



HAL
open science

Synthèse d'aminocyclitols, inhibiteurs potentiels de glycosidases lysosomales, via des aldolases

Flora Camps Bres

► **To cite this version:**

Flora Camps Bres. Synthèse d'aminocyclitols, inhibiteurs potentiels de glycosidases lysosomales, via des aldolases. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. NNT : 2010CLF22073 . tel-00629666

HAL Id: tel-00629666

<https://theses.hal.science/tel-00629666>

Submitted on 6 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : D.U. 2073

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N° 659

THESE

Présenté en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Chimie Organique Biologique

Par

Flora CAMPS BRES

Master

TITRE

**Synthèse d'aminocyclitols, inhibiteurs potentiels de
glycosidases lysosomales, *via* des aldolases**

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2010, devant la commission d'examen.

Président :

MOREAU Pascale, Professeur, Université Clermont-Ferrand II

Examineurs :

ARCHELAS Alain, Directeur de Recherche, CNRS, Université Aix-Marseille III
LE NARVOR Christine, Chargée de Recherche, CNRS, Université Paris-Sud XI
GARCIA-JUNCEDA Eduardo, Directeur de Recherche, Institut QOG de Madrid
HELAINÉ Christine, Maître de Conférences, Université Clermont-Ferrand II
LEMAIRE Marielle, Professeur, Université Clermont-Ferrand II, directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB, UMR CNRS 6504) de l'Université Blaise Pascal, dirigé par le Docteur Anne-Marie Delort, Directeur de Recherche, que je remercie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Marielle Lemaire, mon encadrante de thèse, pour m'avoir accompagnée durant ces trois années dans ces recherches sur les inhibiteurs de glycosidases. Merci pour sa confiance, son aide, ses conseils et son soutien tout au long de ce travail, et tout particulièrement durant la difficile période de rédaction. Merci aussi de m'avoir permise d'aller en Espagne durant ma première année de thèse grâce à une collaboration avec le CSIC.

J'en profite pour remercier tous mes collègues espagnols, et notamment le Docteur Eduardo Garcia-Junceda, Directeur de Recherche, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Un hommage particulier au Docteur Israël Sanchez pour son aide tout au long de mon séjour à Madrid, sa patience à me transmettre une partie de son savoir, et ses qualités humaines incomparables : *Isra, Gracia por tu ayuda y tu amistad.*

Je tiens également à témoigner ma chaleureuse gratitude au Docteur Christine Helaine, Maître de Conférences, pour son aide au laboratoire et tout particulièrement lors de la production et la purification des enzymes. Un grand merci aussi pour ses précieuses corrections de manuscrit et sa disponibilité à répondre à toutes mes questions, ainsi que pour nos nombreuses discussions scientifiques.

Je suis sensible à l'honneur que me font le Docteur Christine Le Narvor, Chargée de Recherche, et le Docteur Alain Archelas, Directeur de Recherche, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude. J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Eduardo Garcia-Junceda, Directeur de Recherche, et au Professeur Pascale Moreau, qui ont bien voulu faire partie de mon jury de thèse, témoignant ainsi de leur intérêt pour ce travail. Enfin je remercie l'ensemble des membres de mon jury pour avoir été présent le 25 Novembre à ma soutenance de thèse et d'avoir participé à la discussion scientifique qui s'en est suivie.

Mes remerciements s'adressent aussi à mon inséparable collègue de paillasse le Docteur Carlos Fernandes, pour son soutien, ses nombreux conseils, son expérience, mais aussi pour ses bons goûts musicaux et culinaires, sa bonne humeur, ses potins et nos « *piscines parties* » qui à défauts de me faire perdre un once m'ont permis de garder la forme et de mieux le connaître : *vive Brad, vive Françoise, vive nous !*

Un grand merci à Henri pour son aide à la paillasse, à Thierry pour sa disponibilité à répondre à toutes sortes d'urgence au laboratoire, à Martine pour la microbio, Mounir pour la RMN, et enfin à Agnès qui à toujours fait son possible pour nous fournir le matériel demandé. Bravo à Carole et Stéphanie toujours là pour répondre à nos questions administratives et se rendre utiles.

Une pensée toute particulière à mon ami Johan qui ne connaîtra malheureusement pas la sensation d'être docteur, cette thèse t'est tout particulièrement dédiée. Merci pour ton amitié et ton soutien durant ces moments difficiles au labo : *tu resteras pour moi le meilleur des chimistes, dommage que tu sois encore meilleur en infirmier, tes patients ont bien de la chance.*

Merci à tous mes collègues et camarades de thèse pour la bonne humeur au quotidien au SEESIB ainsi que pour nos petits rendez vous détente au Nota ou en Corrèze : Jose, Greg, Marielle, Nadia, Juliane, Julie, Karima, Virgil, Cécile, Anthony, Aurélien, Stéphane, Nico, Mickaël, Pierre, Aurélie, Laurent et tous les autres !

Enfin j'ai une pensée pour mes parents et mon compagnon Polo qui m'ont toujours soutenu. Merci maman pour les corrections d'orthographe, ce devait être laborieux à lire ! Merci mon Popo pour m'avoir supporté pendant les « *bas* » de la thèse. Merci encore pour tout ce que vous avez fait pour moi.

ABBREVIATIONS

AK : acétate kinase
ASSC : « *active-site-specific chaperones* »
ADP : adénosine diphosphate
APS : persulfate d'ammonium
ATP : adénosine triphosphate
BSA : « *Bovine Serum Albumin* »
c : taux de conversion
CAL-B : lipase de *Candida Antartica*
CCM : chromatographie sur couches minces
CPV : chromatographie en phase vapeur
DGJ : désoxygalactonojirimycine
DGJ-NAc : 2-acétamido-1,2-didéoxy-D-galacto-nojirimycin
CFE : « *cell free extract* »
CN-DNJ : α -1-C-nonyl- désoxynojirimycine
CO-DNJ : α -1-C-octyl désoxynojirimycine
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undécène
DPPE : 1,2-diphénylphosphinoéthane
DERA : désoxyribose-5-phosphate aldolase
DHA : dihydroxyacétone
DHAK : dihydroxyacétone kinases
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DIPEA : diisopropyléthylamine
D-HPG : D-4-hydroxyphenylglycine
DMA : diméthoxyacétaldéhyde
DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine
DMF : diméthylformamide
DMJ : 1-désoxymannojirimycine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNJ : 1-désoxynojirimycine
DDDP2 : 2,5-diéthoxy-*p*-dioxane-2,5-diméthanol-*O*-2-*O*-5-bisphosphate
E : coefficient d'énantiosélectivité
ee : excès énantiomérique
EI complexe enzyme-inhibiteur
éq. : équivalent
ES : complexe enzyme-substrat
ESI : électrospray
F6P : fructose-6-phosphate
F1P : fuculose-1-phosphate
F1PA : fuculose-1-phosphate aldolase
FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FBP : fructose-1,6-bisphosphate
FID : détecteur à ionisation de flamme
FSA : fructose-6-phosphate aldolase
GA : glycolaldéhyde
 α -Gal-A : α -galactosidase A
GlcNAc : *N*-acétylglucosamine
GCase : glucocérébrosidase
G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate
GPDH : glycérolphosphate déshydrogénase

GPDH-TPI : glycérolphosphate déshydrogénase – triose phosphate isomérase
GSL: glycosphingolipide
HA : hydroxyacétone
HB : 1-hydroxy-2-butanone
Hex-A : hexosaminidase A
FPLC : “*Fast protein Liquid Chromatography*”
IE : impact électronique
IFG : isofagomine
IMAC : “*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*”
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR : infrarouge
IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*
KDO : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique
Ki : constante de dissociation
Km : constante de Michaelis
LDH lactate déshydrogénase
L-GPO : L-glycérol phosphate oxydase
LB : Luria-Bertani
m-CPBA : acide métachloroperbenzoïque
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NB-DNJ : *N*-butyl-1-désoxynojirimycine
NeuA : *N*-acétylneuraminique
NGT : *N*-Acétyl-glucosamine-thiazoline
NN-DNJ : *N*-nonyl-1-désoxynojirimycine
NJ : Nojirimycine
NOE : “*Nuclear Overhauser Effect*”
NOESY : “*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*”
NOEV: *N*-octyl- β -épivaliénamine
NOV: *N*-octyl- β -valiénamine
%AR : pourcentage d'activité restante
PEP phosphoénol pyruvate
PGH phosphoglycolohydroxamate
PK : pyruvate kinase
ppm : partie par million
R1PA : rhamnulose-1-phosphate aldolase
RCM : « *Ring-Closing Metathesis* »
RE : réticulum endoplasmique
RMN : résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE : « *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* »
TA : température ambiante
TBA : tagatose-1,6-bisphosphate aldolase
TBP : tagatose-1,6-bisphosphate
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle
TEMED : tétraméthyléthylène diamine
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TPI : triose-phosphate isomérase
UDP-glucose : *N*-acylsphingosine D-glucosyltransferase

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	7
INTRODUCTION.....	15
RAPPEL DES CONSTANTES CINETIQUES D'UNE ENZYME	19
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
<i>CHAP1 : LES MALADIES LYSOSOMALES.....</i>	<i>25</i>
<hr/>	
I. LE LYSOSOME ET SES ENZYMES	27
II. LES GLYCOSIDASES	28
1. <i>Présentation.....</i>	28
2. <i>Mécanismes d'action</i>	29
III. LES MALADIES LYSOSOMALES	32
1. <i>Présentation générale.....</i>	32
2. <i>Classification</i>	33
3. <i>Quelques exemples des maladies les plus répandues.....</i>	34
3.1. <i>La maladie de Gaucher.....</i>	34
3.2. <i>La maladie de Fabry.....</i>	35
3.3. <i>La maladie de Tay-Sachs</i>	36
4. <i>Les traitements.....</i>	36
4.1. <i>Les traitements existants</i>	36
4.2. <i>La stratégie par molécules chaperonnes.....</i>	38
IV. LES INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES LYSOSOMALES.....	39
1. <i>Les iminosucres</i>	40
1.1. <i>Présentation générale</i>	40
1.2. <i>Inhibiteurs utilisés dans la thérapie par réduction de substrat.....</i>	42
1.3. <i>Inhibiteurs utilisés dans la stratégie par molécules chaperonnes</i>	44
2. <i>Les aminocyclitols</i>	49
2.1. <i>Deux molécules de référence, NOV et NOEV.....</i>	50
2.2. <i>Les N-Alkyl-valiénamines dans la stratégie par molécules chaperonnes.....</i>	52
<i>CHAP 2 : SYNTHÈSE DES AMINOCYCLITOLS.....</i>	<i>55</i>
<hr/>	
I. PRESENTATION GENERALE.....	57
II. METHODES CHIMIQUES DE SYNTHÈSE DES AMINOCYCLITOLS	59
1. <i>Synthèses à partir de produits possédant un carbocycle.....</i>	59
2. <i>Synthèse par cyclisation intramoléculaire.....</i>	64
2.1. <i>Fermeture du cycle par aldolisation intramoléculaire</i>	64
2.2. <i>Fermeture du cycle par métathèse.....</i>	66
III. APPROCHE CHIMIOENZYMATIQUE.....	68

1. Désymétrisation enzymatique	68
2. Cyclisation intramoléculaire de nitroaldols	70
CHAP 3 : LES ALDOLASES	73
<hr/>	
I. GENERALITES SUR LES ALDOLASES	75
II. LES DHAP-ALDOLASES	77
1. Propriétés catalytiques	78
2. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase	81
2.1. Rôle catalytique.....	81
2.2. Le site actif.....	82
3. La fuculose- et la rhamnulose-1-phosphate aldolases	83
3.1. Rôle catalytique.....	83
3.2. Le site actif.....	84
4. Applications en synthèse.....	89
III. SYNTHÈSE DU DHAP	92
1. Stabilité du DHAP	93
2. Synthèse chimique.....	93
3. Synthèse enzymatique	96
3.1. Régénération de l'ATP.....	96
3.2. Synthèse du DHAP via le glycerol-3-phosphate.....	97
3.3. Synthèse du DHAP à partir de la DHA.....	99
IV. ALTERNATIVES AU DHAP	100
1. Utilisation d'analogues du DHAP.....	100
2. Utilisation de nouvelles enzymes	101
2.1. La FSA	102
2.2. Utilisation en synthèse	106
STRATÉGIE	111
I. STRATEGIE GENERALE.....	113
II. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DU DHAP	116
III. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES ALDEHYDES	117
RÉSULTATS ET DISCUSSION	119
CHAP1 : ALDOLASES ET KINASES	121
<hr/>	
I. PRODUCTION DES ALDOLASES.....	123
1. Production et purification de la FIPA et de la RIPA	123
1.1. Production	123
1.2. Purification par chromatographie d'affinité.....	125
1.3. Purification en batch	127

2. Production et purification de la FSA naturelle et de la FSA mutée	127
3. Mesure des activités des aldolases purifiées	128
3.1. Les aldolases DHAP-dépendantes	128
3.2. Activité de la FSA.....	132
II. SYNTHÈSE DU DHAP	133
1. Synthèse enzymatique	133
2. Production, purification et mesure d'activité de la DHAK	135
CHAP 2 : MISE EN OEUVRE DES ALDOLASES POUR LA SYNTHÈSE D'AMINOCYCLITOLS MODELES	139
<hr/>	
INTRODUCTION	141
I. PRÉPARATION DES ALDÉHYDES MODELES	142
1. Synthèse du 4-nitrobutanal 79	142
2. Obtention des réactifs 81, 84 et 91	143
2.1. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal 81	143
2.2. Synthèse des aldéhydes 84 et 91	145
3. Synthèse des aldéhydes 95 et 96 racémiques.....	148
3.1. La réaction de Henry : présentation générale.....	148
3.2. Application à la synthèse des composés 92, 93 et 94.....	149
3.3. Déprotection des aldéhydes.....	151
4. Dédoublage enzymatique	151
4.1. Principe	151
4.2. Présentation des techniques de détermination d'excès énantiomériques	152
4.3. Le dédoublage cinétique enzymatique.....	153
4.4. Le dédoublage cinétique dynamique.....	157
II. COUPLAGES ENZYMATIQUES AVEC LES ALDÉHYDES MODELES	169
1. Choix du procédé pour les DHAP aldolases	169
1.1. Stratégie « one pot – one step »	170
1.2. Stratégie « 1 pot – 2 steps »	172
1.3. Essai avec deux enzymes fusionnées	176
2. Mise en œuvre des FSA.....	177
3. Analyse des produits de couplages	177
3.1. Couplages avec le 4-nitrobutanal	178
3.2. Couplage avec les substrats nitrés porteurs de groupements hydroxyles.....	185
CHAP 3 : SYNTHÈSE D'AMINOCYCLITOLS	195
<hr/>	
INTRODUCTION	197
I. SYNTHÈSE DES ALDÉHYDES PORTANT UN GROUPEMENT AZOTE.....	198
1. Introduction d'un groupement azido	198
1.1. Synthèse de l'aldéhyde 139.....	199
1.2. Synthèse de l'aldéhyde 143.....	200

2. Introduction d'un groupement amino ou amido.....	204
II. TESTS DE COUPLAGE ENZYMATIQUE DES SUBSTRATS AMINO ET AMIDO	205
1. Couplage avec la FSA et la FBA	205
2. Couplage avec la RIPA et la FIPA.....	207
2.1. Mesure des Km	207
2.2. Réaction enzymatique et résultats.....	208
3. Obtention d'aminocyclitols.....	211
3.1. Déprotection de l'amine en position 5	211
3.2. Réduction du groupement nitro en position 6.....	215
III. MISE EN PLACE DES TESTS D'INHIBITION AUTOMATISES	216
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	219
PARTIE EXPÉRIMENTALE	225
<i>CHAP 1 : PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES.....</i>	<i>227</i>
<hr/>	
I. GENERALITES	229
1. Outils de production et de purification des protéines.....	229
2. Techniques d'analyse.....	229
II. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA FIPA, RIPA ET DHAK.....	230
1. Production des protéines recombinantes.....	230
2. Préparation d'un extrait cellulaire soluble (CFE) à partir d'une culture	231
3. Purification des protéines étiquetées avec une queue 6-Histidine	231
4. Evaluation de la concentration en protéine des éluats.....	232
5. Vérification de la pureté de la protéine d'intérêt	233
6. Récupération de la protéine et conservation.....	234
III. PRODUCTION ET PURIFICATION DES FSA	235
1. Surexpression des FSA dans <i>Escherichia coli</i>	235
2. Extraction et purification des FSA	235
IV. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.....	236
1. Synthèse du L-lactaldéhyde	236
2. Synthèse et purification du fucose-1-phosphate et du rhamnulose-1-phosphate	239
3. Mesure de l'activité de la FIPA et de la RIPA	241
4. Mesure de l'activité de la DHAK.....	242
5. Mesure de l'activité des FSA	242
<i>CHAP2 : SYNTHESSES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES.....</i>	<i>243</i>
<hr/>	
I. GENERALITES	245
1. Nomenclature et numérotation	245
2. Techniques chromatographiques.....	245

3. Techniques spectroscopiques et d'analyse	246
II. SYNTHÈSE DU DHAP	247
1. Réaction enzymatique de formation du DHAP	247
2. Dosage du DHAP d'un milieu	247
3. Dosage du DHA résiduel	248
III. SYNTHÈSE DES NITROALDÉHYDES RACÉMIQUES	248
1. Synthèse du 4-nitrobutanal 79	248
2. Synthèse de l'aldéhyde monohydroxylé 95	249
3. Synthèse de l'aldéhyde dihydroxylé 96	252
3.1. Première méthode : à partir du furane	252
3.2. Deuxième méthode : à partir de l'acroléine diéthylacétal	259
4. Synthèse des aldéhydes dihydroxylés S-96 et R-96 optiquement purs	264
4.1. Le dédoublement cinétique	264
4.2. Le dédoublement dynamique	266
IV. SYNTHÈSE DES PRECURSEURS AZOTES (AMINE MASQUÉE)	269
1. Essais d'obtention de l'aldéhyde 143	269
2. Synthèse de l'aldéhyde 154	276
V. COUPLAGES ENZYMATIQUES : FORMATION DES NITROCYCLITOLS	278
1. Protocole enzymatique général avec la FIPA et la RIPA	278
2. Protocole enzymatique général avec les FSA	278
3. Dosage de l'aldol formé	279
4. Caractérisations des nitrocyclitols obtenus	280
4.1. Avec le 4-nitrobutanal 79 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3-triols et préparation des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3-triols	280
4.2. Avec le 3-hydroxy-4-nitrobutanal 95 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,5-tetrols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,5-tetrols	284
4.3. Avec le (2R)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal R-96 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols ...	288
4.4. Avec le (2S)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal S-96 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols ...	292
4.5. Réaction avec l'acétamide 154	296
VI. OBTENTIONS DES AMINOCYCLITOLS	298
1. Déprotection du NHAc en position 5 du cycle	298
2. Réduction du NO ₂ en position 6 du cycle	299
VII. MISE EN PLACE DES TESTS D'INHIBITION AUTOMATISÉS	300
1. Matériel : le TECAN Freedom EVO® couplé Sapphire	300
2. Méthode d'évaluation des propriétés inhibitrices	301
ANNEXE	306

INTRODUCTION

Le besoin grandissant de produits énantiomériquement purs s'est traduit, au cours des dernières années, par un développement exponentiel des procédés de synthèse asymétrique. A côté des méthodes purement chimiques, la **biocatalyse** s'est progressivement imposée comme un puissant moyen permettant d'accéder à des molécules chirales.

Les enzymes isolées ont fortement suscité l'intérêt des chimistes car elles sont d'excellents catalyseurs et présentent l'avantage de pouvoir être utilisées comme des réactifs chimiques classiques. Elles catalysent un large spectre de réactions avec une excellente stéréosélectivité. Elles sont :

- *Chimiosélectives* : elles agissent sur un type de fonction particulière sans toucher aux autres fonctions présentes sur la molécule,
- *Régiosélectives* : elles peuvent différencier des groupements fonctionnels identiques mais placés dans des régions différentes de la molécule,
- *Enantiosélectives* : leur structure chirale leur permet de reconnaître la chiralité ou la prochiralité présente dans un substrat, et par conséquent de différencier non seulement deux énantiomères mais aussi deux groupements ou faces énantiotopes,
- *Enantiogéniques* : elles ne génèrent qu'un seul énantiomère lors de la formation de carbones asymétriques.

Les enzymes présentent aussi l'avantage de répondre aux principes de la **chimie verte**. En effet, dans un schéma synthétique, elles aident à minimiser le nombre d'étapes en évitant les réactions de protection/déprotection usuelles. Elles permettent également d'adopter des conditions douces de réaction (économie d'énergie) et évite l'utilisation de solvants organiques toxiques. Ce sont de plus des composés biodégradables. Enfin, leur spécificité donne lieu à des réactions propres, sans perte d'atomes en sous produits.

Certaines restrictions sont tout de même importantes à prendre en compte. Tout d'abord de nombreuses enzymes ont été isolées et caractérisées, mais elles ne sont pas toutes commerciales. De plus, elles n'acceptent pas n'importe quelles conditions de température et de pH, et sont sujettes à des phénomènes d'inhibition. On sait également qu'elles sont souvent spécifiques d'une famille de substrats donnée. Cependant, les développements de la biologie moléculaire permettent actuellement de résoudre la plupart de ces inconvénients.

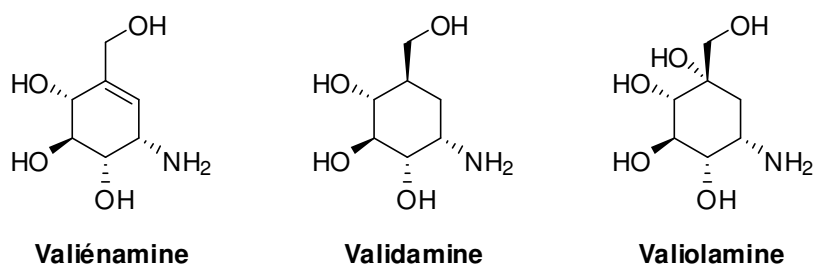
Depuis de nombreuses années, l'équipe *Biocatalyse en Synthèse Organique* du laboratoire SEESIB s'intéresse au développement et à l'utilisation de biocatalyseurs pour synthétiser des molécules à activité biologique. Ce travail de thèse s'inscrit dans une thématique de recherche concernant l'utilisation d'aldolases pour la préparation d'inhibiteurs de glycosidases.

Les glycosidases sont des enzymes très importantes impliquées dans de nombreux processus biologiques de notre corps. Entre autres, elles sont responsables de la dégradation des déchets polysaccharidiques de nos cellules. Lorsqu'une modification génétique touche un

gène qui code pour une de ces enzymes, la glycosidase mutée peut ne plus remplir sa fonction d'origine. Il en résulte que son substrat naturel s'accumule dans les cellules et par conséquent déclenche des pathologies graves, regroupées sous l'appellation de « *maladies lysosomales* ». Ce sont des maladies rares, qui font partie du groupe de maladies dites orphelines (prévalence inférieure à 1/2000 naissances).

Pour certaines de ces maladies, quelques traitements existent mais restent très coûteux et contraignants, pour d'autres, rien n'est encore possible. En l'absence d'une thérapie génique efficace, les chimistes ont un rôle à jouer pour construire de nouvelles molécules biologiquement actives. L'objectif de ce projet est de proposer une méthode de synthèse efficace de molécules qui pourraient être actives spécifiquement sur l'une ou l'autre de ces maladies. Les molécules ciblées sont des **inhibiteurs de glycosidases** utilisés dans une stratégie thérapeutique émergente « *par molécules chaperonnes* ».

Ces molécules font partie de la famille des **aminocyclitols**, dont les plus connus en tant qu'inhibiteurs de glycosidases sont d'origine naturelle, tels la valiénamine, la validamine et la valioline.



La méthode de synthèse d'aminocyclitols développée dans ce travail s'appuie sur une étape enzymatique clé utilisant les **aldolases** comme catalyseurs.

Dans un premier chapitre, nous présenterons les maladies lysosomales : leur cause, leurs conséquences, mais aussi les traitements existants et les stratégies thérapeutiques à l'étude. Un second chapitre sera consacré aux travaux déjà publiés concernant les synthèses chimiques et enzymatiques d'aminocyclitols. Enfin, les aldolases, notre outil enzymatique, seront présentées.

Les résultats que nous avons obtenus seront ensuite exposés et discutés. Ils concerneront dans un premier temps la production et la purification des enzymes, puis la synthèse du DHAP et des aldéhydes substrats. Dans un deuxième temps, les réactions de couplages catalysées par les aldolases seront décrites.

Une conclusion dressant le bilan des résultats, ainsi que les perspectives envisagées termineront ce travail.

Une partie expérimentale en fin de document détaillera l'ensemble des protocoles mis en œuvre, ainsi que la caractérisation de chaque composé isolé.

RAPPEL DES CONSTANTES CINETIQUES D'UNE ENZYME

Une réaction enzymatique peut être décrite grâce à différents modèles plus ou moins compliqués. Nous présenterons ici le modèle de Michaelis-Menten qui s'écrit de la façon suivante :



L'enzyme (E) en présence du substrat (S) conduit à la formation d'un composé dissociable enzyme-substrat (ES). Celui-ci, progressivement, libère le produit (P). Quand la concentration en complexe ES devient constante, on se trouve dans une phase stationnaire pour laquelle l'apparition du produit de la réaction se fait à une vitesse constante.

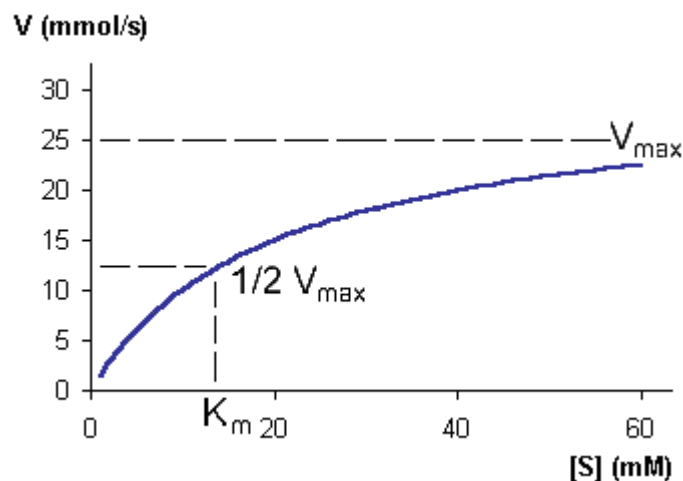
Nous avons, dans les conditions d'état stationnaire :

$$K_m = \left(\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \right)_{\text{stat}}$$

La vitesse de la réaction est constante et a pour expression :

$$V = k_{cat} \cdot [ES]_{\text{stat}} = k_{cat} \cdot [E]_t \cdot \frac{[S]}{[S] + [K_m]} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad \text{avec} \quad \begin{aligned} E_t &= [E] + [ES] \\ V_{\text{max}} &= k_{cat} \cdot [E]_t \end{aligned}$$

Si on trace le graphe correspondant à la mesure de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat, on obtient la courbe suivante :

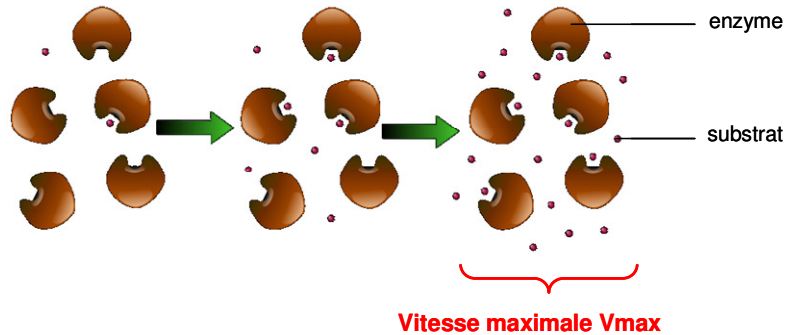


On définit ainsi les paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique : **V_{max}** et **K_m**. **k_{cat}** est aussi une constante cinétique importante.

- **V_{max}** représente la vitesse maximale atteinte lorsque toute l'enzyme est sous la forme du complexe ES. En effet, pour de faibles concentrations en substrat, la

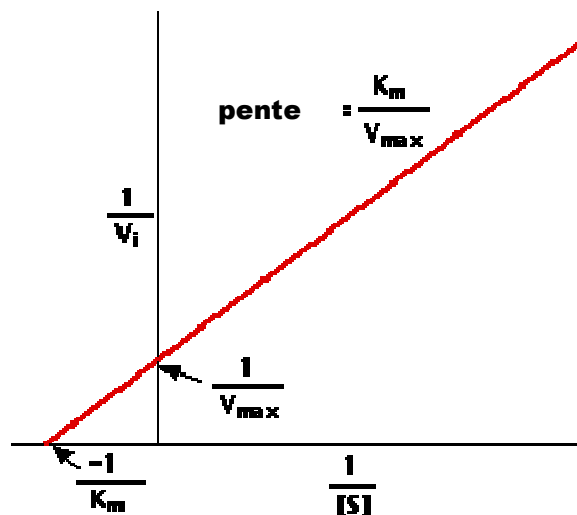
vitesse est proportionnelle à celle-ci, mais pour des concentrations plus élevées en substrat, la vitesse devient constante et atteint une valeur limite V_{max} . L'enzyme est saturée en substrat et la vitesse ne dépend alors que de la concentration en enzyme dans le milieu.

V_{max} est souvent exprimée en μmoles de substrat transformé par minute et par mL de solution. Elle peut être rapportée à la quantité d'enzyme présente, et est alors exprimée en μmoles par minute et par mg de protéines.



- **K_m** (constante de Michaelis) représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de V_{max} . Plus la valeur de K_m est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande.

Ces constantes peuvent également être déterminées de manière plus précise par une représentation dite de Lineweaver-Burk :



- **k_{cat}** est une constante de vitesse. Elle désigne le nombre de molécules de substrat converti en produit par molécule d'enzyme et par unité de temps. k_{cat} est en s^{-1} . Le rapport **k_{cat}/K_m** est souvent donné comme mesure de l'efficacité catalytique, car il correspond à une constante de vitesse pour de basses concentrations en substrat.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chap1 : les maladies lysosomales

I. Le lysosome et ses enzymes

Situés au cœur de chacune de nos cellules, les lysosomes sont des organites du cytoplasme qui contiennent des enzymes, les hydrolases acides. Elles sont chargées de dégrader les déchets produits par la cellule (appelés métabolites), ainsi que des nutriments externes à celle-ci¹. Pour fonctionner correctement, les enzymes digestives requièrent l'environnement acide du lysosome (pH compris entre 3,5 et 5,2)².

Toutes ces enzymes sont produites à pH neutre par le réticulum endoplasmique (RE), organe cellulaire chargé de l'assemblage des acides aminés en chaînes protéiques suivant l'information venue du noyau. Au sein du RE, ces enzymes peuvent être modifiées, repliées et leur qualité « contrôlée »³. Elles sont alors transportées et traitées par l'appareil de Golgi (amoncellement de sacs membranaires aplatis), où elles sont modifiées notamment par glycosylation : c'est la phase de *maturation*. Chaque protéine suit une voie de maturation particulière et sera triée avant d'être envoyée vers son site d'activité⁴ (Figure 1).

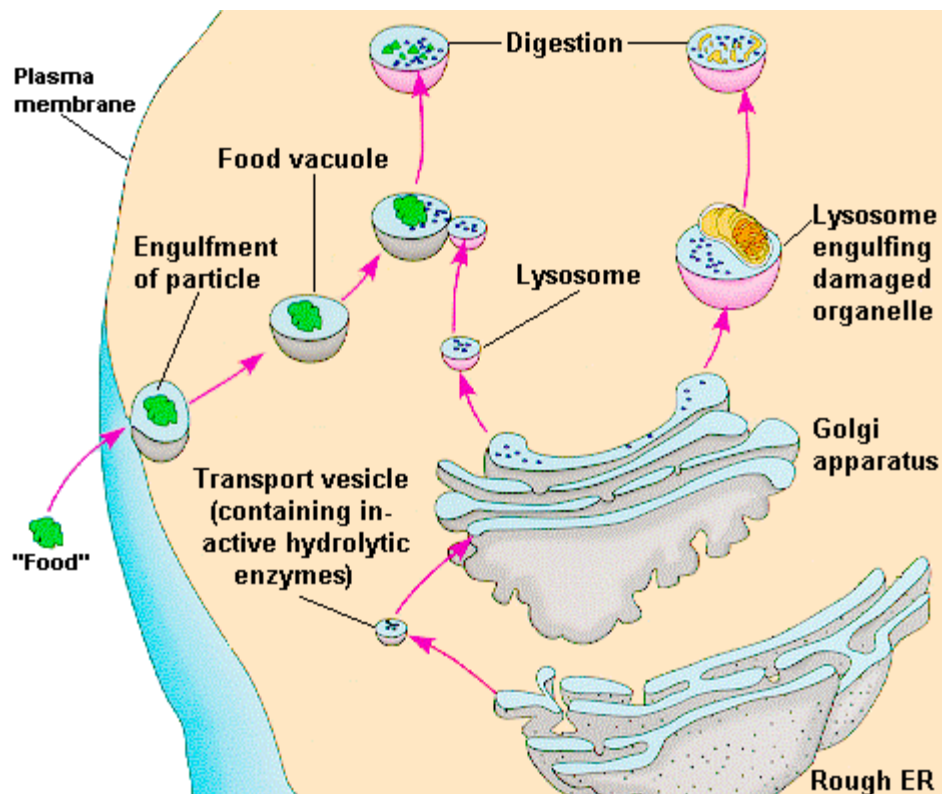


Figure 1 : Rôle et fonctionnement des lysosomes dans une cellule

¹ Lloyd, J. B.; Mason, R. W. *Subcell. Biochem.* **1996**, 27, 15.

