujours lieu dans le site P, mais la réaction qui suit est une réaction aldol entre le second ALA et l'iminium. L'élimination de l'amine qui fixe le complexe sur le site actif permet d'obtenir une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée qui après cyclisation et aromatisation forme le PBG.

**Première liaison formée: liaison C-C par réaction aldol**

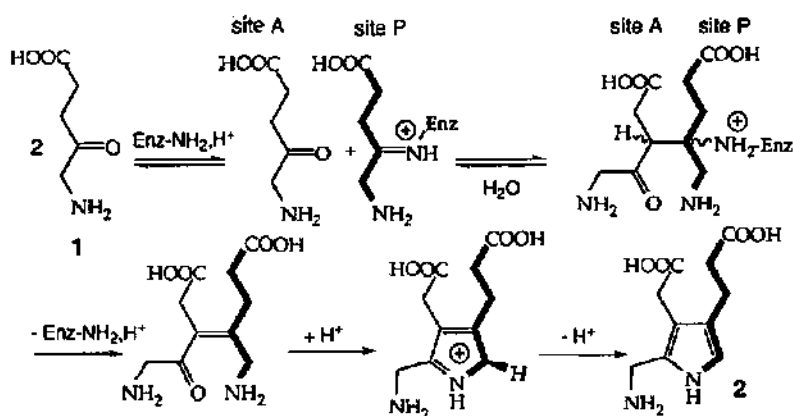


Figure 11: Mécanisme Jordan II (1991).

Jordan a utilisé des expériences <sup>14</sup>C single-turnover sur la PBGS du foie de bovin [23] ainsi que celle issue d'érythrocytes humains [29] afin de situer la base de Schiff (figure 12). Il a mélangé stoechiométriquement et rapidement, le <sup>14</sup>C(5)-ALA avec la PBGS et après 100 ms, il a rajouté un excès de substrat non marqué. Il a déterminé par la suite que l'on retrouvait essentiellement du <sup>14</sup>C(2)-PBG. La position du marquage a été déterminée par dégradation [23]. En laissant ainsi se fixer d'abord le substrat marqué et en retrouvant la radioactivité dans la partie P du PBG, il en a déduit que la lysine faisait partie intégrante du site P.

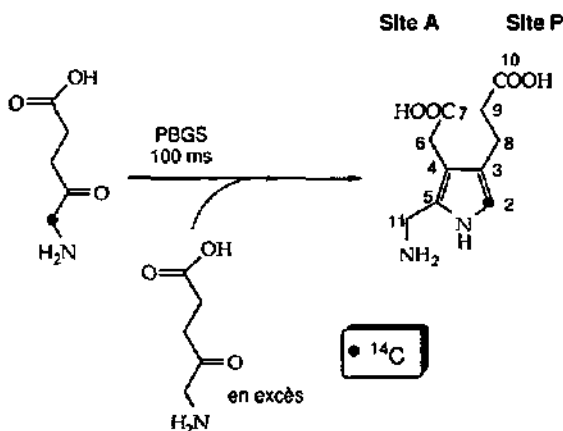


Figure 12: Expériences <sup>14</sup>C single-turnover (1980).

**1.2.1.4. Remarques:**

Dans tous les schémas qui vont suivre et les considérations mécanistiques, nous allons nous tenir à deux points:

. Le site P va être considéré comme étant le site d'ancrage de la base de Schiff suivant les observations de Jordan développées plus haut [23].

. La base de Schiff va toujours être décrite selon les résultats de Jaffe [30,31] comme étant de configuration *trans* entre la lysine de l'enzyme et le C<sub>5</sub> de l'ALA. Elle a observé par RMN <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N le complexe enzyme-substrat en utilisant non pas la PBGS naturelle mais celle modifiée par le méthyl-méthane-thiosulfonate (MMTS). Cette enzyme libre d'ions métalliques ne peut fixer qu'un seul des deux substrats et permet ainsi d'éviter d'observer le PBG fixé à l'enzyme. Ces conditions intéressantes permettent d'observer la structure et l'état de protonation de l'intermédiaire base de Schiff du site P. Malgré la possibilité attrayante d'avoir une forme énamine entre le C<sub>4</sub> et le C<sub>5</sub> de l'ALA fixé dans le site P, l'étude RMN <sup>13</sup>C (étude des différentes formes tautomères) et <sup>15</sup>N (étude de l'état de protonation des deux azotes) montre une forme iminium de structure *trans* prédominante. Ces données montrent également un état de déprotonation pour l'amine libre.

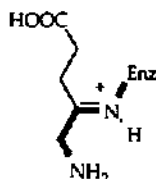


Figure 13: Configuration de la base de Schiff selon Jaffe [30].

## 1.2.2. Caractéristiques de la PBGS

### 1.2.2.1. Isolation et structures

La PBGS, isolée pour la première fois par Gibson [32] à partir du foie de bovin, a été purifiée à partir d'un grand nombre de microorganismes [21,26,33-42]. Le clonage puis le séquençage de l'ADN de différentes sources de PBGS, notamment issues de mammifères, de plantes [43], de levures, d'*Escherichia coli* [44-46] et d'autres bactéries [47,48], ont permis de déterminer les séquences primaires et de les comparer entre elles. Dans la plupart des cas, la séquence d'acides aminés est longue d'environ 330 résidus, mais celles des plantes subissent néanmoins une extension d'environ 100 résidus au niveau du N-terminal [49]. Les différentes séquences montrent un degré élevé de similarité entre elles [43,50], la PBGS de l'*Escherichia coli* qui nous intéresse en particulier est à 36% similaire à celle de la levure et 40% à celle de l'être humain [44]. L'isolation d'ADN complémentaire et/ou de fragments d'ADN génomique encodant la PBGS ont permis d'apporter beaucoup d'informations sur la structure de la protéine et notamment sur celle de son site actif.

Toutes ces études montrent que parmi les domaines les plus conservés, on en distingue particulièrement deux: un domaine du site actif contenant un résidu lysine catalytiquement actif [44] et un domaine de fixation métallique [50].

Les PBGS se situent en taille entre 250 et 340 kDa. Les sous-unités de celles issues de cellules animales ou de levures sont au nombre de huit et forment huit identiques parties de 37 kDa chacune [51,52]. Shemin décrit ces sous-unités de la PBGS issue de foie de bovin comme étant les quatre coins d'un cube [52].

Certaines issues de plantes supérieures et de bactéries sont des protéines hexamériques constituées de six sous-unités identiques de 40 ou 50 kDa.

Il est à noter que la PBGS a été identifiée comme étant semblable au proteasome inhibiteur CF2 qui est un composé stabilisateur de l'ATP du complexe proteasome 26S [53].

#### 1.2.2.2. Rôle des métaux

Les PBGS issues de mammifères, qui sont des métalloenzymes à base de zinc, ont un pH optimal d'environ 6.3-7.0 et sont inhibées par l'EDTA. Les enzymes issues de bactéries montrent des propriétés différentes et présentent un pH optimal aux alentours de 8.0-8.5 et nécessitent soit du zinc soit du magnésium. Les PBGS isolées de plantes et de levures, qui tout en étant certaines des enzymes à zinc, possèdent un pH plus élevé que celui des mammifères [43].

Les études portant sur la PBGS en tant que métalloenzyme ont été très nombreuses [14,54,55]. Cette caractéristique de la PBGS présente un intérêt certain car la PBGS est l'une des cibles principales d'un poison bien connu de l'environnement, le plomb [15]. Pour la PBGS issue de mammifères, l'inhibition par le plomb semble être la conséquence directe d'une substitution du zinc catalytique par le plomb [56]. Jusqu'à récemment, les PBGS étaient décrites comme étant des métalloenzymes dépendant soit du zinc, soit du magnésium. La caractérisation de la PBGS de *E. coli* a permis de démontrer qu'une enzyme peut lier du magnésium et du zinc en même temps et qu'ils présentent des actions bien différentes et spécifiques [57]. A partir d'études portant sur la PBGS *E. coli*, Jaffe a calculé la présence de huit  $Zn^{2+}$  par octamère et également de huit  $Mg^{2+}$ . Les  $Mg^{2+}$  jouent un rôle allostérique important dans la cohésion de l'octamère [58], les huit  $Zn^{2+}$  se répartissent quant à eux en deux groupes. Jaffe démontra sur la PBGS du foie de bovin, qu'il y a par octamère, quatre zinc fixés assez fortement à l'enzyme ( $K_d < 0.1 \mu m$ ) et quatre autres liés moins fortement ( $K_d \sim 5.0 \mu m$ ) [59]. Une modification par le méthyl-méthane-thiosulfonate (MMTS) élimine tous les zinc pour obtenir une apo-enzyme inactive. Le point très intéressant de cette étude est la restauration de l'activité qui ne nécessite que l'addition de quatre nouveaux zinc, donc seuls quatre des huit zinc de départ sont catalytiquement importants. A partir de ces résultats, Jaffe a proposé que les quatre zinc catalytiques, les plus fortement liés à l'enzyme, soient appelés  $Zn_A$ , ceci étant responsables de la fixation du substrat dans le site A [59]. Les zinc non catalytiques sont quant à eux appelés  $Zn_B$ .

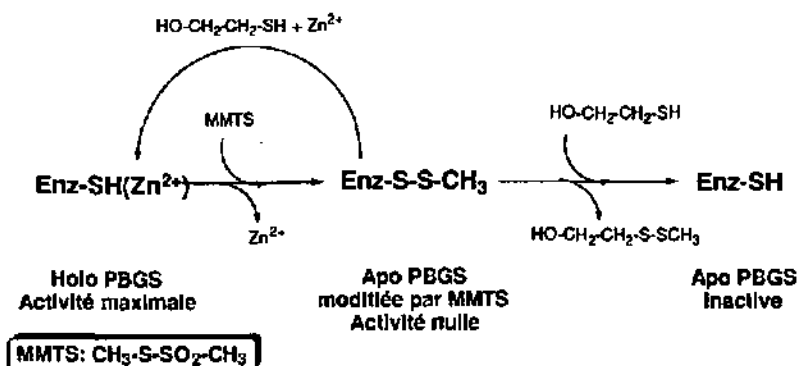


Figure 14: Inactivation de la PBGS par le MMTS

L'importance de  $\text{Zn}_A$  pour la fixation du substrat dans le site A fut renforcée par les expériences du groupe de Jaffe sur les modifications entraînées par l'action d'un composé alkylant comme l'acide 5-chloro-lévulinique (5-CLA) (17) sur la PBGS issue de bovin [60,61]. Ce bon inhibiteur compétitif de la PBGS modifiée alkyle, à haute concentration, une cystéine spécifique. L'enzyme modifiée ne peut plus que lier quatre substrats naturels par octamère et ne fixe que très brièvement le PBG. Ceci indique que le 5-CLA intervient dans le site actif même de la PBGS. Le traitement par  $\text{NaBH}_4$  de l'enzyme modifiée en présence de ALA montre la formation de liaison covalente entre le substrat et l'enzyme, ceci permet de penser que le 5-CLA agit dans le site A. La cystéine 223, modifiée par le 5-CLA, est donc un ligand qui permet de maintenir le zinc catalytique en place. La modification par l'acide 5-chloro-lévulinique sur la PBGS *E. coli* diffère de la précédente, celle-ci semble avoir lieu préférentiellement dans le site P. Les résultats sur ces modifications sont donc assez hétérogènes.

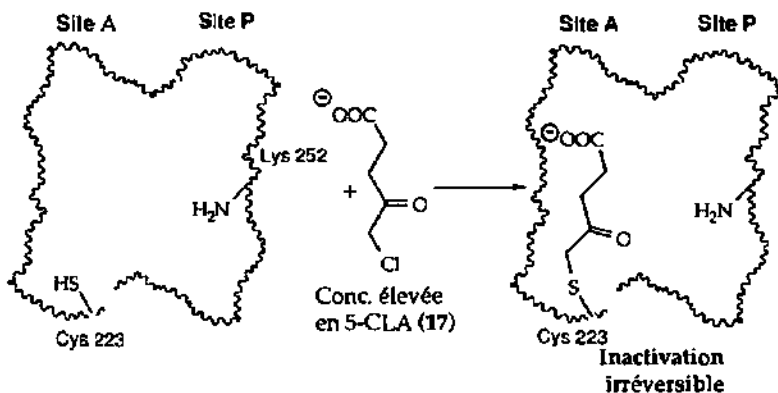


Figure 15: Modification de la PBGS par le 5-CLA

D'après les études de Dent sur la PBGS de mammifères [62], chaque  $\text{Zn}_A$  est entouré de cinq ligands dont l'un serait une cystéine. Ces études EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) ont également pu montrer la

présence autour du  $Zn_A$  d'un acide aspartique, d'une tyrosine et d'une histidine. Quant au  $Zn_B$ , il est tétraédriquement coordonné à quatre cystéines. A la suite de ce résultat, Jaffe proposa que le rôle du (cysteinyl) $_4$ -Zn est d'extraire le proton  $C_5$  de l'ALA situé dans le site P [60]. Ce proton est stéréosélectivement perdu à l'étape finale de formation du PBC [63] et celui-ci étant proche du  $Zn_B$ , il pourrait par l'intermédiaire de ces cystéines passer dans le solvant. Dans les PBCS issues de plantes, cette riche région de cystéines est remplacée par une région riche en acides aspartiques qui fixent un magnésium et qui peuvent jouer le même rôle au niveau du proton  $C_5$ . Le  $Zn_B$  ou le  $Mg_B$  garde en fait les cystéines à l'état réduit et la présence de mercapto-éthanol, qui élimine le risque de formation de ponts disulfides, pourrait palier à l'absence de  $Zn_B$ .

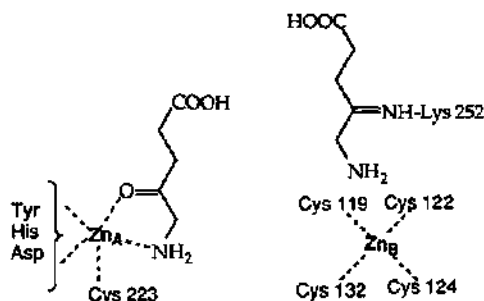


Figure 16: Site actif de la PBCS issue de mammifères selon Jaffe

Jaffe analysa les rayons-X et les spectres RMN de 24 métalloenzymes utilisant du zinc, en espérant ainsi prédire quels acides aminés servent de ligands spécifiques aux  $Zn_A$  et aux  $Zn_B$  [14]. Cette base de données est largement dominée par les enzymes voisines de la carboxypeptidase [50]. Les rayons-X de cette protéine en présence de substrat montre la fixation bidentée de la glycyl-glycine sur le zinc catalytique [64]. Les  $Zn_A$  sont tétra- ou pentacoordiné et il semble que le ligand commun qui revient le plus souvent soit l'histidine. Les zinc non catalytiques ont quant-à-eux au moins deux si ce n'est pas quatre cystéines dans leurs ligands.

A partir de ces nombreuses études, Jaffe proposa un modèle dit des trois métaux qui sépare les PBCS en quatre catégories.

Type	Exemple	Métal A	Métal B	Métal C
I	Mammifères	4 Zn(II)	4 Zn(II)	Absent
II	<i>E.coli</i>	4 Zn(II)	4 Zn(II)	8 Mg(II)
III	Plantes	4 Mg(II)	4 Mg(II)	8 Mg(II)
IV	<i>B. japonicum</i>	4 Mg(II)	Absent	8 Mg(II)

Tableau 2: Modèle des trois métaux de Jaffe

La PBCS issue de mammifères fait partie de la première catégorie et utilise  $Zn_A$  et  $Zn_B$  tandis que celles de *E. coli* et de nombreuses bactéries utilisent  $Zn_A$ ,  $Zn_B$  et  $Mg_C$ . Celles des plantes requièrent du magnésium aux trois différentes positions et à l'exception de celle issue de *Bradyrhizobium japonicum* qui ne nécessite aucun métal catalytique [65].

### 1.2.3. Structure rayons-X de la PBGS issue de levure [49]

Jusqu'à récemment, aucune structure rayons-X de PBGS n'était connue, malgré l'effort continu de plusieurs groupes dans le cadre de la cristallisation de cette enzyme [66,67]. Le groupe de Jordan cristallisa en premier les PBGS issues d'*Escherichia coli*, de *Saccharomyces cerevisiae* et de levure et en fit les premières caractérisations rayons-X [67] en utilisant notamment la technique de diffusion de vapeur [68]. La structure rayons-X de la PBGS issue de levure fut ensuite déterminée avec une résolution de 2.3 Å et publiée [49]. La structure rayons-X de la PBGS issue de *E. coli* devrait être publiée sous peu [69]. L'élucidation d'une structure de la PBGS a permis de vérifier les différentes informations qui ont été accumulées par les innombrables recherches effectuées ces dernières années pour palier à l'absence de structure tridimensionnelle.

La première observation de cette étude rayons-X est la présence de ce que l'on appelle un tonneau TIM (TIM-barrel ou  $(\alpha/\beta)_8$ ) [70]), observé pour 10% des structures d'enzymes connues, mais ces enzymes pouvant catalyser des réactions très différentes telles que des oxydations, des hydrolyses de liaisons glycosidiques ou des condensations aldols [71]. La notation TIM fait référence à la structure de la Triose-phosphate IsoMérerase pour laquelle ce tonneau fut observé la première fois [72]. La partie centrale est constituée de huit brins  $\beta$  parallèles qui sont disposés les uns contre les autres formant ainsi un tonneau ouvert. Les hélices  $\alpha$ , qui relient les brins  $\beta$  parallèles, sont toutes localisées à l'extérieur du tonneau.

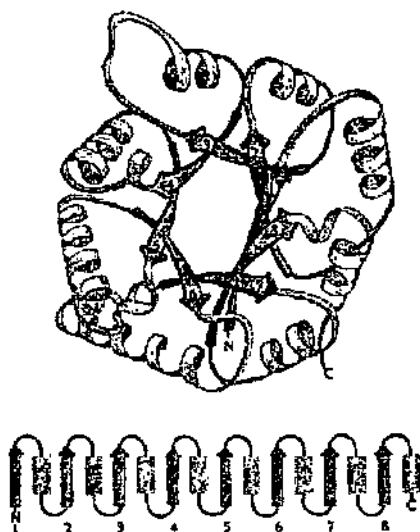


Figure 17: Représentation d'un tonneau TIM ou  $(\alpha/\beta)_8$  [70]

Cette particularité structurale se retrouve notamment dans la classe des aldolases [73-76]. Chaque sous-unité octamère possède un tonneau TIM et une chaîne N-terminale bien distincte d'environ 50 à 60 acides aminés. Il y a ensuite association de deux sous-unités par une interaction forte entre les deux chaînes N-terminales correspondantes pour former un dimère. Cette interaction monomère-monomère semble être la plus stable de tout l'édifice, il serait sans doute plus juste de désigner la PBGS sous la forme d'un tétramère de dimères.

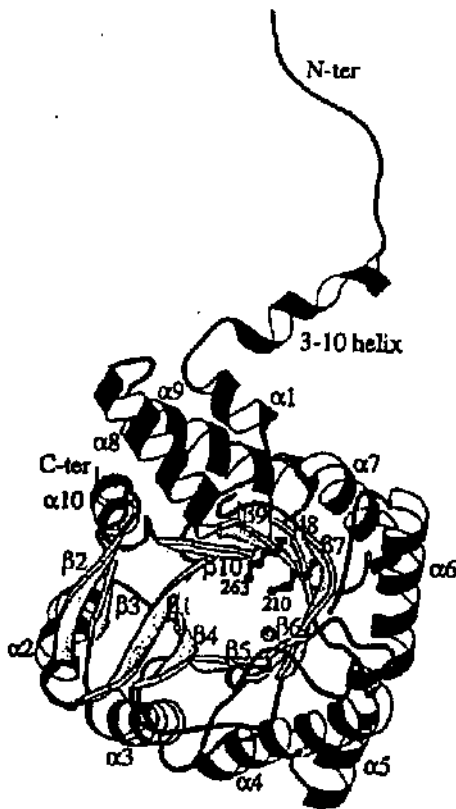


Figure 18: Monomère de la PBGS issue de levure [49]

Les deux tonneaux TIM se positionnent alors suivant un plan orthogonal, c'est-à-dire que les axes des cylindres sont perpendiculaires les uns aux autres et les huit sites actifs sont dirigés vers l'extérieur de l'octamère. Comme la plupart des enzymes possédant un tonneau TIM, la PBGS possède au centre du cylindre un coeur hydrophobe [70]. Beaucoup d'expériences de mutagenèse ou de modification chimique ont permis de localiser les résidus importants à la catalyse [77,78]. Ces données mêlées à celles apportées par l'élucidation de la structure tridimensionnelle ont permis de situer le site actif du côté des brins C-terminaux du tonneau. En effet, dans les domaines à tonneau TIM, le site actif est généralement formé par des boucles situées à l'une des extrémités du tonneau  $\alpha/\beta$  qui relie les brins  $\beta$ -terminaux aux hélices  $\alpha$ -terminales.

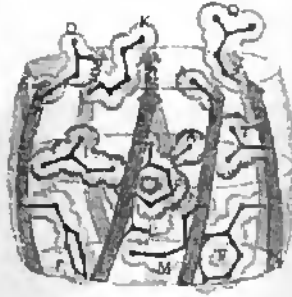


Figure 19: Site actif d'un tonneau TIM [70]

Les résidus catalytiquement actifs sont localisés dans cet ensemble de régions de boucles [70]. Dans notre cas présent, les dernières boucles forment une cavité bien définie où l'on observe deux lysines adjacentes aux positions 210 et 263 (positions 195 et 247 pour *E. coli* [79]).



Figure 20: Site actif de la PBGS issue de levure en présence de plomb [49]

Ces résultats sont en fait les premiers qui mettent au premier plan la présence d'une seconde lysine, la lysine 263 étant déjà connue pour former une base de Schiff avec le premier substrat [28]. Cette dernière est dans un environnement plus hydrophobe que sa voisine, ce qui est en accord avec son rôle de nucléophile, la lysine restant ainsi déprotonée. Cette seconde lysine semble quant à elle, être dans un état protoné ce qui pourrait diminuer le pKa de la lysine 263- base de Schiff. Des études de mutations de la lysine 210 ont montré que ces modifications rendent incapable la lysine 263 de jouer son rôle de nucléophile [49]. Cette lysine imprévue se trouve à une distance de 5 Å d'un ion  $Zn^{2+}$  qui est fixé par trois résidus cystéines. Contrairement aux études EXAFS de Dent [62] qui soulignaient l'implication de quatre cystéines dans le maintien du zinc, la structure rayons-X montre que le milieu défini pour fixer le métal, est constitué de trois cystéines, les cystéines 133, 135 et 143. Quant à la cystéine 130 non impliquée dans la fixation du zinc, elle fait partie d'un feuillet  $\beta$  qui précède la boucle fixant le zinc et sa chaîne latérale est située dans une zone hydrophobe. Un second domaine de fixation de métal se situe entre l'histidine 142 et la cystéine 234 et se trouve à une distance plus éloignée des deux lysines.

L'attribution catalytique à l'un des deux zinc n'est pas aussi évidente qu'à première vue. La région entre les résidus 220 et 233 (adjacent au second domaine métallique) semble changer de conformation quand le substrat se fixe et celle-ci pourrait jouer un rôle dans le site actif, cette région étant commune aux différentes PBGS.

Il est également à noter que le quatrième ligand du zinc entouré par trois cystéines semble être une molécule d'eau qui est bien localisée dans le site actif (voir figure 20). Le rôle de cette molécule d'eau n'est pas encore éclairci mais on peut déjà imaginer que cette molécule d'eau liée au zinc métallique puisse sous forme d'ion hydroxyde jouer un rôle dans les déprotonations.

Jordan à la suite de ces informations a porté sa préférence sur le mécanisme Jordan II et a proposé une version plus élaborée [79] qui sera discutée dans le chapitre 7. Ces nouveaux éléments concernant la position des zincs remettent en cause le modèle de site actif proposé par Jaffe (voir figure 16).

## 2. Travaux déjà effectués dans le groupe et but du travail

### 2.1. Travaux antérieurs du groupe

L'étude mécanistique de réactions catalysées par les enzymes est un véritable challenge pour les chimistes et les biochimistes d'aujourd'hui. Ce challenge est d'autant plus intéressant à relever, si la réaction enzymatique en question présente une suite de réactions. La biosynthèse du PBG (2) à partir de l'acide 5-amino-lévilinique (1) fait partie de cette catégorie de réactions multi-étapes complexes et les questions usuelles concernant ce type de réactions se posent: la réaction chimique est-elle identique à la réaction enzymatique, ou encore, quelle est la séquence des réactions et quelles sont les étapes accélérées par l'enzyme? La réponse à la première question a déjà été apportée dans le premier chapitre et est donc négative. La dimérisation chimique en pyrazine 13 de l'ALA, à la place de la formation du PBG, ne fait qu'accroître l'intérêt porté à la PBGS. La question abordant la séquence des étapes reste pour l'instant sans réponse malgré la publication récente de la première structure rayons-X de la PBGS issue de levure [49]. En plus de ces interrogations s'ajoute une difficulté supplémentaire propre à la PBGS: comment reconnaît et différencie l'enzyme ses deux substrats identiques dans le site actif? Cette particularité du double substrat identique complique sérieusement les données cinétiques mais renforce l'attention portée à cette biosynthèse.

La détermination de structures rayons-X à haute résolution de l'enzyme ou de l'enzyme associée, soit au substrat, soit à un inhibiteur permet souvent de trouver les fonctions responsables de la catalyse enzymatique et d'apporter des informations importantes sur le mécanisme. La structure tridimensionnelle de la PBGS n'étant disponible que depuis peu, il a fallu se reporter à des méthodes moins précises comme les études d'inhibition, la détection d'intermédiaires (suivi RMN), la modification chimique d'acides aminés et la mutagenèse dirigée.

Notre groupe s'est concentré sur les effets d'inhibition sur la cinétique de la PBGS, sur le design et la synthèse d'inhibiteurs potentiels de la PBGS [80,81] mais également sur la synthèse biomimétique du PBG [82]. Cette synthèse repose sur une condensation aldolique de deux analogues fonctionnalisés et protégés d'ALA en présence de  $TiCl_4$  pour former un intermédiaire proche de celui proposé par Shemin [83,84].

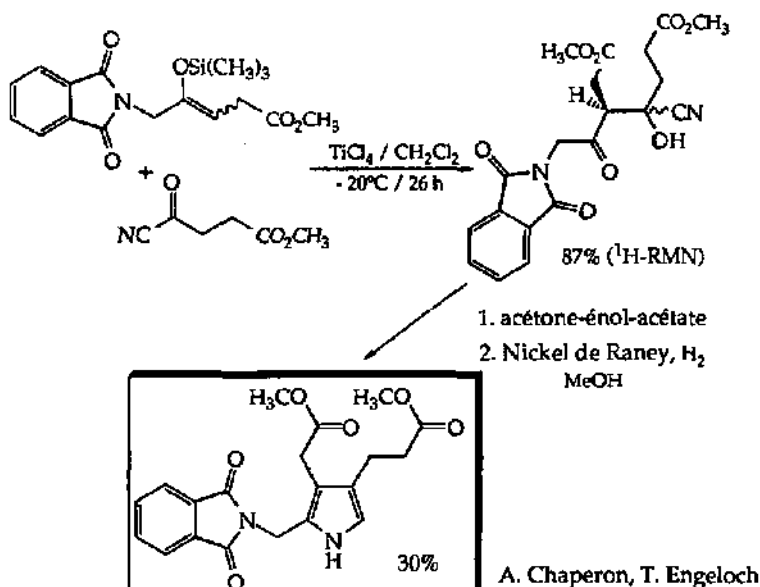


Figure 21: Synthèse biomimétique du PBG

### 2.1.1. Travaux effectués dans le cadre de la thèse de R. Lüönd [38]

Afin d'esquisser le site actif de l'enzyme et de déterminer quelles fonctions reconnaît l'enzyme, nous avons décidé de faire des études d'inhibition systématiques sur des analogues de substrat, de produit et d'intermédiaires potentiels. Les premières investigations ont été effectuées sur la PBGS de *Rhodobacter spheroides* dans le cadre de la thèse de R. Lüönd [38]. Les résultats des tests d'inhibition sur une vingtaine d'analogues de substrat (modifications en toutes positions de ALA, exception faite de la cétone), ont désignés le 4-nitro-butane-2-one (comme étant le meilleur inhibiteur testé ( $K_m=260 \mu\text{M}$ ;  $K_i=18 \mu\text{M}$ ). Le remplacement du carboxylate par une fonction nitro sur cet analogue de substrat améliore donc l'inhibition.

Un modèle du site actif a pu être développé à partir des différents résultats accumulés (figure 22). La fonction acide en position 1, importante pour la reconnaissance, doit être reconnue par une charge positive qui pourrait par exemple être apportée par le guanidium d'une arginine. La fonction cétone en position 4 semble primordiale et des substituants peu encombrants en position 2, 3 et 5 semblent être bien tolérés. En testant des composés possédant entre les carbones 2 et 3 une double liaison, il a pu justifier ainsi l'importance d'avoir une libre rotation autour de ces carbones. La fonction protonée de l'amine n'est pas aussi importante pour la reconnaissance du substrat et peut être remplacée par des substituants neutres ou polaires.

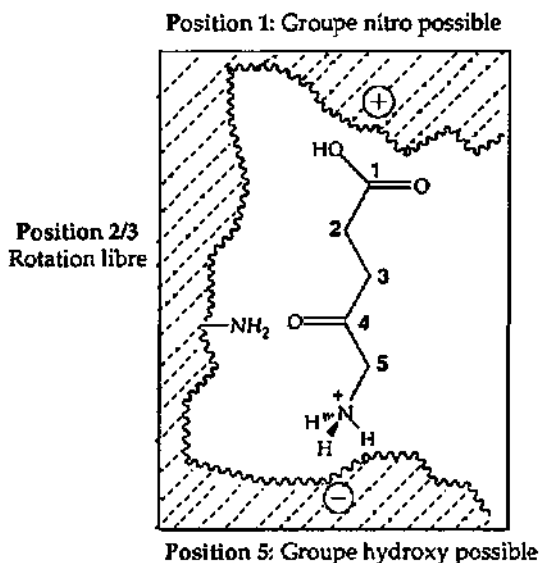


Figure 22: Site actif décrit par R. Lüond

R. Lüond s'est également penché sur le cas très intéressant des analogues d'intermédiaires. Le design puis le test de ce type de composés semblent être un moyen tout indiqué pour avoir plus d'informations sur la séquence suivie lors de la formation des liaisons. Il s'est donc dirigé vers le test d'inhibiteurs basés sur l'intermédiaire de Shemin et H. Bertschy a mis au point la synthèse de l'acide 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptanoïque (*rac*-18) sous forme racémique [85]. Ces composés possédant deux carbones asymétriques (4 énantiomères = 4 complexes enzyme-substrat différents), il a testé séparément les deux diastéréoisomères isolables par chromatographie-flash. Afin d'éviter les problèmes de formation de pyrroles qui pourraient avoir lieu à température ambiante sans enzyme, il a par rapport à la structure de l'intermédiaire éliminer les fonctions amines. Ceci évite également d'avoir en présence de  $\beta$ -cétamines en milieu basique, une formation de pyrazine. Le groupe méthoxy qui par rapport à la fonction alcool, diminue la polarité du composé et encombre stériquement plus la molécule, permet néanmoins d'éviter une réaction rétro-aldolique.

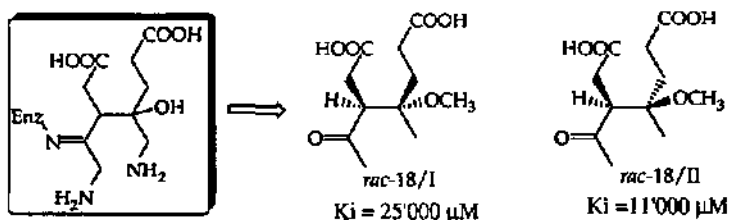


Figure 23: Analogues de l'intermédiaire postulé par Shemin

Les tests d'inhibition effectués sur l'enzyme à partir des deux racémats *rac*-18/I et *rac*-18/II ont montré une plus grande affinité pour l'un des deux racémats ( $K_i = 11'000 \mu\text{M}$ , contre  $K_i = 25'000 \mu\text{M}$  pour l'autre racémate).

Le point en suspens de ces études, était de trouver lequel des deux énantiomères inhibe le plus l'enzyme, l'un des deux devant mieux inhiber que l'autre.

### 2.1.2. Travaux effectués dans le cadre de la thèse de M. Henz [39]

A la suite du travail de R. Lüönd, M. Henz a repris des études d'inhibition, mais cette fois-ci sur la PBGS issue d'*Escherichia coli* [39]. Sur une série d'analogues de substrat similaires à ceux déjà testés par R. Lüönd, il retrouva les mêmes tendances pour les variations de fonctions aux différentes positions. Il est également à noter que le Km de la PBGS issue de *R. spheroides* est sept fois supérieur à celui calculé pour *E. coli*, cette deuxième source d'enzyme nous permet donc de gagner en sensibilité et en spécificité lors des tests d'inhibition. Le grand pas en avant fut celui de développer une nouvelle série d'inhibiteurs, celle des  $\beta$ -dicétones mais également d'obtenir un éventail d'inhibiteurs plus large (époxydes irréversibles, inhibiteurs slow-binder) qui permet de faire certains recoupements. Cette famille des  $\beta$ -dicétones est basée sur le pouvoir inhibiteur, déjà plusieurs fois observé, de l'acide 4,6-dioxo-heptanoïque ou succinyle acétone (11) sur la PBGS. La succinyle acétone et ses analogues suivent un comportement qui semble a priori être incompétitif et la succinyle acétone reste de loin le meilleur inhibiteur testé jusqu'à présent (1500 fois plus efficace que l'acide lévulinique). La succinyle acétone inhibe le site P en formant une base de Schiff qui pourrait s'isomériser en une forme énamine plus stable.

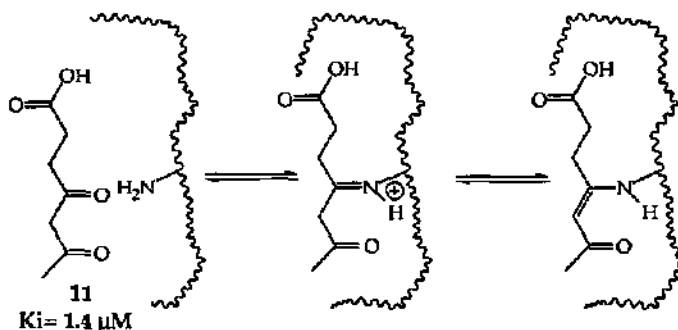


Figure 24: Inhibition du site P par la succinyle acétone (11)

M. Henz a également testé une série de composés diacides comme analogues d'intermédiaires. La plupart des premiers diacides testés sont des inhibiteurs compétitifs avec des  $K_i$  de l'ordre de 10'000  $\mu$ M. Ces résultats ne sont pas très révélateurs mais il est important de souligner ces résultats car ils auront une certaine importance par la suite (Chap. 5.2.4.1.)

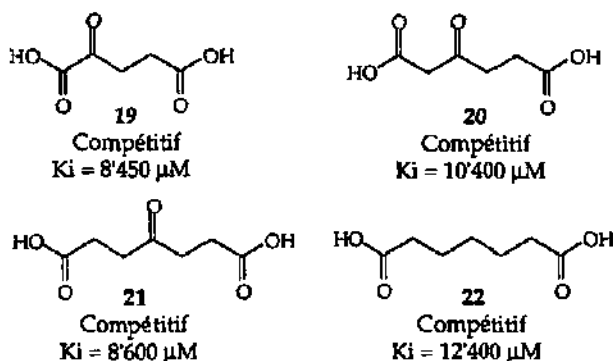


Figure 25: Quelques uns des diacides testés par M. Henz [39]

Enfin, suivant les différentes classes d'inhibiteurs, il a pu corréler ceux-ci avec un site d'interaction enzyme-inhibiteur bien spécifique.

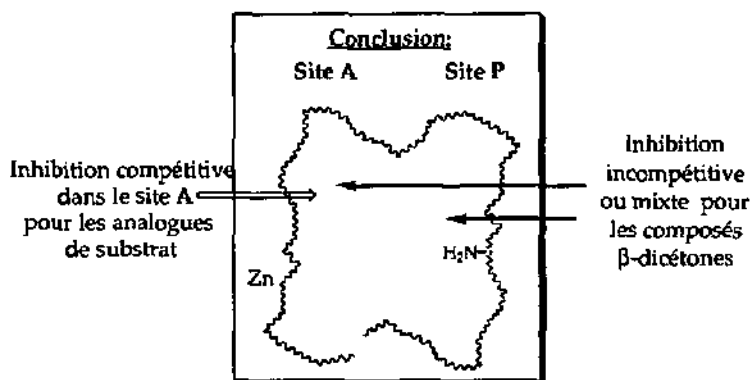
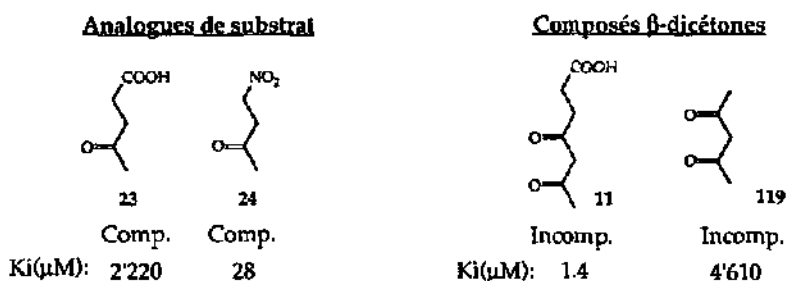


Figure 26: Corrélation type d'inhibiteurs/site d'interaction

Le raisonnement portant sur la cinétique sera développé plus en détail dans le chapitre 3.2., mais les observations de M. Henz sont en grandes lignes les suivantes:

- la cinétique semble suivre les lois de la cinétique de Michaelis-Menten à partir de l'approche du second substrat.
- les analogues de substrat sont majoritairement des inhibiteurs de type compétitif qui sont en direct compétition avec le substrat qui se fixe dans le site A.
- la double interaction d'un inhibiteur dans le site A et dans le site P conduit à un comportement cinétique incompétitif ou mixte.
- l'observation d'inhibiteurs slow-binder est due à la formation lente d'un complexe très stable enzyme-inhibiteur.
- les analogues de produit décrivent une inhibition compétitive.

## 2.2. Les analogues d'intermédiaires

### 2.2.1. Généralités

Au vu des connaissances accumulées lors des précédents travaux, il était intéressant de savoir si il n'était pas possible de développer d'autres inhibiteurs plus efficaces basés sur les différents intermédiaires de mécanismes proposés. Avant d'exposer les grandes lignes du travail effectué, quelques notions portant sur les états de transition et les analogues d'intermédiaires sont nécessaires pour justifier cet intérêt.

Le postulat central de la théorie des états de transition est le suivant: dans les réactions catalysées, le substrat S (dans la réaction non enzymatique) et le complexe ES (dans la réaction enzymatique) existent dans un état d'équilibre avec un état de transition ( $S^\ddagger$  et  $ES^\ddagger$  respectivement) [86,87]. Cet état de transition est situé au sommet de la barrière d'énergie potentielle. Les réactions chimiques et enzymatiques correspondantes peuvent différer mécanistiquement par une différence structurale des états de transition ou, si les mécanismes chimiques sont les mêmes, l'état de transition est atteint à un point différent sur les coordonnées de réaction pour les réactions enzymatique et non enzymatique. Le pouvoir catalytique des enzymes repose sur leur haute affinité par rapport à ces intermédiaires instables. Ce principe fournit une base intéressante pour le design d'inhibiteurs puissants sous la forme d'analogues stables de  $S^\ddagger$ . Ces inhibiteurs, appelés analogues d'état de transition, sont tout d'abord désignés pour tester les différentes alternatives de mécanisme par lequel l'enzyme passe. Mais l'état de transition est par définition le point le plus haut en énergie du profil énergétique d'une réaction, impliquant des angles de liaisons, des distances de liaisons et des distributions électroniques qui ne peuvent jamais être exactement imiter par un inhibiteur stable. Pour ces raisons, le terme d'analogue d'état de transition décrit un idéal qui ne peut jamais être complètement atteint.

Par contre, un inhibiteur mimant un intermédiaire multi-substrat qui incorpore les fonctions qui permettent la fixation de un ou plusieurs substrats dans la même molécule, devrait montrer un avantage entropique dans la fixation par rapport à deux substrats fixés séparément. Le premier inhibiteur multi-substrat développé fut la pyridoxylalanine, inhibiteur puissant de la pyridoxamine-pyruvate transaminase [88]. Ce type d'inhibiteurs est en nombre croissant car ils représentent des cibles attractives pour le design de médicaments. Ils sont en effet la caractéristique unique d'un seul type de réaction, tandis que les substrats sont généralement partagés par deux ou plusieurs enzymes. Il est à noter qu'un second type d'application de ces analogues est celui d'haptène dans la production d'anticorps catalytiques [89].

Cette dernière remarque me permet de souligner que des travaux concernant la formation d'anticorps catalytiques à partir d'haptène basé sur un analogue d'intermédiaire mécanistique présumé de la PBCS sont actuellement en cours [90]. L'étude de la PBCS se prête donc tout à fait à la synthèse et au test d'analogues d'intermédiaires multi-substrats.

### 2.2.2. But du travail

Le point nouveau de ce travail d'inhibition a été de s'intéresser de plus près à la première proposition émise par Jordan. A la suite de l'effort intense de F. Stauffer [81] de synthétiser des inhibiteurs et notamment des intermédiaires de Jordan 1, il a été possible de définir une nouvelle classe d'inhibiteurs, les céto-diacides C<sub>10</sub> qui ont décrit une inhibition slow-binding efficace. Ces composés, par des variations de longueur de la chaîne carbonée et de fonctionnalités aux extrémités, ont donné des résultats très intéressants et confirmé d'autres, déjà connus. Parallèlement à ces composés, des analogues de substrat notamment fluorés et des β-dicétones bloquées entre les deux fonctions carbonyles ont été développés [81] et testés.

Une partie de mon travail s'est également intéressée vers les analogues d'intermédiaires de Shemin. La séparation des énantiomères de l'acide 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptanoïque (*rac-18*) sous forme d'esters méthylés a été réalisée par chromatographie liquide haute performance chirale et une amélioration d'une étape de la synthèse de ces produits a été étudiée.

Une synthèse d'analogue de substrat nitré, le 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25), a ensuite été réalisée.

A l'occasion de ce travail de thèse, un stage à la Technische Universität de Graz dans le groupe du professeur K. Faber, spécialisé dans l'hydrolyse enzymatique d'époxydes a été possible. Dans le cadre de ce stage, des biocatalyseurs permettant l'hydrolyse énantiosélective d'époxydes nitrés ont été testés, afin d'obtenir des analogues de substrat ayant de bonnes qualités de fixation sur le zinc présent dans le site A.

### 3. Etudes d'inhibition

#### 3.1. Cinétique enzymatique

##### 3.1.1. L'équation de Michaelis-Menten

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

Dans une réaction chimique non catalysée, la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la concentration en substrat. Pour ce type de réaction, le graphique représentant la vitesse en fonction de la concentration en substrat serait une ligne droite. Le même type de graphique dans le cas d'une réaction enzymatiquement catalysée n'est plus une ligne droite mais une hyperbole [91] (figure 27).

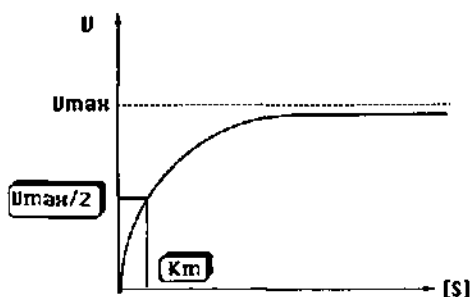
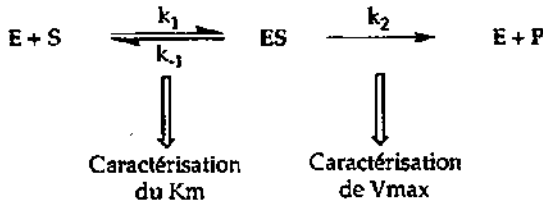


Figure 27: Profil de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

Les premiers travaux portant sur cette hyperbole sont le fruit des recherches de Michaelis et Menten [92] et de Briggs et Haldane [93], l'équation déduite de cette hyperbole s'appelant l'équation de Michaelis-Menten. Ils postulèrent que la catalyse passe par la rapide et réversible formation d'un complexe formé entre l'enzyme et le substrat. Ce complexe est ensuite lentement converti en produit avec régénération de l'enzyme. L'équation de Michaelis-Menten se retrouve le plus couramment sous la forme suivante:



### Equation de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$\text{si } k_2 \ll k_{-1}, K_m = k_{-1} / k_1$$

$$V_{\max} = k_2 \cdot [E]_0$$

$[E]_0 =$  Concentration initiale en enzyme

### Schéma 1: Relation de Michaelis-Menten

Les deux variables de cette équation sont la vitesse de la réaction,  $v$ , et la concentration en substrat  $S$ .  $V_{\max}$  est la vitesse de réaction dans des conditions de concentration saturante en substrat. Dans ces conditions, chaque molécule d'enzyme aura un substrat fixé sur elle et interagira pour le convertir en produit le plus vite que possible. La constante de Michaelis-Menten  $K_m$  décrit l'affinité de l'enzyme pour le substrat [94].

### 3.1.2. Détermination des paramètres cinétiques

#### 3.1.2.1. Utilisation du graphe de Michaelis-Menten

Toutes les méthodes pour déterminer les paramètres cinétiques utilisent la même expérience de base qui est de mesurer la vitesse à différentes concentrations en substrat. La première méthode est tout naturellement celle utilisant le graphe  $v$  en fonction de  $[S]$  (figure 27).  $V_{\max}$  et  $K_m$  peuvent être directement déterminés du graphique,  $K_m$  étant la valeur de la concentration en substrat donnée pour  $v = V_{\max}/2$ . Ces valeurs sont en fait déterminées plus précisément par un programme statistique.

#### 3.1.2.2. Utilisation du graphe de Lineweaver-Burk

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

$$1/v = (K_m/V_{\max}) \cdot (1/[S]) + (1/V_{\max})$$

Le graphe  $1/v$  en fonction de  $1/[S]$  est donc une droite de pente  $K_m/V_{\max}$  et présente l'intérêt d'avoir les deux variables  $v$  et  $[S]$  sur des axes séparés contrairement aux méthodes de Eadie-Hofstee et Hanes décrites dans les lignes qui suivent (figure 28). Cependant, des analyses d'erreurs sur plusieurs graphes ont montré une non-uniformité non négligeable dans la distribution des erreurs par cette méthode [91].

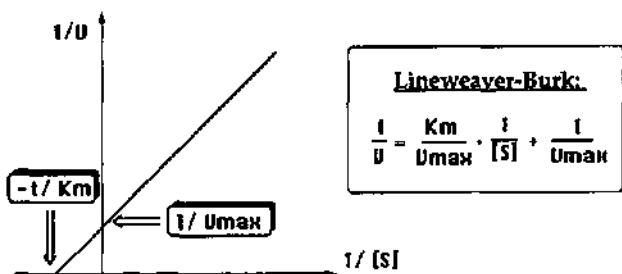


Figure 28: Représentation graphique de l'équation de Lineweaver-Burk

### 3.1.2.3. Utilisation du graphe de Eadie-Hofstee

Tout comme le graphe de Lineweaver-Burk, cette technique de calcul est basée sur une conversion de celle de Michaelis-Menten et donne une équation linéaire. Les variables sont  $v$  et  $v/[S]$ , la droite résultante étant de pente égale à  $K_m$  et coupant l'axe des ordonnées en  $V_{\max}$ , ce qui fait de cette méthode une lecture directe de  $V_{\max}$  (figure 29)[91].

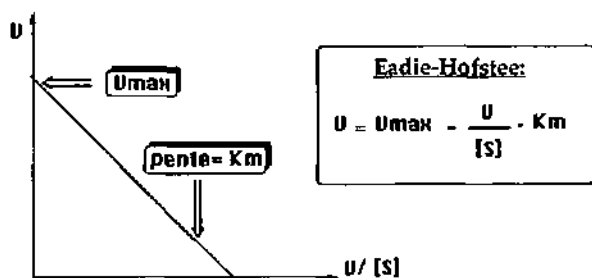


Figure 29: Représentation graphique de l'équation de Eadie-Hofstee

### 3.1.2.4. Utilisation du graphe de Hanes

C'est encore une autre conversion de l'équation de Michaelis-Menten qui donne une nouvelle relation linéaire en portant la concentration en substrat divisée par la vitesse en fonction de la concentration en substrat [91]:

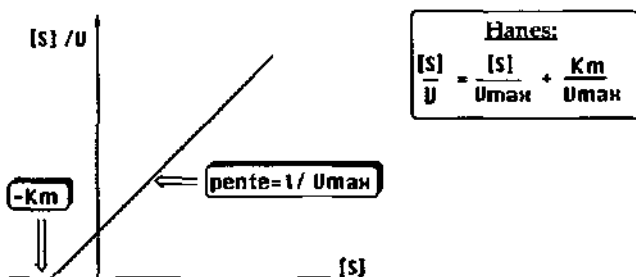


Figure 30: Représentation graphique de l'équation de Hanes

La méthode de Hanes ainsi que celle de Eadie-Hofstee sont plus uniformes dans leurs distributions d'erreurs que celle de Lineweaver-Burk et sont donc des méthodes de détermination de paramètres fiables.

### 3.2. Cinétique de la PBGS

#### 3.2.1. La PBGS: deux substrats identiques, un produit

Les pionniers de l'étude mécanistique de la PBGS sont Granick et Mauzerall, qui à la fin des années cinquante, ont déjà cerné quelques points importants concernant la cinétique de cette enzyme [41]. On serait en droit d'attendre de cette enzyme à deux substrats une cinétique du second ordre mais l'expérience montre un profil de vitesse qui suit parfaitement les lois de Michaelis-Menten. La cinétique observée ne peut cependant pas s'expliquer aussi simplement par les lois de Michaelis-Menten qui sont relatives à une enzyme à un substrat. Granick et Mauzerall ont tout d'abord proposé deux solutions.

La première décrit une première étape de dimérisation chimique entre les deux ALA pour former une imine qui joue ensuite le rôle de substrat dans la réaction enzymatique.

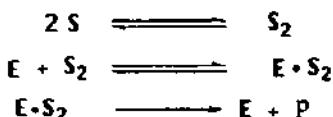
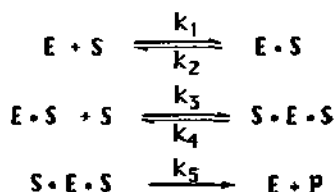


Schéma 2: Premier schéma réactionnel proposé par Granick-Mauzerall [41]

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

Ce second schéma réactionnel (schéma 3) propose la fixation d'un substrat l'un après l'autre sur l'enzyme. A la suite de ce schéma, Granick et Mauzerall esquissent même en quelques mots un mécanisme impliquant la formation spontanée d'une liaison C-N suivie d'une condensation aldol aidée par un métal qui favoriserait la formation d'un énolate.



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

Schéma 3: Deuxième schéma réactionnel proposé par Granick-Mauzerall[41]

Pour que cette équation du second degré puisse après simplification décrire la cinétique observée expérimentalement (schéma 4), il faut réunir selon Granick les conditions suivantes:

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

$1/S_0^2$  négligeable si:

- $S_0 > k_2 / (k_1 + k_3 \cdot k_5 / (k_4 + k_5))$
- $k_5$  petit

$$v = \frac{k_5 E_0}{1 + \left[ \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right] \frac{1}{S_0}} = \frac{k_5 E_0 S_0}{S_0 + \left[ \frac{k_4 + k_5}{k_3} + \frac{k_5}{k_1} \right]} \implies \text{Michaelis-Menten}$$

Schéma 4: Équation simplifiée de Granick-Mauzerall [41]

Suivant les informations accumulées par la suite sur le mécanisme de la PBCS, tout le schéma mécanistique peut être décrit de la manière suivante:

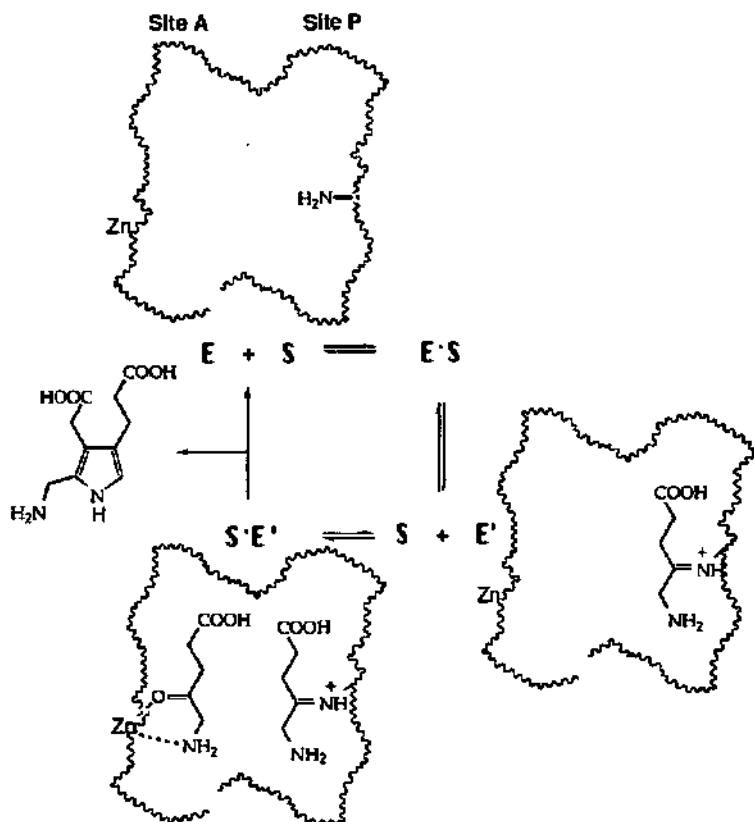


Figure 31: Schématisation de la cinétique de la PBCS

### 3.2.2. Autre exemple d'enzyme deux substrats identiques - un produit la D-alanine : D-alanine ligase

La D-alanine-D-alanine ligase (ou D-alanyl-D-alanine synthetase EC 6.3.2.4.) est essentielle à la synthèse de la membrane cellulaire bactérienne. Cette paroi est constituée d'un peptidoglycane crucial, le UDP-N-acétylmuramyl pentapeptide, dont la formation fait appel à ce que l'on appelle la branche alanine (figure 32).

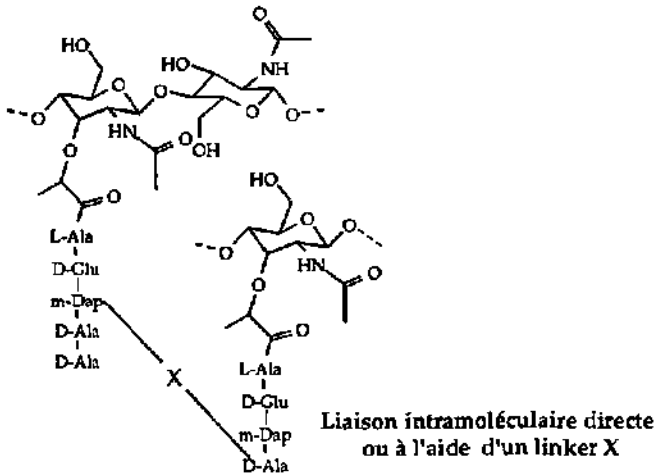


Figure 32: Structure du peptidoglycane impliqué

Celle-ci est constituée de trois étapes: la transformation de L-alanine en D-alanine (26) par l'Alanine racémase, la formation d'un dipeptide D-alanyl-D-alanine (27) par la D-Ala-D-Ala ligase qui est une enzyme ATP-dépendante (figure 33) et enfin, le couplage du dipeptide avec le précurseur du peptidoglycane par la D-Ala-D-Ala adding enzyme [95].

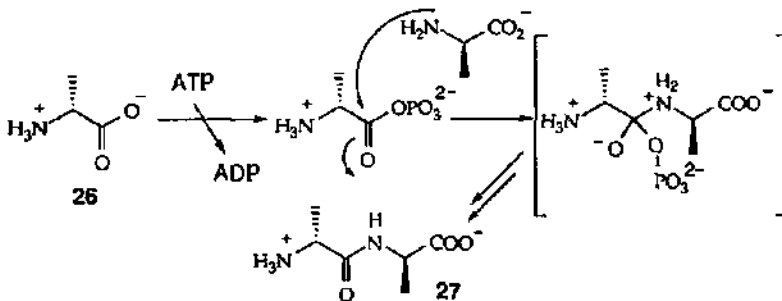
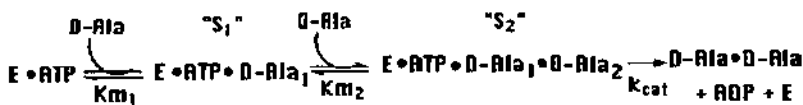


Figure 33: Réaction catalysée par la D-alanine-D-alanine ligase

L'aminocyl-D-Ala-D-Ala résultant est le point faible des bactéries sensibles aux antibiotiques glycopeptidiques comme la vancomycine qui en se fixant sur le dipeptide terminal interfère l'assemblage et la synthèse de la membrane bactérienne [96]. Cependant, une résistance à la vancomycine fut détectée à la fin des années quatre-vingt et celle-ci est associée à la présence d'une protéine qui présente une séquence d'acides aminés très similaire à celle de la D-alanine-D-alanine ligase [97]. Il semble donc que cette protéine soit encodée par un gène mutant de ceux encodant la D-alanine-D-alanine ligase. Il semble également que cette protéine puisse à partir de substrats non naturels former d'autres dipeptides qui ne favorisent pas la fixation de la vancomycine [97]. Ces remarques suffisent à imaginer le potentiel de recherche axé sur cette enzyme et il n'est pas étonnant de

savoir que parmi les nombreux efforts de recherche, des études cinétiques de cette enzyme ont été réalisées [98-102].

Cette enzyme présente bien des points en commun avec la porphobilinogène synthase, ce qui en fait un modèle d'enzyme étudiée intéressant pour nous. Elles sont toutes les deux des enzymes à deux substrats identiques qui forment en fin de réaction un seul produit. Les deux D-Ala se fixent dans deux sites de reconnaissance bien distincts et les constantes de Michaelis-Menten pour les deux sites ont été déterminées pour différentes souches [95-97,99], la constante  $K_{m1}$  du premier complexe enzyme-substrat étant de l'ordre de 100 à 1000 fois plus faible que la constante  $K_{m2}$  du second complexe. Le calcul des  $K_m$  a été effectué par Neuhaus [99] puis répété par Bugg [95]. Cette méthode de calcul est explicitée à la suite de ce chapitre. Ces valeurs sont cependant nettement plus éloignées l'une de l'autre que celles supposées pour la PBGS. Jaffe a déterminé par dialyse les constantes de dissociation des deux complexes enzyme-substrat de la PBGS issue de foie de bovin qui étaient de 3.8  $\mu\text{M}$  pour le site P et 242  $\mu\text{M}$  pour le site A [61]. Ces constantes de dissociation qui ne prennent pas en considération l'aspect cinétique, laissent toutefois penser que le facteur entre les  $K_m$  de la PBGS est moins important que celui pour la D-alanine-D-alanine ligase. La nécessité de l'ATP ne semble toutefois pas gêner la comparaison vu qu'aucun rôle cinétique dans les inhibitions n'a été attribué à l'ATP [103]. L'expression de la vitesse est donnée par la relation suivante:



$$K_{m1} = \frac{[E][D-Ala]}{[S_1]} \quad K_{m2} = \frac{[S_1][D-Ala]}{[S_2]} \quad v = \frac{dP}{dt} = k_{cat} \cdot [S_2] \text{ avec } k_{cat} \text{ petit}$$

$$[S_2] = \frac{V_{max}}{k_{cat}} - \frac{K_{m1} \cdot K_{m2} \cdot [S_2]}{[D-Ala]^2} - \frac{K_{m2} \cdot [S_2]}{[D-Ala]}$$

$$v = \frac{D_{max} \cdot [D-Ala]^2}{K_{m1} \cdot K_{m2} + K_{m2} \cdot [D-Ala] + [D-Ala]^2}$$

Schéma 5: Équation de la vitesse catalysée par la D-alanine-D-alanine ligase

En utilisant les mêmes approximations, on obtient pour la PBGS, le même type d'équation. R.Lüönd a mentionné dans sa thèse [38] que dans le cas spéciale de la formation d'une liaison covalente entre le substrat et l'enzyme, on peut éliminer le terme  $(K_{m1} \cdot K_{m2})$  et obtenir de cette manière une équation du premier ordre qui peut suivre une cinétique de Michaelis-Menten (schéma 6). Dans le cas de la PBGS, ce serait considérer la formation de la base de Schiff comme étant un pas irréversible et rapide.