² Anderson, R. G. W.; Orci, L. *J. Cell Biol.* **1988**, 106, 539.

³ Nakatsukasa, K.; Brodsky, J. L. *Traffic* **2008**, 9, 861.

⁴ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.

Dans le compartiment *cis* de l'appareil de Golgi (compartiment d'entrée des protéines), il existe plusieurs voies de maturation. L'une d'entre elles consiste en la phosphorylation d'unités mannose, ce qui entraîne la création de résidus mannose 6-phosphate. Ces résidus agissent comme des marqueurs, qui permettent l'adressage de la glycoprotéine vers le lysosome⁵.

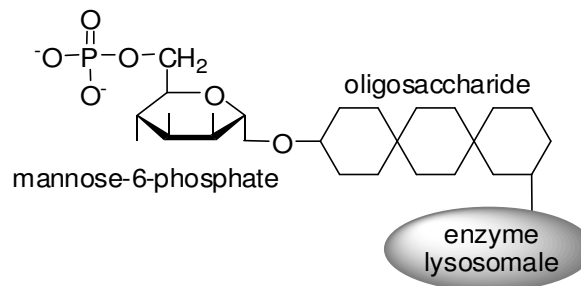


Figure 2 : Marquage par le mannose-6-phosphate des enzymes lysosomales

Dans les autres compartiments de l'appareil de Golgi, des sucres sont ajoutés par l'intermédiaire de glycosyltransférases ou retirés par des glycosidases, pour former des structures saccharidiques plus ou moins complexes. Les glycoprotéines devenues matures sont ensuite envoyées vers leurs sites d'activité : le lysosome, la membrane ou les vésicules de sécrétion⁶.

Plusieurs familles d'enzymes interviennent dans les lysosomes :

- les lipases, qui dégradent les lipides en acides gras,
- les glycoside hydrolases (ou glycosidases), qui dégradent les polysaccharides ou oligosaccharides,
- les protéases, qui dégradent les protéines en peptides, dégradés ensuite par des peptidases en tripeptides, dipeptides, puis acides aminés,
- les nucléases, qui dégradent les acides nucléiques en nucléosides.

Parmi ces enzymes, seule la famille des glycosidases sera étudiée par la suite.

II. Les glycosidases

1. Présentation

Les glycosidases catalysent sélectivement l'hydrolyse de la liaison glycosidique dans les polysaccharides et les glycoconjugués, assurant par exemple la rupture de la liaison entre les deux unités d'un disaccharide (Figure 3). L'hydrolyse permet la libération selon les cas de

⁵ Winchester, B.; Vellodi, A.; Young, E. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 150.

⁶ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* **1992**, Médecine-Sciences Flammarion.

monosaccharides, d'oligosaccharides ou de molécules non saccharidiques de plus faible poids moléculaire.

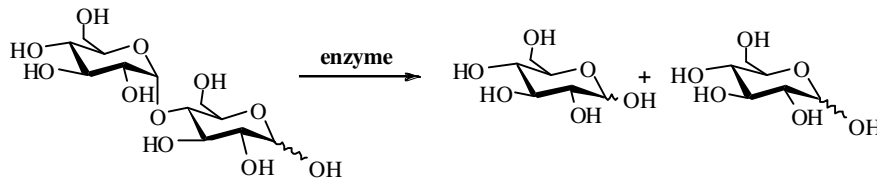


Figure 3 : Exemple du maltose

Il existe différents types de glycosidases, qui sont spécifiques de l'unité glucidique hydrolysée, de sa série D ou L, de sa forme furanique ou pyranique et de la configuration de la liaison glycosidique α ou β . Ainsi les α -D-glycosidases hydrolysent les α -D-glycosides, les β -D-galactosidases hydrolysent les β -D-galactosides, etc⁷. On distingue également les exoglycosidases et les endoglycosidases. Les premières hydrolysent des liaisons glycosidiques terminales et les secondes des liaisons internes des chaînes polysaccharidiques.

Les glycosidases sont des enzymes très répandues impliquées dans un grand nombre de processus biologiques fondamentaux du métabolisme des sucres : la digestion des polysaccharides alimentaires dans la bouche et l'intestin grêle, la dégradation des polysaccharides au niveau du lysosome, ou encore la glycosylation des protéines au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (voir paragraphe précédent)⁸.

2. Mécanismes d'action

Les glycosidases agissent dans l'organisme selon deux mécanismes catalytiques proposés pour la première fois par Koshland en 1953⁹. Avec seulement quelques légères variations, ces propositions ont résisté à l'épreuve du temps et sont toujours d'actualité¹⁰. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique de la liaison glycosidique peut avoir lieu selon deux mécanismes généraux aboutissant à la libération :

- Soit d'un glucide ayant une configuration anomérique inverse de celle du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec *inversion de configuration*.

- Soit d'un glucide ayant un carbone anomérique de même configuration que celui du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec *réretention de configuration*.

⁷ David, S. *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres* 1995, InterEditions / CNRS Editions, 58.

⁸ Winchester B. *Biochem. Soc. Trans.*, 1992, 699.

⁹ Koshland D.E. *Biol. Rev.*, 1953, 28, 416.

¹⁰ Davies, G. J.; Gloster, T. M.; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, 15, 637.

Ces mécanismes mettent en jeu deux groupements carboxyliques clés provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme. Leurs rôles et leurs positions relatives diffèrent selon le mécanisme considéré¹¹.

Mécanisme avec inversion de configuration :

C'est le mécanisme le moins répandu. Il correspond à une substitution nucléophile s'effectuant selon un mécanisme concerté (Figure 4). L'un des groupements carboxyliques, sous forme de carboxylate (B^-), déprotone l'eau pour favoriser son attaque nucléophile sur le carbone anomérique. L'autre résidu acide permet le départ du groupement ROH en jouant le rôle de catalyseur acide (HA), selon un processus de catalyse acide-base générale.

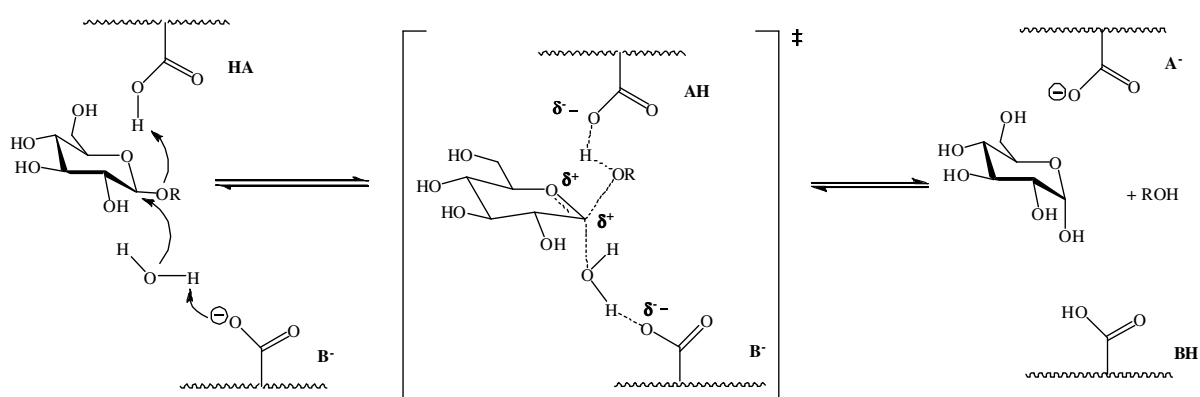


Figure 4 : Hydrolyse avec inversion de configuration

Mécanisme avec rétention de configuration :

La rétention de configuration est la conséquence de deux inversions de configuration successives au niveau du carbone anomérique du substrat. Ce mécanisme implique la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent (Figure 5).

Comme précédemment, l'un des groupements carboxyliques joue le rôle de catalyseur acide (HA) en protonant le groupe partant. L'autre groupement, sous forme de carboxylate nucléophile (B^-), attaque le carbone anomérique pour former un intermédiaire covalent lié à l'enzyme par une liaison axiale. Le monosaccharide libéré sort du site actif et est remplacé par une molécule d'eau. Le processus inverse a ensuite lieu : simultanément et en passant par un autre état de transition, le carboxylate déprotone l'eau et celle-ci attaque le carbone anomérique pour hydrolyser l'intermédiaire covalent.

¹¹ (a) McCarter, J. D.; Stephen Withers, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885 ; (b) Wang, Q. P.; Graham, R. W.; Trimbur, D.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11594.

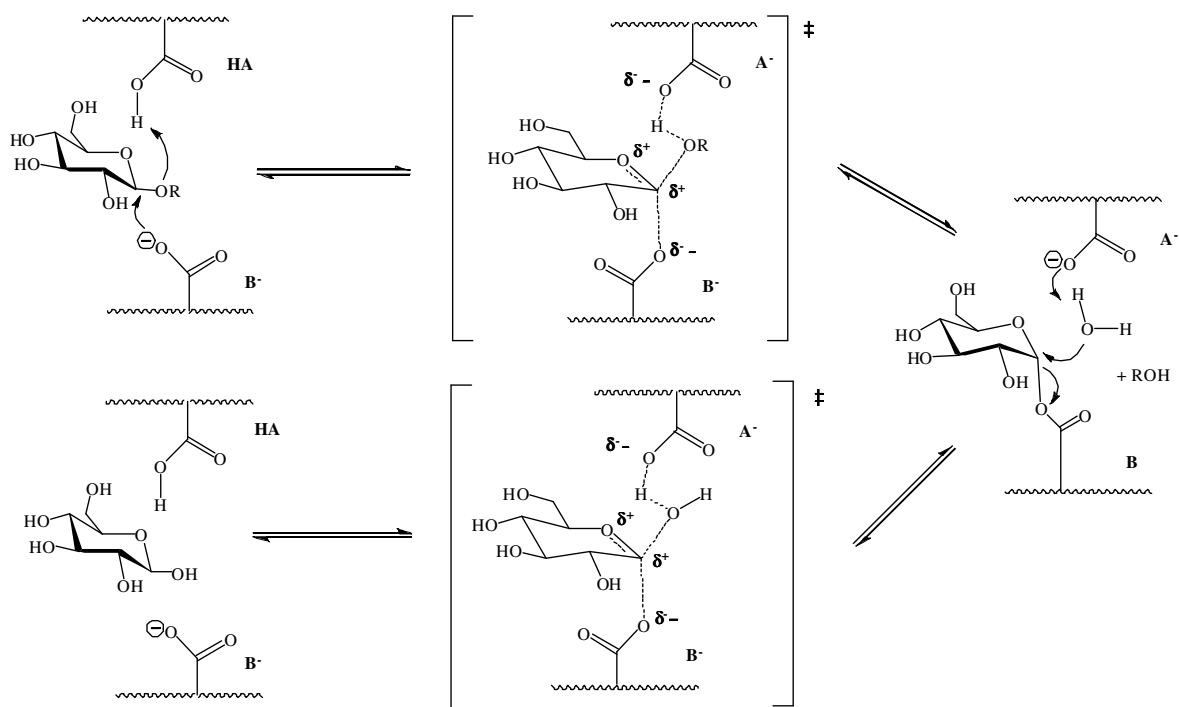


Figure 5 : Hydrolyse avec rétention de configuration

Modèle général de l'état de transition :

La connaissance des mécanismes, et donc des états de transition impliqués dans les réactions catalysées par des enzymes, est fondamentale. En effet, de nombreuses stratégies de synthèse d'inhibiteurs sont orientées vers la création de molécules mimant les états de transition, ceux-ci étant considérés comme les structures les plus fortement liées par l'enzyme au cours du chemin réactionnel¹².

Dans le cas des glycosidases, l'état de transition est similaire quel que soit le mécanisme mis en jeu, et il est généralement représenté de la manière suivante :

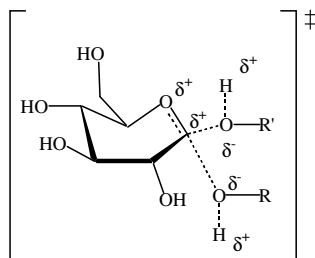


Figure 6 : Modèle général de l'état de transition

Deux caractéristiques essentielles peuvent être plus particulièrement retenues :

¹² Vasella, A.; Davies, G. J.; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 619.

- *Le passage par un intermédiaire portant une charge positive* partagée entre le carbone anomérique et l'oxygène endocyclique, ce qui implique la présence d'une liaison à caractère sp^2 entre ces deux atomes. L'état de transition posséderait alors une structure proche d'un *ion oxocarbénium* (Figure 6).

- *Une distorsion du cycle* du substrat fixé dans le site actif par rapport à l'état fondamental de la molécule. Une telle distorsion faciliterait le passage de l'état de transition à l'intermédiaire cationique. Elle permettrait le recouvrement des orbitales pour la formation de l'ion oxocarbénium et/ou diminuerait des interactions stériques défavorables lors de l'attaque par le nucléophile¹³.

III. Les maladies lysosomales

1. Présentation générale

Les maladies lysosomales sont des maladies dégénératives rares, dites « orphelines », où une déficience génétique aboutit à un défaut de fonctionnement au niveau du lysosome.

Sous l'appellation de «maladies lysosomales» sont regroupées une cinquantaine de maladies, toutes impliquant un gène différent codant pour une enzyme du lysosome. Pour chacune de ces maladies, le défaut du gène concerné entraîne le dysfonctionnement de la protéine chargée de recycler les métabolites. Ceux-ci s'accumulent progressivement dans les cellules, et, par voie de conséquence, dans les tissus du corps de l'enfant ou de l'adulte malade, ce qui en perturbe leur fonctionnement. Peu à peu, des lésions apparaissent au niveau de différents organes : cœur, poumons, foie, cerveau... provoquant des troubles particulièrement graves et irréversibles, mortels avant l'âge adulte pour nombre de pathologies. Le plus souvent, les signes révélateurs de la maladie sont absents à la naissance. Ils n'apparaissent qu'après une période d'évolution de quelques mois, voire plusieurs années selon la gravité. 3 000 enfants sont atteints en France, 250 à 400 nouveaux cas sont recensés chaque année.



L'association Française Vaincre les Maladies Lysosomales (VML) a été créée en 1990 par des parents d'enfants malades, accompagnés de médecins spécialistes de ces pathologies¹⁴. Depuis, ce sont plus de 278 subventions et bourses de recherche, soit pratiquement 4,7 millions d'euros, que VML a attribué pour faire progresser la compréhension et le traitement des maladies lysosomales.

¹³ Rye C. S., Withers S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 573.

¹⁴ <http://www.vml-asso.org/>

2. Classification

Les maladies lysosomales les plus répandues, représentées par plus de 30 maladies, résultent d'un défaut de dégradation des glycanes. Ces maladies peuvent être classées selon quatre groupes¹⁵ :

- Défaut de dégradation des glycoprotéines (Maladie Sialidose) ;
- Défaut de dégradation des glycolipides (Maladie de Gaucher, Tay-Sachs, Sandhoff) ;
- Défaut de dégradation des glycosaminoglycanes (Syndrome de Hurler) ;
- Défaut de dégradation du glycogène (Maladie de Pompe).

La famille de maladies résultant d'un défaut de dégradation des glycolipides est la plus représentée. Parmi les glycolipides, les glycosphingolipides (ou glycosilcéramides) sont des composants essentiels de la membrane cellulaire. Ils sont constitués d'une chaîne de polysaccharides de longueur variable et d'un céramide relié par une liaison glycosidique. Le céramide correspond à un acide aminé (souvent de type sérine) lié à un acide gras (souvent de type acide palmitique) (Figure 7). Selon la nature du sucre, de l'acide aminé, ou de l'acide gras, on aboutit à un galactocérébroside, à un glucocérébroside, ou à de nombreux autres glycosylcéramides.

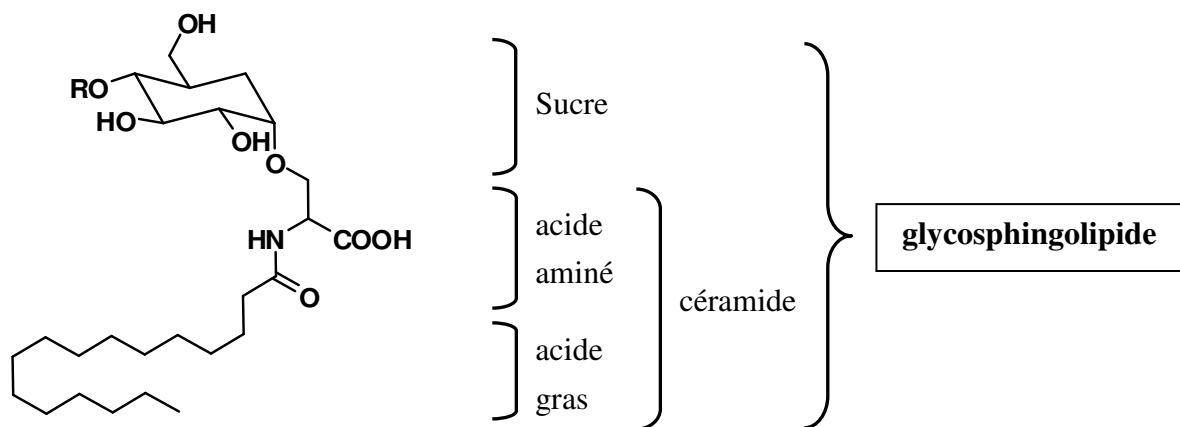


Figure 7 : Structure des glycosphingolipides

Les lysosomes contiennent une cinquantaine d'hydrolases différentes, chargées de dégrader les glycosphingolipides (GSL) de manière séquentielle (Figure 8). Des entités saccharidiques sont ainsi relarguées du résidu terminal jusqu'à une ultime étape, générant le céramide et le monosaccharide final qui seront alors recyclés dans le cytoplasme.

Des mutations de protéines, impliquées dans ce chemin catabolique, entraînent l'accumulation de substrats non dégradés et les maladies lysosomales correspondantes, comme représenté sur le schéma ci-dessous.

¹⁵ Murthy, T.; Nagarjuna, S.; Vali, P. S.; Saritha, T.; Rao, G. M. S. *Int. J. PharmTech. Res.* **2010**, 2, 1082.

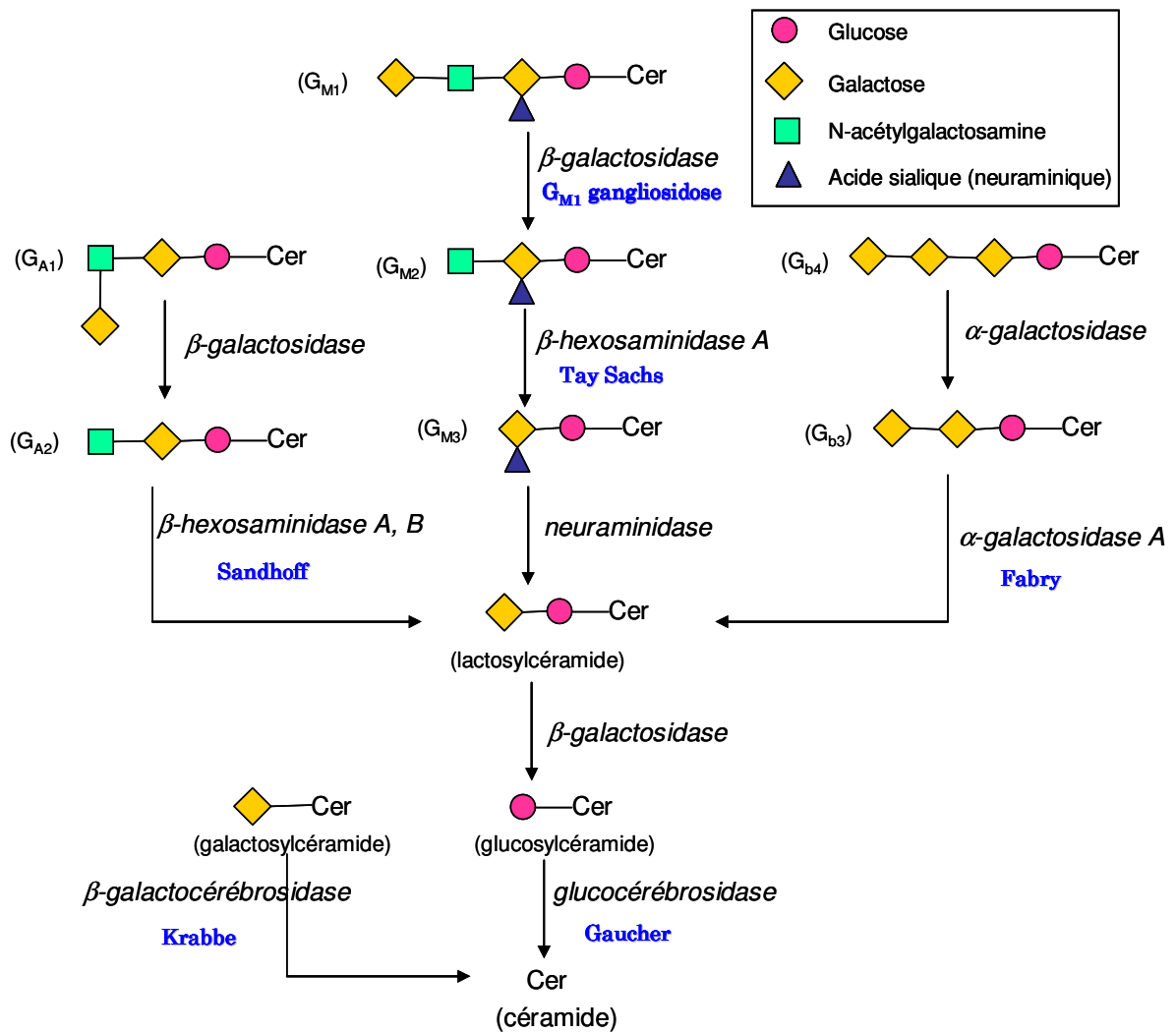


Figure 8 : Voie catabolique des GSL impliqués dans des maladies lysosomales

3. Quelques exemples des maladies les plus répandues

3.1. La maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher fut pour la première fois décrite par le docteur P. Gaucher en 1882. Il remarqua la présence de cellules anormalement élargies au niveau de la rate d'une patiente. La substance stockée dans les cellules fut identifiée comme étant du glucosylcéramide en 1934, mais ce n'est que 30 ans plus tard que la cause de cette accumulation, une déficience en glucocérébrosidase (GCCase), fut découverte (Figure 8). Le biais par lequel cette accumulation va provoquer les différents symptômes de la maladie (complications cardio-pulmonaires, anomalie cutanée, etc) n'est cependant pas clair, malgré de nombreuses années d'investigation¹⁶.

Avec un taux de prévalence compris entre 1 sur 40 000 et 1 sur 60 000 naissances, la maladie de Gaucher est le syndrome le plus représenté en France. La population juive

¹⁶ Sawkar, A. R.; D'Haese, W.; Kelly, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1179.

ashkénaze est plus particulièrement touchée, avec un taux de survenance compris entre 1 pour 500 et 1 pour 1000¹⁷. Etant l'une des maladies lysosomales les plus fréquentes, elle bénéficie d'un intérêt un peu plus développé. Ainsi, plusieurs industries se sont appliquées ces dernières années à trouver des traitements pour cette maladie, et continuent activement leurs recherches.¹⁸

On distingue trois formes de la maladie, correspondantes à des mutations différentes de l'enzyme déficiente. Pour la maladie de Gaucher de type I, l'activité résiduelle de cette enzyme est comprise entre 10 et 15 %. Une activité inférieure à 10 % est retrouvée dans les formes les plus sévères (type II et III).

- Maladie de Gaucher de type I: A évolution variable, certaines personnes peuvent ne jamais avoir de symptômes durant toute leur vie. Plusieurs organes peuvent être touchés (foie, rate, os) mais sans atteinte du système neurologique (cerveau). C'est la forme de la maladie la plus fréquente (environ 95% des malades).
- Maladie de Gaucher de type II: Exceptionnelle, à évolution rapide, l'atteinte du système neurologique (cerveau) est majeure et touche donc les très jeunes enfants.
- Maladie de Gaucher de type III: Forme peu fréquente, les symptômes sont variables dans leur intensité et dans l'âge d'apparition (enfance, adolescence) ; l'atteinte du système neurologique est moins sévère que le type II.

3.2. La maladie de Fabry

La maladie de Fabry est liée à la défaillance d'une α -galactosidase lysosomale (α -Gal-A, Figure 8). Son incidence est d'environ 1 personne sur 40 000, 200 à 300 cas en France. Ce défaut génétique conduit à l'accumulation de glycosphingolipides partiellement hydrolysés (globotriaoxylcéramide G_{B3}) dans les cellules endothéliales du système vasculaire, ce qui provoque des atteintes cardiaques, cérébrales et rénales qui s'accroissent avec l'âge et entraînent fréquemment un décès prématuré.

Dans certaines formes de la maladie, les patients conservent une activité résiduelle de l' α -Gal-A de l'ordre de 5 – 10 %. Des travaux sur ces enzymes mutantes ont montré qu'elles avaient des caractéristiques cinétiques voisines de celles de l'enzyme normale, mais qu'elles étaient beaucoup moins stables¹⁹ ; pour cette raison, certaines de ces enzymes forment des agrégats au niveau du RE et sont rapidement éliminées. La défaillance enzymatique responsable de la maladie de Fabry serait ainsi due principalement, au moins pour certaines mutations, à la rétention au niveau du RE et à la dégradation de la protéine mal repliée.

¹⁷ Horowitz, M.; Zimran, A. *Hum. Mutat.* **1994**, *3*, 1.

¹⁸ Sorbera, L. A.; Sundaravinayagam, D.; Dulsat, C.; Rosa, E. *Drugs Fut.* **2009**, *34*, 1001.

¹⁹ Ishii, S.; Kase, R.; Sakuraba, H.; Suzuki, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *197*, 1585.

3.3. La maladie de Tay-Sachs

C'est une maladie neurodégénérative due à l'absence de l'enzyme hexosaminidase A, ce qui entraîne une accumulation dans le lysosome de ganglioside G_{M2} (Figure 8). Plus de 100 allèles pathologiques ont été recensés pour cette maladie, regroupés en trois groupes selon les symptômes :

- *La forme infantile* commence entre 3 et 6 mois. Le signe le plus précoce est l'apparition de sursauts inépuisables au bruit. Puis surviennent un arrêt de développement, une cécité puis un état végétatif avec décès avant l'âge de 4 ans.
- *La forme juvénile* commence entre 2 et 6 ans par des troubles du comportement et de la coordination musculaire. Sa progression est plus lente que la forme infantile.
- *La forme adulte* commence après 10 ans, mais le diagnostic peut être très tardif à l'âge adulte. Elle présente les mêmes signes que la forme juvénile.

La maladie tire son nom de l'ophtalmologue W. Tay et du neurologue B. Sachs, qui ont décrit les premiers, en 1881, les symptômes de la maladie. Ils avaient aussi noté une augmentation de la prévalence chez la population juive d'Europe orientale (Ashkénaze).

4. Les traitements

4.1. Les traitements existants

A ce jour, huit maladies lysosomales bénéficient d'un traitement permettant de contenir leur évolution. Deux stratégies thérapeutiques sont actuellement utilisées : par enzymothérapie substitutive ou par réduction de substrat²⁰.

✓ **L'enzymothérapie substitutive** : le but de ce traitement est d'apporter par des perfusions intraveineuses régulières (toutes les semaines) l'enzyme spécifique qui fait défaut. Avec ce principe, pour chaque maladie il est nécessaire de développer la production d'une enzyme différente, ce qui est une technique coûteuse. Ces enzymes sont produites par génie génétique, purifiées et modifiées pour les aider à atteindre les cellules de l'organisme impliquées dans la maladie. Cependant, dans certains cas, ce traitement n'est pas applicable, car par exemple les cellules du cerveau sont difficilement accessibles en raison de la barrière hémato-méningée.

Cette thérapie fut pour la première fois utilisée dans le traitement de la maladie de Gaucher de type I, et permit d'en diminuer les symptômes de façon très significative²¹, encourageant les travaux dans ce domaine.

²⁰ Beck, M. *Hum. Genet.* **2007**, 121, 1.

Par ailleurs en 2001, deux enzymes substitutives ont été mises sur le marché pour lutter contre la maladie de Fabry. Néanmoins le prix de ces traitements est problématique (environ 250 000 \$ par an/patient) et reste un obstacle pour beaucoup¹⁶.

✓ **La réduction de substrat** : le but de cette thérapie est d'empêcher partiellement la production du ou des métabolites qui, par défaut génétique, ne sont pas recyclés par les cellules. Le principe de cette stratégie repose sur l'utilisation de petites molécules agissant comme inhibiteurs de la synthèse des métabolites non dégradés. Ce type de traitement permet ainsi de diminuer l'accumulation toxique du métabolite et l'engorgement des cellules. De plus, si la molécule inhibitrice est assez petite, elle pourrait traverser la barrière hémato-méningée pour un traitement des symptômes neurologiques de certaines maladies.

Les travaux dans ce domaine concernent la céramide glucosyltransférase. C'est une cible de choix car elle est indispensable pour la biosynthèse de tous les GSL (en vert Figure 9). Le concept qu'un inhibiteur de cette enzyme pourrait mener à une réduction de l'accumulation des GSL fut proposé en premier par Randin en 1996²². Depuis, ce traitement a été testé pour plusieurs maladies (Gaucher, Fabry, Pompe, ...). Il a montré que non seulement l'évolution de la maladie pouvait être stoppée, mais aussi qu'une rémission des symptômes neurologiques était possible²³. La céramide glucosyltransférase est actuellement la seule enzyme ciblée dans le cadre de cette stratégie.

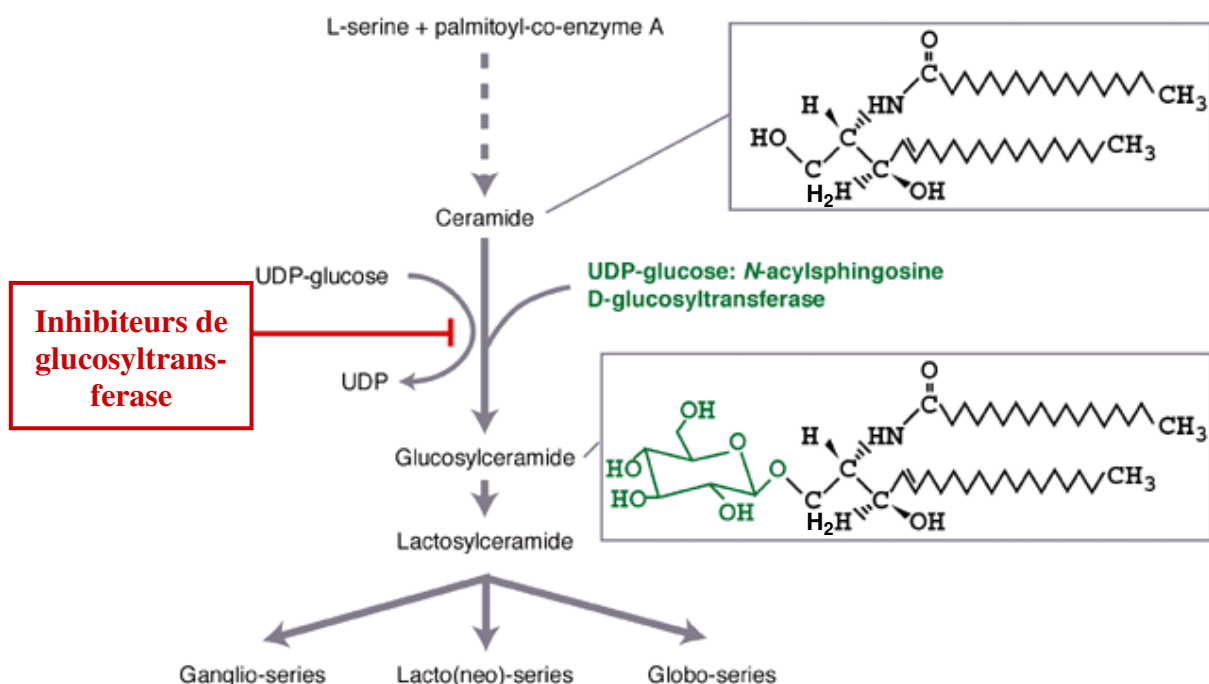


Figure 9 : Réduction de l'accumulation des GSL

¹⁶ Sawkar, A. R.; D'Haese, W.; Kelly, J. *Cell. Mol. Life Sci* **2006**, *63*, 1179.

²¹ Weinreb, N. J.; Charrow, J.; Andersson, H. C.; Kaplan, P.; Kolodny, E. H.; Mistry, P.; Pastores, G.; Rosenbloom, B. E.; Scott, C. R.; Wappner, R. S.; Zimran, A. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 112.

²² Randin N.S. *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 153-157

²³ Jakobkiewicz-Banecka, J.; Wegrzyn, A.; Wegrzyn, G. *J. Appl. Genet.* **2007**, *48*, 383.

Ce type de traitement présente malheureusement de nombreux effets secondaires (troubles gastro-intestinaux, tremblement, ...) et n'est proposé qu'en deuxième choix si l'enzymothérapie ne fonctionne pas²⁰. En effet, les GSL sont incorporés dans les membranes cellulaires et dans la structure de glycoprotéines, leur synthèse ne doit donc pas être entièrement bloquée. La réduction de leur quantité sur un traitement à long terme peut entraîner des complications²⁴.

Quel que soit la stratégie employée, les traitements, quand ils existent, sont très contraignants pour le patient. De plus, la liste des maladies lysosomales en attente de traitement reste encore trop longue. Cependant, d'après différents auteurs^{25,26,27}, une nouvelle stratégie, appelée **thérapie par molécule chaperonne** serait envisageable. Elle repose sur le principe d'une augmentation de l'activité enzymatique de la glycosidase lysosomale touchée par la mutation. Cette thérapie est assez prometteuse car elle offre la possibilité d'une simple médication par voie orale. De plus, pour certaines formes de maladies, un accès au cerveau serait possible car ces petites molécules thérapeutiques pourraient traverser la barrière hémato-méningée.

4.2. La stratégie par molécules chaperonnes

Au sein de nos cellules, un système de contrôle des protéines s'effectue au niveau du RE, de manière à ce que le bon fonctionnement des cellules soit maintenu. Ce système est exécuté par différentes molécules et enzymes de repliement (Figure 10, ovales rouges et losanges bleus). Les protéines adoptant la conformation correcte sont transportées en dehors du RE vers l'appareil de Golgi (a), tandis que les protéines mutées, mal repliées ou dénaturées, sont évacuées hors du RE (b). Elles seront alors dégradées au niveau des protéasomes du cytoplasme (complexe enzymatique de dégradation de protéines).

Chez un patient malade, la protéine affectée n'est pas reconnue comme structure stable au niveau du RE. Elle suit donc la voie (b) de dégradation, au lieu de poursuivre sa maturation et d'être véhiculée jusqu'au lysosome, où son activité devrait être exprimée. Dans le cas d'un traitement par augmentation d'activité enzymatique, le rôle des molécules chaperonnes (notées sur la Figure 10 ASSC pour « *active-site-specific chaperones* ») est de favoriser le repliement de l'enzyme et donc de stabiliser sa conformation dans le RE. Elle peut ensuite être dirigée normalement vers le lysosome (Figure 10, partie droite). Le processus naturel est ainsi rétabli²⁸.

²⁰ Beck, M. *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 1.

²⁴ Mellor, H. R.; Platt, F. M.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 307.

²⁵ Kolter, T.; Wendeler, M. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 260.

²⁶ Maegawa, G. H. B.; Tropak, M.; Buttner, J.; Stockley, T.; Kok, F.; Clarke, J. T. R.; Mahuran, D. J. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9150.

²⁷ Butters, T. D. *Expert Opin. Pharmacother.* **2007**, *8*, 427.

²⁸ Fan, J. Q. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355.

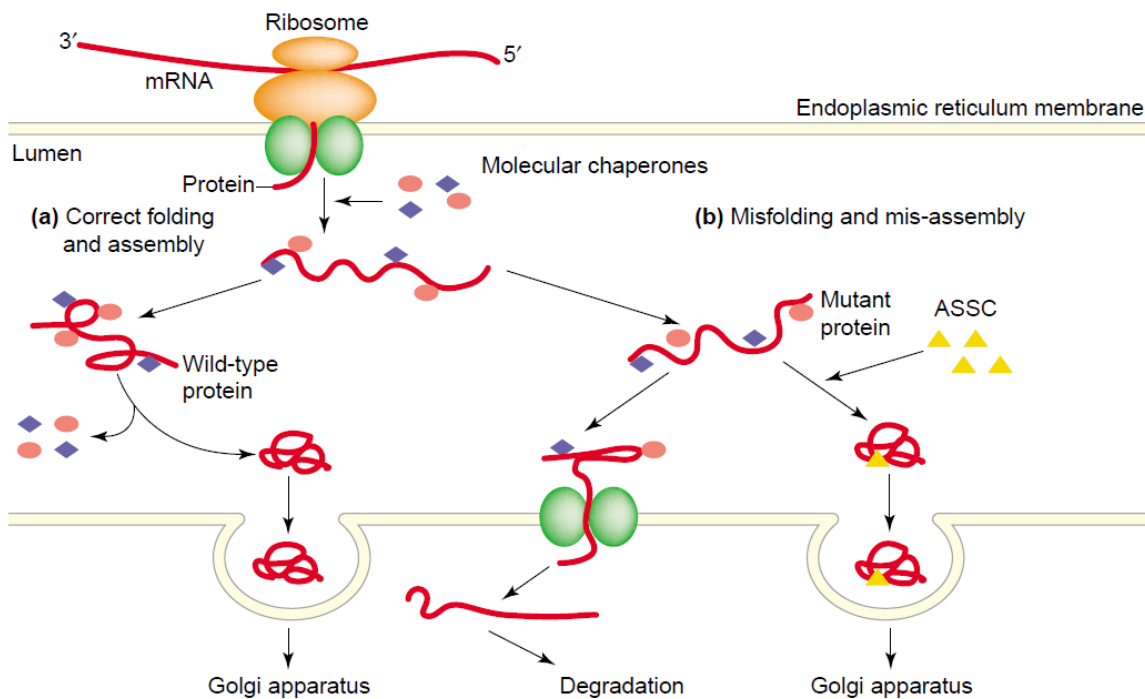


Figure 10 : Devenir des protéines au niveau du RE

Les petites molécules permettant d'obtenir cet effet chaperon se sont révélées être des inhibiteurs compétitifs réversibles de l'enzyme ciblée. Au pH neutre du RE, le complexe enzyme-inhibiteur EI est stable²⁹ et adopte la conformation requise. Il va suivre le chemin de maturation au niveau de l'appareil de Golgi, et atteindre le lysosome de pH acide. Au sein de celui-ci, l'enzyme est stable et active.

Les molécules chaperonnes sont utilisées à une concentration très faible, nettement en dessous du K_i (constante de dissociation du complexe EI). Par conséquent, arrivé au niveau du lysosome, le substrat prend la place de l'inhibiteur et l'enzyme, si la mutation n'affecte pas son site actif, peut remplir sa fonction catalytique normale. L'accumulation des métabolites est ainsi évitée.

IV. Les inhibiteurs de glycosidases lysosomales

Les inhibiteurs de glycosidases, qui ont été isolés ou synthétisés, ont souvent des structures mimant le substrat naturel de l'enzyme³⁰ ou l'état de transition. La plupart du temps les configurations des centres asymétriques sont identiques ou proches du substrat naturel.

Ce paragraphe se focalisera sur l'étude des inhibiteurs de glycosidases lysosomales.

²⁹ Lieberman, R. L.; D'Aquino, J. A.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochem.* **2009**, *48*, 4816.

³⁰ Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Asym.* **2000**, *11*, 1645.

Dans la littérature, on rencontre deux familles d'inhibiteurs de glycosidases actifs sur les enzymes du lysosome (Figure 11) :

- Les **pipéridines polyhydroxylées N-alkylées**, de type Zavesca®. Cette molécule a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2003 pour lutter contre la maladie de Gaucher selon la stratégie par réduction de substrat³¹,
- Les **aminocyclitols N-alkylés**³², tels la *N*-octylvaliénamine (NOV). Cet inhibiteur puissant de β -glucocérébrosidases a démontré une activité en tant que molécule chaperonne dans le traitement de la maladie de Gaucher.

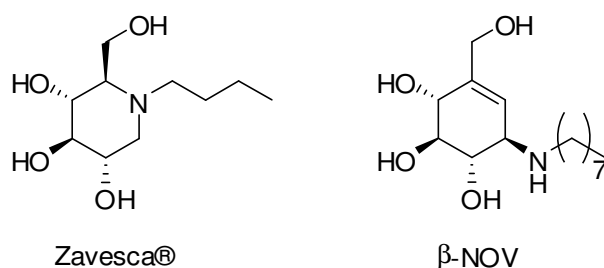


Figure 11 : Inhibiteurs d'hydrolases lysosomales

1. Les iminosucres

1.1. Présentation générale

Le remplacement du cycle oxygéné (pyranose, furanose) des structures monosaccharidiques par un cycle azoté (pipéridine, pyrrolidine) conduit à une classe de «glycomimétiques» particulièrement intéressante : les *iminosucres*. La découverte au Japon d'un tel analogue de sucre dans des extraits bactériens en 1966 (le 5-amino-5-désoxy-D-glucose **1**, dès lors appelé *nojirimycine*)³³, a été suivie quelques années plus tard par sa première synthèse par le Pr H. Paulsen³⁴.

Ce fut le point de départ de l'étude de cette vaste classe de produits. Ils peuvent aussi être considérés comme des alcaloïdes polyhydroxylés. Les iminosucres n'ont cependant déclenché un grand intérêt qu'à la suite de la mise en évidence par les chimistes de Bayer, en 1976, de leurs propriétés d'inhibiteurs de glycosidases. Depuis, ces composés très répandus dans la nature ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, et d'autres activités biologiques ont été mises en évidence, comme par exemple l'inhibition de glycosyltransférases³⁵.

³¹ Cox, T.; Lachmann, R.; Hollak, C.; Aerts, J.; van Weely, S.; Hrebicek, M.; Platt, F.; Butters, T.; Dwek, R.; Moyses, C.; Gow, I.; Elstein, D.; Zimran, A. *Lancet* **2000**, *355*, 1481.

³² Ogawa, S.; Kanto, M.; Suzuki, Y. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 679.

³³ Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 288.

³⁴ Paulsen, H.; Todt, K. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1968**, *23*, 115.

³⁵ Asano, N. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479.

Il est à noter que le terme « iminosucre » est utilisé de façon abusive : les seuls vrais iminosucres sont les composés apparentés à la nojirimycine. Cependant ils ne sont pas très stables et la grande majorité des travaux dans ce domaine ont été réalisés sur des 1-désoxy-iminosucres, comme par exemple la 1-désoxynojirimycine (**2**, DNJ)³⁶, composés stables mais qui sont en fait des iminoalditols (Figure 12).

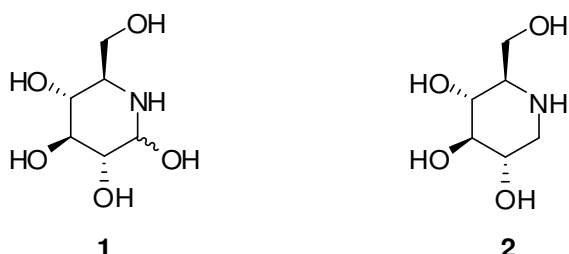
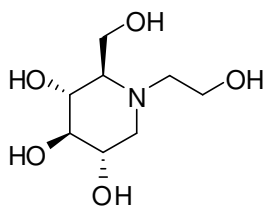


Figure 12 : Nojirimycine NJ et 1-désoxynojirimycine DNJ

Les activités biologiques variées des iminosucres sont principalement dues au fait que ces composés sont de puissants inhibiteurs de glycosidases : ils miment le substrat de ces enzymes, et, du fait de la protonation de la fonction amine dans les conditions de pH voisin de la neutralité, portent une charge positive qui entraîne une forte interaction avec les fonctions carboxylates du site actif. De plus, l'espèce chargée est un mime de l'intermédiaire oxocarbenium impliqué dans le mécanisme de l'hydrolyse³⁷.

Comme les glycosidases participent à un grand nombre de processus biologiques, la possibilité de développer des agents thérapeutiques à partir d'iminosucres a été rapidement reconnue. Ainsi, l'inhibition des glucosidases intestinales, responsables de la fragmentation des sucres alimentaires, offre un moyen de réguler l'absorption des sucres. Elle peut être utilisée pour traiter par voie orale les complications associées à un diabète de type 2. Dans ce but, les études de la société Bayer sur la DNJ et ses dérivés ont conduit à l'identification du Miglitol® (*N*-hydroxyéthyl DNJ) comme médicament permettant de traiter le diabète de type 2³⁸ (Figure 13).



Miglitol®

Diabète type II

Figure 13 : Le Miglitol®, un inhibiteur commercial de glycosidase

³⁶ Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Ito, T.; Niida, T. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125.

³⁷ Heightman, T. D.; Vasella, A. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750.

³⁸ Mitrakou, A.; Tountas, N.; Raptis, A.E.; Bauer, R.J.; Schulz, H.; Raptis, S.A. *Diabetic Med.* **1998**, *15*, 657

1.2. Inhibiteurs utilisés dans la thérapie par réduction de substrat

Etude de la maladie de Gaucher

Le deuxième dérivé d'iminosucre mis récemment sur le marché est la *N*-butyl DNJ (NB-DNJ), sous le nom de Zavesca^{® 31}. Ce composé est utile pour le traitement de la maladie de Gaucher, par le fait que c'est un inhibiteur de la glucosyltransférase³⁹. Son action sur d'autres maladies par une autre stratégie thérapeutique est en cours d'étude et sera présenté dans ce manuscrit par la suite.

En agissant en amont sur la glucosyltransférase, la NB-DNJ a un effet inhibiteur sur la première étape de la biosynthèse des GSL, ce qui limite la quantité de substrat devant être traitée par la glycosidase défaillante⁴⁰. Les tests cliniques sur de nombreux patients ont clairement mis en évidence l'amélioration des symptômes caractéristiques de la maladie et l'effet bénéfique du traitement à long terme, malgré des effets secondaires principalement liés à l'inhibition de glycosidases intestinales et à la diminution des GSL de l'organisme⁴¹.

Des études de relation structure-activité⁴² ont révélé que l'activité des *N*-alkyl DNJ augmente avec la longueur de la chaîne alkyle, mais en parallèle leur cytotoxicité aussi.

Les travaux de Butters⁴² ont montré que la NB-DNJ est un inhibiteur compétitif de la glucosyltransférase par rapport au céramide, et non par rapport à l'UDP-glucose. Ce résultat suggère que l'addition d'une deuxième chaîne alkyle sur la NB-DNJ devrait conduire à un meilleur mime du céramide. L'équipe du Pr Martin, en collaboration avec celle du Pr Butters, s'est alors attachée à la synthèse d'analogues dialkylés de la DNJ (Figure 14)⁴³. Cependant, les nouveaux produits obtenus se sont révélés être des inhibiteurs nettement moins performants que la NB-DNJ, et n'ont donc pas validé le concept de Butters. Les IC₅₀ (concentration de l'inhibiteur requise pour une inhibition à 50% *in vitro* de l'activité enzymatique) du *N*,1-*C*-dioctyl DNJ et du *N*,2-*O*-dioctyl DNJ sont en effet sept fois plus élevées que celle mesurée avec le *N*-butyl DNJ. Le positionnement de la chaîne en 1-*C* ou 2-*O* n'a quasiment pas d'influence.

³⁹ Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *100*, 4683.

⁴⁰ Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Glycobiology* **2005**, *15*, R43.

⁴¹ Elstein, D.; Hollak, C.; Aerts, J.; van Weely, S.; Maas, M.; Cox, T. M.; Lachmann, R. H.; Hrebicek, M.; Platt, F. M.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Zimran, A. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2004**, *27*, 757.

⁴² Butters, T. D.; van den Broek, L.; Fleet, G. W. J.; Krulle, T. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Tetrahedron Asym.* **2000**, *11*, 113.

⁴³ Boucheron, C.; Desvergnès, V.; Compain, P.; Martin, O. R.; Lavi, A.; Mackeen, M.; Wormald, M.; Dwek, R.; Butters, T. D. *Tetrahedron Asym.* **2005**, *16*, 1747.

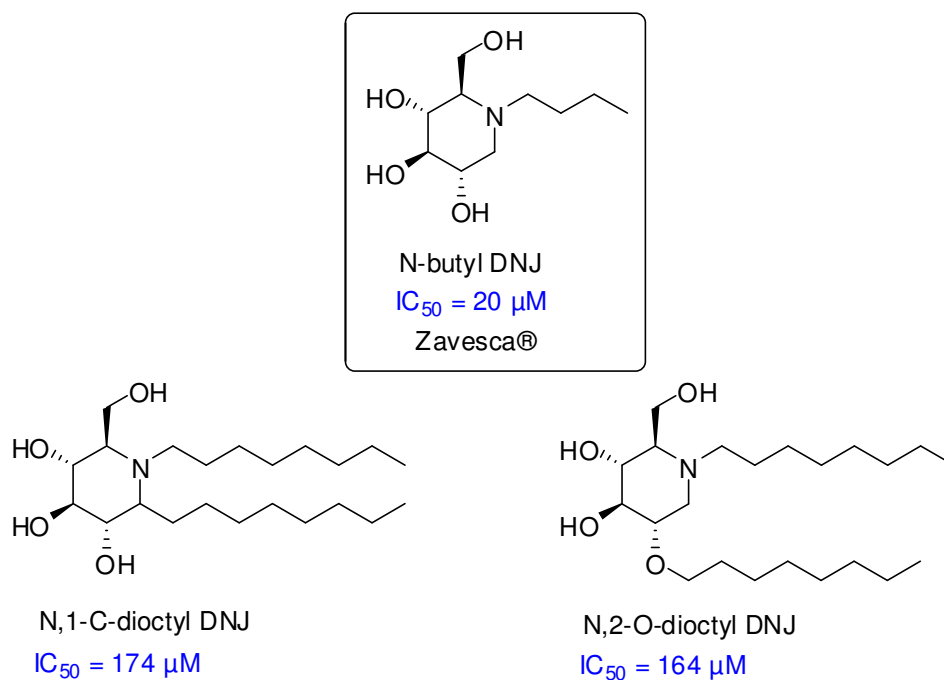


Figure 14 : Activité du Zavesca® et produits analogues

Ces résultats peuvent être expliqués par l'orientation relative des deux chaînes alkyles sur le squelette de la pipéridine. Leur conformation la plus favorable en solution correspond à un positionnement éloigné des deux chaînes, contrairement au céramide dont les chaînes alkyles sont parallèles. Il apparaît donc qu'en dépit de la flexibilité des substituants alkyles, les deux chaînes carbonées n'adoptent pas facilement une conformation proche du céramide⁴³. Des études sont toujours en cours afin de synthétiser de nouveaux analogues du Zavesca® présentant des activités inhibitrices augmentées vis-à-vis de la glucosyltransférase⁴⁴.

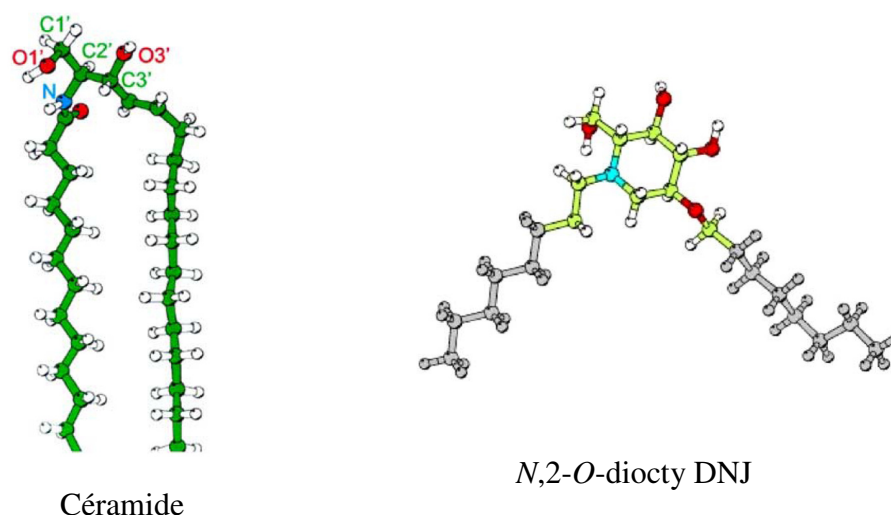


Figure 15 : Comparaison de la conformation du céramide à celle du *N,2-O*-dioctyl DNJ

⁴³ Boucheron, C.; Desvergnès, V.; Compain, P.; Martin, O. R.; Lavi, A.; Mackeen, M.; Wormald, M.; Dwek, R.; Butters, T. D. *Tetrahedron Asym.* **2005**, *16*, 1747.

⁴⁴ Martin, O. *Ann. Pharm. Fr.* **2007**, *65*, 5.

1.3. Inhibiteurs utilisés dans la stratégie par molécules chaperonnes

L'idée d'une stratégie par molécules chaperonnes utilisant les iminosucres est apparue lors de travaux sur des α -galactosidases lysosomales mutantes, impliquées dans la maladie de Fabry. Ces travaux ont montré qu'elles conservaient une activité proche de celle de l'enzyme normale, mais qu'elles étaient détruites pour cause d'instabilité au niveau du RE¹⁹. La recherche d'inhibiteurs comme molécules chaperonnes a donc commencé pour le traitement de cette maladie, rapidement suivi de travaux concernant le traitement de la maladie de Gaucher beaucoup plus représentée.

a) Etude de la maladie de Fabry

La 1-désoxygalactonojirimycine (DGJ, Figure 16) est un inhibiteur compétitif puissant de l' α -galactosidase (α -Gal-A) impliquée dans la maladie de Fabry ($IC_{50} = 4.7$ nM *in vitro*). Les travaux de J.-Q. Fan, en collaboration avec l'équipe du Pr Asano, ont mis en évidence un phénomène remarquable en travaillant sur des lymphoblastes de patients atteints de cette maladie⁴⁵. Lorsqu'elle est administrée à de faibles concentrations, insuffisantes pour provoquer l'inhibition de l'enzyme dans la cellule, la DGJ est capable d'augmenter l'activité de l' α -Gal-A mutante par un facteur de sept à huit après cinq jours d'incubation. L'effet dépend de la dose à des concentrations non-inhibitrices. L'enzyme mutante est transportée efficacement vers le lysosome dans les cellules traitées avec ce produit. Ces résultats suggèrent que l'iminosucre joue le rôle d'un chaperon moléculaire²⁸.

Le graphique ci-dessous (Figure 16) montre que son association avec l'enzyme mutante stabilise la structure tridimensionnelle de la protéine. La dénaturation thermique de ce complexe EI s'effectue en effet à des températures supérieures à celle de l'enzyme seule²⁹. Cette stabilisation est notamment observée au pH neutre du RE, ce qui limite la dégradation de l'enzyme *in vivo*⁴⁶. Ce composé est en développement sous le nom d'AmigalTM, au stade des essais cliniques de phase III.

¹⁹ Ishii, S.; Kase, R.; Sakuraba, H.; Suzuki, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *197*, 1585.

⁴⁵ Asano, N.; Ishii, S.; Kizu, H.; Ikeda, K.; Yasuda, K.; Kato, A.; Martin, O. R.; Fan, J. Q. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4179.

²⁸ Fan, J. Q. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355.

²⁹ Lieberman, R. L.; D'Aquino, J. A.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochem.* **2009**, *48*, 4816.

⁴⁶ Khanna, R.; Soska, R.; Lun, Y.; Feng, J.; Frascella, M.; Young, B.; Brignol, N.; Pellegrino, L.; Sitaraman, S. A.; Desnick, R. J.; Benjamin, E. R.; Lockhart, D. J.; Valenzano, K. J. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 23.

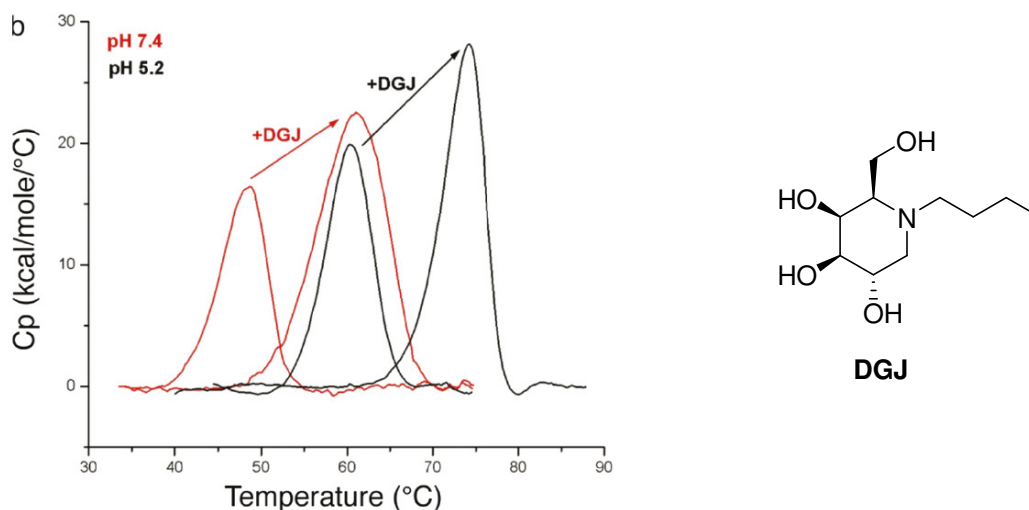


Figure 16 : Dénaturation thermique de l'α-Gal-A après addition de DGJ à différents pH

b) Recherche de molécules chaperonnes pour la maladie de Gaucher

■ *DNJ et analogues*

La recherche de chaperons moléculaires pour la β-glucocérébrosidase (β-GCase) fait aussi l'objet d'études approfondies, avec l'objectif de développer un traitement spécifique pour la maladie de Gaucher. Les travaux de Sawkar *et al.*⁴⁷ ont révélé que la *N*-nonyl-DNJ (NN-DNJ), un inhibiteur puissant de cette β-glucosidase, était capable de doubler l'activité résiduelle de l'enzyme mutante dans des fibroblastes de malades.

Cette augmentation de l'activité, même si elle paraît faible, est significative car des essais cliniques ont montré qu'une petite augmentation de l'activité de l'enzyme était suffisante pour diminuer les symptômes de façon notable.

En s'appuyant sur ces premiers résultats, l'équipe du Pr Martin a alors développé d'autres très bons inhibiteurs de la β-GCase humaine⁴⁴. Par exemple, les α-1-*C*-octyl ou α-1-*C*-nonyl-DNJ (CO-DNJ et CN-DNJ) sont des inhibiteurs aussi puissants de cette β-glucosidase que la NN-DNJ. Mais contrairement au dérivé *N*-alkylé, ils n'ont pas d'effet néfaste sur les α-glucosidases lysosomales⁴⁸. Un exemple de comparaison des effets d'un *C*-alkyle DNJ et d'un *N*-alkyle DNJ est donné Figure 17. Ces résultats font de ces composés des têtes de série de grand intérêt pour un futur développement comme agent thérapeutique⁴⁹.

⁴⁴ Martin, O. *Ann. Pharm. Fr.* **2007**, 65, 5.

⁴⁷ Sawkar, A. R.; Cheng, W. C.; Beutler, E.; Wong, C. H.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 15428.

⁴⁸ Yu, L.; Ikeda, K.; Kato, A.; Adachi, I.; Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7736.

⁴⁹ Martin, O. R.; Compain, P.; Boucheron, C.; Asano, N. Demande de brevet français N° 0506382, 23 juin **2005**.

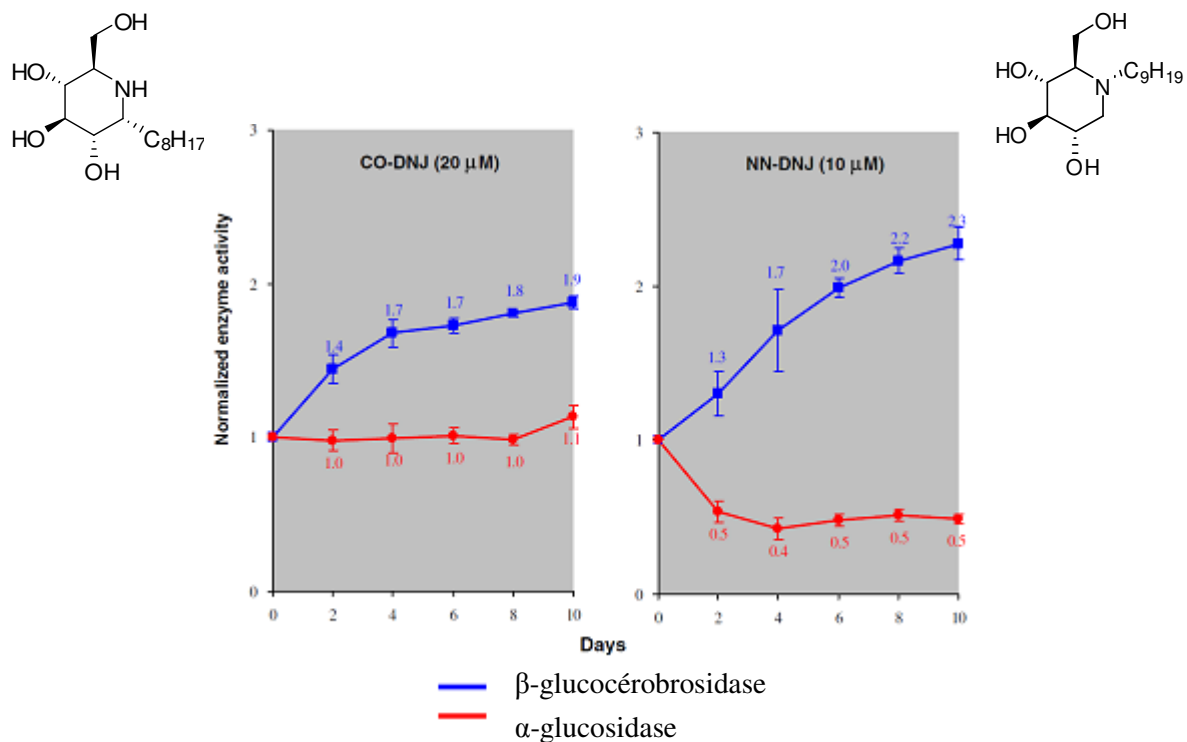


Figure 17 : Activité des α et β -glucosidases dans des fibroblastes présentant la mutation de Gaucher, après traitement à la CO-DNJ et NN-DNJ

- *L'isofagomine*

Les travaux de Fan *et al.* ont mis en évidence, lors de criblage de différents alcaloïdes, un iminosucre agissant comme molécule chaperonne dans le cas de la maladie de Gaucher : la D-isofagomine D-IFG⁵⁰. Ce composé se lie au site actif du mutant de la GCase N370S et en stabilise la structure²⁹, comme indiqué sur la Figure 18 ci-après (dénaturation du complexe EI à des températures supérieures à celles observées pour l'enzyme E seule).

Son efficacité maximum se situe pour des concentrations entre 10 et 50 μM, ce qui permet d'envisager la mise en place d'un traitement sur longue durée. Après avoir présenté de bons résultats lors de la phase clinique II fin 2009, *Amicus Therapeutics* poursuit actuellement les essais cliniques en phase III pour ce composé baptisé Plicera.

²⁹ Lieberman, R. L.; D'Aquino, J. A.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochem.* **2009**, *48*, 4816.

⁵⁰ Chang, H. H.; Asano, N.; Ishii, S.; Ichikawa, Y.; Fan, J. Q. *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082.