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_{m2}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{K_{m1} \cdot K_{m2}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]^2}$$

relation parabolique

$$\left( \begin{array}{l} \text{Michaelis-} \\ \text{Menten: } v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \implies \frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \end{array} \right)$$

relation linéaire

$$[S] \cdot \left( \frac{1}{v} - \frac{1}{v_{\max}} \right) = \frac{K_{m2}}{v_{\max}} + \frac{K_{m1} \cdot K_{m2}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

$$[S] \cdot \left( \frac{1}{v} - \frac{1}{v_{\max}} \right) = r \left( \frac{1}{[S]} \right) \implies \text{Linéaire}$$

Schéma 8: Relation double réciproque d'une réaction enzymatique à deux substrats identiques

En traçant la dernière équation du schéma 8, on peut déterminer  $K_{m2}$  à partir de l'ordonnée et  $K_{m1}$  en combinaison avec  $K_{m2}$  à partir de la pente de cette droite. Pour avoir des résultats fiables de  $K_{m1}$  et  $K_{m2}$ , il faut calculer  $v_{\max}$  à partir de la relation double-réciproque parabolique. Pour des concentrations en substrat trop élevées, cette relation double réciproque est à première vue linéaire, il faut donc se placer dans une fourchette de concentrations où le terme  $1/[S]^2$  a une influence sur la valeur de  $1/v$ . Pour vérifier cette influence, nous avons calculé pour trois valeurs différentes de concentrations en substrat, l'influence du terme parabolique dans le cas de la D-alanine-D-alanine ligase (Annexe 1).

Suivant ces calculs, nous avons déduit qu'il faut se trouver dans un domaine de concentrations  $K_{m1}$ - $K_{m2}$ . Dans le cas de la PBGS, il faut se trouver selon cette théorie dans des concentrations en ALA allant du  $\mu\text{M}$  ( $K_{m1}$ ) aux environs de 50-80  $\mu\text{M}$  ( $K_{m2}$ ).

Des mesures ont donc été effectuées dans ce domaine de concentrations et les résultats sont résumés dans le tableau suivant (mode opératoire selon Chap. 8.2.2.):

Essai	[ALA] ( $\mu\text{M}$ )	ABS 1	ABS 2	v1	v2	Y1	Y2
1	3.97	0.025	0.020	0.096	0.077	40.20	50.41
2	7.95	0.060	0.0535	0.230	0.205	32.20	36.12
3	11.91	0.091	0.0855	0.349	0.328	30.63	32.41
4	15.89	0.124	0.1125	0.476	0.432	28.77	31.64
5	19.85	0.152	0.146	0.584	0.561	28.26	28.98
6	39.70	0.288	0.268	1.106	1.030	24.40	25.71
7	59.55	0.358	0.364	1.375	1.398	26.06	23.31
8	74.40	0.412	0.427	1.582	1.640	27.18	22.70

ABS (1,2) : mesure de l'absorbance à 554 nm

v(1,2) : Calcul de la vitesse selon formule schéma 23 (Chap. 4.1)

Y(1,2) = |ALA|. (1/v(1,2) - 1/vmax)

Tableau 3: Mesure de la vitesse et calcul de Y = [ALA]. (1/v - 1/vmax)

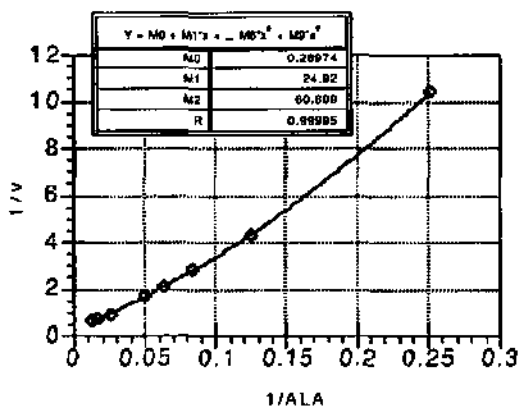


Figure 34: Relation double réciproque du second degré dans le cas de la PBCS (première série)

A partir de la courbe double-réciproque, on calcule le Vmax qui est égale à l'inverse du terme constant.

Première série: Vmax = 3.45  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 2<sup>ème</sup> série: Vmax = 3.09  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$

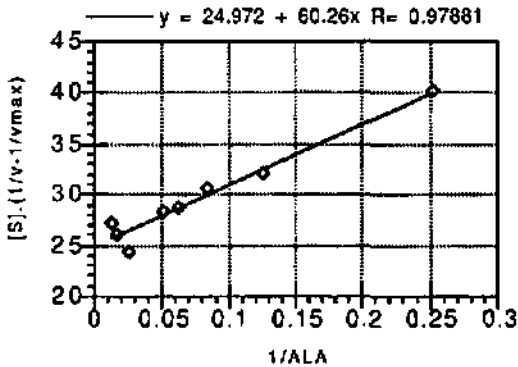


Figure 35: Relation [ALA].  $(1/v - 1/v_{max}) = f([ALA])$  dans le cas de la PBGS (première série)

Les valeurs de  $K_m$  calculées sont les suivantes:

Première série:  $K_{m2} = 86.15 \mu\text{M}$ ;  $K_{m1} = 2.43 \mu\text{M}$

Deuxième série:  $K_{m2} = 70.02 \mu\text{M}$ ;  $K_{m1} = 4.96 \mu\text{M}$

#### Vérification des valeurs de $K_{m1}$ et $K_{m2}$ par traitement statistique sur la première série

A la suite de cette première méthode de détermination des deux paramètres  $K_{m1}$  et  $K_{m2}$ , une méthode de régression non linéaire directement effectuée sur la courbe  $v = f([S])$  a été employée. Cette méthode (programme d'analyse statistique SAS utilisant des méthodes paramétriques ou non-paramétriques, univariées ou multivariées) détermine également l'erreur standard et l'intervalle de confiance à 95%. Ces résultats montrent que la méthode effectuée précédemment calcule une régression optimale pour calculer la valeur de l'inverse de la vitesse ( la courbe de régression non linéaire se confond avec celle calculée précédemment). Mais cette régression n'est par contre pas optimale pour la détermination de  $V_{max}$ . Les petits écarts sur l'inverse de la vitesse deviennent des grands écarts surtout sur les petites valeurs de la vitesse. Cette différence se retranscrit également sur la figure montrant la non superposition de la régression non linéaire avec la courbe calculée  $v = f([S])$  (voir annexe 2).

Les valeurs de  $K_m$  recalculées sont les suivantes:

$V_{max} = 3.05 \pm 0.29 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

Intervalle de confiance asymptotique à 95%: 2.32 - 3.79  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

$K_{m1} = 4.6 \pm 1.9 \mu\text{M}$

Intervalle de confiance asymptotique à 95%: -0.3 - 9.4  $\mu\text{M}$

$K_{m2} = 65.7 \pm 13.1 \mu\text{M}$

Intervalle de confiance asymptotique à 95%: 31.9 - 99.4  $\mu\text{M}$

On voit que les valeurs sont différentes de celles issues des premiers calculs. On obtient donc des valeurs raisonnables pour les deux valeurs de constantes. L'intervalle de confiance à 95% est extrêmement large et devrait se rétrécir en

mesurant une série d'échantillons plus large. Les valeurs obtenues pour la deuxième série ( $V_{max} = 4.42 \pm 0.22 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $K_{m1} = 2.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ;  $K_{m2} = 122.1 \pm 10.0 \mu\text{M}$ ) ont été estimées mais semble moins bonnes au vu des graphes.

Les valeurs retenues sont donc  $K_{m1} = 4.6 \pm 1.9 \mu\text{M}$  et  $K_{m2} = 66 \pm 13 \mu\text{M}$ .

Une comparaison des valeurs de la vitesse obtenues dans le domaine de concentrations en substrat du test d'inhibition, permettront de déterminer si l'équation de la cinétique du second ordre peut être simplifiée en une équation du type Michaelis-Menten.

<u>Equation de la cinétique</u>	ou	<u>Equation simplifiée</u>
$v = \frac{v_{max} \cdot [S]^2}{K_{m1} \cdot K_{m2} + K_{m2} \cdot [S] + [S]^2}$		$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_{m2} + [S]}$

Pour  $[S] = 80 \mu\text{M}$ :

$$v = \frac{v_{max} \cdot 80^2}{4.6 \cdot 66 + 66 \cdot 80 + 80^2}$$

$$= 0.5352 v_{max}$$

$$v = \frac{v_{max} \cdot 80}{66 + 80}$$

$$= 0.5498 v_{max}$$

12.5 % d'erreur

Pour  $[S] = 400 \mu\text{M}$ :

$$v = 0.8575 v_{max}$$

$$v = 0.8589 v_{max}$$

(0.17 % d'erreur)

**Schéma 9: Pourcentage d'erreur du à la simplification**

On estime donc que sur la plage de concentrations en substrat testée, on effectue une erreur allant de 2.5% pour la concentration la plus faible à 0.17% pour la concentration la plus élevée. Au vu de ces valeurs, on peut considérer que la cinétique observée suit l'équation simplifiée de Michaelis-Menten dans les conditions du test. On vérifie donc les suppositions de Granick, que l'on peut ainsi expliquer par les valeurs relatives de  $K_{m1}$  et  $K_{m2}$  la cinétique observée.

### 3.3. Types d'inhibitions rencontrés

Les enzymes sont inhibées spécifiquement par certains composés et ces composés, appelés inhibiteurs, peuvent intervenir naturellement dans les cellules pour réguler la vitesse de réactions métaboliques ou être artificiellement utilisés dans l'étude de mécanismes enzymatiques. Cette dernière approche est largement utilisée à des fins thérapeutiques et des molécules inhibitrices d'enzymes sont à la base de nombreux médicaments. Le design et le test d'un large éventail de composés permettent de déterminer la nature des acides aminés présents dans le site actif, responsables de la reconnaissance du substrat, et de faire ainsi une esquisse du site actif. C'est cette méthode que nous avons adopté pour mieux connaître le système de reconnaissance utilisé par la P8GS pour complexer ces

deux substrats [38,39]. L'action des inhibiteurs peut se faire à différents stades de la réaction enzymatique. Dans le cas d'une enzyme à deux substrats identiques comme la PBGS, le système d'inhibition peut alors devenir très vite complexe.

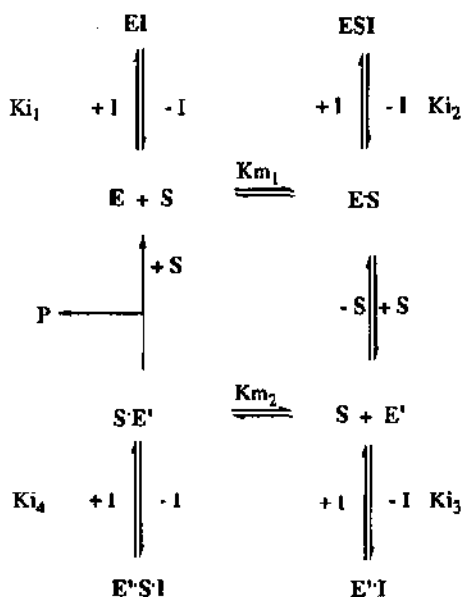


Schéma 10: Différentes possibilités d'inhibition

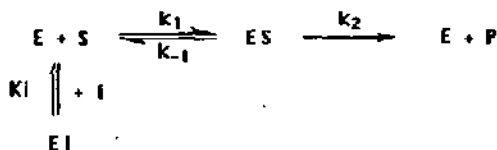
Ce schéma ne montre que quelques unes des inhibitions possibles, car il faut bien entendu compter en plus, les combinaisons d'interactions inhibiteur-enzyme et les inhibitions du type irréversible ou slow-binding.

Les inhibitions observées lors de nos études sur la PBGS sont au nombre de cinq (inhibitions compétitive, incompétitive, mixte, slow-binding et irréversible) et seront détaillées dans les lignes qui suivent.

La description du type d'inhibition se fera sur quelques points concrets comme l'analyse du comportement de l'inhibiteur, les conséquences pour la cinétique, des exemples et la caractérisation du potentiel inhibiteur du composé dans nos tests d'inhibition.

### 3.3.1. Inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif a une similarité structurale avec le substrat naturel de l'enzyme. C'est donc par cette similarité que l'enzyme lie "par erreur" cet analogue de substrat. Le substrat et l'inhibiteur sont donc en compétition car ils ne peuvent pas se lier en même temps au site actif (schéma 11). L'enzyme complexée avec l'inhibiteur ne peut plus fonctionner comme catalyseur puisque l'enzyme est bloquée par l'inhibiteur qu'elle ne peut pas convertir en produit.



## Schéma 11: Inhibition compétitive

L'addition d'un inhibiteur compétitif favorise la dissociation du complexe enzyme-substrat ES et augmente donc la valeur de la constante de Michaelis-Menten. L'inhibition compétitive dépend donc des concentrations en substrat et en inhibiteur mais surtout des affinités respectives de l'enzyme pour le substrat et l'inhibiteur [91]. La constante caractérisant l'inhibition est appelée constante d'inhibition  $K_i$ .

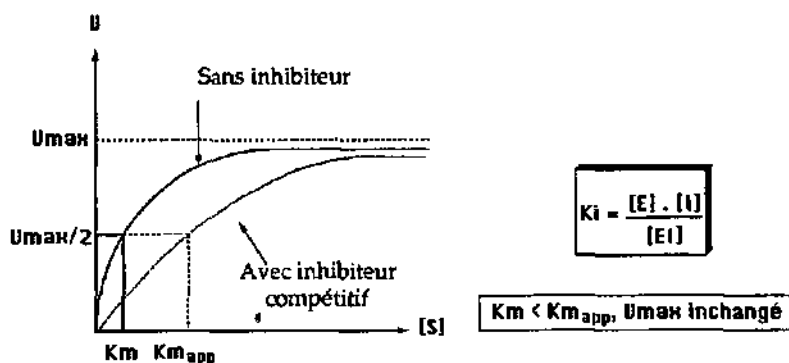


Figure 36: Influence d'un inhibiteur compétitif sur le graphique  $v=f([S])$

La visualisation du graphique représentant la vitesse en fonction de la concentration en substrat montre qu'à de fortes concentrations en substrat, l'effet de l'inhibiteur est négligeable et que la vitesse  $V_{max}$  reste inchangée (figure 36). Par contre, en calculant la valeur du  $K_m$  dit apparent ( $K_{mapp}$ ) à partir de  $V_{max}/2$ , on voit que la valeur de la nouvelle constante de Michaelis-Menten augmente. Ces deux tendances sont donc les caractéristiques d'une inhibition compétitive [104].

Le graphe de Lineweaver-Burk évolue selon la concentration en inhibiteur de la manière suivante:

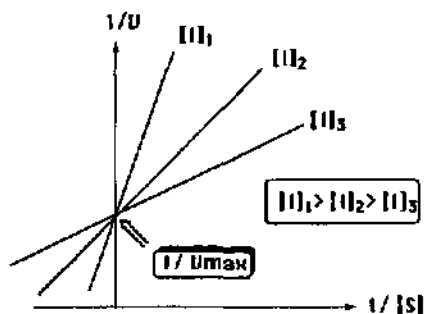


Figure 37: Influence de la concentration en inhibiteur compétitif sur le graphique de Lineweaver-Burk [104]

Reprenons l'exemple de la D-Alanine-D-alanine ligase pour illustrer cette inhibition. Outre la D-Cyclosérine qui semble être un bon inhibiteur compétitif (malheureusement toxique) [95,101], deux séries de composés ont été testées sur la D-Alanine-D-alanine ligase: les phosphonates et les phosphinates qui miment l'intermédiaire tétraédral [102] (figure 38).

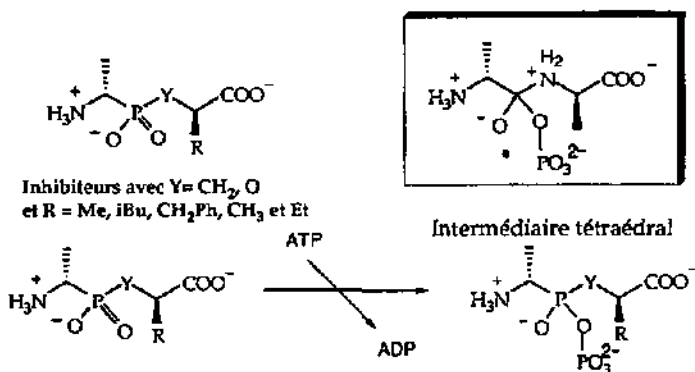
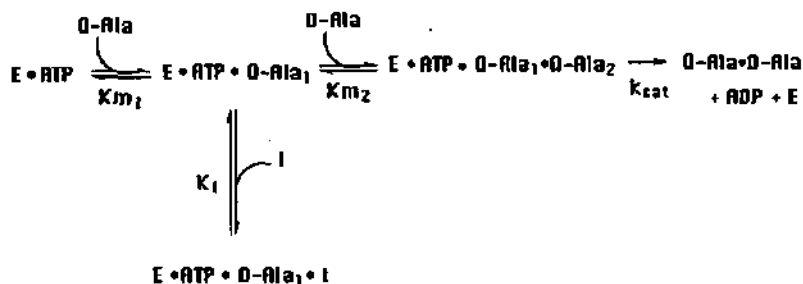


Figure 38: Inhibiteurs testés par Bartlett [102]

Il semble néanmoins pour ces produits que le degré d'inhibition augmente avec le temps, au fur et à mesure que le composé phosphonate ou phosphinate se convertisse en une espèce phosphorylée plus fortement fixée sur l'enzyme. Cette inactivation lente et réversible n'est pas surprenante vu que l'on a à faire avec des analogues d'intermédiaire (Chap 2.2.1., Chap. 3.3.4.) plutôt qu'à des analogues de substrat.

Néanmoins sur la phase dite réversible du processus d'inactivation (avant la phosphorylation), les calculs ont été effectués suivant le cas d'un inhibiteur en compétition avec le second substrat (schéma 12).

Pour ces deux séries de composés, Bartlett applique l'analyse de Dixon [105] en considérant des concentrations en substrat environ égales à Km<sub>2</sub>.



$$u = \frac{U_{\max} \cdot [\text{O-Ala}]^2}{K_{m_1} \cdot K_{m_2} + K_{m_2} \cdot [\text{O-Ala}] \cdot (1 + [I] / K_i) + [\text{O-Ala}]^2}$$

$$u = \frac{U_{\max} \cdot [\text{O-Ala}]}{K_{m_2} \cdot (1 + [I] / K_i) + [\text{O-Ala}]} = \frac{U_{\max} \cdot [\text{O-Ala}]}{K_{m_{app}} + [\text{O-Ala}]}$$

Pour  $[\text{O-Ala}] = K_{m_2}$   
et  $K_{m_1} \ll K_{m_2}$

Schéma 12: Analyse de l'inhibition compétitive avec le second substrat selon Bartlett [102]

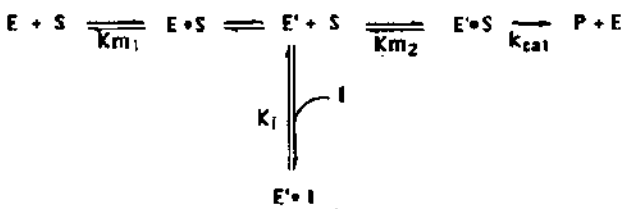
Il obtient l'équation simplifiée en négligeant le terme  $K_{m_1} \cdot K_{m_2}$  du dénominateur devant les autres termes puisque le facteur  $K_{m_1} / K_{m_2}$  est d'environ 1000 dans le cas présent. A la suite de cette analyse, il estime qu'ayant des inhibiteurs bi-substrats, il y a inévitablement inhibition dans le site du premier substrat, car d'une part, la composante phosphorylée est présente pour mimer la partie du premier substrat et d'autre part, il argumente en disant que des inhibiteurs dipeptidiques tels que les phosphonates et les phosphinates sont trop grands pour pouvoir insérer le site actif en présence du premier substrat. A la suite de ces commentaires, Bartlett a reconsidéré ces calculs en intégrant une inhibition compétitive touchant simultanément les deux sites.

Connaissant désormais la valeur de nos constantes de Michaelis-Menten pour les deux sites de fixation de l'ALA (1) sur la PBGS, nous pouvons également considérer le cas de l'inhibition compétitive avec le second substrat et uniquement avec celui-ci qui est le substrat le plus facile à déplacer pour un inhibiteur.

Pour avoir une équation du second degré qui se simplifie comme celle considérée pour la D-Alanine-D-alanine ligase, on peut calculer le pourcentage d'erreur que l'on obtient sur la vitesse en utilisant l'équation simplifiée (schéma 13).

Un test d'inhibition s'effectue en général pour des concentrations allant de 80 à 400  $\mu\text{M}$  en ALA et les valeurs de constantes obtenues sont de 4.6  $\mu\text{M}$  pour le premier complexe enzyme-substrat et de 65.7  $\mu\text{M}$  pour le second. Le calcul des pourcentages d'erreur sur la vitesse s'effectue de la même manière que celui de la

réaction non inhibée puisque l'on met le terme lié à l'inhibition égale à 1 (voir chap. 3.2.3.).



$$v = \frac{U_{max} \cdot [S]^2}{K_{m1} \cdot K_{m2} + K_{m2} \cdot [S] \cdot \underbrace{(1 + [I] / K_i)}_{\text{Valeur minimum de 1}} + [S]^2}$$

ou

$$v = \frac{U_{max} \cdot [S]}{K_{m2} \cdot (1 + [I] / K_i) + [S]}$$

Schéma 13: Validité de la simplification utilisée pour l'évaluation de l'inhibition compétitive.

On estime donc que sur la plage de concentrations en substrat testée, on effectue une erreur maximale allant de 2.5 % pour la concentration la plus faible à 0.17 % pour la concentration la plus élevée. Au vu de ces valeurs, nous considérons donc que les inhibiteurs compétitifs avec le second substrat suivent cette équation simplifiée et que l'on observe une constante de Michaelis-Menten apparente  $K_{m_{app}}$  dont on peut déduire le  $K_i$  (schéma 14). C'est ce que l'on appelle une inhibition linéaire, car la cinétique obéit toujours aux lois de Michaelis-Menten.

$$K_i = \frac{[I]}{[(K_{m_{app}}/K_{m2}) - 1]}$$

Schéma 14: Constante d'inhibition compétitive pure

**3.3.2. Inhibition incompétitive/mixte**

L'inhibiteur incompétitif lie généralement uniquement le complexe enzyme-substrat et ne se lie donc pas à l'enzyme libre. L'inhibition incompétitive peut se dérouler de deux manières: la fixation du substrat peut causer un changement conformationnel de l'enzyme et révéler ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur ou l'inhibiteur se fixe directement sur le complexe enzyme-substrat. Le schéma d'inhibition incompétitive le plus commun est donc celui où l'inhibiteur forme avec l'enzyme un complexe ESI, appelé "dead end complex" [104].



L'interprétation du comportement incompétitif observé dans le cas de la PBGS est nettement moins évident que le cas compétitif pur. On interprète ce phénomène par des interactions plus complexes qui se font dans les deux sites A et P. La base de Schiff formée par l'inhibiteur et la lysine est alors tout aussi stable sinon plus que la base de Schiff formée par le substrat et la lysine. Si on cherche l'équation de la vitesse de la réaction inhibée dans l'un ou/et l'autre site, on obtient une équation complexe présentant plusieurs constantes.



Expression de la vitesse:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^2}{K_{m1} \cdot K_{m2} \cdot (1 + [I]/K_{I(1)} + [I]^2/K_{I(3)} \cdot K_{I(1)}) + K_{m2} \cdot [S] \cdot (1 + [I]/K_{I(2)} + [I] \cdot K_{m1}/K_{I(4)} \cdot K_{I(1)}) + [S]^2}$$

Schéma 17: Expression de la vitesse pour une combinaison d'inhibitions dans les deux sites

La complexité de ce type d'équation ne permet plus de prévoir les tendances de  $K_{mapp}$  et de  $V_{max}$ . Par contre ce que l'on peut affirmer, c'est que le comportement incompétitif est lié à l'inhibition du site P, vu que les composés ayant des caractéristiques pour inhiber ce site provoquent une diminution du  $V_{max}$  et du  $K_{mapp}$ .

Une double inhibition des deux sites étant accompagnée de l'inhibition compétitive du seul site A, on rejoint en fait la remarque déjà faite plus haut qui dit que dans beaucoup de cas, on assimile l'inhibition incompétitive avec un cas limite d'inhibition mixte (composante compétitive + composante incompétitive).

Suivant l'inhibiteur (groupe stabilisateur de base de Schiff, groupe mieux reconnu dans site A que P...), le pourcentage d'inhibition compétitive pure varie permettant soit l'observation d'une inhibition compétitive-mixte, incompétitive-mixte ou incompétitive pure. Les graphes obtenus pour les cas intermédiaires mixtes sont du type suivant:

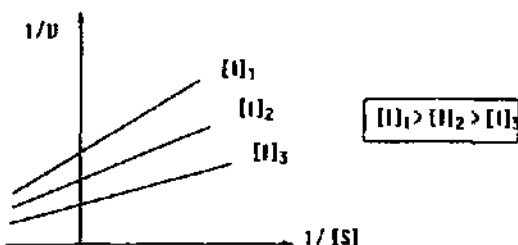


Figure 40: Inhibition mixte observée sur le graphique de Lineweaver-Burk

Si le point d'intersection s'effectue avant l'axe des abscisses, la composante compétitive prend le dessus ( $K_{ii} > K_{ic}$ ) et lorsque celui-ci se situe en dessous de l'axe des abscisses, c'est le cas inverse ( $K_{ii} < K_{ic}$ ).

Aucun exemple de ce type de comportement pour des cas d'aldolases ou d'enzyme à deux substrats identiques n'est connu.

N'ayant pas d'équation adéquate décrivant cette inhibition, on utilise l'équation générale de l'inhibition incompétitive pour calculer le  $K_i$  de l'inhibiteur.

$$K_i = \frac{[I]}{((K_m/K_{m_{app}}) - 1)}$$

Schéma 18: Constante d'inhibition incompétitive

Pour les inhibiteurs mixtes, on utilise suivant la tendance de leurs  $K_m$  l'équation décrivant l'inhibition compétitive ou incompétitive.

### 3.3.3. Inhibition irréversible

En fait, deux catégories distinctes d'inhibiteurs peuvent être décrites: les réversibles (compétitifs, non compétitifs, incompétitifs, mixtes) et les irréversibles. Un autre type d'inhibition appelée slow-binding dont le degré d'inhibition augmente avec le temps (semblable aux irréversibles), mais qui est réversible à long ou moyen terme sera décrit dans le sous-chapitre qui suit.

Les inhibiteurs réversibles lient l'enzyme par de faibles liaisons qui sont rapidement formées et facilement cassées. Ces liaisons sont similaires à celles qui fixent le substrat à l'enzyme. L'inhibiteur est ainsi en équilibre avec l'enzyme pour former un complexe enzyme-inhibiteur.

L'inhibiteur irréversible forme quant à lui, une liaison forte et le plus souvent covalente (schéma 19). La formation d'une liaison covalente demandant plus de temps que la mise en place de liaisons faibles, les inhibiteurs irréversibles sont en général plus lents à réagir [104].

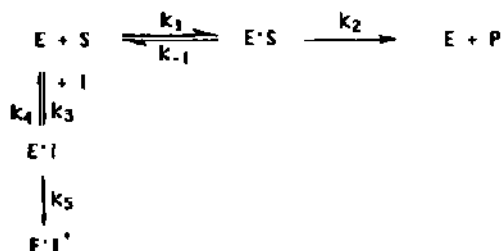


Schéma 19: Exemple d'inhibition irréversible

Cette dépendance du degré d'inhibition vis-à-vis du temps est la caractéristique qui permet de distinguer les irréversibles des réversibles. Ces composés réduisent la concentration en enzyme active, donc si l'inhibiteur n'est pas en excès, la concentration initiale en enzyme va passer de  $[E]_0$  à  $[E]_0 - [I]$  (valable si l'inhibiteur n'est pas en excès. La vitesse maximale va donc être ainsi réduite. Si on introduit ensuite le substrat, celui-ci va continuer d'obéir aux lois de Michaelis-Menten et

le  $K_m$  ne va pas être modifié [104]. Il est noté que dans le cas de la PBGS, on a pu observer notamment pour les composés céto-diacides une diminution du  $K_m$  en même temps que celle du  $V_{max}$ , certainement engendrée par la complexité des interactions mises en jeu. Ces irréversibles céto-diacides qui sont en fait des forts slow-binder, interagissent au même endroit que les inhibiteurs incompétitifs, c'est-à-dire, qu'il y a dans tous ces cas, formation d'une base de Schiff entre l'inhibiteur et l'enzyme. La diminution du  $K_m$  peut être perçue ici comme l'héritage des inhibiteurs incompétitifs aux irréversibles, puisque ceux-ci sont en fait des inhibiteurs incompétitifs plus stables.

M. Henz [39] a testé lors de son travail de thèse des époxydes énantiomériquement purs qui ont inactivé irréversiblement l'enzyme, la dialyse n'ayant pas pu régénérer l'activité de celle-ci (figure 41).

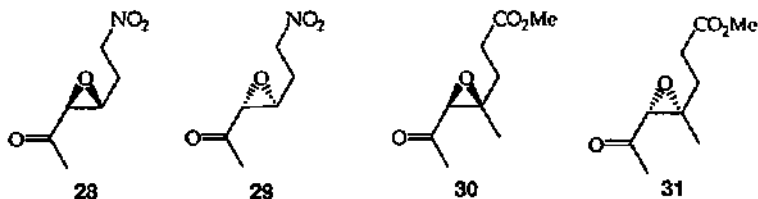


Figure 41: Epoxydes irréversibles testés par M. Henz [39]

Il a proposé différentes alternatives d'ouverture de l'époxyde, l'attaque nucléophile permettant la formation de la liaison covalente pouvant provenir du site A ou du site P (figure 42).

Des essais d'analyse MS ainsi que MALDI-TOF ont été réalisés sur l'enzyme après incorporation de l'époxyde 30 par le groupe de Jaffe. Les résultats ont montré une alkylation au niveau de plusieurs sites. En effet, l'analyse MALDI-TOF semble indiquer une augmentation de masse équivalente à cinq molécules par sous-unité [106]. De nouveaux essais, présentant des concentrations en inhibiteur plus faibles sont envisagés.

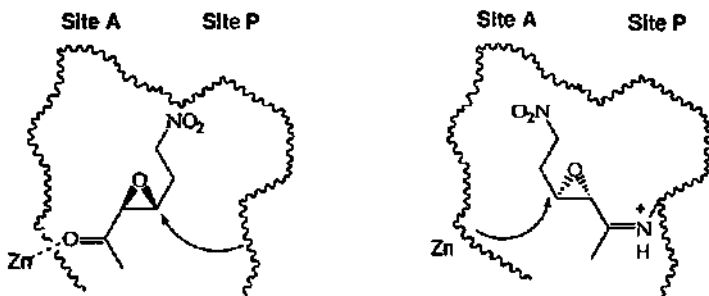


Figure 42: Inhibition irréversible de la PBGS par l'époxyde 28 [39]

Dans une récente publication [107], Leeper propose également l'inactivation de la PBGS par la fixation d'un époxyde 32 à la suite d'une attaque nucléophile (figure 43). Cependant, en suivant l'inactivation par ESMS, il a observé l'augmentation

d'un pic de masse supérieure de 95 Da par rapport à celle de l'enzyme (enzyme + 32 · 2 H<sub>2</sub>O). Il propose à la suite de cette observation, un mécanisme d'inactivation qui passe par la double fixation du même époxyde.

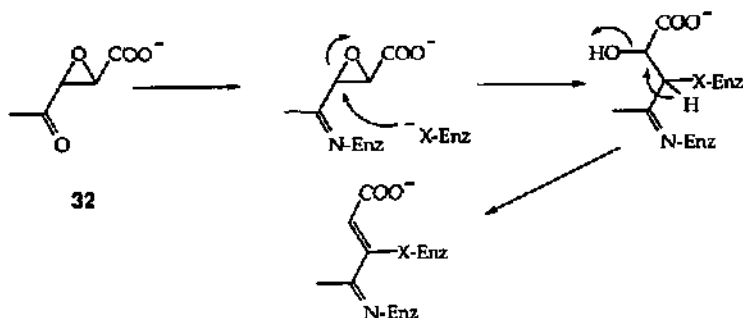


Figure 43: Inactivation par un époxyde suivant les observations de Leeper [107]

Les inhibiteurs irréversibles seront caractérisés par le pourcentage d'activité de l'enzyme en fonction du temps ainsi que par le pourcentage d'activité avant et après dialyse (toutes ces valeurs étant valables pour une concentration donnée).

### 3.3.4. Le cas *slow-binder*

Il y a déjà plus de cinquante ans que Easson et Stedman [108] ont fait mention pour la première fois d'un type d'inhibiteurs qui n'obéissait pas aux lois de cinétique déjà définies pour les inhibiteurs réversibles (Chap. 3.3.1. et 3.3.2.). La cinétique de ces inhibiteurs a d'abord été analysée par Morrison [109], puis par Cha [110]. Normalement, une dépendance de l'inhibition en fonction du temps est attendue pour les inhibiteurs irréversibles comme les agents alkylants de groupes spécifiques ou les inhibiteurs provoquant l'inactivation d'enzymes. Dans ces cas précis, la dépendance en fonction du temps est due à une lente modification chimique de l'enzyme et à la formation d'une liaison covalente. Cependant des cas d'inhibition dépendant du temps pour des inhibiteurs réversibles ont été observés.

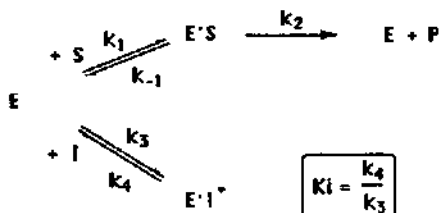
Une définition de ces inhibiteurs fut donnée par Morrison et Walsh: "*Such compounds have been called slow-binding inhibitors to convey the idea that binding, which is the establishment of the equilibria between enzyme, inhibitor, and enzyme-inhibitor complexes, occurs slowly on the steady-state time scale of seconds to minutes*" [111]. Pour donner un ordre de grandeur, les vitesses nécessaires pour atteindre l'équilibre entre le substrat et l'enzyme dans le cas d'inhibiteurs réversibles classiques sont données en millisecondes. C'est pour cette raison que Morrison [112] choisit le terme de "slow-binding" pour définir cette inhibition atypique.

Schématiquement, l'inhibition *slow-binding* peut être décrite selon deux mécanismes [111] (schéma 20). Cette inhibition peut avoir lieu à cause de la très faible valeur de la constante  $k_3$  (mécanisme A) qui peut être diminuée par les barrières rencontrées par l'inhibiteur pour se fixer dans le site actif.

Le mécanisme B décrit la formation rapide d'un premier complexe qui évolue ensuite par une lente isomérisation à un deuxième complexe.

Il ne faut pas dans ce cas seulement avoir une lente conversion de EI en EI\*, mais il faut aussi que la vitesse d'isomérisation inverse soit bien inférieure ( $k_6$ ) à la vitesse d'isomérisation ( $k_5$ ). Il est à noter que dans les situations extrêmes telles que  $k_4 \ll k_3$  ou  $k_6$  qui tend vers zéro, la réaction va apparaître comme étant irréversible et l'inhibiteur *slow-binder* va devenir un inhibiteur *active-site-directed* irréversible [111].

### Mécanisme A:



### Mécanisme B:

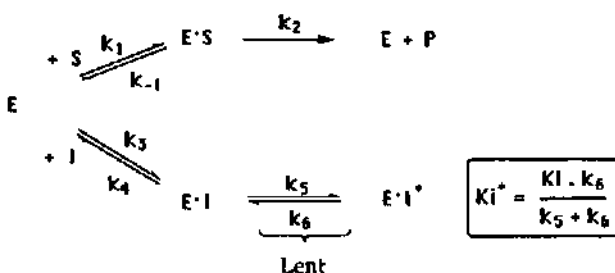


Schéma 20: Inhibition *slow-binding*: deux mécanismes possibles [111]

Pour illustrer graphiquement l'inhibition *slow-binding*, on peut comparer les effets d'un inhibiteur classique par rapport à un inhibiteur *slow-binder* sur la formation du produit en fonction du temps (figure 44). Pour un inhibiteur classique, la vitesse de réaction reste linéaire sur une période pendant laquelle il y a suffisamment de substrat. Pendant les premières millisecondes, les courbes décrivant la vitesse de réaction en présence d'un inhibiteur *slow-binder* est identique à celle décrivant l'interaction entre le substrat et l'enzyme. Il y a donc au départ une formation de produit quasi-identique à celle de la réaction enzymatique normale. Cette période est suivie par une étape où une vitesse d'état quasi-stationnaire plus lente s'installe. Celle-ci diminue quand la concentration en inhibiteur augmente [111]. Les mêmes remarques concernant les irréversibles sur la variation des caractéristiques  $K_m$  et  $V_{max}$  peuvent être faites pour les *slow-binder*.

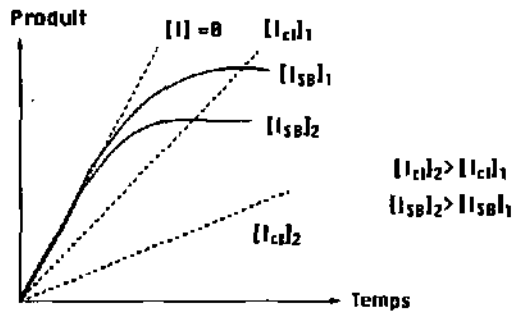


Figure 44: Effet de l'inhibiteur slow-binder sur la vitesse [111]

A la suite de différentes études utilisant des analogues d'intermédiaires [113], l'inhibition slow-binding fut assez souvent rencontrée. Ces analogues sont en général de très bons inhibiteurs qui sont très fortement liés à l'enzyme. Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer le slow-binding et plus spécifiquement, celui lié aux analogues d'intermédiaires. D'une part, les inhibiteurs pouvant se lier fortement à l'enzyme possèdent généralement plusieurs groupes de fixation qui sont combinés de telle manière à obtenir une inhibition optimale. Ces différentes interactions se mettent en place pas par pas et avec ajustement du site actif ce qui provoque un délai supplémentaire au temps nécessaire à l'inhibiteur pour se fixer. Certains groupes de fixation peuvent également interagir plus rapidement que d'autres et former ainsi un complexe non optimal qui doit ensuite évoluer lentement vers le complexe final (mécanisme B). Il est également à souligner que dans le cas d'inhibition par des analogues d'intermédiaires, l'enzyme n'est pas naturellement préparée à lier rapidement une molécule ressemblant à un intermédiaire, même si celle-ci présente une grande affinité pour ces composés. L'enzyme est programmée pour fixer rapidement le substrat et les interactions stabilisant l'état de transition sont souvent dues à des transformations topologiques complexes incluant des ajustements induits. Ces changements conformationnels enveloppent quelques fois complètement le complexe qui peut même être inaccessible à une molécule d'eau [114].

Le groupe de Périé a identifié des composés  $\beta$ -dicarbonylés et  $\alpha$ -hydroxycétone comme étant des inhibiteurs slow-binder de l'aldolase issue de muscle de lapin (figure 45) [115,116]. Cette enzyme fait partie de la classe I des aldolases [25], c'est-à-dire qu'elle fonctionne par l'intermédiaire d'une base de Schiff alors que la classe II ne nécessite que l'apport d'un ion métallique [117]. Par la présence d'une lysine dans son site actif, ce type d'enzyme est très intéressant pour nous, de même que les composés qui l'inactivent [25]. En effet, des résultats d'inhibition portant sur des composés  $\beta$ -dicétones seront développés plus tard (Chap 5.3.).

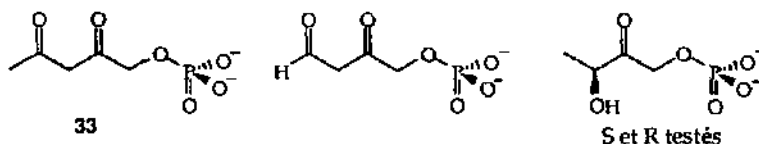


Figure 45: Inhibiteurs slow-binder de l'aldolase de muscle de lapin [25,115]

Le mécanisme d'inhibition (figure 46) passe par la formation d'une base de Schiff, suivie d'une déprotonation en  $\alpha$  et la formation d'une énamine stable. Le mécanisme proposé par Blonski passait d'abord par la formation d'un énol avant l'énamine mais la formation directe d'énamine nous semble plus probable.

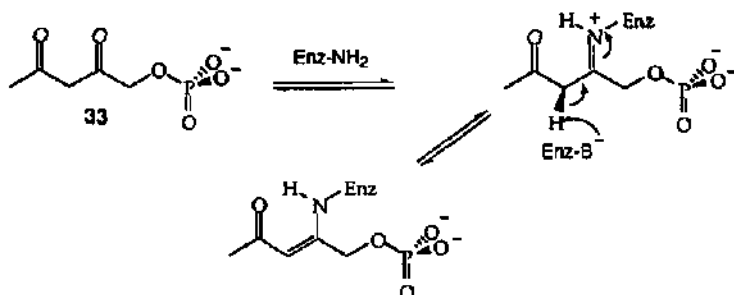


Figure 46: Mécanisme d'inhibition slow-binding de l'aldolase de muscle de lapin selon Blonsky (modifié)[115]

Selon les expressions des  $K_i$  (schéma 20), on voit qu'il faut être en mesure de calculer les valeurs des constantes d'isomérisation ( $k_3, k_5$ ) et d'isomérisation inverse ( $k_4$  et  $k_6$ ). Il faut donc être capable de déplacer l'équilibre de la réaction dans le sens inverse et pouvoir suivre le retour d'activité dans des conditions acceptables. Quelques essais de retour d'activité ont été effectués dans la cas de la PBGS et ceux-ci n'ont pour l'instant pas abouti à une méthode fiable (Chap. 7.2).

Les inhibiteurs slow-binder seront donc caractérisés par le pourcentage d'activité de l'enzyme en fonction du temps ainsi que par le pourcentage d'activité avant et après dialyse (toutes ces valeurs étant valables pour une concentration donnée).

### 3.4. Littérature existante

#### 3.4.1. Inhibition de la PBGS par la Succinyle acétone et ses dérivés

Le groupe de Lindblad [16] a isolé dans les années soixante-dix, à partir des urines de patients atteints de tyrosinémie (Chap. 1.1.2.2.), des produits issus de la dégradation anormale de la tyrosine, l'acide 4,6-dioxo-heptanoïque ou succinyle acétone (11) et l'acide 3,5-dioxo-octane-1,8-dioïque (10) (figure 4).

De plus, il a pu remarquer la présence importante d'ALA et la réduction importante de l'activité de la porphobilinogène synthase (<5 %). Ces observations ont permis à Lindblad de conclure que ces deux dicétones pourraient être des inhibiteurs potentiels de la PBGS.

Des travaux allant dans cette direction ont été entrepris un peu plus tard par Ebert et Tschudy [118]. Ils ont étudié l'action de la succinyle acétone sur des cellules érythroleucémiques *in vivo* et *in vitro*. Ils ont montré que pour de très faibles concentrations en succinyle acétone ( $10^{-8}$  M), on peut observer une inhibition significative de la PBGS. En parallèle avec l'inhibition de la PBGS, une diminution importante de la quantité d'hémoglobine et un enrichissement en ALA ont été observés. Les cellules commencent à mourir quand la concentration en hème descend en dessous de 10 pmol/mg de protéine.

A la suite de ces travaux, Tschudy étudia l'enzyme issue de foie de rat [119]. Celle-ci démontra une inhibition de type irréversible en présence de succinyle acétone.

L'activité de l'enzyme n'a pas pu être régénérée par dialyse et il a été démontré que cette inhibition irréversible a lieu dans le site actif même. En étudiant l'incorporation de substrat marqué en présence ou non d'inhibiteur, il a pu mettre en évidence la compétition entre le substrat et l'inhibiteur. Ceci suggère que l'inhibiteur réagit dans le site où se forme la base de Schiff entre le premier substrat et l'enzyme.

Des observations similaires ont été faites par Meller et Cassman [120]. Ils ont isolé la PBGS à partir de feuilles d'orge séchées et ont testé l'action de la succinyle acétone mais également celle de l'acide lévulinique *in vivo* et *in vitro*. Ils ont trouvé que la succinyle acétone inhibait la PBGS d'un facteur mille fois plus grand que l'acide lévulinique.

Des études d'inhibition datant de la même période ont également été conduites par Brumm et Friedman sur la PBGS isolée à partir de *Clostridium tetanomorphum* [121]. Ils ont déterminé en fonction de la concentration de succinyle acétone mis en jeu, deux constantes d'inhibition car ils estiment que suivant la concentration en succinyle acétone, ils sont en présence de un ou deux inhibiteurs. Pour les études d'inhibition effectuées à haute concentration en succinyle acétone (5 mM) et en présence de plus faibles concentrations d'ALA (1) ([ALA] = 0.5 mM), ils ont observé une inhibition compétitive ( $K_i = 400 \mu\text{M}$ ). Ils en ont donc déduit que la succinyle acétone décrit une inhibition compétitive. Par contre pour des inhibitions se déroulant à des concentrations en ALA et succinyle acétone similaires et plus élevées, ils ont obtenu une inhibition plus importante. A la suite de ce résultat inattendu, ils ont proposé la formation d'un produit de condensation type Knorr entre l'ALA et la succinyle acétone qui semble être un inhibiteur plus puissant que la succinyle acétone elle-même ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ). Ils ont déterminé les constantes d'inhibition en faisant des corrections graphiques car l'essai à blanc présentait selon eux déjà ce pyrrole inattendu appelé SA-pyrrole (34) (figure 47) qui réagit avec le réactif de Ehrlich puisque la position  $\alpha$  du pyrrole est libre. Cette correction n'est pas clairement décrite par les auteurs. De plus, la synthèse du pyrrole à partir 11 et 1 a été effectuée dans nos laboratoires et la formation de quatre différents pyrroles (2 produits Knorr majoritaires et 2 produits Fischer-Fink) a été démontrée [84]. Par ailleurs si ce produit se forme, il devrait, dans les conditions du test, précipiter. Les auteurs ont également attribué l'activité inhibitrice du SA-pyrrole (34) comme étant due à une ressemblance avec le substrat plutôt qu'avec le produit. Ils fondent ce raisonnement sur deux points: d'une part, le PBG n'inhibe pas la PBGS isolée de *Clostridium tetanomorphum*, et d'autre part beaucoup d'analogues de substrat contenant cette partie succinyle dans leurs structures sont de très bons inhibiteurs.

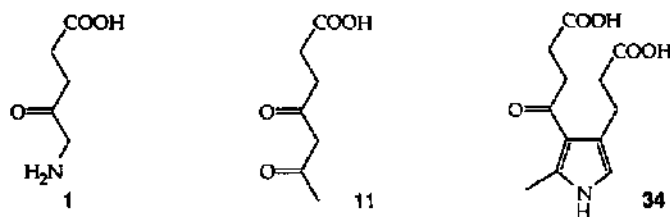


Figure 47: ALA (1), succinyle acétone (11) et SA-pyrrole (34)

Shoolingin-Jordan et son groupe ont écrit la publication la plus récente portant sur l'inhibition de la PBGS par la succinyle acétone [68]. Ils ont montré que la

succinyle acétone inhibait la PBGS issue de *Pisum sativum* (petits pois,  $K_i = 0.3 \mu\text{M}$ ) d'un facteur de 2 à 3000 fois plus élevé comparé à celle issue de *E. coli* ( $K_i = 0.8 \text{ mM}$ ). De plus, ils ont synthétisé et testé le 5A-pyrrole (34) décrit par Brumm [121] et n'ont trouvé aucun effet d'inhibition sur les trois sources de PBGS testés. Ils en ont donc conclu que l'inhibition ne provient que de l'action inhibitrice de la succinyle acétone et non pas d'un produit secondaire formé.

### 3.4.2. Inhibition de la PBGS par des composés diacides

Les analogues d'intermédiaires basés sur des diacides ont été en général très peu étudiés et seul, le groupe de P.M. Shoolingin-Jordan a publié des travaux concernant une série de diacides [68]. Il a étudié simultanément ces composés sur trois sources différentes d'enzyme: *Pisum sativum* (petits pois) *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* (levure). Ces trois enzymes entrent dans les deux catégories de PBGS, celles dépendant de magnésium (*Pisum sativum*) et celles dépendant de zinc (*Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*). Des inhibiteurs déjà connus ont été retestés afin d'avoir des comparaisons significatives entre les différences sources et les tests entrepris antérieurement. L'acide succinique (35) n'a donné qu'une inhibition faible ( $K_i$  supérieur à  $20'000 \mu\text{M}$ ) et son dérivé 2,2-difluoré (36) inhibe modérément de façon compétitive l'enzyme ( $K_i = 7'000 \mu\text{M}$ ) (figure 48). Des dérivés méthylés de l'acide glutarique 37 et adipique 38 et 39 ont également été testés et se sont révélés être des inhibiteurs compétitifs moyens. Par contre, il a observé que de passer d'un intermédiaire en  $C_5$  à un intermédiaire en  $C_{10}$ , l'acide 2,2,7,7-tétraméthyl-sébacique (40), fait basculer l'inhibition de compétitive à non-compétitive.

Shoolingin-Jordan en déduit que les diacides inhibent de façon non spécifique l'enzyme en ce liant aux régions hydrophobiques de celle-ci et ils interprètent le comportement compétitif des autres diacides par une interaction simultanée dans les deux sites de reconnaissance A et P.

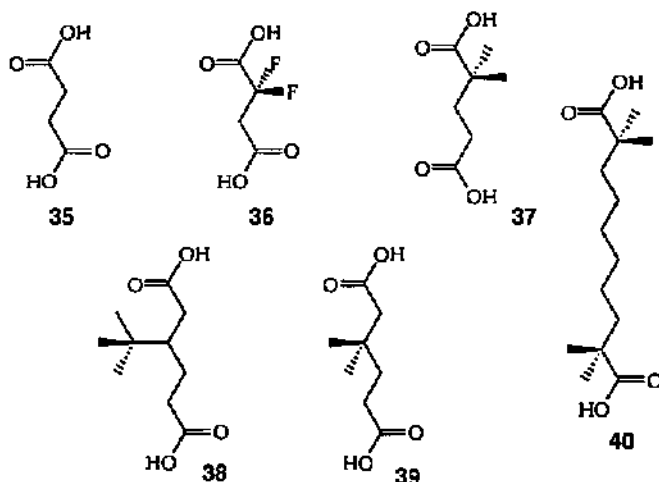


Figure 48: Diacides testés par le groupe de Shoolingin-Jordan [68].

Dans un autre article [122], ce groupe fait également référence à un autre diacide qu'ils ont testé: l'acide 3-acétyl-4-oxo-heptane-1,7-dioïque (*rac-41*) (figure 49). Celui-ci pourrait mimer l'intermédiaire de Shemin et ils ont observé une inhibition dépendante du temps par la formation d'un complexe stable.

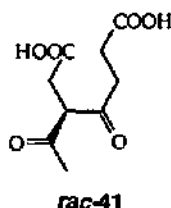


Figure 49: Analogue d'intermédiaire testé comme inhibiteur dans le groupe de Shoalingin-Jordan [122].

La publication de Leeper [107] la plus récente est la première publication où un composé a été synthétisé dans le but d'imiter l'intermédiaire décrit dans la première proposition mécanistique de Jordan [23] (figure 50). Ce diacide *rac-42* mime parfaitement, à l'exception d'un groupe amino manquant, cet intermédiaire mais aucune inhibition n'a été détectée sur l'enzyme issue de *Bacillus subtilis*.

Cet analogue, exempt de tout groupe amino, a ensuite été testé sur la PBGS issue de foie de bovin pour laquelle la présence d'un groupe amino en position C<sub>5</sub> de l'ALA n'est pas primordiale pour la reconnaissance ( $K_m = K_i$  acide lévulinique = 0.22 mM). Une inhibition fut cette fois-ci visible ( $K_i = 5$  mM) mais correspondait à une inhibition vingt fois moins intense que celle provoquée par l'acide lévulinique.

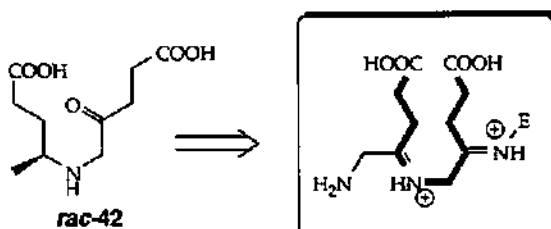


Figure 50: Analogue de l'intermédiaire postulé par Jordan testé comme inhibiteur [107].

### 3.4.3. Inhibitions de la PBGS par des composés fluorés

Jusqu'à présent, peu d'articles faisant référence à des inhibiteurs fluorés ont été publiés. A part les travaux de Jordan [68] mentionnant le dérivé difluoré de l'acide succinique 38 qui semble être un inhibiteur compétitif moyen ( $K_i = 7'000$   $\mu\text{M}$ ) de la PBGS, deux publications de Leeper abordent le sujet des dérivés fluorés de l'ALA [107,123]. Dans une première publication [123], il développe la synthèse de l'acide 5-amino-2-fluoro-lévulinique (*rac-43*). Ce composé a été synthétisé avec l'idée d'obtenir une inhibition irréversible (figure 51). En effet, l'élimination du

fluor engendrerait la formation d'un bon accepteur de Michael qui serait très sensible aux attaques d'un résidu nucléophile de l'enzyme.

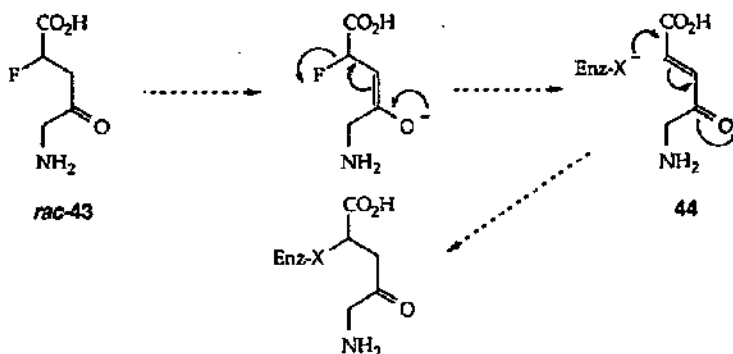


Figure 51: Inactivation envisagée par Leeper [123]

Les résultats préliminaires de l'inhibition de *rac*-43 sur la PBGS issue de l'algue *Euglena gracilis* n'ont pas confirmé cette hypothèse. Le composé montre une bonne inhibition (0.5 - 2 mM) qui est dans l'ordre de grandeur du  $K_m$  de cette espèce de PBGS mais ne montre aucune caractéristique d'irréversibilité ou de substrat non naturel.

Récemment, d'autres travaux de Leeper [107] portant sur l'inhibition de la PBGS ont été publiés. La PBGS utilisée dans cette étude est issue de *B. subtilis* dont le gène a été exprimé dans *E. coli* ( $K_m = 290 \mu M$ ). Leeper teste à nouveau le composé *rac*-43 sur cette nouvelle espèce d'enzyme et a conclu à sa non-stabilité dans les conditions du test. Lors de l'ajustement du pH à 9, une coloration jaune apparaît immédiatement. Leeper interprète cette coloration comme un départ spontanée de HF qui pourrait donner lieu à la formation du 2,3-déhydro-ALA (44). Dans des conditions de pH plus bas (pH = 5.4), une légère inactivation a tout de même pu être détectée. Cette inactivation ne semble se manifester qu'après une certaine période de temps qui pourrait concorder avec la formation ultérieure d'un produit secondaire inactivant l'enzyme. Leeper n'a pas pu déterminer si l'inactivation provenait de *rac*-43 ou d'un produit secondaire formé au cours du test. L'acide-(2,3-déhydro)-lévulinique a été testé ultérieurement dans notre groupe [39] et celui-ci n'avait présenté alors aucune propriété inhibitrice: la non rotation entre les carbonés 2 et 3 semble en faire un très mauvais inhibiteur.

### 3.5. Test d'inhibition

#### 3.5.1. Procédure

Quarante-huit tubes contenant des solutions de concentrations en inhibiteur et/ou en substrat différentes sont nécessaires pour pouvoir faire une étude cinétique. Les concentrations en substrat restent fixes d'un test à l'autre (79.5 à 397.0  $\mu M$ ).

La concentration en inhibiteur est estimée lors d'un préessai et est choisie de telle manière que la baisse d'absorbance soit visible sans être trop importante.

L'inhibiteur est tout d'abord préincubé en présence d'enzyme dans un tampon phosphaté à pH=8.0. Ce tampon à 0.1 M en phosphate et diphosphate contient 10  $\mu$ M de Zn(II) et 10 mM de Mg(II). Pour la stabilité de l'enzyme et afin d'éviter la formation de ponts disulfides, on additionne également 12.3 mM de mercaptoéthanol.

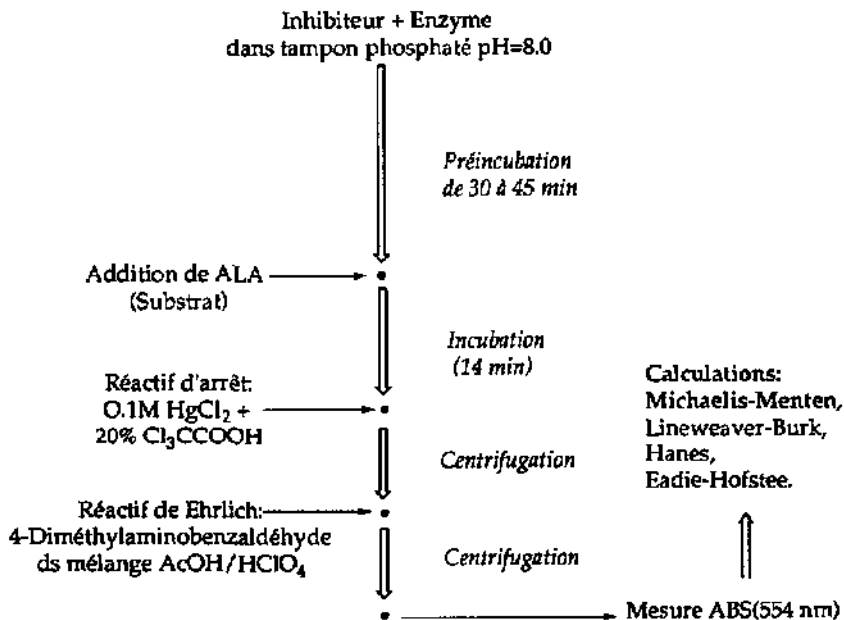


Schéma 21: Test d'inhibition

La préincubation se déroule dans un bain thermostaté à 37°C et le temps de préincubation est d'environ 30 à 45 minutes. Une quantité variable du substrat naturel ALA est ensuite additionnée puis chaque tube est incubé pour un temps déterminé et fixe de 14 minutes. La réaction enzymatique est stoppée par l'addition d'une solution d'acide trichloro-acétique contenant du chlorure mercurique. Les sels de mercure permettent ainsi de faire précipiter le mercaptoéthanol. La solution résultante est centrifugée puis un volume de surnageant est additionné à un volume de réactif de Ehrlich.