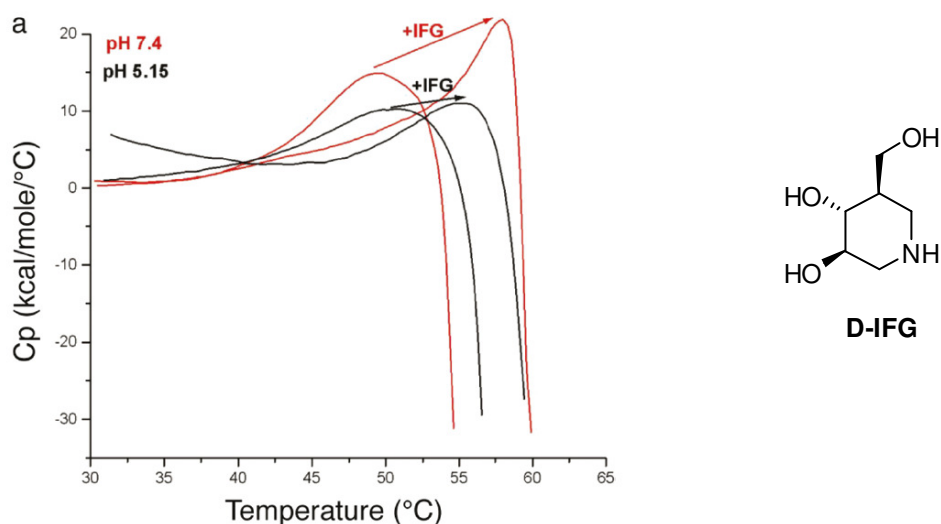


Figure 18 : Dénaturation thermique de la GCCase après addition de D-IFG à différents pH

c) Travaux pour les maladies G_{M2} -gangliosidoses

D'autres maladies sont à l'étude pour un traitement par augmentation d'activité enzymatique. Ces travaux concernent notamment les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff dues à une déficience de la β -hexosaminidase A (Hex-A). Cette déficience entraîne une accumulation dans le lysosome de gangliosides G_{M2} et G_{A2} . Sur les patients adultes atteints de ces maladies, on observe une activité enzymatique résiduelle d'environ 5%, alors qu'une activité de seulement 10% permet à un individu de rester en bonne santé⁵¹. De plus, pour ces maladies, les mutations mises en évidence ne touchent pas le site actif des enzymes.

Aussi, différents iminosucres et sucres portant une fonction amine sont à l'étude en tant qu'inhibiteurs d'hexosaminidases et molécules chaperonnes⁵². Leur sélection s'appuie sur la connaissance du mécanisme d'hydrolyse des Hex-A (Figure 19) : un complexe se forme entre un résidu glutamate et un résidu *N*-acétylgalactosamine du ganglioside G_{M2} , formant ainsi un ion oxazolium cyclique intermédiaire. Dans ce cas, le résidu aspartate du site actif n'est pas nécessaire au mécanisme d'hydrolyse car c'est le groupement *N*-acétyl qui attaque le carbone anomérique du saccharide.

Une attention toute particulière a été portée sur le *N*-Acétyl-glucosamine-thiazoline NGT (Figure 20), molécule stable qui mime l'état de transition. Le NGT s'est en effet montré être un inhibiteur très spécifique des Hex-A ($K_i = 280$ nM).

⁵¹ Conzelmann, E.; Sandhoff, K. *Dev. Neurosci.* **1984**, *6*, 58.

⁵² Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z. N.; Kirk, B.; Lou, J. P.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804.

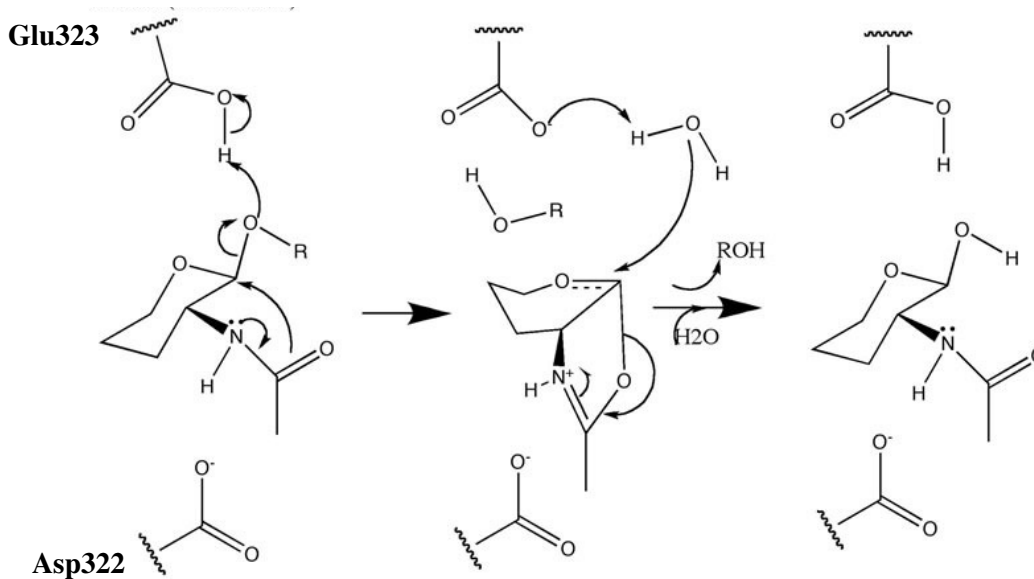


Figure 19 : mécanisme d'hydrolyse des Hex-A

Il a par la suite été démontré, sur des cellules fibroblastes traitées par NGT, qu'une augmentation d'activité des Hex-A était visible au niveau des lysosomes (Figure 20), prouvant ainsi l'effet chaperon de ce composé. D'une activité résiduelle de 8,6 % des Hex-A présentes chez une cellule atteinte, une augmentation jusqu'à 37 % d'activité a pu être observée⁵³, pourcentage bien au-dessus duquel un patient devient asymptotique.

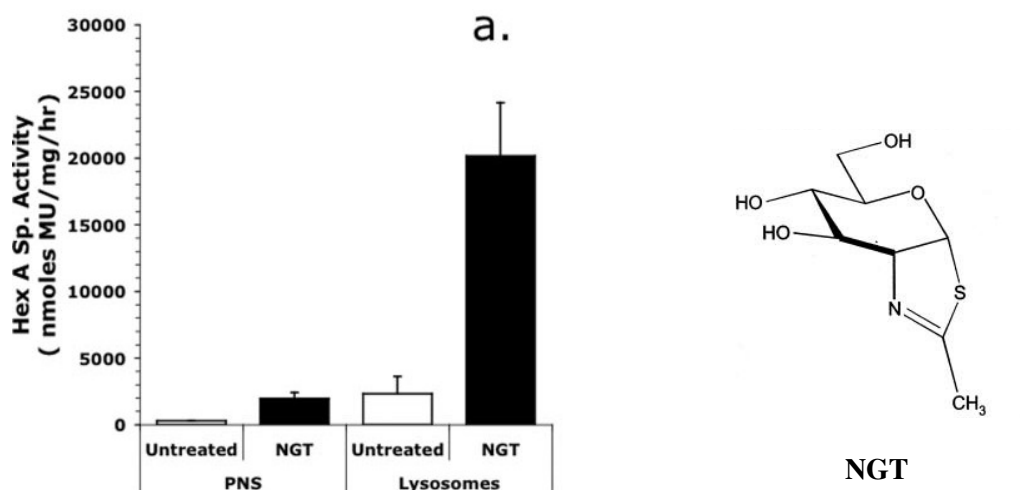


Figure 20 Comparaison de l'activité des Hex-A dans le surnageant postnucléaire (PNS) et une fraction enrichie en lysosome de fibroblastes malades, traités par NGT ou non

Plus récemment, un composé nouvellement synthétisé par l'équipe du Pr Butters, le 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galacto-nojirimycin (DGJ-NAc, Figure 21)⁵⁴, s'est révélé comme

⁵³ Tropak, M. B.; Reid, S. P.; Guiral, M.; Withers, S. G.; Mahuran, D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13478.

⁵⁴ Best, D.; Chairatana, P.; Glawar, A. F. G.; Crabtree, E.; Butters, T. D.; Wilson, F. X.; Yu, C. Y.; Wang, W. B.; Jia, Y. M.; Adachi, I.; Kato, A.; Fleet, G. W. *J. Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2222.

très bon inhibiteur compétitif d'hexaminidases. L'ensemble des tests, visant à montrer une activité en tant que molécule chaperonne pour le traitement des maladies de Tay-Sachs et Sandhoff, reste cependant à faire.

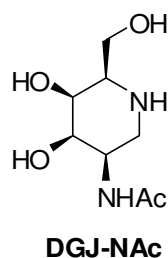


Figure 21 : Structure de la DGJ-NAc

d) Recherche de traitement pour la maladie de Pompe

La molécule NB-DNJ, déjà commercialisée pour la maladie de Gaucher (Zavesca ®, *cf paragraphe précédent*), a été reprise pour le traitement de la maladie de Pompe, qui touche les α -glucosidases lysosomales. En effet, un traitement oral utilisant ce composé associé à un traitement par enzyme substitutive a été récemment mis à l'étude sur des souris modèles. Il a montré une augmentation d'activité de la protéine mutante au niveau des lysosomes supérieure à celle observée dans le cadre d'un simple traitement par enzyme substitutive⁵⁵.

La DNJ, aussi testée sur cette maladie en tant que molécule chaperonne, a également montré son efficacité sur 16 mutants d' α -glucosidases impliqués dans la maladie⁵⁶. En juin 2008, l'entreprise *Amicus Therapeutics* annonçait le lancement des essais cliniques phase II pour la DNJ dans le traitement de la maladie de Pompe³⁵.

2. Les aminocyclitols

Des structures de types aminocyclitols *N*-alkylé ont aussi été développées dans le cadre de la stratégie par molécules chaperonnes. Ces inhibiteurs potentiels s'inspirent de la structure de la valioline, excellent inhibiteur naturel d' α -glycosidases, comme la maltase ($IC_{50} = 2,2 \mu M$) et la saccharase ($IC_{50} = 0,049 \mu M$) intestinales.

Les travaux décrits ci-après visent à :

- améliorer les traitements déjà existants, notamment ceux de la maladie de Gaucher qui présentent certains effets secondaires,

³⁵ Asano, N. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479.

⁵⁵ Porto, C.; Cardone, M.; Fontana, F.; Rossi, B.; Tuzzi, M. R.; Tarallo, A.; Barone, M. V.; Andria, G.; Parenti, G. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 964.

⁵⁶ Flanagan, J. J.; Rossi, B.; Tang, K.; Wu, X. Y.; Mascioli, K.; Donaudy, F.; Tuzzi, M. R.; Fontana, F.; Cubellis, M. V.; Porto, C.; Benjamin, E.; Lockhart, D. J.; Valenzano, K. J.; Andria, G.; Parenti, G.; Do, H. V. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, 1683.

- cibler d'autres maladies génétiques, telles que la maladie de Morquio B et la G_{M1} -gangliosidose, qui affectent l'enzyme lysosomale β -galactosidase.

2.1. Deux molécules de référence, NOV et NOEV

L'une des premières molécules de type aminocyclitol ayant donné de bons résultats d'inhibition de glycosidases lysosomales est la *N*-octylvaliénamine (*N*-octyl-[(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)]-1-amino-5-(hydroxyméthyl)cyclohex-5-ène-2,3,4-triol], **NOV**), inhibiteur puissant de β -glucocérébrosidases (β -GCCase, $IC_{50} = 0,03 \mu M$). (Figure 22)

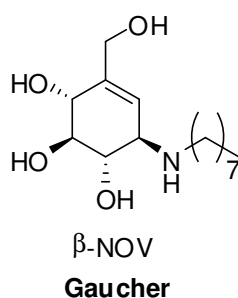


Figure 22 : Structure de la β -NOV et maladie lysosomale ciblée

En 2007, son effet chaperon a été mis en évidence sur quatre β -GCCase mutées associées à la maladie de Gaucher de type I, lors d'essais sur cellules entières⁵⁷. Dans ces quatre cas (marqués d'une étoile sur la Figure 23) une augmentation de l'activité enzymatique après traitement au NOV a été observée, avec un effet maximum pour une concentration en NOV de $10 \mu M$. Aucun effet sur la β -GCCase non mutée n'a été relevé. Les activités sont données en pourcentage par rapport à l'activité de la β -GCCase naturelle en l'absence de NOV.

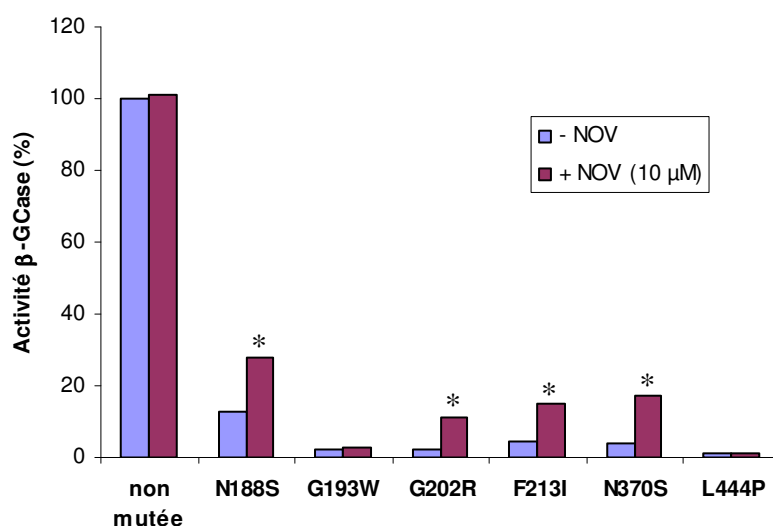


Figure 23 : Mesure de l'activité en β -GCCase de mutants avant et après traitement en NOV

⁵⁷ Lei, K.; Ninomiya, H.; Suzuki, M.; Inoue, T.; Sawa, M.; Iida, M.; Ida, H.; Eto, Y.; Ogawa, S.; Ohno, K.; Suzuki, Y. *BBA – Mol. Basis Dis.* **2007**, 1772, 587.

Plus récemment encore, l'effet chaperon de NOV fut démontré sur le mutant de β -GCase T369M correspondant à la maladie de Gaucher de type II et III⁵⁸.

Les effets de ce composé ont été comparés *in vitro* à ceux du médicament Zavesca® (NB-DNJ). De manière non surprenante, la réponse des cellules après traitement avec NOV est similaire à celle des cellules traitées par NB-DNJ, la structure de ces composés étant dans les deux cas un mime du substrat naturel de l'enzyme défaillante. Cependant, NOV semblerait être efficace à des concentrations inférieures à celles de NB-DNJ. Des études supplémentaires *in vivo* sont à poursuivre pour confirmer ce point.

Par analogie, l'épimère en C4 du composé NOV, la *N*-octyl-4-epi- β -valiénamine (NOEV), de configuration β -galacto, a été synthétisé dans le but d'obtenir un inhibiteur de β -galactocérébrosidases (Figure 24, maladie de Krabbe ciblée). Malheureusement, les tests biologiques de cette molécule sur des cellules de souris ont montré une activité inhibitrice relativement faible ($IC_{50} = 5.0 \mu M$) vis-à-vis de la β -galactocérébrosidase naturelle. Plus encourageant, une étude sur des cellules humaines a révélé une bonne inhibition sur la β -galactosidase ($IC_{50} = 0.3 \mu M$)⁵⁹.

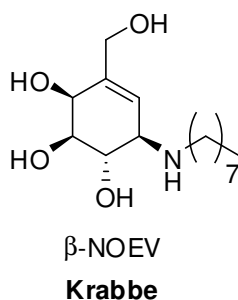


Figure 24 : Structure de la β -NOEV et maladie lysosomale ciblée

Des travaux plus poussés *in vivo* pour évaluer l'efficacité de cet analogue en tant que molécule chaperonne sur des β -galactosidases ont alors été menés. Il était en effet important de voir si ce composé est capable de traverser la barrière hémato-méningée car les maladies lysosomales ciblées présentent des effets sur le système nerveux central.

Son efficacité a été démontrée après administration du composé par voie orale à des souris malades, à des concentrations intracellulaires très faibles ($0,2 \mu M$). Il est à noter notamment une restauration d'activité des G_{M1} et G_{A1} gangliosidases dans le cerveau des

⁵⁸ Luan, Z.; Li, L. J.; Ninomiya, H.; Ohno, K.; Ogawa, S.; Kubo, T.; Iida, M.; Suzuki, Y. *Blood Cells Mol. Dis.* **2010**, *44*, 48.

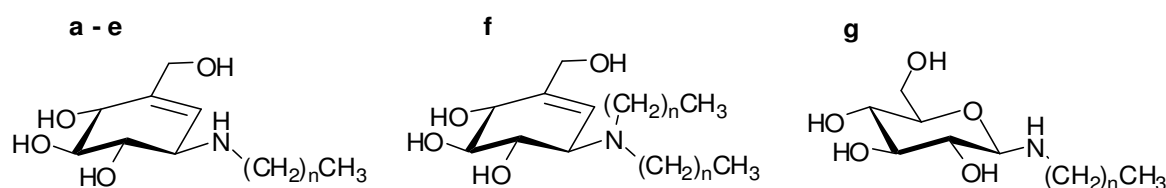
⁵⁹ Ogawa, S.; Matsunaga, Y. K.; Suzuki, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1967.

animaux, laissant ainsi de grands espoirs quant à un traitement futur des maladies de Morquio et de G_{M1}-gangliosidose⁶⁰.

2.2. Les *N*-Alkyl-valiénamines dans la stratégie par molécules chaperonnes

L'ensemble des molécules à effet chaperon décrit jusqu'alors sont des inhibiteurs des enzymes ciblées⁶¹. Aussi, l'hypothèse « la meilleure molécule chaperonne correspond au meilleur inhibiteur » est posée comme un postulat stipulant que l'activité d'une molécule chaperonne dépend de son affinité pour l'enzyme mutante.

En s'appuyant sur ce principe, K. Lei *et al.* ont développé plusieurs *N*-alkyl- β -valiénamines, inhibiteurs potentiels de β -glucocérébrosidases, dans le but de trouver de nouvelles molécules chaperonnes⁵⁷. Les molécules **a-e** répertoriées dans la Figure 25 sont composées d'une seule chaîne alkyle de longueur variable, tandis que le composé **f** contient une double chaîne alkyle. Le composé **g** comporte un squelette glucopyranosyle à la place d'une structure valiénamine, mais fut inclus en tant que contrôle négatif.



	n	composé	IC ₅₀ (μ M)	inhibition
a	3	<i>N</i> -butyl- β -valiénamine	> 10	-
b	7	<i>N</i> -octyl- β -valiénamine	0,502	+
c	11	<i>N</i> -dodécyl- β -valiénamine	0,085	++
d	13	<i>N</i> -tétradécyl- β -valiénamine	0,093	++
e	17	<i>N</i> -octadécyl- β -valiénamine	0,442	+
f	7 x 2	<i>N,N</i> -octyl- β -valiénamine	0,003	+++
g	7	octyl- β -glucopyranosylamine	> 10	-

Figure 25 : Etude du lien structure/activité de *N*-alkyl- β -valiénamines

⁶⁰ (a) Matsuda, J.; Suzuki, O.; Oshima, A.; Yamamoto, Y.; Noguchi, A.; Takimoto, K.; Itoh, M.; Matsuzaki, Y.; Yasuda, Y.; Ogawa, S.; Sakata, Y.; Nanba, E.; Higaki, K.; Ogawa, Y.; Tominaga, L.; Ohno, K.; Iwasaki, H.; Watanabe, H.; Brady, R. O.; Suzuki, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 15912 ; (b) Suzuki, Y.; Ichinomiya, S.; Kurosawa, M.; Ohkubo, M.; Watanabe, H.; Iwasaki, H.; Matsuda, J.; Noguchi, Y.; Takimoto, K.; Itoh, M.; Tabe, M.; Iida, M.; Kubo, T.; Ogawa, S.; Nanba, E.; Higaki, K.; Ohno, K.; Brady, R. O. *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 671.

⁶¹ Cohen, F. E.; Kelly, J. W. *Nature* **2003**, *426*, 905.

⁵⁷ Lei, K.; Ninomiya, H.; Suzuki, M.; Inoue, T.; Sawa, M.; Iida, M.; Ida, H.; Eto, Y.; Ogawa, S.; Ohno, K.; Suzuki, Y. *BBA – Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 587.

Les tests d'inhibition *in vitro* sur fibroblastes humains ont révélé que le composé **f**, avec une double chaîne alkyle, était le meilleur inhibiteur du groupe. Il correspond en effet à un très bon mime du céramide. Les résultats nous suggèrent aussi que la présence d'une chaîne alkyle de longueur appropriée (entre 8 et 14 carbones) est nécessaire pour une meilleure action de ces composés sur les β -GCases.

Il serait important de poursuivre ces travaux par des mesures d'activité enzymatique *in vivo* pour valider le postulat cité ci-dessus. Ces mesures d'activité doivent être faites pour chaque composé à des concentrations différentes, dépendante de leur constante d'inhibition. Il faut en effet rappeler que ces inhibiteurs ne peuvent tenir le rôle de molécules chaperonnes que s'ils sont utilisés à des concentrations nettement en dessous de leur K_i .

Chap 2 : Synthèse des aminocyclitols

I. Présentation générale

D'un point de vue structural, les aminocyclitols sont des cycloalcanes contenant au moins une fonction amine primaire ou secondaire, ainsi que trois groupements hydroxyles supplémentaires portés par le cycle. Selon le nombre de carbones du cycle, on parle d'aminocyclopentitols (5 C), d'aminocyclohexitols (6 C), etc. Les aminocyclohexitols étant de loin les plus représentés, il n'est pas rare de voir utiliser abusivement le terme d'« aminocyclitols » pour ce groupe. Cette partie bibliographique se limitera d'ailleurs à cette famille de composés.

Les aminocyclitols naturels sont des métabolites secondaires de microorganismes, que l'on retrouve comme sous-unités de complexes comme les validamycines, une famille d'antibiotiques isolés de la fermentation de la levure *Streptomyces hygroscopicus*⁶². Une validamycine est composée d'une unité valiénamine associée diversement à une unité validamine, valioline ou hydroxyvalidamine (Figure 26 : les substituants R peuvent être des hydrogènes, des groupements hydroxyles, ou encore des hexoses reliés à la structure de base par des liaisons glycosidiques).

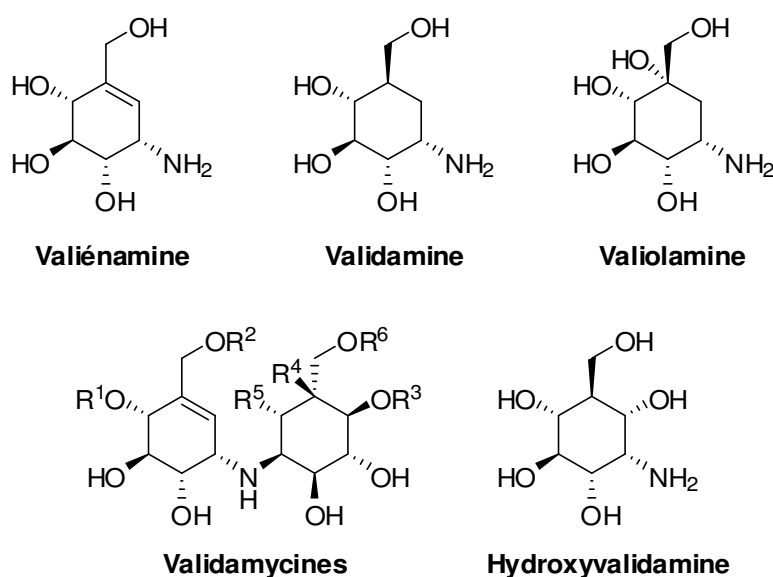


Figure 26 : Aminocyclitols isolés de source naturelle

Ces molécules naturelles présentent d'intéressantes propriétés thérapeutiques, notamment grâce à leur action d'inhibiteur de glycosidases. Elles sont également couramment utilisées comme antibiotiques⁶³.

⁶² Chen, X. L.; Fan, Y. X.; Zheng, Y. U.; Shen, Y. C. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955.

⁶³ Diaz, L.; Delgado, A. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2393.

En 1944 est par exemple découverte la streptomycine, le premier antibiotique efficace contre la tuberculose. Elle a été isolée à partir de la souche bactérienne *Streptomyces griseus*.

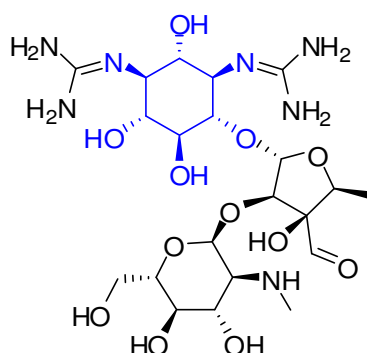


Figure 27 : Structure de la streptomycine

C'est aussi le premier membre d'une large classe de composés à avoir été découvert : la famille des aminoglycosides⁶⁴. Leur structure générale consiste en un aminocyclitol comme corps central, relié à un ou plusieurs aminosucres par liaison glycosidique. Les aminocyclitols les plus représentés dans la structure de ce type de composés sont la streptamine, la 2-désoxystreptamine et la 2,5-didésoxystreptamine (Figure 28). Ils sont porteurs de deux groupements amines.

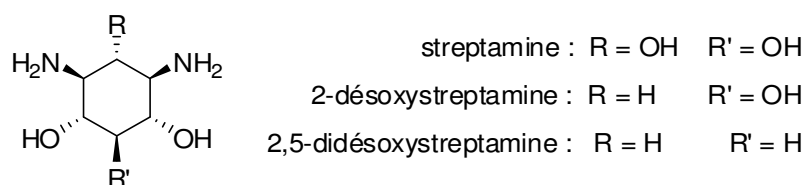


Figure 28 : Structure de base de la plupart des aminoglycosides

Face à l'augmentation du phénomène de résistance aux antibiotiques, ainsi qu'au potentiel thérapeutique des inhibiteurs de glycosidases, la conception de structures de type aminocyclitol aux propriétés biologiques améliorées est devenue un axe majeur de recherche⁶⁵. La partie qui suit sera une brève présentation des dernières méthodes de synthèse de cette famille de molécules décrites dans la littérature.

⁶⁴ Harrison, T; R. *Principes de médecine interne* **2002**, Flammarion Médecine-Sciences

⁶⁵ Delgado, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 3893-3906.

II. Méthodes chimiques de synthèse des aminocyclitols

Deux grandes stratégies de synthèse chimique des aminocyclitols sont présentes dans la littérature :

- ✓ Par modification d'un carbocycle déjà formé,
- ✓ Par cyclisation intramoléculaire de synthons linéaires.

Quelque soit la stratégie employée, la plupart de ces synthèses s'appuie sur des produits de départ chiraux, de manière à obtenir des produits finaux optiquement purs.

1. Synthèses à partir de produits possédant un carbocycle

➤ Plusieurs composés naturels, présentant dans leur structure un squelette cyclohexane polyhydroxylé, ont fréquemment été utilisés comme produit de départ dans la synthèse d'aminocyclitols.

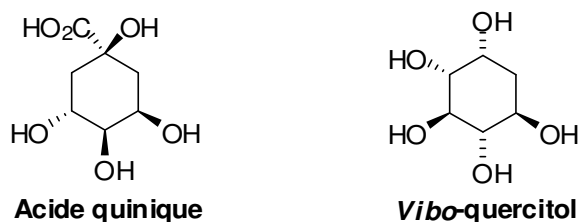


Figure 29 : Produits naturels au squelette polyhydroxy-cyclohexane

On retrouve notamment dans la littérature plusieurs exemples de synthèses à partir de l'acide quinique (Figure 29), extrait de l'écorce d'arbre *Cinchona*.

L'équipe de Shing a publié en 1995 la synthèse de la validamine à partir de ce composé (15 étapes, 5 % de rendement global)⁶⁶. L'étape clé de cette synthèse est une ouverture régiosélective du sulfate cyclique **3** par l'azoture de lithium, suivie d'une inversion de configuration en remplaçant l'hydroxyle du composé **4** par un triflate pour obtenir un bon groupe partant (Figure 30).

⁶⁶ Shing, T. K. M.; Tai, V. W. F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5332.

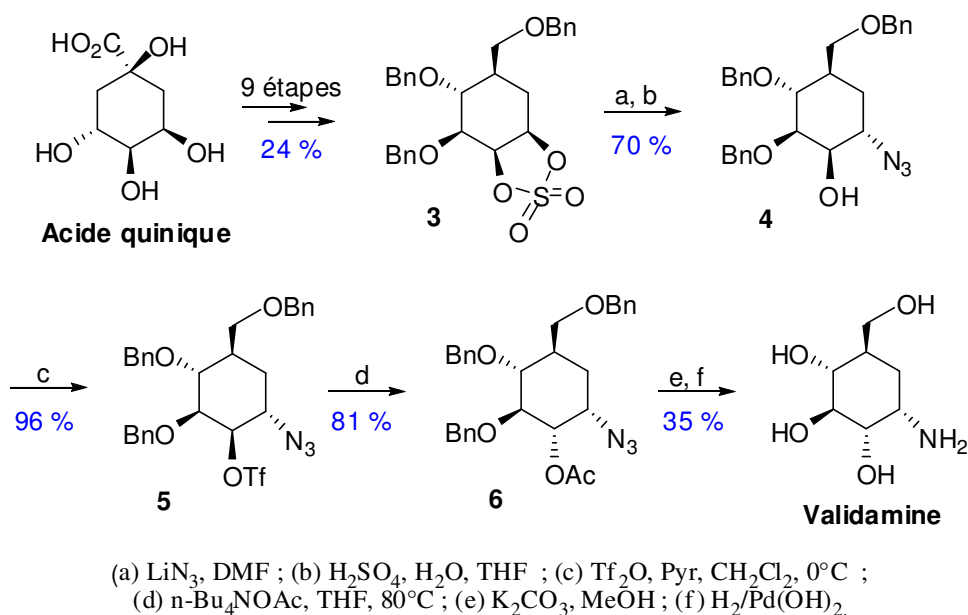


Figure 30 : Synthèse de la validamine à partir d'acide quinique

En 1996, cette équipe a également publié la synthèse de la valioline à partir d'acide quinique⁶⁷ (14 étapes, 15 % de rendement global). La double liaison du composé **7** est dihydroxylée, puis les alcools protégés. L'amine est introduite par $\text{S}_{\text{N}}2$ et réduction du groupe azido après une série de protection-déprotection. (Figure 31)

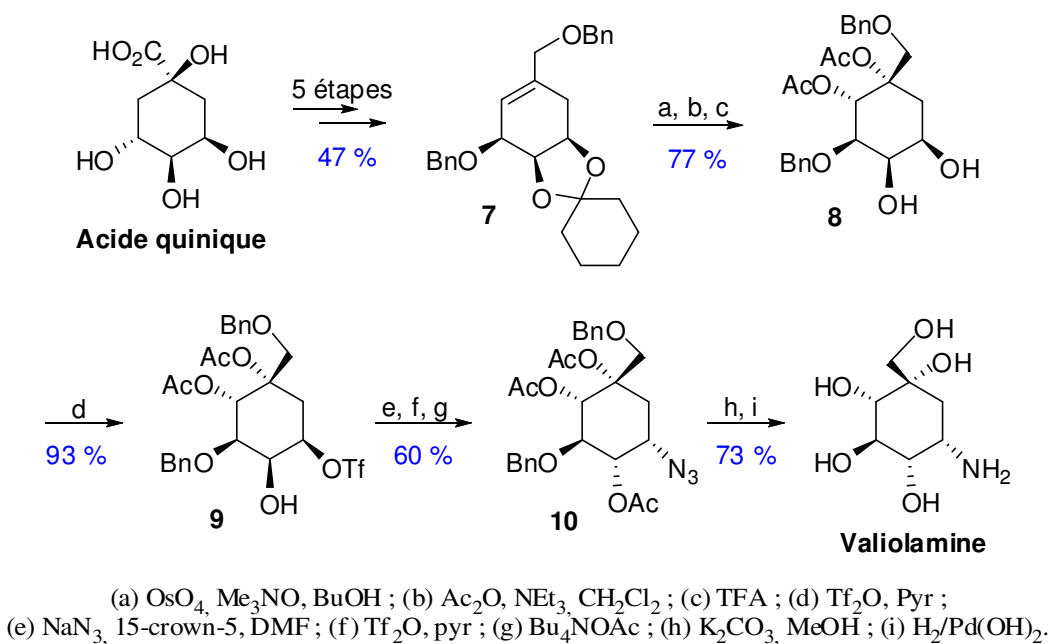
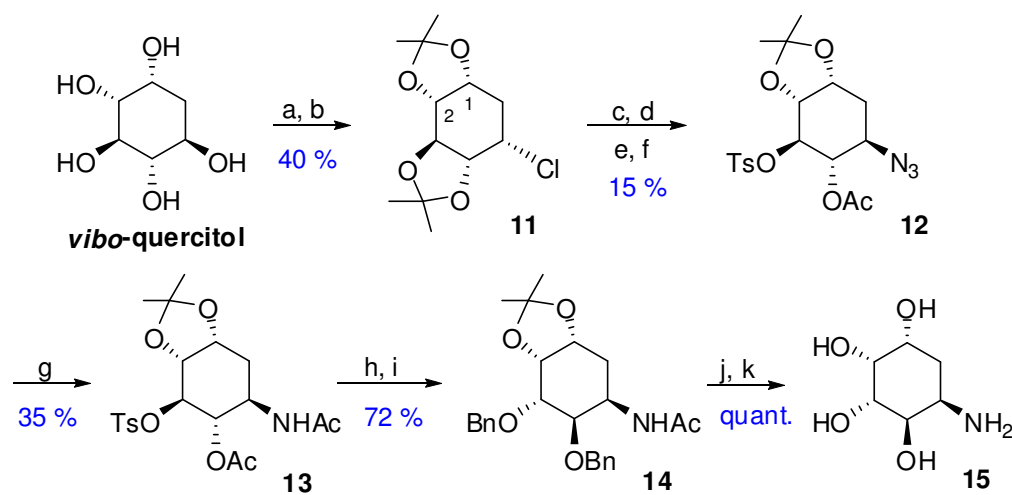


Figure 31 : Synthèse de la valioline à partir d'acide quinique

Plus récemment, Ogawa *et al.* ont obtenu l'aminocyclitol **15**, inhibiteur potentiel d' α -fucosidase, en partant du *vibo*-quercitol⁶⁸ (Figure 32).

⁶⁷ Shing, T. K. M.; Wan, L. H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8468.

⁶⁸ Ogawa, S.; Asada, M.; Ooki, Y.; Mori, M.; Itoh, M.; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4306.



(a) $(\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2)$, DMF, TsOH, H_2O ; (b) SOCl_2 , DMAP, pyr ; (c) NaN_3 , 15-crown-5, DMF ; (d) MeOH, TsOH ; (e) TsCl, pyr ; (f) Ac_2O , pyr ; (g) H_2 , Ni de Raney, EtOH, Ac_2O ; (h) AcONa, $\text{MeO}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$; (i) BnBr, NaH, DMF ; (j) AcOH ; (k) $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, EtOH, $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

Figure 32 : Synthèse de l'aminocyclitol 15 à partir du vibo-quercitol

Les fonctions hydroxyles du *vibo*-quercitol ont été protégées sélectivement. La fonction amine a alors pu être introduite par une $\text{S}_{\text{N}}2$, après inversion de configuration du carbone 5, suivie d'une réduction du groupe azido. La synthèse s'effectue en 11 étapes pour 2 % de rendement global.

Ces synthèses, toutes relativement longues, présentent l'inconvénient de nécessiter de nombreuses étapes de protection/déprotection des groupements hydroxyles, ce qui entraîne un faible rendement total.

➤ En 2005, Delgado *et al.* ont mis au point une méthode de synthèse d'amino- et de diaminocyclitols régiosélective à partir du conduritol B naturel⁶⁹ (Figure 33).

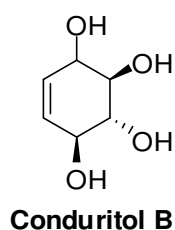
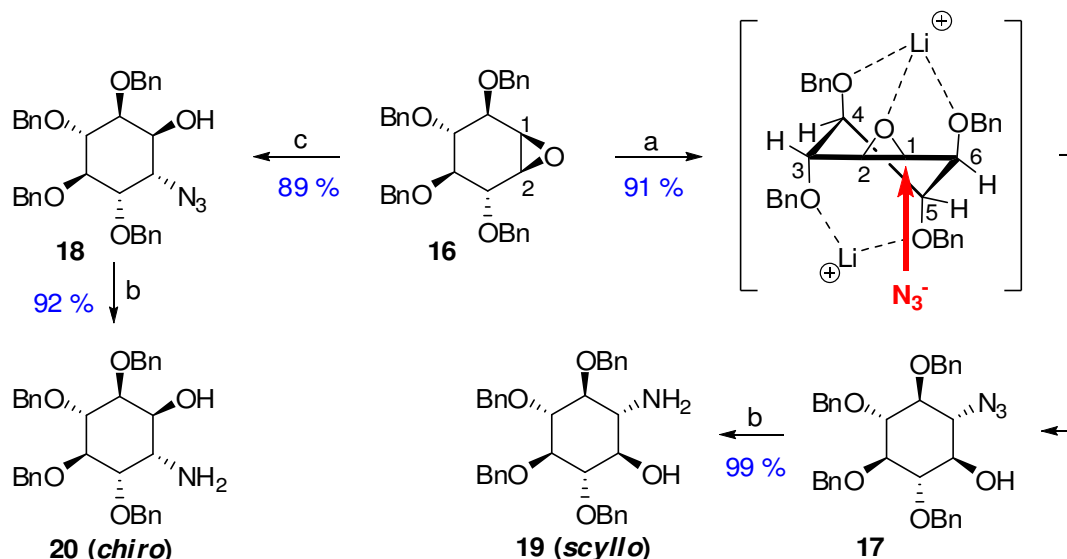


Figure 33 : Produit naturel utilisé en synthèse par Delgado *et al.*

Leur méthodologie démarre à partir du tetra-*O*-benzylconduritol B **16**, facilement obtenu après époxydation au *m*-CPBA et benzylation (BnBr, NaH, DMF) du conduritol B.

⁶⁹ Serrano, P.; Llebaria, A.; Delgado, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7829.

L'ouverture régiosélective de l'époxyde est influencée par la présence ou non d'un acide de Lewis chélatant⁷⁰. Ainsi, en présence de LiClO₄, la réaction d'addition du nucléophile NaN₃ se fera en position 1 du cycle, tandis qu'en l'absence de l'ion lithium, l'attaque du nucléophile se fera en position 2. Après réduction du groupement azido, les aminocyclitols **19** et **20** sont obtenus (4 étapes, **19** : 83 % - **20** : 76 % de rendement global, Figure 34).

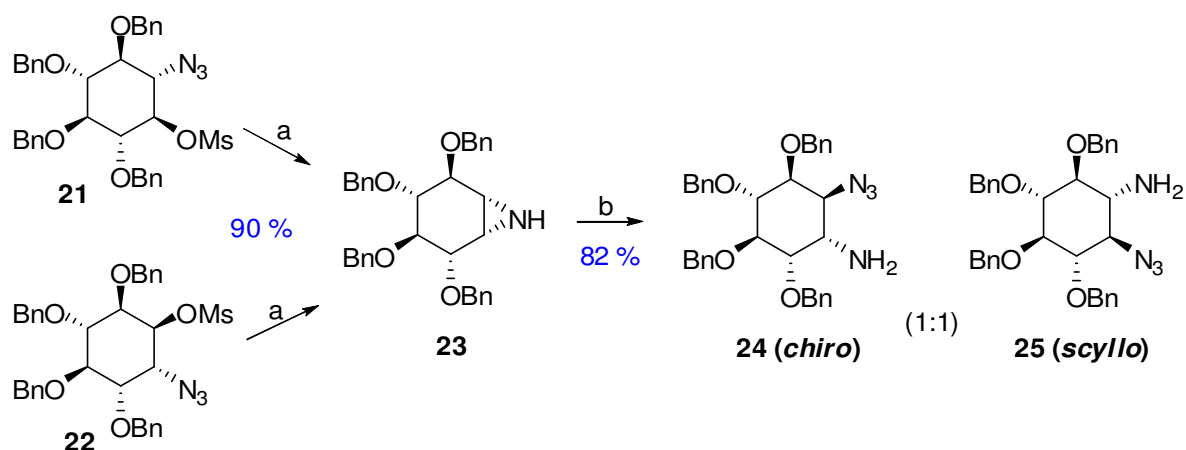


(a) NaN₃, CH₃CN, 2 N LiClO₄ ; (b) LiAlH₄, THF ; (c) NaN₃, 1,2 N NH₄Cl, MeOH/H₂O.

Figure 34 : Influence du Lithium sur l'ouverture de l'époxyde

De manière à introduire un deuxième groupement azoté sur le cyclitol, la synthèse est reprise à partir des composés **17** et **18** (Figure 35). Après méthylation de la fonction alcool de ces molécules, le groupement azido est réduit en amine primaire. Une attaque nucléophile de l'amine au niveau du carbone portant le groupement mésylate permet alors l'obtention de l'aziridine **23**. L'ouverture de celle-ci par de l'azoture de sodium sous catalyse acide aboutit à un mélange (1 :1) des azido amines **24** et **25** de configuration *chiro*- et *scyllo*-, facilement séparables par chromatographie (un rappel sur la nomenclature des différentes configurations des cyclitols est donné en annexe). Ces molécules peuvent alors servir d'intermédiaires pour une fonctionnalisation chimiosélective de chaque atome d'azote.

⁷⁰ Serrano, P.; Llebaria, A.; Vazquez, J.; de Pablo, J.; Anglada, J. M.; Delgado, A. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4465.



(a) LiAlH_4 , THF, 0 °C ; (b) NaN_3 , NH_4Cl , MeOH:H₂O (9:1), 80 °C.

Figure 35 : Synthèse des composés *trans* diaminés 24 et 25

➤ L'inositol, un cyclohexane hexahydroxylé, fait partie des composés naturels ayant attiré l'attention des chimistes ces dernières années. En effet, largement présent dans la nature sous sa forme isomère *myo*- (notamment dans la sève de bouleau, Figure 36), ce composé peu cher est un très bon candidat comme produit de départ pour la synthèse d'aminocyclitols.

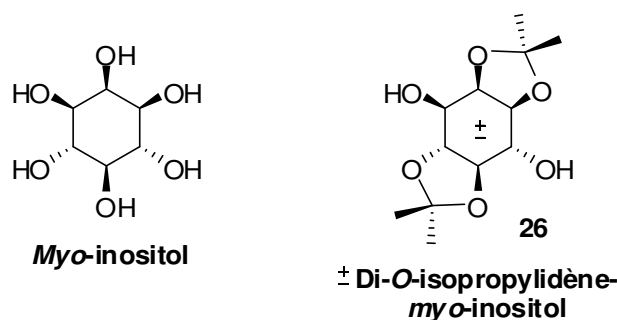


Figure 36 : *myo*-inositol et dérivé protégé

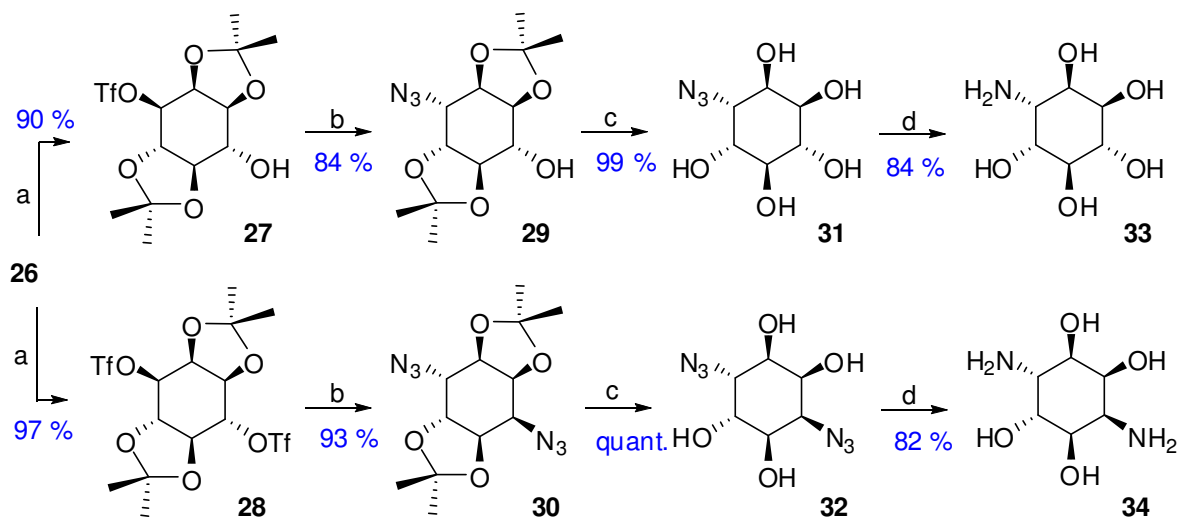
Les protections et déprotections régiosélectives du *myo*-inositol ayant été développées⁷¹, l'utilisation des bons dérivés protégés de ce composé ont permis d'aboutir à un certain nombre d'amino- et diaminocyclitols optiquement purs.

Sureshan *et al.* ont sélectionné le produit racémique 1,2:4,5-di-*O*-isopropylidène-*myo*-inositol **26** comme produit de départ de leur synthèse⁷², pour sa facilité de préparation. Après avoir mis au point une méthode efficace de séparation des deux énantiomères, le composé **26** optiquement pur est mis en réaction dans une séquence de quatre étapes. Elle met en jeu une substitution du dérivé monosulfonate par un groupement azido, puis, après déprotection et réduction, l'amine **33** est isolée (10 étapes, rendement global 6 %). (Figure 37)

⁷¹ Sureshan, K. M.; Shashidhar, M. S.; Praveen, T.; Das, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4477.

⁷² Sureshan, K. M.; Ikeda, K.; Asano, N.; Watanabe, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4072.

En utilisant deux équivalents d'anhydride triflique au départ, la diamine **34** peut être préparée de la même façon.



(a) Tf₂O, Pyr, CH₂Cl₂, -20°C ; (b) NaN₃, DMF, 70°C ; (c) TFA-H₂O (4:1), TA ; (d) H₂, Pd-C, MeOH, TA.

Figure 37 : Voie de synthèse d'amino et diaminocyclitols à partir du *myo*-inositol protégé

2. Synthèse par cyclisation intramoléculaire

2.1. Fermeture du cycle par aldolisation intramoléculaire

➤ Le D-glucose fut très vite utilisé comme réactif de départ à la synthèse d'aminocyclitols⁷³. L'utilisation de ce composé naturel nécessite une étape clé de formation du carbocycle. Récemment, Shing *et al.* ont mis au point une réaction intramoléculaire intéressante d'aldolisation, pour former le carbocycle hydroxylé avec des configurations *D-gluco*, *D-galacto*, *D-manno*, et *L-ido*⁷⁴.

La réaction d'aldolisation est l'une des méthodes les plus efficaces de formation de liaisons carbone-carbone dans tout l'arsenal de la chimie organique⁷⁵. L'aldolisation directe catalysée par la L-proline a notamment été beaucoup utilisée ces dernières années⁷⁶. Depuis peu, les bases DBU et DIPEA ont aussi démontré leur capacité à promouvoir des réactions intramoléculaires⁷⁷. Shing *et al.* se sont appuyés sur ces résultats pour développer la formation de carbocycles via l'aldolisation intramoléculaire de la dicétone **35**, dérivée du glucose.

⁷³ Yoshikawa, M. ; Cha, B. C. ; Ochaichi, Y. ; Takinami, Y. ; Yokokawa, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 4236.

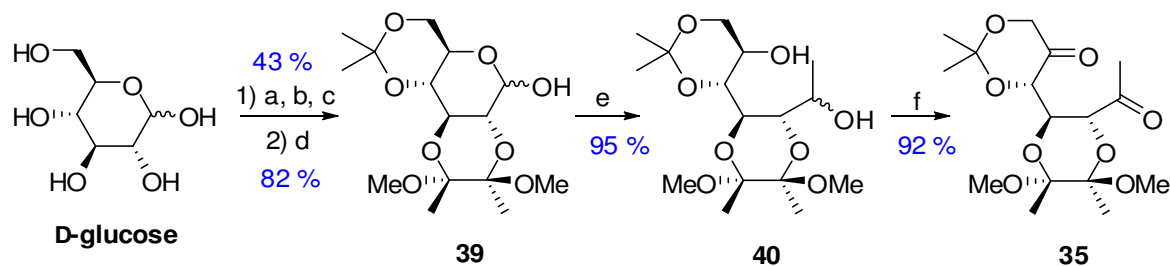
⁷⁴ Shing, T. K. M. ; Cheng, H. M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4137.

⁷⁵ Mahrwald, R. *Modern aldol reactions* **2004**, Wiley-VCH : Weinheim.

⁷⁶ de Figueiredo, R. M. ; Christmann, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2575.

⁷⁷ Markert, M. ; Mulzer, M. ; Schetter, B. ; Mahrwald, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7258.

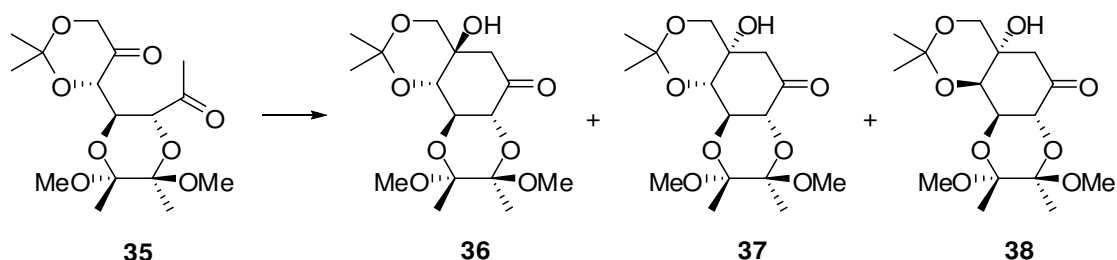
La dicétone **35** a été préparée à partir du D-glucose en 6 étapes et un rendement global de 31 % selon le schéma de la Figure 38. La réaction du D-glucose avec l'alcool allylique et du chlorure d'acétyle aboutit à un mélange d' α - et β -allyl pyranosides, lesquels sont protégés par un acétal en position 2 et 3 du cycle, et par un isopropylidène en position 4 et 5. Après une désallylation catalysée au palladium, une réaction de Grignard permet de méthyler le composé **39** pour donner le diol **40**. Celui-ci est oxydé pour donner la dicétone désirée⁷⁸.



(a) AlOH , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, reflux ; (b) 2,3-butadione, $\text{CH}(\text{MeO})_3$, MeOH , TA ; (c) DMP, acétone, TA ;
 (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , MeOH , reflux ; (e) MeMgBr , THF, TA (f) PDC, CH_2Cl_2 , TA.

Figure 38 : Obtention de la dicétone 35 à partir du D-glucose

A partir de la molécule **35**, le contrôle de la stéréochimie lors de la formation du cycle s'effectue en jouant sur les conditions de réaction, et notamment sur le type de base utilisé (Figure 39). Dans le cas de bases faibles, une épimérisation du composé **35** s'effectue en C4 de manière à aboutir au composé **38** thermodynamiquement plus stable. Lorsque des bases fortes sont employées, un contrôle cinétique est observé pour donner le composé **37**. Enfin une réaction organocatalysée par la L-proline donne majoritairement le composé **36**.



Entrées	Conditions			
		36	37	38
1	L-Proline (0,3 équiv.), DMSO	82 %	8 %	2 %
2	(D)-Proline (0,3 équiv.), DMSO	–	–	52 %
3	Et_3N (1,5 équiv.), CH_2Cl_2	–	–	95 %
4	DIPEA (1,5 équiv.), CH_2Cl_2	–	–	94 %
5	LDA (1 équiv.), Toluène, -78°C	–	42 %	–
6	NaHMDS (1 équiv.), Toluène, -78°C	–	62 %	–
7	KHMDS (1 équiv.), Toluène, -78°C	–	75 %	–

Figure 39 : Etape clé de cyclisation et conditions utilisées

⁷⁸ Shing, T. K. M.; Cheng, H. M.; Wong, W. F.; Kwong, C. S. K.; Li, J.; Lau, C. B. S.; Leung, P. S.; Cheng, C. H. K. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3145.

Après cyclisation intramoléculaire du composé **35**, la *D-gluco*-cyclohexanone obtenue est facilement convertie en valioline par amination réductive, suivie d'une hydrolyse acide (Figure 40). La valioline est ainsi synthétisée en 10 étapes et un rendement global de 17 %.

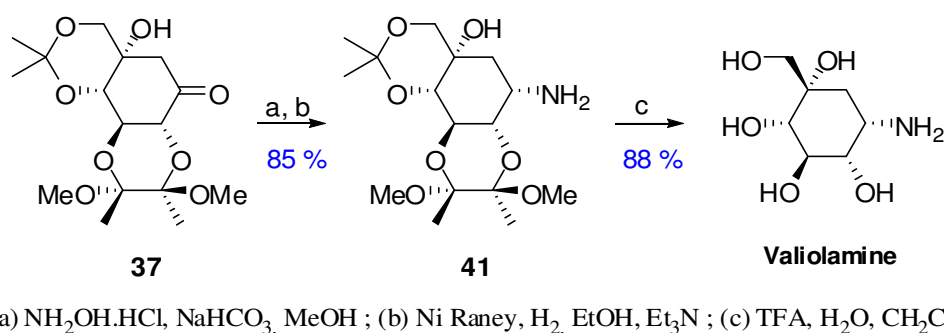


Figure 40 : Synthèse de la valioline à partir de la cyclohexanone **37**

2.2. Fermeture du cycle par métathèse

La fermeture de cycles par métathèse (RCM, « *Ring-Closing Metathesis* ») est apparue rapidement comme une méthode appropriée pour la synthèse de cycles carbonés à partir de saccharides⁷⁹. Pour ce qui est de la chimie des aminocyclitols, plusieurs exemples intéressants ont été publiés ces dernières années.

➤ La métathèse de l'aminodiène **43**, obtenu par une séquence multi-étapes à partir du *D*-ribose, conduit à la conduramine **44**, intermédiaire clé de la synthèse de diaminocyclitols (Figure 41, exemple de la synthèse du composé **45**)^{80,81}. En partant du *D*-mannose au lieu du *D*-ribose, l'énantiomère de la conduramine **44** peut être obtenu.

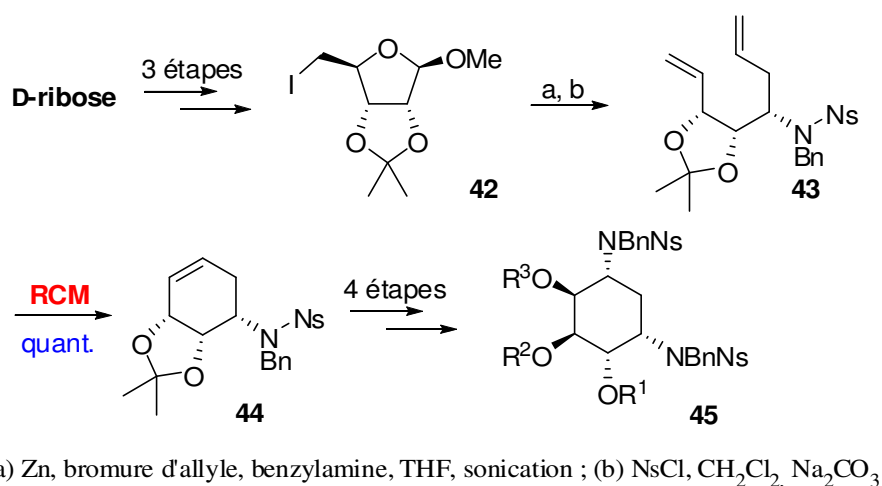


Figure 41 : Synthèse de diaminocyclitols par métathèse

⁷⁹ Madsen, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 399.

⁸⁰ Verhelst, S. H. L.; Wiedenhof, W.; Ovaa, H.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6451.

⁸¹ Verhelst, S. H. L.; Wennekes, T.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2813.

➤ Avec une approche similaire, l'aldéhyde de Garner **46**, obtenu à partir de la L-sérine (5 étapes, 81 % de rendement)⁸², a été utilisé comme produit de départ à l'élaboration du diaminodiène **48**. Cet intermédiaire, mis en jeu dans une fermeture de cycle par métathèse, aboutit à la formation du composé **49**. Ce dernier, fonctionnalisé par dihydroxylation, conduit à l'aminocyclitol désiré après déprotection des amines (Figure 42)⁸³.

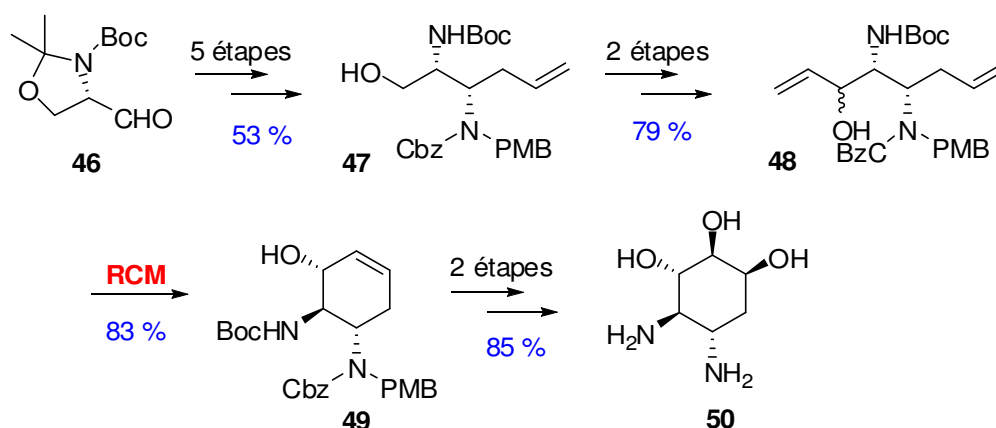


Figure 42 : Synthèse d'un diaminocyclitol par RCM d'un diaminodiène

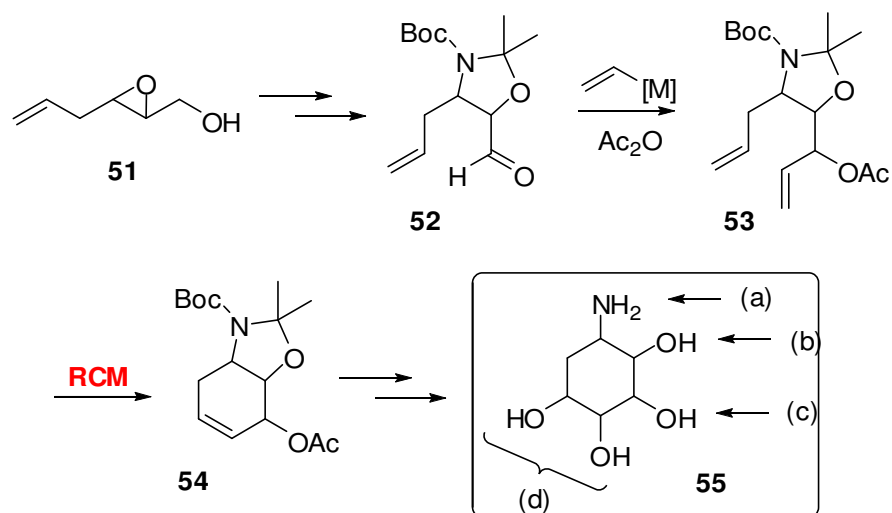
➤ Plus récemment encore, la RCM a été utilisée pour la synthèse asymétrique de la 4-déoxy-3-conduramine **54**, un composé donnant accès par dihydroxylation à une nouvelle famille d'aminocyclitols : les désoxynosamines **55**.

La synthèse met en jeu une époxydation de Sharpless du 2,5-hexadien-1-ol aboutissant à l'époxyalcool **51** optiquement pur, ainsi qu'une alkylation diastéréosélective par un dérivé vinylique sur l'aldéhyde **52** intermédiaire (43). Selon la stéréochimie désirée, le nombre d'étapes et les rendements diffèrent⁸⁴.

⁸² Garner, P.; Park, J. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2361.

⁸³ Cong, X.; Liao, Q. J.; Yao, Z. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5314.

⁸⁴ Alegret, C.; Benet-Buchholz, J.; Riera, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3069.



Contrôle de la stéréochimie :

- (a) époxydation de Sharpless ; ouverture régio- et stéréosélective de l'époxyde,
- (b) Inversion ou non de l'hydroxyle en C2 après ouverture de l'époxyde,
- (c) Addition organométallique : Li = *anti*, cuprates = *syn*,
- (d) *Cis*-dihydroxylation.

Figure 43 : Synthèse d'aminocyclitols de type désoxyminosamine à stéréochimie contrôlée

III. Approche chimioenzymatique

Malgré l'intérêt grandissant des laboratoires pour la synthèse d'aminocyclitols, peu d'exemples de méthodes chimioenzymatiques sont présents dans la littérature. Deux équipes se sont toutefois démarquées dans ce domaine ces dernières années :

- L'équipe du Pr Robert Chênevert de l'Université de Laval, Canada ;
- L'équipe du Pr Marielle Lemaire de l'Université Blaise Pascal à Clermont-Ferrand, France.

Ce paragraphe se focalisera donc sur les travaux de ces deux laboratoires.

1. Désymétrisation enzymatique

Les aminoglycosides, telle la streptomycine déjà présentée dans ce chapitre, forment une large classe d'antibiotiques aux propriétés antibactériennes intéressantes. Leur structure générale consiste en un aminocyclitol comme corps central, généralement la streptomine, la 2-désoxystreptomine et la 2,5-didésoxystreptomine (Figure 28).

Ces composés étant *méso*, la préparation de dérivés dissymétriques et énantiopurs permettra l'accès à de nouveaux analogues d'aminoglycosides. Dans ce contexte, Chênevert

et al. se sont attachés à la désymétrisation enzymatique d'un précurseur de la 2,5-didésoxystreptamine.

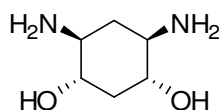
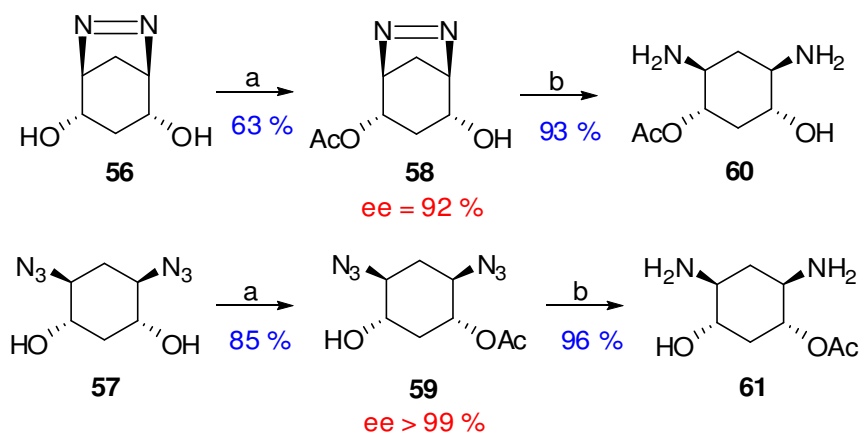


Figure 44 : Rappel de la structure de la 2,5-didésoxystreptamine

Les auteurs ont utilisé des hydrolases capables de distinguer deux groupements hydroxyles de substrats *méso*⁸⁵. Ainsi, les diols **56** et **57** ont été engagés dans une estérification catalysée par la lipase de *Candida rugosa*. Les monoesters correspondants ont été obtenus avec de très bons excès énantiomériques⁸⁶. (Figure 45)



(a) Lipase *Candida rugosa*, acétate de vinyle ; (b) H₂ Pd/C, MeOH

Figure 45 : Procédé enzymatique de désymétrisation donnant accès à des précurseurs d'analogues de 2,5-didésoxystreptamine

Ces composés sont d'importantes structures de base à la synthèse d'analogues d'aminoglycosides. Par exemple, le composé **59** dissymétrique a récemment été utilisé comme élément de construction de l'acide 2,4,5-triaminocyclohexanyl carboxylique (Figure 46), précurseur potentiel d'aminoglycosides aux propriétés antibiotiques améliorées⁸⁷.

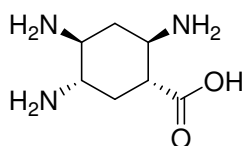


Figure 46 : acide 2,4,5-triaminocyclohexanyl carboxylique

⁸⁵ Chênevert, R.; Pelchat, N.; Jacques, F. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1067.

⁸⁶ Chênevert, R.; Jacques, F. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 1017.

⁸⁷ Roberts, S.; Chittapragada, M.; Pendem, K.; Leavitt, B. J.; Mahler, J. W.; Ham, Y. W. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1779.

2. Cyclisation intramoléculaire de nitroaldols

Au sein du laboratoire, une voie de synthèse chimioenzymatique de nitrocyclitols, précurseurs d'aminocyclitols, a été développée. Cette synthèse s'appuie sur un procédé mettant en jeu deux enzymes et trois réactions en un seul pot⁸⁸ :

- ✓ Une aldolisation catalysée par une aldolase,
- ✓ Une nitroaldolisation intramoléculaire, responsable de la cyclisation,
- ✓ Une déphosphorylation catalysée par une phosphatase.

La stratégie s'appuie sur la capacité des aldolases à catalyser la formation d'une liaison carbone-carbone de manière hautement stéréosélective. Ainsi, l'utilisation de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) comme catalyseur de synthèse, permet, lors de la condensation entre le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et un aldéhyde nitré, de contrôler la configuration des deux stéréocentres de la liaison C2-C3 du futur aminocyclitol (liaison en rouge sur la Figure 47).

Le nitroaldol obtenu se cyclise alors selon une réaction de Henry intramoléculaire. Cette réaction se produit naturellement après formation du nitroaldol, au pH de la réaction d'aldolisation enzymatique, grâce au caractère acide du proton situé en α du groupement nitro. La réaction de Henry intramoléculaire s'est révélée être stéréosélective pour les aldéhydes testés.