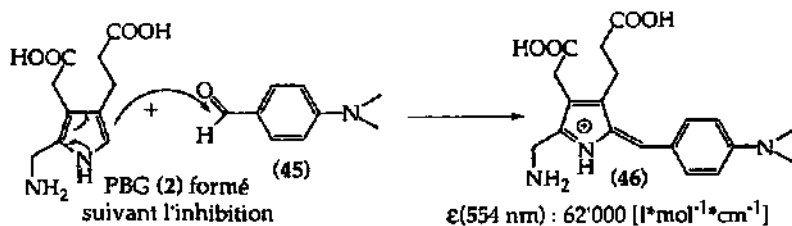


Figure 52: Réaction avec le réactif d'Ehrlich

Après une seconde centrifugation, on peut mesurer l'absorbance à 554 nm du complexe résultant de l'attaque de l'amine du 4-diméthyl-amino-benzaldéhyde (46) sur la position libre en  $\alpha$  du pyrrole (figure 52).

Le chromophore 46 obtenu (solution de couleur rose) a un coefficient d'absorption de  $62'000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 554 nm. Le spectre visible de ce complexe présentent en fait deux maxima, l'un à 524 nm, l'autre à 554 nm et c'est ce dernier qui est utilisé pour la détermination de la quantité de PBC. Des études de stabilité de ce chromophore ont montré qu'un délai de 10 minutes est optimal et qu'au delà de ce temps, la reproductibilité est plus délicate à obtenir.

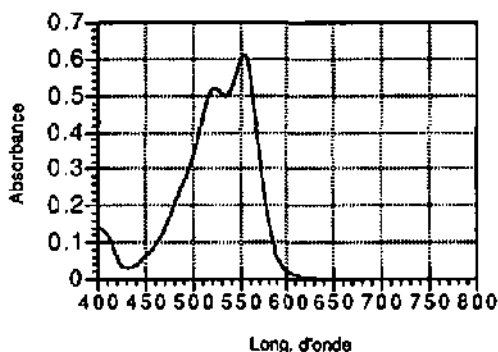


Figure 53: Spectre visible observé ( $\epsilon = 62'000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 554 nm)

A partir des résultats d'absorbance, on peut calculer la quantité de produit formé et par conséquent la vitesse de réaction. Ces données sont retranscrites graphiquement par les différentes méthodes à disposition (Chap. 3.1.2.) et les valeurs de  $K_i$  et  $V_{\text{max}}$  sont déduites par les relations d'inhibition correspondantes.

### 3.5.2. Préparation de la solution d'inhibiteur

Une quantité d'inhibiteur appropriée est dissoute dans 10 ou 20 ml de tampon phosphaté pH=8.0. Le problème qui peut se poser suivant la polarité des substances, est la solubilité de celles-ci dans le tampon. M. Henz a testé le comportement de la PBGS en présence des différents solvants miscibles à l'eau: dioxane, acétonitrile, diméthylformamide et diméthylsulfoxyde [39]. Pour une teneur en dioxane de 1.6%, il a observé une diminution de 15% de l'activité. L'acétonitrile semble au contraire activé la PBGS et c'est le DMSO et le DMF qui semblent être les cosolvants les plus pratiques, avec aucune influence sur l'activité jusqu'à une teneur de 1.3%. La méthode suivie est donc la dissolution dans un minimum de DMSO du produit puis addition du tampon. On calcule ensuite par rapport au volume maximal de solution d'inhibiteur prélevée et le volume de l'essai, le pourcentage de DMSO présent et s'il n'excède pas 1.3%, le test est poursuivi.

## 4. Résultats des tests d'inhibition

### 4.1. Exploitations des résultats d'inhibition

Les méthodes de calcul choisies sont les méthodes de Michaelis-Menten et ses dérivées déjà citées précédemment (Chap. 3.1.2).

Lineweaver-Burk (1)	Hanes (2)
$\frac{1}{U} = \frac{K_m}{U_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{U_{\max}}$	$\frac{[S]}{U} = \frac{[S]}{U_{\max}} + \frac{K_m}{U_{\max}}$
Eadie-Hofstee (3)	Michaelis-Menten (4)
$U = U_{\max} - \frac{U}{[S]} \cdot K_m$	$U = \frac{U_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$

Schéma 22: Méthodes de calcul

Les graphes dérivés de l'équation de Michaelis-Menten servent principalement à déterminer le type d'inhibition que l'enzyme subit. La valeur de la constante d'inhibition est donnée à partir de la moyenne des constantes calculées pour trois concentrations différentes en inhibiteur par la méthode de Michaelis-Menten (4).

La vitesse est donnée par la relation suivante:

$$U = \frac{dP}{dt} = \frac{n \cdot ABS \cdot l B^6}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

$l = 1 \text{ cm}$   
 $\epsilon = 62\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 $t = 14 \text{ min}$   
 ABS = Absorbance (554 nm)  
 n (facteur de dilution) = 3.33

Schéma 23: Expression de la vitesse

Les types d'inhibition sont donc différenciés suivant les variations des deux caractéristiques  $V_{\max}$  et  $K_m$  en fonction de la concentration en inhibiteur et la variation de l'inhibition suivant le temps.

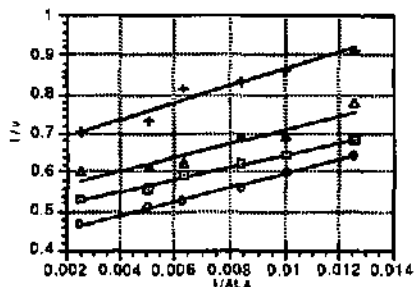
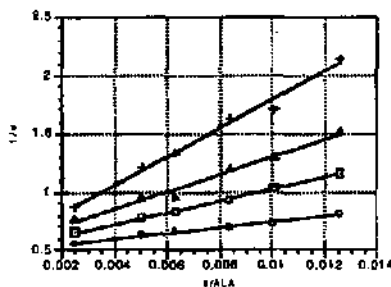
#### 4.1.1. Inhibition réversible:

On différencie nettement un cas compétitif d'un cas incompétitif en comparant les variations des grandeurs caractéristiques graphe par graphe (figure 54A).

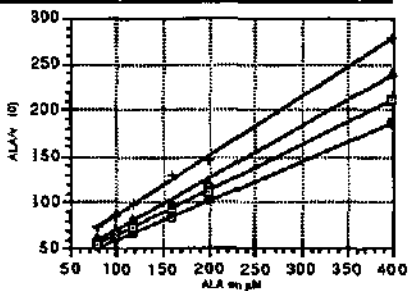
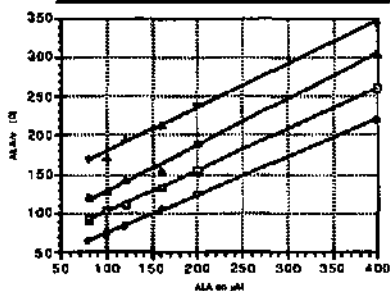
Exemple d'inhibiteur compétitif:  
l'acide 5-fluoro-lévinique

Exemple d'inhibiteur incompétitif:  
l'acide 4-oxo-nonane-1,9-dioïque

Lineweaver-Burk (1)



Hanes (2)



Eadie-Hofstee (3)

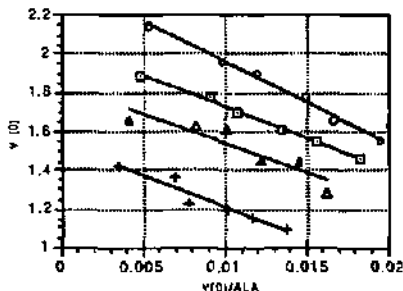
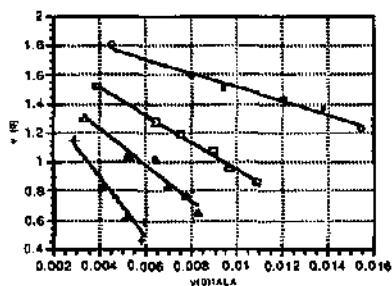


Figure 54A: Cas compétitif de l'acide 5-fluoro-lévinique (65) et cas incompétitif de l'acide 4-oxo-nonane-dioïque (102)

On voit donc un contraste certain entre les graphiques correspondant aux deux cas. Lorsque des droites sont parallèles dans un cas, elles se coupent en un point dans l'autre cas.

**Tendances des caractéristiques dans le cas d'un inhibiteur compétitif:**

	<u>Acide 5-fluoro-lévulinique</u>			
	0 $\mu$ M	70 $\mu$ M	140 $\mu$ M	278 $\mu$ M
Vmax (1)	2.00	1.90	1.78	1.74
Kmapp (1)	48.74	95.06	133.27	211.92
Ki(1)		73.27	80.29	83.18
Vmax (2)	2.04	1.88	1.71	1.78
Kmapp (2)	52.27	93.23	122.39	219.20
Ki(2)		88.86	103.80	87.21
Vmax (3)	2.00	1.89	1.73	1.72
Kmapp (3)	48.75	93.87	124.70	206.17
Ki(3)		75.23	89.38	86.25
Vmax (4)	2.01	1.89	1.72	1.78
Kmapp (4)	49.72	93.35	122.84	219.04
Ki(4)		79.35	94.69	81.78

Valeurs moyennes  $K_i$  (1): 79,  $K_i$ (2): 93,  $K_i$ (3): 84,  $K_i$ (4): 85

**Tableau 4:** Valeurs des caractéristiques de Vmax et Km dans le cas de l'acide 5-fluoro-lévulinique (65)

Ce tableau montre très bien la stabilisation de Vmax et l'augmentation nette de Km en fonction des valeurs croissantes en concentration d'inhibiteur.

**Tendances des caractéristiques dans le cas d'un inhibiteur incompétitif:**

	<u>Acide 4-oxo-nonane-1,9-dioïque</u>			
	0 $\mu\text{M}$	76 $\mu\text{M}$	151 $\mu\text{M}$	303 $\mu\text{M}$
$V_{\text{max}}$ (1)	2.84	2.37	2.06	1.59
$K_{\text{mapp}}$ (1)	51.87	45.80	42.21	35.70
$K_i(1)$		570.95	661.29	668.25
$V_{\text{max}}$ (2)	2.90	2.39	2.04	1.56
$K_{\text{mapp}}$ (2)	56.32	47.83	40.15	31.69
$K_i(2)$		426.30	375.78	389.44
$V_{\text{max}}$ (3)	2.86	2.36	2.05	1.58
$K_{\text{mapp}}$ (3)	52.79	44.71	41.32	34.84
$K_i(3)$		418.71	545.19	587.49
$V_{\text{max}}$ (4)	2.87	2.37	2.05	1.58
$K_{\text{mapp}}$ (4)	53.98	45.36	41.18	34.36
$K_i(4)$		398.19	486.89	530.08

Valeurs moyennes  $K_i$  (1): 633,  $K_i$ (2): 397,  $K_i$ (3): 517,  $K_i$ (4): 472

**Tableau 5:** Valeurs des caractéristiques de  $V_{\text{max}}$  et  $K_{\text{m}}$  dans le cas de l'acide 4-oxo-nonane-1,9-dioïque (102)

Ce tableau montre la diminution nette de  $V_{\text{max}}$  et  $K_{\text{m}}$  en fonction de valeurs croissantes en concentration d'inhibiteur dans le cas d'un inhibiteur réversible incompétitif.

#### **4.1.2. Inhibition irréversible/slow-binder**

Dans toute la série d'inhibiteurs testés, il n'y a pas vraiment de "vrais irréversibles". Les composés qui ont démontré un comportement irréversible, sont en fait des composés que l'on dénomme sous le terme de "fort slow-binder", car ils n'ont pas, par exemple, de propriétés d'alkylation comme ce fut le cas pour les époxydes synthétisés par M. Marty [124]. Ces composés forment en fait par la présence d'une fonction cétone, une base de Schiff stabilisée qui est normalement réversible mais qui ne l'est que très lentement dans ces cas précis. Mais nous avons néanmoins gardé la dénomination irréversible pour le type d'inhibition décrit par les "fort slow-binder". La distinction entre irréversible et slow-binder se fait par dialyse.

Si l'activité n'a pas recouvert 20% d'activité en plus que le pourcentage d'activité initial après 70h de dialyse, le terme irréversible lui est attribué. Dans le cas contraire, on parle de slow-binder.

L'exemple choisi est celui de l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110) qui décrit un comportement slow-binder classique (figure 54B).

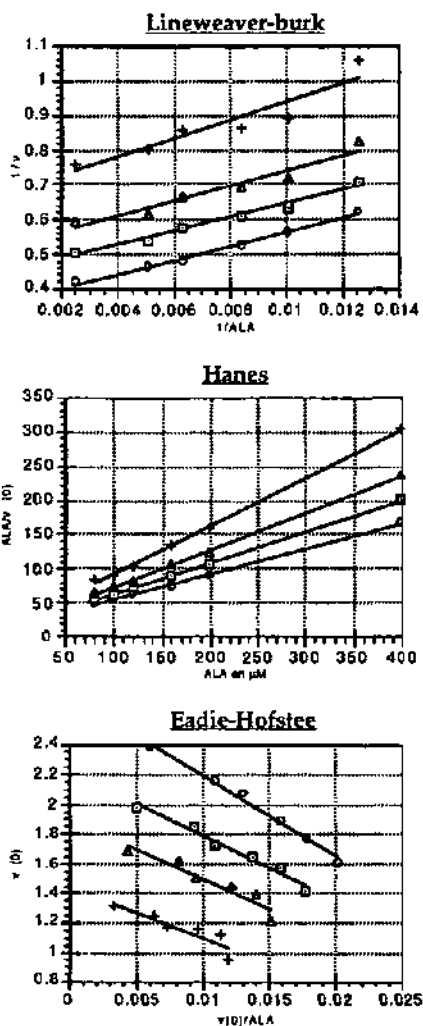


Figure 54B: Cas slow-binder de l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110)

Tendances des caractéristiques dans le cas d'un inhibiteur slow-binder:

	Acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque			
	0 $\mu$ M	70.3 $\mu$ M	140.7 $\mu$ M	281.3 $\mu$ M
V <sub>max</sub> (1)	2.77	2.24	1.93	1.47
K <sub>mapp</sub> (1)	56.3	44.82	43.55	38.85
K <sub>i</sub> (1)		274.5	480.6	(626.3)
V <sub>max</sub> (2)	2.70	2.20	1.85	1.42
K <sub>mapp</sub> (2)	51.16	41.25	34.88	32.03
K <sub>i</sub> (2)		292.6	301.5	471.0
V <sub>max</sub> (3)	2.75	2.23	1.90	1.44
K <sub>mapp</sub> (3)	54.72	43.55	40.2	34.20
K <sub>i</sub> (3)		274.1	389.5	468.8
V <sub>max</sub> (4)	2.73	2.22	1.89	1.44
K <sub>mapp</sub> (4)	53.5	43.1	39.4	34.7
K <sub>i</sub> (4)		291.5	393.2	519.2

Valeurs moyennes K<sub>i</sub> (1):378, K<sub>i</sub>(2): 355 , K<sub>i</sub>(3): 377, K<sub>i</sub>(4): 401

Tableau 6: Valeurs des caractéristiques de V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub> dans le cas de l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110)

On remarque qu'au vu des courbes (figure 54A/figure 54B), on peut facilement faire une confusion entre un slow-binder et inhibiteur incompétitif. Le tableau montre également la même tendance au niveau des valeurs de V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub>: diminution nette de V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub> en fonction de valeurs croissantes en concentration d'inhibiteur dans le cas d'un slow-binder. La différenciation entre les deux cas se fait en mettant en évidence pour le slow-binder l'augmentation du degré d'inhibition en fonction du temps. Le tableau 7 qui suit démontre cette propriété pour l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110).

t (min)	Essai	Inhibiteur	Enzyme	Tampon	ALA	Absorbance
22	1	0	400	900	200	0.600
22	2	400	400	500	200	0.360
85	3	0	400	900	200	0.586
85	4	400	400	500	200	0.218
22	5	0	400	1000	100	0.554
22	6	400	400	600	100	0.346
85	7	0	400	1000	100	0.538
85	8	400	400	600	100	0.227
22	9	0	400	1050	50	0.439
22	10	400	400	650	50	0.300
85	11	0	400	1050	50	0.425
85	12	400	400	650	50	0.198

Temps de préincubation 1 = 22 min, temps de préincubation 2 = 85 min

Concentration en inhibiteur: 6.1 mg /20 ml tampon

Tableau 7: Test avec variation du temps de préincubation.

On voit une différence croissante entre le blanc et l'essai avec l'augmentation du temps de préincubation.

Une dialyse détermine entre l'inhibiteur irréversible et l'inhibiteur slow-binder.

#### 4.1.3. Classification des inhibiteurs:

La constante standard qui nous a permis de classer les inhibiteurs entre eux, est la constante  $K_{m2} = 65 \mu\text{M}$  qui est directement retranscrite des tests d'inhibition. Cette valeur nous permet de définir des catégories d'inhibiteurs. Un excellent inhibiteur possède une constante d'inhibition du même ordre de grandeur que le  $K_{m2}$  ( $K_i < 100 \mu\text{M}$ ). Un inhibiteur est faible pour une valeur supérieure à  $10'000 \mu\text{M}$  et n'est plus considéré comme un inhibiteur pour une valeur supérieure à  $100'000 \mu\text{M}$ .

## 4.2. Résultats

Au cours de ce travail, plus de 70 molécules ont été testées sur la PBGS de l'*E. coli*. Les résultats obtenus vont être divisés en trois grandes parties:

- les analogues de substrat qui seront subdivisés suivant les modifications structurales apportées par rapport à l'ALA (1)
- la famille des composés  $\beta$ -dicétones qui s'articule autour de la succinyle acétone (11)
- et enfin les analogues d'intermédiaires qui seront essentiellement des diacides à longue chaîne ou des composés similaires dont une des deux fonctions acides sera remplacée par un groupe nitro ou un groupe ester méthylé.

### 4.2.1. Les analogues de substrat

#### 4.2.1.1. Variation en position 1

Les deux premiers composés 47 et 48 proposés sont en fait des substrats non-naturels potentiels de la PBGS car ils possèdent tous les deux une fonction amine primaire en  $\alpha$  d'une fonction cétone susceptible de former un pyrrole avec une seconde molécule.

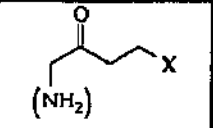
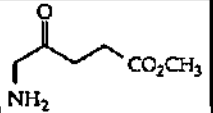
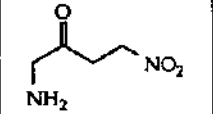
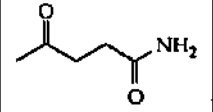
	N°	Km( $\mu$ M)	Ki( $\mu$ M)	Type d'inhibition
	47	(-)	(-)	Formation de pyrrole
	48	45	15	Compétitif-mixte
	49	(-)	(-)	Problème de détection

Tableau 6: Résultats d'inhibition pour une variation en position 1

L'ester méthylé de ALA 47, purifié de tout ALA qui perturberait l'interprétation, forme sans équivoque possible un pyrrole dans les conditions du test d'inhibition. Après une incubation de 40 min, une solution de 4.87 mM de 47 en présence d'enzyme donne un spectre visible (Absorbance= 0.858 unité) semblable à celui du complexe formé par le PBG et le réactif d'Ehrlich ( $\lambda_{max}$ = 554 nm). L'analogue nitré de l'ALA, le 1-amino-4-nitro-butane-2-one (48), décrit par l'augmentation du Km et la diminution modérée du Vmax, une excellente inhibition compétitive-mixte de 15  $\mu$ M.

Ce dernier composé très bien reconnu par l'enzyme, était un des composés les plus susceptibles de jouer le rôle de substrat non-naturel et de former ainsi du PBC dinitré. Malheureusement malgré un temps d'incubation à 37°C assez long (t= 26 h), aucune formation visible de pyrrole n'a été détectée.

Quant au dérivé amide de l'acide lévulinique 49, il pose un problème au niveau de la détection car il y a formation dans la zone de mesure du spectre visible d'une bosse assez imposante ( $\lambda_{max} = 548 \text{ nm}$ ) qui ne permet pas de faire des mesures. La coloration rose normalement observée tourne dans ce cas au violet très foncée.

4.2.1.2. Variation en position 3

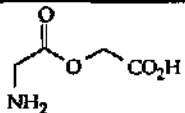
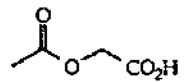
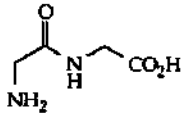
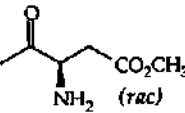
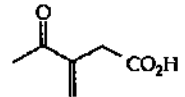
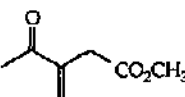
$(\text{H}_2\text{N})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{XCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	N°	$K_m(\mu\text{M})$	$K_i(\mu\text{M})$	Type d'inhibition
	50	57	18'200	Compétitif
	51	43	24'500	Compétitif
	52	56	>100'000	Inhibition non détectée
	53	52	19'000	Incompétitif-mixte
	54	51	580	Incompétitif
	55	75	11'900	Incompétitif

Tableau 9: Résultats d'inhibition pour une variation en position 3

L'introduction d'un oxygène à la place d'un carbone augmente d'un facteur 300 la constante d'inhibition de 50 par rapport à l'ALA ( $K_m = 65 \mu\text{M}$ ). Le dérivé 3-oxo de l'ALA 50 est donc un inhibiteur faible de constante d'inhibition  $K_i = 18'200 \mu\text{M}$ . La perte de l'amine augmente modérément la constante d'inhibition à  $24'500 \mu\text{M}$  pour l'acide acétoxy-acétique (51). Par contre, la glycyl-glycine (52), un dérivé 3-aza de l'ALA, présente une modification qui provoque un effet désastreux sur l'inhibition et demande des concentrations de  $80'000 \mu\text{M}$  pour entrevoir un effet d'inhibition.

Les constantes d'inhibition calculées sont de l'ordre de 150'000 à 200'000  $\mu\text{M}$  ce qui ne permet pas de considérer la glycyl-glycine comme un inhibiteur. L'introduction d'une amine primaire ou d'une double liaison en position 3 (cas 53, 54, 55) donne de bons résultats, si l'on considère que le rapport entre la constante d'inhibition d'un ester méthylé et celle de son acide correspondant est de 15-20 pour 53.

4.2.1.3. Variation en position 4

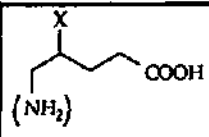
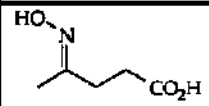
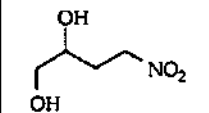
	N°	Km( $\mu\text{M}$ )	Ki( $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	56	58	21'500	Compétitif
	57	70	21'800	Compétitif

Tableau 10: Résultats d'inhibition pour une variation en position 4

La suppression de la fonction cétone aboutit à des inhibiteurs compétitifs faibles aux alentours de  $K_i = 22'000 \mu\text{M}$  ce qui n'est pas plus mauvais que la conversion de la cétone en amide ou en ester (acide acétoxy-acétique (51)  $K_i = 24'500 \mu\text{M}$ ).

4.2.1.4. Variation en position 5

Le dérivé N-méthylé de l'ALA 58 a montré une légère formation de pyrrole ( $\lambda_{\text{max}} = 554 \text{ nm}$ ), un test serait cependant envisageable. Avec une concentration assez élevée (5.74 mM), l'absorbance est passée de 0.019 après 5h d'incubation à 37°C à 0.026 après 20h d'incubation. L'encombrement supplémentaire de l'amine introduite par un second méthyle aboutit à l'obtention d'un inhibiteur 59 faible. L'allongement ainsi que la diminution de la chaîne carbonée entre la fonction cétone et l'amine (cas 60 et 61), donnent des constantes d'inhibition un peu plus élevées (supérieure à 20'000  $\mu\text{M}$ ) mais du même ordre de grandeur.

L'acide 5-cyano-lévilinique (62) est un très bon inhibiteur incompétitif ce qui est en contradiction avec des travaux antérieurs [39] effectués sur le dérivé ester méthylé de ce composé qui décrivait un comportement slow-binder. Le dérivé soufré 63 ( $K_i = 5'200 \mu\text{M}$ ) donne des résultats trois à quatre fois meilleurs que l'amine 59. L'hydrazide 64 pose un problème de détection qui se retranscrit visuellement par une coloration orange très intense (bosse imposante  $\lambda_{\text{max}} = 458 \text{ nm}$ ).

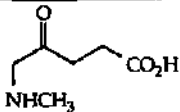
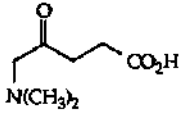
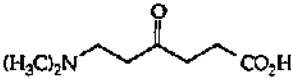
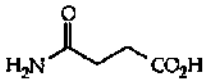
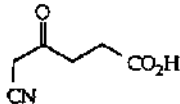
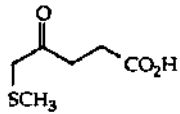
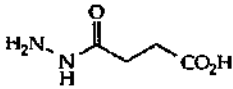
Composé	N°	Km(μM)	Ki(μM)	Type d'inhibition
	58	(-)	(-)	Formation de pyrrole
	59	52	17'200	Compétitif
	60	61	20'600	Compétitif
	61	51	27'600	Compétitif
	62	49	152	Incompétitif
	63	55	5'200	Compétitif
	64	(-)	(-)	Pb de détection

Tableau 11 : Résultats d'inhibition pour une variation en position 5

Suivent ensuite dans la série des variations en position 5, des composés fluorés qui sont de bons inhibiteurs.

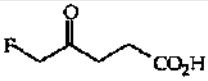
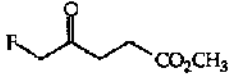
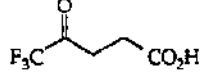
Composé fluoré	N°	Km(μM)	Ki(μM)	Type d'inhibition
	65	50	85	Compétitif
	66	49	695	Compétitif
	67	(-)	(-)	Slow-binder

Tableau 12 : Résultats d'inhibition pour les composés fluorés

L'acide 5-fluoro-lévilinique (65) est vingt-cinq fois mieux reconnu que l'acide lévilinique (23) et est à peine moins bien reconnu que le substrat naturel. Son ester méthylié 66 reste un bon inhibiteur et son dérivé trifluoré, l'acide 5,5,5-trifluoro-lévilinique (67) a un degré d'inhibition augmentant avec le temps. Pour une concentration de 643  $\mu\text{M}$ , le pourcentage d'activité passe de 60% après 30 min de préincubation à 52% après 1 h 30 min de préincubation. Après 92 h de dialyse, l'activité a pu être régénérée de 38 à 87% ( $C = 21.8 \text{ mM}$ ).

4.2.1.5. Double variation

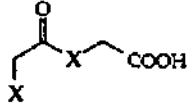
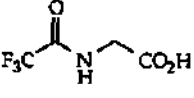
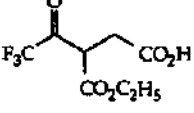
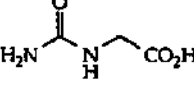
	N°	Km( $\mu\text{M}$ )	Ki( $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	68	55	18'800	Compétitif
	69	(-)	(-)	Slow-binder
	70	(-)	(-)	Problème de détection

Tableau 13: Résultats d'inhibition pour une double-variation

Le composé 68 est un inhibiteur faible dans le même ordre de grandeur que son dérivé non fluoré, l'acétyl-glycine (115) ( $K_i = 18'700 \mu\text{M}$ , [39]). La présence d'un éthyl-carboxyle en position 3 du composé 69 permet tout de même de maintenir l'effet slow-binder déjà observé pour l'acide 5,5,5-trifluoro-lévilinique (67). Pour une concentration de 6.37 mM, le pourcentage d'activité passe de 82 % après 30 min de préincubation à 70% après 1h 30 min de préincubation. Après 70 h de dialyse, l'activité a pu être régénérée de 61 à 88% ( $C = 12.5 \text{ mM}$ ).

Le composé 70 présente quant à lui des pics interférants à 418 et 432 nm.

4.2.1.6. Autres composés testés

Les deux composés aromatiques 71 et 72 donnent des résultats intéressants et peuvent être mis en parallèle avec d'autres déjà testés par M. Henz [39].

Le 4-nitro-benzaldéhyde (71) décrit une inhibition compétitive moyenne tandis que l'acide phthalaldéhydique (72) est un inhibiteur incompétitif excellent avec un  $K_i$  de 27  $\mu\text{M}$ . Le composé 73 ne permet pas d'observer une inhibition claire et le 4-furanyl-3-méthylène-butane-2-one (74) réagit avec le réactif de Ehrlich.

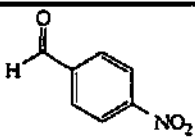
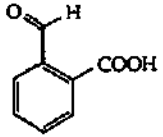
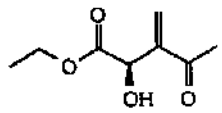
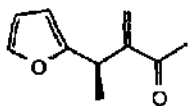
Composé	N°	Km(μM)	Ki(μM)	Type d'inhibition
	71	56	3'900	Compétitif
	72	49	27	Incompétitif
	73	(-)	(-)	Inhibition non détectée
	74	(-)	(-)	Réagit avec le réactif de Ehrlich

Tableau 14: Composés divers

#### 4.2.2. La famille des composés β-dicétones

Une série de composés β-dicétones ainsi que des dérivés de cette fonctionnalité ont été testés. Ces tests permettent d'explorer plus précisément la classe dont est issue la succinyle acétone (11), décrite dans la littérature comme étant l'inhibiteur de la PBGS le plus efficace [118,119].

Afin d'étudier l'importance de la formation d'énamine sur l'inhibition provoquée par ces composés β-dicétones, les trois types de β-dicétones suivantes ont été étudiés:

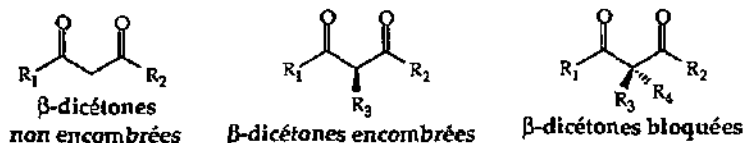


Figure 55: Types de β-dicétones testées

Des tableaux présenteront séparément les résultats de ces trois catégories de β-dicétones avec des dérivés de la succinyle acétone suivis de dérivés de l'acétyl-acétone. A la fin de ce chapitre, des résultats concernant des analogues de β-dicétones sont également présentés.

La succinyle acétone a dans un premier temps été décrite comme un inhibiteur incompétitif de la PBGS issue de *E. coli* [39], mais s'est avéré être après une étude plus poussée, un slow-binder puissant. Pour une concentration de 2.5 μM en succinyle acétone (11), l'activité baisse à 42% après 30 min de préincubation. Une dialyse de 70 h a permis de régénérer partiellement l'activité de l'enzyme de 9 à 50% pour une concentration initiale en 11 de 0.14 mM.

La succinyle acétone (11) mais aussi l'acide 4,6-dioxo-5-méthyl-heptanoïque (79), dérivé méthylé de la succinyle acétone, ont montré une régénération de l'activité par dialyse. On suppose que les  $\beta$ -dicétones encombrées et non encombrées qui décrivent une inhibition croissante en fonction du temps, suivent également ce type de comportement. Les dérivés  $\beta$ -dicétones entièrement bloqués ne nécessitent quant à eux aucune dialyse, vu qu'ils présentent une inhibition réversible.

Le premier tableau montre les résultats concernant les  $\beta$ -dicétones non encombrées (tableau 15). Les valeurs données entre parenthèses sont en fait des valeurs calculées après 30 min de préincubation à partir de l'expression de la constante d'inhibition incompétitive. N'ayant pas d'équation adéquate décrivant la cinétique d'inhibition de nos slow-binder, nous avons tout de même voulu comparer nos inhibiteurs  $\beta$ -dicétones entre eux en donnant une valeur de constante. Nous avons opté pour le calcul de constantes suivant la manière incompétitive pour un temps fixe car une variation similaire des deux caractéristiques (diminution de  $V_{max}$  et  $K_m$ ) a été observée pour ces deux catégories d'inhibiteurs.

Cependant quelques slow-binder montrent une relative stabilisation du  $K_m$  et aucune valeur n'a été attribuée à ces composés (composés dont le type d'inhibition est suivie d'une astérisque).

Il faut néanmoins être prudent avec ces valeurs, appelées  $K_i$  qui donnent une variation des grandeurs des caractéristiques pour un temps donné. Ces valeurs  $K_i$  nous permettent de comparer les composés  $\beta$ -dicétones slow-binder entre eux et en aucun cas de les comparer à des composés présentant un autre type d'inhibition.

Les valeurs données dans l'avant-dernière colonne des tableaux sont les valeurs d'activité calculées pour deux temps de préincubation différents (valeur supérieure: temps de préincubation de 30 min; valeur inférieure: temps de préincubation de 90 min) et la dernière colonne indique à la concentration à laquelle ces activités ont été calculées.

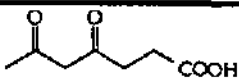
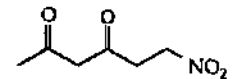
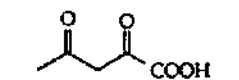
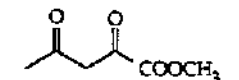
Composé	N°	$K_m$ ( $\mu M$ )	$K_i$ ( $\mu M$ )	Type d'inhibition	Activité (%)	
					A(30) [A(90)]	Conc (mM)
	11	(70)	(1.4)	Slow-binder	42 [24]	0.0025
	76	44	15	Incomp-mixte		
	77	(55)	(260)	Slow-binder		
	78	(68)	(1600)	Slow-binder	59 [46]	1.89

Tableau 15:  $\beta$ -Dicétones non encombrées

On observe donc que le remplacement du groupe carboxylate de la succinyle acétone par un groupe nitro ne permet plus d'avoir l'effet slow-binding. Le 6-nitro-hexane-2,4-dione (76) décrit une très bonne inhibition réversible mixte mais ce composé ne semble pas très stable dans les conditions du test d'inhibition. On voit également que la diminution de la chaîne carbonée portant la fonction acide permet de garder l'effet slow-binding dans le cas de l'acide acétopyruvique (77) et de son ester méthylé 78 (inhibition slow-binding de 77 accordée suivant celle de 78)

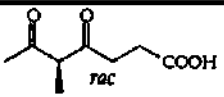
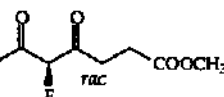
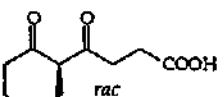
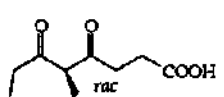
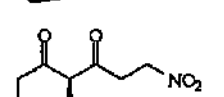
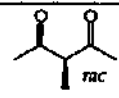
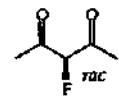
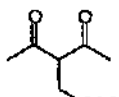
Composé	N°	K <sub>m</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Type d'inhibition	Activité (%) A(30) [A(90)]	Conc (mM)
	79	(67)	(440)	Slow-binder	75 [58]	0.077
	80	(-)	(-)	Slow-binder*	65 [42]	1.32
	81	(57)	(400)	Slow-binder	56 [38]	0.44
	82	(55)	(2'400)	Slow-binder	76 [70]	0.58
	83	60	16	Compétitif-mixte		
	84	(70)	(> 50'000)	Slow-binder	90 [82]	16
	85	(-)	(-)	Slow-binder*	92 [79]	6.86
	86	37	8'800	Compétitif-mixte		

Tableau 16: β-Dicétones encombrées

Dans la série des  $\beta$ -dicétones encombrées, on observe différents résultats intéressants. Sur cette série de huit composés, deux se dégagent par leur caractère réversible, tous les autres étant des slow-binder. Sur ces deux inhibiteurs compétitifs mixtes, un des deux est le 2-(3-nitro-propionyl)-cyclohexanone (83) qui confirme le résultat du 6-nitro-hexane-2,4-dione (76) qui montrait déjà que l'introduction d'un groupe nitro perturbe l'effet slow-binding. De plus, 83 est un très bon inhibiteur réversible avec un  $K_i$  de 16  $\mu\text{M}$ . Le deuxième inhibiteur compétitif-mixte de la série est l'acide 3-acétyl-lévulinique (86) qui est en revanche un inhibiteur plus faible ( $K_i=8'800 \mu\text{M}$ ). Par ailleurs, on observe une nette différence de concentration nécessaire pour observer l'inhibition après 30 min, entre les composés  $\beta$ -dicétones possédant une chaîne succinyle (79; 75% d'activité pour  $C= 0.077 \text{ mM}$ ) et ceux n'en possédant pas (84; 90% d'activité pour  $C= 16.0 \text{ mM}$ ). Même 200 fois plus concentré, le dérivé méthyle de l'acétyl-acétone 84 n'arrive pas à fournir une inhibition comparable à celle de l'acide 4,6-dioxo-5-méthyl-heptanoïque (79). Il faut également signaler que le fait d'avoir une cyclohexanone en bout de chaîne dans l'acide 4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (81) ne semble pas énormément déranger l'enzyme puisque 81 semble provoquer une inhibition similaire à celle de 79.

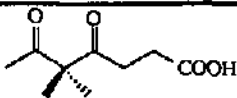
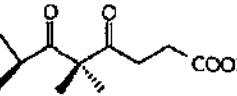
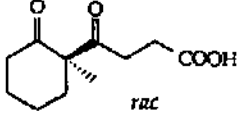
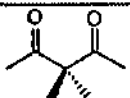
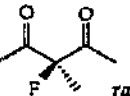
Composé	N°	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	87	44	54'500	Compétitif- mixte
	88	62	50'200	Compétitif- mixte
	89	61	34'200	Compétitif- mixte
	90	58	31'000	Incompétitif- mixte
	91	80	> 70'000	Incompétitif- mixte

Tableau 17:  $\beta$ -Dicétones bloquées

En parcourant ce tableau 17, on voit rapidement que tout effet de slow-binding a disparu avec le blocage du carbone central et que ces cinq composés décrivent une inhibition mixte réversible. Avec des constantes d'inhibition qui dépassent dans tous les cas les 30'000  $\mu\text{M}$ , ces composés  $\beta$ -dicétones bloquées sont de très faibles inhibiteurs dont la présence ou non d'un groupe succinyle dans la molécule n'influence pas leur potentiel d'inhibition.

Composé	N°	Km ( $\mu\text{M}$ )	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
	92	(-)	(-)	Slow-binder*
	93	(-)	(-)	Réagit avec ALA
	94	(-)	(-)	Problème d'hydrolyse
	95	(-)	(-)	
	96	(-)	(-)	Problème de détection
	97	(-)	(-)	
	98	(-)	(-)	Aucune inhibition détectée
	99	(-)	(-)	

Tableau 18: Analogues de  $\beta$ -dicétones

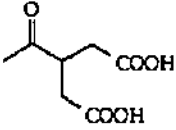
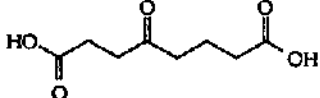
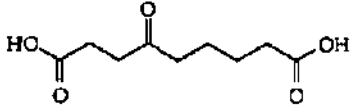
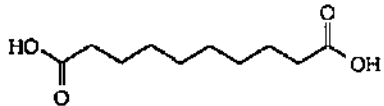
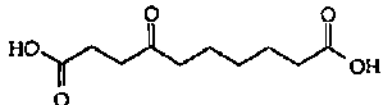
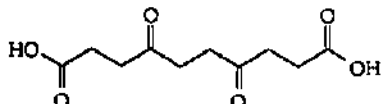
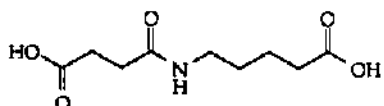
Peu d'informations ont pu être tirées des dérivés de  $\beta$ -dicétones (tableau 18). Concernant les énamines, on observe clairement la formation de pyrrole entre l'ester méthylé de l'acide 6-amino-4-oxo-5-hepténoïque (93) et ALA (1). Cette formation, spontanée et rapide dans les conditions du test d'inhibition, ne nous permet pas d'évaluer son potentiel d'inhibition. Quant à l'ester méthylé de l'acide 4-amino-6-oxo-5-hepténoïque (92), il décrit une inhibition slow-binding. Pour une concentration de 4.9 mM en 92, le pourcentage d'activité passe de 88% après 40 min de préincubation à 51% après 1h 40 min de préincubation. Après 89 h de dialyse, l'activité a pu être régénérée de 20 à 71% ( $C = 12.6$  mM). Le 4-méthoxy-6-oxo-5-hepténoate de méthyle (95) et le 6-méthoxy-4-oxo-5-hepténoate de méthyle (94) ont été testés en présence d'environ 15-20% de leur produit d'hydrolyse commun, le 4,6-dioxy-heptanoate de méthyle ( $K_i = 319$   $\mu\text{M}$ , slow-binder, [39]). Au vu des quantités de composés à mettre en oeuvre pour observer une inhibition, on peut juste en déduire que ces composés inhibent moins bien l'enzyme que son produit d'hydrolyse commun. Un mélange d'isoxazoles 98 et 99 (ces produits n'étant pas séparables) a été testé et n'a pas mis en évidence une inhibition importante.

4.2.3. Les analogues d'intermédiaires

4.2.3.1. Les diacides

Une série de diacides a été testée comme analogues d'intermédiaires potentiels. Ce travail a été effectué à la suite des travaux antérieurs de M. Henz et R. Lüönd (Chap. 2.) [38,39]. La plupart des premiers diacides testés par M. Henz semblaient montrer un comportement compétitif très modéré avec des  $K_i$  de l'ordre de 10'000  $\mu\text{M}$  (figure 25). Malgré ces résultats, nous avons tout de même été motivé de développer d'autres inhibiteurs à partir de diacides tout en jouant un peu plus avec la longueur de la chaîne carbonée entre les deux fonctions acides.

Une série de diacides a donc été testée et les résultats sont reportés dans le tableau qui suit.

$C_x$	Composé	N°	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Type d'inhibition
$C_5$		100	65	1'770	Incompétitif
$C_8$		101	52	68	Incompétitif
$C_9$		102	53	403	Incompétitif
$C_{10}$		103	43	8'700	Compétitif/ activateur
$C_{10}$		104	(-)	(-)	Irréversible
$C_{10}$		105	(-)	(-)	Irréversible
$C_{10}$		106	54	22'900	Compétitif

C <sub>x</sub>	Composé	N°	K <sub>m</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Type d'inhibition
C <sub>10</sub>		107	48	8'300	Compétitif
C <sub>10</sub>		108	(-)	(-)	Irréversible
C <sub>11</sub>		109	(-)	(-)	Slow-binder
C <sub>12</sub>		110	(-)	(-)	Slow-binder

Tableau 19: Diacides testés

Les diacides de cette seconde série possédant une chaîne carbonée entre les deux fonctions acides plus courte (100, 101, 102) décrivent une inhibition incompétitive assez bonne. Tout comme M. Henz [39], nous obtenons des inhibiteurs compétitifs modérés pour certains diacides à dix carbones (103, 106 et 107) allant jusqu'à un K<sub>i</sub> supérieure à 22'000 pour 106. La différence de comportement la plus frappante est celle observée entre l'acide sébacique (103) et l'acide 4-oxo sébacique (104). L'introduction de la fonction cétone n'a pas seulement améliorée l'inhibition mais un changement de type d'inhibition s'est produit. L'acide sébacique (103) montre une inhibition compétitive modérée (K<sub>i</sub>=8'700 μM) tandis que l'acide 4-oxo-sébacique (104) devient par l'introduction de la fonction cétone un inhibiteur irréversible. D'autres cas d'irréversibilité ont été trouvés pour les composés 108 et 105. Après 70 h de dialyse, l'activité de l'enzyme était toujours à un pourcentage assez bas pour ces trois composés. Par contre pour les céto-diacides à chaîne plus longue comme l'acide 4-oxo-undécane-1,11-dioïque (109) et l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110), l'activité de l'enzyme a pu être partiellement régénérée.

C <sub>x</sub>	Composé	Activité en fonction du temps		Dialyse (70 h)		Type d'inhibition
		Activité (%) A(30) [A(90)]	Conc. (mM)	Activité (%) A(0) [A(70)]	Conc. (mM)	
C <sub>10</sub>	108	66 [35]	0.44	13 [13]	2.16	Irréversible
C <sub>10</sub>	104	73 [32]	0.41	22 [28]	6.70	Irréversible
C <sub>10</sub>	105	17 [6]	0.41	2 [3]	4.24	Irréversible
C <sub>11</sub>	109	84 [73]	0.33	61 [89]	3.26	Slow-binder
C <sub>12</sub>	110	46 [31]	0.45	46 [72]	2.55	Slow-binder

Note:

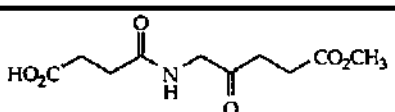
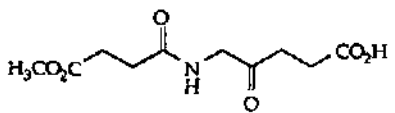
-Les valeurs données dans la troisième colonne sont les valeurs d'activité calculées pour deux temps de préincubation différents (valeur supérieure: temps de préincubation de 30 min; valeur inférieure: temps de préincubation de 90 min)

-Les valeurs données dans la cinquième colonne sont les valeurs d'activité calculées avant et après dialyse (valeur supérieure: activité avant dialyse; valeur inférieure: activité après dialyse)

Tableau 20: Diacides slow-binder et irréversibles

#### 4.2.3.2. Les dérivés mixtes

Six analogues de 108 (tableau 19) ont été synthétisés avec des changements aux deux extrémités par remplacement du groupe carboxylate soit par un ester méthylique ou soit par un groupe nitro. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant:

Composé	N°	K <sub>m</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Type d'inhibition
	111	(-)	(-)	Irréversible
	112	59	243	Incompétitif

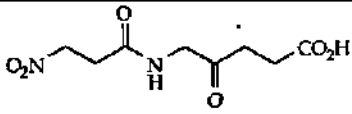
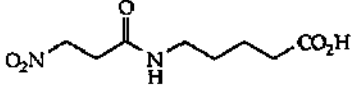
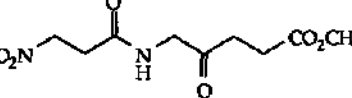
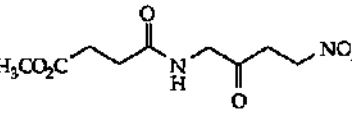
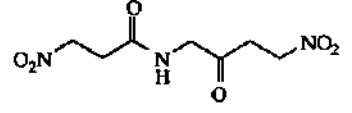
Composé	N°	Km ( $\mu$ M)	Ki ( $\mu$ M)	Type d'inhibition
	113	(-)	(-)	Irréversible
	114	48	18'200	Comp/activateur
	115	(-)	(-)	Irréversible
	116	53	20	Compétitif-mixte
	117	61	30	Compétitif-mixte

Tableau 21: Composés mixtes testés

En plus de ces six composés, un dérivé nitré de 106 (tableau 19) a été testé. L'introduction du groupe nitro en 114 comparé à 106 augmente légèrement la valeur du  $K_i$ . Une estimation correcte de ces constantes d'inhibition est délicate car le composé 106 montre un effet activateur mais il reste largement dans la catégorie des inhibiteurs faibles.

On s'aperçoit que trois inhibiteurs parmi ces six analogues montrent une inhibition irréversible. Nous avons effectué des dialyses pour ces trois composés et en présence des composés 113 et 115, l'inactivation de l'enzyme varie légèrement. Le pourcentage d'activité a augmenté de 17% à 30% pour 113 et de 33% à 40% pour 115. Le composé 111 permet d'avoir une inactivation très stable de l'enzyme.

Trois des analogues de 108 décrivent une inhibition réversible de type variable. Les différents graphiques démontrent une bonne inhibition incompétitive pour le composé 112 et une inhibition compétitive mixte excellente dans le cas des composés 116 et 117. Un test comparatif entre 108 et son dérivé nitré 113 a été effectué utilisant les mêmes conditions et les mêmes concentrations (0.30 mg/ml) pour chaque composé. Pour deux temps de préincubation (27 min et 96 min) et deux concentrations en ALA différentes, nous avons incubé avec ou sans l'un de ces inhibiteurs l'enzyme. Ce test nous permet d'estimer lequel de ces deux inhibiteurs inactive le plus rapidement l'enzyme. Après 27 min, Le composé 113 inactive déjà à 75% l'enzyme contre 0% pour le composé 108. Après 96 min, nous avons pu observer un début d'inactivation de l'enzyme par l'action de 108 (10%) et l'inactivation toujours croissante de la PBGS par 113.

Au vu de ces résultats et par leur analogie structurale, on peut penser que la plus rapide inactivation par 113 va de paire avec la plus rapide reconnaissance de 113 par l'enzyme.

Composé	Activité en fonction du temps		Dialyse (70 h)		Type d'inhibition
	Activité (%) A(30) [A(90)]	Conc. (mM)	Activité (%) A(0) [A(70)]	Conc. (mM)	
113	• 25 • 12	0.35	• 17 • 30	0.19	Irréversible
115	• 88 • 70	1.73	• 33 • 40	4.67	Irréversible
111	• 95 • 89	1.88	• 37 • 40	8.57	Irréversible

Note:

-Les valeurs données dans la deuxième colonne sont les valeurs d'activité calculées pour deux temps de préincubation différents (valeur supérieure: temps de préincubation de 30 min; valeur inférieure: temps de préincubation de 90 min)

-Les valeurs données dans la quatrième colonne sont les valeurs d'activité calculées avant et après dialyse (valeur supérieure: activité avant dialyse; valeur inférieure: activité après dialyse)

Tableau 22: Diacides mixtes slow-binder et irréversibles

Deux autres inhibiteurs mixtes mimant l'intermédiaire de Jordan 1 112 et 113 (figure 56) ont été testés. Ces composés s'hydrolysant spontanément dans les conditions du test d'inhibition, aucune valeur les concernant n'a pu être estimée.

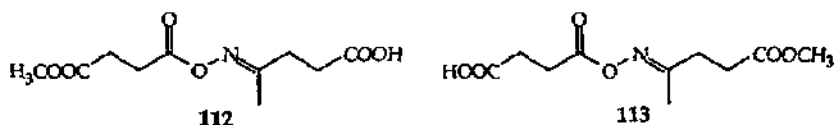


Figure 56: Diacides mixtes posant des problèmes d'hydrolyse

En travaillant à deux temps de préincubation différents, on voit une augmentation du degré d'inhibition. Ceci est certainement dû à l'inhibition supplémentaire d'un produit d'hydrolyse dont la concentration est croissante (oxime de l'acide lévulinique par exemple) lors de la préincubation.

## 5. Discussion des résultats concernant les tests d'inhibition

### 5.1. Hypothèses de travail mécanistiques

Tous les résultats obtenus seront traités en tenant compte des observations suivantes:

- la porphobilinogène synthase possède deux sites de reconnaissance distincts pour chaque substrat (site A et site P) [22]
- les constantes de Michaelis-Menten calculées pour chaque site sont: 66  $\mu\text{M}$  pour le site A et 4.5  $\mu\text{M}$  pour le site P
- le premier substrat est reconnu dans le site P et est suivi par la reconnaissance du second substrat dans le site A [23]
- le site P contient une lysine qui forme avec ALA une base de Schiff [28]
- la base de Schiff va toujours être décrite comme étant de configuration *trans* entre la lysine de l'enzyme et le C<sub>5</sub> de l'ALA selon les essais RMN <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N de Jaffe [30,31]
- la structure rayons-X de la PBGS issue de levure montre la présence d'un ion métallique zinc proche de la lysine impliquée dans la formation de la base de Schiff [49]

Ces données donnent une représentation minimale (figure 58) du site actif mais suffisante pour émettre les hypothèses suivantes:

- la constante  $K_m$  impliquée dans la cinétique de Michaelis-Menten est celle correspondant à la reconnaissance du second substrat qui se lie dans le site A. Les composés qui décrivent une inhibition compétitive pure sont donc en directe compétition avec le substrat se fixant dans le site A (Chap 3.3.1., schéma 13)
- les inhibiteurs compétitif-mixtes, incompétitif-mixtes et incompétitifs inhibent les deux sites avec des proportions variables suivant le cas (une molécule dans chaque site).
- les inhibiteurs slow-binder inhibent essentiellement le site P. Les comportements irréversibles que nous avons observé sont en fait des inhibiteurs "fort slow-binder" (inhibition possible des deux sites avec une même molécule).

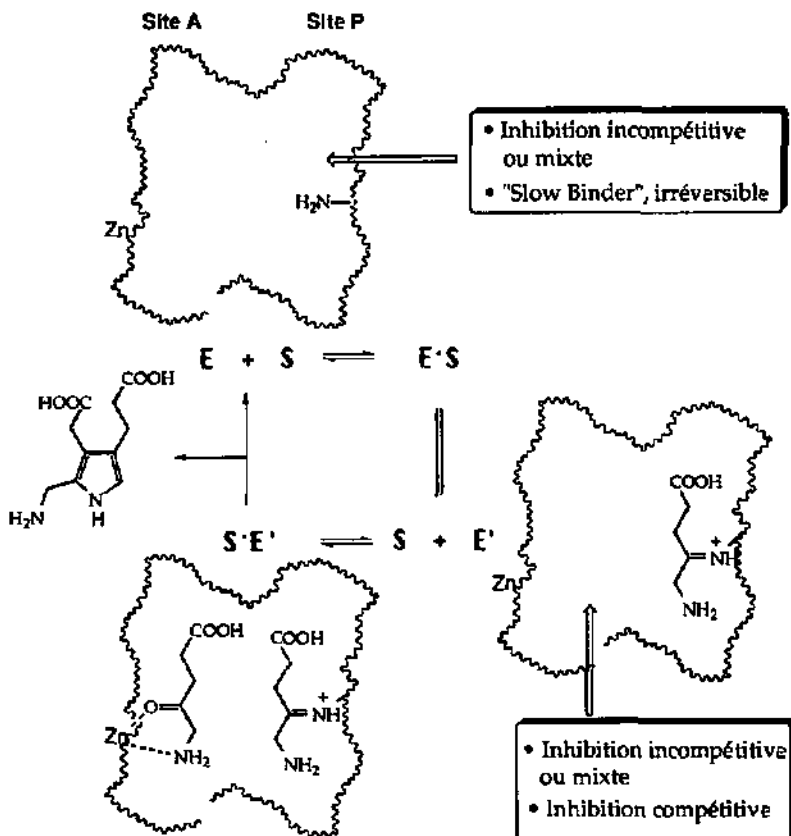


Figure 57: Corrélation site d'inhibition / type d'inhibition

## 5.2. Discussions des résultats

### 5.2.1. Analogues de substrat

Les composés résultant d'une variation en position 1 sont dans la lignée des acides phosphoniques, acides sulfoniques et composés nitrés, dérivés de l'acide lévulinique ou d'ALA, testés par M. Henz et R. Lüönd [38,39]. On avait durant les premières études sur *Rhodobacter spheroides*, déjà remarqué que le dérivé acide sulfonique de ALA, l'acide 4-amino-3-oxo-butane-sulfonique, n'inhibait pas du tout la PBGS. L'acide 3-oxo-butane-phosphonique s'était avéré être un inhibiteur faible tandis que le dérivé nitré, le 4-nitro-butane-2-one (24), était mieux reconnu que le substrat lui-même. Ces tendances se sont reconfirmées pendant les travaux de M. Henz [39] sur la PBGS issue de *E. coli*.

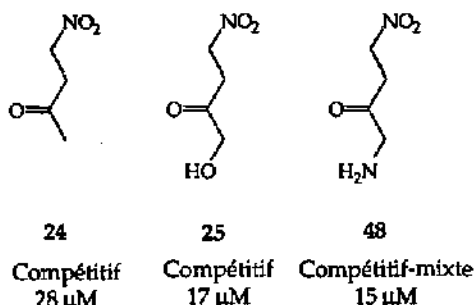


Figure 58: Analogues nitrés de ALA

On remarque que les dérivés nitrés de ALA sont des inhibiteurs compétitifs ou compétitifs mixtes très puissants et que l'introduction d'un groupe hydroxy ou amino améliore légèrement l'inhibition mais que celle-ci est du même ordre de grandeur que le 4-nitro-butane-2-one (24) (figure 58).

Cette introduction de groupe polaire n'a pas l'effet aussi important qu'il a pour l'acide lévulinique (23) car le passage de l'acide lévulinique au substrat naturel divise la constante d'inhibition par un facteur supérieure à 30 (figure 59). Sur la PBGS issue de *Rhodobacter spheroides*, on avait trouvé un rapport 3 à 4 entre l'acide lévulinique (23) et ses dérivés hydroxy et amino en position 5 (114) et (1) qui avaient une constante d'inhibition du même ordre de grandeur.

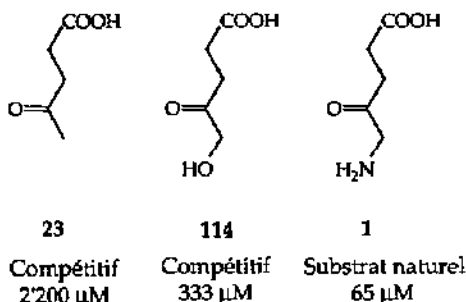


Figure 59: Série carboxylate correspondante [39]

De plus, on voit que dans la série carboxylate, l'influence sur la constante d'inhibition du groupe hydroxy n'est pas la même que celle du groupe amino. L'acide 5-hydroxy-lévulinique (114) est 5 fois moins bien reconnu que le substrat naturel.

A partir de la PBGS issue de *E. coli*, on constate que suivant la fonction présente en position 1 (nitro ou carboxylate), les fonctions (amino, hydroxy ou aucune) en position 5 ont des influences différentes.

L'amélioration de la reconnaissance par l'introduction d'un groupe nitro en position 1 masque sans doute l'amélioration apportée en position 5 par un groupe amino ou hydroxy. Cependant on ne peut pas aussi facilement conclure que la position 1 est un site de reconnaissance plus important que la position 5,

car la stabilité des  $K_i$  dans la série nitré peut provenir du fait que les composés nitrés inhibent plus spécifiquement le site A et que ce site accorde moins d'importance à la reconnaissance de la fonction en position 5. Le site P peut par ailleurs être plus "critique" envers la fonction présente en position 5.

Les composés nitrés **24** et **25** présentent donc une inhibition compétitive avec le second substrat dans le site A. Le 1-amino-4-nitro-butane-2-one (**48**) présente cependant une inhibition mixte qui montre une analogie plus importante que le (**25**) ou le 4-nitro-butane-2-one (**24**) avec le substrat naturel, ce qui lui permet d'interagir avec les deux sites tout en inhibant plus fortement le site A.

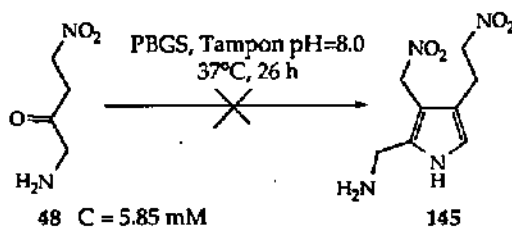


Figure 60: Formation de pyrrole dinitré **145** souhaitée

Cette inhibition mixte nous a conforté dans l'idée que le 1-amino-4-nitro-butane-2-one (**48**) pouvait agir comme substrat non-naturel de la PBGS et conduire au PBG dinitré **145**. Malheureusement, aucune formation de pyrrole n'a pu être détectée (figure 60).

Cet analogue nitré de ALA **48** a également été testé par Leeper sur la PBGS issue de *B. subtilis* ( $K_m=0.29$  mM) dont le gène a été cloné et exprimé dans *E. coli* [107]. Il a trouvé que ce composé n'était pas stable dans les conditions du test d'inhibition (pH=9.0, 37°C, tampon Bis-Tris propane, temps de préincubation=10 min). Par suivi  $^1\text{H-RMN}$ , il a vérifié la stabilité de ce produit dans un tampon  $\text{D}_2\text{O}$  à pH=8.0 et a remarqué l'apparition de signaux dans la région des protons oléfiniques. Il en a déduit qu'avec le départ de  $\text{HNO}_2$ , on observe la formation d'une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée. Il n'a donc pas pu dire si **48** ou le produit secondaire était responsable de la bonne inhibition observée ( $K_i=0.30$  mM). Dans nos conditions, aucune dégradation de **48** n'a été observée (pH=8.0, 37°C, tampon phosphaté, temps de préincubation=30 min).

L'amélioration de l'inhibition due au remplacement d'un carboxylate par un groupe nitro avait déjà été observée par d'autres groupes notamment au cours des travaux de Bright [125] sur l'acotinase.

En effet, des analogues nitrés de citrate et d'isocitrate ont été jusqu'à 70'000 fois mieux reconnus que les substrats naturels correspondants (citrate et isocitrate). Par déprotonation en  $\alpha$  du groupe nitro, ils possédaient ainsi des inhibiteurs puissants, analogues d'intermédiaire.

Notre cas n'est pas semblable puisque nous avons de réels analogues de substrat qui n'ont rien à voir dans le contexte de la PBGS avec des analogues d'intermédiaires. L'explication se trouve plutôt dans la répartition des charges, la géométrie et la longueur des liaisons similaires pour le groupe nitro et le groupe carboxylate.

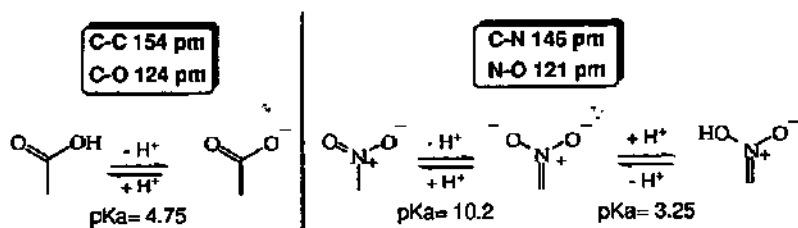


Figure 61: Comparaison groupe nitro/ groupe carboxylate

Le groupe nitro sous la forme nitronate peut être considéré comme un remplacement isostérique du groupe carboxylate [126] (figure 61).

Le 5-amino-lévélinatate de méthyle (47) montre que celui-ci a pu être correctement reconnu par l'enzyme, contrairement aux différents esters de l'acide lévulinique précédemment testés [39] qui n'avaient montré aucun potentiel en tant qu'inhibiteur. Ce composé a su induire la suite de réactions nécessaires pour former le PBG diester méthylé. Pour plus d'informations, cette réaction devrait être suivie par HPLC-MS, ce qui permettrait d'identifier plus précisément le pyrrole formé.

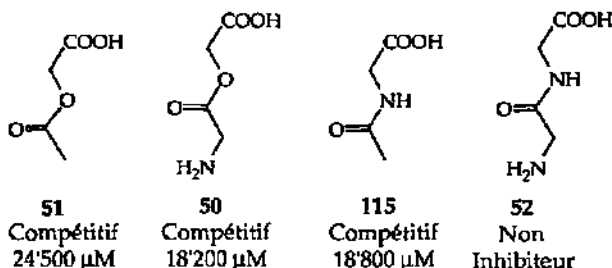


Figure 62: Dérivés esters et amides de ALA (1)

Des études similaires sur des dérivés esters de ALA ont été effectuées par Leeper [107]. Il a observé la non inhibition de la PBGS par l'acide acétoxy-acétique (51) et l'inhibition très moyenne de 50 ( $K_i=26$  mM;  $K_m=0.29$  mM). Il a donc souligné l'importance de la présence du groupe amino dans le cas de la PBGS issue de *B. subtilis*. Leeper a également observé la non stabilité de l'acide acétoxy-acétique (51) dans les conditions du test (20% d'hydrolyse au bout de 10 min, tampon phosphaté  $D_2O$  à  $pH=9.0$ , RT). Dans notre cas, aucun problème d'hydrolyse n'a été observé (tampon phosphaté à  $pH=8.0$ ,  $37^\circ C$ ) et l'introduction du groupe amino n'a pas abaissé la constante d'inhibition d'une manière spectaculaire. Le remplacement d'une fonction cétone par une fonction ester ainsi qu'amide est très défavorable pour la reconnaissance de la molécule par l'enzyme.

Néanmoins le cas de la glycyl-glycine (52) est intéressant puisque des  $K_i$  supérieures à  $150'000$  µM ont été calculés lors des tests et ceci ne permet plus de ranger ce composé dans la catégorie des inhibiteurs (Leeper a fait la même observation [107]).

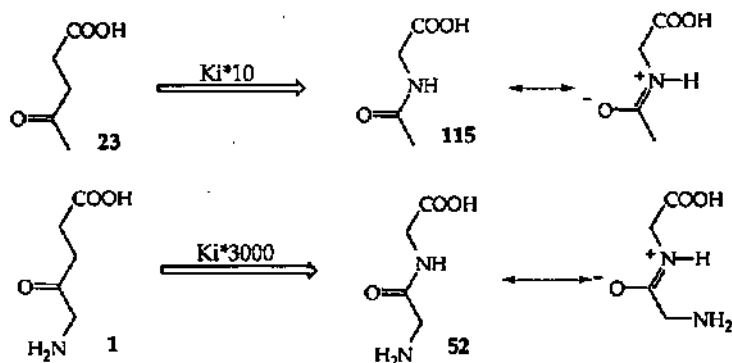


Figure 63: Cas de l'acétyl-glycine (115) et de la glycyl-glycine (52)

Deux points peuvent expliquer cette mauvaise inhibition: on passe d'une part d'une fonction cétone à une fonction amide ce qui explique également le facteur dix qui fait passer la constante d'inhibition de l'acide lévulinique (23) à celle de l'acétyl-glycine (115). La fonction amide introduite ne permet plus de considérer le carbonyle comme un point d'ancrage pour la lysine du site actif, l'inhibition se fait donc sans surprise uniquement dans un site A. D'autre part, cette liaison amide a un certain caractère insaturé (double liaison entre N(3) et C(O)) qui donne une certaine planéité à la molécule. Ces deux aspects sont communs à l'acétyl-glycine (115) et à la glycyl-glycine (52) et n'explique donc pas la différence flagrante entre ces deux composés. La présence de l'amine dans la glycyl-glycine (52) provoque donc une gêne stérique supplémentaire qui augmente sa constante d'inhibition d'un facteur 50 par rapport à l'acétyl-glycine (115).

Le 3-amino-lévulinate de méthyle (53,  $K_i = 19'000 \mu\text{M}$ ) donne des valeurs un peu plus élevées que le dérivé azoture correspondant ( $12'400 \mu\text{M}$ , [39]) alors que la double liaison de l'acide 3-méthylène-lévulinique (54) semble moins gêner puisque l'on obtient un très bon inhibiteur incompétitif avec un  $K_i$  de  $580 \mu\text{M}$ . Ce dernier composé pourrait en fait être plutôt considéré comme un analogue d'intermédiaire potentiel Jordan II.

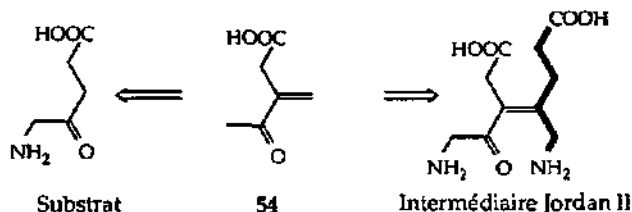


Figure 64: Cas de l'acide 3-méthylène-lévulinique (54)

La suppression de la cétone en position 4 entraîne donc une augmentation des valeurs de  $K_i$  aux alentours de  $20'000 \mu\text{M}$ . Le 4-nitro-butane-1,2-diol (57) a été synthétisé dans le but d'élaborer un inhibiteur efficace dans le site A alliant un groupe nitro très bien reconnu dans le site A et une pince diol pouvant complexer efficacement le zinc, supposé maintenir le second substrat dans le site

A (des dérivés alcool-thiol ont bien entendu été envisagés dans cette optique là). Les résultats qui en découlent sont assez significatifs et montrent qu'une fonction cétone est indispensable en position 4 pour une bonne reconnaissance. Lorsque l'on suit l'évolution des dérivés nitrés 1-nitro-butane (116), 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25) et 4-nitro-butane-1,2-diol (57), on voit que l'on se retrouve bien au niveau des constantes d'inhibition entre le composé nitré possédant une cétone 25 et celui ne possédant aucun substituant 116.

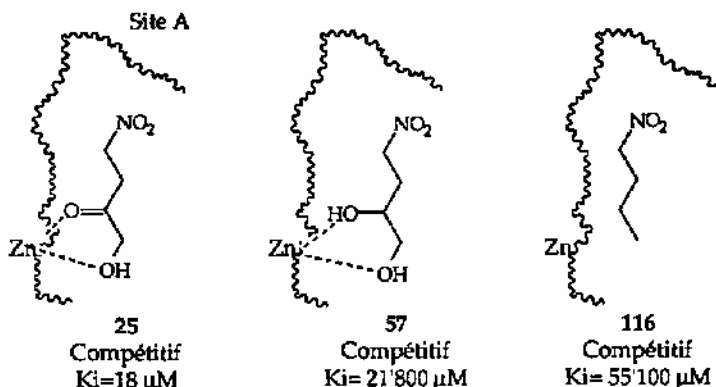


Figure 65: Modification en position 4

Le dérivé hydroxylamine de l'acide lévulinique 56 est également un inhibiteur faible avec un  $K_i$  tournant également aux alentours de 21'500  $\mu\text{M}$ . Le design d'inhibiteurs puissants passe donc par la nécessité d'avoir en position 4 d'une fonction acide, une fonction cétone.

En combinant les résultats obtenus par M. Henz [39] (figure 66) et les derniers résultats obtenus, on arrive à avoir une bonne vue d'ensemble sur les effets de variation de groupe en position 5.

On voit tout d'abord que l'apport de groupes non négativement chargés est mieux accepté que l'absence de groupe qui est décrit par une constante d'inhibition de 2'200  $\mu\text{M}$  pour l'acide lévulinique (23).

Tous ces composés substitués en position 5 sont des inhibiteurs compétitifs à l'exception de deux qui interagissent comme slow-binder et inhibiteur incompétitif. L'inhibition compétitive pure montre que ces composés complexent très bien (par un système de pince) le zinc responsable de la fixation du second substrat.

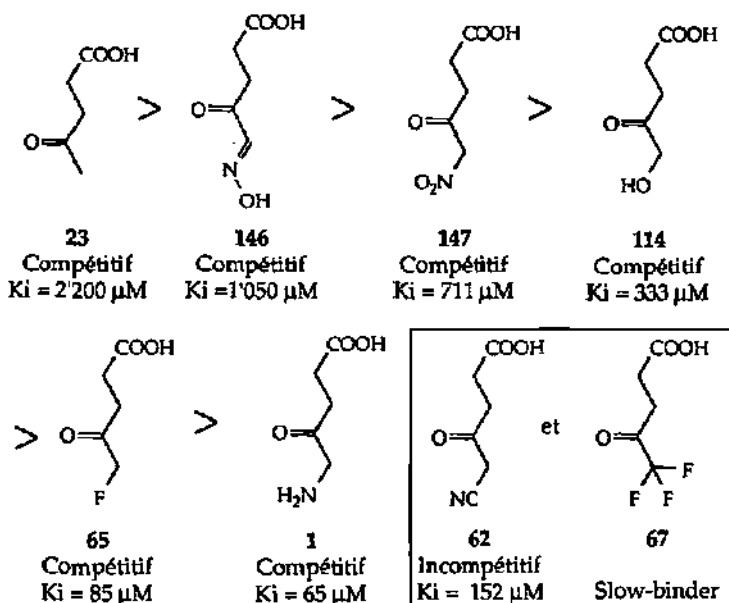


Figure 66: Modification en position 5

Le dérivé N-méthyl de ALA 58 forme en petite quantité un pyrrole. Il serait intéressant de modifier les conditions et de suivre cette formation. F. Stauffer a reproduit cette réaction en milieu basique en l'absence d'enzyme et a observé la formation de deux pyrroles [81]. Ce type d'analogues est intéressant car il permettrait d'éviter par condensation chimique la formation de pyrazine indésirable. Le dérivé N,N-diméthyl de ALA 59 est faiblement reconnu dans le site A (compétitif,  $K_i = 17'200 \mu\text{M}$ ), l'encombrement dû aux deux méthyles ne permet plus d'avoir une bonne reconnaissance. Le composé 60 avec un carbone de plus entre la cétone et l'amine que 59 n'est pas beaucoup moins bien reconnu que ce dernier.

Le raccourcissement de cette chaîne jusqu'à l'obtention d'une fonction amide diminue l'inhibition jusqu'à un  $K_i$  de  $27'600 \mu\text{M}$  pour l'acide succinamique (61).

Le dérivé sulfuré S-méthyl de ALA 63 est mieux reconnu que N,N-diméthyl de ALA 59 (cinq fois mieux), une amélioration certainement due à un encombrement stérique moins important. Un dérivé oxygéné similaire apportera sans aucun doute des informations supplémentaires sur la reconnaissance à ce niveau de la structure.

L'acide 5-cyano-lévilinique (62) ne confirme pas les résultats d'inhibition slow-binding observés pour son ester méthylé 148. La présence d'un groupe fortement électro-attracteur permettait dans le cas de 148 de favoriser la formation de l'énamine dans le site P. Le changement de type d'inhibition entre l'acide et son ester méthylé reste encore inexpliqué.

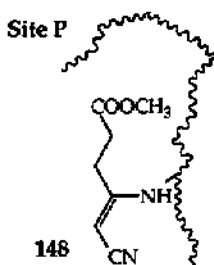


Figure 67: Inhibition du composé 148

Le comportement slow-binding est observé pour l'acide 5,5-trifluoro-lévilinique (67) qui stabilise la base de Schiff. Le cas de 67 est délicat car le carbone en  $\alpha$  de la cétone est totalement substitué par des fluorures. On a pu remarquer que la présence d'un seul fluor ne permet pas de réaliser une stabilisation suffisante pour observer l'effet slow-binding. Il faut néanmoins noter que ce composé trifluoro peut-être défini comme étant un inhibiteur incompétitif/slow-binder, la diminution d'activité étant faible (8% sur une heure). Ceci tendrait plus vers la stabilisation d'une base de Schiff ou d'une forme hydratée de l'iminium (figure 68).

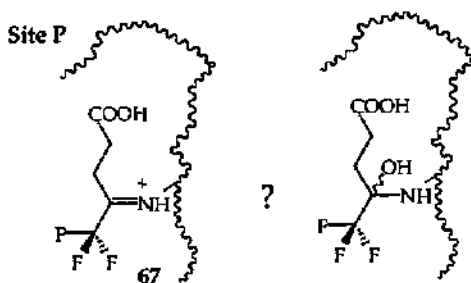


Figure 68: Modification en position 5 entraînant un effet slow-binding

La trifluoro-acétyl-glycine (68) et le 3-(trifluoro-acétyl)-monosuccinate d'éthyle (69) sont dans la suite logique des conclusions tirées sur les autres analogues de substrat.

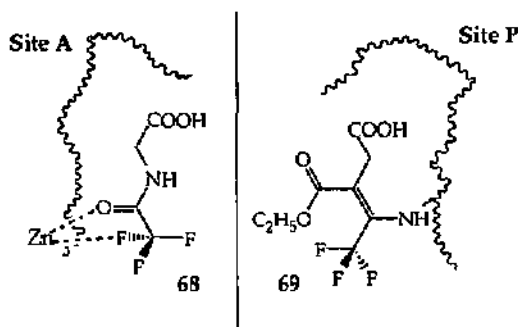


Figure 69: Analogues de substrat avec double modification

L'effet slow-binder de l'acide 5,5,5-trifluoro-lévalinique (67) est dû à une stabilisation de la base de Schiff par la présence des trois fluors en  $\alpha$  du carbonyle. Si on empêche la fixation de ce produit dans le site P en remplaçant la fonction cétone par une fonction amide, cet effet stabilisateur n'a aucune efficacité dans le site A et on retrouve une constante d'inhibition semblable à celle de l'acétyl-glycine (115) ( $18'700 \mu\text{M}$ ). La trifluoro-acétyl-glycine (68) est donc un inhibiteur compétitif de  $K_i$  égale à  $18'800 \mu\text{M}$ . La présence d'un groupe encombrant comme le carboxy-ethoxy dans la structure du composé 69 n'empêche pas la formation de la base de Schiff et les trois fluors peuvent dans ce cas jouer le rôle de stabilisateur et induire ainsi l'effet slow-binding. La forme énamine proposée (figure 69) est la forme la plus semblable étant favorisée par la présence de l'ester en position 3. Il est à noter que la forme non fluorée de ce composé s'est révélée être un inhibiteur compétitif avec une constante d'inhibition d'environ  $23'000 \mu\text{M}$ . L'introduction des fluors a permis l'inhibition dans le site P et a provoqué un changement de type d'inhibition.

M. Henz avait déjà testé deux composés benzaldéhydes qui décrivaient une inhibition slow-binding; le 2-nitro-benzaldéhyde (117) et le 2,4-dinitro-benzaldéhyde (118). Lors de ce travail, deux nouvelles molécules de ce type se sont rajoutées; le 4-nitro-benzaldéhyde (71) et l'acide phthalaldéhydique (72). Les deux nouveaux résultats obtenus diffèrent des précédents puisqu'aucune inhibition slow-binding n'a été identifiée pour ces deux cas.

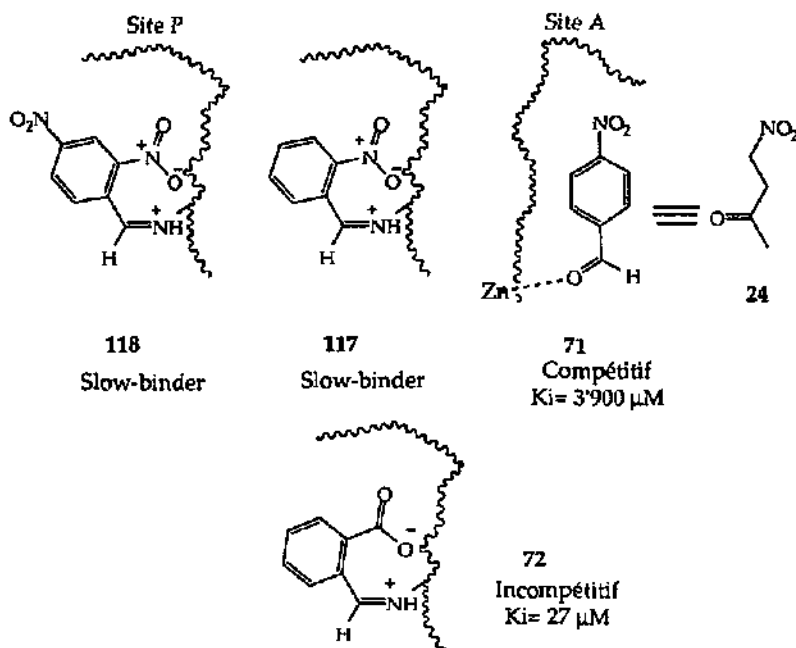


Figure 70: Comportements des dérivés benzaldéhydes

En voyant cette série, on remarque qu'il faut avoir une combinaison groupe nitro et position ortho par rapport à l'aldéhyde pour avoir un slow-binder.

Le remplacement par un carboxylate de la fonction nitro ou le déplacement de celle-ci en position para, ne permet pas d'obtenir de stabilisation de la base de Schiff. Par contre, on observe un changement de site d'interaction puisque le 4-nitro-benzaldéhyde (71) décrit une inhibition compétitive moyenne de 3'900  $\mu\text{M}$ .

Du point de vue électronique, la position ortho et para influent de la même manière, l'explication d'une meilleure inhibition se trouve donc également dans la proximité des fonctions aldéhyde et nitro qui permettent ainsi d'avoir des interactions plus favorables. En fait l'inhibition slow-binding est certainement favorisée par deux facteurs: l'effet désactivateur supérieur du nitro par rapport à la fonction acide carboxylique et l'effet d'interaction supplémentaire par un groupe nitro ou acide carboxylique en position ortho.

Le 2-nitro-benzaldéhyde (117) et le 2,4-dinitro-benzaldéhyde (118) remplissent tout à fait ces conditions, par contre l'acide phthalaldéhydique (72) stabilise moins bien le complexe enzyme-substrat et on aboutit à une inhibition incompétitive qui est du reste très bonne (figure 70).

Le 4-nitro-benzaldéhyde (71) montre que la stabilisation seule avec un groupe nitro en para ne suffit pas et qu'il est alors reconnu comme un analogue de substrat (la position en para et la présence du nitro le favorisant).

Quant au composé furane 74 (figure 71), on ne peut pas estimer son potentiel inhibiteur puisque le blanc effectué sans enzyme et sans ALA montre l'apparition d'une coloration violette avec le réactif de Ehrlich. Cette coloration parasite permet de penser que ce composé, dont la position en  $\alpha$  dans le cycle furane est libre, réagit avec le réactif comme un pyrrole non substitué en  $\alpha$  le ferait.

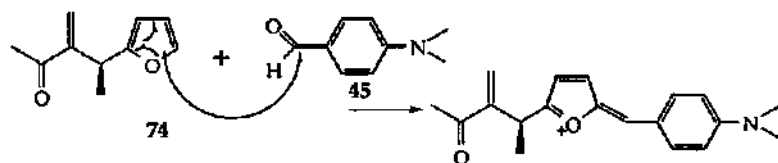


Figure 71: Réaction du composé 74 avec le réactif de Ehrlich

### 5.2.2. Les composés $\beta$ -dicétones

La succinyle acétone (11), abrégée SA, est donc le slow-binder le mieux reconnu de cette série de composés  $\beta$ -dicétones. Des changements structurels à partir de ce composé sont donc très intéressants et pourraient certainement apporter des éclaircissements sur la manière dont est très bien reconnue cette molécule (fixation sur deux sites, stabilisation en énamine ou pas).

Le premier dérivé intéressant à tester est l'analogue nitré de la SA, le 1-nitro-5-oxo-hexane-3-one (76). Cependant, il faut tout d'abord signaler que ce composé ne semble pas très stable à moyen terme dans le tampon à 37°C. Le spectre RMN après 2h d'incubation semble montrer l'apparition de nouveaux signaux correspondant à des protons plus déblindés (départ de la fonction nitro?). La constatation importante est que là encore la fonction nitro semble influencer d'une manière spécifique le type d'inhibition. On est passé d'une inhibition slow-binding excellente à une très bonne inhibition mixte. Ceci indique donc que le groupe nitro n'est pas optimalement reconnu dans le site P ce qui a pour conséquence l'observation d'une inhibition réversible incompétitive et que ce

groupe permet également d'accentuer l'inhibition dans le site A pour renforcer le caractère mixte. On constate par ailleurs que par l'obtention d'une constante d'inhibition 10 fois supérieure à celle de la SA, l'introduction du nitro dans la molécule n'a pas le même effet bénéfique pour les composés interagissant dans le site P que pour ceux interagissant dans le site A.

Cette conclusion permet de rejoindre différentes observations déjà faites précédemment (figure 72):

- l'amélioration de l'inhibition pour les analogues de substrat par l'introduction d'un groupe nitro.
- la non formation de PBG dinitré 145: l'analogue nitré de ALA, le 1-amino-4-nitro-butane-2-one (48) qui est très bien reconnu dans le site A, ne permet pas d'aller jusqu'à l'analogue dinitré du PBG.

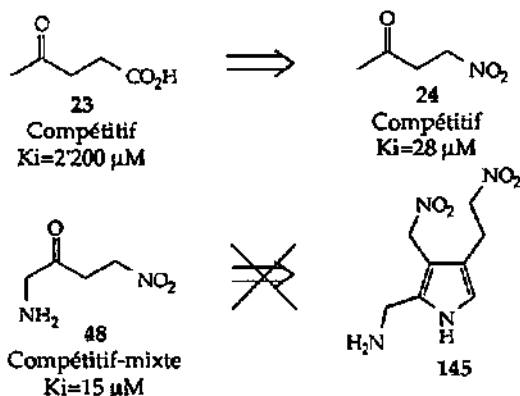


Figure 72: Influence du groupe nitro sur les analogues de substrat

Un deuxième cas de  $\beta$ -dicétones va dans ce sens puisque le 2-(3-nitro-propionyl)-cyclohexanone (83) décrit une très bonne inhibition compétitive mixte de 16  $\mu\text{M}$  par rapport à l'acide 4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (81) qui décrit un effet slow-binding (figure 73).

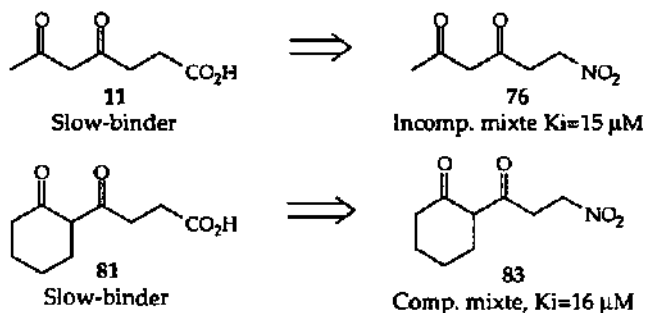


Figure 73: Changement de type d'inhibition par l'introduction d'un groupe nitro dans les composés du type  $\beta$ -dicétones.

Cette valeur de constante d'inhibition est également surprenante car elle met ce composé au même niveau que l'analogue nitré de ALA 48 et 76. L'effet stérique apporté par le cyclohexyle doit être compensé et ceci doit se faire en grande partie par une meilleure complexation du zinc dans le site A par le passage à la forme énol de 83 (figure 74). Il a été démontré que 83 est présent exclusivement sous sa forme énol dans  $\text{CDCl}_3$  (97%) [81]. Cependant 76 est également présent exclusivement sous sa forme énol et on ne peut pas vraiment comparer ces deux composés qui présentent un type d'inhibition différent.

Deux cas réversibles parmi les  $\beta$ -dicétones non-bloquées sur trois sont donc associés à des composés possédant une fonction nitro en position 3 par rapport à l'une des deux fonctions cétones.

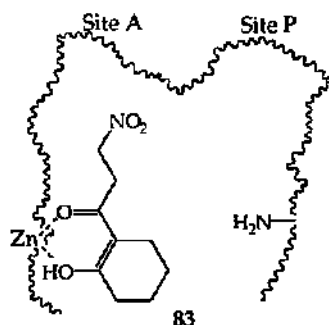


Figure 74: Inhibition provoquée par le composé 83

Un autre composé  $\beta$ -dicétones, l'acide 3-acétyl-lévélinique (86), décrit une inhibition compétitive mixte.

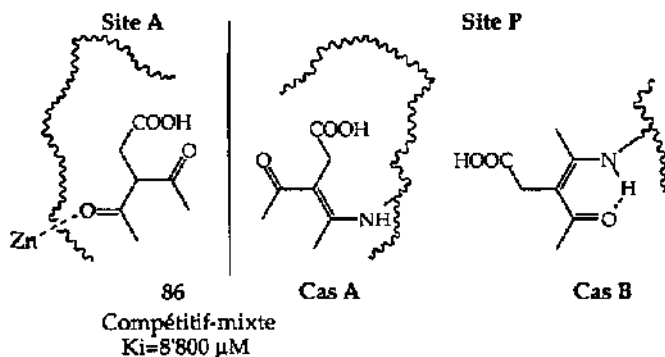


Figure 75 : Inhibition mixte provoquée par le composé 86

86, ayant un caractère compétitif plus prononcé, est plutôt reconnu comme un analogue d'ALA dans le site A. Si par inhibition du site P (mixte), une des deux fonctions cétones forme une base de Schiff de telle façon à avoir reconnaissance du groupe carboxylate (cas A), on peut s'imaginer que la formation d'énamine très probable entre C(3) et C(4), donne une certaine rigidité qui perturbe cette reconnaissance. Si l'énamine se présente suivant le cas B, il n'y a pas

reconnaissance optimale du carboxylate mais possibilité de former des ponts hydrogène. Le cas B semble le plus probable mais ne permet pas d'obtenir un bon inhibiteur ni un caractère slow-binder.

Ce composé a été synthétisé dans le but d'avoir un composé susceptible d'avoir des interactions dans les deux sites par l'intermédiaire de ces deux fonctions cétones et servir ainsi de modèle d'intermédiaires basés sur les mécanismes de Shemin ou Jordan II. La faible inhibition observée ne permet pas de penser que l'on a atteint ce but et un composé ayant un carbone de plus sur une des deux chaînes acétyles serait certainement plus adapté (Chap. 7.2., figure 114). L'inhibition se faisant essentiellement dans le site A, on peut également penser qu'en présence de substrat dans le site P, l'accès de l'inhibiteur possédant une chaîne acétyle est rendu plus difficile d'où un  $K_i$  plus élevé.

A partir de la structure de la succinyle acétone (11), il était intéressant de voir quelle influence peut avoir le raccourcissement ou l'absence de la chaîne succinyle sur les valeurs de  $K_i$ . L'évolution décrite sur la figure 76 est assez nette.

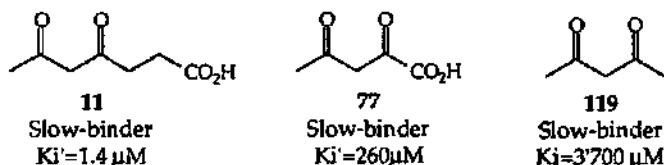


Figure 76: Influence de la chaîne succinyle

Le  $K_i$  est augmenté d'un facteur 20 pour une diminution de deux carbones de la chaîne succinyle et d'un facteur supérieure à 2000 pour l'absence d'une chaîne succinyle. Ce dernier résultat montre donc la nécessité d'avoir une chaîne portant un carboxylate pour obtenir de bons inhibiteurs. Cependant le cas de l'acide acétopyruvique (77) pose un problème intéressant: avec quelle fonction cétone la base de Schiff se forme-t-elle? Autrement dit, l'acide acétopyruvique est-il reconnu comme un analogue de l'acide lévulinique dans le site P ou est-il reconnu comme devrait l'être généralement un composé  $\beta$ -dicétone ?

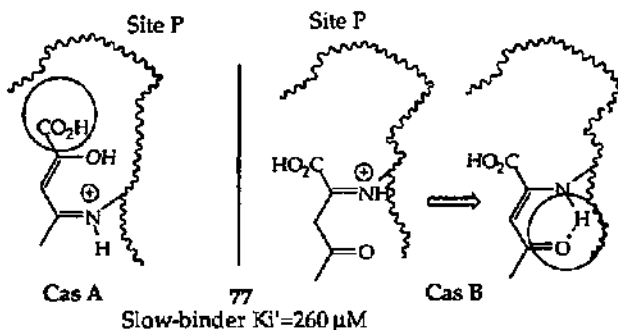


Figure 77 : Inhibition slow-binding provoquée par le composé 77

Le composé 77 étant majoritairement sous forme énol en position C(2)/C(3) (mesuré dans  $\text{CDCl}_3$  et  $d_6$ -DMSO), la cétone en position 4 est la plus réactive [84] et ceci devrait aboutir à la formation d'une base de Schiff de la forme A. Si c'est la fonction cétone en position 2 qui forme la base de Schiff (possibilité B), les liaisons hydrogène stabilisant la forme énamine sont possibles, mais par contre, le carboxylate est dans une position très défavorable pour être reconnu. Vu la réactivité de la cétone en position 4 et la reconnaissance bien que pas optimale du carboxylate, la possibilité A semble être la plus probable des deux.

Dans cette série de composés où l'isomérisation en énamine est l'atout principale de ces  $\beta$ -dicétones, il était intéressant de voir comment se comporteraient ces composés si on affaiblissait cette propriété. Le point principal sur lequel on peut jouer est l'encombrement du carbone central par rapport aux deux fonctions cétones et une série de ces dérivés a alors été testée.

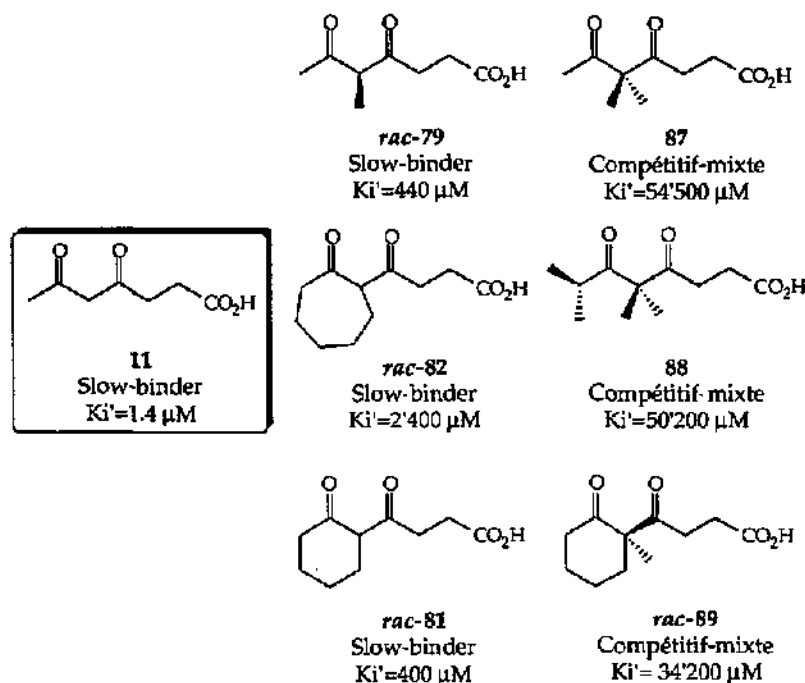


Figure 78: Influence de l'encombrement stérique sur le carbone central

Si on regarde les séries de composés encombrés et bloqués dérivés de la SA (11) pure (sans ester ni dérivés nitrés), on remarque déjà une différence de réversibilité nette entre les  $\beta$ -dicétones ayant encore une possibilité d'isomériser et celles totalement bloquées. L'acide 4,6-dioxo-5-méthyl-heptanoïque (*rac*-79), l'acide 4-(2-cyclohexyl)-4-oxo-butanoïque (*rac*-81) et l'acide 4-(2-cycloheptyl)-4-oxo-butanoïque (*rac*-82) sont des exemples de dicétones encombrées qui décrivent une inhibition slow-binding. Il est également intéressant de souligner que *rac*-81 inhibe à un même degré la PBGS après 30 min que *rac*-79. Cependant, l'apport d'un carbone de plus dans le cycle casse cette similitude et multiplie la constante

d'inhibition par 6 pour *rac*-82. Les composés cyclohexanones *rac*-81 et *rac*-83 sont donc des composés surprenants car qu'ils soient spécifiques au site A (*rac*-83) ou au site P (*rac*-81), ils provoquent des inhibitions similaires à d'autres composés moins encombrés et qui sont plus proches structurellement du substrat naturel. Ces composés seront des inhibiteurs intéressants à étudier dans le cadre de structures tridimensionnelles de complexes enzyme-inhibiteur.

Par le blocage du carbone central, on obtient des composés capables de former une base de Schiff dans le site P mais incapables d'apporter la stabilisation supplémentaire engendrée par une forme énamine.

L'acide 5,5-diméthyl-4,6-dioxo-heptanoïque (87), l'acide 5,5,7-triméthyl-4,6-dioxo-octanoïque (88) et l'acide 4-oxo-4-(2-oxo-(2-méthyl)-cyclohexyl)-butyrique (*rac*-89) démontrent tous les trois une inhibition réversible du type compétitif mixte. Toutes ces inhibitions compétitives faibles ( $K_i$  supérieures à 30'000  $\mu\text{M}$ ) se passent donc majoritairement dans le site A, mais la mixité démontre qu'il y a également inhibition dans le site P. Une fois que le carbone central de la SA est complètement bloqué (cas de 87), l'encombrement stérique d'autres carbones (cas de 88) n'apporte pas de diminution supplémentaire de l'inhibition, on remarque plutôt une stabilisation du  $K_i$ .

Des dérivés encombrés de l'acétyl-acétone (119) ont également été testés et les mono-encombrés font déjà partie de la catégorie des inhibiteurs faibles, ce qui ne facilite pas la compréhension exacte de leur comportement.

Les composés fluorés sont intéressants, car en introduisant une liaison plus forte avec des propriétés chimiques différentes, on restreint l'impact structural par rapport, par exemple, à l'introduction d'un méthyle. Le résultat de l'acide 5,5-difluoro-4,6-dioxo-heptanoïque serait très intéressant car il permettrait de bloquer le carbone central tout en limitant l'encombrement stérique et ceci correspondrait à un modèle de la succinyle acétone (11) incapable de s'isomériser en énamine C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>. Les premiers tests de composés  $\beta$ -dicétones fluorés n'ont pour l'instant pas donné de résultats. Une stabilisation du  $K_m$  ne nous permet pas d'évaluer une valeur de  $K_i$  selon la méthode à laquelle nous nous sommes tenus pour l'évaluation des slow-binder.

L'effet slow-binding est donc bien dépendant de l'encombrement stérique du carbone situé entre les deux cétones, ce qui nous fait supposer que l'on a bien stabilisation de la succinyle acétone par la formation d'une forme énamine entre le carbone C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub>.

Une série de composés de types énamines, énoles-ethers et autres ont été testés dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition utilisé par les composés  $\beta$ -dicétones. Ce type de composés vérifierait la distance nécessaire entre la cétone participant à la base de Schiff et le carboxylate. En effet, les différents composés qui suivent sont des analogues du 4,6-dioxo-heptanoate de méthyle (120) figé dans une ou l'autre de ses formes énoles et il est intéressant de voir comment réagit l'enzyme vis-à-vis de ces composés (double liaison déjà établie entre la cétone en position 4 et le carbone central ou entre la cétone en position 6 et le carbone central).

Les essais d'inhibition en présence de l'ester méthylé de l'acide 6-amino-4-oxo-5-hepténoïque (93) montre une augmentation de la quantité de pyrrole formé par rapport à un essai témoin. L'énamine réagit avec ALA pour former un pyrrole qui fausse le test et cette formation a été suivie par T. Engeloch à l'aide d'études <sup>1</sup>H-RMN. Une quantité équimolaire d'inhibiteur 93 et d'ALA (1) sont dissous dans du tampon phosphaté deutéré. Après 10 min de réaction à température ambiante, la formation d'un pyrrole est déjà bien visible. Des comparaisons avec

des spectres de pyrroles synthétisés attribuent la structure du composé perturbateur au pyrrole 152 (figure 79) [84].

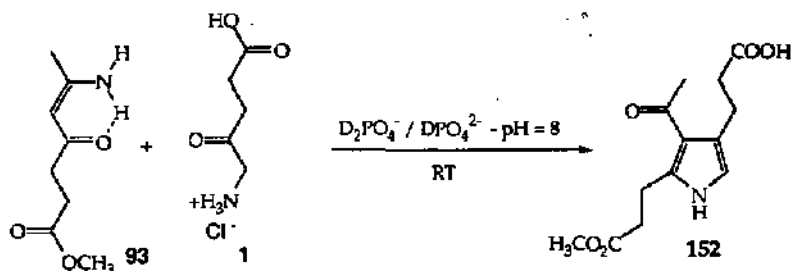
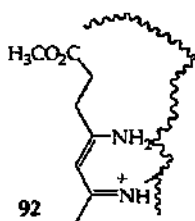


Figure 79: Formation du pyrrole 152 à partir de ALA (1) et l'énamine 93.

La formation de ce pyrrole suit certainement une réaction du type Knorr.

L'inhibition par l'ester méthylique de l'acide 4-amino-6-oxo-4-hepténoïque (92) permet d'avoir une base de Schiff stabilisée et donc d'observer une inhibition slow-binding.

**Possibilité A**



**Possibilité B**

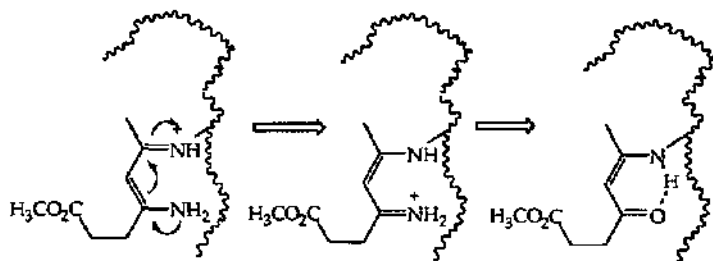


Figure 80: Inhibition slow-binding du composé 92

La fonction cétonique qui forme la base de Schiff est en position 6 par rapport à la fonction ester méthylique, c'est-à-dire deux carbones de trop par rapport à la reconnaissance optimale et s'il y a formation d'énamine, la formation de liaisons hydrogènes ne sera pas favorisée (possibilité A). La seconde possibilité (possibilité B) propose la fixation de la molécule dans l'autre sens: dans ce cas, il y aurait moins de gêne stérique dans le site P, possibilité de former l'énamine et

possibilité de former des ponts hydrogènes (fonction cétone ou amine non protonée).

Vu l'importante tendance à l'hydrolyse des deux dérivés énols ethers (94, 95), ces composés ont été testés avec environ 15-20% de leur produit d'hydrolyse commun, le 4,6-dioxo-heptanoate de méthyle (120). Si ces composés étaient de très bons inhibiteurs, ils auraient décrit une inhibition d'un  $K_i$  inférieur à 300  $\mu\text{M}$ . Ceci n'étant pas le cas, ces composés sont considérés comme de faibles inhibiteurs.

Différents conclusions peuvent déjà être tirées de ces résultats d'inhibition:

- les composés  $\beta$ -dicétones sont généralement des inhibiteurs slow-binder
- la structure de la succinyle acétone (11), inhibiteur slow-binder le plus puissant, suggère que ce type de composé est reconnu comme un analogue de substrat, la première partie de la molécule (carboxylate position 1 / cétone position 4) mimant ALA et la deuxième partie (enchaînement  $\beta$ -dicétone) favorisant la formation d'énamine et donnant ce potentiel d'inhibition puissant
- dans le même sens que la remarque précédente, on peut dire que l'inhibition par la succinyle acétone ne semble pas se faire simultanément dans les deux sites suivant une analogie avec le mécanisme de Jordan II ou Shemin

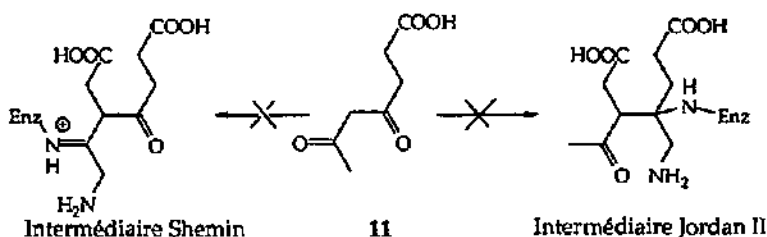


Figure 81: Inhibition simultanée dans les deux sites par la SA

- le remplacement d'un carboxylate par un groupe nitro induit un changement d'inhibition slow-binding à une inhibition réversible.
- l'inhibition compétitive mixte faible des composés  $\beta$ -dicétones bloqués renforce l'hypothèse que ces composés stabilisent par la formation d'une base de Schiff qui s'isomérisse sous une forme énamine.
- la formation d'énamine pourrait se faire suivant une déprotonation en  $\alpha$  de l'iminium (cas A) ou sur la forme hydratée de celui-ci (cas B).

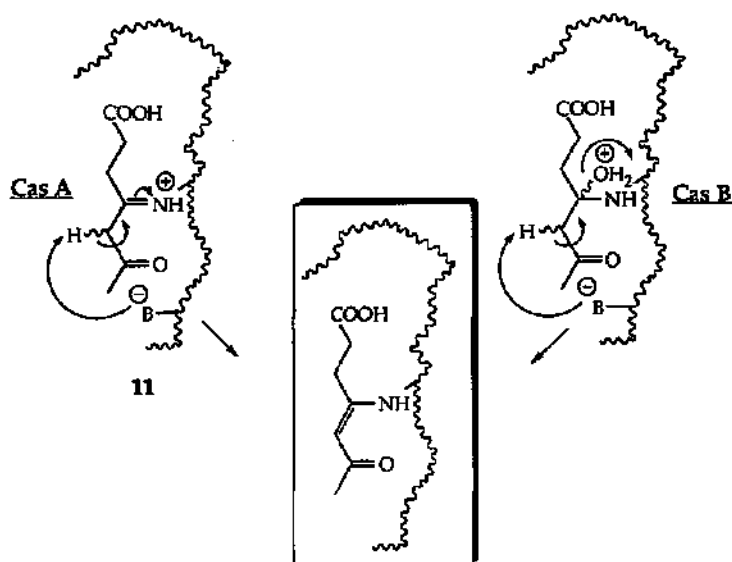


Figure 82: Formation possible de l'énamine

### 5.2.3. Les analogues d'intermédiaires

#### 5.2.3.1. Les diacides

Lorsque l'on regarde, les trois principaux mécanismes proposés, on voit que quelque soit le mécanisme, on passe à un moment donné par un intermédiaire diacide à longue chaîne (figure 83).

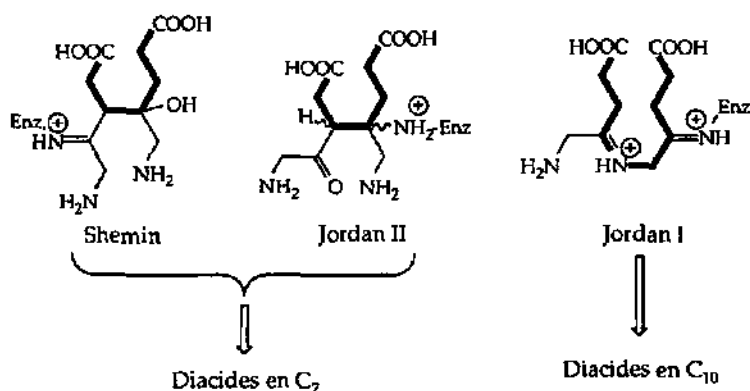


Figure 83: Intermédiaires mécanistiques diacides

Le passage se fait soit par un intermédiaire diacide comportant 5 atomes de carbone entre les deux fonctions acides (Shemin, Jordan II) soit par un intermédiaire comportant 8 atomes de carbone entre les deux fonctions acides (Jordan I). L'intérêt de tester des diacides à chaîne variable entre les deux fonctions acides est donc évident (figure 83).

En analysant ces résultats, le point important qui se dégage est l'obtention de composés céto-diacides irréversibles dont la chaîne carbonée est constituée de 10 carbones (céto-diacides C<sub>10</sub>). Les composés 104, 105 et 108 (figure 84) sont similaires en deux points: ce sont des diacides dont les deux fonctions acides sont séparées par huit atomes et ils possèdent une fonction cétone en position 4 par rapport à une des fonctions acides. Ces composés décrivent une inhibition irréversible par une fixation optimale par trois points de reconnaissance: reconnaissances de chaque fonction acide et reconnaissance de la fonction cétone qui forme une base de Schiff.

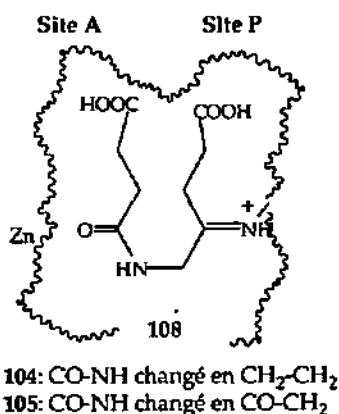


Figure 84: Reconnaissance des céto-diacides C<sub>10</sub>

Ce type de composés semblent être les seuls diacides à Interagir de façon aussi forte avec l'enzyme au point d'obtenir une inhibition irréversible. Ces composés n'ont pas les caractéristiques normales d'inhibiteurs irréversibles déjà identifiés dans le cadre de la PBGS. Les époxydes, synthétisés par M. Marty [124], se sont révélés être irréversibles sans grande surprises [39]. Cependant les céto-diacides C<sub>10</sub> sont très différents de ces composés alkylants. Pour être plus précis, on devrait appeler ces composés "fort slow-binder". La formation d'une base de Schiff est normalement réversible et dans le cas précis de nos céto-diacides C<sub>10</sub>, la réversion se fait de façon très lente, ce qui conduit à l'observation d'une inhibition irréversible.

C <sub>x</sub>	Composé	N°	K <sub>i</sub> (μM)	Type d'inhibition
C <sub>5</sub>		19	8'500	Compétitif
C <sub>6</sub>		20	10'400	Compétitif
C <sub>7</sub>		21	8'600	Compétitif
C <sub>8</sub>		101	82	Incompétitif
C <sub>9</sub>		102	450	Incompétitif
C <sub>10</sub>		104	(-)	Irreversible
C <sub>11</sub>		109	(-)	Slow-binder
C <sub>12</sub>		110	(-)	Slow-binder

Tableau 23: résultats des variations de la chaîne carbonée concernant les céto-diacides

Si nous comparons juste la série concernant les diacides contenant une fonction cétone en position 4 par rapport à une des fonctions acides, on observe une évolution très intéressante avec l'extension de la chaîne carbonée (tableau 23). Les premiers céto-diacides 19, 20 et 21 inhibent compétitivement l'enzyme et sont reconnus dans le site A comme des analogues de substrat [39].

Vient ensuite l'analogue C<sub>8</sub>, l'acide 4-oxo-octane-1,8-dioïque (101), pour lequel une inhibition incompétitive excellente est observée.

Ceci signifie donc que l'interaction enzyme-inhibiteur n'a plus seulement lieu dans le site A mais simultanément dans les deux sites. On peut alors imaginer que la chaîne carbonée est assez longue pour permettre cette double interaction et

que la reconnaissance des deux fonctions acides s'est faite, ainsi que la formation de la base de Schiff. Cette hypothèse d'une meilleure fixation de l'inhibiteur quand la longueur de la chaîne carbonée augmente est renforcée par les résultats des autres composés. La présence de l'acide 4-oxo-nonane-1,9-dioïque (102) provoque une inhibition incompétitive avec un potentiel d'inhibition un peu moins important que 101. Cette différence peut provenir d'une meilleure interaction avec la conformation prise par un diacide en C<sub>9</sub>. L'acide 4-oxo-sébacique (104), l'analogue C<sub>10</sub>, inhibe irréversiblement l'enzyme. Cet inhibiteur a la longueur optimale et toutes les fonctions nécessaires pour se fixer très fortement à l'enzyme. Les deux composés dont la chaîne carbonée est plus longue, l'acide 4-oxo-undécane-1,11-dioïque (109) et l'acide 4-oxo-dodécane-1,12-dioïque (110), décrivent une inhibition slow-binding qui montrent que les reconnaissances s'effectuent toujours sans problème mais qu'avec une longueur supérieure à la longueur optimale, la fixation est moins efficace et on arrive à dissocier le complexe enzyme-inhibiteur à l'aide d'une dialyse.

En résumé, si la chaîne est trop courte, les diacides sont reconnus comme des analogues de substrat, si la chaîne est tout juste plus courte que la longueur optimale, l'inhibiteur interagit dans les deux sites et on est en présence d'inhibiteurs incompétitifs. Dans le cas optimal d'une chaîne à dix atomes, on observe une inhibition irréversible et dans le cas de chaînes un peu plus longues, la double interaction est toujours présente mais on observe cette fois-ci une inhibition slow-binding. Dans cette série de céto-diacides, on peut voir d'une manière progressive et intéressante tous les types d'inhibition observées lors des études d'inhibition de la PBGS.

En revenant sur nos intermédiaires mécanistiques, on voit qu'un des résultats important de cette série est la différence significative entre l'inhibition compétitive et faible engendrée par l'acide 4-oxo-pimélique (21) et l'irréversibilité engendrée par l'acide 4-oxo-sébacique (104). Ces deux composés confrontent directement l'intermédiaire Shemin/Jordan II à l'intermédiaire Jordan I. D'autre part, l'introduction de la fonction cétone sur l'acide pimélique (22) pour obtenir 21 ne montre qu'une légère amélioration de l'inhibition (Chap.2., figure 25), tandis que la même introduction sur l'acide sébacique provoque un changement d'inhibition compétitive moyenne à une inhibition irréversible. Cette introduction de cétone en position 4 d'une des fonctions acides crée une molécule qui est si fortement reconnue par l'enzyme qu'elle inhibe irréversiblement celle-ci. De plus, les analogues d'intermédiaire de Shemin, *rac*-18/I et *rac*-18/II n'ont pas donné de résultats spectaculaires ( $K_i > 10^5$   $\mu$ M). La conclusion rapide et évidente que l'on peut tirer de ces résultats est que la dépendance du type d'inhibition en fonction de la longueur de la chaîne carbonée telle qu'elle est décrite ici est un argument en faveur du premier mécanisme de Jordan.

Un autre composé céto-diacide C<sub>10</sub>, l'acide 4,7-dioxo-décane-1,10-dioïque (105) a été testé (figure 85).

Ce composé, qui possède deux cétones, inhibe l'enzyme d'une façon plus prononcée que l'acide 4-oxo-décane-1,10-dioïque (104). Pour une même concentration (0.41 mM), 105 inhibe après 30 min trois fois plus que 104. On peut donc imaginer que 105 a plus de capacités à inhiber l'enzyme, car la symétrie de la molécule facilite l'accès par un côté ou l'autre du site actif ou que l'interaction de la cétone qui ne forme pas une base de Schiff avec un zinc améliore l'inhibition.

Finalement, on peut également faire les remarques suivantes sur les résultats des autres diacides testés: l'inhibiteur le moins bon de la série est 106 (figure 85) avec un  $K_i = 23^000$   $\mu$ M qui possède une fonction amide et aucune fonction cétone. Plus

surprenante est la valeur de 8'300  $\mu\text{M}$  pour la constante d'inhibition de 107 qui est un inhibiteur compétitif avec un potentiel d'inhibition proche de celui de l'acide sébacique. L'introduction du groupe CO-NH-NH-CO n'affecte pas l'inhibition par rapport à l'acide sébacique (103).

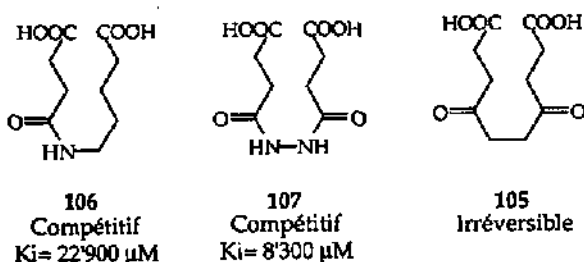


Figure 85: Composés 106, 107 et 105 diacides en  $\text{C}_{10}$

Ce type de céto-diacide en  $\text{C}_{10}$  n'a été rencontré qu'une fois dans la littérature dans le cadre de l'inhibition de la PBGS (figure 86). Leeper a décrit la synthèse et le test d'un analogue d'intermédiaire Jordan I *rac-42* [107], mais aucune inhibition n'a été visible sur la PBGS de *Bacillus subtilis*.

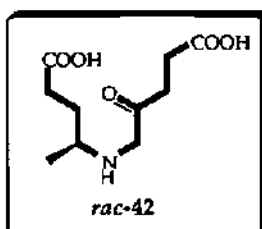


Figure 86: Analogue d'intermédiaire de Jordan I testé par Leeper [107]

Si nous analysons la structure de cette molécule, on voit qu'elle remplirait les conditions idéales pour provoquer une inhibition irréversible et il serait intéressant de la tester sur la PBGS issue de *Escherichia coli*.

### 5.2.3.2. Les dérivés mixtes

A la suite des résultats obtenus dans la classe des céto-diacides  $\text{C}_{10}$ , nous voulions voir si il était possible de réaliser des changements de type d'inhibition sur cette classe de composés comme ce fut le cas pour celle des  $\beta$ -dicétones. Ces composés sont tout-à-fait adéquats pour faire ce type d'études, car ils ont l'avantage d'interagir dans les deux sites simultanément et c'est un point sur lequel nous pouvons jouer. Le composé standard diacide choisi est 108 (figure 84), car d'une part il est composé de deux parties bien distinctes (une pouvant former une base de Schiff, l'autre pas) et d'autre part, on peut facilement synthétiser des dérivés à partir de ce composé. Par la position de la fonction cétone, nous avons un point de repère pour savoir quel groupe inhibe quel site.

Les différents types d'inhibition observés dans cette catégorie (Chap. 4, tableau 21), nous disent d'ores et déjà que nous avons réussi en introduisant des fonctionnalités différentes des deux fonctions acides de l'inhibiteur irréversible de base 108 à modifier le type d'inhibition et par conséquent, le site d'interaction.

Les hypothèses de départ que nous essayons de vérifier par cette série de dérivés mixtes du composé 108 sont les suivantes:

- les céto-diacides C<sub>10</sub> ou un dérivé ayant des fonctions équivalentes, inhibent irréversiblement l'enzyme par une reconnaissance optimale de l'inhibiteur. L'interaction dans les deux sites, appuyée fortement par la formation d'une base de Schiff, lui permet de stabiliser le complexe enzyme-inhibiteur de telle façon à ce qu'une inhibition irréversible soit visible.
- le groupe nitro est mieux reconnu dans le site A que dans le site P suivant les résultats obtenus avec les cyclohexanones, 2-(3-nitro-propionyl)-cyclohexanone (83) et l'acide 4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (81), ainsi que la diminution de la valeur de la constante d'inhibition K<sub>i</sub> par l'introduction d'un groupe nitro dans le cas des analogues de substrat.
- un inhibiteur montrant une inhibition compétitive inhibe essentiellement le site A, alors que celui montrant une inhibition incompétitive ou slow-binder inhibe majoritairement le site P (sans exclure la mixité).

Le résultat de l'acide 6-(3-nitro-propionyl)amino-hexanoïque (114) (compétitif, 18'200 μM) montre immédiatement qu'un composé alliant une fonction nitro ainsi qu'une fonction acide carboxylique sans posséder de fonction cétone en position 4 donne un inhibiteur faible. Ceci indique une fois de plus la nécessité d'avoir une fonction cétone.

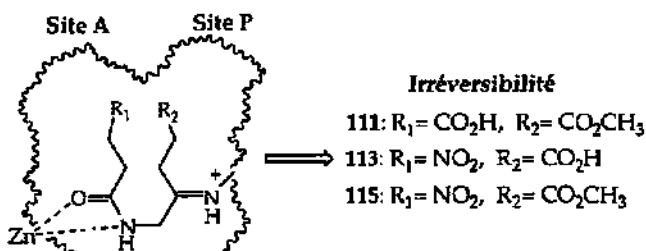


Figure 87: Cas d'irréversibilité dans la classe diacides mixtes

Lorsque l'on regarde les différents cas d'irréversibilité (figure 87), nous pouvons définir une structure type d'irréversible et également prévoir les groupes fonctionnels acceptés (figure 88).

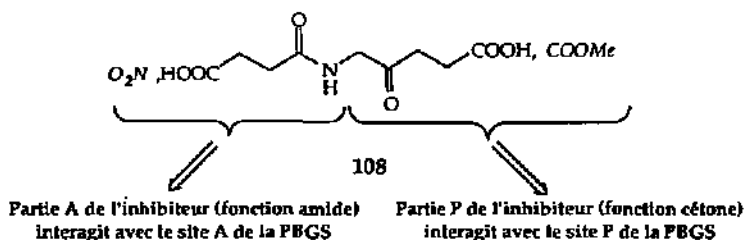


Figure 88: Structure-type d'un diacide mixte irréversible

Nous voyons déjà que pour chaque partie de l'inhibiteur, seule une autre fonction peut remplacer le carboxylate et celle-ci diffère suivant la partie concernée (une preuve de plus que les deux fonctions carboxylates ne sont pas reconnues de manière similaire). Le groupe nitro est accepté à la place du carboxylate dans la partie interagissant dans le site A, ce qui confirme bien une de nos hypothèses de base (page 104). Tandis que la formation de la base de Schiff et la possibilité d'avoir un inhibiteur irréversible n'est pas empêchée par la fonction ester méthylé introduite dans la partie P de l'inhibiteur.