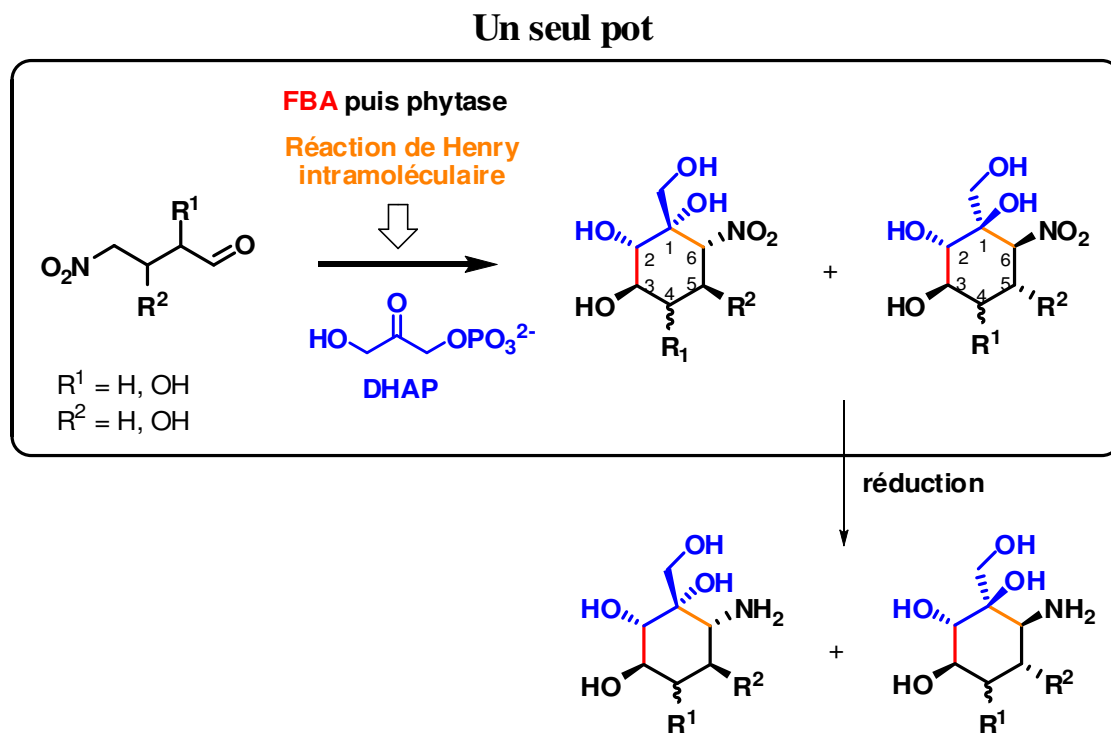


Figure 47 : procédé chimioenzymatique d'obtention d'aminocyclitols

⁸⁸ (a) El Blidi, L.; Ahbala, M.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 2684. (b) El Blidi, L.; Crestia, D.; Gallienne, E.; Demuynck, C.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 2951.

Ainsi, au cours de ce procédé, deux liaisons C-C sont formées de façon hautement stéréosélective. La stéréochimie de l'hydroxyle en position 5 du cycle influence la stéréochimie de la liaison C1-C6. Enfin, l'utilisation de lipases dans un dédoublement cinétique enzymatique lors de la synthèse des précurseurs nitrés, définit la stéréochimie de l'alcool en position 4.

L'utilisation du DHAP comme donneur lors de l'aldolisation introduit un groupement phosphate sur la molécule qu'il faut hydrolyser pour aboutir au nitrocyclitol désiré. L'élimination du groupement phosphate se fait par une enzyme appelée phytase (une phosphatase) à pH acide dans l'eau.

Les diastéréoisomères des nitrocyclitols obtenus sont séparés par chromatographie sur colonne de silice et réduits en aminocyclitols correspondants, analogues de la valioline.

Chap 3 : les aldolases

I. Généralités sur les aldolases

Les aldolases sont des enzymes ubiquitaires présentes dans la quasi-totalité des organismes vivants, et responsables notamment de la dégradation des sucres. Ce sont des lyases (enzymes permettant la rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation) qui catalysent la rupture stéréosélective de liaisons carbone-carbone. La majorité des réactions enzymatiques étant réversible, elles sont le plus souvent utilisées en synthèse dans le sens inverse de la réaction naturelle, celui de la formation stéréosélective d'une liaison carbone-carbone selon une réaction d'aldolisation.

Les aldolases peuvent être scindées en quatre groupes suivant la nature des substrats et des produits de réaction^{89,90}.

➤ Les aldolases appartenant au premier groupe utilisent le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) comme substrat donneur. On les appelle les aldolases DHAP dépendantes. La réaction de condensation avec un aldéhyde fournit un cétose-1-phosphate (Figure 48).

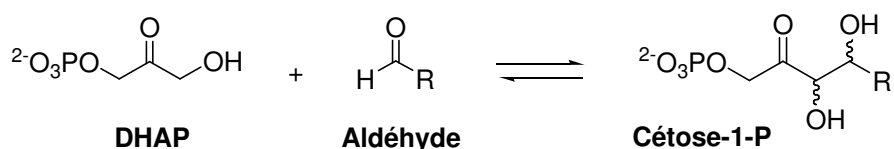


Figure 48 : Réaction catalysée par les aldolases du 1^{er} groupe

Les DHAP aldolases sont les plus décrites dans la littérature en tant que catalyseur pour la formation de liaisons C-C. Elles présentent en effet de nombreux avantages, tels leur facilité d'isolation et leur grande tolérance vis-à-vis de substrats accepteurs. Elles sont aussi hautement stéréosélectives et ont ainsi permis l'accès à de nombreux analogues de monosaccharides. Pour ces raisons, nous nous intéresserons principalement à ce groupe dans la suite de cette partie bibliographique.

➤ D'autres aldolases utilisent le pyruvate ou le phosphoénol pyruvate (PEP) comme nucléophile, et conduisent à des 3-désoxy-2-cétoacides⁹¹ (Figure 49).

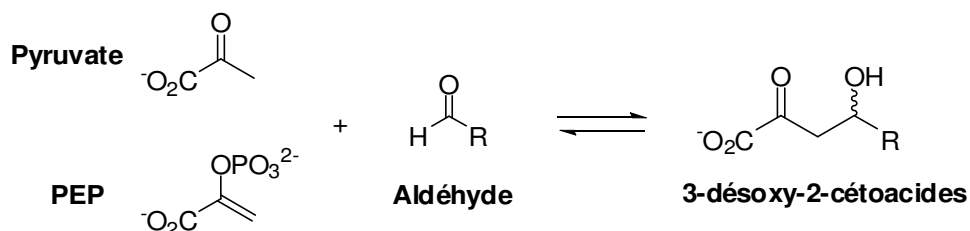


Figure 49 : Réactions catalysées par les aldolases du 2^{ème} groupe

⁸⁹ Clapés, P.; Fessner, W.-D.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154.

⁹⁰ Dean, S. M.; Greenberg, W. A.; Wong, C. H. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1308.

⁹¹ Wang, W. J.; Baker, P.; Seah, S. Y. K. *Biochemistry* **2010**, *49*, 3774.

La lyase de l'acide *N*-acétylneuraminique (NeuA) et ses mutants comptent parmi les pyruvate aldolases les plus étudiées⁹². Ils permettent la synthèse de l'acide sialique et de ses analogues (Figure 50). Ce sont des sucres spécifiques de la surface de certaines de nos cellules. Ils jouent donc un rôle à de nombreux niveaux, et sont ainsi impliqués dans la reconnaissance et la communication cellulaire. Certains motifs sont impliqués dans des infections bactériennes et virales, car les entités pathogènes sont capables d'identifier et de cibler certains sucres spécifiques de la surface des cellules hôtes⁹³. En conséquence, ils ont attiré l'attention pour leur potentiel thérapeutique vis-à-vis de nombreuses maladies⁹⁴.

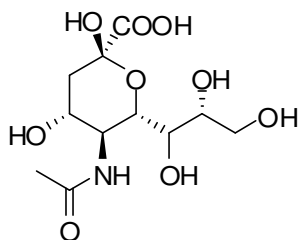


Figure 50 : Acide *N*-acétylneuraminique ou acide sialique

➤ Le troisième groupe est celui de la désoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) qui utilise l'acétaldéhyde comme nucléophile et conduit à des 2-désoxyaldoses⁹⁵ (Figure 51).

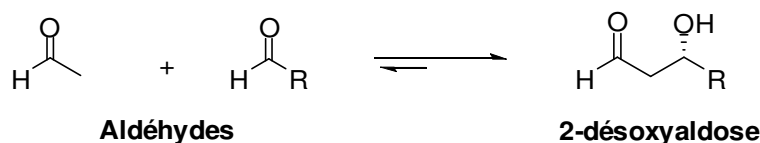


Figure 51 : Réactions catalysées par les aldolases du 3^{ème} groupe

Sa caractéristique la plus intéressante est sa capacité à catalyser des réactions d'aldolisation en cascade. Cette propriété a été renforcée par mutagenèse et l'enzyme mutante est maintenant utilisée industriellement pour la préparation du (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-tridésoxyhexose⁹⁶ (Figure 52).

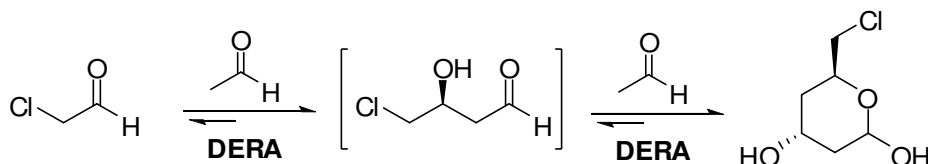


Figure 52 : Procédé industriel de préparation du (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-tridésoxyhexose

⁹² Campeotto, I.; Carr, S. B.; Trinh, C. H.; Nelson, A. S.; Berry, A.; Phillips, S. E. V.; Pearson, A. R. *Acta Crystallogr. Sect. F* **2009**, *65*, 1088.

⁹³ Williams, G. J.; Woodhall, T.; Nelson, A.; Berry, A. *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 239.

⁹⁴ Pearce, O. M. T.; Varki, A. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1225.

⁹⁵ Kim, Y. M.; Choi, N. S.; Kim, Y. O.; Son, D. H.; Chang, Y. H.; Song, J. J.; Kim, J. S. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20*, 995.

⁹⁶ Jennewein, S.; Schürmann, M.; Wolberg, M.; Hilker, I.; Luiten, R.; Wubbolts, M.; Mink, D. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537.

Ce β -hydroxyaldéhyde est obtenu par addition de deux équivalents d'acétaldéhyde à un équivalent de chloroacétaldéhyde. C'est un précurseur chiral des statines, médicaments utilisés dans le traitement de maladies cardio-vasculaires ou pour son action hypocholestérolémiant. L'atorvastatine est par exemple amplement prescrite (**Error! Reference source not found.**). Ce médicament, commercialisé par le laboratoire pharmaceutique Pfizer sous la marque **Tahor**[®] en France, est le plus vendu dans le monde, tous produits confondus, avec un chiffre d'affaires de 11 milliards de dollars.

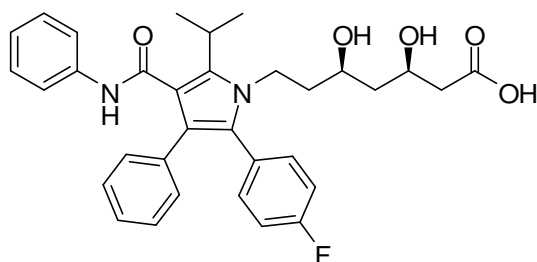


Figure 53 : Structure de l'atorvastatine

➤ Le dernier groupe est celui des thréonines aldolases. Dans ce cas, la glycine est le nucléophile et génère des aminoacides fonctionnalisés⁹⁷ (Figure 54). Ces aldolases sont des outils puissants en synthèse chimioenzymatique car elles introduisent en une seule étape chiralité et multifonctionnalité à une molécule. Elles sont notamment utilisées pour la synthèse d'antibiotiques et antifongiques⁹⁸.

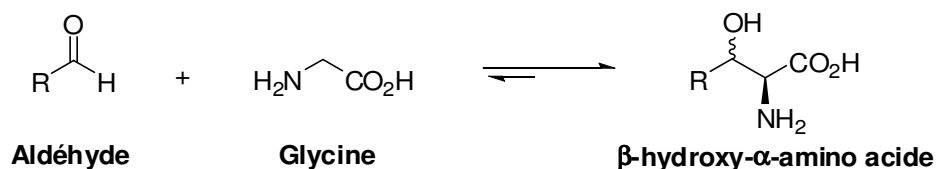


Figure 54 : Réaction catalysée par les aldolases du 4^{ème} groupe

II. Les DHAP-aldolases

Les DHAP-aldolases catalysent la condensation du DHAP sur un aldéhyde, pour conduire à un cétose-1-phosphate.

Elles sont répertoriées en deux classes en fonction de leur mécanisme d'action⁹⁹ :

⁹⁷ Machajewski, T. D. ; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 1352.

⁹⁸ Steinreiber, J.; Fesko, K.; Reisinger, C.; Schurmann, M.; van Assema, F.; Wolberg, M.; Mink, D.; Griengl, H. *Tetrahedron* **2007**, 63, 918.

⁹⁹ Bommarius, A. S. ; Riebel, B. R. *Biocatalysis*, Wiley-VCH Ed., **2004**, p 274.

- A la classe I appartiennent les enzymes issues du règne animal, de plantes supérieures, d'algues vertes, mais aussi de certaines bactéries comme *Peptococcus aerogenes*. Ces enzymes ne nécessitent pas de cofacteur.

- Les aldolases de la classe II sont présentes chez les bactéries, les levures et les champignons. Elles sont dénommées métalloaldolases car leur fonctionnement nécessite la présence d'ions métalliques divalents comme Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Fe^{2+} .

1. Propriétés catalytiques

Pour les enzymes de classe I, le mécanisme de la réaction est illustré pour la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (Figure 55). Il a été montré qu'il y a d'abord formation d'une base de Schiff **A** par réaction entre la fonction amine d'un résidu lysine de l'enzyme et le carbonyle du DHAP, puis départ du proton *proS* du DHAP pour former l'intermédiaire **B**. L'énamine **C** (forme mésomère de **B**) s'additionne sur la face *Si* du carbone prochiral du substrat aldéhyde, formant ainsi une autre base de Schiff **D**, précurseur du cétose phosphate **F**.

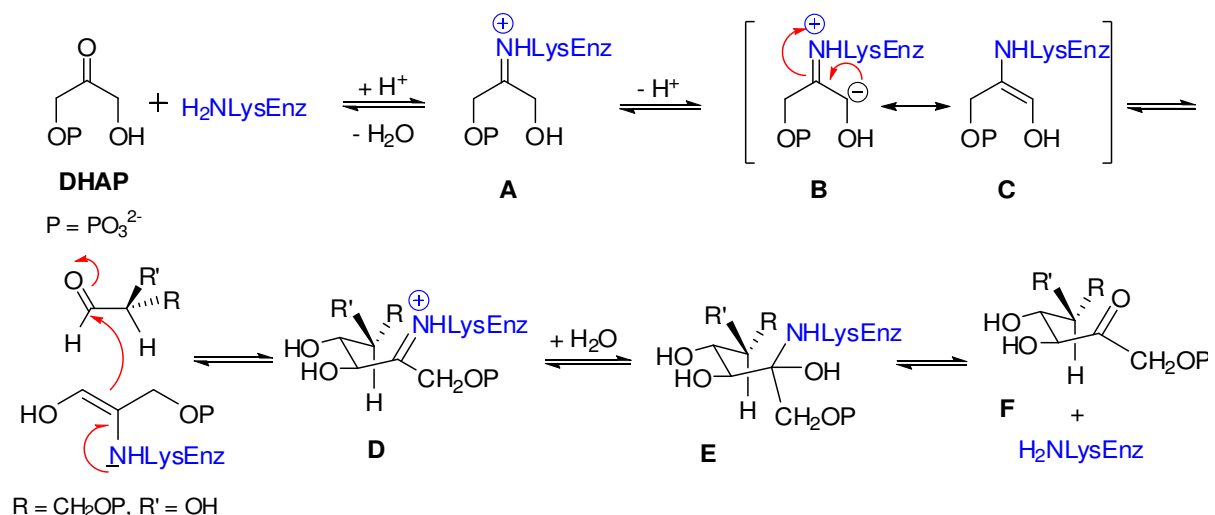


Figure 55 : Mécanisme des réactions catalysées par les aldolases de classe I

Chez les aldolases de classe II, un cation métallique, ici illustré avec Zn^{2+} , agit en tant qu'acide de Lewis dans le site actif (Figure 56). Dans ce cas, il s'agit de la forme énoil du DHAP qui se condense sur l'aldéhyde accepteur.

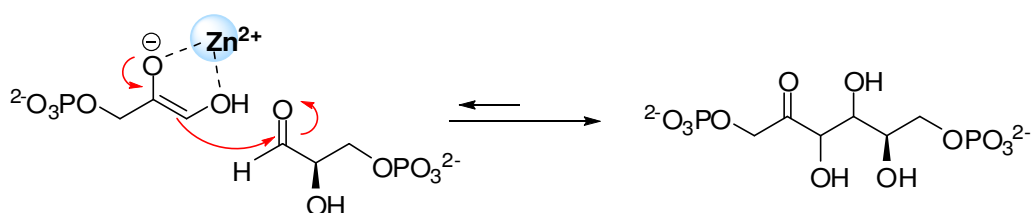
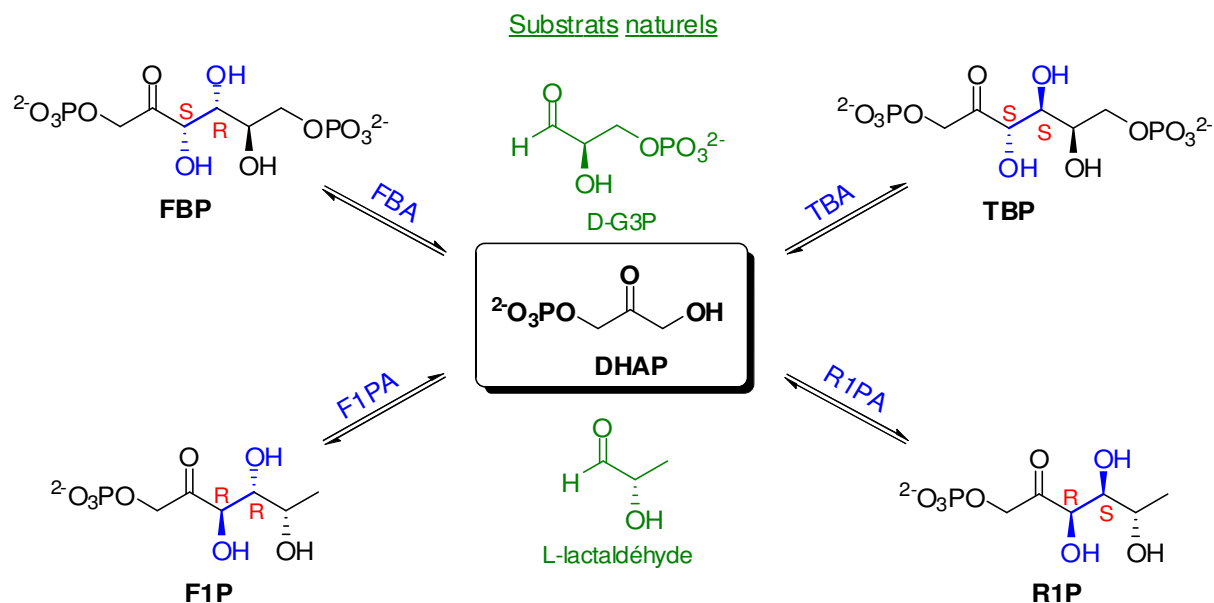


Figure 56 : Mécanisme des réactions catalysées par les aldolases de classe II

En suivant l'un ou l'autre de ces mécanismes, les aldolases contrôlent généralement de façon absolue la configuration des carbones asymétriques créés. Les quatre stéréochimies de la liaison C3-C4 sont accessibles par différentes aldolases comme représenté sur la Figure 57 ci-dessous.



In vitro, la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA, classe I) catalyse la réaction de condensation entre le DHAP et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) pour former le D-fructose-1,6-bisphosphate (FBP) avec la stéréochimie 3*S*,4*R*.

La fucose-1-phosphate aldolase (F1PA, classe II) et la rhamnucose-1-phosphate aldolase (R1PA, classe II) catalysent la condensation entre le DHAP et le L-lactaldéhyde pour donner respectivement le L-fucose-1-phosphate (F1P, 3*R*,4*R*) et le L-rhamnucose-1-phosphate (R1P, 3*R*,4*S*)¹⁰⁰.

La tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (TBA, classe I) devrait en principe catalyser la réaction de condensation entre le DHAP et le D-tagatose-1,6-bisphosphate (TBP)¹⁰¹. En réalité, cette enzyme présente une mauvaise discrimination au niveau des centres chiraux C3 et C4. Elle catalyse la rupture réversible de quatre stéréoisomères : le fructose-, le psicose-, le sorbose-, et le tagatose-1,6-bisphosphate.

¹⁰⁰ Gijssen, H. J. M. ; Qiao, L. ; Fitz, W. ; Wong, C. -H. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 443.

¹⁰¹ (a) Crow, V. L. ; Thomas, T. D. *J. Bacteriol.* **1982**, 151, 600. (b) van, Rooijen, R. J. ; van Schalkwijk, S. ; De Vos, W. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7176.

Sa structure et son mécanisme d'action ont été récemment étudiés de manière à expliquer ce manque de stéréosélectivité. Il semblerait qu'une isomérisation *cis-trans* de la liaison C2-C3 du carbanion soit responsable de l'épimérisation en C3 du produit attendu¹⁰².

Dans le cas de la FBA, l'isomère *cis* de l'intermédiaire **C** énamine est stabilisé par deux liaisons hydrogènes au sein du site actif avec les résidus Asp27 et Lys125. Cela aboutit à une configuration *S* au niveau du C3 de l'aldol formé. Dans le cas de la TBA, LowKam et *coll.* envisagent une forme pseudo carbanionique **B** due au caractère réduit de double liaison de l'énamine **C**. Celle-ci permet la rotation, autour de la liaison C2-C3, de l'hydroxyle du DHAP. Un positionnement *trans* de celui-ci est alors possible (Figure 58). Cette forme est stabilisée par deux liaisons hydrogènes : l'une entre l'hydroxyle du DHAP et son groupement phosphate, l'autre entre ce même hydroxyle et un résidu glutamine (Gln28) du site actif.

Cette isomérisation explique les deux configurations observées en C3 des aldols formés par la TBA. Notons que dans le cas de la FBA le résidu glutamine est remplacé par un résidu glutamate (Glu34). Pour ce qui est des deux configurations obtenues en C4, ce phénomène a déjà été observé pour d'autres aldolases et sera expliqué par la suite.

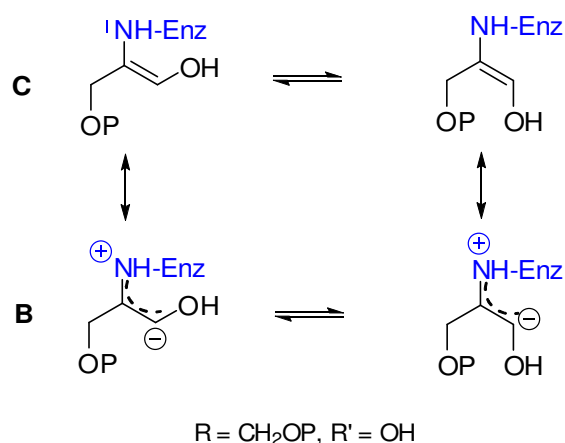


Figure 58 : Isomérisation *cis-trans* de l'intermédiaire C

Ainsi, avec le jeu de DHAP aldolases présenté ci-dessus, il est possible, en théorie, d'accéder à trois configurations de la liaison C3-C4 des aldols. C'est cette propriété que nous avons essayé d'exploiter lors de ces travaux de thèse. Nous allons donc présenter plus en détail ces enzymes dans les paragraphes suivants.

¹⁰² LowKam, C.; Liotard, B.; Sygusch, J. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 21143.

2. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase

2.1. Rôle catalytique

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA, EC 4.1.2.13) issue du muscle du lapin, est l'aldolase la plus utilisée pour la formation stéréospécifique d'une liaison carbone-carbone, en particulier pour la synthèse d'analogues de sucres. C'est une enzyme abondante et facilement purifiable. Elle est, depuis plusieurs années, disponible commercialement à un prix raisonnable.

Dans la glycolyse (voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie dans la cellule), la FBA catalyse la rupture de la liaison C3-C4 du FBP en donnant deux trioses : le DHAP et le D-G3P (Figure 59 **Error! Reference source not found.**).

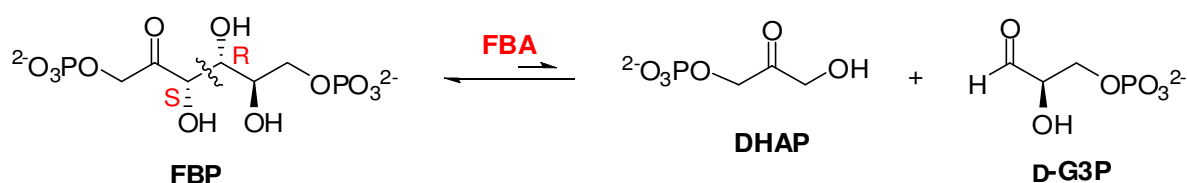


Figure 59 : Rétroaldolisation catalysée par la FBA

La variation d'énergie libre standard de cette coupure est de $+20,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, à laquelle correspond la constante d'équilibre K_{eq} :

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{G3P}] \times [\text{DHAP}]}{[\text{FBP}]}$$

Etant donné la valeur positive de l'énergie libre standard, la réaction est très défavorable dans le sens de la rupture¹⁰³. Cependant, les étapes glycolytiques ultérieures utilisent le G3P et le DHAP en continu, et permettent donc de surmonter les conditions thermodynamiques défavorables ; le FBP est transformé progressivement en D-G3P et DHAP.

Comme *in vitro* l'équilibre est déplacé en faveur de la condensation, cette enzyme est très utilisée en synthèse. De plus, elle accepte une grande variété d'aldéhydes comme substrat, mais elle est très spécifique du DHAP. En général, dans le cas d'un aldéhyde racémique, elle n'est pas énantiosélective. Néanmoins, dans certains cas peu fréquents, il a été observé une légère préférence pour l'un des deux énantiomères¹⁰⁴. Cela fait de cette enzyme un excellent outil pour accéder à de nombreux monosaccharides et analogues, naturels ou non.

¹⁰³ Drauz, K. ; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Ed., Vol II, **1995**, p 547.

¹⁰⁴ Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapes, P. *Chem.Eur. J.* **2003**, 9, 4887.

2.2. Le site actif

Dans le site actif de la FBA (Figure 60), l'activation du DHAP par formation d'une base de Schiff est assurée par la lysine 229. Le groupement guanidinium de l'arginine 148 stabilise le DHAP en interagissant avec la charge négative du groupement phosphate. Un autre résidu lysine du site actif (Lys107) stabilise le groupement phosphate du G3P. Il joue un rôle important pour le contrôle de l'énantiosélectivité au niveau du C2 de l'aldéhyde accepteur¹⁰⁵.

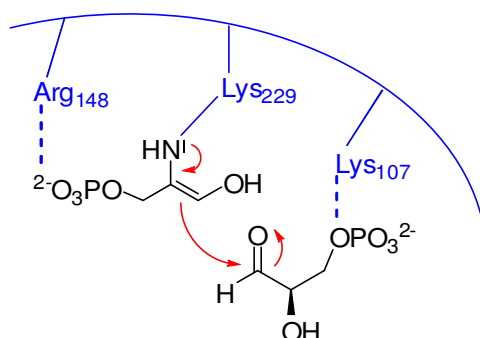


Figure 60 : Interactions connues du site actif de la FBA avec le G3P et le DHAP

Des études cristallographiques récentes¹⁰⁶ ont été réalisées sur des sites actifs de mutants de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (classe I) provenant d'un microorganisme de *Thermoproteus tenax*, en présence de son substrat naturel, le fructose-1,6-bisphosphate. Elles ont montré la nécessité d'un donneur de proton pour convertir l'intermédiaire carbinolamine en base de Schiff **D** lors de la réaction de rupture du FBP en G3P et DHAP (Figure 61). Le résidu tyrosine 146 a été identifié comme tenant ce rôle, puisque les mutants ne présentant pas ce résidu perdent leur activité.

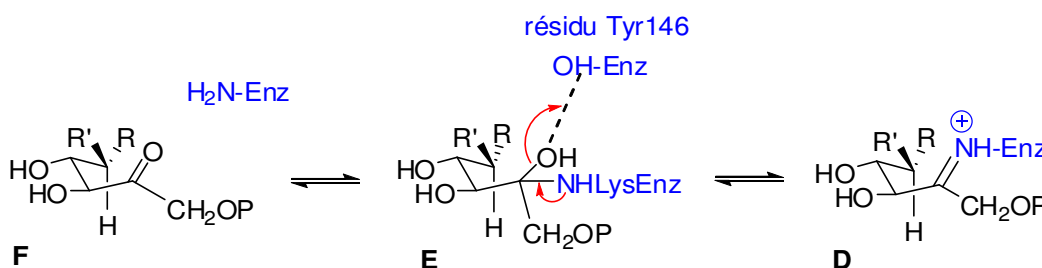


Figure 61 : Rôle du résidu Tyr146 de la FBA dans son mécanisme catalytique

¹⁰⁵ (a) Lai, C. Y.; Nakai, N.; Chang, D. *Science* **1974**, *183*, 1204. (b) Lubini, D. G. E.; Christen, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 2527. (c) Sygush, J.; Beaudy, D.; Allaire, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7846. (d) Lees, W. J.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1887.

¹⁰⁶ Lorentzen, E.; Siebers, B.; Hensel, R.; Pohl, E. *Biochemistry*. **2005**, *44*, 4222.

3. La fucose- et la rhamnULOse-1-phosphate aldolases

3.1. Rôle catalytique

La fucose-1-phosphate aldolase (F1PA, EC 4.1.2.17) catalyse de façon réversible la rupture du L-fucose-1-phosphate en DHAP et L-lactaldéhyde (Figure 62), étape clé du métabolisme bactérien du L-fucose¹⁰⁷. Cette enzyme permet de générer des produits de structures analogues à ceux obtenus grâce à la FBA, mais avec une stéréochimie 3*R*,4*R*. Son équilibre est déplacé dans le sens de la synthèse du F1P ce qui en fait un outil de choix en synthèse organique. Afin d'obtenir des quantités suffisantes d'enzyme pour des synthèses à grande échelle, la F1PA a été clonée et surexprimée dans *Escherichia coli* dès 1990¹⁰⁸.

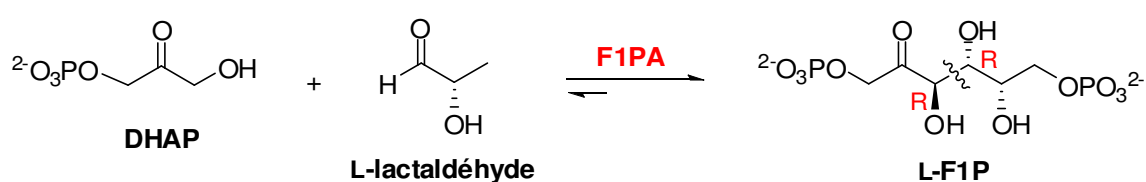


Figure 62 : Réaction entre le DHAP et le L-lactaldéhyde catalysée par la F1PA

La rhamnULOse-1-phosphate aldolase (R1PA, EC 4.1.2.19) permet quant à elle la formation réversible d'une liaison C-C de configuration 3*R*,4*S* entre le DHAP et différents aldéhydes (son substrat naturel étant, comme pour la F1PA, le L-lactaldéhyde). Son équilibre est aussi favorable au sens de la synthèse. Elle a été clonée et surexprimée dans *Escherichia coli* en 1991¹⁰⁹. Cette enzyme intervient dans le métabolisme bactérien du mannose.

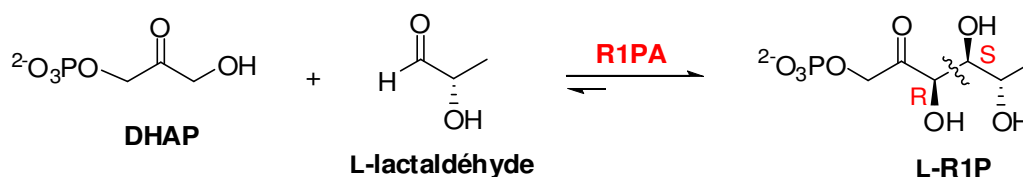


Figure 63 : Réaction entre le DHAP et L-lactaldéhyde catalysée par la R1PA

L'énantiopréférence de ces deux enzymes pour l'énantiomère L de 2-hydroxyaldéhydes (>95 : 5) permet la résolution cinétique de mélanges racémiques de ce type de composés¹¹⁰ (Figure 64).

¹⁰⁷ Ghalambor, M. A.; Heath, E. C. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 2427.

¹⁰⁸ Ozaki, A.; Toone, E.; Vonderosten, C.; Sinskey, A. J.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4970.

¹⁰⁹ Fessner, W. D.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Dreyer, M.; Schulz, G. E.; Badia, J.; Aguilar, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 555.