Concernant ces inhibiteurs irréversibles, une comparaison intéressante a été effectuée sur les rapidités d'inactivation des inhibiteurs 108 et 113. Cette comparaison trouve sa raison d'être dans le fait que l'on pense que 113 devrait être mieux reconnu que 108, le composé 113 ayant une fonction nitro dans la partie A de l'inhibiteur. Il a été prouvé, notamment pour différents analogues de substrat, que le nitro est mieux reconnu que le carboxylate dans le site A. Pour ces analogues qui décrivent une inhibition compétitive réversible, on a constaté par l'introduction d'une fonction nitro à la place d'un carboxylate, une amélioration de l'inhibition qui se traduit par une constante d'inhibition  $K_i$  plus petite.

Pour les inhibiteurs irréversibles, le calcul des constantes d'inhibition n'étant pas possible, on a voulu estimer l'effet de l'introduction du groupe nitro par une mesure des vitesses d'inactivation dans les mêmes conditions et concentrations. En comparant les pourcentages d'activités, on s'aperçoit que l'inactivation par le composé nitro-acide 113 est 8 à 9 fois plus rapide que par le diacide 108, ce qui consolide nos hypothèses. Pour comparer l'effet de l'introduction de l'ester méthylé, il suffit de comparer le composé 108 au composé 111. Un test simultané n'a pas été effectué (les concentrations pour obtenir une inhibition, étant déjà trop différentes), mais il faut, pour avoir une meilleure inhibition, utiliser cinq fois moins de composé 108 que de composé 111. Ceci nous indique déjà que l'introduction du groupe ester méthylé permet l'irréversibilité mais que l'inhibiteur proposé est moins bien reconnu par l'enzyme.

Les cas des inhibiteurs réversibles 116 et 117 (figure 89) sont tout aussi intéressants. On voit assez rapidement que l'introduction du groupe nitro dans la partie P de l'inhibiteur perturbe l'enzyme qui ne décrit plus une inhibition irréversible mais une inhibition compétitive mixte. Celle-ci se déroule alors majoritairement dans le site A ce qui nous fait penser que l'inhibiteur est reconnu alors comme un analogue de substrat. La partie comportant le groupe nitro est très certainement reconnue dans le site A et il n'y a donc plus possibilité de former la base de Schiff (ou très partiellement d'où le caractère mixte de l'inhibition) puisqu'il ne reste que la fonction amide dans l'autre partie de la molécule. Par contre au vu des bonnes valeurs de  $K_i$  (similaire aux analogues de ALA nitrés), il y a tout de même reconnaissance du groupe nitro et de l'ester méthylé dans le site P. D'ailleurs, la meilleure valeur de  $K_i$  de 116 par rapport à 117 s'explique par une meilleure reconnaissance du groupe ester méthylé que du groupe nitro dans le site P.

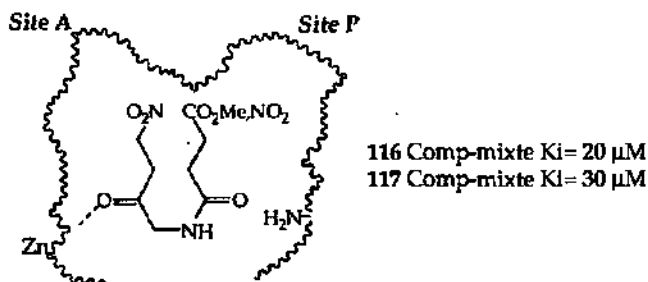


Figure 89: Inhibition sélective provoquée par les composés 116 et 117

Le cas du composé 112 (figure 90) est inverse aux deux cas précédents. Ici une inhibition incompétitive pure a été observée qui résulte d'une inhibition majoritaire dans le site P.

On peut également penser que dans ce cas-ci, il y a rupture de la double reconnaissance mais ici due à une mauvaise reconnaissance dans le site A. L'ester méthylé est très mal reconnu dans le site A, ce qui est également le cas pour les analogues de substrat comme l'ester méthylé de l'acide lévulinique qui n'est pas un inhibiteur de la PBGS [39]. La formation normale de la base de Schiff sans double interaction conduit donc à une inhibition incompétitive.

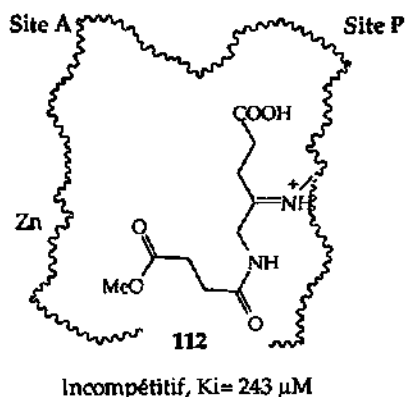


Figure 90: Inhibition sélective du composé 112

Nous avons donc par le biais de groupes fonctionnels spécifiques à un site de reconnaissance, obtenus des inhibiteurs sélectifs et confirmé par la même occasion toutes nos hypothèses de départ (page 104).

### 5.3. Conclusions mécanistiques

Les recherches de notre groupe se sont tournées dans un premier temps vers l'hypothèse de Shemin. Ceci s'explique par l'analogie inévitable faite avec la classe des aldolases mais également par les résultats obtenus lors de la mise au

point d'une synthèse biomimétique du PBG. En effet, cette synthèse, basée sur le mécanisme de Shemin [82], passe dans un premier temps par une condensation aldolique du type Mukaiyama (Chap. 2, figure 21). Lorsque tous les éléments sont en place (fonctions amines déprotégées), la formation de pyrrole se fait spontanément. Il suffit donc que la liaison C-C soit formée pour que le reste des réactions s'enchaîne. Le mécanisme proposé par Shemin semblait donc être une voie attrayante.

Les résultats de R. Lüönd comparant le pyrrole mixte formé lors de l'addition d'ALA à l'acide lévulinique (23) au composé postulé par Shemin (synthétisé), ont montré que les deux composés n'étaient pas identiques [27].

Ces résultats appuyés par les résultats d'inhibition décevants des analogues d'intermédiaires de Shemin (Chap. 2.2.1.), nous ont fait explorer les autres possibilités. M. Henz a opté suivant les résultats intéressants de "Single turnover" avec du substrat marqué de Jordan [23,29] et l'analogie avec les aldolases, pour le second mécanisme de Jordan [39]. Ce mécanisme présente l'inconvénient de ne pas conserver la liaison covalente enzyme-substrat plus de trois étapes lors de la formation du PBG.

Au début de mon travail, nous avons gardé comme hypothèse la formation de la base de Schiff dans le site P et nous avons orienté les tests d'inhibition vers les analogues d'intermédiaires. Les composés diacides étaient donc l'occasion idéale de confronter directement des analogues d'intermédiaires de Jordan I avec ceux de Jordan II. Les résultats obtenus lors de la variation de la chaîne carbonée des céto-diacides (C<sub>10</sub> irréversibles) sont très favorables au mécanisme de Jordan I. Cependant, Jordan avait lors de tests d'inhibition de diacides mentionné que les diacides à longue chaîne inhibaient de manière non spécifique l'enzyme en interagissant avec des régions hydrophobes de celle-ci [68]. L'évolution du type d'inhibition lors de l'extension de la chaîne carbonée des céto-diacides ainsi que les inhibitions observées pour les diacides mixtes ne nous fait en aucun cas douter de la spécificité de ces inhibitions. Par contre, ces résultats ne permettent pas d'exclure totalement l'hypothèse de la formation initiale d'une liaison C-C, l'espace occupé par un céto-diacide C<sub>10</sub> pouvant être également occupé par un intermédiaire Jordan II/Shemin.

De plus, la récente détermination de la structure rayons-X de la PBGS issue de levure [49] a donné des informations structurales supplémentaires quant au site actif dont il faut tenir compte. Ces nouvelles données mettent au premier plan deux points: la fonction importante d'une seconde lysine (état protoné) et la présence du zinc métallique entourée de trois cystéines et d'une molécule d'eau près du site actif. Pour l'instant aucune publication ne traite intégralement d'expériences plus approfondies concernant le rôle de cette seconde lysine et du zinc. Cependant, Jordan mentionne brièvement quelques résultats non publiés [69,78,79]:

- la structure de la PBGS issue de *E. coli* en présence d'acide lévulinique suggère que le carboxylate situé dans le site P interagit avec les résidus Tyr-312 et Ser-273 (résidus conservés suivant les structures primaires de différentes souches).

- la mutation de la Lys-210 sur la PBGS issue de levure conduit à l'incapacité de la Lys-263 de jouer son rôle de nucléophile.

Sans expériences plus approfondies, nous ne pouvons pas connaître exactement le rôle du zinc ou encore de la seconde lysine, mais nous pouvons par contre émettre des hypothèses les concernant.

Rôle possible du zinc métallique

La structure rayons-X a donc mis en évidence la présence aux abords du site actif du zinc métallique complexé par trois cystéines (Cys-120, Cys-122 et Cys-130, *E. coli*) et éventuellement par une molécule d'eau, alors que les précédentes études avaient plutôt tendance à souligner le rôle structurale de ce zinc. Ce zinc peut difficilement jouer son rôle d'acide de Lewis si le substrat au site A se coordine en cinquième. Ce cas de figure oriente les investigations vers la possible formation d'un hydroxyde métallique qui jouerait un rôle dans les déprotonations impliquées dans le mécanisme.

Cependant en absence d'éléments supplémentaires, il faut être prudent car la seconde région de fixation métallique moins bien définie et plus éloignée du site actif (zinc entouré de ligands plus polaires: Cys, Tyr, His) semble être dans une région de l'enzyme qui se réajuste après fixation du premier substrat.

Rôle possible de la seconde lysine

La fonction de la seconde lysine semble donc être primordiale suite aux premiers essais de mutation et plusieurs possibilités quant à son rôle peuvent être envisagées:

- cette lysine protonée peut tout simplement avoir un rôle dans la régulation du pH au niveau du site actif de l'enzyme
- elle semble diminuer le pKa de la lysine 247-base de Schiff (*E. coli*)
- elle peut avoir un rôle important dans le maintien de la structure
- elle peut faciliter par une charge positive l'approche et la mise en place du substrat dans le site P
- et elle peut également avoir un rôle direct dans le mécanisme dans des étapes de protonation et de déprotonation.

Jordan à la suite de ces informations a porté sa préférence sur le mécanisme Jordan II tout en n'excluant pas le mécanisme Jordan I. Il a proposé une déprotonation par l'hydroxyde métallique en C(3) du substrat situé dans le site A qui est suivie par la formation d'une liaison C-C. Après cyclisation, il propose que la lysine impliquée dans la formation de la base de Schiff (libre à ce stade) enlève le proton *pro-R* lors de l'aromatisation.

Mécanisme proposé

Le mécanisme qui suit reprend donc le mécanisme de Jordan I en incorporant ces nouveaux éléments: le zinc et la molécule d'eau qui agissent sous la forme d'un hydroxyde métallique et la seconde lysine protonée qui est directement impliquée dans des étapes de protonation et déprotonation.

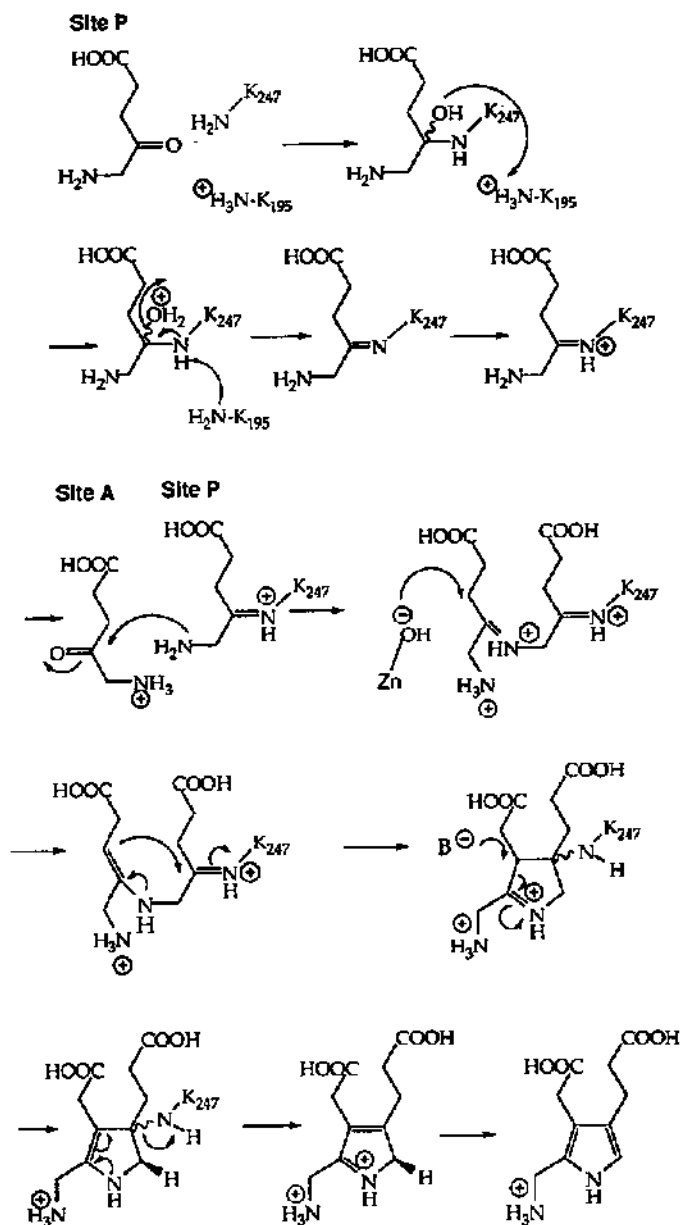


Figure 91: Mécanisme proposé pour la PBGS issue de *E. coli*

## 6. Synthèse d'inhibiteurs

Trois distinctes parties faisant intervenir de la synthèse sont décrites dans ce chapitre. La première partie porte sur la recherche d'un biocatalyseur susceptible d'hydrolyser des époxydes nitrés en composés diols énantiomériquement enrichis. Ces diols pourraient être des inhibiteurs intéressants de la PBGS. La seconde partie traite à nouveau du travail concernant les analogues d'intermédiaire de Shemin (séparation d'énantiomères et amélioration d'une étape de synthèse) et la dernière partie décrit la synthèse d'un analogue de substrat nitré.

### 6.1. Hydrolyse énantiosélective de diols nitrés (Stage effectué dans le groupe du Pr. K. Faber, T-U Graz)

#### 6.1.1. Objectifs

Des composés nitrés ayant été plusieurs fois décrits comme étant de bons inhibiteurs de la porphobilinogène synthase, une des idées de départ de ce travail était de développer de nouveaux composés susceptibles d'avoir un potentiel d'inhibition intéressant à partir d'époxydes nitrés. Lors d'un stage dans le groupe du Pr. K. Faber, j'ai pu étudier les hydrolyses enzymatiques d'époxydes. L'ouverture d'époxydes nitrés n'ayant pas encore été réalisée par ce groupe, il était intéressant de voir comment se comportaient ces dérivés nitrés très polaires en présence d'enzymes issues de différentes souches que l'on nomme époxyhydrolases (EH). Deux composés nitrés ont été synthétisés à cette intention, l'un monosubstitué, l'autre étant 2,2-disubstitué (figure 92).



Figure 92: Dérivés nitrés testés

Jusqu'à présent, les seuls résultats concernant des substrats polaires semblaient montrer que les composés possédant un caractère polaire inhibent l'enzyme. Ceci pourrait être une conséquence de la fonction principale des EH qui ont la tâche d'hydrolyser dans la métabolisation des xénobiotiques des substrats peu polaires en composés plus polaires. Dans un premier temps, l'ouverture enzymatique d'époxydes en présence de différents nucléophiles semblait être la voie qui pouvait nous apporter la plus grande variété de composés. Mais la mise en oeuvre de ces réactions n'est pas optimal et fournit environ 50 % de diol résultant de l'hydrolyse enzymatique simple [127]. L'ouverture enzymatique a donc été utilisée sans nucléophile afin d'obtenir un diol dont on pourrait ensuite transformer la fonction alcool primaire en tosylate et introduire ainsi les groupements désirés.

#### 6.1.2. Les époxyhydrolases

##### 6.1.2.1. Rôle des époxyhydrolases

Les époxyhydrolases, enzymes catalysant l'hydrolyse régiosélective et énantiosélective des époxydes, joue un rôle déterminant dans la métabolisation des xénobiotiques [128]. Dans les cellules vivantes, les composés aromatiques peuvent être métabolisés selon deux schémas:

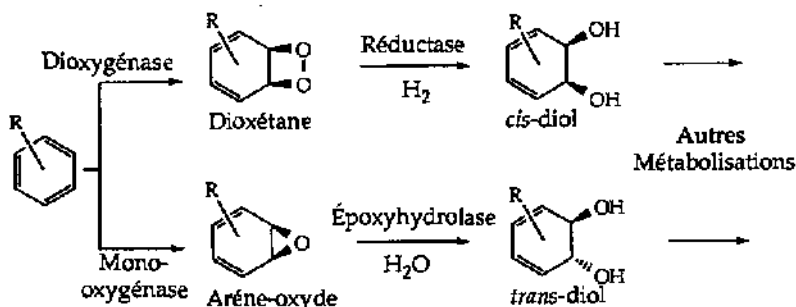


Figure 93: Rôle des époxyhydrolases dans la décomposition des composés aromatiques [129]

a) Dans les cellules procaryotiques, les dioxygénases catalysent la cycloaddition d'oxygène moléculaire sur la double liaison afin de former une dioxétane. Celle-ci est ensuite réduite par une réductase sous la forme d'un *cis*-1,2-diol biologiquement plus inoffensif.

b) Pour les eucaryotes (champignons, mammifères), le chemin suivi diffère. Il implique une monoxygénase qui additionne sur une double liaison de l'aromatique un oxygène. Ceci aboutit à la formation d'un composé arène-oxyde très réactif et toxique. Les EH interviennent ici en hydrolysant cet arène-oxyde, cancérigène et tératogène par son caractère alkylant, en un *trans*-1,2-diol, plus inoffensif. Ce composé, présentant une solubilité dans l'eau plus importante et deux groupements hydroxyles qui sont des positions assez réactives dans la molécule, est le candidat idéal pour de futures métabolisations [129].

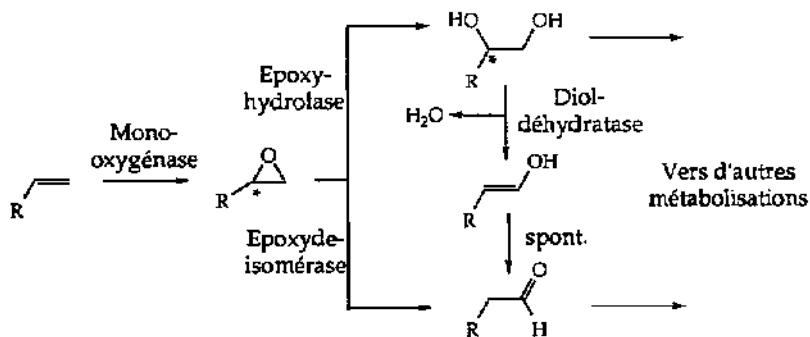


Figure 94: Rôle des époxyhydrolases dans la décomposition des alcènes [129]

En ce qui concerne les alcènes, ceux-ci peuvent être métabolisés par le passage à un époxyde, suivi par la formation d'un diol en présence d'une EH (figure 94).

Celui-ci peut être directement métabolisé ou conduire à un composé carbonylé par l'action d'une diol-déhydratase (même résultat avec une époxyde-isomérase) qui sera également ultérieurement métabolisé [130].

#### 6.1.2.2. Structure des époxyhydrolases

Comparé à d'autres classes d'enzymes, les EH sont encore un groupe d'enzymes sur lequel peu de recherches ont été effectuées. Jusqu'à présent, ces recherches se portaient essentiellement sur les cellules issues d'eucaryotes. Depuis peu, à l'institut de chimie organique TU-Graz, une EH issue de procaryote présentant une grande sélectivité a été isolée et caractérisée [131].

Les époxyhydrolases de cellules d'eucaryotes sont généralement localisées dans le foie, organe où elles présentent une activité supérieure, mais aussi dans les reins, intestins et poumons. Elles sont isolées à partir de souris, de rats, de cobayes, de lapins, de porcs et de singes. On distingue trois types d'EH: les époxyhydrolases microsomiales (m-EH, les mieux connues) [132,133], les époxyhydrolases cytosoliques (c-EH), et également des époxyhydrolases spécifiques à l'hydrolyse des 5,6-époxystéroïdes.

Les EH de procaryotes sont facilement accessibles et représentent une source d'enzyme moins onéreuse. Ces caractéristiques ne peuvent que favoriser une utilisation industrielle future. Une enzyme isolée à l'institut à partir de la bactérie *Rhodococcus* sp. NCIMB 11216 [131,134-136] présente une haute sélectivité lors de l'hydrolyse d'époxydes 2,2-dialkylsubstitués.

#### Caractéristiques de l'EH de *Rhodococcus* sp. NCIMB 11216

- . protéine sous forme de monomère de masse molaire 35 kDa
- . pas d'atomes métalliques
- . pas de groupes prostétiques visibles dans la région U.V.
- . pH optimal pH=8, température optimale 30°C

#### 6.1.2.3. Mécanisme des époxyhydrolases

Le mécanisme de l'hydrolyse catalysée par des EH repose sur une addition d'eau sur des époxydes ou des arène-oxydes pour donner des diols vicinaux. En fait, le mécanisme qui n'utilise aucun groupe prosthétique ou ion métallique a été longtemps l'objet de beaucoup de discussions. Il a été un certain temps accepté que le cycle oxirane était ouvert par l'attaque directe d'un nucléophile, ceci en présence d'eau sous des conditions de catalyse basique aidée par un résidu histidine [129]. A partir d'expériences utilisant  $H_2O^{18}$ , de nouvelles informations ont été apportées sur le mécanisme des m-EH de mammifères. Il a été montré que la réaction passait par la formation d'un intermédiaire monoester de glycol - enzyme [137] (figure 95). Celui-ci est formé vraisemblablement par l'attaque nucléophile d'un aspartate sur le cycle oxirane conduisant à la formation d'une liaison covalente. Cette liaison ester est ensuite hydrolysée par un ion hydroxyle qui provient de la déprotonation d'une molécule d'eau par une base (probablement une histidine) qui libère ainsi le glycol.

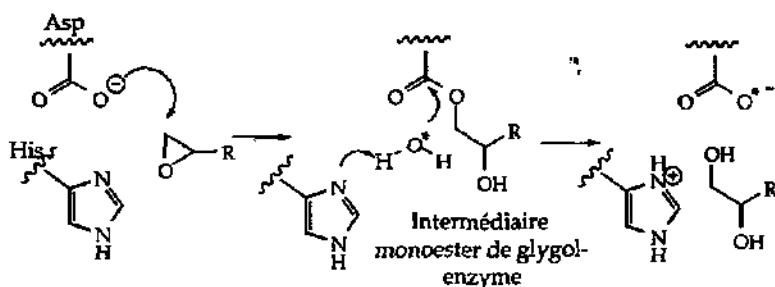


Figure 95: Mécanisme des époxyhydrolases microsomiales

Une conséquence stéréochimique de ce mécanisme est l'ouverture *trans*-spécifique du cycle oxirane qui incorpore un oxygène de l'eau dans le substrat. A la suite d'expériences utilisant  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  marquée, il a été montré aussi bien pour les *m*-EH [138] que pour des cellules entières provenant de champignons [69], que seul un oxygène est introduit dans l'époxyde. Les études effectuées à l'institut de chimie organique TU-Graz sur les EH de souche bactérienne c'est à dire à partir de *Rhodococcus* sp. NCIMB 11216 ont également conclues à l'introduction *trans* spécifique d'un oxygène de l'eau dans le substrat [131] (via échange avec le résidu aspartate). Cette introduction se fait dans la plupart des cas sur le carbone stériquement le moins encombré. Il y a cependant, deux possibilités à envisager pour l'hydrolyse enzymatique des époxydes (figure 96):

A. L'attaque nucléophile a lieu sur le carbone non chiral du cycle oxirane ce qui implique la rétention de configuration du centre chiral (par exemple: *Aspergillus niger* [139]).

B. L'attaque se fait sur le centre asymétrique ce qui aboutit à une inversion de configuration (par exemple: *Beauveria* sp [139]).

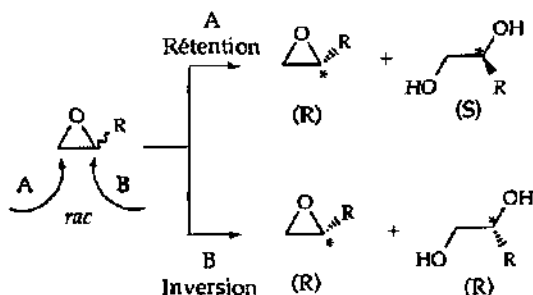
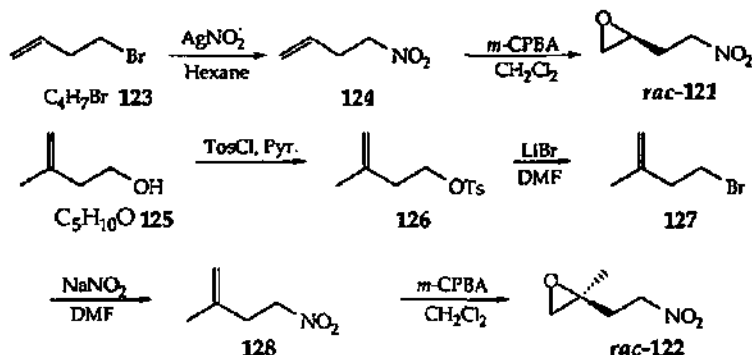


Figure 96: Effets stéréochimiques possibles sur un racémat

Même si c'est la rétention de configuration qui a été le plus souvent observée et décrit dans la littérature, l'inversion de configuration a également fait l'objet de diverses publications [69,138]. Il est donc important de déterminer la configuration du produit formé mais également celle du produit restant. La régiosélectivité de l'attaque autant que l'énantiosélectivité envers le substrat sont des points importants. La combinaison de ces deux aspects peuvent avoir des applications intéressantes dans la synthèse énantio-convergente [69].

## 6.1.3. Synthèses des dérivés nitrés

6.1.3.1. Synthèse du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121) et du 2-méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-122)Figure 97: Synthèses des composés *rac*-121 et *rac*-122

Différentes remarques concernant les synthèses des produits de départ et également sur les synthèses découlant de ces produits, peuvent être faites (figure 97).

En ce qui concerne la synthèse du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121), les difficultés se sont trouvées non pas lors de la synthèse de l'époxyde mais lors de l'ouverture de cet époxyde en diol, étape nécessaire à l'obtention de diol de référence *rac*-57. L'ouverture en milieu basique est généralement préférée à l'ouverture en milieu acide car bien qu'étant lente, elle ne génère normalement que peu de réactions secondaires par rapport à l'ouverture en milieu acide. En ce qui concerne ce premier dérivé nitré, l'ouverture en milieu basique montre la formation de plusieurs produits mais surtout la perte du composé lors de l'extraction. L'ouverture en milieu acide a dans ce cas-ci montré de meilleurs résultats et a permis d'obtenir le diol avec un rendement de 56 %. Le passage du produit nitré sous une forme nitronate dans la phase aqueuse est possible. Néanmoins, une extraction en continue sur la phase aqueuse n'a permis aucune récupération du produit.

En ce qui concerne la synthèse du 2-méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-122), deux différentes procédures ont été suivies (figure 98). Tout d'abord, la procédure normale, c'est-à-dire celle suivant la synthèse étape après étape, puis un raccourci qui rassemble la bromation et la nitro-déhalogénéation en une seule étape (le solvant étant identique pour les deux réactions). Lors de la première synthèse de cet époxyde, le traitement final de la bromation aboutissait à la perte assez importante de produit bromé. Ce composé est en effet très volatil et disparaît assez facilement lors de l'évaporation du DMF qui ne s'évapore pas sans peine. Ceci n'est en aucun cas favorable vu que la réaction qui suit est une réaction de nitro-déhalogénéation qui n'a également pas un bon rendement. La mise en commun des étapes de bromation et de nitro-déhalogénéation qui permet d'avoir une quantité plus importante d'époxyde à la fin, aboutit néanmoins à la formation majoritaire d'un produit non attendu 129 après l'époxydation (figure 99). Apparemment, la mise en oeuvre d'un produit non purifié lors de la réaction d'époxydation avec le *m*-CPBA engendre la formation non négligeable d'un produit secondaire.

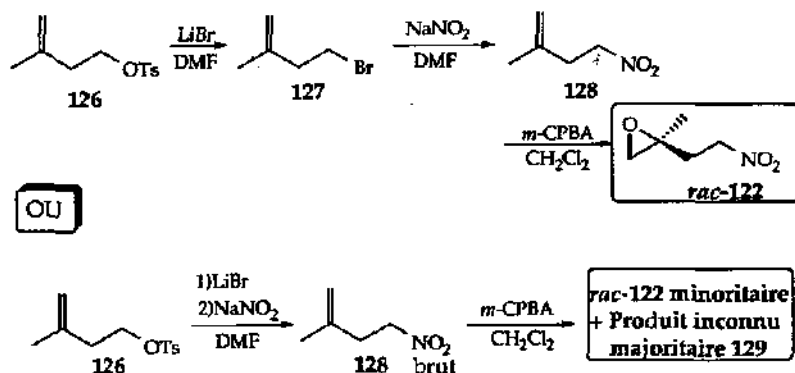


Figure 98: Procédures utilisées dans la synthèse du composé *rac*-122

Le spectre de masse montre que la structure du composé formé 129 (suivant le pic parent,  $m/z = 129$ ) n'est pas très éloigné de celle du produit désiré, c'est à dire l'époxyde *rac*-122 dont la masse molaire est de 117.10 g/mol. D'après les spectres  $^1\text{H}$ - et  $^{13}\text{C}$ -RMN, on est en présence de deux méthylènes (dont un porte un alcool) qui ne couplent pas ensemble, d'un méthyle isolé, d'un carbone quaternaire et également d'un carbonyle.

En rassemblant ces renseignements avec les informations données par l'IR (présence d'alcool primaire, de liaison NO et d'amide), la structure suivante a été proposée ( $M = 130$  g/mol):

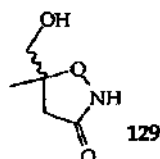


Figure 99: Structure possible du produit secondaire 129

Cette structure ne répond pas complètement aux analyses (par exemple à  $1611\text{ cm}^{-1}$ :  $\nu\text{CO}$  amide bande pas très prononcée mais on se trouve également dans le cas d'un acide hydroxamique) mais une hypothèse de formation peut être donnée sur sa formation à partir de l'époxyde *rac*-122 (figure 100):

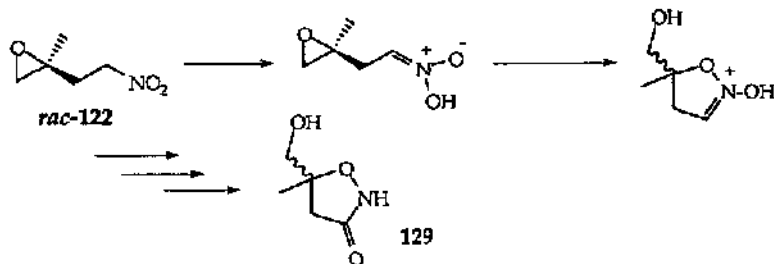


Figure 100: Formation possible du produit secondaire 129

### 6.1.3.2. Remarques générales concernant le travail avec les microorganismes et les époxydes

En travaillant avec cette matière biocatalytiquement active et en interprétant les résultats, il ne faut en aucun cas oublier que l'on utilise un système multi-enzymes et non pas des enzymes pures. La teneur en époxyhydrolases est jusqu'à présent inconnue et la quantité en masse est acceptée comme étant inférieure à 0.1%. Cette remarque est surtout à prendre en compte dans l'estimation des vitesses de réaction atteintes qui sont proportionnelles à la quantité de catalyseur engagée. Il est également en aucun cas connu si l'on est en présence de plusieurs époxyhydrolases ou non.

Dans le cas où il s'agit de plusieurs époxyhydrolases, on peut se demander si elles ont la même régio et/ou énantiométrie, ce qui pourrait bien évidemment interférer sur la valeur de la pureté optique. Une autre caractéristique des systèmes multi-enzymes est la possibilité d'avoir des réactions secondaires qui pourrait ainsi apporter une activité hydrolytique supplémentaire et par conséquent demander l'apport de groupes protecteurs supplémentaires (hydrolyse d'esters par exemple). Malgré ces désavantages apparents, les systèmes multi-enzymes sont néanmoins des systèmes acceptables. En effet, l'activité catalytique des époxyhydrolases est d'abord testée et prouvée pour certains substrats et la dépense occasionnée par une purification n'est alors justifiée qu'en présence d'une certaine activité.

Les diols posent des problèmes au niveau de l'extraction à partir de la suspension aqueuse de l'enzyme. En effet, ils sont partiellement solubles dans la phase aqueuse ce qui rend difficile leur récupération quantitative par rapport aux époxydes correspondants. Ceci demande également des quantités de solvant d'extraction assez importantes et par la même occasion nécessite un temps d'évaporation plus long ce qui ne peut qu'augmenter les pertes en époxyde très volatil. Vu ces conditions de travail, le suivi quantitatif de la réaction est assez délicat.

L'époxyde lipophile a par contre une faible solubilité dans l'eau et tend lors de la mise en oeuvre de la réaction enzymatique à se concentrer sur les membranes lipophiles des cellules. Ce phénomène se manifeste quand les cellules lyophilisées n'ont pas été hydratées suffisamment longtemps dans le tampon avant l'addition de l'époxyde. Les cellules doivent rester environ une heure dans le milieu tamponné jusqu'à ce qu'elles s'entourent de leur enveloppe d'eau naturelle et qu'elles reprennent leur conformation initiale. Si ceci n'est pas respecté, l'époxyde va préférentiellement s'emmagasiner dans la cellule qui est partiellement sèche. Cette concentration élevée en époxyde est dangereuse pour la cellule, les cellules se cassent, forment des amas et la réaction est ainsi gênée, voir complètement empêchée.

Un autre problème est celui de l'inhibition de l'enzyme par l'époxyde. Celle-ci peut se produire lorsque la concentration en substrat est trop élevée et l'on observe alors une inhibition irréversible. La probabilité de l'inhibition dépend de la concentration et de la réactivité de l'époxyde.

Une des principales conditions pour qu'un époxyde soit un bon candidat à l'hydrolyse enzymatique est sa stabilité dans le tampon employé. L'hydrolyse spontanée, non-sélective de l'époxyde abaisse la pureté optique des produits obtenus et cache la bonne énantiométrie éventuelle de l'enzyme. Pour toutes les transformations, on utilise un tampon 50 mM de Tris-(Hydroxyméthyl)-amino-méthane (Tris) pH=8.0. Parallèlement aux essais de screening, la substance testée est additionnée à 2 ml de tampon sans enzyme et est traitée suivant les

mêmes conditions afin d'avoir un témoin. Par suivi sur chromatographie couche mince, il ne doit apparaître aucune trace de diol.

#### 6.1.4. Le screening

Le screening est donc l'opération qui permet de sélectionner parmi les souches citées plus bas, celles qui possèdent une activité sur les substances testées. La réaction générale du screening est donc l'hydrolyse suivante:

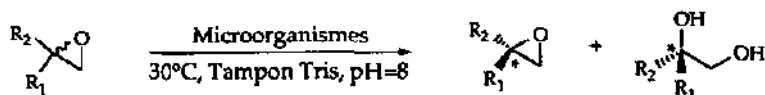


Figure 101: Schéma général de l'hydrolyse par les EH

Les différentes souches testées sont les suivantes:

- Rhodococcus equi* IFO 3730 (RE)
- Mycobacterium paraffinicum* NCIMB 10420 (MP)
- Rhodococcus sp.* NCIMB 11216 (PP)
- Nocardia sp.* EH1
- Nocardia sp.* H8
- Nocardia sp.* TB1
- Rhodococcus ruber* DSM 43338 (RR)
- Rhodococcus rhodochrous* (Rot)
- Méthyllobactérium sp.* (Rosa)
- Mycobacterium* E3

Ces souches sont achetées ou proviennent soit d'un laboratoire de Stuttgart (C.Syldatk) soit des laboratoires de l'institut de biotechnologie de Graz.

La mise en oeuvre du screening est décrite en partie expérimentale (Chap 8.3.) et les résultats du screening effectué sur les deux dérivés nitrés *rac*-221 et *rac*-122 sont rassemblés dans le tableau 24.

Vu les résultats rassemblés dans ce tableau, seule la souche E3 semble présenter une activité hydrolytique sur les composés nitrés. Néanmoins ce tableau ne reflète pas le déroulement exacte du screening. Dans un premier temps, seuls les neuf premiers microorganismes ont été testés et les CCM ont révélé des tâches de couleur orange ( $R_f = 0.34$ , AcOEt pur, Vanilline milieu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pour certains microorganismes. Ceci a faussé nos résultats puisque ces tâches semblaient correspondre à des produits polaires semblables aux diols désirés. Cependant, après comparaison par chromatographie en phase gazeuse entre le diol référence synthétisé et le résidu d'extraction des réactions enzymatiques à plus grande échelle (100  $\mu\text{l}$  de substance) avec RR, EH1 et H8, on ne retrouvait pas le diol dans les résidus. Ces tâches n'étaient en fait que des artefacts. Une dernière souche (E3) s'est alors rajoutée et on a pu constater qu'elle possédait bien une activité hydrolytique sur ces composés (confirmé par GC).

Souches	rac-121	rac-122
<i>Nocardia sp.</i> EH1	-	-
<i>Nocardia sp.</i> TB1	-	-
<i>Nocardia sp.</i> HB	-	-
<i>Rhodococcus ruber</i> (RR)	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (RE)	-	-
<i>Mycobacterium paraffinicum</i> (MP)	-	-
<i>Rhodococcus sp.</i> (PP)	-	-
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (Rosa)	-	-
<i>Méthyllobactérium sp.</i> (Rot)	-	-
E3	+	+

" + " signifie que selon la CCM, l'époxyde est hydrolysé en diol.

" - " signifie un résultat négatif.

Tableau 24: Résultats du screening des composés nitrés *rac*-121 et *rac*-122

### 6.1.5. Détermination de l'énantiosélectivité

#### 6.1.5.1. Estimation de l'excès énantiomérique

L'excès énantiomérique (ee) se calcule selon la formule suivante:

$$ee = \frac{R - S}{R + S} * 100[\%]$$

Schéma 24: Expression de l'excès énantiomérique ee

R et S sont les concentrations des énantiomères correspondants aux valeurs des surfaces des pics donnés par le chromatogramme.

Pour évaluer la sélectivité d'une enzyme sur un substrat racémique, on calcule le rapport énantiomérique E [140]. Cette valeur est fonction de la conversion c et des valeurs ee du produit (ee<sub>p</sub>) et du substrat résiduel (ee<sub>s</sub>).

$$E = \frac{\ln\left[\frac{(1-c) * (1-ee_p)}{(1-c) * (1+ee_s)}\right]}{\ln\left[\frac{(1-c) * (1+ee_p)}{(1-c) * (1-ee_s)}\right]}$$

Schéma 25: Expression du rapport énantiomérique E

Ces deux expressions donnent de bons résultats quand la conversion ne prend pas une valeur trop petite ou trop grande.

L'excès énantiomérique est déterminé par GC sur une colonne chirale à base de β-cyclodextrine perméthylée en utilisant H<sub>2</sub> comme gaz vecteur. Suivant les cas, différentes modifications concernant le gaz vecteur, la pression, la température ont été apportées. En pratique, on voit que la capacité de séparation sur les

colonnes à base de cyclodextrine dépend fortement de la quantité de substance injectée. Avec une quantité trop importante, la résolution diminue visiblement ce qui provoque des fluctuations au niveau des valeurs des maxima des pics et des temps de rétention. Certains composés nécessitent cependant d'être dérivatisés afin d'observer la séparation des pics.

Les configurations absolues sont, si aucune littérature n'est connue (valeurs de pouvoir rotatoire d'un énantiomère soit du diol soit de l'époxyde), déterminées à partir de composés préparés énantiomériquement purs. Par comparaison avec les pics GC références, on retrouve quel pic correspond à quel énantiomère sur le chromatogramme.

#### 6.1.5.2. Résultats concernant les excès énantiomériques:

Des premiers essais d'estimation d'excès énantiomérique ont été effectués avec les microorganismes EH1, RR, H8 sur le composé 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121), mais les échantillons injectés n'ont montré aucune présence de diol (par comparaison avec un diol référence) et ont conclu donc à la non-activité de ces époxyhydrolases sur ces composés nitrés. Deux autres estimations avec le microorganisme E3 ont été effectuées plus tard sur les composés *rac*-121 et *rac*-122 et ont cette fois-ci montré la formation de diols. Les chromatogrammes semblent montrer un  $e_p$  pour le composé 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121) mais par contre une mauvaise sélectivité pour le composé disubstitué 2-méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*122) et les études concernant *rac*-122 ont été arrêtées à ce stade.

Par contre pour le 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121), les différents chromatogrammes qui semblaient montrer une certaine sélectivité, n'étaient pas satisfaisants au niveau de la séparation des pics des énantiomères du diol, ce qui empêche le calcul de  $e_p$ . La même difficulté avait déjà été rencontrée lors de l'injection du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121). Différents paramètres ont été changés (température isotherme variant de 130 à 180 °C, pression de 0.5 bar ou 1 bar, gaz vecteur H<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>).

D'autres essais d'hydrolyse ont alors été effectués une année plus tard à Neuchâtel et des injections ont été alors effectuées à Bern sur des mélanges époxyde-diols par l'intermédiaire du Dr Claude Saturnin sur des colonnes chirales également à base de  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée préparées à Neuchâtel. Pour l'époxyde 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121) et son diol correspondant, la séparation a pu être obtenue sur une colonne qui était alors en cours de développement. Les spectres et les conditions d'analyse sont en annexe (Annexe 3)

Deux publications écrites par Zindel et DeMeijere décrivent la préparation et les mesures des pouvoirs rotatoires du (2R)-4-nitro-butane-1,2-diol et du (2S)-4-nitro-butane-1,2-diol [141,142]. Une simple mesure du pouvoir rotatoire des diols formés par hydrolyse enzymatique permet selon le signe de savoir quel énantiomère est formé préférentiellement.

Les derniers d'essai d'hydrolyse ont montré que l'enzyme était peu sélective et que la conversion faible soulignait "l'âge" de la souche. Les faibles sélectivité et conversion observées sont peut-être la conséquence d'une hydrolyse spontanée et qui est, de ce fait, non sélective. Nous avons donc décidé afin d'avoir une première idée du potentiel inhibiteur de ce diol *rac*-57 sur la PBGS, de tester le 4-nitro-butane-1,2-diol sous sa forme racémique. Une certaine quantité de composé racémique avait été synthétisé comme référence et a donc été utilisée pour les tests d'inhibition (résultat Chap. 5.1.2.3.).

### 6.1.6. Conclusion

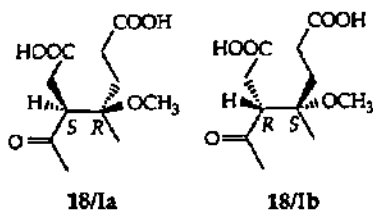
Une souche, capable hydrolyser des époxydes nitrés a donc été trouvée et des conditions de séparation par chromatographie en phase gazeuse ont été déterminées pour le 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-121) et le 4-nitro-butane-1,2-diol (*rac*-57). L'aspect intéressant de cette souche E3 est qu'elle est en général peu réactive avec les époxydes non nitrés. Pour étudier ses possibilités d'hydrolyse, il serait nécessaire de synthétiser d'autres substrats nitrés (époxydes 1,2-disubstitués ou trisubstitués, substituants plus longs...) et de les tester sur un microorganisme récemment préparé.

## 6.2. Travaux concernant les analogues d'intermédiaire de Shemin

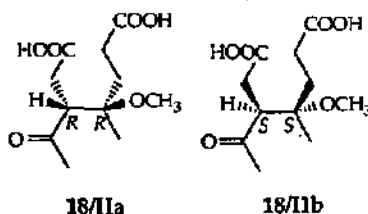
### 6.2.1. Synthèse et séparation du mélange de stéréoisomères du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle

L'intérêt porté sur les analogues d'intermédiaire de Shemin remonte dans notre groupe aux travaux de R. Lüönd qui avait alors testé sur la PBGS issue de *Rhodobacter spheroides*, l'acide 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioïque sous forme de mélange racémique *rac*-18/I et *rac*-18/II [38]. Par la suite, M. Henz a déterminé les constantes d'inhibition de ces composés sur la PBGS issue de *E. coli* [39]. Les résultats ont été dans les deux cas décevants (figure 102). Cependant, on a observé dans les deux cas une meilleure inhibition de *rac*-18/I (disposition *unlike* des chaînes acides) par rapport à *rac*-18/II (disposition *like*), une tendance qui s'est avérée plus prononcée sur *R. spheroides*.

#### Diastéréoisomères I



#### Diastéréoisomères II



	<i>R. spheroides</i>	<i>E. coli</i>
Km (μM):	260	65
Ki <i>rac</i> -18/I (μM):	11'000	11'900
Ki <i>rac</i> -18/II (μM):	25'000	17'000

Figure 102: Diastéréoisomères à séparer

La diminution d'un rapport légèrement supérieure à 2 d'une constante d'inhibition d'un diastéréoisomère par rapport à un autre est significative et c'est sur cette observation qu'il semblait intéressant de pouvoir tester les énantiomères séparément. Un des deux énantiomères doit forcément être mieux reconnu par l'enzyme et une diminution de la constante d'inhibition devrait

être observée ce qui nous indiquerait la configuration relative de ces chaînes acides préférée par l'enzyme.

Ces composés ont donc été resynthésés suivant une méthode développée par H. Bertschy [85] jusqu'au stade de diesters méthylés *rac*-130/I et *rac*-130/II et dans des quantités importantes afin d'avoir la possibilité de tester différentes techniques de séparation.

L'étape clé de la synthèse est une condensation aldolique de type Mukaiyama qui utilise le tétrachlorure de titane comme catalyseur [143,144]. Cette condensation met en jeu le 4-triméthyl-silyloxy-pentanoate de méthyle (131) et le 4,4-diméthoxy-pentanoate de méthyle (132) [145]. La silylation dirigée à partir d'un dérivé bromé du lévulinate de méthyle est décrite dans le chap. 6.2.2. qui suit. Quant à l'acétale, il a été préparé par action du triméthyl-orthoformate sur le lévulinate de méthyle (133) dans le méthanol [85]. Après isolation du mélange des quatre stéréoisomères, la séparation des diastéréoisomères s'effectue sur une colonne par chromatographie-flash. La quantité de produit (8.12 g) et la difficulté de la séparation ont porté au nombre de trois les colonnes nécessaires pour récupérer le maximum de diastéréoisomères. Le diastéréoisomère *rac*-130/I qui est suivant les valeurs de  $K_I$  obtenues le diastéréoisomère le plus intéressant, est formé en plus faible quantité que le diastéréoisomère *rac*-130/II.

La première méthode de séparation d'énantiomères que nous avons tenté est bien entendu la chromatographie liquide haute performance chirale. Avec l'aide du Dr. E. Francotte, nous avons pu bénéficier des moyens techniques de Ciba dans ce domaine.

Une série de colonnes a été testée et une bonne séparation de ces diastéréomères a été obtenue dans les conditions suivantes:

Colonne: Chiralcel OD (25\*0.46 cm)

Éluant: Héptane/ Isopropanol (95/5)

1.0 ml/min, RT, 30 bar, Détection U.V. 210 nm

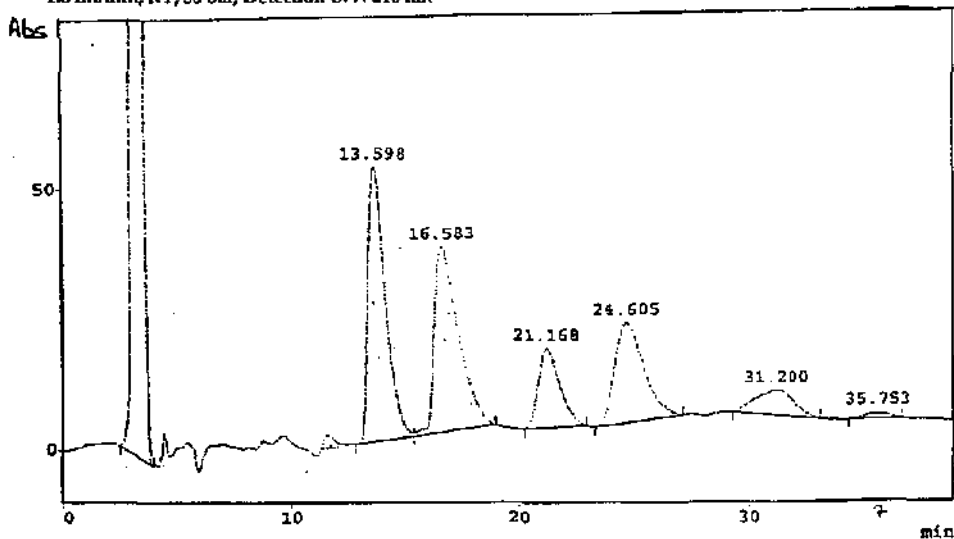


Figure 103: Séparation par HPLC chirale de 130/Ia et 130/Ib

Lors de la colonne préparative, 800 mg de substance ont été au total séparés et deux chromatographies préparatives ont été nécessaires à cette séparation (450 mg +350 mg). Les premiers 450 mg ont été dissous dans 3 ml d'éthanol et dilué avec 70 ml d'éluant (Heptane/ Isopropanol (95/5)). Les conditions de la préparative sont les suivantes:

Colonne: Chiralcel OD (50\*5 cm); éluant: Heptane/ Isopropanol (95/5); 60 ml/min, RT, 2 bar; Détection U.V. 210 nm

Cette bonne séparation nous permet d'éviter de tester d'autres esters plus encombrés de *rac*-18/I et *rac*-18/II qui seraient plus facilement séparés sur colonne chirale.

L'absorption U.V. correspondant à chaque pic chromatographique et la mesure de la rotation suivant les pics de l'échantillon à séparer, nous ont permis d'attribuer la nature du composé à chaque pic :

- .pic 1 (13.6 min): énanti. 130/Ia ou b ( $\lambda_{\max}$ =210 nm, optiquement actif (+))
- .pic 2 (16.6 min): énanti. 130/Ia ou b ( $\lambda_{\max}$ =210 nm, optiquement actif (-))
- .pic 3 (21.2 min): produit d'élimination 1 ( $\lambda_{\max}$ =240 nm)
- .pic 4 (24.6 min): produit d'élimination 2 ( $\lambda_{\max}$ =240 nm)
- .pic 5 (31.2 min): produit d'élimination 3 ( $\lambda_{\max}$ =240 nm)
- .pic 6 (35.8 min): énanti. 130/IIa ou b ( $\lambda_{\max}$ =210 nm, optiquement actif (-))

Les produits correspondants aux pics 3, 4 et 5 ont été identifiés comme étant des composés d'élimination. Leurs spectres U.V. très similaires montrent une absorbance maximale à 240 nm, ce qui correspond à déplacement bathochrome de 30 nm par rapport au chromophore de base (210 nm), ce qui pourrait être identifier à l'introduction d'une double liaison conjuguée. Ces composés ne sont également pas optiquement actifs et les spectres <sup>1</sup>H-RMN ont permis d'observer la disparition du signal du proton porté par le carbone asymétrique en  $\alpha$  de la cétone, ainsi que celui du OCH<sub>3</sub>. Ceci indique bien que ces composés ont perdu une molécule de méthanol formant ainsi des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées, bien qu'aucune identification formelle n'ai été faite.

A la suite de cette séparation, nous avons obtenus 326 mg d'un des deux énantiomère et 321 mg de l'autre (autres romposés: m< 10 mg).

#### Remarque:

L'étape suivante serait donc l'obtention des diacides 18/Ia et 18/Ib énantiomériquement purs à partir de ces esters méthylés 130/Ia et 130/Ib. Une partie de ces esters a donc été hydrolysée en présence de soude dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O. Lors de la vérification de la pureté optique de ces diacides, nous avons remarqué que ces conditions d'hydrolyse aboutissent sans doute à une épimérisation des composés due à la présence d'une fonction cétone en  $\alpha$  de l'un des deux carbones asymétriques.

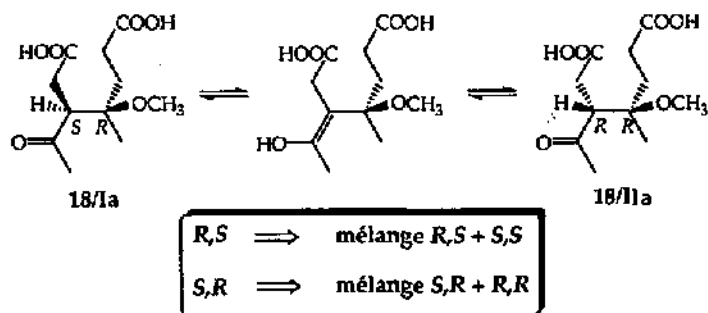


Figure 104: Epimérisation des énantiomères sous conditions basiques

Il faut donc trouver des techniques d'hydrolyse plus douces (test de différentes estérases) pour aboutir aux diacides 18/Ia et 18/IIa énantiomériquement purs.

Les tests d'inhibition des diesters 130/Ia et 130/IIa nous aurait permis d'avoir une idée précise sur l'énantiomère qui induit la meilleure inhibition. Malheureusement, ces diesters sont très peu solubles dans les conditions du test et nécessiteraient trop de DMSO comme solvant pour les solubiliser (perturbation du test).

### 6.2.2. Amélioration d'une étape de la synthèse du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthylheptane-1,7-dioate de méthyle (130)

Une publication de Tius [146] concernant la synthèse d'un triéthylsilyl-énoether, le 2-triéthylsilyloxy-4-méthyl-2-pentène, qui est ensuite impliqué dans une condensation aldolique nous a particulièrement intéressé. En effet, la silylation dirigée qui se fait en une seule étape à partir d'une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée en présence de triéthyl-silane et de catalyseur de Wilkinson ( $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ ) serait une voie possible dans le cadre de la synthèse du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthylheptane-1,7-dioate de méthyle (130) à partir du *trans*-4-oxo-2-penténoate de méthyle (134) (figure 107).

Cependant, aucune publication reliée à ces hydrosilylations ne relevait de réaction concernant des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées portant des groupes électro-attracteurs. De plus, ces hydrosilylations sont généralement utilisées comme réactions de réduction de la double liaison des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées dans des conditions autres que fortement basiques ou acides [147,148].

L'hydrosilylation [1,4] ainsi que l'hydrosilylation [1,2] sont possibles et la prédominance de l'une de ces silylations par rapport à l'autre se fait surtout en fonction de l'hydrosilane utilisé [148] (figure 105)

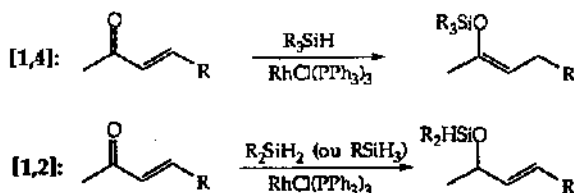


Figure 105: Les hydrosilylations [1,4] et [1,2]

Les dihydrosilanes ( $R_2SiH_2$ ) et les trihydrosilanes ( $RSiH_3$ ) conduisent régiosélectivement à l'addition [1,2] tandis que les monohydrosilanes ( $RSiH_3$ ) conduisent à l'addition [1,4].

Cette régiosélectivité est également dépendante du substrat, de la concentration en hydrosilane utilisé et de la température de réaction qui lorsqu'elle est élevée ( $>40^\circ C$ ) favorise l'addition [1,4].

Deux mécanismes ont été proposés pour ces hydrosilylations: un par Ojima [147] et l'autre par Chan [149].

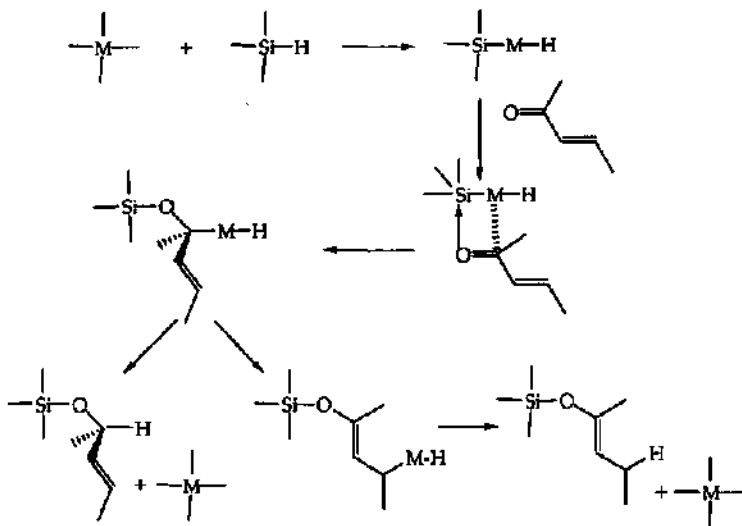
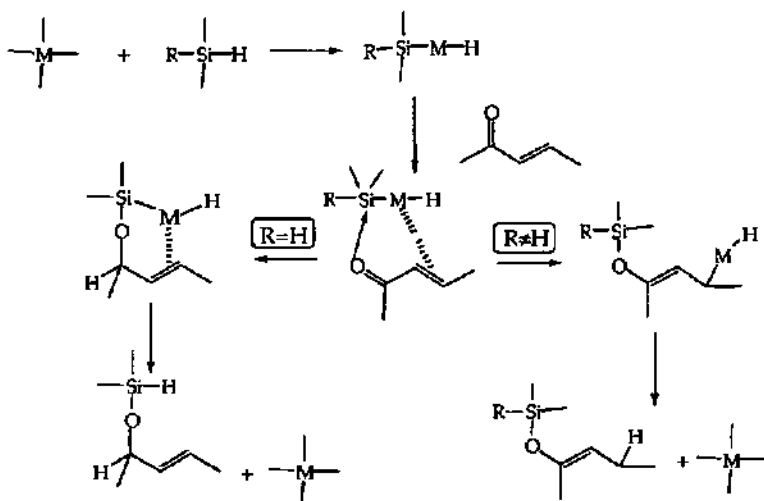
**Mécanisme proposé par Ojima:****Mécanisme proposé par Chan:**

Figure 106: Les deux mécanismes d'hydrosilylation proposés [147,149]

Le mécanisme plus élaboré de Chan tente d'expliquer la relation entre le type d'addition et l'hydrosilane utilisé par une migration d'hydrogène du silyl au carbone portant l'oxygène, processus uniquement possible dans le cas du di- ou trihydrosilane [149]. Néanmoins, une forme *s-cis* de la cétone insaturée permettrait de mieux expliquer la complexation du rhodium et du silicium.

Une série de réactions nous a permis de définir les conditions expérimentales nécessaires d'une part à avoir une réaction et d'autre part à diminuer les réactions secondaires. La réaction s'effectue avec le moins de formation de produits secondaires à une température de 80°C. Nous avons varié le pourcentage molaire en catalyseur de Wilkinson de 1 à 3% d'essais à 60°C afin de diminuer le temps de réaction qui augmentait les chances de formation de produits secondaires. A 80°C, il serait sans doute intéressant de voir si l'on ne peut pas revenir à des pourcentages plus bas. Enfin, une équivalence de 1.2 éq. en triéthylsilane semble optimal.

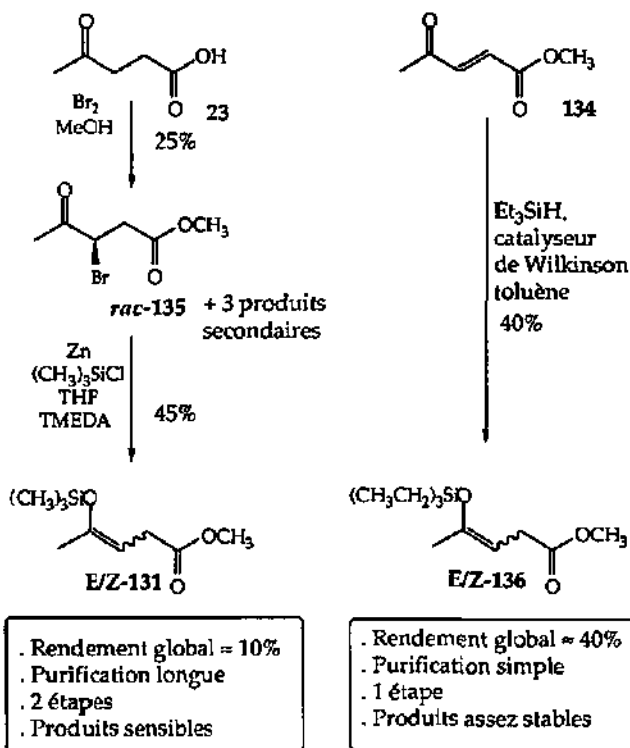


Figure 107: Comparaison des deux méthodes

Un mélange *cis/trans* (56/44) du composé 4-triéthyl-silyloxy-pentanoate de méthyle (136) a été isolé par simple distillation du résidu après évaporation du toluène avec 42% de rendement.

Une alternative à la synthèse impliquant une bromation de l'acide lévulinique suivie d'une silylation a donc été trouvée. L'hydrosilylation nous permet de préparer à partir d'un produit commercial un composé silylé facilement isolable et assez stable (deux semaines au réfrigérateur sans dégradation) en une étape.

### 6.3. Synthèse d'un analogue de substrat: le 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25)

La synthèse du composé 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25) nous a particulièrement intéressé dans le but d'évaluer l'influence de l'introduction d'une fonction alcool sur le 4-nitro-butane-2-one (23) qui était alors notre meilleur inhibiteur compétitif ( $K_i = 28 \mu\text{M}$ ) et de voir si il était encore possible d'améliorer cette inhibition déjà excellente.

La synthèse suivie est la suivante (figure 108):

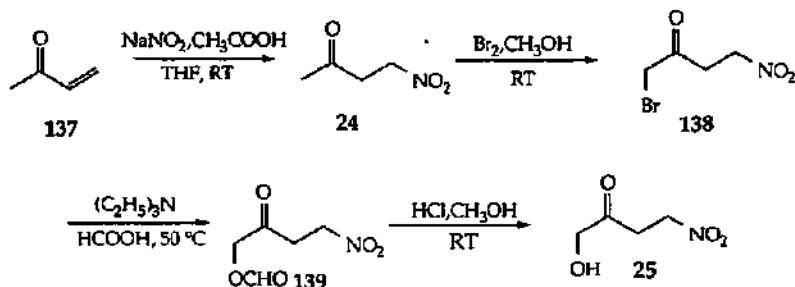


Figure 108: Synthèse de 25

#### 6.3.1. Synthèse du 4-nitro-butane-2-one (24)

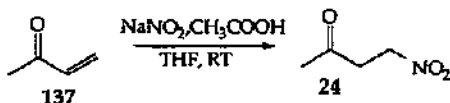


Figure 109: Synthèse du composé 24

Le 4-nitro-butane-2-one (24) est synthétisé à partir du 3-butène-2-one (137) en présence de nitrite de sodium et d'acide acétique selon une méthode de Miyakoshi [150]. La réaction se fait dans le THF et est laissée sous agitation pendant 14 heures à température ambiante. Cette méthode utilisant une addition de Michael simple et ne présentant aucune difficulté expérimentale, permet d'éviter le passage à un dérivé chloré suivi d'une réaction de nitro-déhalogénéation ( $\text{NaNO}_2$  dans DMF par exemple) qui aboutissent en général à un rendement moyen [38,151,152]. Le rendement brut de cette étape est de 99%.

#### 6.3.2. Synthèse du 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138)

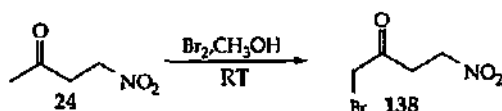


Figure 110: Bromation du composé 24

La synthèse du 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138) s'est effectuée par addition de brome au 4-nitro-butane-2-one (24) dans le méthanol suivant la méthode utilisée pour la bromation de l'acide lévulinique (23) (figure 110). L'addition du brome a été effectuée lentement et la température n'a pas dépassée 5°C. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation 14 heures à température ambiante. Après extraction, isolation et purification, on obtient le 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138) avec 45% de rendement par rapport au produit engagé lors de la première étape, le 3-butène-2-one (137). Lors de cette réaction, la bromation peut également se faire en position 3 ou 4 de 24, mais l'obtention majoritaire d'un produit (deux produits secondaires ont été observés) est beaucoup plus prononcée dans le cas présent que dans celui de l'acide lévulinique où un mélange de cinq composés en proportions équitables a été obtenu [153].

La position qui est en général bromée, est celle située sur le carbone en  $\alpha$  du carbonyle le plus substitué (produit thermodynamique) [154]. Cependant, un groupe coréen a fait mention de la bromation sélective de certaines cétones dont l'acide lévulinique (23) dans le cadre de la synthèse d'inhibiteurs potentiels de la PBGS [155]. Ils ont également effectué la bromation du 4-nitro-butane-2-one (24) dans le méthanol en présence d'un équivalent de brome mais dans des conditions de reflux (température ambiante dans notre essai) et sur une durée plus courte (40 min contre 14 h). Ils obtiennent 138 avec un rendement de 45% et un rapport 138 / 3-bromo-4-nitro-butane-2-one de 2.5. Lors de la purification par chromatographie-flash, nous avons récupéré 11.5 g de produits secondaires (non identifiés) sur 30.5 g de composés bromés (soit 62% de 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138) si on considère une masse molaire semblable pour tous ces composés). A température ambiante, nous avons donc obtenu un rendement similaire en composé majoritaire 138.

### 6.3.3. Synthèse du 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139)

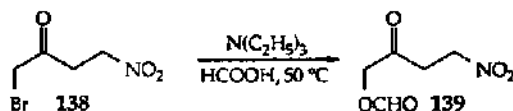


Figure 111: Formylation du composé 138

Le premier mode opératoire utilisé pour cette synthèse a été l'utilisation du 1,8-diazobicyclo[5.4.0]-7-undécène (DBU) comme base. L'acide formique et l'acétonitrile comme solvant. Le problème principal de cette méthode a été la récupération du 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139) qui formait avec le DBU une huile brune, très visqueuse et qui diminuait sérieusement le rendement (rendement=10%). De plus, on observait la formation de nombreux produits secondaires avec cette base forte.

En passant à une base moins forte que le DBU comme la triéthylamine, aucune formation de produit ne semblait se produire.

Par la suite, la quantité d'acide formique a été renforcée (5 éq. contre 1 éq) et le solvant (l'acétonitrile) a été supprimé car il favorisait le passage du dérivé nitré dans la phase aqueuse lors de l'extraction et 138 a donc été simplement solubilisé dans l'acide formique. Après addition goutte à goutte de la triéthylamine (1 éq.) à 5°C, le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 50°C et la réaction est suivie par spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$  pendant plusieurs jours. Après dix jours, la réaction a été stoppée car le début d'une formation de produit secondaire 140 a été observé (figure 112). Le rapport 139/138 est alors d'environ 6/1. Le produit secondaire a été identifié comme étant un composé nitroso issu de l'attaque du nitrosyle sur la cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée résultant d'une réaction rétro-Michael (10 % de produit secondaire 140 dans le produit final).

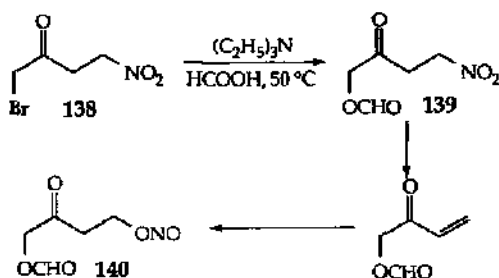


Figure 112: Formation du produit secondaire 140

Après extraction, isolation et purification, le 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139) a été obtenu avec un rendement de 36%.

#### 6.3.4. Synthèse 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25):



Figure 113: Synthèse du composé 25

La première méthode utilisée a été celle de dissoudre le 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139) dans du méthanol et d'hydrolyser la fonction formiate sur de l'alumine. Cette réaction fonctionne si le méthanol contient 1% d'eau, mais pose un problème au niveau de la récupération du 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25) qui est rendue difficile par une fixation du produit sur l'alumine (rendement 10%).

Par la suite, une simple hydrolyse en milieu acide dans le méthanol pendant 17 heures à température ambiante a permis d'obtenir après purification le 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25) avec un rendement de 62%.

## 7. Conclusions

### 7.1. Conclusions générales

- Nous observons un comportement cinétique qui suit les lois de Michaelis-Menten. Il a été possible d'estimer les constantes de Michaelis-Menten pour chaque site par des essais de formation de PBC à basses concentrations en ALA:

$$K_{m1} = 4.6 \mu\text{M pour le site P}$$

$$K_{m2} = 66 \mu\text{M pour le site A}$$

Les valeurs de  $K_{m1}$  et  $K_{m2}$  explique la cinétique du type Michaelis-Menten sous nos conditions expérimentales de test ( $[\text{Substrat}] \gg K_{m1}$ ).

#### Equation de la cinétique

#### Equation simplifiée

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]^2}{K_{m1} \cdot K_{m2} + K_{m2} \cdot [S] + [S]^2} = v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_{m2} + [S]}$$

- Une inhibition compétitive claire avec le second substrat (aucune inhibition dans le site P) est observée pour les analogues de substrat.

- Une double interaction dans les deux sites de l'inhibiteur donne une cinétique d'inhibition plus complexe et se décrit par une inhibition mixte, incompétitive ou slow-binding.

- Le groupe nitro est mieux reconnu s'il est utilisé comme substitut du groupe carboxylate dans un inhibiteur interagissant dans le site A. Ce remplacement n'a pas le même effet bénéfique si il y a lieu sur des molécules interagissant dans le site P de l'enzyme.

- Les composés  $\beta$ -dicétones interagissent comme analogue de substrat dans le site P en formant une base de Schiff stabilisée sous forme énamine. Les  $\beta$ -dicétones non encombrées décrivent toutes une inhibition slow-binding (excepté les dicétones possédant une fonction nitro).

- Une nouvelle classe d'inhibiteurs a été présentée au cours de ce travail: les céto-diacides  $C_{10}$ . Ces diacides présentent trois points de reconnaissance (deux fonctions acides et une fonction cétone qui forme la base de Schiff), cette combinaison permet d'en faire des inhibiteurs "fort slow-binder" qui décrivent un comportement irréversible. La structure de ces composés est favorable au premier mécanisme proposé par Jordan.

- Nous sommes capables d'inhiber sélectivement le site A ou le site P de l'enzyme en introduisant un groupe nitro ou un groupe ester méthylé à la place d'un des deux carboxylates d'un inhibiteur céto-diacide  $C_{10}$ .

- Les énantiomères de l'analogue d'intermédiaire de Shemin, le 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle (*rac*-18) ont pu être résolus par HPLC chirale.

- La synthèse d'un silylénoether dirigé, le 2-triéthylsilyloxy-4-méthyl-2-pentène (136), a pu être effectuée avec un rendement de 40% à partir d'une hydrosilylation en présence de catalyseur de Wilkinson en une seule étape. Cette réaction diminue le nombre d'étapes de la synthèse d'un analogue d'intermédiaire de Shemin *rac*-18.



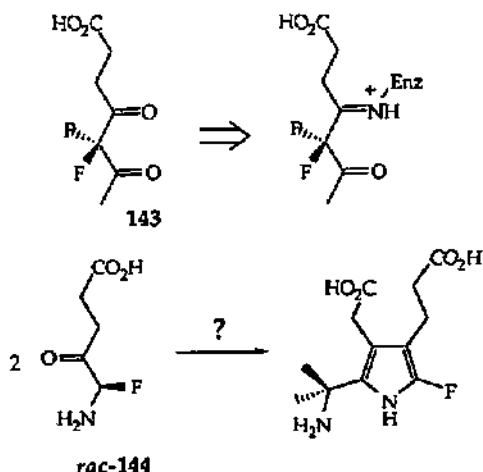


Figure 115: Analogues fluorés à envisager

- Il serait également intéressant de suivre par HPLC-MS, la formation de composés "PBG-mixte", c'est-à-dire la formation de dérivés du PBG portant des chaînes latérales avec des substituants différents. L'ester méthylé de ALA 47, est un candidat tout désigné pour ce genre d'essais, mais le 1-amino-4-nitro-butane-2-one serait également un candidat potentiel avec la formation envisageable d'un PBG-mixte possédant une chaîne nitro-méthyl et une chaîne propionique.

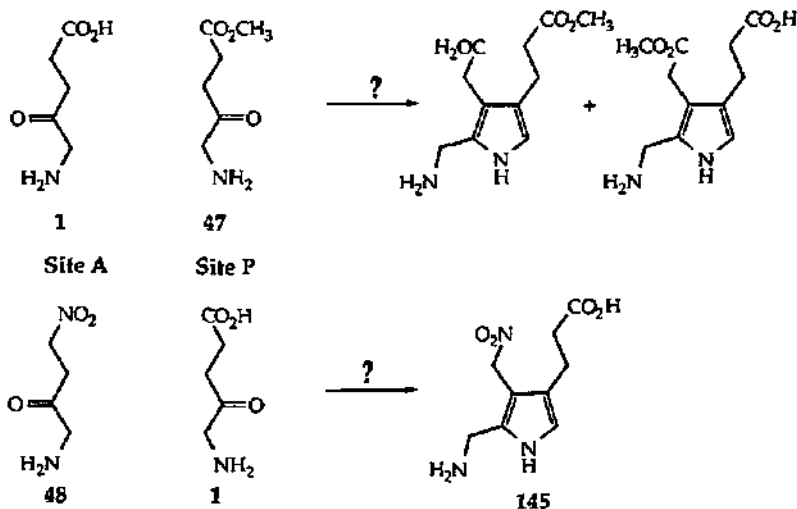


Figure 116: Formation de PBG-mixte

- Quelques préessais concernant la possible observation de la cinétique du retour de l'activité de la PBGS en présence d'un slow-binder ont été effectués. Ces mesures permettraient de calculer les valeurs de  $K_i$  des inhibiteurs slow-binder.

Ces premiers essais ont été effectués sur trois jours à 4°C dans des conditions de dialyse (1l de tampon phosphaté pH=8.0) en présence de succinyle acétone (11). Ces mesures doivent cependant se faire à 37°C et le temps de mesure ne doit pas être trop long car l'instabilité de l'enzyme poserait alors des problèmes. Plusieurs publications montrent la détermination de ces valeurs de  $K_i$  dans le cas d'aldolases [115] qui sont tout à fait réversibles. Par contre, la PBGS ne permet pas de jouer sur les conditions d'essai et sur l'ajout de produit pour déplacer l'inhibiteur.

- Comme les résultats des tests l'ont montré, certains composés n'ont pas pu être testés pour divers problèmes. Mis à part les composés réagissant avec ALA (cas de 93), il serait envisageable de tester les composés réagissant avec le réactif de Ehrlich par une méthode analytique comme l'HPLC. L'HPLC permettrait de mettre en route une analyse qualitative d'une série de composés par comparaison à des inhibiteurs étalons. Une analyse quantitative serait néanmoins plus complexe à mettre en jeu, mais l'analyse qualitative permettrait de faire une première sélection au niveau des inhibiteurs testés.

## 8. Partie expérimentale biochimique et bioorganique

### 8.1. Appareils et produits utilisés

#### 8.1.1. Chromatographie gazeuse (TU-Graz)

Chromatographe gaz Shimadzu GC-14A, Split-Injecteur, FID.

##### Colonne A:

Pour la simple séparation de substances:

Biorad RSL 1701, 35m\*0,25mm\*0.25 $\mu$ m (Film), Perméthylsiloxane (7% Cyanopropyl, 7% Phenyl), N<sub>2</sub>

##### Colonne B :

Pour l'estimation des excès énantiomériques:

Chirasil-DEX CB, Chrompack, Perméthyl- $\beta$ -cyclodextrine fixée chimiquement, 25m\*0.32mm\*0.25 $\mu$ m (Film), H<sub>2</sub>

#### 8.1.3. Spectrophotométrie UV-Visible

Les spectres U.V-visible ont été enregistrés sur un spectromètre HP 8452A Array.

#### 8.1.3. Centrifugeuse

La centrifugeuse utilisée durant les tests d'inhibition est une centrifugeuse de table de type MSE, Mistral 2000.

#### 8.1.5. Produits chimiques

<u>Produits chimiques</u>	<u>Qualité</u>
Acide acétique	Fluka, puriss p.a.
Acide perchlorique	Fluka, puriss p.a.
Acide trichloroacétique (TCA)	Fluka, puriss p.a.
Chlorure de magnésium hexahydraté	Fluka, microselect
Chlorure de mercure (II)	Fluka, puriss p.a.
Chlorure de zinc	Fluka, puriss p.a.
Dihydrogénophosphate de sodium (NaP)	Fluka, microselect
p-Diméthylamino-benzaldéhyde	Fluka, puriss p.a.
Hydrogénophosphate de sodium (NaP)	Fluka, microselect
Mercapto-éthanol	Fluka, Bioch. >99 %
Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane	Fluka, Bioch. >99 %

## 8.2. Travaux biochimiques

### 8.2.1. Détermination des constantes $K_m$ pour les deux sites

Les pipettages décrits dans le tableau ont été effectués sur les solutions suivantes:

Solution ALA: 0.5 mg de ALA, HCl dissous dans 10 ml de tampon phosphaté pH= 8.0 (0.1M NaP, 12.3 mM mercapto-éthanol, 10 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  and 10  $\mu M$   $ZnCl_2$ )

Solution PBGS: un épendorf contenant environ 1.1 mg de PBGS a été dilué dans 70 ml de tampon.

Essai	Solution PBGS ( $\mu l$ )	Tampon ( $\mu l$ )	Solution ALA ( $\mu l$ )
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

La solution enzymatique est additionnée au tampon et les différents tubes sont préincubés 15 minutes à 37°C dans un bain thermostaté (2 mesures par essai). Après addition des différents volumes de la solution d'ALA, les tubes sont incubés exactement 14 minutes. Après addition d'1 ml de réactif d'arrêt (20% TCA, 10 mM  $HgCl_2$ ) et centrifugation, le mélange du surnageant avec un réactif de Ehrlich (1.1 g 4-diméthylamino-benzaldéhyde dans 20 ml d'acide perchlorique ajusté à 55 ml avec de l'acide acétique) forme un complexe rose. Le mélange résultant est à nouveau centrifugé (4 min, 1900 g). La quantité de PBG formé est mesuré par absorbance à 554 nm ( $\epsilon = 62'000 [mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$ ). L'expérience a été effectué deux fois. Les résultats sont décrits en page 37.

### 8.2.2. Test d'inhibition et détermination des constantes cinétiques

La PBGS issue de *E. coli* (CR 261) a été procurée par le Dr. Ch. Roessner de l'université Texas A & M. La production et la purification de cette source de PBGS ont été décrits dans les travaux de M. Henz [39].

Les essais d'inhibition (48 tubes au total) contiennent 400  $\mu l$  d'une solution de PBGS (1 épendorf (1.1 mg) dans 80 ml de tampon) et l'inhibiteur (trois concentrations différentes par test) dans du tampon phosphaté à pH=8.0 (0.1M NaP, 12.3 mM mercapto-éthanol, 10 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  et 10  $\mu M$   $ZnCl_2$ ). La préincubation a lieu à 37°C durant 30 à 45 minutes. Le substrat est additionné à des concentrations différentes et le mélange résultant est incubé durant 14 minutes. Un schéma de pipettage et d'addition d'ALA peut être décrit comme suit:

	Blanc	Conc I	Conc II	Conc III
Inhibiteur dilué dans tampon	0 $\mu$ l	300 $\mu$ l (ou 50 $\mu$ l)	500 $\mu$ l (ou 100 $\mu$ l)	700 $\mu$ l (ou 200 $\mu$ l)
Solution PBGS	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Tampon	complété à 1.5 ml	complété à 1.5 ml	complété à 1.5 ml	complété à 1.5 ml
Solution ALA 0.5 mg/ml	40, 50, 60, 80, 100, 200 $\mu$ l	40, 50, 60, 80, 100, 200 $\mu$ l	40, 50, 60, 80, 100, 200 $\mu$ l	40, 50, 60, 80, 100, 200 $\mu$ l

Après 14 min d'incubation, la réaction enzymatique est stoppée par addition du réactif d'arrêt et les tubes sont placés dans un bain de glace. Après centrifugation (4 min, 1900 g), 1 ml du surnageant est traité par 1 ml de réactif d'Ehrlich. Le mélange résultant est à nouveau centrifugé (4 min, 1900 g). La quantité de PBG formé est mesuré par absorbance à 554 nm ( $\epsilon = 62'000 \text{ [mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$ ).

Les types d'inhibition sont déterminés en utilisant les graphiques de Eadie-Hofstee, Lineweaver Burk et Hanes. Les valeurs de  $K_i$  sont calculées à partir des  $K_{mapp}$  déduits de l'hyperbole décrivant la cinétique de Michaelis-Menten.

#### Préparation de la solution d'inhibiteur:

Une quantité d'inhibiteur appropriée est dissoute dans 10 ou 20 ml de tampon phosphaté pH=8.0. Si l'inhibiteur n'est pas soluble dans le tampon, le DMSO est utilisé comme cosolvant (aucune influence sur l'activité jusqu'à une teneur de 1.3%). La méthode suivie est donc la dissolution dans un minimum de DMSO du produit puis addition du tampon. On calcule ensuite par rapport au volume maximal de solution d'inhibiteur prélevée et le volume de l'essai, le pourcentage de DMSO présent et s'il n'excède pas 1.3%, le test est poursuivi.

#### 8.2.3. Test de différenciation réversible/irréversible, slow-binder

Une variation du test d'inhibition incluant deux temps de préincubation différents permet de différencier les inhibiteurs réversibles des inhibiteurs irréversibles/slow-binder.

Le schéma de pipetage est le suivant:

	Blanc	Conc I	Blanc'	Conc I'
Inhibiteur dilué dans tampon	0 µl	400 µl	0 µl	400 µl
Solution PBCS	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Tampon	completé à 1.5 ml	completé à 1.5 ml	completé à 1.5 ml	completé à 1.5 ml
Pré-incubation	30 min	30 min	90 min	90 min
Solution ALA 0.5 mg/ml	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl	50, 100, 200 µl

Une stabilité des valeurs d'absorbance Conc I par rapport à Conc I' confirme la présence d'un inhibiteur réversible. Par contre, une diminution de cette valeur met en évidence la présence d'un inhibiteur irréversible ou d'un slow-binder qui doivent être différencier par dialyse (exemple p 69).

#### 8.2.4. Estimation de l'activité spécifique

Le calcul de l'activité spécifique nécessite d'une part la détermination de la quantité de protéine présente dans la solution enzymatique et d'autre part, la mesure de l'activité de cette même solution.

La quantité de protéine est estimée par le test Bio-Rad Protein Assay utilisant un changement de couleur du colorant Coomassie Brilliant Blue-G-250. Ce changement de couleur est suivi par mesure de l'absorbance à 596nm.

Différentes dilutions et mesures sont effectuées à partir de la solution enzymatique dont l'activité doit être estimée:

X µl de solution à tester + (800-X) µl d'eau + 200 µl de Coomassie Brilliant Blue-G-250 ( avec X = 10, 20, 30, 40 et 50).

La quantité d'enzyme ( $m_{\text{protéine}}$  (mg)) est déduite par comparaison avec une courbe standard utilisant comme protéine l'albumine de serum de boeuf.

La mesure de l'activité de la solution enzymatique s'effectue comme suit:

50 µl de la solution enzymatique sont placés avec 1250 µl de tampon phosphaté (0.1M NaP, 12.3 mM mercapto-éthanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O et 10 µM ZnCl<sub>2</sub>) dans un tube (deux mesures par essai). La préincubation a lieu à 37°C durant 20 minutes. 200 µl d'ALA (0.5 mg/ml) sont additionnés et le mélange est incubé. Après 14 min d'incubation, la réaction enzymatique est stoppée par addition du réactif d'arrêt et les tubes sont placés dans un bain de glace. Après centrifugation (4 min, 1900 g), 1 ml du surnageant est traité par 1 ml de réactif d'Ehrlich. Le mélange résultant est à nouveau centrifugé (4 min, 1900 g). La quantité de PBG formé est mesuré par absorbance à 554 nm ( $\epsilon = 62'000$  [l/mol/cm]).

L'activité spécifique se calcule suivant la relation suivante:

$$SA = (n \cdot ABS \cdot 1000) / (\epsilon \cdot m_{\text{protéine}} \text{ (mg)} \cdot t \text{ (h)}) \text{ [}\mu\text{mol PBG/mg/h]}$$

ABS : absorbance à 554 nm; Temps d'incubation en h = 0.233

Coefficient d'extinction: 62'000 [l/mol/cm]; Facteur de dilution n =3.333

### 8.2.5. Dialyse

#### Exemple de l'acide 4-oxo-sébacique (104):

Un épendorf de PBCS (1.1 mg) est dissous dans 10 ml de tampon phosphaté (0.1M NaP, pH=8.0, 12.3 mM mercapto-éthanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O et 10 μM ZnCl<sub>2</sub>). 4 ml de cette solution sont placés dans deux différents tubes de 5 ml, un contenant 5.8 mg d'acide 4-oxo-sébacique (104) et le second, sans inhibiteur (témoin). Après 24 h d'incubation à température ambiante, l'activité spécifique est déterminée. La solution contenant l'inhibiteur montre 22.4% d'activité spécifique comparé au témoin (100%).

1 ml de chaque solution est placé dans une poche à dialyse et chaque solution est dialysée séparément dans 2.5 l de tampon phosphaté (0.1M NaP, pH=8.0, 12.3 mM mercapto-éthanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O et 10 μM ZnCl<sub>2</sub>). Après 66 h de dialyse à 4°C (un changement de tampon a été entre temps effectué), les activités spécifiques sont à nouveau déterminées. La solution contenant l'inhibiteur montre 28.5 % d'activité spécifique comparé au témoin (100%). L'acide 4-oxo-sébacique est un inhibiteur décrit comme étant irréversible.

### 8.2.6. Tableaux de résultats

Les résultats des composés dont une valeur de K<sub>i</sub> ou K<sub>i</sub>' a été donnée sont donnés dans les tableaux qui suivent. Les différentes concentrations en inhibiteur sont notées dans la seconde ligne. K<sub>i</sub>(1), K<sub>i</sub>(2), K<sub>i</sub>(3) et K<sub>i</sub>(4) sont calculées suivant les méthodes suivantes: Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Ofstee et Michaelis-Menten.

Pour les diacides et diacides mixtes slow-binder (aucune valeur K<sub>i</sub>'ne leur a été attribuée), ce sont les tests de différenciation réversible/irréversible, slow-binder qui sont donnés.

Trois cas de problèmes de détection sont également montrés.

ALA [µM]	1-Amino-4-nitro-butane-2-one (48) [µM]			3-Oxo-ALA (50) [µM]			Acide acétoxy-acétique (51) [µM]				
0	3.93	7.87	15.73	0	1422	2370	3318	0	5758	11516	17274
79.4	0.320 0.337	0.304 0.299	0.259 0.246	0.171 0.176	(0.614) (0.592)	(0.573) (0.587)	(0.555) (0.534)	(0.543) (0.536)	0.346 0.334	0.303 0.321	0.298 0.263
99.2	0.363 0.354	0.307 0.326	0.279 0.293	0.175 0.196	0.436 0.420	0.403 0.418	0.390 0.378	0.346 0.352	0.370 0.364	0.360 0.351	0.338 0.304
119.1	0.386 0.366	0.329 0.309	0.307 0.309	0.228 0.219	0.457 0.457	0.434 0.406	0.383 0.400	(0.345) 0.407	0.388 0.407	0.377 0.372	0.337 0.360
158.8	0.392 0.411	0.370 0.366	0.321 0.310	0.236 0.229	0.523 0.519	0.497 0.477	0.458 0.453	0.444 0.437	0.400 0.400	0.401 0.400	0.380 0.398
198.5	0.426 0.426	0.373 0.388	0.337 0.327	0.265 0.274	0.541 0.543	0.511 0.510	0.489 0.483	0.479 0.484	0.430 0.444	0.427 0.426	0.409 0.409
397.0	0.471 0.457	0.436 0.393	0.390 0.331	0.315 0.321	0.614 0.592	0.573 0.587	0.535 0.534	0.543 0.536	0.476 0.463	0.464 0.462	0.453 0.432
Vmax (1)	2.00	1.84	1.68	1.38	2.75	2.62	2.30	2.61	1.99	2.07	2.04
K <sub>mapp</sub> (1)	45.77	50.00	56.11	111.55	65.99	68.50	71.85	87.66	41.65	54.50	59.44
K <sub>i</sub> (1)		42.52	34.84	10.94		(37386)	26688	10104		18809	26961
Vmax (2)	1.98	1.90	1.72	1.35	2.67	2.61	2.46	2.47	1.99	2.00	1.98
K <sub>mapp</sub> (2)	44.50	56.50	60.78	107.02	58.79	67.42	67.81	74.31	41.80	47.98	53.62
K <sub>i</sub> (2)		14.57	21.51	11.20		9687	(409706)	12568		38946	40759
Vmax (3)	1.99	1.86	1.67	1.55	2.72	2.61	2.48	2.52	1.99	2.04	2.01
K <sub>mapp</sub> (3)	45.44	51.30	54.74	106.50	63.31	67.58	69.65	79.49	41.51	51.81	57.04
K <sub>i</sub> (3)		30.46	38.45	11.71		21083	24437	12983		23205	30781
Vmax (4)	1.99	1.88	1.69	1.56	2.70	2.62	2.48	2.51	1.99	2.03	2.02
K <sub>mapp</sub> (4)	45.21	53.71	56.67	107.92	61.95	68.26	70.01	78.01	41.83	50.69	55.77
K <sub>i</sub> (4)		20.90	31.05	11.34		13961	18216	12799		27184	34556
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 29.4 K <sub>i</sub> (2): 13.8 K <sub>i</sub> (3): 26.9 K <sub>i</sub> (4): 21.1			K <sub>i</sub> (1): 18396 K <sub>i</sub> (2): 11127 K <sub>i</sub> (3): 19501 K <sub>i</sub> (4): 14992			K <sub>i</sub> (1): 20911 K <sub>i</sub> (2): 34888 K <sub>i</sub> (3): 24405 K <sub>i</sub> (4): 27746				
	Préincubation: 35 min Incubation: 14 min			Préincubation: 33 min Incubation: 14 min			Préincubation: 32 min Incubation: 14 min				
	Nombre de tests: 4			Nombre de tests: 5			Nombre de tests: 3				

A.L.A. [µM]	Glycyl-glycine (52) [µM]				3-Amino-lévininate de méthyle (53) [µM]				Acide 3-méthylène-lévinique (54) [µM]			
	0	31622	52703	73783	0	1750	2917	4083	0	140.5	280.9	561.9
0.285	0.295	0.278	0.264	0.264	0.341	0.331	0.309	0.297	0.320	0.249	0.246	0.207
0.291	0.264	0.272	0.268	0.351	0.320	0.312	0.299	0.299	0.326	0.263	0.229	0.221
0.347	0.322	0.302	0.298	0.393	0.359	0.345	0.315	0.389	0.389	0.294	0.265	0.232
99.2	(0.315)	0.321	(0.254)	0.283	0.391	0.356	0.347	0.311	(0.326)	0.283	0.267	0.225
0.366	0.359	0.329	0.319	0.397	0.392	0.358	0.343	(0.410)	(0.266)	(0.284)	(0.187)	
119.1	0.368	0.343	0.324	0.327	0.399	0.367	0.366	0.351	(0.380)	(0.286)	(0.190)	(0.246)
0.385	0.375	(0.495)	(0.416)	0.439	0.403	0.382	0.366	0.439	0.318	0.280	0.240	
158.8	0.386	0.391	(0.498)	(0.415)	0.439	0.405	0.380	0.358	0.455	0.329	0.288	0.249
0.409	0.394	0.367	0.384	0.473	0.440	0.400	0.379	0.448	0.336	0.274	0.239	
198.5	0.402	0.400	0.387	0.375	0.461	0.425	0.391	(0.367)	0.451	0.345	0.297	0.259
0.461	0.449	0.438	0.428	0.522	0.486	0.445	0.422	0.495	0.357	0.314	0.271	
397.0	0.452	0.446	0.437	0.423	0.513	0.486	0.462	0.422	0.494	0.363	0.317	0.268
Vmax (1)	2.06	2.14	1.96	1.97	2.27	2.11	1.92	1.81	2.27	1.58	1.30	1.12
K <sub>mapp</sub> (1)	62.20	77.79	68.02	73.58	55.07	54.57	47.07	46.75	59.65	46.02	31.64	27.96
K <sub>i</sub> (1)		126163	-	-	(190995)	17162	22942			474.4	317.3	495.8
Vmax (2)	2.00	2.00	1.97	1.92	2.26	2.13	1.95	1.81	2.13	1.52	1.31	1.11
K <sub>mapp</sub> (2)	55.61	63.13	69.39	68.26	53.74	55.84	50.72	47.20	47.06	38.17	32.51	26.22
K <sub>i</sub> (2)		233843	212686	324362	-	(489901)	29467			603.2	627.6	707.0
Vmax (3)	2.00	2.05	1.96	1.95	2.26	2.11	1.92	1.80	2.19	1.57	1.29	1.11
K <sub>mapp</sub> (3)	55.66	68.80	68.28	71.70	54.09	54.68	46.95	46.34	52.26	43.68	30.66	27.69
K <sub>i</sub> (3)		133948	232444	256039	-	19181	2413			715.3	398.7	633.2
Vmax (4)	2.00	2.04	1.96	1.94	2.26	2.12	1.93	1.81	2.18	1.56	1.30	1.11
K <sub>mapp</sub> (4)	56.00	66.71	68.64	70.44	54.24	55.06	47.85	46.75	51.49	45.20	31.02	27.57
K <sub>i</sub> (4)		165344	233494	286147	-	21843	25484			664.2	425.7	647.6
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 126163 K <sub>i</sub> (2): 256964 K <sub>i</sub> (3): 207477 K <sub>i</sub> (4): 228328	K <sub>i</sub> (1): 20053 K <sub>i</sub> (2): 29467 K <sub>i</sub> (3): 21797 K <sub>i</sub> (4): 23660								K <sub>i</sub> (1): 429 K <sub>i</sub> (2): 646 K <sub>i</sub> (3): 582 K <sub>i</sub> (4): 579		
	Préincubation: 36 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 5				Préincubation: 36 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 3				Préincubation: 29 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 2			

ALA [µM]	3-Méthyle lévulinate de méthyle (S5) [µM]				Hydroxylamine de l'acide lévulinique (S6) [µM]				4-Nitro-butane-1,2-diol (S7) [µM]				
0	3792	6320	8848	0	7800	13000	18200	0	1540	3080	6160		
79.4	0.331 (0.358)	0.288 (0.280)	0.224 (0.157)	0.176 (0.192)	0.345 (0.296)	0.306 (0.312)	0.262 (0.284)	0.242 (0.260)	0.388 (0.389)	0.372 (0.366)	0.363 (0.369)	0.331 (0.340)	
99.2	0.385 (0.400)	0.287 (0.321)	0.227 (0.269)	0.212 (0.224)	0.392 (0.381)	0.359 (0.322)	0.318 (0.315)	0.270 (0.272)	0.440 (0.445)	0.423 (0.429)	0.422 (0.406)	0.391 (0.387)	
119.1	0.360 (0.414)	0.334 (0.256)	0.280 (0.275)	0.244 (0.211)	0.388 (0.382)	0.367 (0.374)	0.344 (0.342)	0.306 (0.320)	0.475 (0.465)	0.447 (0.455)	0.440 (0.454)	0.431 (0.439)	
158.8	0.399 (0.446)	0.331 (0.339)	0.272 (0.272)	0.238 (0.240)	0.434 (0.450)	0.410 (0.415)	0.394 (0.366)	0.340 (0.356)	0.528 (0.530)	0.505 (0.510)	0.454 (0.566)	0.485 (0.495)	
198.5	0.456 (0.445)	0.356 (0.343)	0.299 (0.291)	0.254 (0.249)	0.463 (0.459)	0.447 (0.441)	0.417 (0.415)	0.387 (0.388)	0.532 (0.557)	0.549 (0.541)	0.530 (0.540)	0.513 (0.525)	
397.0	0.538 (0.523)	0.403 (0.393)	0.336 (0.334)	0.271 (0.271)	0.499 (0.512)	0.494 (0.498)	0.473 (0.474)	0.464 (0.465)	0.639 (0.619)	0.625 (0.617)	0.615 (0.604)	0.595 (0.590)	
V <sub>max</sub> (1)	2.21	1.67	1.47	1.22	2.22	2.28	2.29	2.30	2.93	2.94	2.85	2.97	
K <sub>mapp</sub> (1)	59.26	41.05	53.80	55.09	53.27	70.55	90.07	113.09	74.32	83.14	80.71	99.38	
K <sub>i</sub> (1)	8548	(62274)	(116891)		24045	18818	16207		12977	35822	18269		
V <sub>max</sub> (2)	2.44	1.69	1.45	1.16	2.20	2.22	2.29	2.29	2.83	2.86	2.80	2.77	
K <sub>mapp</sub> (2)	83.07	43.29	50.46	43.84	50.79	64.80	80.35	111.92	67.13	76.15	75.83	82.22	
K <sub>i</sub> (2)		4126	9779	9888		28277	22356	15122		11461	23766	27404	
V <sub>max</sub> (3)	2.24	1.66	1.45	1.20	2.21	2.25	2.24	2.29	2.89	2.90	2.83	2.86	
K <sub>mapp</sub> (3)	62.37	40.22	50.45	50.33	52.02	67.64	84.82	112.06	71.38	79.92	78.96	90.07	
K <sub>i</sub> (3)		6885	(26749)	(36987)		25977	20618	15769		12876	29004	23526	
V <sub>max</sub> (4)	2.37	1.67	1.45	1.19	2.21	2.24	2.22	2.30	2.87	2.88	2.82	2.81	
K <sub>mapp</sub> (4)	75.59	40.75	50.30	48.52	52.34	66.73	82.66	112.68	69.56	78.13	77.55	85.98	
K <sub>i</sub> (4)		7392	12570	13859		28371	22441	15787		12499	26814	26096	
Valeur moyenne		K <sub>i</sub> (1): 8548 K <sub>i</sub> (2): 7931 K <sub>i</sub> (3): 6885 K <sub>i</sub> (4): 11940				K <sub>i</sub> (1): 19690 K <sub>i</sub> (2): 21912 K <sub>i</sub> (3): 20788 K <sub>i</sub> (4): 22200				K <sub>i</sub> (1): 22356 K <sub>i</sub> (2): 20877 K <sub>i</sub> (3): 21801 K <sub>i</sub> (4): 21803			
	Préincubation: 33 min Incubation: 14 min				Préincubation: 41 min Incubation: 14 min				Préincubation: 34 min Incubation: 14 min				
	Nombre de tests: 2				Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 2				

ALA [µM]	Diacide mixte (117) [µM]				N,N-diméthyl-ALA (59) [µM]				Acide 6-(N,N-diméthyl)-arnino)-4-oxo-hexanoïque (60) [µM]			
0	2.3	4.6	9.15	0	1866	3110	4354	0	1740	2900	4060	
0.343	0.310	0.278	0.218	0.421	0.359	0.318	0.302	0.364	0.259	0.214	0.191	
0.328	0.305	0.286	0.238	0.434	0.350	0.324	0.295	0.354	0.252	0.212	0.197	
79.4	0.380	0.354	0.324	0.451	0.388	0.366	0.356	0.397	0.292	0.248	0.226	
99.2	0.368	0.355	0.313	0.453	0.380	0.360	0.354	0.405	0.274	0.245	0.213	
0.402	0.378	0.339	0.288	0.479	0.422	0.386	0.361	0.429	0.307	0.270	0.248	
119.1	0.410	0.377	0.324	0.477	0.406	0.386	0.361	0.440	0.314	0.269	0.239	
0.436	0.411	0.370	0.319	0.514	0.453	0.427	0.412	0.477	0.328	0.299	0.273	
158.8	0.428	0.402	0.365	0.506	0.441	0.427	0.385	0.471	0.330	0.301	0.275	
0.457	0.426	0.410	0.338	0.540	0.474	0.441	0.423	0.499	0.351	0.313	0.289	
198.5	0.467	0.423	0.397	0.526	0.459	0.432	0.419	0.489	0.348	0.317	0.295	
0.511	0.469	0.32	0.384	0.620	0.530	0.503	0.472	0.568	0.385	0.355	0.315	
397.0	0.499	0.468	0.441	0.606	0.525	0.501	0.476	0.555	0.395	0.347	0.330	
Vmax (1)	2.27	2.12	2.00	2.56	2.30	2.25	2.15	2.54	1.75	1.69	1.59	
Kmapp (1)	58.64	59.14	65.92	46.23	55.07	63.62	65.31	65.16	60.47	80.28	87.80	
Ki (1)	-	-	36.81	18.21	9758.50	8267.70	10549.5	-	-	12497.6	11685.0	
Vmax (2)	2.20	2.04	1.94	2.66	2.30	2.22	2.10	2.49	1.71	1.58	1.47	
Kmapp (2)	52.18	51.05	59.17	53.64	55.21	60.58	60.03	61.13	56.17	65.69	69.59	
Ki (2)	-	-	34.11	(63753)	(24037)	(36549)	-	-	-	38876.5	29336.6	
Vmax (3)	2.25	2.08	1.98	2.58	2.30	2.23	2.11	2.51	1.73	1.64	1.54	
Kmapp (3)	56.24	55.18	63.79	47.64	54.94	61.66	61.20	63.27	58.50	73.27	80.20	
Ki (3)	-	-	34.04	12177.5	10567.7	15296.8	-	-	-	18348.3	15172.8	
Vmax (4)	2.23	2.06	1.97	2.61	2.30	2.23	2.11	2.50	1.72	1.62	1.52	
Kmapp (4)	24.89	53.81	62.61	49.68	54.94	60.99	61.06	62.22	57.58	70.14	76.01	
Ki (4)	-	-	32.49	17624.1	13660.9	19007.6	-	-	-	22782.5	18318.5	
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 27.5 K <sub>i</sub> (2): 33.6 K <sub>i</sub> (3): 26.9 K <sub>i</sub> (4): 26.5				K <sub>i</sub> (1): 9525 K <sub>i</sub> (2): - K <sub>i</sub> (3): 12680 K <sub>i</sub> (4): 16764				K <sub>i</sub> (1): 12091 K <sub>i</sub> (2): (34107) K <sub>i</sub> (3): 16761 K <sub>i</sub> (4): 20551			
Préincubation: 43 min Incubation: 20 min				Préincubation: 37 min Incubation: 14 min				Préincubation: 40 min Incubation: 14 min				
Nombre de tests: 4				Nombre de tests: 5				Nombre de tests: 6				

ALA [μM]	Acide succinamique (61) [nM]				Acide 5-cyano-lévolinique (62) [nM]				Acide 5-(S-méthyl)-thio)-lévolinique (63) [nM]						
0	4600	9200	13800	0	53.9	107.8	215.5	0	3840	6400	8960				
79.4	0.307	0.289	0.274	0.298	0.236	0.206	0.171	0.396	0.310	0.278	0.218				
	0.311	0.299	0.264	0.296	0.246	0.213	0.171	0.404	0.333	0.284	0.230				
99.2	0.323	0.284	0.280	0.318	0.273	0.229	0.175	0.438	0.375	0.322	0.272				
	0.312	0.302	0.294	0.281	0.262	0.222	0.183	0.442	0.373	0.322	0.259				
**	0.347	0.333	0.319	0.288	0.311	0.260	0.232	0.187	0.478	0.405	0.364				
119.1	0.345	0.341	0.319	0.288	0.316	0.246	0.225	0.188	0.475	0.399	0.350				
	0.361	0.334	0.323	0.333	0.292	0.237	0.195	0.496	0.443	0.394	0.345				
158.8	0.357	0.368	0.343	0.276	0.284	0.254	0.199	0.487	0.451	0.402	0.359				
	0.390	0.385	0.362	0.353	0.394	0.335	0.266	0.211	0.535	0.496	0.424				
198.5	0.383	0.375	0.361	0.351	0.378	0.306	0.262	0.205	0.532	0.479	0.428				
	0.424	0.418	0.414	0.402	0.444	0.327	0.267	0.211	0.606	0.571	0.542				
397.0	0.422	0.412	0.408	0.394	0.436	0.332	0.282	0.214	0.597	0.569	0.533				
	V <sub>max</sub> (1)	1.78	1.76	1.78	1.70	1.85	1.42	1.22	0.89	2.61	2.75	2.61			
K <sub>mapp</sub> (1)	41.78	48.75	56.59	58.87	52.92	42.98	36.94	28.26	54.89	94.64	112.00	175.78			
K <sub>i</sub> (1)		27574	25954	33737	232.97	249.10	246.93		5302.58	6151.22	4068.22				
	V <sub>max</sub> (2)	1.81	1.82	1.79	1.95	1.41	1.15	0.87	2.63	2.69	2.65	2.63			
K <sub>mapp</sub> (2)	44.86	5377	61.13	69.66	63.71	41.22	32.97	24.30	56.71	89.14	115.97	155.11			
K <sub>i</sub> (2)		23160	25366	24962	98.75	115.58	132.86		6714.97	6124.60	5163.84				
	V <sub>max</sub> (3)	1.78	1.76	1.78	1.72	1.87	1.41	1.16	0.89	2.61	2.71	2.62			
K <sub>mapp</sub> (3)	42.17	47.84	57.36	60.79	54.39	41.05	34.77	27.80	54.60	91.46	112.05	161.27			
K <sub>i</sub> (3)		34212	25541	31254	165.80	190.97	225.26		5688.12	6082.51	4586.26				
	V <sub>max</sub> (4)	1.79	1.79	1.80	1.92	1.42	1.16	0.86	2.62	2.70	2.64	2.64			
K <sub>mapp</sub> (4)	43.48	51.83	59.16	66.02	59.619	43.44	34.88	27.49	55.34	90.07	114.20	154.96			
K <sub>i</sub> (4)		23953	25511	26620	144.66	151.93	184.35		6118.79	6017.26	4977.38				
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 29088 K <sub>i</sub> (2): 24496 K <sub>i</sub> (3): 30336 K <sub>i</sub> (4): 25361	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 2				K <sub>i</sub> (1): 243 K <sub>i</sub> (2): 116 K <sub>i</sub> (3): 194 K <sub>i</sub> (4): 160	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 6				K <sub>i</sub> (1): 5174 K <sub>i</sub> (2): 6001 K <sub>i</sub> (3): 5452 K <sub>i</sub> (4): 5704	Préincubation: 36 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 3			

ATLA [µM]	Acide 5-fluoro-lévolinique (65) [µM]				5-fluoro lévolinate de méthyle (66) [µM]				Acide 5,5,5-trifluoro-lévolinique (67) [µM]			
0	89.5	179.0	358.1	0	1058	2115	4231	0	80.3	160.7	321.3	
0.301	0.191	0.138	0.075	0.305	0.187	0.139	0.087	0.371	0.344	0.309	0.265	
79.4	0.337	0.174	0.061	0.299	0.189	0.1234	0.089	0.358	0.326	0.303	0.262	
0.329	(0.300)	0.169	0.100	0.337	0.220	0.177	0.115	0.400	0.361	0.336	0.294	
99.2	0.319	0.254	0.128	0.342	0.217	0.173	0.127	0.401	0.360	0.332	0.292	
119.1	0.327	0.247	0.186	0.350	0.245	0.194	0.132	0.412	(0.378)	(0.337)	0.308	
158.8	0.311	0.248	0.185	0.347	0.248	0.193	0.139	0.413	0.378	(0.353)	0.298	
198.5	0.372	0.263	0.197	0.387	0.292	0.229	0.163	0.449	(0.450)	0.375	0.317	
397.0	0.405	0.260	0.220	0.392	0.291	0.233	0.164	0.454	0.412	0.367	0.319	
	0.373	0.306	0.229	0.132	0.393	0.311	0.258	0.191	0.486	0.433	0.387	
	0.367	0.305	0.284	0.154	0.390	0.319	0.263	0.187	0.494	0.429	0.392	
	0.430	0.351	0.323	0.219	0.428	0.364	0.317	0.276	0.553	0.491	0.434	
	0.404	0.357	0.285	0.230	0.439	0.369	0.327	0.263	0.481	0.434	0.368	
Vmax (1)	1.78	2.03	2.46	1.89	2.01	2.22	2.38	2.42	2.08	1.84	1.57	
Kmapp (1)	43.28	107.77	240.98	586.81	47.89	138.12	250.18	449.70	59.03	49.93	44.68	
Ki (1)	60.08	39.19	28.51	562	501	504	504	440.76	500.23	826.14		
Vmax (2)	1.78	1.68	1.75	1.55	1.85	1.82	1.92	2.48	2.11	1.86	1.56	
Kmapp (2)	45.09	94.33	186.60	315.73	43.84	111.20	177.63	332.80	64.19	52.82	46.68	
Ki (2)	81.98	56.70	39.66	689	693	642	642	373.18	428.30	565.04		
Vmax (3)	1.77	1.39	1.77	1.13	1.37	1.90	1.83	2.44	2.09	1.84	1.56	
Kmapp (3)	43.471	80.42	191.98	182.48	46.03	122.66	180.80	309.41	60.26	50.63	44.86	
Ki (3)	105.31	52.41	111.98	635	722	739	739	422.34	468.00	725.88		
Vmax (4)	1.78	1.68	1.75	1.46	1.87	1.85	1.81	2.46	2.10	1.85	1.56	
Kmapp (4)	44.46	92.16	184.86	280.19	45.50	115.17	173.98	315.84	62.27	51.45	45.28	
Ki (4)	83.44	56.70	67.53	691	749	712	712	381.98	428.17	653.76		
Valeur moyenne	Ki (1): 43	Ki (2): 66	Ki (3): 90	Ki (4): 69	Ki (1): 522	Ki (2): 675	Ki (3): 699	Ki (4): 717	Ki (1): 589	Ki (2): 455	Ki (3): 539	Ki (4): 488
Préincubation: 30 min	Incubation: 14 min	Préincubation: 30 min	Incubation: 14 min	Préincubation: 45 min	Incubation: 14 min							
Nombre de tests: 4				Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 4				

ALA [μM]	Trifluoro-acétyl-glycine (68) [μM]	2-Trifluoroacétyl-mono-succinate d'éthyle (69) [μM]	4-Nitro-benzaldéhyde (71) [μM]
0	8522 14203 19883	0 4637 702 10783	0 628 1097 1465
0.359	0.318 0.299 0.250	0.283 0.224 0.215	0.383 0.341 0.317
0.381	0.309 0.278 0.241	0.274 0.231 0.207	0.399 0.353 0.303
0.405	0.369 0.321 0.284	0.305 0.260 0.227	(0.330) (0.380)
0.409	0.356 0.322 0.280	0.315 0.256 0.226	0.417 0.356 0.330
0.429	0.385 0.340 0.308	0.319 0.278 0.237	0.465 0.417 0.359
0.445	0.390 0.346 0.313	0.326 0.265 0.228	0.448 0.419 0.391
0.460	0.416 0.392 0.346	0.326 0.285 0.262	0.504 0.448 0.418
158.8	0.467 0.426 0.400	0.343 0.292 0.260	0.495 0.454 0.421
0.493	0.465 0.414 0.376	0.380 0.316 0.280	0.534 0.491 0.449
198.5	0.486 0.462 0.416	0.368 0.310 0.279	0.533 0.482 0.431
0.546	0.514 0.500 0.465	0.404 0.346 0.315	0.589 0.545 0.506
397.0	0.536 0.513 0.488	0.407 0.352 0.307	0.543 0.543 0.508
Vmax (1)	2.37 2.41 2.31	1.75 1.55 1.35	2.64 2.48 2.36
K <sub>mnapp</sub> (1)	51.63 76.72 86.53	49.75 59.45 55.00	61.53 67.98 79.19
K <sub>i</sub> (1)	17536.5 21011.4 17649.3	23702 72986 25472	(5990) 3648 3909
Vmax (2)	2.34 2.32 2.31	1.76 1.54 1.37	2.60 2.43 2.32
K <sub>mnapp</sub> (2)	49.21 67.98 87.07	50.23 57.69 57.75	63.85 74.70 78.63
K <sub>i</sub> (2)	22342.4 18460.9 15845.3	31116 51446 54434	(6468) 3693 4173
Vmax (3)	2.35 2.37 2.31	1.75 1.54 1.36	2.63 2.46 2.35
K <sub>mnapp</sub> (3)	50.64 72.74 86.58	49.30 58.11 55.76	60.78 66.59 77.33
K <sub>i</sub> (3)	19527.3 20012.2 17228.0	22860 58778 33816	(6570) 3845 4216
Vmax (4)	2.35 2.35 2.31	1.76 1.54 1.37	2.43 2.45 2.34
K <sub>mnapp</sub> (4)	50.09 70.90 86.97	50.08 57.99 57.32	60.26 66.61 76.34
K <sub>i</sub> (4)	20512.5 19290.3 16661.7	29258 53276 41411	(7073) 3923 4405
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 18732 K <sub>i</sub> (2): 18883 K <sub>i</sub> (3): 18922 K <sub>i</sub> (4): 18822	K <sub>i</sub> (1): 40720 K <sub>i</sub> (2): 45665 K <sub>i</sub> (3): 39485 K <sub>i</sub> (4): 41315	K <sub>i</sub> (1): 3778 K <sub>i</sub> (2): 3933 K <sub>i</sub> (3): 4090 K <sub>i</sub> (4): 4164
	Préincubation: 34 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 3	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 4	Préincubation: 31 min Incubation: 14 min Nombre de tests: 4



ALA [μM]	Acide acéto-pyruvique (77) [μM]				Acéto-pyruvate de méthyle (78) [μM]				Acide 4-δ-déso-5-méthyl-heptanoïque (79) [μM]			
0	14,9	29,8	59,4	0	278	463	648	0	68	113	159	
0,330 (0,284)	0,311 0,311	0,298 0,293	0,275 0,270	0,217 (0,263)	0,281 (0,293)	0,300 (0,287)	0,312 (0,253)	0,342 0,361	0,295 0,298	0,259 0,271	0,244 0,249	
79,4	0,371 0,366	0,323 0,328	0,298 0,277	0,280 0,406	0,372 0,406	0,301 (0,295)	0,344 0,312	0,331 0,385	0,318 0,353	0,303 0,293	0,275 0,265	
99,2	0,381 (0,345)	0,367 0,362	0,333 0,347	0,316 0,307	0,438 (0,400)	0,404 0,398	0,369 0,373	0,339 0,353	0,325 0,342	0,335 0,319	0,301 0,283	
119,1	0,420 0,410	0,378 0,380	0,367 0,360	0,325 0,321	0,483 0,473	0,418 0,430	0,404 0,389	0,372 0,381	0,459 0,467	0,390 0,389	0,350 0,335	
158,8	0,472 0,472	0,435 0,433	0,388 0,408	0,358 0,377	0,503 0,499	0,459 0,455	0,429 0,422	0,407 0,401	0,508 0,499	0,412 0,416	0,367 0,364	
198,5	0,472 0,472	0,435 0,433	0,388 0,408	0,358 0,377	0,577 0,569	0,525 0,508	0,463 (0,427)	0,440 0,450	0,555 0,550	0,450 0,446	0,358 0,354	
397,0	2,10	1,85	1,73	1,57	2,63	2,25	2,03	1,99	2,55	2,05	1,82	
V <sub>max</sub> (1)	44,23	44,24	41,53	22,4,21	71,88	57,11	52,45	59,81	70,73	62,16	60,37	
K <sub>m</sub> (1)	79,09	158,41	224,21		1075	1250	(3213)	493	658	393		
V <sub>max</sub> (2)	2,03	1,85	1,68	1,56+	2,57	2,28	2,00	1,95	2,48	1,96	1,77	
K <sub>m</sub> (2)	46,30	43,64	38,59	39,73	66,67	60,27	48,93	55,75	64,21	52,70	55,14	
V <sub>max</sub> (3)	2,06	1,84	1,71	1,57	2,59	2,26	2,02	1,98	2,53	2,02	1,8	
K <sub>m</sub> (3)	49,27	43,26	41,87	40,67	68,73	57,73	51,45	58,67	69,07	59,03	58,06	
V <sub>max</sub> (4)	2,05	1,85	1,71	1,57	2,57	2,27	2,02	1,97	2,52	2,00	1,79	
K <sub>m</sub> (4)	48,41	43,56	41,96	41,10	67,98	58,98	50,85	57,82	67,53	57,08	56,96	
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 154 K <sub>i</sub> (2): 251 K <sub>i</sub> (3): 185 K <sub>i</sub> (4): 221	K <sub>i</sub> (1): 1162 K <sub>i</sub> (2): 1938 K <sub>i</sub> (3): 1419 K <sub>i</sub> (4): 1599	K <sub>i</sub> (1): 515 K <sub>i</sub> (2): 471 K <sub>i</sub> (3): 461 K <sub>i</sub> (4): 456									
	Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 31 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 7				Nombre de tests: 4			

ALA [μM]	4,6-Dioxo-5-fluoro-heptanoate de méthyl				Acide 4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (81) [μM]				Acide 4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (82) [μM]			
	0	1046	1744	24417	0	52	104	208	0	561	934	1308
79.4	0.393 0.388	0.255 0.234	0.220 0.221	0.187 0.191	0.419 0.404	0.393 0.374	0.354 0.346	0.300 0.299	0.290 0.267	0.217 0.207	0.187 (0.148)	0.124 0.110
99.2	(0.473)	0.294	0.258	0.226	0.438	0.414	0.393	0.332	0.327	(0.271)	0.198	0.199
119.1	0.460	0.313	0.274	0.243	0.444	0.403	0.389	0.338	0.324	(0.228)	0.185	0.191
158.8	0.459	0.309	0.273	0.243	0.518	0.472	0.405	(0.416)	0.378	0.290	0.263	0.233
198.5	0.504	0.339	0.286	0.270	0.553	0.499	0.438	0.376	0.343	0.269	0.253	0.225
397.0	0.520	0.351	0.289	(0.368)	0.547	0.473	0.441	0.368	0.406	0.308	0.275	0.231
	0.526	0.343	0.314	0.283	0.571	0.497	0.447	0.399	0.482	0.359	0.292	0.252
	0.602	0.399	0.340	0.312	0.645	0.540	0.511	0.420	0.551	0.389	0.342	0.301
	0.577	0.398	0.345	0.312	0.620	0.570	0.512	0.420	0.596	0.396	0.345	0.299
$V_{max}$ (1)	2.61	1.85	1.57	1.52	2.92	2.43	2.21	1.83	2.95	2.10	1.70	1.35
$K_{mapp}$ (1)	58.72	71.82	63.37	81.98	66.53	51.25	49.42	43.65	137.4	120.6	103.2	74.8
$K_i$ (1)		4688	(22023)	6165		174.41	300.39	396.82		4027	2818	1563
$V_{max}$ (2)	2.59	1.78	1.50	1.40	2.79	2.39	2.20	1.77	2.73	1.87	1.61	1.38
$K_{mapp}$ (2)	56.77	63.45	54.88	63.54	57.56	47.56	48.90	37.40	116.4	89.5	89.5	80.86
$K_i$ (2)		8889		20477		247.31	587.25	385.87		1863	3110	2976
$V_{max}$ (3)	2.60	1.80	1.54	1.46	2.86	2.41	2.20	1.80	2.83	1.98	1.61	1.33
$K_{mapp}$ (3)	58.03	66.03	59.44	72.69	62.33	49.16	48.56	40.83	126.5	103.5	88.4	71.5
$K_i$ (3)		7587		9666		194.10	366.76	395.01		2319	2161	1701
$V_{max}$ (4)	2.60	1.80	1.52	1.44	2.84	2.40	2.20	1.80	2.78	1.93	1.61	1.36
$K_{mapp}$ (4)	57.51	64.86	58.13	69.23	61.02	48.85	48.46	40.13	120.5	96.2	88.7	76.8
$K_i$ (4)		8184		11983		208.73	401.26	399.57		2223	2610	2295
Valeur moyenne	$K_i$ (1): 5426 $K_i$ (2): 14683 $K_i$ (3): 8626 $K_i$ (4): 10083				$K_i$ (1): 290 $K_i$ (2): 406 $K_i$ (3): 319 $K_i$ (4): 337				$K_i$ (1): 2803 $K_i$ (2): 2650 $K_i$ (3): 2127 $K_i$ (4): 2376			
	Préincubation: 27 min Incubation: 14 min				Préincubation: 30 min Incubation: 14 min				Préincubation: 33 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 1				Nombre de tests: 4				Nombre de tests: 4			