¹¹⁰ Fessner, W.-D.; Badía, J.; Eyrisch, O.; Schneider, A.; Sinerius, G. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5231.

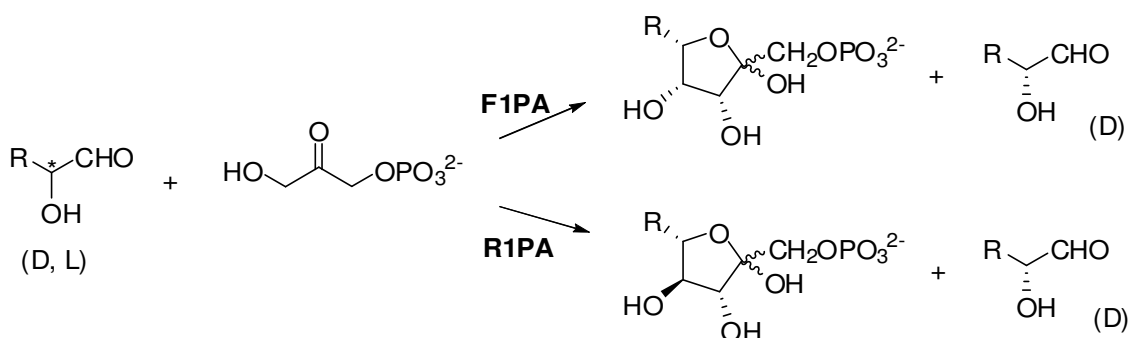


Figure 64 : Résolution cinétique de 2-hydroxyaldéhydes par la F1PA et la R1PA

3.2. Le site actif

Pour la F1PA et la R1PA, l'avantage de la large tolérance en substrat aldéhydique est à contrebalancer avec un contrôle de la diastéréosélectivité limitée, dans certains cas, au niveau du stéréocentre en C4. Ceci peut être dû à une modification d'attaque de la face prochirale de l'aldéhyde, causée par les interactions de ce dernier avec le site actif de l'enzyme. Ainsi, la connaissance détaillée de la contribution des résidus du site actif dans la reconnaissance du substrat et l'action catalytique est un point fondamental pour l'utilisation de ces enzymes.

3.2.1. Mécanisme catalytique des aldolases de type II

Dans le site actif, plusieurs hypothèses quant à l'action de l'ion Zn^{2+} ont été envisagées (Figure 65) :

- A. Stabilisation de l'énolate par liaison hydrogène avec un résidu histidine et activation de l'aldéhyde par le Zn^{2+} ,
- B. Stabilisation de l'énolate par coordination entre Zn^{2+} l'énolate et le groupement phosphate,
- C. Stabilisation de l'enediolate par chélation avec Zn^{2+} .

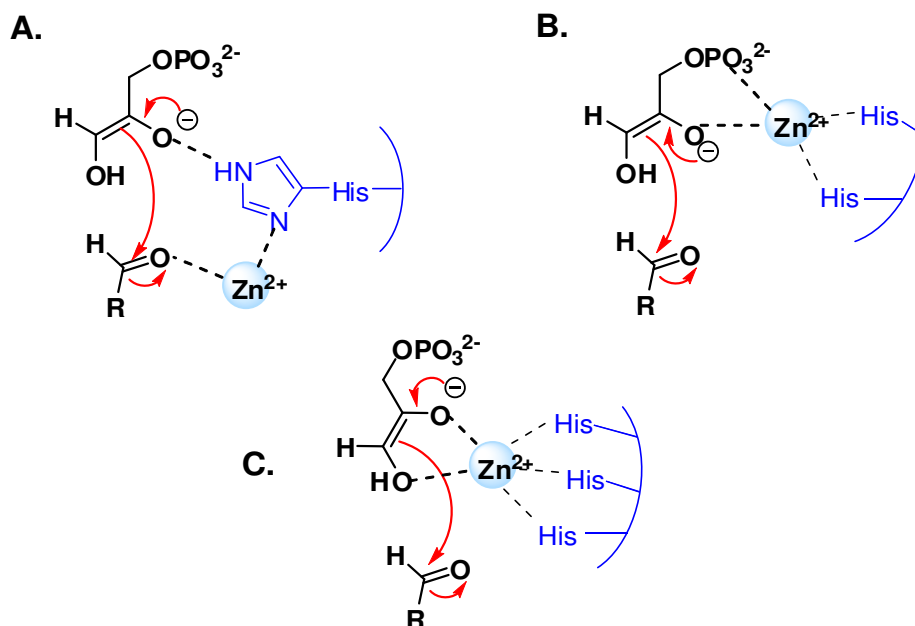


Figure 65 : Hypothèses du mécanisme catalytique pour les aldolases de type II

Dreyer et Schulz, qui ont reporté en premier une structure par rayon X de la F1PA, ont permis de valider avec certitude l'hypothèse C¹¹¹. En effet, leurs travaux ont mis en évidence la forte coordination de l'ion Zn^{2+} à 3 résidus histidine (His92, His94, His155), éliminant ainsi les autres hypothèses par les contraintes stériques engendrées. Cette conclusion a été validée quelques années plus tard par Fessner *et al.*; ils ont utilisé un hydroxamate, le phosphoglycolhydroxamate PGH, comme mème de l'intermédiaire catalytique (Figure 66). Ils ont ainsi pu montrer la stabilisation de la forme ènediolate du DHAP par l'ion Zn^{2+} avec la formation d'un chélate bidenté¹¹².



Figure 66 : Détermination par rayon-X de la coordination de Zn^{2+} dans le site actif de la F1PA, avec le PGH comme mème du DHAP

A partir de ces résultats, un cycle catalytique de la F1PA fut proposé, avec des implications générales pour l'ensemble des métalloaldolases¹¹² (Figure 67). Dans le sens de la synthèse, le DHAP entre dans le site actif comme premier substrat et se coordine au zinc. La polarisation de la liaison carbonyle augmente l'acidité de l'hydrogène en α et facilite son arrachement par une base, probablement le Glu73. Le nucléophile *cis*-ènediolate attaque alors

¹¹¹ Dreyer, M. K.; Schulz, G. E. *J. Mol. Biol.* **1993**, 231, 549.

¹¹² Fessner, W. D.; Schneider, A.; Held, H.; Sinerius, G.; Walter, C.; Hixon, M.; Schloss, J. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 2219.

la face *Si* du carbonyle du second substrat entré dans le site actif : le lactaldéhyde. Un résidu Tyr113' permet de stabiliser les charges formées en donnant un proton. Cette liaison hydrogène est responsable de l'induction asymétrique en C4, tandis que l'encombrement de la face *Si* du DHAP par la protéine assure la stéréochimie correcte en C3. Après libération de l'aldol, des échanges de protons préparent le site actif à un prochain cycle catalytique.

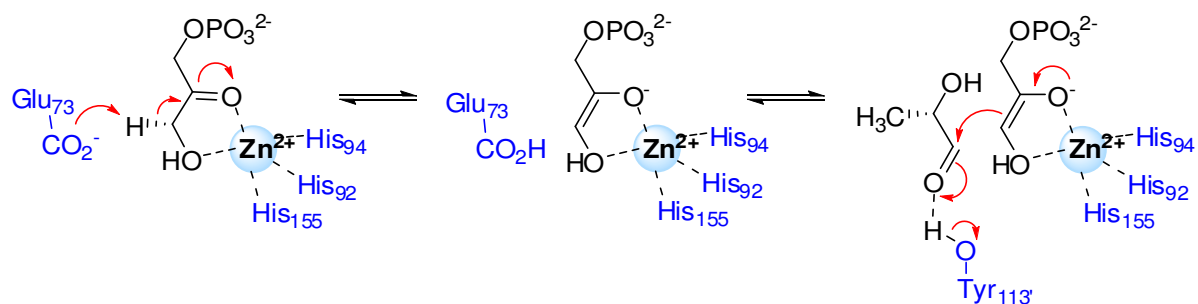


Figure 67 : Cycle catalytique de la F1PA proposé en 1996 par Fessner *et coll.*

Pour confirmer ce mécanisme, plusieurs mutants de la F1PA et des composés mimes du DHAP ont été construits ; les rôles catalytiques des résidus Glu73 et Tyr113' ont particulièrement été observés.

- Kimura *et coll.* se sont penchés sur l'hypothèse de déprotonation du DHAP par le Glu73 lors d'une étude de pKa d'un composé mime du DHAP, le bromophenacylcyclène. Il a été montré que la complexation de ce composé au Zn^{2+} diminue le pKa du proton en C3 de 19 à 8,4 ce qui rend donc possible son arrachement par le résidu glutamate¹¹³.

- Dans la suite du mécanisme, il avait été admis une action du résidu Tyr113' comme donneur de proton. Le pKa d'une tyrosine est habituellement d'environ 10 (donc trop grand pour donner son proton au lactaldéhyde), mais en supposant une baisse de pKa due à la présence adjacente de Zn^{2+} , son rôle d'acide devenait possible¹¹². Cependant, lors de l'étude de mutants dont le résidu Tyr113' a été modifié, une activité résiduelle de l'enzyme est observée. Ce résultat n'est pas compatible avec l'hypothèse d'une implication de ce résidu dans le mécanisme catalytique de l'aldolase (l'activité mesurée aurait alors été nulle). Une modélisation du site actif a finalement abouti à une nouvelle hypothèse : celle d'une double implication de Glu73. Ce résidu, protonné lors de l'activation du DHAP en début de mécanisme, peut atteindre l'oxygène du carbonyle de l'aldéhyde et donner son proton¹¹⁴.

Pour ce qui est de la Tyr113', la baisse d'activité observée chez les mutants dépourvus de ce résidu indique son implication lors de la catalyse, bien qu'il n'intervienne pas directement au niveau du mécanisme. Son rôle dans l'orientation du substrat dans la poche catalytique sera abordé par la suite.

¹¹³ Kimura, E.; Gotoh, T.; Koike, T.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1267

¹¹⁴ Joerger, A. C.; Gosse, C.; Fessner, W. D.; Schulz, G. E. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6033.

3.2.2. Sélectivité

Il a été remarqué une tolérance relativement élevée de la F1PA envers un certain nombre d'aldéhydes¹¹⁵ mais une grande sélectivité envers le DHAP¹¹⁶. Néanmoins, pour plusieurs aldéhydes, le diastéréoisomère *3R,4S* a été observé en plus du produit *3R,4R* attendu¹¹⁴. La formation de ces diastéréoisomères reste cependant cohérente avec le mécanisme proposé ci-dessus, c'est-à-dire la fixation du DHAP en premier lieu au site actif (avec encombrement de sa face *Si* par le polypeptide lui-même) puis l'arrivée de l'aldéhyde en second lieu. Quelques résultats d'aldéhydes testés avec la F1PA sont présentés Tableau 1 :

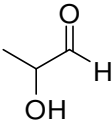

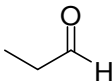
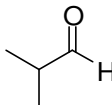
A. 	B. 	C. 	D. 
A : <i>rac</i> -lactaldéhyde <i>3R,4R</i> : <i>3R,4S</i>	B : Acétaldéhyde <i>3R,4R</i> : <i>3R,4S</i>	C : Propionaldéhyde <i>3R,4R</i> : <i>3R,4S</i>	D : Isobutyraldéhyde <i>3R,4R</i> : <i>3R,4S</i>
97 : 3	95 : 5	50 : 50	68 : 32

Tableau 1 : Ratios des produits obtenus lors de la réaction d'aldolisation catalysée par la F1PA avec différents aldéhydes

Si l'aldéhyde présente sa face *Si* ou sa face *Re* au carbanion attaquant, la réaction de condensation donnera le produit *3R,4R* ou *3R,4S* respectivement. Différents ratios ont été trouvés, dépendant des contraintes stériques de l'aldéhyde, de sa polarité, ou encore de la présence ou non de groupements à liaison hydrogène en α ou β du carbonyle.

Il est à noter que les aldéhydes portant un groupement hydroxyle en α du carbonyle fournissent exclusivement le produit *3R,4R*. De plus, l'enzyme a une forte préférence pour les aldéhydes α -hydroxylés de configuration L¹¹⁷ ; la F1PA sélectionne l'énantiomère L lors d'une réaction effectuée sous contrôle cinétique à partir du lactaldéhyde racémique.

Les modélisations du site actif ont révélé trois résidus proéminents (Tyr113', Phe131 et Tyr209') directement impliqués dans le positionnement de l'aldéhyde. Il a notamment été montré la possibilité de formation d'une liaison hydrogène entre le résidu Tyr113' et l'hydroxyle du lactaldéhyde, ce qui expliquerait pourquoi les substrats portant ce type de groupement ne donneraient que des produits *3R,4R*¹¹⁴. (Figure 68)

¹¹⁵ Fessner, W. D.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Dreyer, M.; Schulz, G. E.; Badia, J.; Aguilar, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555.

¹¹⁶ Arth, H.-L.; Fessner, W.-D. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 313.

¹¹⁷ Fessner, W. D.; Schneider, A.; Eyrisch, O.; Sinerius, G.; Badia, J. *Tet. Asym.* **1993**, *4*, 1183.

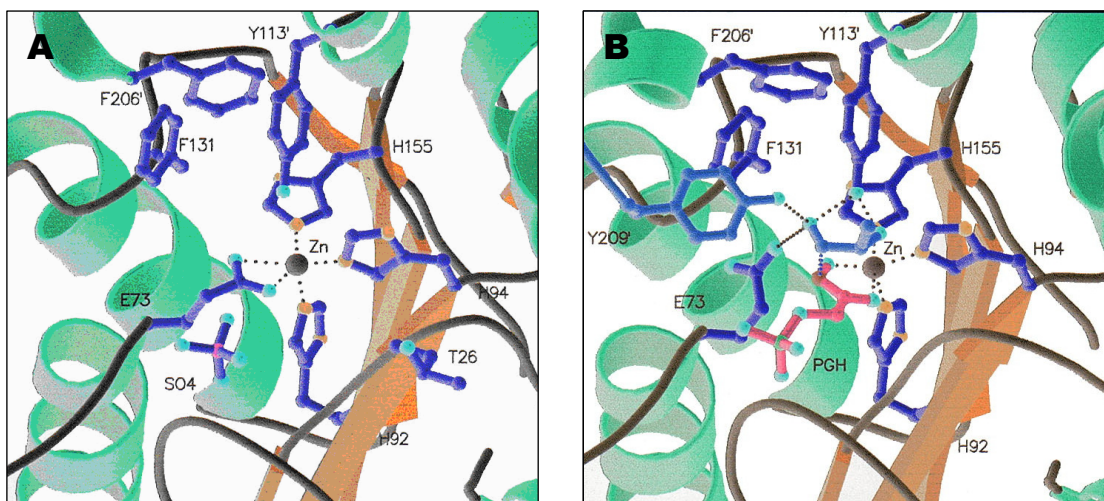


Figure 68 : Vue 2D du site actif de la F1PA sauvage (A) dans son état initial (B) complexé avec le phosphoglycolohydroxamate PGH et le L-lactaldéhyde

A la suite de ces découvertes, la sélectivité de la R1PA a elle aussi été étudiée. Les réactions catalysées par la R1PA et la F1PA étant relativement proches, les structures de ces deux enzymes de type II ont été comparées. Pour cela la séquence des 274 aminoacides de la R1PA a été alignée avec celle des 215 résidus de la F1PA. Il en résulte une homologie de séquence de 43 aminoacides, et parmi eux les résidus clés du site actif de la F1PA. Plusieurs observations ont aussi permis de conclure en un repliement de chaîne similaire¹¹⁸.

La superposition des sites actifs de la F1PA et R1PA en présence du composé PGH a montré une conservation du mode de liaison du DHAP à la protéine. Cela suggère que c'est un changement dans le positionnement de l'aldéhyde qui génère la différence de stéréochimie en C4 des produits de réaction de ces deux enzymes.

Dans ce contexte, deux hypothèses ont été envisagées (Figure 69) :

- Il a d'abord été suggéré une rotation de l'aldéhyde de 180° autour de sa liaison C4-O4 par rapport au mode de fixation de l'aldéhyde à la F1PA. Cependant, le site actif de la R1PA ne contient pas assez de place à gauche du carbonyle pour que cette rotation soit possible. De plus, l'absence d'un résidu équivalent à Tyr113', capable de former une liaison hydrogène avec le carbonyle de l'aldéhyde, laisse imaginer un positionnement différent de O4 dans le site actif de la R1PA.

- Il a par la suite été proposé une rotation de 180° de l'aldéhyde autour de sa liaison C4-C5. Cela permet au résidu Glu117 de R1PA de dé- et re-protonner les atomes C3 et O4, ce qu'accomplissait l'équivalent Glu73 de la F1PA¹¹⁹.

¹¹⁸ Kroemer, M.; Schulz, G. E. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, 58, 824.

¹¹⁹ Kroemer, M.; Merkel, I.; Schulz, G. E. *Biochemistry* **2003**, 42, 10560.

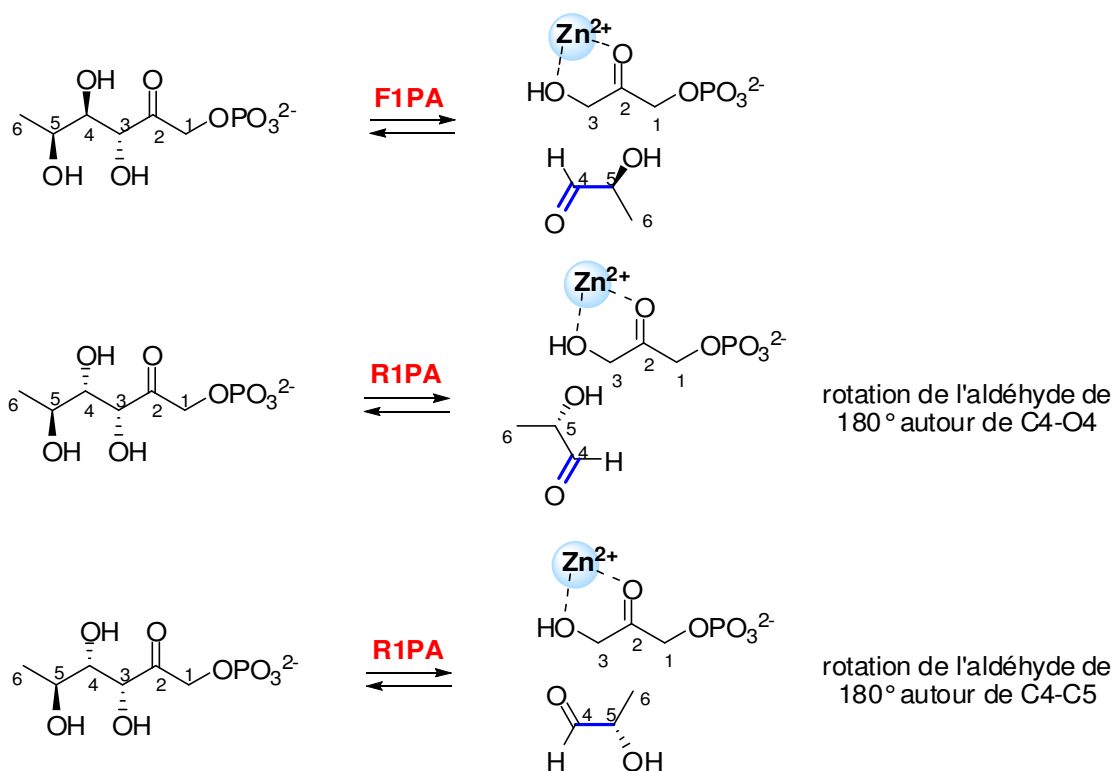


Figure 69 : Positionnements envisagés de l'aldéhyde vis-à-vis du DHAP pour les mécanismes de la R1PA et de la F1PA

De la même manière qu'avec la F1PA, une inversion de configuration au niveau du C4 lors de réactions catalysées par la R1PA a été observée. Ainsi, lors de travaux sur la formation d'iminopolyols par la R1PA en 2003, l'équipe du Pr. Clapés a obtenu des mélanges de stéréoisomères présentant les deux configurations *3R,4R* et *3R,4S*¹²⁰.

Les modélisations du site actif ont montré l'importance de la formation d'une liaison hydrogène entre le lactaldéhyde et le résidu Glu117 dans l'orientation du substrat naturel dans la poche catalytique. Cette interaction force l'approche de l'aldéhyde vers la forme énolate du DHAP par sa face *Re*. Lors de réaction mettant en jeu d'autres aldéhydes, l'absence de cette liaison hydrogène ou la présence d'autres interactions du substrat avec le site actif, peut changer la face d'approche de l'aldéhyde. La stéréochimie finale du produit de réaction sera alors modifiée¹²⁰.

4. Applications en synthèse

En synthèse organique, la réaction naturelle des DHAP-aldolases ne présente qu'un faible intérêt. Par contre, la très grande tolérance de ces enzymes vis-à-vis du substrat accepteur permet d'obtenir des monosaccharides d'intérêt. Ainsi, on peut par exemple aboutir à des sucres phosphorylés à chaîne courte intéressants (érythrose 1-phosphate, xylose-1-

¹²⁰ Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapes, P. *Chem Eur. J.* **2003**, *9*, 4887.

phosphate, etc)¹²¹. De nombreux sucres ou analogues de sucres porteurs de fonctions variées (groupements amino, nitro, azido, phosphono, ...) ont aussi pu être synthétisés¹²². Si l'aldéhyde utilisé est marqué au ¹⁴C, le produit dérivé pourra être utilisé comme marqueur en biosynthèse après déphosphorylation.

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase FBA est la première DHAP-aldolase à avoir été découverte, et elle est facilement accessible. Cette enzyme est donc logiquement la plus représentée en nombre de publications et d'utilisations en synthèse organique : production d'iminocyclitols, de désoxythiosucres, d'analogues de nucléosides et de composés naturels notamment.

Un bilan de ces synthèses a été illustré par L. El Blidi lors de son mémoire de thèse¹²³. Nous allons donc présenter uniquement les exemples d'utilisation de la FBA les plus récents, ainsi que quelques exemples de synthèses catalysées par la F1PA et la R1PA.

➤ Un exemple intéressant de réaction chimioenzymatique en cascade faisant intervenir une DHAP-aldolase est l'obtention en deux étapes d'aminocyclitols à partir d'aldéhydes nitrés. Cette méthodologie a déjà été exposée dans le chapitre précédent et reste un des exemples marquants d'obtention rapide d'inhibiteurs potentiels de glycosidases⁸⁸ (Figure 70).

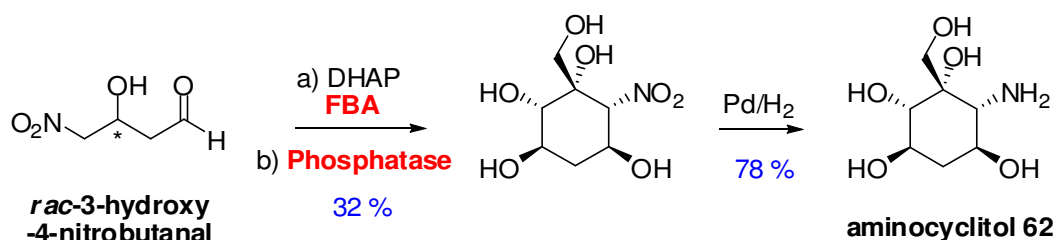


Figure 70 : Exemple d'obtention de l'aminocyclitol 62

➤ D'autres inhibiteurs de glycosidases ont récemment été obtenus par Calveras et coll. dont la hyacinthacine A2, qui a démontré une bonne inhibition de l' α -D-glucosidase de riz¹²⁴. Sa synthèse consiste en une chaîne réactionnelle de deux étapes : d'abord l'addition aldolique du DHAP au (*S*)-*N*-Cbz-prolinal catalysée par la R1PA, suivie d'une déphosphorylation par une phosphatase acide, puis la déprotection du groupement amine

¹²¹ Gefflaut, T.; Blonski, C.; Perie, J.; Willson, M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, *63*, 301.

¹²² Samland, A. K.; Sprenger, G. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 253.

¹²³ El Blidi, L.; Thèse de l'université Blaise Pascal n°501, **2006**

⁸⁸ (a) El Blidi, L.; Ahbala, M.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 2684. (b) El Blidi, L.; Crestia, D.; Gallienne, E.; Demuynck, C.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 2951.

¹²⁴ Calveras, J.; Casas, J.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1661.

déclenchant une cyclisation (Figure 71). Cette méthodologie n'a par contre pas pu être effectuée avec la FBA ou la F1PA qui n'acceptent pas l'aldéhyde de départ comme substrat.

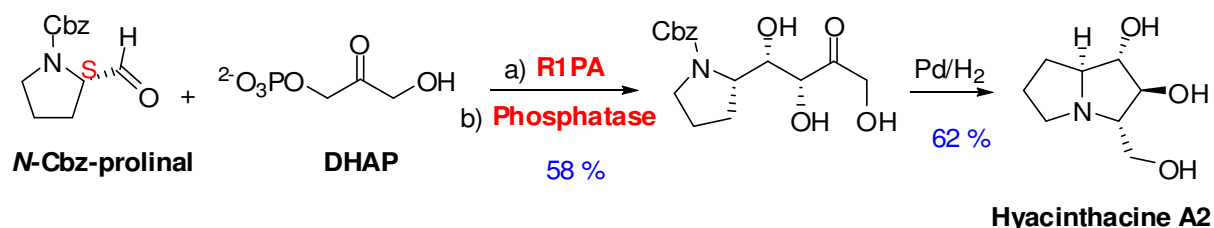


Figure 71 : Synthèse chimioenzymatique de la Hyacinthacine A2

➤ Une stratégie similaire a été conçue par la même équipe en 2009 pour la préparation de pyrrolidines polyhydroxylées (exemples Figure 72)¹²⁵. Certaines ont montré de bonnes inhibitions envers les α -L-fucosidases, des inhibitions modérées pour les α -D-rhamnosidases, et de faibles inhibitions pour les α -D-mannosidases. L'étape clé est l'addition aldolique du DHAP à des *N*-Cbz-aminoaldéhydes catalysée par la R1PA ou la F1PA.

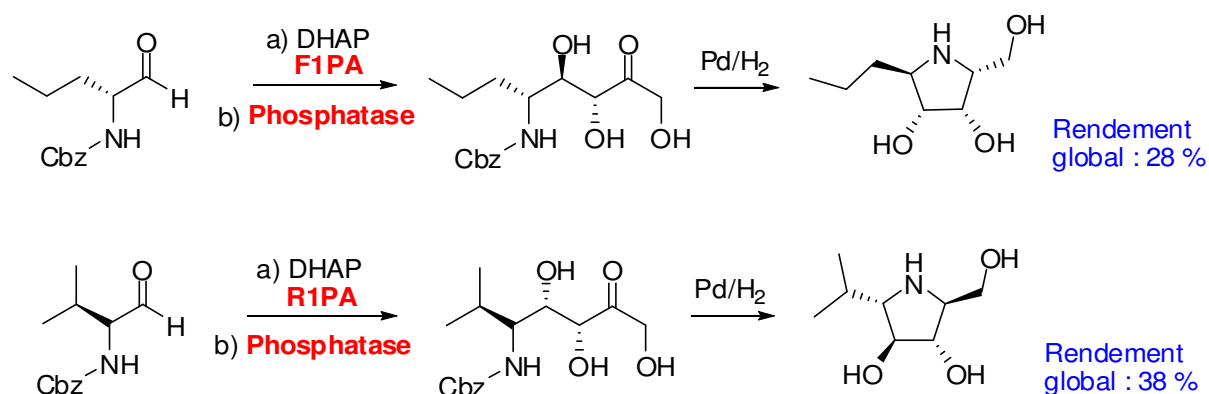


Figure 72 : Synthèse chimioenzymatique de pyrrolidines polyhydroxylées

➤ Des produits plus complexes peuvent être synthétisés à l'aide des DHAP-aldolases, comme l'analogue de la pancraïstatine **63**, produit avec intervention de la R1PA et décrit par Phung *et al.* en 2003 (Figure 73)¹²⁶.

¹²⁵ Calveras, J.; Egado-Gabas, M.; Gomez, L.; Casas, J.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7310.

¹²⁶ Phung, A. N.; Zannetti, M. T.; Whited, G.; Fessner, W. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4821.

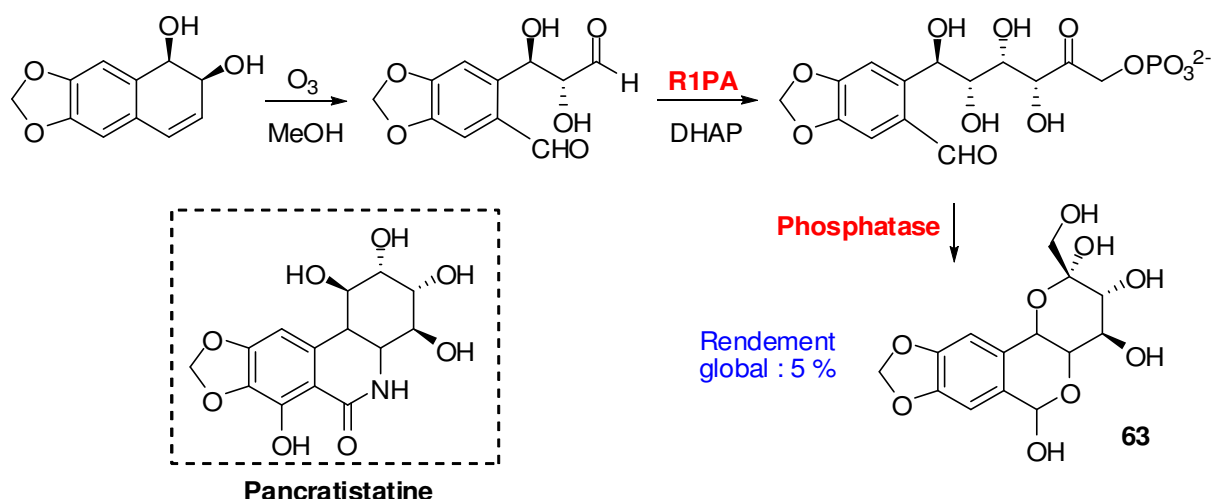


Figure 73 : Synthèse chimioenzymatique d'un analogue de la pancratistatine

En 2004, Crestia *et al.* ont utilisé quant à eux la FBA pour préparer des précurseurs de l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (KDO, Figure 74)¹²⁷.

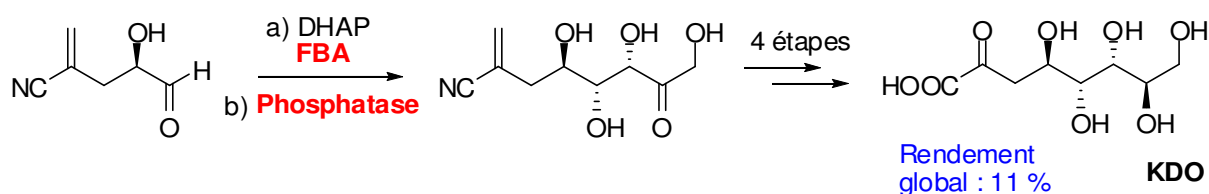


Figure 74 : Exemple de synthèse d'un produit à intérêt biologique, le KDO

III. Synthèse du DHAP

Comme il a été vu précédemment, les DHAP aldolases forment un groupe d'enzymes particulièrement bien connu et au potentiel de synthèse énorme. Elles tolèrent une grande variété d'accepteurs, la spécificité de substrat pouvant encore être adaptée par mutagenèse aléatoire et évolution dirigée. Cependant, elles sont très spécifiques du DHAP, composé cher et peu stable. La difficulté d'accès à cette molécule reste un frein aux applications industrielles des DHAP-aldolases.

Plusieurs voies de synthèse, chimiques et enzymatiques, ont été développées pour ce composé, et des alternatives à l'utilisation du DHAP ont été envisagées¹²⁸.

¹²⁷ Crestia, D.; Demuynck, C.; Bolte, J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2417.

¹²⁸ Schumperli, M.; Pellaux, R.; Panke, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 33.

1. Stabilité du DHAP

L'un des inconvénients majeurs du DHAP est sa faible stabilité chimique dans l'eau : sa dégradation est initiée par une déprotonation, suivie par l'élimination du groupement phosphate. Cette élimination se produit à pH physiologique, pour donner le méthylglyoxal (Figure 75). Le temps de demi-vie du DHAP, calculé à pH neutre ou légèrement basique, se situe entre 3 et 30 heures selon la température (37°C et 25°C respectivement).