ALA [μM]	2-(3-Nitro-propionyl)-cyclohexanone (83) [μM]				3-Méthyl-acétyl-acétone (84) [μM]				3-Fluoro-acétyl-acétone(85) [μM]			
	0	2.09	4.18	8.37	0	14070	23451	32831	0	7578	12629	17681
79.4	0.280	0.321	0.289	0.257	0.359	0.335	0.308	0.273	0.364	0.314	0.282	0.243
	0.367	0.329	0.316	0.242	0.368	0.334	0.307	0.276	0.371	0.314	0.282	0.251
99.2	0.377	0.391	0.342	0.301	0.412	0.373	0.331	0.307	0.417	0.355	0.310	0.278
	0.383	0.391	0.357	0.296	0.420	0.372	0.330	0.308	0.404	0.346	0.313	0.275
119.1	0.307	0.415	0.361	0.315	0.451	(0.375)	0.365	0.330	0.437	0.382	0.339	0.305
	0.297	0.400	0.365	0.326	0.437	0.404	0.362	0.349	0.437	0.376	0.331	0.292
158.8	0.479	0.454	0.427	0.367	0.500	0.422	0.395	0.352	0.474	0.405	0.358	0.321
	0.492	0.460	0.368	0.369	0.484	0.417	0.391	0.364	0.479	0.404	0.357	0.323
198.5	0.515	0.482	0.462	0.398	0.502	0.445	0.416	0.377	0.508	0.433	0.388	0.346
	0.529	0.490	0.462	0.395	0.519	0.438	0.400	0.377	0.502	0.424	0.383	0.342
397.0	0.596	0.549	0.525	0.460	0.607	0.521	0.462	(0.554)	0.587	0.486	0.441	0.401
	0.587	0.558	0.521	0.472	0.580	0.512	0.465	0.428	0.565	0.479	0.441	0.393
Vmax (1)	2.72	2.65	2.55	2.37	2.72	2.23	2.05	1.93	2.58	2.15	1.95	1.79
Kmapp (1)	73.64	83.61	93.25	112.19	72.75	57.43	58.51	63.35	64.64	60.74	63.56	69.41
Ki (1)		15.44	15.38	15.99		52744	96356	(221260)				
Vmax (2)	2.67	2.53	2.45	2.24	2.68	2.28	2.04	1.89	2.56	2.12	1.97	1.79
Kmapp (2)	69.28	73.04	83.62	98.15	69.35	61.43	57.58	59.35	63.80	57.90	65.28	69.21
Ki (2)		(38.50)	20.19	20.08		109131	114724	(194852)				
Vmax (3)	2.71	2.57	2.50	2.29	2.69	2.23	2.04	1.90	2.57	2.14	1.95	1.78
Kmapp (3)	72.46	76.82	89.03	103.71	70.41	57.08	57.90	60.75	64.05	59.24	63.72	68.78
Ki (3)		(34.71)	18.27	19.40		60249	108338	(206468)				
Vmax (4)	2.69	2.55	2.48	2.26	2.68	2.25	2.04	1.90	2.57	2.13	1.96	1.78
Kmapp (4)	71.11	75.27	86.94	100.24	69.64	58.39	57.76	60.03	63.81	58.57	64.29	68.76
Ki (4)		(35.72)	18.77	20.43		73026	114018	(205082)				
Valeur moyenne		Ki (1): 15.6 Ki (3): 18.8	Ki (2): 20.1 Ki (4): 19.6			Ki (1): 74550 Ki (3): 84594	Ki (2): 111927 Ki (4): 93522			Ki (1): - Ki (3): -	Ki (2): - Ki (4): -	
	Préincubation: 27 min Incubation: 14 min				Préincubation: 28 min Incubation: 14 min				Préincubation: 33 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 3				Nombre de tests: 2				Nombre de tests: 3			

Al.A [µM]	Acide 3-acétyl-β-evalinique (86) [µM]				Acide 4,6-dioxo-5,5-diméthyl-β-heptanoïque (87) [µM]				Acide 4,6-dioxo-5,5,7-triméthyl-octanoïque (88) [µM]			
0	3731	7462	14924	0	3743	6238	8734	0	4760	7933	11107	
0.422	0.362	0.265	0.226	0.341	0.327	0.290	0.253	(0.482)	(0.399)	0.317	0.266	
79.4	0.414	0.374	0.312	0.194	0.359	0.314	0.262	0.431	0.311	0.279		
(0.409)	0.400	0.305	0.255	0.381	0.351	0.334	0.277	0.472	0.392	0.343	(0.269)	
99.2	0.454	0.402	0.358	0.262	0.386	0.350	0.274	0.475	0.393	0.343	0.293	
0.498	0.428	0.383	0.295	0.407	0.372	0.333	0.297	0.487	0.421	0.368	0.312	
119.1	0.493	0.392	0.386	0.294	0.401	0.377	0.338	0.296	0.492	0.427	0.371	
0.506	0.447	0.423	0.320	0.433	0.401	0.354	0.324	0.548	0.475	(0.429)	0.364	
158.8	0.504	0.464	0.424	0.326	0.417	0.393	0.327	0.554	0.484	0.412	0.352	
0.533	0.503	0.431	0.373	0.440	0.417	0.382	0.341	0.591	0.498	0.425	0.389	
198.5	0.528	0.488	0.440	0.359	0.437	0.406	0.377	0.335	0.583	0.511	0.432	
0.580	0.543	0.509	0.407	0.499	0.456	0.411	0.377	0.655	0.553	0.506	0.443	
397.0	0.593	0.532	0.507	0.445	0.494	0.450	0.366	0.656	0.579	0.483	0.437	
V <sub>max</sub> (1)	2.50	2.35	2.53	2.38	2.09	1.95	1.75	1.63	2.91	2.61	2.22	2.03
K <sub>mapp</sub> (1)	42.78	53.84	97.24	145.50	43.20	45.24	43.98	52.04	60.88	71.31	67.28	77.56
K <sub>i</sub> (1)		14431.4	5861.63	6215.43		(79.264)	(-)	42682		27784.1	(75462)	40539.2
V <sub>max</sub> (2)	2.49	2.35	2.36	2.13	2.11	1.93	1.71	1.61	2.91	2.53	2.22	2.02
K <sub>mapp</sub> (2)	42.25	53.25	80.19	114.37	45.91	43.01	38.79	48.82	60.51	64.26	67.03	76.67
K <sub>i</sub> (2)		14330.4	8309.69	8742.91		(-)	(-)	(137793)		(76807)	(73623)	41589.3
V <sub>max</sub> (3)	2.48	2.35	2.41	2.19	2.09	1.94	1.74	1.63	2.91	2.58	2.22	2.03
K <sub>mapp</sub> (3)	41.74	53.81	85.69	121.73	43.18	44.31	42.74	51.29	60.89	68.70	67.11	77.66
K <sub>i</sub> (3)		12902.4	7086.78	7787.57		(143029)	(-)	46502		37110.9	(77659)	40328.2
V <sub>max</sub> (4)	2.48	2.36	2.39	2.16	2.09	1.94	1.73	1.62	2.92	2.56	2.22	2.04
K <sub>mapp</sub> (4)	41.83	54.45	83.07	116.80	43.7	43.80	41.82	50.70	61.24	67.11	67.07	78.45
K <sub>i</sub> (4)		12366.7	7568.76	8326.94		(-)	(-)	54525		49659.6	(83330)	39523.1
Valeur moyenne		K <sub>i</sub> (1): 6764 K <sub>i</sub> (2): 10461 K <sub>i</sub> (3): 9259 K <sub>i</sub> (4): 9421				K <sub>i</sub> (1): 42682 K <sub>i</sub> (2): - K <sub>i</sub> (3): 46502 K <sub>i</sub> (4): 54525				K <sub>i</sub> (1): 34162 K <sub>i</sub> (2): 41589 K <sub>i</sub> (3): 38720 K <sub>i</sub> (4): 44591		
	Préincubation: 37 min Incubation: 14 min				Préincubation: 31 min Incubation: 14 min				Préincubation: 36 min Incubation: 14 min			
	Nombre de tests: 4				Nombre de tests: 1				Nombre de tests: 5			

ALA [ $\mu$ M]	Acide 4-méthyl-4-oxo-4-(2-oxo-cyclohexyl)-butyrique (89) [ $\mu$ M]	3,3-Diméthyl-acétyl-acétone (90) [ $\mu$ M]	3-fluoro-3-méthyl-acétyl-acétone(91) [ $\mu$ M]
0	3059	6119	12237
(0,351)	0,343	(0,354)	0,292
0,368	0,334	0,335	0,291
0,382	0,383	0,379	(0,308)
99,2	0,413	0,404	0,363
0,432	0,412	0,410	0,347
0,436	0,420	0,401	0,357
119,1	0,479	0,456	0,379
0,472	(0,425)	0,446	0,399
158,8	0,499	0,489	0,476
0,492	0,488	0,477	0,432
397,0	0,574	0,544	0,537
0,548	0,558	0,527	0,482
Vmax (1)	2,50	2,55	2,46
Kmapp (1)	61,60	73,22	71,54
K <sub>i</sub> (1)	16216	37921	25417
Vmax (2)	2,48	2,39	2,20
Kmapp (2)	59,68	66,54	64,92
K <sub>i</sub> (2)	26612	69691	32826
Vmax (3)	2,49	2,51	2,43
Kmapp (3)	60,91	69,68	69,31
K <sub>i</sub> (3)	21246	44370	33883
Vmax (4)	2,49	2,50	2,42
Kmapp (4)	60,49	68,33	67,58
K <sub>i</sub> (4)	22602	52206	33137
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 26518 K <sub>i</sub> (2): 29719 K <sub>i</sub> (3): 33166 K <sub>i</sub> (4): 36315	K <sub>i</sub> (1): 35249 K <sub>i</sub> (2): 39093 K <sub>i</sub> (3): 35997 K <sub>i</sub> (4): 36467	K <sub>i</sub> (1): 73649 K <sub>i</sub> (2): 89205 K <sub>i</sub> (3): 80776 K <sub>i</sub> (4): 85323
Préincubation: 25 min Incubation: 14 min	Préincubation: 34 min Incubation: 14 min	Préincubation: 39 min Incubation: 14 min	
Nombre de tests: 7	Nombre de tests: 5	Nombre de tests: 4	

A.L.A [µM]	4-Amino-6-oxo-5-hepténoate de méthyle			Acide 3-acétyl-pentane-1,5-dioïque(100)			Acide 4-oxo-octane-1,8-dioïque (101)				
	0	518 (92)	1036 (92)	0	211 (92)	352 (92)	493 (92)	0	9.93 (92)	19.86 (92)	39.72 (92)
79.4	0.296	0.277	0.280	0.333	0.300	0.278	0.264	0.389	0.333	0.322	0.256
	0.292	0.252	0.292	0.340	0.294	0.296	0.271	(0.423)	0.328	0.309	0.255
99.2	0.327	0.314	0.318	0.362	0.345	0.315	0.302	0.424	0.370	0.351	(0.255)
	0.323	0.325	0.308	0.369	0.329	0.313	0.297	0.410	0.369	0.353	0.261
119.1	0.352	0.345	0.345	0.388	0.353	0.339	0.320	0.449	0.400	0.359	0.291
	0.343	0.343	0.340	0.394	0.357	0.341	0.311	0.442	0.400	0.368	0.296
158.8	0.382	0.371	0.361	0.425	0.390	0.367	0.332	0.467	(0.401)	(0.348)	0.301
	0.370	0.358	0.356	0.423	0.390	0.355	0.335	0.478	0.414	0.376	(0.306)
198.5	0.370	0.365	0.372	0.460	0.412	0.381	0.345	0.491	0.425	0.389	0.306
	0.370	0.377	0.371	0.458	0.410	0.371	0.353	0.500	0.444	0.397	0.305
397.0	0.430	0.413	0.411	(0.575)	0.449	0.415	0.385	0.574	0.474	0.423	0.343
	0.420	0.410	0.408	0.512	0.445	0.411	(0.363)	0.560	0.483	0.407	0.315
Vmax (1)	1.82	1.90	1.78	2.27	2.02	1.81	1.67	2.40	2.09	1.79	1.38
Kmapp (1)	46.97	61.25	47.76	60.66	58.86	49.36	47.20	49.26	48.42	39.79	32.51
Ki (1)				(6899)		1538	1729		(572.39)	83.45	77.09
Vmax (2)	1.82	1.78	1.75	2.26	1.95	1.77	1.65	2.46	2.04	1.74	1.36
Kmapp (2)	46.23	47.92	43.93	59.77	50.75	45.43	44.83	54.19	44.54	33.69	30.26
Ki (2)				1187	1115	1479		45.83	32.64	50.23	
Vmax (3)	1.81	1.81	1.77	2.27	1.99	1.79	1.65	2.42	2.06	1.78	1.37
Kmapp (3)	45.48	51.93	45.97	60.44	55.93	47.91	45.86	50.16	46.20	37.90	31.20
Ki (3)				2617	1346	1479		115.85	61.39	65.36	
Vmax (4)	1.81	1.81	1.76	2.27	1.98	1.79	1.65	2.43	2.06	1.77	1.37
Kmapp (4)	45.52	51.58	45.31	60.37	54.31	47.09	45.43	51.43	45.66	37.27	31.48
Ki (4)				1891	1248	1499		78.58	52.27	62.68	
Valeur moyenne		Ki (1): - Ki (2): - Ki (3): - Ki (4): -		Ki (1): 1633 Ki (3): 1838 Ki (4): 1546	Ki (2): 1260		Ki (1): 80 Ki (2): 43 Ki (3): 81 Ki (4): 65				
	Préincubation: 33 min Incubation: 14 min			Préincubation: 29 min Incubation: 14 min			Préincubation: 33 min Incubation: 14 min				
	Nombre de tests: 2			Nombre de tests: 4			Nombre de tests: 3				

ALA [μM]	Acide 4-oxo-nonane-1,9-dioïque (102) [μM]			Acide sébacique (103) [μM]			Diacide (106) [μM]				
0	67,67	135,34	270,68	0	4688	7813	10939	0	7366	12277	17187
0,414	0,388	0,342	0,300	0,389	(0,450)	(0,405)	(0,358)	0,373	0,287	0,251	0,187
0,425	0,374	0,341	0,289	0,419	(0,382)	(0,401)	(0,292)	0,372	0,286	0,228	0,192
0,460	0,418	0,393	0,326	0,501	(0,504)	(0,308)	0,352	0,396	0,336	0,286	0,224
0,445	0,425	0,387	0,325	0,477	0,441	0,393	0,393	0,359	(0,281)	0,270	0,221
0,509	0,438	0,408	0,340	0,532	0,524	0,456	0,423	0,448	0,311	0,294	0,255
119,1	0,506	(0,427)	(0,382)	0,516	(0,462)	0,417	0,419	0,430	(0,351)	(0,250)	0,257
0,563	0,483	0,433	0,360	0,536	0,562	(0,405)	0,441	0,482	0,397	0,346	0,267
0,576	0,470	0,439	0,366	(0,597)	0,586	0,538	0,490	0,481	0,404	0,346	0,292
158,8	0,578	0,506	0,470	0,571	0,614	0,571	0,552	0,518	0,433	0,384	0,346
198,5	0,592	(0,484)	0,475	0,569	0,597	(0,543)	0,558	0,514	0,433	0,376	0,339
0,660	0,568	0,499	0,408	0,632	0,676	0,654	0,619	0,581	0,503	0,473	0,421
397,0	0,650	0,572	0,514	0,630	0,679	0,653	0,617	0,564	0,494	0,443	0,418
Vmax (1)	3,04	2,48	2,27	2,87	3,28	3,64	3,22	2,63	2,38	2,30	2,33
K <sub>mapp</sub> (1)	70,48	54,85	55,03	60,30	84,56	140,55	121,69	70,62	89,74	118,48	173,80
K <sub>i</sub> (1)	237,47	482,06	425,83	2,74	11652	5870	10744	2,58	2,32	2,27	2,31
Vmax (2)	2,92	2,50	2,19	1,72	2,74	3,06	3,02	2,58	2,32	2,27	2,31
K <sub>mapp</sub> (2)	61,51	56,43	47,96	38,25	50,55	99,20	103,77	66,05	83,80	113,32	170,53
K <sub>i</sub> (2)	(751,70)	479,03	445,12	4871	7421	10533	27410	16458	10865		
Vmax (3)	2,99	2,48	2,24	1,76	2,76	3,13	3,32	2,60	2,35	2,29	2,27
K <sub>mapp</sub> (3)	66,86	55,06	52,27	41,78	52,20	73,09	113,49	67,70	86,22	116,86	164,31
K <sub>i</sub> (3)	315,76	484,87	450,92	11714	6654	9837	26926	16907	12044		
Vmax (4)	2,97	2,49	2,23	1,75	2,77	3,12	3,28	2,61	2,34	2,28	2,32
K <sub>mapp</sub> (4)	65,15	55,59	51,19	40,97	52,55	72,31	109,46	68,77	85,04	116,23	170,71
K <sub>i</sub> (4)	393,49	496,28	458,63	12467	7214	10376		31135	17789	11995	
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 382 K <sub>i</sub> (2): 462			K <sub>i</sub> (1): 9422 K <sub>i</sub> (2): 7608			K <sub>i</sub> (1): 19028 K <sub>i</sub> (2): 18244				
	K <sub>i</sub> (3): 417 K <sub>i</sub> (4): 449			K <sub>i</sub> (3): 9401 K <sub>i</sub> (4): 10019			K <sub>i</sub> (3): 18625 K <sub>i</sub> (4): 20173				
	Préincubation: 37 min incubation: 14 min			Préincubation: 40 min incubation: 14 min			Préincubation: 28 min incubation: 14 min				
	Nombre de tests: 3			Nombre de tests: 3			Nombre de tests: 3				

ALA ( $\mu\text{M}$ )	Diacide 107 ( $\mu\text{M}$ )			Diacide mixte 112 ( $\mu\text{M}$ )			Diacide mixte 114 ( $\mu\text{M}$ )				
	0	6588	10980	0	61	122	245	0	8872	14787	20701
0.439	0.365	0.298	0.244	0.384	0.348	0.285	0.208	0.427	0.373	0.359	0.311
0.433	0.356	0.296	0.234	0.382	0.325	0.278	0.212	0.412	0.392	0.339	(0.261)
0.477	0.406	0.339	0.280	0.436	0.359	0.327	0.238	0.447	0.433	0.376	0.358
0.489	0.402	0.346	0.282	0.430	0.359	0.306	0.244	0.441	0.423	0.389	(0.284)
0.480	0.438	0.394	0.311	0.457	0.394	0.331	0.238	0.465	0.464	0.428	0.389
0.506	0.421	0.370	0.321	0.459	0.379	0.315	0.241	0.481	0.448	0.428	0.364
0.520	0.447	0.405	0.338	0.496	0.406	0.346	0.257	0.509	0.512	0.477	0.435
0.520	0.472	0.407	0.339	0.502	0.408	0.343	0.253	0.504	(0.428)	0.490	0.438
0.535	0.487	0.445	0.387	0.526	0.426	0.362	0.268	0.523	0.530	0.514	(0.410)
0.524	0.487	0.427	0.383	0.522	0.426	0.364	0.268	0.534	0.541	0.509	0.474
0.569	0.548	0.515	0.484	0.589	0.463	0.378	0.265	0.601	0.616	0.599	0.562
397.3	0.581	0.560	0.523	0.573	0.459	0.377	0.275	0.590	0.625	(0.522)	0.563
Vmax (1)	2.39	2.44	2.44	2.60	1.97	1.63	1.16	2.52	2.83	2.86	2.73
Kmapp (1)	31.97	59.27	87.43	120.66	41.4	37.4	30.6	46.07	73.06	90.83	101.21
K <sub>i</sub> (1)		7714.96	6329.44	5541.13	144.8	213	265	15143	15219	17295	
Vmax (2)	2.38	2.44	2.41	2.30	1.95	1.57	1.10	2.56	2.81	2.80	2.70
Kmapp (2)	31.13	59.22	84.70	115.06	39.4	30.9	21.90	49.69	71.45	85.90	99.10
K <sub>i</sub> (2)		7300.98	6380.57	5701.54	169.8	166.5	169.0	20259	20291	20818	
Vmax (3)	2.38	2.43	2.40	2.30	1.96	1.61	1.14	2.53	2.82	2.84	2.71
Kmapp (3)	31.12	58.58	83.75	114.98	36.7	33.4	27.8	46.82	72.24	88.73	100.06
K <sub>i</sub> (3)		7466.08	6492.45	5704.47	158.4	203.2	235.4	16340	16519	18204	
Vmax (4)	2.38	2.43	2.41	2.30	1.96	1.60	1.14	2.54	2.82	2.82	2.71
Kmapp (4)	31.08	58.61	83.86	114.90	35.6	34.7	27.6	47.78	71.78	87.37	99.79
K <sub>i</sub> (4)		7437.52	6465.68	5699.85	164.0	203.0	241.2	17662	17845	19017	
Valeur moyenne	K <sub>i</sub> (1): 6528 K <sub>i</sub> (2): 6461 K <sub>i</sub> (3): 6554 K <sub>i</sub> (4): 6534			K <sub>i</sub> (1): 208 K <sub>i</sub> (2): 168 K <sub>i</sub> (3): 199 K <sub>i</sub> (4): 241			K <sub>i</sub> (1): 15886 K <sub>i</sub> (2): 20456 K <sub>i</sub> (3): 17022 K <sub>i</sub> (4): 18175				
Préincubation: 35 min Incubation: 14 min			Préincubation: 46 min Incubation: 14 min			Préincubation: 35 min Incubation: 14 min					
Nombre de tests: 2			Nombre de tests: 4			Nombre de tests: 2					

ALA ( $\mu\text{M}$ )	Diacide mixte II6 ( $\mu\text{M}$ )				
0	2.82	5.63	11.27		
39.7	0.336	0.307	0.268	0.192	
	0.339	0.290	0.254	0.206	
79.4	0.390	0.346	0.283	0.240	
	0.375	0.354	0.311	0.234	
119.2	0.390	0.356	0.329	0.268	
	0.415	0.376	0.337	0.273	
158.9	0.440	0.416	0.369	0.304	
	0.444	0.410	0.362	0.303	
198.6	0.469	0.424	0.390	0.322	
	0.462	0.433	0.387	0.324	
397.3	0.520	0.476	0.446	0.370	
	0.512	0.476	0.437	0.372	
Vmax (1)	2.32	2.22	2.13	1.96	
Kmapp (1)	60.79	70.38	86.52	117.50	
Ki (1)		17.88	13.30	12.08	
Vmax (2)	2.26	2.11	2.02	1.76	
Kmapp (2)	55.26	59.12	74.31	90.91	
Ki (2)		(40.37)	16.33	17.46	
Vmax (3)	2.30	2.17	2.08	1.83	
Kmapp (3)	58.60	64.84	80.40	100.13	
Ki (3)		26.48	15.13	15.90	
Vmax (4)	2.29	2.15	2.05	1.80	
Kmapp (4)	57.39	62.87	77.48	95.11	
Ki (4)		28.95	16.08	17.15	
Valeur moyenne					
	Préincubation: 26 min Incubation: 14 min				
	Nombre de tests: 4				
		Ki (1): 14.4	Ki (2): 16.9		
		Ki (3): 19.2	Ki (4): 20.7		

Succinyle acétone II

Essai	Inh	P.B.G.S	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0.645
2	0	400	900	200	0.628
3	400	400	500	200	0.246
4	400	400	500	200	0.237
5	0	400	900	200	0.649
6	0	400	900	200	0.695
7	400	400	500	200	0.126
8	400	400	500	200	0.123
9	0	400	1050	100	0.550
10	0	400	1000	100	0.544
11	400	400	600	100	0.282
12	400	400	600	100	0.228
13	0	400	1000	100	0.530
14	0	400	1000	100	0.527
15	400	400	600	100	0.122
16	400	400	600	100	0.122
17	0	400	1050	50	0.453
18	0	400	1050	50	0.445
19	400	400	650	50	0.208
20	400	400	650	50	0.208
21	0	400	1050	50	0.437
22	0	400	1050	50	0.438
23	400	400	650	50	0.116
24	400	400	650	50	0.116

Conc: 0.0004 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 20 min

Tps préincubation 2 = 1h33

## Composé: Diacide 104

Essai	Inh	PGS	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0.5472
2	0	400	900	200	0.5302
3	400	400	500	200	0.390
4	400	400	500	200	0.397
1	0	400	900	200	0.5324
2	0	400	900	200	0.5243
3	400	400	500	200	0.163
4	400	400	500	200	0.164
5	0	400	1000	100	0.486
6	0	400	1000	100	0.481
7	400	400	600	100	0.370
8	400	400	600	100	0.355
5	0	400	1000	100	0.452
6	0	400	1000	100	0.451
7	400	400	600	100	0.366
8	400	400	600	100	0.1663
9	0	400	1050	50	0.391
10	0	400	1050	50	0.402
11	400	400	650	50	0.302
12	400	400	650	50	0.276
9	0	400	1050	50	0.366
10	0	400	1050	50	0.363
11	400	400	650	50	0.340
12	400	400	650	50	0.139

Conc: 0.33 mg/ml      Tps incubation = 14 min  
 Tps préincubation 1 = 25 min  
 Tps préincubation 2 = 1h36

## Composé: Diacide 105

Essai	Inhib	PG S	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	960	200	0.586
2	0	400	900	200	0.593
3	400	400	500	200	0.099
4	400	400	500	200	0.103
1	0	400	900	200	0.593
2	0	400	900	200	0.603
3	400	400	500	200	0.033
4	400	400	500	200	0.033
5	0	400	1000	100	0.541
6	0	400	1000	100	0.514
7	400	400	600	100	0.091
8	400	400	600	100	0.091
5	0	400	1000	100	0.548
6	0	400	1000	100	0.532
7	400	400	600	100	0.030
8	400	400	600	100	0.031
9	0	400	1050	50	0.437
10	0	400	1050	50	0.438
11	400	400	650	50	0.078
12	400	400	650	50	0.073
9	0	400	1050	50	0.431
10	0	400	1050	50	0.418
11	400	400	650	50	0.022
12	400	400	650	50	0.031

Conc: 0.35 mg/ml      Tps incubation = 14 min  
 Tps préincubation 1 = 28 min  
 Tps préincubation 2 = 1h33

Composé: Diacide 108

Essai	Inh	PBG'S	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0,5834
2	0	400	900	200	0,5741
3	400	400	500	200	0,388
4	400	400	500	200	0,373
1	0	400	900	200	0,561
2	0	400	900	200	0,5523
3	400	400	500	200	0,190
4	400	400	500	200	0,190
5	0	400	1000	100	0,552
6	0	400	1000	100	0,536
7	400	400	600	100	0,406
8	400	400	600	100	0,363
5	0	400	1000	100	0,477
6	0	400	1000	100	0,483
7	400	400	600	100	0,1572
8	400	400	600	100	0,1583
9	0	400	1050	50	0,445
10	0	400	1050	50	0,448
11	400	400	650	50	0,313
12	400	400	650	50	0,313
9	0	400	1050	50	0,400
10	0	400	1050	50	0,410
11	400	400	650	50	0,323
12	400	400	650	50	0,340

Conc: 0,38 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 25 min

Tps préincubation 2 = 1h25

Composé: Diacide C11 109

Essai	Inhib S	PBG	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0,605
2	0	400	900	200	0,600
3	400	400	500	200	0,507
4	400	400	500	200	0,505
1	0	400	900	200	0,623
2	0	400	900	200	0,600
3	400	400	500	200	0,448
4	400	400	500	200	0,445
5	0	400	1000	100	0,546
6	0	400	1000	100	0,542
7	400	400	600	100	0,470
8	400	400	600	100	0,467
5	0	400	1000	100	0,543
6	0	400	1000	100	0,542
7	400	400	600	100	0,341
8	400	400	600	100	0,340
9	0	400	1050	50	0,456
10	0	400	1050	50	0,450
11	400	400	650	50	0,300
12	400	400	650	50	0,300
9	0	400	1050	50	0,433
10	0	400	1050	50	0,431
11	400	400	650	50	0,346
12	400	400	650	50	0,351

Conc: 0,28 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 22 min

Tps préincubation 2 = 1h25

Composé: Diacide C12 110

Essai	Inh	PBG S	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0,663
2	0	400	900	200	0,586
3	400	400	500	200	0,360
4	400	400	500	200	0,360
5	0	400	900	200	0,585
6	0	400	900	200	0,580
7	400	400	500	200	0,217
8	400	400	500	200	0,270
9	0	400	1000	100	0,554
10	0	400	1000	100	0,554
11	400	400	600	100	0,345
12	400	400	600	100	0,350
13	0	400	1000	100	0,540
14	0	400	1000	100	0,536
15	400	400	600	100	0,228
16	400	400	600	100	0,226
17	0	400	1050	50	0,438
18	0	400	1050	50	0,439
19	400	400	650	50	0,382
20	400	400	650	50	0,397
9'	0	400	1050	50	0,429
10'	0	400	1050	50	0,420
11'	400	400	650	50	0,387
12'	400	400	650	50	0,398

Conc: 0,305 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 22 min

Tps préincubation 2 = 1h25

Composé: Diacide mixte 111

Essai	Inhib	PBG S	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0,571
2	0	400	900	200	0,546
3	400	400	500	200	0,528
4	400	400	500	200	0,536
5	0	400	900	200	0,538
6	0	400	900	200	0,541
7	400	400	500	200	0,494
8	400	400	500	200	0,488
9	0	400	1000	100	0,495
10	0	400	1000	100	0,488
11	400	400	600	100	0,388
12	400	400	600	100	0,385
13	0	400	1000	100	0,489
14	0	400	1000	100	0,486
15	400	400	600	100	0,442
16	400	400	600	100	0,438
17	0	400	1050	50	0,389
18	0	400	1050	50	0,399
19	400	400	650	50	0,388
20	400	400	650	50	0,386
9'	0	400	1050	50	0,401
10'	0	400	1050	50	0,392
11'	400	400	650	50	0,361
12'	400	400	650	50	0,357

Conc: 1,73 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 29 min

Tps préincubation 2 = 1h34

Composé: Diacide mixte 113

Essai	Inh	PHCS	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	400	0,552
2	0	400	900	200	0,517
3	400	400	500	200	0,144
4	400	400	500	200	0,156
5	0	400	900	200	0,530
6	0	400	900	200	0,510
7	0	400	900	200	0,512
8	0	400	900	100	0,448
9	0	400	1050	50	0,389
10	0	400	1050	50	0,393
11	0	400	550	50	0,139
12	0	400	550	50	0,138
9'	0	400	1050	50	0,380
10'	0	400	1050	50	0,406
11'	400	400	550	50	0,068
12'	400	400	550	50	0,070

Conc: 0,26 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 28 min

Tps préincubation 2 = 1h30

Composé: Diacide mixte 115

Essai	Inhib	PHCS	Tamp	ALA	Abs.
1	0	400	900	200	0,506
2	0	400	900	200	0,295
3	400	400	500	200	0,439
4	400	400	500	200	0,443
5	0	400	900	200	0,498
6	0	400	900	200	0,491
7	0	400	900	200	0,491
8	0	400	900	100	0,448
9	0	400	1050	50	0,362
10	0	400	1050	50	0,364
11	0	400	550	50	0,316
12	0	400	550	50	0,323
9'	0	400	1050	50	0,373
10'	0	400	1050	50	0,349
11'	400	400	550	50	0,245
12'	400	400	550	50	0,260

Conc: 1,6 mg/ml Tps incubation = 14 min

Tps préincubation 1 = 26 min

Tps préincubation 2 = 1h32

### 8.3. Travaux bioorganiques

#### 8.3.1. Mode opératoire du screening sur les époxydes rac-121 et rac-122

40 mg de cellules lyophilisées sont placées dans un tube avec 1 ml de tampon Tris pH=8 (50 mM Tris-(Hydroxyméthyl)amino-méthane, pH ajusté avec HCl). Les cellules sont réhydratées une heure à température ambiante sous agitation (150 rpm). On additionne ensuite 5 µl du substrat à tester. En parallèle, un témoin est également effectué afin d'observer une éventuelle hydrolyse spontanée de l'époxyde. Après 24 h d'agitation (150 rpm, 35°C), un contrôle CCM est effectué. La réaction est ainsi suivie au moins trois jours et est jugée positive lorsqu'un spot assez net est visible.

Pour suivre par CCM, on prélève généralement 0.5 ml du milieu réactionnel et on dilue avec 0.5 ml d'acétone. On centrifuge la solution et on effectue une CCM à partir de la solution surnageante. La révélation des tâches est effectuée avec de la vanilline en milieu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à chaud. L'éluant usuel est l'AcOEt pur. Les tâches étant très peu visibles pour les deux composés nitrés testés, une extraction a été effectuée à partir du milieu enzymatique et la dilution avec l'acétone a été abandonnée. 1 ml de milieu enzymatique additionné de 2 équivalents d'eau est traité trois fois par 2 ml d'AcOEt, les phases organiques récupérées sont réunies et évaporées. On effectue la CCM sur le résidu repris par 2 gouttes d'acétone. La révélation des tâches se fait comme précédemment mais également avec KMnO<sub>4</sub>. L'extraction doit se faire de façon précise afin que la comparaison entre les différents microorganismes soit valable.

#### 8.3.2. Mode opératoire concernant les excès énantiomériques

Les réactions sont réalisées dans des tubes à centrifugation surmontés de bouchons à visser. Dans 5 ml de tampon Tris pH=8 (50 mM Tris-(Hydroxyméthyl)amino-méthane, pH ajusté avec HCl), sont placés environ 100 mg de cellules lyophilisées qui ont été réhydratées auparavant 1h avant l'addition de 100 µl de substrat. La réaction se poursuit ensuite dans un système d'agitation latérale à 30°C et 130 rpm. La réaction est suivie par CCM. Le traitement final (environ. 24-48h après) est directement effectué sur le milieu enzymatique par extraction avec 2 fois avec 2 ml d'AcOEt. On effectue à chaque fois après agitation, une centrifugation afin de casser l'émulsion qui se forme. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et lorsque l'on observe rien de particulier (sans séparation ou sans dérivatisation), un échantillon est directement injecté sur colonne chirale afin de déterminer l'excès énantiomérique.

## 9. Partie expérimentale chimique

### 9.1. Méthodes analytiques et appareils

#### Chromatographie

##### 9.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Couches minces sur aluminium, gel de silice 60 F<sub>254</sub>, (épaisseur de la couche 0.2 mm) avec indicateur de fluorescence (Merck, Darmstadt). Révélateurs (par atomisation): solution basique aqueuse de KMnO<sub>4</sub> ou acide de vanilline.

##### 9.1.1.1. Chromatographie sur colonne - chromatographie- flash:

Gel de silice 60, grosseur de grains 0.040 - 0.063 mm (230 - 400 mesh ASTM) (Merck, Darmstadt). L'éluant et les proportions du mélange utilisé sont décrits dans la partie expérimentale. Toutes les chromatographies sur colonnes s'effectuent sous pression ( $p = 0.5 - 0.9 \text{ atm}$ ).

#### Spectroscopie infrarouge (IR)

Un spectromètre du type Perkin Elmer FT-IR 1720 X est utilisé pour l'obtention des spectres IR, avec une résolution de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Des pastilles de KBr sont préparées pour les substances cristallines, la technique de film liquide (sandwich) entre 2 plaques de KBr est utilisée pour les liquides purs ou en solution. Les bandes d'absorption sont décrites par des abréviations *vs* (très intense), *s* (intense), *m* (moyenne), *w* (faible), *vw* (très faible) ou *br* (large) et données en longueur d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les mesures RMN sont effectuées avec un spectromètre Gemini XL-200 de Varian, spectres <sup>1</sup>H à 200 MHz et <sup>13</sup>C à 50 MHz; ou Bruker AMX-400, spectres <sup>1</sup>H à 400 MHz et <sup>13</sup>C à 100 MHz. La fréquence de mesure ainsi que le solvant sont précisés entre parenthèse dans chaque cas. Standard interne pour les spectres du proton (<sup>1</sup>H): TMS ( $\delta_{\text{H}} = 0 \text{ ppm}$ ) ou CHCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}} = 7.26 \text{ ppm}$ ); pour les spectres du carbone (<sup>13</sup>C): CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{C}} = 77.0 \text{ ppm}$ ); pour les spectres <sup>19</sup>F: CFCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{F}} = 0 \text{ ppm}$ ); pour les spectres <sup>31</sup>P: (PhO)<sub>3</sub>PO ( $\delta_{\text{P}} = -18 \text{ ppm}$ ). Tous les déplacements chimiques sont donnés en ppm et les constantes de couplage *J* en Hz. Les spectres <sup>13</sup>C sont mesurés avec découplage large en proton. Les multiplicités des signaux sont abrégées par: *s* = singulet, *d* = doublet, *t* = triplet, *q* = quartet, *sx* = sextet, *m* = multiplet et *br* = large. Pour permettre l'interprétation, des spectres HETCOR (low range ou short range), COSY, DEPT, APT ou NOESY ont été mesurés lorsque cela s'avérait nécessaire.

#### Spectroscopie de masse (SM)

Spectromètre Nermag RC 30-10 (EI: 70 eV; DCI: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a été utilisé. Les spectres ESI sont enregistrés avec un appareil Finnigan, LCQ. Les pics sont donnés en *m/e* et en pour-cent du pic de base (100%). Les intensités individuelles sont données entre parenthèse.

##### 9.1.2. Verreries, systèmes de chauffage et de refroidissement

La verrerie pour les réactions sous N<sub>2</sub>, sous argon ou sans humidité est chauffée à 120°C minimum au four durant la nuit, elle est montée chaude et refroidie à température ambiante sous un flux d'azote. Les réactions à basses températures (en dessous de -40°C) se font dans un bain froid acétone/CO<sub>2</sub> sol. ou acétone/N<sub>2</sub>

liquide. Pour les réactions de  $-40^{\circ}\text{C}$  à  $0^{\circ}\text{C}$ , un cryostat HAAKE F3 ( $-40^{\circ}\text{C}$  à  $+80^{\circ}\text{C}$ ) est utilisé.

### 9.1.3. Solvants-Produits

Les solvants standards sont utilisés pour les traitements finaux, les extractions, ainsi que pour la purification par chromatographie (CCM, colonnes ou CP).

Solvant	dans le texte	distillé sur
Acétate d'éthyle	AcOEt	$\text{K}_2\text{CO}_3$
Cyclohexane		$\text{CaCl}_2$
Dichlorométhane	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CaCl}_2$
Diéthyléther	éther	$\text{CaCl}_2$
Ether de pétrole		$\text{CaCl}_2$
Heptane		$\text{CaCl}_2$
Hexane		$\text{CaCl}_2$
Pentane		$\text{CaCl}_2$

Pour toutes les réactions sous atmosphère gazeuse, des solvants secs sont utilisés. Les solvants standards sont distillés sur un agent desséchant.

Solvant	dans le texte	agent desséchant
Dichlorométhane	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{P}_2\text{O}_5$ ou $\text{CaH}_2$
Diméthylformamide	DMF	anhydride phtalique
Hexane		potassium ou sodium
Méthanol	MeOH	magnésium
Pentane		potassium ou sodium
Tétrahydrofurane	THF	potassium
Toluène		potassium

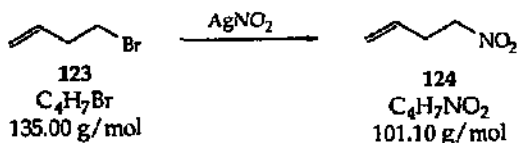
### Produits chimiques et gaz

Produits chimiques	dans le texte	qualité
Acide acétique		Fluka, puriss p.a.
Acide chlorhydrique	HCl	Technique
Acide 3-chloro-perbenzoïque	<i>m</i> -CPBA	Fluka, 70%
Acide formique	HCOOH	Fluka, puriss p.a.
Acide lévulinique		Fluka, purum > 97%
Acide sulfurique 95-97%	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Merck, p.a.
Azote	$\text{N}_2$	Carbagas, techn.
Brome	$\text{Br}_2$	Fluka, technique
4-Bromo-1-butène		Aldrich, 97%
Bromure de lithium	LiBr	Merck, 99 %.

3-Butène-2-one		Fluka, puriss p.a.
Carbonate de sodium	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Prochimie, technique
Chlorure de paratoluène sulfonyle	<i>p</i> -TsOH	Merck, 98 %
Chlorure de triméthylsilane	TMSCl	Fluka, purum, $\approx$ 95%
Chlorure de tris(triphénylphosphine)rhodium(I)		ABCR, 99%
Hydrogénocarbonate de sodium	$\text{NaHCO}_3$	Prochimie, Ph.Helv.VII
3-Méthyl-3-butène-1-ol		Fluka, purum
Nitrite d'argent	$\text{AgNO}_2$	Acros, 99%
Nitrite de sodium	$\text{NaNO}_2$	Fluka, puriss p.a.
Pyridine		Fluka, purum > 99%
Tétrachlorure de titane	$\text{TiCl}_4$	Fluka, pract.
Tétraméthyléthylènediamine	TMEDA	Fluka, purum > 98%
Trans-4-oxo-2-penténoate de méthyle		Fluka, purum
Triéthylamine	TEA	Fluka, puriss p.a.
Triéthylsilane	$\text{Et}_3\text{SiH}$	Fluka, purum
Triméthyl-orthoformate		Fluka, purum
Zinc (poudre)	Zn	Fluka puriss p.a.

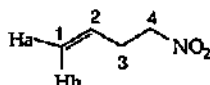
## 9.2. Synthèses

## 9.2.1. Synthèse du 4-nitro-1-butène (124)



Dans un monocol de 250 ml, on ajoute 100 ml d'hexane à 20.22 g (0.132 mol, 1.2 éq.) de  $\text{AgNO}_2$  et on agite fortement 5 min. On rajoute ensuite à la suspension jaune, le dérivé bromé 123 (14.8 g, 0.109 mol) et on chauffe à reflux sous  $\text{N}_2$  durant 5h30. Au bout de 10 min de reflux, le milieu réactionnel devient brun et un précipité gris se forme durant la réaction. Après refroidissement, la solution est filtrée et le précipité est lavé 2 fois avec de l'hexane. Après évaporation du solvant, on obtient 4.23 g (rendement brut = 39 %) d'un liquide jaune-orange. Aucune purification supplémentaire n'est effectuée.

Données analytiques de 124:



$R_f$  (hexane/  $\text{AcOEt}$  4:1) = 0.38; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

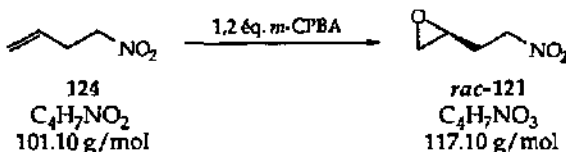
$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

5.76 (ddt,  $^3J(2, 1b) = 17.0$ ,  $^3J(2, 1a) = 10.3$ ,  $^3J(2, 3) = 6.7$ , 1H, HC(2)); 5.17 (dq,  $^3J(1b, 2) = 17.1$ ,  $^2J(1b, 1a) = ^4J(1b, 3) = 1.3$ , 1H,  $\text{H}_b\text{C}(1)$ ); 5.15 (dq,  $^3J(1a, 2) = 10.2$ ,  $^2J(1a, 1b) = ^4J(1a, 3) = 1.3$ , 1H,  $\text{H}_a\text{C}(1)$ ); 4.43 (t,  $^3J(4, 3) = 7.0$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 2.74 (qt,  $^3J(3, 4) = ^3J(3, 2) = 6.9$ ,  $^4J(3, 1) = 1.3$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

131.7 (C(2)); 118.8 (C(1)); 74.7 (C(4)); 31.3 (C(3)).

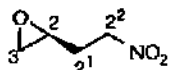
## 9.2.2. Synthèse du 2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (rac-121)



575 mg (5.69 mmol) de 124 et 1.73 g de *m*-CPBA (7.02 mmol, 1.2 éq., pureté 70%) sont dissous dans 25 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La solution est agitée à température ambiante pendant 67 heures. Pendant la réaction, un précipité blanc d'acide benzoïque se forme. On extrait avec 2 x 15 ml et 1 x 10 ml d'une solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% le milieu réactionnel. Les phases aqueuses sont réunies et lavées avec 2 x 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les phases organiques sont réunies, lavées avec 20 ml d'une

solution aqueuse de NaCl sat. et séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif et le produit (506 mg) est purifié au moyen d'une chromatographie-flash (SiO<sub>2</sub>, Ø = 2.5 cm, h = 20 cm, hexane/AcOEt 3:2). 331 mg (2.83 mmol, rendement = 50%) de *rac*-121 sous forme d'un liquide visqueux jaune sont isolés.

Données analytiques de *rac*-121:



R<sub>f</sub> (hexane/AcOEt 3:2): 0.26; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

IR (film):

3062m, 3002m, 2930m, 1726w, 1554vs, 1484m, 1433s, 1381vs, 1349m, 1263m, 1210m, 1156w, 1124m, 1090w, 1028w, 1001m, 967w, 922m, 908m, 861s, 831s.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.53 (ddd, <sup>2</sup>J(2<sup>2</sup>a, 2<sup>2</sup>b) = 13.8, <sup>3</sup>J(2<sup>2</sup>a, 2<sup>1</sup>a) = 7.7, <sup>3</sup>J(2<sup>2</sup>a, 2<sup>1</sup>b) = 6.3, 1H, H<sub>a</sub>C(2<sup>2</sup>)); 4.49 (m, <sup>2</sup>J(2<sup>2</sup>b, 2<sup>2</sup>a) = 13.8, 1H, H<sub>b</sub>C(2<sup>2</sup>)); 3.04 (ddd, <sup>3</sup>J(2, 2<sup>1</sup>b) = 6.7, <sup>3</sup>J(2, 3a) = <sup>3</sup>J(2, 2<sup>1</sup>a) = 4.1, <sup>3</sup>J(2, 3b) = 2.7, 1H, HC(2)); 2.81 (dd, <sup>2</sup>J(3a, 3b) = 4.6, <sup>3</sup>J(3a, 2) = 4.1, 1H, H<sub>a</sub>C(3)); 2.54 (dd, <sup>2</sup>J(3b, 3a) = 4.7, <sup>3</sup>J(3b, 2) = 2.6, 1H, H<sub>b</sub>C(3)); 2.42 (ddd, <sup>2</sup>J(2<sup>1</sup>a, 2<sup>1</sup>b) = 14.8, <sup>3</sup>J(2<sup>1</sup>a, 2<sup>2</sup>a) = 7.9, <sup>3</sup>J(2<sup>1</sup>a, 2<sup>2</sup>b) = 7.0, <sup>3</sup>J(2<sup>1</sup>a, 2) = 4.2, 1H, H<sub>a</sub>C(2<sup>1</sup>)); 2.04 (dq, <sup>2</sup>J(2<sup>1</sup>b, 2<sup>1</sup>a) = 14.9, <sup>3</sup>J(2<sup>1</sup>b, 2) = <sup>3</sup>J(2<sup>1</sup>b, 2<sup>2</sup>) = 6.4, 1H, H<sub>b</sub>C(2<sup>1</sup>)).

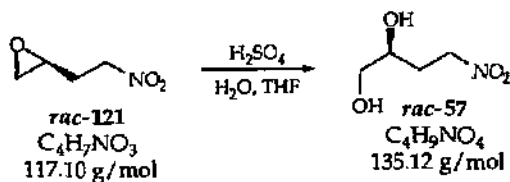
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

71.9 (C(2<sup>2</sup>)); 48.8 (C(2)); 46.8 (C(3)); 29.9 (C(2<sup>1</sup>)).

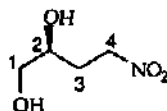
DCI-MS:

133 (11, [M+1+2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 135 (95, [M+1+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 120 (100), 118 (57, [M+1]<sup>+</sup>), 102 (46), 71 (30).

### 2.2.3. Synthèse du 4-nitro-butane-1,2-diol (*rac*-57)



270 mg (2.31 mmol) de *rac*-121 sont dissous dans 6 ml de THF et 6 ml d'eau désionisée. 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. sont ajoutées au mélange. La solution est agitée à température ambiante pendant 25 heures. En fin de réaction, une demi spatule de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O est ajoutée pour neutraliser la solution. Après quelques secondes, la solution devient jaune. Celle-ci est filtrée sur papier filtre et extraite avec 3 x 20 ml d'AcOEt. La phase aqueuse est récupérée et extraite en continu pendant 16 heures avec de l'AcOEt. La phase organique est ensuite récupérée et séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et le solvant est évaporé après filtration. Le produit (229 mg) est purifié au moyen d'une chromatographie-flash (SiO<sub>2</sub>, Ø = 2.5 cm, h = 15 cm, éther/pentane 10:1). 133 mg (0.984 mmol, rendement = 43%) de *rac*-57 sous forme d'un liquide visqueux sont isolés.

Données analytiques de *rac*-57: $R_f$  (éther/pentane 10:1): 0.29; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

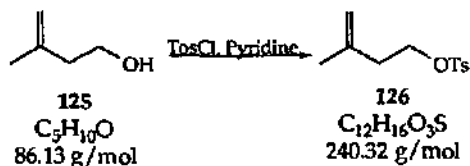
IR (film):

3370br, 2937m, 2883m, 1770w, 1718w, 1553vs, 1433m, 1386s, 1318w, 1281m, 1192w, 1115m, 1055m, 958w, 931w, 914w, 872w, 817vw, 719w, 612w.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 298 K):4.71 (m, <sup>3</sup>J(4b, 3b)= 6.3, 1H, H<sub>b</sub>C(4)); 4.67 (ddd, <sup>2</sup>J(4a, 4b)= 13.6, <sup>3</sup>J(4a, 3a)= 7.6, <sup>3</sup>J(4a, 3b)= 6.1, 1H, H<sub>a</sub>C(4)); 3.75 (ddd, <sup>3</sup>J(2, 3b)= 9.3, <sup>3</sup>J(2, 1)= 5.5, <sup>3</sup>J(2, 3a)= 3.4, 1H, HC(2)); 3.57 (d, <sup>3</sup>J(1, 2)= 5.5, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 2.34 (ddd, <sup>2</sup>J(3a, 3b)= 14.3, <sup>3</sup>J(3a, 4a)= <sup>3</sup>J(3a, 4b)= 7.6, <sup>3</sup>J(3a, 2)= 3.4, 1H, H<sub>a</sub>C(3)); 2.07 (ddd, <sup>2</sup>J(3b, 3a)= 14.3, <sup>3</sup>J(3b, 2)= 9.4, <sup>3</sup>J(3b, 4a)= <sup>3</sup>J(3b, 4b)= 6.3, 1H, H<sub>b</sub>C(3)).<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 298 K):

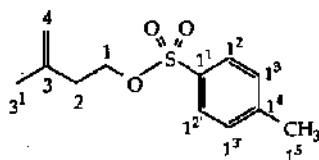
73.7 (C(4)); 70.4 (C(2)); 67.3 (C(1)); 32.4 (C(3)).

EI-MS:

135 (14, M<sup>+</sup>), 86 (22, [M-CH<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 77 (16), 73 (26), 71 (29), 69 (23), 61 (38), 57 (100), 55 (35).**9.2.4. Synthèse de l'ester du 3-méthyl-3-butène paratoluène sulfonique (126)**

Dans un bicol de 250 ml, on place la pyridine (14 ml, 0.174 mol, 1.5 éq.) et 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On refroidit cette solution à 0°C, on ajoute le chlorure de paratoluène sulfonyle (33.2 g, 0.174 mol, 1.5 éq.) et on agite jusqu'à dissolution. On rajoute ensuite goutte à goutte l'alcool 125 (11.7 ml, 0.116 mol) et après addition, on agite à température ambiante durant 48h. La réaction est alors stoppée, on ajoute 70 ml d'eau et on agite durant 1h. Après séparation des phases, la phase aqueuse est traitée 2 fois par 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques réunies sont traitées 3 fois par 30 ml d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M et 1 fois par une solution saturée en NaCl. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et filtration, le solvant est évaporé. On récupère 34.2 g d'un liquide jaune. Après purification par chromatographie-flash (SiO<sub>2</sub>, Ø = 8 cm, h = 18 cm, éther de pétrole/AcOEt 20 : 1), 10.75 g de produit pur ont été récupérés (rendement produit pur = 39 %) et 15.64 g d'un mélange produit/chlorure de paratoluène sulfonyle.

Données analytiques de 126:



$R_f$  (cyclohexane/AcOEt 4:1): 0.46; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

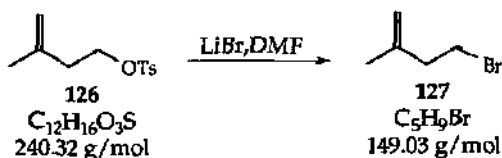
<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

7.78 (*dd*, <sup>3</sup>J(1<sup>2</sup>, 1<sup>3</sup>)= 6.6, <sup>4</sup>J(1<sup>2</sup>, 1<sup>2'</sup>)= 1.8, 2H, 2 HC(1<sup>2</sup>, 1<sup>2'</sup>)); 7.35 (*d*, <sup>3</sup>J(1<sup>3</sup>, 1<sup>2</sup>)= 8.0, 2H, HC(1<sup>3</sup>, 1<sup>3'</sup>)); 4.79 (*d*, <sup>2</sup>J(4a, 4b)= 1.5, 1H, H<sub>a</sub>C(4)); 4.73 (*m*, 1H, H<sub>b</sub>C(4)); 4.12 (*t*, <sup>3</sup>J(1, 2)= 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 2.44 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>5</sup>)); 2.34 (*t*, <sup>3</sup>J(2, 1)= 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.65 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(3<sup>1</sup>)).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

144.8 (C(1<sup>4</sup>)); 140.2 (C(3)); 133.2 (C(1<sup>1</sup>)); 129.9 (C(1<sup>3</sup>, 1<sup>3'</sup>)); 127.9 (C(1<sup>2</sup>, 1<sup>2'</sup>)); 113.1 (C(4)); 68.6 (C(1)); 36.8 (C(1<sup>5</sup>)); 22.4 (C(2)); 21.7 (C(3<sup>1</sup>)).

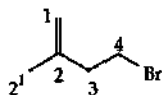
### 9.2.5. Synthèse du 4-Bromo-2-méthyl-1-butène (127)



#### 9.2.5.1. Synthèse avec traitement final

Dans un bicol de 250 ml, on dissout le dérivé tosylé **126** (10.75 g, 45 mmol) dans 80 ml de DMF. On agite fortement et on refroidit la solution dans un bain d'eau. On rajoute ensuite LiBr (7.77 g, 89 mmol, 2.0 éq.) et après addition, on agite à température ambiante durant 64 h. Le milieu réactionnel est ensuite placé dans une ampoule à décanter et on rajoute 100 ml d'eau. Après séparation des phases, la phase aqueuse est extraite cinq fois par 50 ml de pentane. Les phases organiques réunies sont lavées une fois par une solution saturée en NaCl, puis séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. On récupère 2.48 g de produit (rendement = 37 %). Aucune purification supplémentaire ne fut nécessaire.

Données analytiques de **127**:



$R_f$  (cyclohexane/AcOEt 1:1): 0.45; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.86 (*s*, 1H, H<sub>2</sub>C(1)); 4.78 (*s*, 1H, H<sub>b</sub>C(1)); 3.48 (*t*, <sup>3</sup>J(4, 3)= 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 2.58 (*t*, <sup>3</sup>J(3, 4)= 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 1.81 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(2<sup>1</sup>)).

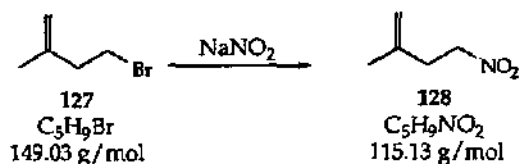
$^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

142.5 (C(2)); 112.7 (C(1)); 40.9 (C(4)); 30.8 (C(3)); 22.0 (C(2<sup>1</sup>)).

### 9.2.5.2. Synthèse sans traitement final

Dans un bicol de 250 ml, on dissout le dérivé tosylé 126 (22.80 g, 95 mmol) dans 160 ml de DMF. On agite fortement et on refroidit la solution dans un bain d'eau. On rajoute ensuite LiBr (16.0 g, 184 mmol, 1.9 éq.) et après addition, on agite à température ambiante durant 48h. Aucun traitement final n'est alors effectué et une nitro-déhalogénéation est directement engagée.

### 9.2.6. Synthèse du 2-Méthyl-4-nitro-1-butène (128)



#### 9.2.6.1. Nitro-déhalogénéation à partir de composé bromé pur

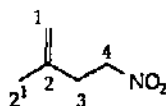
Dans un monocol de 25 ml, on place 250 mg (3.7 mmol, 1.5 éq) de  $\text{NaNO}_2$  finement broyé et on ajoute 8 ml de DMF. On agite fortement 10 min. Le produit bromé 127 est alors additionné goutte à goutte et on laisse agiter à température ambiante durant 6h. Le solvant est évaporé et le résidu est repris avec de l'AcOEt. Cette phase organique est lavée une fois avec une solution saturée en NaCl et après séparation des phases, la phase aqueuse est extraite 3 fois par de l'AcOEt.

Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé et on obtient 63 mg (0.55 mmol, rendement brut = 22 %) d'un liquide jaune. Aucune purification supplémentaire n'a été effectuée et seule une bonne évaporation est nécessaire pour éliminer le DMF résiduel.

#### 9.2.6.2. Nitro-déhalogénéation à la suite de la bromation sans traitement final

Dans un monocol, on ajoute au milieu réactionnel précédent 7.85 g (0.114 mol, 1.2 éq calculé par rapport à un rendement de 100 % en produit bromé à l'étape précédente) de  $\text{NaNO}_2$  finement broyé. On agite fortement à température ambiante durant 18h. Le milieu réactionnel devient fortement orange en cours de réaction. Le mélange est repris par 500 ml d'AcOEt et 200 ml d'eau. Après séparation des phases et traitement de la phase organique jaune par de l'eau, la phase aqueuse est extraite à nouveau 3 fois par de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé et on obtient 8.50 g (0.074 mol, rendement brut = 78 % par rapport au composé tosylé engagé) d'un liquide jaune. Aucune purification supplémentaire n'a été effectuée et seule une bonne évaporation est nécessaire pour éliminer le DMF résiduel.

Données analytiques de 128:



R<sub>f</sub> (cyclohexane/AcOEt 1:1): 0.85; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

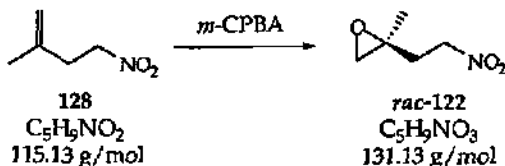
<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.78 (s, 1H, H<sub>a</sub>C(1)); 4.68 (s, 1H, H<sub>b</sub>C(1)); 4.43 (t, <sup>3</sup>J(4, 3)= 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 2.63 (t, <sup>3</sup>J(3, 4)= 7.1, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 1.70 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(2')).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

139.7 (C(2)); 113.4 (C(1)); 73.9 (C(4)); 35.1 (C(3)); 22.1 (C(2')).

### 9.2.7. Synthèse du 2-Méthyl-2-(2-nitro-éthyl)-oxirane (*rac*-122)

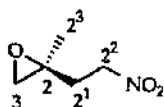


#### 9.2.7.1. Synthèse de *rac*-122 à partir d'alcène nitré issu de la bromation avec traitement final

On dissout sous forte agitation, 105 mg (0.91 mmol) de dérivé nitré 128 purifié dans 15 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On rajoute 252 mg de *m*-CPBA (1.02 mmol, 1.1 éq.) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 25h.

Le mélange est versé dans une ampoule à décanter et traité 2 fois par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 %. La phase aqueuse est reprise 2 fois par du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et les phases organiques réunies sont encore lavées une fois avec une solution de NaCl saturée. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et filtration, le solvant est évaporé. On récupère 122 mg d'un liquide jaune (rendement brut =100 %). Après purification par chromatographie-flash (SiO<sub>2</sub>, Ø = 1.5 cm, h = 15 cm, cyclohexane/AcOEt 3:1), 53 mg de produit ont été récupérés (rendement produit pur = 45 %).

Données analytiques de *rac*-122:



R<sub>f</sub> (cyclohexane/AcOEt 3:1): 0.34; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.43 (t, <sup>3</sup>J(2', 2)= 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(2')); 2.63 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.32 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.36 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(2')).

<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

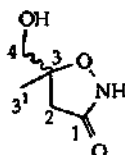
71.5 (C(2')); 54.3 (C(2)); 53.2 (C(3)); 33.5 (C(2)); 21.1 (C(2')).

#### 9.2.7.2. Synthèse de *rac*-122 à partir d'alcène non purifié: observation de la formation majoritaire d'un produit non désiré

On dissout sous forte agitation, les 8.50 g non purifiés (74 mmol) de dérivé nitré 128 dans 200 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On rajoute 15.0 g de *m*-CPBA (74 mmol) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 38h. Le milieu réactionnel

est versé dans une ampoule à décanter et traité 3 fois par une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 %. La phase aqueuse est reprise 4 fois par du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et les phases organiques réunies sont encore lavées une fois avec une solution de  $\text{NaCl}$  saturée. Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et filtration, le solvant est évaporé. On récupère 9.61 g d'un liquide orange qui est purifié par chromatographie-flash ( $\text{SiO}_2$ ,  $\varnothing = 4$  cm,  $h = 38$  cm, éluant: cyclohexane/ $\text{AcOEt}$  3:1) puis 1:1). On récupère de 1.05 g de produit pur et 2.57 g d'un liquide jaune qui se solidifie au réfrigérateur.

Données analytiques du produit majoritaire 129:



$R_f$  (cyclohexane/ $\text{AcOEt}$  3:1): 0.15; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

IR (en solution dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):

3593m, 3485s, 2934s, 2874s, 1782s, 1751m, 1611m, 1557w, 1537vw, 1456s, 1432m, 1383m, 1365vw, 1309vw, 1064w, 991w.

$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

3.79 (d,  $^2J(4a, 4b) = 12.6$ , 1H,  $\text{H}_a\text{C}(4)$ ); 3.65 (d,  $^2J(2a, 2b) = 17.6$ , 1H,  $\text{H}_a\text{C}(2)$ ); 3.56 (d,  $^2J(4b, 4a) = 12.6$ , 1H,  $\text{H}_b\text{C}(4)$ ); 3.14 (d,  $^2J(2b, 2a) = 17.6$ , 1H,  $\text{H}_b\text{C}(2)$ ); 2.80-2.50 (br s, 1H, OH); 1.48 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(3')$ ).

$^1\text{H-RMN}$  (200 MHz,  $d_6$ -DMSO, 298 K):

5.33 (t,  $^3J(\text{NH}, 4) = 5.9$ , 1H, NH); 3.50 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 3.48 (d,  $^2J(2a, 2b) = 17.3$ , 1H,  $\text{H}_a\text{C}(2)$ ); 3.35 (s, 1H, OH); 3.23 (d,  $^2J(2b, 2a) = 17.3$ , 1H,  $\text{H}_b\text{C}(2)$ ); 1.42 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(3')$ ).

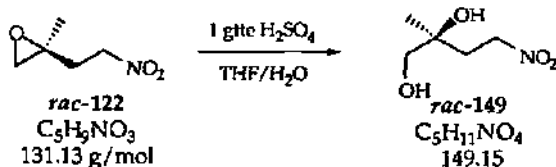
$^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

162.8 (C(1)); 96.5 (C(2)); 66.8 (C(3)); 36.9 (C(4)); 22.5 (C(3')).

EI-MS:

129 (100,  $\text{M}^+$ ), 128 (71), 113 (7), 112 (4), 104 (6), 84 (10), 83 (9), 70 (10), 69 (21), 68 (30), 67 (5), 66 (5), 58 (15), 57 (43), 56 (27), 55 (30).

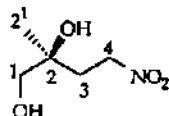
### 2.2.8. Synthèse du 2-Méthyl-4-nitro-butane-1,2-diol (rac-149)



Dans un monocol de 10 ml, on place l'époxyde nitré *rac-122* (200 mg, 1.52 mmol) avec 3 ml de THF, 3 ml d'eau et une goutte de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 48 h (présence d'époxyde toujours détectable). La réaction est alors stoppée et on additionne au milieu réactionnel une pointe de spatule de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solide. Après 5 min d'agitation, le milieu

réactionnel est repris par 5 ml d'eau et est ensuite extrait 4 fois par de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et après filtration, le solvant est évaporé. On récupère 131 mg d'un liquide jaune-orange qui est purifié par chromatographie-flash ( $\text{SiO}_2$ ,  $\varnothing = 1.5$  cm,  $h = 5$  cm, éluant: cyclohexane/AcOEt 1:2). On obtient 102 mg de produit (rendement = 45 %)

Données analytiques de *rac*-150:



$R_f$  (heptane/AcOEt 1:2): 0.28; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

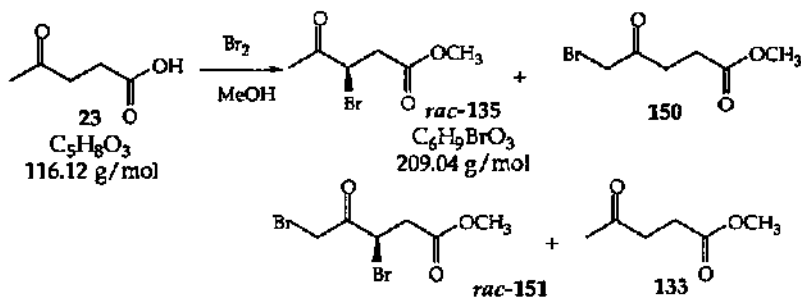
$^1\text{H}$ -RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

4.58 (td,  $^3J(4, 3a) = ^2J(4a, 4b) = 7.5$ ,  $^3J(4, 3b) = 1.2$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 3.50 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 2.38 (dt,  $^2J(3a, 3b) = 14.3$ ,  $^3J(3a, 4) = 7.3$ , 1H,  $\text{H}_a\text{C}(3)$ ); 2.14 (dt,  $^2J(3b, 3a) = 14.6$ ,  $^3J(3b, 4) = 7.3$ , 1H,  $\text{H}_b\text{C}(3)$ ); 1.21 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(2^1)$ ).

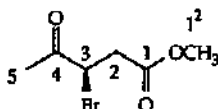
$^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

79.7 (C(2)); 71.7 (C(4)); 69.8 (C(1)); 35.4 (C(3)); 23.5 (C(2<sup>1</sup>)).

### 9.2.9. Synthèse du 3-bromo-4-oxopentanoate de méthyle (*rac*-135)



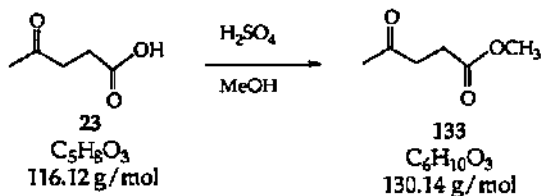
Dans un ballon tricol de 1 litre muni d'un thermomètre, d'un bouchon et d'une ampoule à brome, on dissout 45 ml (0.43 mol) d'acide lévulinique 23 dans 400 ml de méthanol. Au mélange placé sous agitation, on ajoute lentement 22 ml de  $\text{Br}_2$  (0.43 mol, 1 éq.) en prenant soin que la température ne dépasse pas  $30^\circ\text{C}$ . Une coloration brune s'intensifie au cours de l'adjonction de  $\text{Br}_2$ . Après 16 h d'agitation à température ambiante, le mélange devient incolore. Il est chauffé à reflux pendant 1 h. Le méthanol résiduel est ensuite évaporé. On ajoute ensuite au résidu 200 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et 200 ml d'eau. Après séparation des phases, la phase organique est lavée avec 100 ml d'une solution saturée en  $\text{NaHCO}_3$  et 3 fois avec 100 ml d'eau. Après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et filtration, le solvant est évaporé. La séparation des produits formés est effectuée à pression réduite à l'aide d'une colonne Widmer de 30 cm sur 80.4 g de produit brut passe à  $130^\circ\text{C}$  sous 0.03 mm Hg). On obtient 19.8 g de liquide incolore correspondant au composé *rac*-135. Les rendements calculés sur les fractions obtenues par  $^1\text{H}$ -RMN sont les suivants:  $r(\text{rac-135}) = 25\%$ ,  $r(150) = 50\%$ ,  $r(\text{rac-151}) = 2\%$ ,  $r(133) = 4\%$ .

Données analytiques de *rac*-135 : $R_f$  (heptane/AcOEt 1:1): 0.75; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).IR (en solution dans CCl<sub>4</sub>):

3003w, 2955w, 2849w, 1730s, 1549w, 1438m, 1409m, 1357m, 1327m, 1288w, 1219m, 1161m, 1139w, 998w, 896w, 818-741vs, 651w.

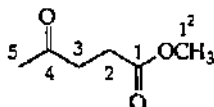
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):4.69 (dd, <sup>3</sup>J(3, 2a) = 5.8, <sup>3</sup>J(3, 2b) = 8.8, 1H, HC(3)); 3.65 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.21 (dd, <sup>2</sup>J(2a, 2b) = 17.2, <sup>3</sup>J(2a, 3) = 5.8, 1H, H<sub>a</sub>C(2)); 2.85 (dd, <sup>2</sup>J(2b, 2a) = 17.2, <sup>3</sup>J(2b, 3) = 5.8, 1H, H<sub>b</sub>C(2)); 2.37 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):200.9 (C(4)); 171.2 (C(1)); 52.7 (C(1<sup>2</sup>)); 45.6 (C(3)); 38.6 (C(2)); 27.6 (C(5)).

EI-MS:

211 (81, [M(<sup>81</sup>Br)+1]<sup>+</sup>), 209 (90, [M(<sup>79</sup>Br)+1]<sup>+</sup>), 193 (7), 191 (6), 179 (77, [M(<sup>81</sup>Br)+1-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>), 177 (100, [M(<sup>79</sup>Br)+1-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>), 168 (7), 166 (7), 165 (7), 163 (7), 151 (6), 149 (6), 143 (10), 129 (6), 115 (49), 101 (7), 97 (10), 87 (7), 75 (1), 69 (1), 59 (8), 55 (10), 43 (21).**9.2.10. Synthèse du lévulinate de méthyle (133)**

Un mélange composé 30.0 g d'acide lévulinique 23 (0.26 mol), 1.9 ml d'acide sulfurique concentré et 65ml de méthanol (0.81 mol, 3 éq.) est porté à reflux pendant 24h. L'excès de méthanol est éliminé par évaporation rotative. Le produit brut est neutralisé en ajoutant 3.23 g (0.027 mol) d'NaHCO<sub>3</sub> solide et on ajoute également de l'eau. Le composé est extrait à l'éther. Après évaporation du solvant, le produit brut (28.45 g) est purifié par distillation à pression réduite (10 mm Hg, 76°C) et 133 est obtenu avec un rendement de 62% (18.5 g).

Données analytiques de 133:



R<sub>f</sub> (hexane/AcOEt 1:1): 0.44; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

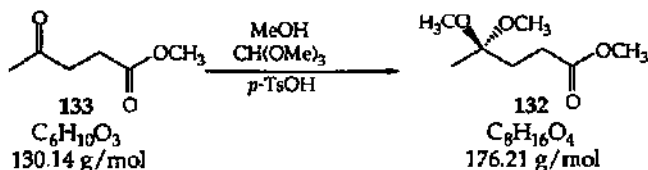
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

3.65 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.73 (t, <sup>3</sup>J(3, 2) = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.55 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.5, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.17 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

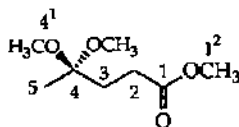
207.26 (C(4)); 173.84 (C(1)); 52.41 (C(1<sup>2</sup>)); 38.57 (C(3)); 30.48 (C(5)); 28.36(C(2))

### 9.2.11. Synthèse du 4,4-diméthoxy-pentanoate de méthyle (132)



Sous azote, on ajoute 0.96 g (5.14 mmol) de *p*-TsOH à une solution de 17.6 g (135 mmol) de lévulinate de méthyle (133) et de 77.15 g (730 mmol, 5.5 éq.) de triméthyl-orthoformate dans 40 ml de méthanol sec. Le mélange est porté à reflux pendant 18h. Après refroidissement de la solution à température ambiante, on ajoute 3.0 g d'NaHCO<sub>3</sub>. On filtre la solution et on évapore l'excès de solvant. Finalement, le produit brut est distillé à pression réduite (T = 45 °C, 0.1 atm) et on obtient 132 avec un rendement de 98% (21.6 g).

Données analytiques de 132:



R<sub>f</sub> (hexane/AcOEt 1:1): 0.47; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

IR (en solution dans CCl<sub>4</sub>):

3003<sub>m</sub>, 2967<sub>m</sub>, 2850<sub>m</sub>, 1746<sub>s</sub>, 1459<sub>m</sub>, 1387<sub>w</sub>, 1345<sub>m</sub>, 1180, 1105<sub>s</sub>, 1050<sub>m</sub>, 850<sub>s</sub>.

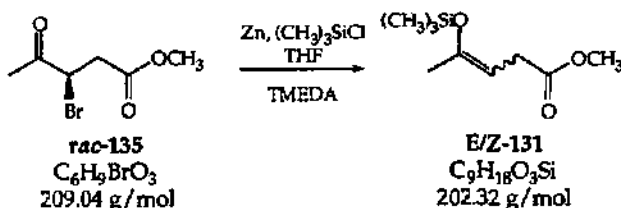
<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

3.68 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.17 (s, 6H, 2 H<sub>3</sub>C(4<sup>1</sup>)); 2.35 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.1.96 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 1.25 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).

EI-MS:

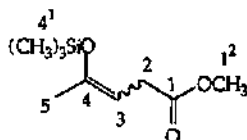
161 (9, [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 145 (26, [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>), 113 (16), 101 (8), 90 (5), 89 (100, [C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 85 (92), 81 (11), 71 (10), 59 (6, [H<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>C]<sup>+</sup>), 55 (6), 53 (1).

### 9.2.12. Synthèse du 4-triméthylsilyloxy-pentanoate de méthyle (131)



Dans un réacteur de 500 ml muni d'une ampoule de coulée de 250ml, d'un septum, d'une entrée d' $\text{N}_2$  et d'un agitateur mécanique, on place 8.25 g (0.13 mol, 1.5 éq.) de zinc activé et 25 ml de THF sec. A l'aide de l'ampoule de coulée, on ajoute en 30 min une solution composée de : 17.6 g (0.084 mol) de *rac*-135, 27.47 g (0.25 mol, 3 éq.) de chlorure de triméthylsilane (fraîchement distillé, conservé sous azote et sur tamis moléculaire) et de 75 ml de THF sec. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 20 h à température ambiante. On ajoute ensuite 125 ml (0.80 mol) de TMEDA et on laisse agiter pendant une heure. On ajoute 175 ml de pentane sec et on laisse sous agitation 30 minutes. Un précipité blanc (sels d'ammonium) se forme. On sépare le précipité du filtrat par filtration sur un verre fritté contenant de la Celite. On récupère le filtrat et l'excès de solvant est évaporé. Finalement, on distille le silylénoléther brut (29.81 g) à pression réduite ( $T_{\text{éb}} = 33^\circ\text{C}$ , 0.8 atm). On obtient un mélange composé de 85% de Z-131 et 15% de E-131 avec un rendement de 62 % (13.52 g).

Données analytiques de E/Z-131 (déterminées dans le mélange (Z-131 et E-131):



$R_f$  (hexane/ AcOEt 1:1): 0.47; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

IR (en solution dans  $\text{CCl}_4$ ):

3069w, 2954m, 2950w, 2361vw, 1743s, 1682m, 1436m, 1413w, 1380m, 1357m, 1307m, 1254s, 1197m, 1160s, 1101w, 1006m, 846s, 817m, 682w.

$^1\text{H-RMN}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

Z-131 (85%)

4.63 (tq,  $^3J(3,2) = 7.0$ ,  $^5J(3,5) = 0.8$ , 1H, HC(3)); 3.66 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ); 3.03 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(2)$ ); 1.81 (d,  $^5J(5,3) = 1.1$ , 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5)$ ); 0.19 (s, 9H,  $\text{H}_3\text{C}(4^1)$ ).

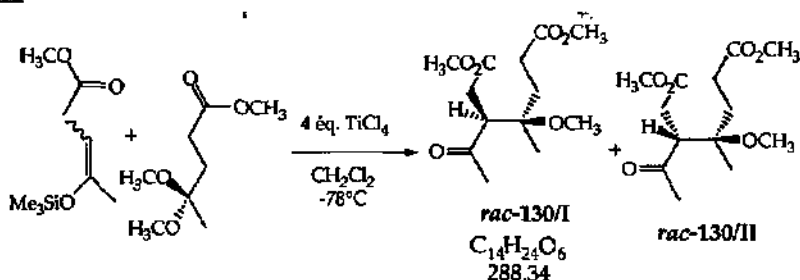
E-131 (15%)

4.79 (m, 1H, HC(3)); 3.67 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ); 2.96 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(2)$ ); 1.74 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5)$ ); 0.19 (s, 9H,  $\text{H}_3\text{C}(4^1)$ ).

EI-MS:

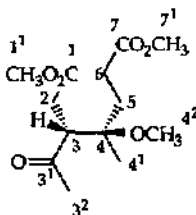
203 (4,  $[\text{M}+1]^+$ ), 202 (25,  $\text{M}^+$ ), 188 (2,  $[\text{M}+1-\text{CH}_3]^+$ ), 187 (12,  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ), 144 (8,  $[\text{M}+1-\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$ ), 143 (53,  $[\text{M}-\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$ ), 98 (9), 90 (3,  $[\text{OSi}^{29}(\text{CH}_3)_3]^+$ ), 89 (29,  $[\text{OSi}^{28}(\text{CH}_3)_3]^+$ ), 75 (14), 73 (100,  $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ ), 59 (9,  $[\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$ ).

### 9.2.13. Synthèse du 3-acétyl-4-méthoxy-4-méthyl-heptane-1,7-dioate de méthyle (130)



Dans un réacteur de 1.5 l, muni d'un agitateur mécanique, d'un septum, d'une ampoule de coulée et d'une entrée d'azote, on introduit sous  $\text{N}_2$  une solution de 9.34 g (0.053 mol) d'acétale 132 dans 230 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec. On refroidit le mélange réactionnel à  $-70^\circ\text{C}$ . On ajoute en deux portions 38.2 g de  $\text{TiCl}_4$  (22 ml, 0.213 mol) fraîchement distillé. Finalement, on ajoute lentement une solution de silylénoléther 131 (10.73 g à 58% pur et 42% de produit d'hydrolyse soit 0.0307 mol dans 230 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec). Le mélange est tenu sous agitation pendant toute la nuit à une température de  $-40^\circ\text{C}$ . Au mélange réactionnel, on ajoute à l'aide d'une ampoule de coulée 470 ml d'une solution saturée en  $\text{NaCl}$  froide. On place le mélange sous agitation 30 min. Après séparation des phases dans, on extrait 3 fois la phase aqueuse avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois avec une solution saturée en  $\text{NaCl}$ , puis séchées sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre. L'excès de solvant est évaporé et on effectue sur le résidu liquide une distillation à pression réduite pour éliminer le produit d'hydrolyse, c'est-à-dire, le lévulinat de méthyle. On élimine 3.04g de lévulinat de méthyle et on obtient 8.12g de mélange de *rac-130/I* et *rac-130/II* (rendement brut = 92%). sur lequel on effectue une chromatographie-flash (310g  $\text{SiO}_2$ , hexane/ $\text{AcOEt}$  4:1 jusqu'à 2:1). A la suite de la première colonne, on arrive à isoler 3.36 g de *rac-130/II* pur et des fractions enrichies en l'un ou l'autre des deux diastéréoisomères. Deux autres colonnes sont alors effectuées sur les fractions enrichies en *rac-130/I* (310 g  $\text{SiO}_2$ , hexane/ $\text{AcOEt}$  4:1 jusqu'à 2:1). On obtient à la fin de ces séparations, 802 mg de *rac-130/I* avec un enrichissement de 95%. La séparation des énantiomères a ensuite été effectuée par HPLC chirale sur cette fraction.

Données analytiques de *rac-130/I* et *rac-130/II*:



#### Diastéréoisomère *rac-130/I*

$R_f$  (hexane/ $\text{AcOEt}$  2:3): 0.47 (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

3.67 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^1)$  ou  $\text{H}_3\text{C}(7^1)$ ); 3.64 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(7^1)$  ou  $\text{H}_3\text{C}(1^1)$ ); 3.42 (dd,  $^3J(3,2a)=11.5$ ,  $^3J(3,2b)=3.4$ , 1H,  $\text{HC}(3)$ ); 3.18 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(4^2)$ ); 2.88 (dd,  $^2J(2a,2b)=17.3$ ,  $^3J(2a,3)=$



R<sub>f</sub> (hexane/AcOEt 1:1): 0.73; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

Z-136 (par analogie à 131), (56%):

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.60 (*tq*, <sup>3</sup>J (3,2) = 7.0, <sup>5</sup>J(3,5) = 1.0, 1H, HC(3)); 3.67 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.08 (*dq*, <sup>3</sup>J (2,3) = 7.0, <sup>5</sup>J(3,5) = 1.2, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.83 (*m*, 3H, H<sub>3</sub>C(5)); 0.96 (*m*, 9H, H<sub>3</sub>C(4<sup>2</sup>)); 0.61 (*m*, 6H, H<sub>2</sub>C(4<sup>1</sup>)).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

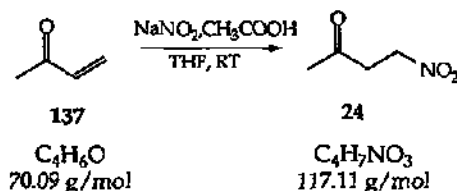
173.2 (C(1)); 149.5 (C(4)); 99.4 (C(3)); 51.5 (C(1<sup>2</sup>)); 30.8 (C(2)); 22.4 (C(5))

E-136 (par analogie à 131), (44%):

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

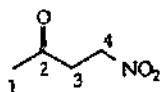
4.79 (*tq*, <sup>3</sup>J (3,2) = 7.7, <sup>5</sup>J(3,5) = 0.8, 1H, HC(3)); 3.67 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.96 (*d*, <sup>3</sup>J (2,3) = 7.6, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.76 (*m*, 3H, H<sub>3</sub>C(5)); 0.96 (*m*, 9H, H<sub>3</sub>C(4<sup>2</sup>)); 0.61 (*m*, 6H, H<sub>2</sub>C(4<sup>1</sup>)).

### 9.2.15. Synthèse du 4-nitro-butane-2-one (24)



Dans un tricol de 250 ml, 46.8 g de nitrite de sodium (0.45 mol, 1.3 éq.), 150 ml de THF et 28 ml de 137 (0.34 mol) sont mis sous N<sub>2</sub>. 39 ml d'acide acétique (0.45 mol, 1.3 éq.) sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. La réaction est laissée sous agitation pendant 14 heures à température ambiante. La solution est versée dans une ampoule à décanter et un volume de solution saturée en chlorure de sodium ainsi qu'un volume d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est lavée trois fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, la solution est ensuite filtrée et le solvant évaporé. Après évaporation, on obtient un résidu brut liquide de couleur jaune orange (masse = 40.0 g, rendement = 100%). Le produit 24 est engagé sans purification dans la réaction suivante.

Données analytiques de 24:



R<sub>f</sub> (AcOEt/heptane 1:1): 0.29; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

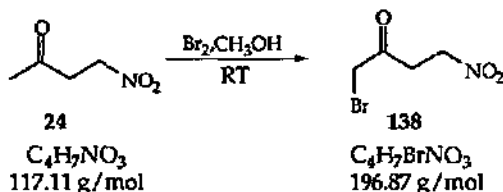
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

4.55 (*t*, <sup>3</sup>J(4, 3) = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 3.04 (*t*, <sup>3</sup>J(3, 4) = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.19 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1)).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

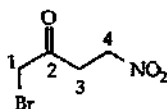
204.4 (C(2)); 68.9 (C(4)); 39.1 (C(3)); 30.1 (C(1)).

### 9.2.16. Synthèse du 1-bromo-4-nitro-butane-2-one (138)



38 g de 24 (0.32 mol) sont dissous dans 350 ml de méthanol. Le tricol est plongé dans un bain eau-glace et 20 ml de Br<sub>2</sub> (0.37 mol, 1.1 éq.) sont ajoutés goutte à goutte (30 min) en faisant attention que la température ne dépasse pas 5°C. Le mélange réactionnel est agité 14 heures sous N<sub>2</sub> à température ambiante. Le méthanol est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans une ampoule à décanter avec 125 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et traité avec 125 ml d'eau. Après agitation, les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est lavée trois fois avec 125 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques réunies sont lavées quatre fois avec un volume d'une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> puis deux fois avec un volume d'eau. La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et le solvant est ensuite évaporé. Le produit brut est un liquide brun (masse = 55.1 g). Le produit est purifié par chromatographie-flash (SiO<sub>2</sub>, Ø = 7 cm, h = 1.5 m, éluant: heptane/AcOEt 2:1). 28.2 g d'un produit solide de couleur blanc-crème sont récupérés (rendement = 44% (par rapport à 138)).

Données analytiques de 138:



R<sub>f</sub> (heptane/AcOEt 2:1): 0.25; (UV<sub>254</sub>-actif, brun, KMnO<sub>4</sub>).

IR (pastille KBr):

3448w, 3028m, 2999m, 2972m, 2951m, 2939m, 2916m, 2752w, 2428w, 2356w, 2054w, 1733s, 1553s, 1465w, 1415s, 1378s, 1269m, 1249m, 1215s, 1134m, 1083s, 1030m, 985m, 956m, 880s, 817w, 777w, 695s, 635m, 584m, 483m.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

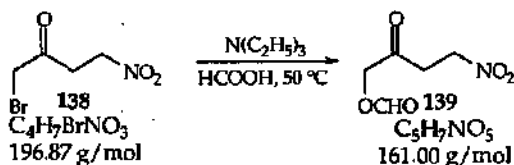
4.69 (t, <sup>3</sup>J(4, 3) = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 3.98 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 3.33 (t, <sup>3</sup>J(3, 4) = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(3)).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):

197.9 (C(2)); 68.9 (C(4)); 35.7 (C(1)); 33.3 (C(3)).

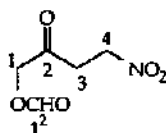
EI-MS:

149 (1, [M(<sup>79</sup>Br)-HNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 135 (1, [M(<sup>79</sup>Br)-CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 123 (12, [<sup>81</sup>BrCH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup>), 121 (13, [<sup>79</sup>BrCH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup>), 102 (20, [M-CH<sub>2</sub>Br]<sup>+</sup>), 95 (21, [CH<sub>2</sub>Br(<sup>81</sup>Br)]<sup>+</sup>), 93 (25, [CH<sub>2</sub>Br(<sup>79</sup>Br)]<sup>+</sup>), 81 (1, <sup>81</sup>Br), 79 (1, <sup>79</sup>Br), 55 (100, [C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>).

**9.2.17. Synthèse du 1-formyloxy-4-nitro-butane-2-one (139)**

5.1 g de 138 (26 mmol) sont dissous dans 4.9 ml d'acide formique (130 mmol, 5 éq.). La solution est agitée sous  $\text{N}_2$  jusqu'à ce que la solution atteigne  $0^\circ\text{C}$ . 3.6 ml de triéthylamine (26 mmol, 1 éq.) sont ajoutés goutte à goutte en faisant attention que la température ne dépasse pas  $5^\circ\text{C}$ . Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à  $50^\circ\text{C}$  pendant 10 jours. La solution est versée dans un décanteur. Un volume de solution de  $\text{HCl}$  1N saturée en  $\text{NaCl}$  et un volume d'AcOEt sont ajoutés. La phase aqueuse est lavée trois fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et après filtration, le solvant est évaporé. Le résidu liquide brut est de couleur brunâtre (masse = 3.66 g). Le produit est purifié par chromatographie-flash ( $\text{SiO}_2$ ,  $\varnothing = 5$  cm,  $h = 70$  cm, éluant: heptane/AcOEt 1:1). 1.19 g d'un liquide jaune sont récupérés (rendement = 36%).

Données analytiques de 139:



$R_f$  (heptane/AcOEt 1:1): 0.33; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $\text{KMnO}_4$ ).

IR (film):

3645w, 3444w, 2926m, 1723s, 1556s, 1421s, 1377s, 1280m, 1249m, 1173s, 1101s, 1060m, 1010m, 947m, 900w, 835m, 753w, 636w, 595w, 492w.

$^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

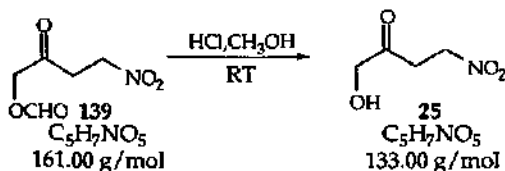
8.17 (t,  $^4J(1^2, 1) = 0.7$ , 1H,  $\text{HC}(1^2)$ ); 4.85 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 4.71 (t,  $^3J(4, 3) = 5.9$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 3.12 (t,  $^3J(3, 4) = 5.9$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):

199.0 (C(2)); 159.7 (C(1<sup>2</sup>)); 68.2 (C(4)); 66.9 (C(1)); 34.8 (C(3)).

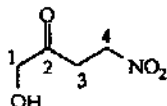
EI-MS:

159 (4,  $[\text{M}-2]^+$ ), 140 (5), 102 (10,  $[\text{M}-\text{OCHO}]^+$ ), 86 (33), 84 (47), 55 (100,  $[\text{C}_3\text{H}_3\text{O}]^+$ ).

**9.2.18. Synthèse du 1-hydroxy-4-nitro-butane-2-one (25)**

Dans un bicol de 100 ml, 1,19 g de 139 (7.39 mmol) est solubilisé dans 60 ml de méthanol sous  $N_2$ . 16 ml d'acide chlorhydrique 2N sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère d'azote 17 heures à température ambiante. La solution est versée dans un ballon et le volume est réduit à l'évaporateur rotatif de moitié. Le mélange est repris avec deux volumes d'AcOEt et un volume d'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'AcOEt. La phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et après filtration, le solvant est évaporé. Le liquide obtenu de couleur jaune (masse brute = 0.842 g) est purifié par chromatographie-flash ( $SiO_2$ ,  $\varnothing = 5$  cm,  $h = 70$  cm, éluant: heptane/AcOEt 1:3). On obtient 685 mg de produit qui est à nouveau purifié par distillation au four à boules ( $P = 4 \cdot 10^{-1}$  mbar,  $T(^{\circ}C) = 150-155$ ). 556 mg de liquide incolore pur sont alors isolés (rendement = 62%).

Données analytiques de 25:



R<sub>f</sub> (heptane/AcOEt 1:3): 0.18; (UV<sub>254</sub>-actif, brun,  $KMnO_4$ ).

IR (film):

3414s, 3025m, 2969m, 2920s, 2443w, 1729vs, 1553vs, 1423s, 1377s, 1256s, 1188m, 1128s, 1085s, 1019s, 996s, 894m, 811m, 754w, 642m, 595m, 533m, 504m, 476m, 423m.

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ , 298 K):

4.71 (t, 3J(4, 3) = 5.9, 2H,  $H_2C(4)$ ); 4.35 (s, 2H,  $H_2C(1)$ ); 3.04 (t, 3J(3, 4) = 5.9, 2H,  $H_2C(3)$ ); 3.01 (br s, 1H, OH).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ , 298 K):

205.6 (C(2)); 68.4 (C(4 ou 1)); 68.1 (C(1 ou 4)); 34.3 (C(3)).

EI-MS:

102 (10,  $[M-CH_2OH]^+$ ), 87 (9,  $[M-NO_2]^+$ ), 73 (14,  $[M-CH_2NO_2]^+$ ), 59 (7,  $[M-CH_2CH_2NO_2]^+$ ), 55 (100,  $[C_3H_5O]^+$ ).

## 10. Bibliographie

- [1] H.A. Dailey, in 'Biosynthesis of Heme and Chlorophylls', Ed. McGraw-Hill, New York, 1969, p.73.
- [2] B. Franck, *Angew.Chem.* 1992, 94, 327.
- [3] A.R. Battersby, *Science* 1994, 264, 1551.
- [4] A.R. Battersby, K. Frobel, *Chemie in unserer Zeit* 1982, 16, 124.
- [5] F.J. Leeper, *Nat.Prod.Rep.* 1989, 171.
- [6] D. Shemin, C.S. Russell, T. Abramsky, *J.Biol.Chem.* 1955, 215, 613.
- [7] S.I. Beale, P.A. Castelfranco, *Plant Physiol.* 1974, 53, 296.
- [8] C.G. Kannangara, S.P. Gough, R.P. Oliver, S.K. Rasmussen, *Carlsberg Res.Commun.* 1984, 49, 417.
- [9] H.D. Gibson, W.G. Laver, A. Neuberger, *Biochem.J.* 1958, 70, 71.
- [10] Z. Zaman, P.M. Jordan, M. Akhtar, *Biochem.J.* 1973, 135, 257.
- [11] P.M. Jordan, D. Shemin, in 'The Enzymes', Ed. P.D. Boyer, Academic Press, New York, 1972, p. 330.
- [12] D.W. Martin, 'Porphyrines et pigments biliaires', Editions ESKSA, 6th ed., Québec, 1985. p. 357
- [13] N.A. McCarroll, *Anal.Chem.* 1995, 67, 425.
- [14] E.K. Jaffe, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1995, 27, 169.
- [15] M.J. Warren, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, *TIBS* 1998, 23, 217.
- [16] B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1977, 74, 4641.
- [17] A. Gandy, American Liver Foundation, Web 1998.
- [18] P.M. Jordan, in 'Biosynthesis of Tetrapyrroles', Ed. P.M. Jordan, Elsevier, London, 1991, p. 1.
- [19] J.J. Scott, *Biochem.J.* 1956, 62, 6P.
- [20] B. Franck, H. Stratmann, *Heterocycles* 1981, 15, 919.
- [21] R. Neier, in 'Advances in Nitrogen Heterocycles', Ed. JAI Press Inc., Greenwich, 1996, p. 35.
- [22] D. Shemin, D.L. Nandi, *J.Biol.Chem.* 1968, 243, 1236.
- [23] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J.Chem.Soc.Perk.T.2* 1980, 240.
- [24] D. Shemin, in 'The Enzymes', Ed. P.D. Boyer, Academic Press, New-York, 1972, p. 3 23.
- [25] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Perie, M. Willson, *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 1995, 63, 301.
- [26] D. Shemin, F.K. Baker-Cohen, D.L. Nandi, *J.Biol.Chem.* 1968, 213, 1224.
- [27] R. Lüönd, R. Neier, *Biochim.Biophys.Acta* 1996, 1289, 83.
- [28] P.N.B. Gibbs, P.M. Jordan, *Biochem.J.* 1986, 236, 447.
- [29] P.M. Jordan, P.N.B. Gibbs, *Biochem.J.* 1985, 227, 1015.
- [30] E.K. Jaffe, G.D. Markham, J.S. Rajagopalan, *Biochemistry* 1990, 29, 8345.
- [31] E.K. Jaffe, G.D. Markham, *Biochemistry* 1988, 27, 4475.
- [32] K.D. Gibson, A. Neuberger, J.J. Scott, *Biochem.J.* 1955, 61, 618.

- [33] D. Shemin, *Method.Enzymol.* 1970, XVII Part A, 205.
- [34] D.L. Coleman, *Method.Enzymol.* 1969, XVII Part A, 211.
- [35] C. Battle, A.M. Ferramola, M. Grinstein, *Method.Enzymol.* 1919, XVII Part A, 216.
- [36] P.M. Anderson, R.J. Desnick, *J.Biol.Chem.* 1979, 254, 6924.
- [37] B. Lingner, Thèse, Université de München, 1983.
- [38] R. Lüönd, Thèse, Université de Fribourg, 1991.
- [39] M. Henz, Thèse, Université de Neuchâtel, 1997.
- [40] Y. Shioi, M. Doi, *Plant Cell Physiol.* 1988, 29, 843.
- [41] S. Granick, D. Mauzerall, *J.Biol.Chem.* 1958, 232, 1119.
- [42] W. Liedgens, C. Lütz, A.W. Schneider, *Eur.J.Biochem.* 1983, 135, 75.
- [43] Q.F. Boese, A.J. Spano, J. Li, M.P. Timko, *J.Biol.Chem.* 1991, 266, 17060.
- [44] J.M. Li, C.S. Russell, S.D. Cosloy, *Gene* 1989, 75, 177.
- [45] Y. Echelard, J. Dymetryszyn, M. Drolet, A. Sasarman, *Mol.Gen.Genet.* 1988, 214, 503.
- [46] P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem.J.* 1993, 290, 279.
- [47] N. Frankenberg, T. Kittel, C. Hungerer, U. Römling, D. Jahn, *Mol.Gen.Genet.* 1998, 257, 485.
- [48] G.-E. Rhie, Y.J. Avissar, S.I. Beale, *J.Biol.Chem.* 1996, 271, 8176.
- [49] P.T. Erskine, N. Senior, S. Awan, 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(12), 1025.
- [50] E.K. Jaffe, *Comments Inorg.Chem.* 1993, 15, 67.
- [51] A.M. Cheh, J.B. Neilands, in 'Structure and Bonding', Ed. 1976, p. 123.
- [52] H.W. Wen, D. Shemin, K.E. Richards, R.C. Williams, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1974, 71, 1767.
- [53] G. Gang Guo, Gu. Maozhi, J.D. Etlinger, *J.Biol.Chem.* 1994, 269, 12399.
- [54] P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem.J.* 1994, 300, 373.
- [55] I. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Int.J.Biochem.* 1980, 12, 751.
- [56] E.K. Jaffe, S. Bagla, P.A. Michini, *Biol.Trace Element Res.* 1991, 28, 223.
- [57] L.W. Mitchell, E.K. Jaffe, *Arch.Biochem.Biophys.* 1993, 300, 169.
- [58] E.K. Jaffe, A. Shafinaz, L.W. Mitchell, K.M. Taylor, M. Volin, G.D. Markham, *Biochemistry* 1995, 34, 244.
- [59] E.K. Jaffe, P.S. Scott, N.T. Chen, P.A. DeHaven, *J.Biol.Chem.* 1984, 259, 5032.
- [60] E.K. Jaffe, M. Volin, C.B. Myers, W.R. Abrams, *Biochemistry* 1994, 33, 11554.
- [61] E.K. Jaffe, W.R. Abrams, H.X. Kaempfen, K.A. Harris, *Biochemistry* 1992, 31, 2113.
- [62] A.J. Dent, D. Beyersmann, C. Block, S.S. Hasnain, *Biochemistry* 1990, 29, 7822.
- [63] M.M. Abboud, M. Akhtar, *J.Chem.Soc.Perk.T.2* 1976, 1007.
- [64] D.W. Christianson, W.N. Lipscomb, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1986, 83, 7568.
- [65] E.K. Jaffe, R.M. Petrovich, S. Litwin, *J.Biol.Chem.* 1996, 271, 8692.
- [66] L. Shimoni-Livny, H.L. Carrell, T. Wagner, A. Kaufman Katz, C. Afshar, L.W. Mitchell, M. Volin, E.K. Jaffe, J.P. Glusker, *Acta Crystallogr.* 1998, D54, 438.

- [67] P.T. Erskine, N. Senior, S. Maignan, J. Cooper, R. Lambert, G. Lewis, P. Spencer, P.M. Shoolingin-Jordan, S.P. Wood, S. Awan, M. Warren, I.J. Tickle, P. Thomas, *Protein Sci.* 1997, 6, 1774.
- [68] 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.
- [69] G. Lewis, P.T. Erskine, É. Norton, J.B. Cooper, R. Lambert, P. Spencer, S.P. Wood, S. Sarwar, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, *Structure* 1999, in the press.
- [70] C. Branden, J. Tooze, in 'Introduction à la structure des protéines', Ed. De Boeck Université, Paris, 1991, p. 43.
- [71] D. Reardon, G.K. Farber, *FASEB J.* 1995, 9, 497.
- [72] D.W. Banner, A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D.C. Phillips, C.I. Pogson, I.A. Wilson, *Nature* 1975, 255, 609.
- [73] S.J. Cooper, G.A. Leonard, S.M. Mc Sweeney, A.W. Thompson, J.H. Naismith, S. Qamar, A. Plater, A. Berry, W.N. Hunter, *Structure* 1996, 4, 1303.
- [74] N.S. Blom, S. Tétrault, R. Coulombe, J. Sygusch, *Nature struct.biol.* 1996, 3, 856.
- [75] N.S. Blom, J. Sygusch, *Nature struct.biol.* 1997, 4, 36.
- [76] G. Hester, D. Brenner-Holzach, F.A. Rossi, M. Struck-Donatz, K.H. Winterhalter, J.D.G. Smit, K. Piontek, *FEBS* 1991, 292, 237.
- [77] B.V. Plapp, in 'Methods in Enzymology', Ed. D.L. Purich, Academic Press, San Diego, 1995, p. 91.
- [78] E. Norton, M. Sarwar, P.M. Shoolingin-Jordan, *Biochem. Soc.Tr.* 1998, 26, S285.
- [79] P.M. Shoolingin-Jordan, *Biochem.Soc. T.* 1998, 26, 326.
- [80] R. Neier, R. Lüönd, J. Walker, *J.Org.Chem.* 1992, 57, 5005.
- [81] F. Stauffer, Thèse en cours, Neuchâtel, 1999.
- [82] A.R. Chaperon, T.M. Engeloch, R. Neier, *Angew.Chem.* 1998, 110(3), 369.
- [83] A. Chaperon, Thèse, Université de Neuchâtel, 1996.
- [84] T. Engeloch, Thèse, Université de Neuchâtel, 1998.
- [85] H. Bertschy, Thèse, Université de Fribourg, 1991.
- [86] D. Voet J.G. Voet, 'Biochemistry', John Wiley & Sons, 2nd ed., New-York, 1995. p. 345
- [87] L. Pauling, *Am. Sci.* 1953, 50.
- [88] W.B. Dempsey, E.E. Snell, *Biochemistry* 1963, 2, 1414.
- [89] Brevet IGEN INC., C12P 1/00 19/00 19/02, 1990.
- [90] J. Velker, Stage post-doctoral, 1999.
- [91] A. Cornish-Bowden, 'Enzyme Kinetics', IRL PRESS, Oxford, 1988. p.1.
- [92] M. Michaelis, M.L. Menten, *Biochem.Z.* 1913, 49, 333.
- [93] G.E. Briggs, J.B.S. Haldane, *Biochem.J.* 1925, 19, 338.
- [94] D.B. Northrop, *J.Chem.Educ.* 1998, 75, 1153.
- [95] L.E. Zawadzke, T.D.H. Bugg, C.T. Walsh, *Biochemistry* 1991, 30, 1673.
- [96] G.D. Wright, C.T. Walsh, *Accounts Chem.Res.* 1992, 25, 468.
- [97] T.D.H. Bugg, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C.T. Walsh, *Biochemistry* 1991, 30, 2017.

- [98] K. Duncan, W.S. Faraci, D.S. Matteson, C.T. Walsh, *Biochemistry* 1989, 28, 3541.
- [99] F.C. Neuhaus, *J.Biol.Chem.* 1962, 237(10), 3128.
- [100] K. Duncan, C.T. Walsh, *Biochemistry* 1988, 27, 3709.
- [101] F.C. Neuhaus, J.L. Lynch, *Biochemistry* 1964, 3(4), 471.
- [102] B.A. Ellsworth, N.J. Tom, P.A. Bartlett, *Curr.Biol.* 1996, 3(1), 37.
- [103] O.A.M. Al-Bar, C.D. O'Connor, L.G. Giles, M. Akhtar, *Biochem. J.* 1992, 282 747.
- [104] T. Palmer, 'Understanding Enzymes', Ed. Ellis Horwood, 4th ed., 1995.
- [105] M. Dixon, *Biochem.J.* 1972, 129, 197.
- [106] E.K. Jaffe, 'Fax', 1997.
- [107] D. Appleton, A.B. Duguid, S-K. Lee, Y-J. Ha, H-J. Ha, F.J. Leeper, *J.Chem.Soc.Perk.T.1* 1998, 89.
- [108] L.H. Easson, E. Stedman, *Proc.R.Soc.London B* 1936, 127, 142.
- [109] J.F. Morrison, *Biochim.Biophys.Acta* 1969, 185, 269.
- [110] S. Cha, I. Scott, *Biochem.Phaemacol.* 1975, 24, 2177.
- [111] J.F. Morrison, C.T. Walsh, in 'Advances in enzymology', Ed. John Wiley & Sons, New-York, 1988, p. 201.
- [112] J.F. Morrison, *Trends Biochem.Sci.* 1982, 7, 102.
- [113] J.V. Schloss, *Accounts Chem.Res.* 1988, 21, 348.
- [114] A. Radzicka, R. Wolfenden, in 'Methods in Enzymology', Ed. Academic Press, San Diego, 1995, p. 284.
- [115] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Périé, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 1996, 4, 2043.
- [116] C. Blonski, T. Gefflaut, J. Périé, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 1995, 3, 1247.
- [117] W.-D. Fessner, A. Schneider, H. Held, G. Sinerius, C. Walter, M. Hixon, J.V. Schloss, *Angew.Chem.* 1996, 108, 2366.
- [118] P.S. Ebert, R.A. Hess, B.C. Frykholm, D.P. Tschudy, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1979, 88, 1382.
- [119] D.P. Tschudy, R.A. Hess, B.C. Frykholm, *J.Biol.Chem.* 1981, 256, 9915.
- [120] E. Meller, M.L. Gassman, *Plant Physiol.* 1981, 67, 728.
- [121] P.J. Brumm, H.C. Friedmann, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1981, 102, 854.
- [122] K-M. Cheung, P. Spencer, M.P. Timko, P.M. Shoolingin-Jordan, S. Udenfriend, *Biochemistry* 1997, 36, 1148.
- [123] F.J. Leeper, M. Rock, *J.Fluorine Chem.* 1991, 51, 381.
- [124] M. Marty, Thèse, Université de Neuchâtel, 1995.
- [125] J.V. Schoss, D.J.T. Porter, H.J. Bright, W.W. Cleland, *Biochemistry* 1980, 19, 2358.
- [126] D. Seebach, *Angew.Chem.* 1990, 102, 1363.
- [127] M. Mischitz, K. Faber, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 81.
- [128] A.Y.T. Lu, G.T. Miwa, *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1980, 20, 513.
- [129] K. Faber, 'Biotransformations in Organic Chemistry', Ed. Springer-Verlag, Heidelberg, 1992.
- [130] K. Faber, M. Mischitz, W. Kroutil, *Acta Chem.Scand.* 1996, 50, 249.

- [132] U. Goergens, M.P. Schneider, *Tetrahedron-Asymmetry* 1992, 3, 831.
- [133] O. Takahashi, J. Umezawa, K. Furuhashi, M. Takagi, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 1583.
- [134] U. Wandel, M. Mischitz, W. Kroutil, K. Faber, *J.Chem.Soc.Perk.T.1* 1995, 735.
- [135] M. Mischitz, W. Kroutil, U. Wandel, K. Faber, *Tetrahedron-Asymmetry* 1995, 6, 1261.
- [136] M. Mischitz, K. Faber, C. Mirl, R. Saf, *Tetrahedron-Asymmetry* 1996, 7, 2041.
- [137] G.M. Lacourcier, R.N. Armstrong, *J.Am.Chem.Soc.* 1993, 115, 10466.
- [138] G. Bellucci, C. Chiappe, A. Cordoni, F. Marioni, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 4219.
- [139] S. Pedrogosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, *J.Org.Chem.* 1993, 58, 5533.
- [140] J.L.L. Rackels, A.J.J. Straathof, J.J. Heijnen, *Enzyme Microb.Technol.* 1993, 15, 1051.
- [141] J. Zindel, A. Zeeck, W.A. König, A. De Meijere, *Tetrahedron Lett.* 1993, 12, 1917.
- [142] J. Zindel, A. De Meijere, *J.Org.Chem.* 1995, 60, 2968.
- [143] T. Mukaiyama, *Angew.Chem.* 1977, 89, 858.
- [144] T. Mukaiyama, K. Banno, K. Narasaka, *J.Am.Chem.Soc.* 1974, 96, 7503.
- [145] S. Murata, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* 1980, 21, 2527.
- [146] M.A. Tius, D.P. Astrab, *Tetrahedron Lett.* 1996, 30, 2333.
- [147] I. Ojima, T. Kogure, *Organometallics* 1982, 1, 1390.
- [148] I. Ojima, M. Nihonyanagi, T. Kogure, M. Kumagai, S. Horiuchi, K. Nakatsugaya, Y. Nagai, *J.Organomet.Chem.* 1975, 94, 449.
- [149] G.Z. Zheng, T.H. Chan, *Organometallics* 1995, 14, 70.
- [150] T. Miyakoshi, S. Saito, J. Kumamoto, *Chem.Lett.* 1981, 1677.
- [151] J.N. Marx, *Tetrahedron* 1983, 39, 1529.
- [152] J. March., 'Advanced organic chemistry', Ed. Wiley & Sons, 4th ed., New-York, 1992. p. 428
- [153] S.F. MacDonald, *Can.J.Chem.* 1974, 52, 3257.
- [154] W.A. Benjamin, 'Modern Synthetic Reaction', Ed. House, 2nd ed., New-York, 1972. p. 459
- [155] H-J. Ha, S-K. Lee, Y-J. Ha, J-W. Park, *Synthetic Commun.* 1994, 24, 2557.
- [156] E. Zizzari, Thèse en cours, Université de Neuchâtel, 2001.

# 11. Annexes

## 11.1. Annexe 1: Influence du terme quadratique de la relation double réciproque dans le cas de la D-alanine-D-alanine ligase

$K_{m1} = 0.17 \text{ mM}$ ;  $K_{m2} = 9.7 \text{ mM}$ ;  $k_{cat} = 0.86 \cdot 10^{18} = 875 \text{ min}^{-1}$

Ces trois valeurs sont tirées de la publication de Bugg [95] pour la D-alanine-D-alanine ligase B issue de *E. coli* en présence d'un substrat non naturel le D-amino-butyrate.

Les concentrations en substrat sont prises dans la fourchette suivante:

$[S] = 0.1-10 \text{ mM}$

Ces valeurs ont été choisies pour se situer aux environs des deux  $K_m$  déterminées.

Calcul de  $V_{max}$ :  $[S] = 0.1 \text{ mM}$ ;  $1/[S] = 10$

D'après le graphique donné dans la publication,  $1/v \approx 2000$  et donc  $v = 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}/\text{min}$

A partir de ces valeurs et en utilisant par approximation la relation de Michaelis-Menten, on peut en déduire la concentration en enzyme:

$[E] = v \cdot ([S] + K_{m2}) / (k_{cat} \cdot [S]) = 5.6 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$

On peut ainsi en déduire  $V_{max}$ :  $V_{max} = k_{cat} \cdot [E] = 4.9 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}/\text{min}$

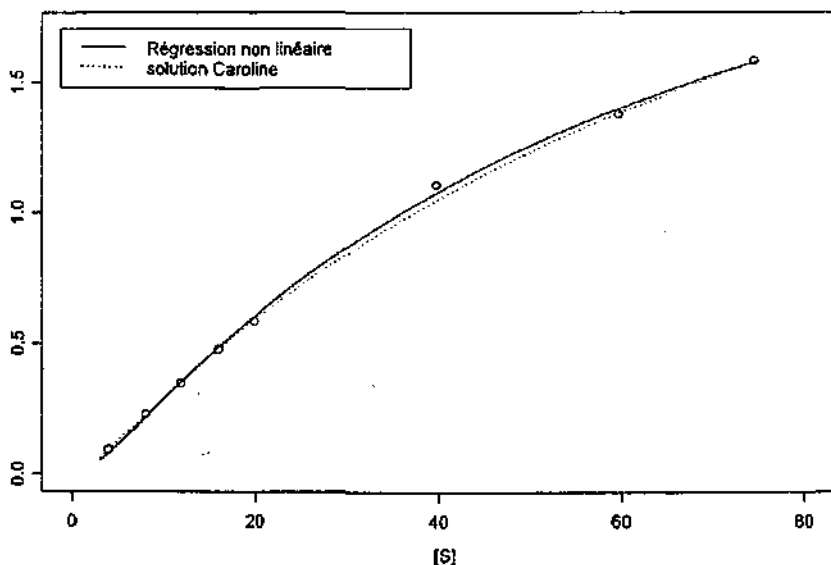
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_{m2}}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{K_{m1} \cdot K_{m2}}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]^2}$$

	$\Downarrow$ $\Downarrow$ $\Downarrow$				
Pour $\frac{1}{[S]} = 10$	$\frac{1}{v} =$	$20.4$	$+$	$1900$	$+$
					$\frac{3363}{v_{max}} = 5320$
					$\approx 53\% \text{ de la valeur totale}$
Pour $\frac{1}{[S]} = 1$	$\frac{1}{v} =$	$20.4$	$+$	$190$	$+$
					$\frac{33.6}{v_{max}} = 252$
					$\approx 13\% \text{ de la valeur totale}$
Pour $\frac{1}{[S]} \approx 0.1$	$\frac{1}{v} \approx$	$20.4$	$+$	$19.8$	$+$
					$\frac{0.336}{v_{max}} = 40.5$
					$\approx 0.8\% \text{ de la valeur totale}$

Schéma 26: Influence du terme quadratique de la relation double réciproque en fonction de la concentration en substrat dans le cas de la D-alanine-D-alanine ligase B issue de *E. coli*

Pour des valeurs de concentration environ égale à  $Km_2$ , le terme quadratique n'a que peu d'influence et pour des valeurs égales et supérieures, on visualisera une droite à la place d'une parabole. Pour des valeurs inférieures à  $Km_2$  et de l'ordre de  $Km_1$ , le terme quadratique prend de l'importance. Il faut donc se situer à des valeurs proches de  $Km_1$  pour calculer  $V_{max}$ .

### 11.2. Annexe 2: Graphe de régression non linéaire



### 11.3. Annexe 3: Séparation par chromatographie en phase de gazeuse chirale de *rac*-121 et *rac*-57

#### Epoxyde *rac*-121:

Colonne utilisée en cours de développement

Dimensions de la colonne: 35 m, diamètre intérieur = 0.3 mm

Gaz vecteur: He, 115 kPa, température avec gradient 60-120°C; 2°C/min

Chromatographe HP 5890

#### Diol *rac*-57:

Colonne utilisée en cours de développement

Dimensions de la colonne: 35 m, diamètre intérieur = 0.3 mm

Gaz vecteur: He, 60 kPa, température isotherme 110°C

## Chromatographe HP 5890

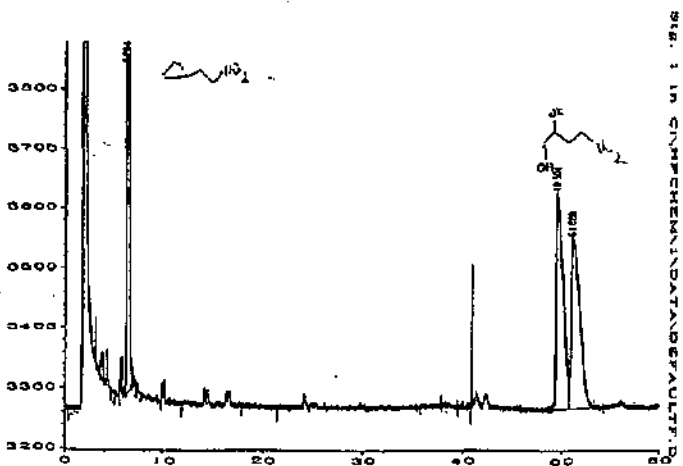
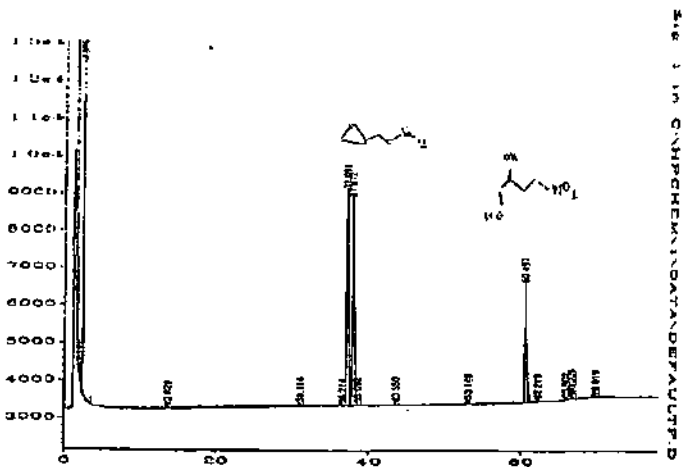


Figure 117: Chromatogramme séparation des diols et époxydes énantiomères

## Curriculum Vitae

JARRET Caroline

Née le 04.08.72 à Mulhouse (Haut-Rhin, France)

Fille d'Alice et André Jarret

## FORMATION

**Octobre 1995-Mai 1999:**

Travail de thèse au sein du groupe du Professeur R.Neier à l'institut de chimie de Neuchâtel

Poste d'assistantat à l'université de Neuchâtel

**Mars 1997-Juin 1997:**

Stage dans le groupe de biocatalyse du Professeur K.Faber à la Technische Universität de Graz (Autriche)

**1995:** Obtention du diplôme d'ingénieur-chimiste E.N.S.C.Mu.

Obtention du Diplôme d'Etudes Appliquées (D.E.A) de Chimie option Chimie Organique

Stage de 8 mois dans le cadre de la troisième année de formation à l'ENSCMu et du D.E.A. au laboratoire de recherche CIBA-PHARMA (Bâle)

**1992:** Obtention du Diplôme Universitaire de Technologie de Chimie (D.U.T) Université de Strasbourg

**1990:** Baccalauréat série F6 Lycée Lavoisier-Mulhouse

**Soutenance de thèse:** 21 Mai 1999

**Présentation publique:** 11 Juin 1999