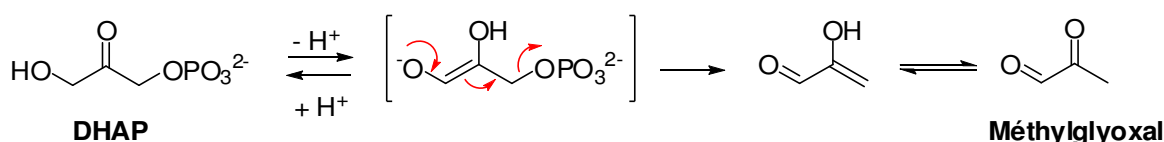


Figure 75 : Dégradation chimique du DHAP

En 2006, Suau *et al.* ont montré que cette dégradation se produisait chimiquement, mais aussi enzymatiquement lors de l'utilisation d'aldolases de type II¹²⁹. En effet, l'énediolate intermédiaire est aussi impliqué dans le mécanisme catalytique des aldolases de type II. Il forme un complexe avec l'ion métallique du site actif de l'enzyme. Un contrôle de la température permet cependant de rendre négligeable cette dégradation enzymatique qui ralentit très fortement si la réaction se déroule à 4°C.

2. Synthèse chimique

Ce manque de stabilité a influencé les stratégies de synthèse du DHAP. En synthèse chimique, les efforts se sont par exemple concentrés sur la production d'un précurseur facile à stocker et rapidement convertible en DHAP. Le DHAP doit aussi être obtenu suffisamment pur pour être utilisé directement en synthèse.

Dans la littérature, on retrouve essentiellement les voies de synthèse de trois précurseurs stables du DHAP.

✓ Le premier intermédiaire est le dimère cyclique 2,5-diéthoxy-*p*-dioxane-2,5-diméthanol-*O*-2-*O*-5-bisphosphate, DDDP₂. Il est accessible en plusieurs étapes à partir de la dihydroxyacétone DHA peu onéreuse. Plusieurs séquences réactionnelles ont été décrites ; la plus récente est basée sur l'acétalisation de la DHA, suivie d'une phosphorylation par le *N,N*-diéthylphosphoramidite dibenzylé, d'une oxydation, et d'une hydrogénolyse. L'intermédiaire DDDP₂ est obtenu avec un rendement global de 73 %, et donne accès au DHAP par une simple hydrolyse acide, ou par chauffage¹³⁰.

¹²⁹ Suau, T.; Alvaro, G.; Benaiges, M. D.; Lopez-Santin, J. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 48.

¹³⁰ Jung, S. H.; Jeong, J. H.; Miller, P.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7182.

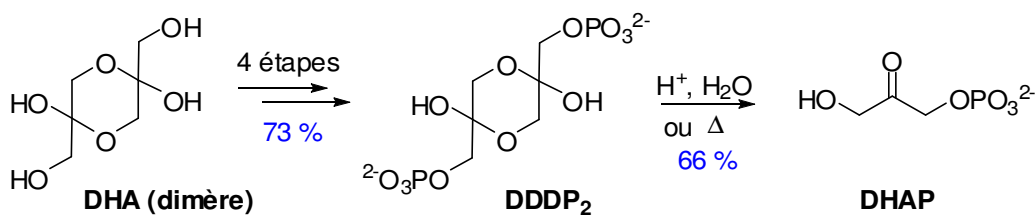
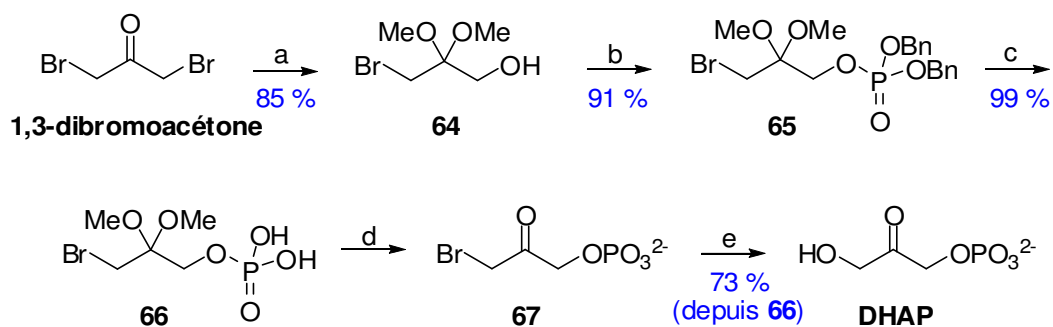


Figure 76 : Synthèse chimique du DHAP avec le DDDP₂ comme intermédiaire

Cette voie de synthèse présente l'avantage de produire un précurseur stable du DHAP avec un bon rendement, mais la dernière étape d'hydrolyse reste un problème et ne donne accès au DHAP qu'avec un rendement d'environ 66 %. Le rendement global de cette voie de synthèse est donc de 48 %.

✓ Un autre précurseur stable du DHAP est son acétal phosphorylé monomérique. Il peut être obtenu en plusieurs étapes, notamment à partir de l'acétone ou de la DHA :

- La bromation acide de l'acétone donne accès au 1,3-dibromoacétone, également disponible commercialement. L'acétalisation en milieu basique permet à la fois la protection du carbonyle et la désymétrisation de la molécule. La phosphorylation du composé **64** a été réalisée par du phosphoriodidate dibenzylé DBPI, généré à partir de tribenzyle phosphite et de diiode. Les groupements benzyles sont facilement éliminés par hydrogénation sur charbon palladié pour donner l'intermédiaire stable **66**, conservable plusieurs mois à -20°C. Le DHAP est alors obtenu par hydrolyse de ce précurseur, suivi d'un traitement basique. Le rendement global de cette séquence réactionnelle est de 56 %¹³¹. (Figure 77)

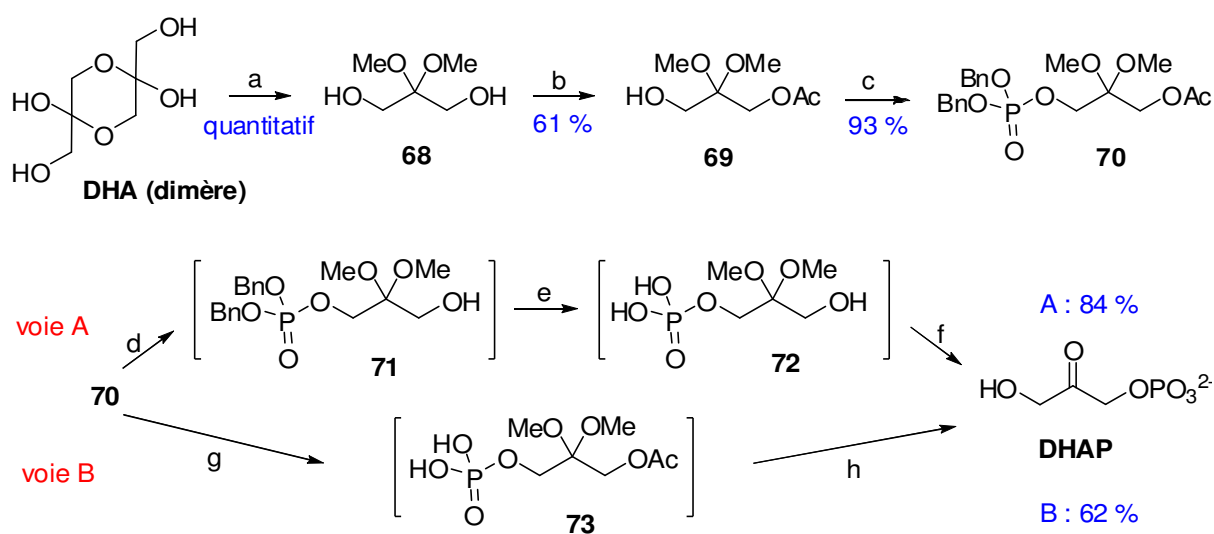


(a) MeONa, MeOH ; (b) P(OBn)₃, I₂, Pyr, CH₂Cl₂ ; (c) H₂, Pd/C, MeOH ; (d) H₂O, 65 °C ; (e) NaOH.

Figure 77 : Synthèse chimique du DHAP à partir du 1,3-dibromoacétone

¹³¹ Gefflaut, T.; Lemaire, M.; Valentin, M. L.; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5920.

- La DHA est facilement transformée en son acétal diméthylé par action du triméthylorthoformiate en milieu acide. Dans une seconde étape, la mono-fonctionnalisation du diol est effectuée via une lipase. L'enzyme catalyse une transestérification en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle. Parmi les enzymes testées, la lipase Amano de *Pseudomonas fluorescens* a donné les meilleurs résultats. La phosphorylation du composé **69** est exécutée en suivant le même protocole que celui décrit Figure 77. L'intermédiaire **70** peut être conservé plusieurs mois sans dégradation et donne accès au DHAP avec de bons rendements. (Figure 78 **Error! Reference source not found.**)



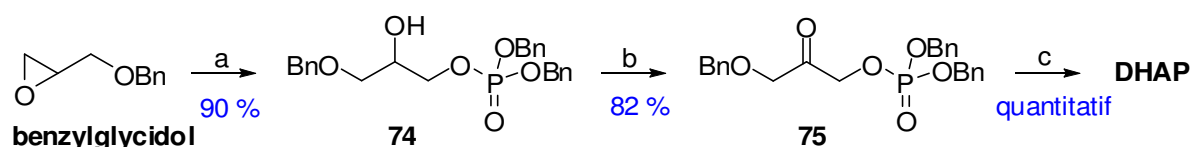
(a) HC(OMe)₃, MeOH, TsOH ; (b) lipase AK, vinyl acétate, *i*Pr₂O ; (c) P(OBn)₃, I₂, Pyr, CH₂Cl₂ ; (d) NaOH, MeOH ; (e) H₂, Pd/C, MeOH ; (f) H₂O, 45°C ; (g) H₂, Pd/C, MeOH ; (h) H₂O, 65 °C.

Figure 78 : Synthèse chimique du DHAP à partir du DHA

Deux voies de synthèse peuvent être suivies à partir du composé **70**. Par le chemin A, 3 réactions consécutives sont accomplies sans isolement des intermédiaires : une hydrolyse basique du groupement ester, une hydrogénation des groupements benzyles sur Pd/C et l'hydrolyse de l'acétal par chauffage dans l'eau. En suivant le chemin réactionnel B, le DHAP est obtenu en seulement deux étapes : l'hydrogénation des benzyles et l'hydrolyse simultanée des groupements ester et acétal. Selon la méthode A, le DHAP est obtenu avec 84 % à partir de la molécule **70**, soit un rendement global de 47 % depuis la DHA. Par la méthode B, le DHAP est obtenu avec 62 % de rendement (soit un rendement global de 35 %). Cette dernière est plus directe que la voie A, mais malheureusement la cinétique de l'hydrolyse de l'ester est plus lente que celle du phosphate ce qui donne un moins bon rendement¹³².

¹³² Charmantray, F.; El Blidi, L.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Bolte, J.; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9310.

✓ Enfin une synthèse d'un précurseur benzylé du DHAP, facilement réalisable à l'échelle du gramme, a été publiée en 2006 par Meyer *et al.*¹³³. Le réactif de départ utilisé est le benzylglycidol racémique. L'ouverture régiosélective de l'époxyde suivie par l'oxydation de l'alcool secondaire mène au dibenzyl-3-benzylhydroxyacétone phosphate **75**, composé stable facile à stocker. Cet intermédiaire, obtenu avec un rendement global de 74 %, est quantitativement hydrogéné en DHAP, ce qui fait de cette voie de synthèse une méthode efficace de production de ce dernier. Cependant, il est à noter que cette méthode nécessite des quantités stœchiométriques de l'acide de Lewis CuI (ouverture de l'époxyde), du *N*-oxyde-*N*-méthylmorpholine NMO (oxydation de l'alcool), et une utilisation importante du catalyseur tetrapropylammonium perruthénate TPAP relativement cher. De plus, pour l'avoir testé dans notre laboratoire, cette méthode est difficilement applicable à grande échelle. La formation de la molécule **74** s'accompagne de régioisomères difficilement séparables par chromatographie.



(a) HOP(O)(OBn)₂, CuI, CH₂Cl₂ ; (b) TPAP, NMO, CH₂Cl₂ ; (c) H₂, Pd/C, MeOH/H₂O.

Figure 79 : Synthèse chimique du DHAP à partir du benzylglycidol

3. Synthèse enzymatique

Le DHAP comportant plusieurs groupements fonctionnels, sa synthèse chimique requière une procédure multiétapes et souvent plusieurs jours de travail. La purification des différents intermédiaires et les étapes de protection-déprotection sont de plus responsables de rendements globaux relativement faibles. Dans ce contexte, la mise au point de protocoles enzymatiques apparaît tout à fait appropriée (pas de protection des groupements fonctionnels, désymétrisation aisée). Le DHAP serait ainsi accessible rapidement et sans l'utilisation de réactifs ou catalyseurs toxiques.

L'ensemble des voies de synthèses enzymatiques développé jusqu'à aujourd'hui suit la même stratégie : utilisation d'un précurseur non phosphorylé peu cher puis transfert du phosphate à partir d'un donneur, tel l'adénosine triphosphate ATP.

3.1. Régénération de l'ATP

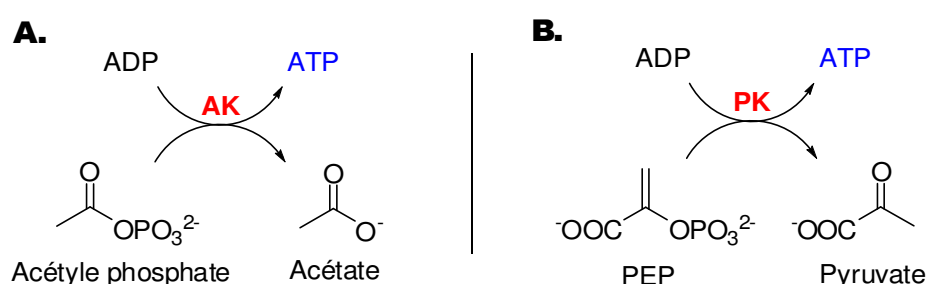
L'ATP étant onéreux, sa régénération est un point important à développer. Deux stratégies ont principalement été utilisées lors de la synthèse du DHAP¹³⁴ :

¹³³ Meyer, O.; Ponaire, S.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4347.

¹³⁴ Zhao, H. M.; van der Donk, W. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583.

- Régénération de l'ATP à partir de l'acétyl phosphate et de l'acétyl kinase AK.
- Régénération de l'ATP à partir du phosphoénol pyruvate PEP et de la pyruvate kinase PK.

Chacun de ces systèmes comporte ses avantages et ses inconvénients. L'acétyl phosphate est facile à préparer, et est aussi disponible commercialement, mais il est très instable. A l'inverse, le phosphoénol pyruvate est un composé plutôt stable mais il est plus laborieux et cher à produire. De plus, le pyruvate formé lors de la régénération de l'ATP agit comme un inhibiteur compétitif de la kinase avec, par exemple, un K_i d'environ 10 mM dans le cas de l'enzyme issue des muscles des mammifères¹³⁵ (Figure 80).



**Figure 80 : Système de régénération de l'ATP par
(A) : l'acétyl kinase, (B) : la pyruvate kinase**

3.2. Synthèse du DHAP *via* le glycerol-3-phosphate

3.2.1. A partir du glycérol

Une voie d'obtention du DHAP résulte en la phosphorylation du glycérol en L-glycérol-3-phosphate suivie de son oxydation. Bien que cette séquence réactionnelle requière deux étapes enzymatiques, elle présente l'avantage d'avoir l'intermédiaire L-glycérol-3-phosphate stable qui peut être conservé. L'étape d'oxydation est quant à elle simple à mettre en œuvre.

La première étape de cette voie de synthèse est la formation du glycérol phosphorylé. Ce dernier est chiral, et la L-glycérol phosphate oxydase (L-GPO), utilisée pour convertir le glycérol phosphate en DHAP, est sélective du L-glycérol-3-phosphate. Par conséquent, un mélange racémique peut au maximum fournir le DHAP avec un rendement de 50 %. Néanmoins le glycérol est un réactif peu cher, et cette perte peut donc passer pour tolérable.

¹³⁵ Hirschbein, B. L.; Mazenod, F. P.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3765.

Schoevaart *et coll.* ont ainsi mis au point une conversion quantitative du pyrophosphate en glycérol phosphate racémique à partir du glycérol¹³⁶. L'enzyme utilisée, une phosphatase, est la phytase commerciale d'*Aspergillus ficuum*. Pour obtenir le DHAP, le L-glycérol-3-phosphate doit alors être oxydé par la L-GPO qui consomme de l'oxygène et produit du peroxyde d'hydrogène. Durant cette procédure, l'inactivation de la GPO par le peroxyde d'hydrogène est évitée par l'addition d'une catalase qui consomme celui-ci pour redonner de l'oxygène et de l'eau. L'utilisation de ces deux enzymes a été optimisée : elles ont été co-immobilisées sur matrice polymère (EupergitC250L®). Cette immobilisation a permis une augmentation de stabilité des enzymes. De plus, elles peuvent ainsi être réutilisées sans perte d'activité¹³⁷.

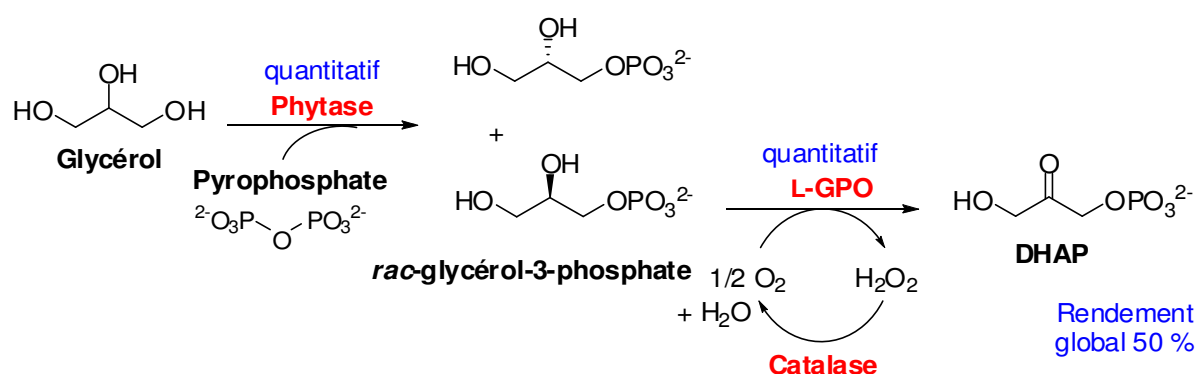


Figure 81 : Synthèse enzymatique du DHAP avec la phytase à partir du glycérol

L'utilisation de la glycérol kinase à la place de la phytase permet d'obtenir uniquement le L-glycérol-3-phosphate avec de bons rendements¹³⁸. Cependant, dans ce cas, le donneur de phosphate est de nouveau l'ATP et non l'économique pyrophosphate.

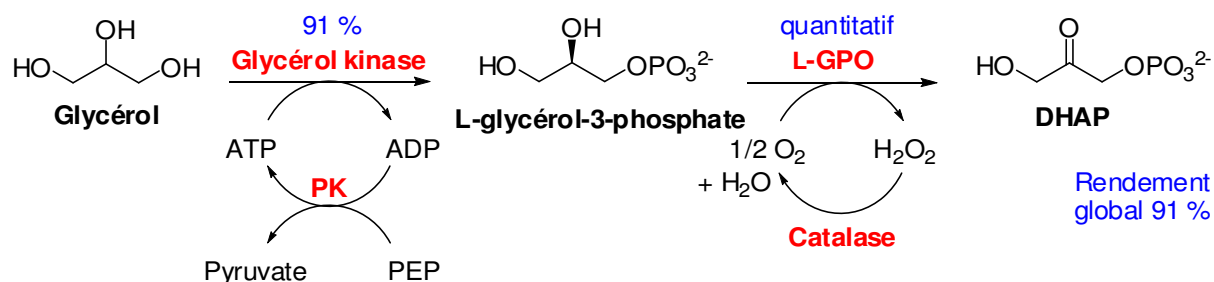


Figure 82 : Synthèse enzymatique du DHAP avec la glycérol kinase à partir du glycérol

¹³⁶ Schoevaart, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6940.

¹³⁷ Kramer, L.; Steckhan, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14645.

¹³⁸ Hettwer, J.; Oldenburg, H.; Flaschel, E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19*, 215.

3.2.2. A partir du glycidol

Charmantray *et coll.* ont couplé réactions chimique et enzymatique pour former en deux étapes le DHAP désiré¹³⁹. En partant du *rac*-glycidol, peu cher et commercial, l'ouverture régiosélective de l'époxyde par Na₂HPO₄ donne accès au glycérol-3-phosphate racémique. L'énantiomère L est alors oxydé quantitativement par la L-GPO en présence d'une catalase, comme vu précédemment.

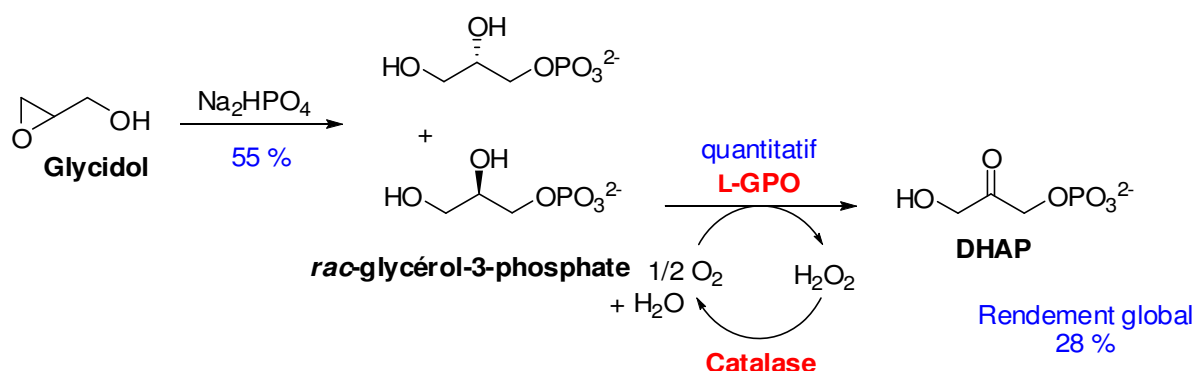


Figure 83 : Synthèse enzymatique du DHAP à partir du glycidol

3.3. Synthèse du DHAP à partir de la DHA

L'approche la plus directe pour former le DHAP utilise comme produit de départ le monomère de la DHA, qui se forme après dissolution de son dimère dans l'eau.

En 1983, Wong et Whitesides ont exploité le peu de spécificité de substrat des glycérol kinases pour produire le DHAP à partir de la DHA et d'ATP¹⁴⁰. La glycérol kinase de *Saccharomyces cerevisiae* a permis notamment d'obtenir le DHAP à l'échelle du gramme en 16 heures, avec un rendement de 83 %¹⁴¹.

Ces enzymes ont été par la suite remplacées par les dihydroxyacétone kinases (DHAK). Avec des activités spécifiques aux alentours de 20 U/mg et des K_M pour la DHA de valeurs souvent inférieures à 100 μM, ces enzymes se montrent bien plus efficaces pour la production de DHAP¹⁴².

En 2004, Sanchez-Moreno *et al.* ont décrit la surexpression dans *E. coli* de la DHAK issue de la bactérie *Citrobacter freundii* et son utilisation dans un système multienzymatique¹⁴³. Lors de ces travaux, la phosphorylation de la DHA a été couplée à une

¹³⁹ Charmantray, F.; Dellis, P.; Samreth, S.; Hecquet, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3261.

¹⁴⁰ Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3199.

¹⁴¹ Crans, D. C.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7019.

¹⁴² Itoh, N.; Tujibata, Y.; Liu, J. Q. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 193.

¹⁴³ Sanchez-Moreno, I.; Garcia-Garcia, J. F.; Bastida, A.; Garcia-Junceda, E. *Chem. Commun.* **2004**, 1634.

condensation aldolique catalysée par une DHAP-aldolase. Le système est complété par une régénération *in situ* de l'ATP, catalysée par l'acétate kinase AK.

Après optimisation des conditions, le DHAP est obtenu avec plus de 95 % de rendement en seulement 2 heures. Il peut être directement consommé lors d'une réaction enzymatique (condensation par une DHAP aldolase par exemple), limitant ainsi toute perte par dégradation. L'ATP est uniquement ajouté en quantité catalytique, ce qui évite l'accumulation d'ADP qui est un inhibiteur de la DHAK. Le système de régénération choisi pour l'ATP utilise l'acétate kinase car il présente plusieurs avantages : la facilité d'obtention de l'acétyle phosphate comme donneur de phosphate, et l'inertie chimique de l'acétate de sodium relargué dans le milieu.

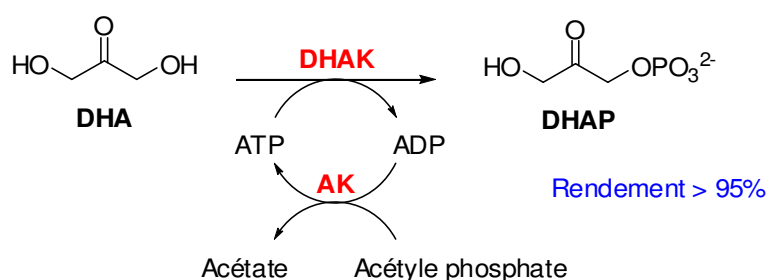


Figure 84 : Synthèse enzymatique du DHAP à partir du DHA

IV. Alternatives au DHAP

Indirectement, au travers des différentes méthodes illustrées ci-dessus, il ressort que la production du DHAP représente toujours une grande contrainte. Ces difficultés ont motivé les chercheurs à trouver de nouvelles approches, qui permettraient l'exploitation des possibilités de stéréochimies des aldolases, tout en évitant la synthèse du DHAP.

Deux principales options ont été considérées :

- Garder le jeu de DHAP-aldolases disponibles en utilisant un analogue du donneur plus facile à obtenir,
- Modifier les enzymes existantes ou chercher dans la diversité biologique de nouvelles enzymes aboutissant à des stéréochimies similaires mais ne requérant pas de donneur phosphorylé.

1. Utilisation d'analogues du DHAP

Comme il a déjà été indiqué précédemment, les DHAP-aldolases sont très spécifiques de leur donneur et ne tolèrent pas de modification substantielle de celui-ci. Dans certains cas, il est cependant possible d'effectuer de faibles modifications de structure, notamment en C1.

Ainsi, le changement de l'ester phosphorylé par un phosphonate a été envisagé (Figure 85). Cette modification entraîne tout de même une réduction de 90 % de l'activité enzymatique, et n'est acceptée que par la F1PA et la R1PA. L'analogue 4-hydroxy-3-oxobutylphosphonate est de plus synthétisé en plusieurs étapes à partir du 4-éthoxy-1-hydroxybutane-2-one avec seulement 59 % de rendement global¹¹⁶, ce qui ne présente aucun avantage par rapport à la synthèse du DHAP. Cette approche, n'aidant pas à la synthèse préparative de sucres, a rapidement été abandonnée.

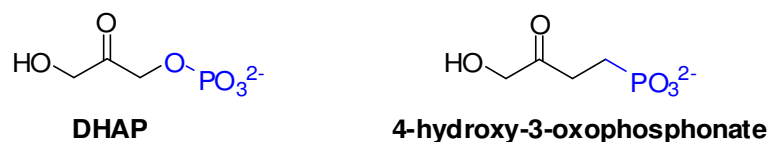


Figure 85 : Le DHAP et son analogue phosphonate

Un autre exemple de modification tolérée en C1 est la substitution du phosphoester de la DHA par un arsenate ester (Figure 86). Ce dernier se forme spontanément et de manière réversible en solution aqueuse à partir de la DHA et d'arsenate, ce qui présente un grand avantage comparé à la synthèse laborieuse du DHAP. L'efficacité de ce système a été démontrée avec la FBA¹⁴⁴, la R1PA et la F1PA¹⁴⁵. Néanmoins, cette méthode souffre de la nécessité d'une concentration élevée en arsenate hautement toxique dans le milieu, ce qui ne rend pas cette méthode adaptable à une échelle préparative.

Plus récemment, Wong *et al.* ont reporté la substitution du phosphoester par un borate ester, lui aussi formé *in situ*, à partir de la DHA et d'un tampon borate en solution aqueuse (Figure 86). Ce mime du DHAP est très bien accepté par la R1PA. Par cette méthode, le L-fructose a été synthétisé à l'échelle du gramme avec un rendement de 92 %¹⁴⁶.

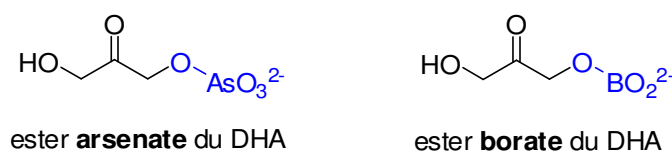


Figure 86 : Esters utilisés en mime du DHAP

2. Utilisation de nouvelles enzymes

Devant les difficultés d'utilisation des DHAP aldolases, les chercheurs ont continué leurs investigations pour découvrir de nouvelles enzymes aux propriétés de synthèse

¹¹⁶ Arth, H.-L.; Fessner, W.-D. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 313.

¹⁴⁴ Schoevaart, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4559.

¹⁴⁵ Drucekhammer, D. G.; Durrwachter, J. R.; Pederson, R. L.; Crans, D. C.; Daniels, L.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 70.

¹⁴⁶ Sugiyama, M.; Hong, Z.Y.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C. H. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2555.

intéressantes, et qui ne nécessiteraient pas de donneur phosphorylé. Ces nouvelles enzymes peuvent être issues soit de l'environnement, soit du jeu d'enzymes existantes modifiées par évolution dirigée.

Il est cependant important de noter que le site de fixation du phosphate est le site le plus conservé chez les DHAP-aldolases¹⁴⁷, ce qui laisse supposer une importance du groupement phosphate dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. Essayer d'éliminer la nécessité de ce groupement par évolution dirigée s'avère donc une tâche difficile. En 2007, l'équipe du Pr Wong a reporté le développement d'un système de sélection *in vivo* pour de l'évolution dirigée de la RIPA¹⁴⁸. Le but de ce projet est de générer un mutant capable d'accepter le DHA comme donneur à la place du DHAP. Les travaux sur la modification de la spécificité de substrat de cette aldolase sont toujours en cours.

En 2001, l'équipe du Pr. Sprenger a finalement découvert par hasard chez *E. coli* une nouvelle aldolase non DHAP-dépendante : la fructose-6-phosphate aldolase (FSA)¹⁴⁹. C'est au cours de recherches d'une transaldolase que l'activité de cette enzyme a été mise à jour.

2.1. La FSA

2.1.1. Description

Les premiers travaux publiés par Sprenger *et coll.* ont montré que la fructose-6-phosphate aldolase de *E. coli* catalyse la formation du fructose-6-phosphate (F6P) à partir de la dihydroxyacétone (DHA) et du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) (Figure 87). C'est d'ailleurs d'après cette réaction étudiée initialement que cette nouvelle aldolase a été nommée.

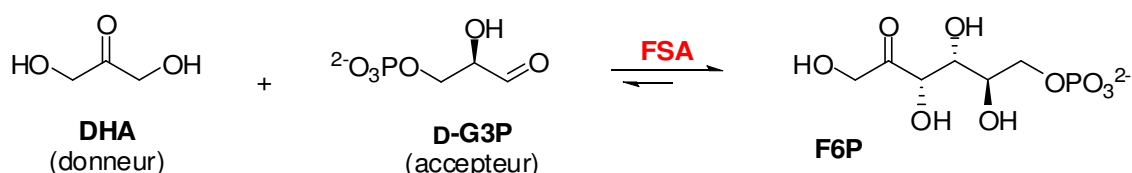


Figure 87 : Réaction de formation du fructose-6-phosphate catalysée par la FSA

Au cours de la réaction, il y a formation d'une liaison C-C avec création de deux carbones asymétriques de configuration 3*S*,4*R*. Cette stéréochimie est identique à celle obtenue par la FBA. La FSA tend actuellement à supplanter cette dernière puisqu'elle supprime l'inconvénient de l'utilisation du DHAP ainsi que la nécessité d'une déphosphorylation en fin d'aldolisation. De plus, de la même manière que la FBA, la FSA présente une grande tolérance vis-à-vis des aldéhydes accepteurs, ce qui en fait un outil puissant pour la synthèse.

¹⁴⁷ Nagano, N.; Orengo, C. A.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 741.

¹⁴⁸ Sugiyama, M.; Hong, Z.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5905.

¹⁴⁹ Schurmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055.

Les constantes cinétiques de la FSA vis-à-vis des substrats cités Figure 87 ont été déterminées¹⁴⁹ :

	DHA	G3P	F6P
K_M (mM)	32	0,8	9
kcat	116	173	27
kcat/K_M (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	4	216	3

Tableau 2 : Constantes cinétiques de la FSA vis-à-vis de ses substrats naturels

On remarque que la constante de Michaelis-Menten (K_M) de la FSA pour la DHA est de 32 mM, tandis qu'elle est de 0,8 mM pour le G3P et de 9 mM pour le F6P. L'affinité de la FSA est donc bien meilleure pour le G3P que pour la DHA. La réaction étant largement favorisée dans le sens de la formation (comme c'est le cas pour les DHAP-aldolases), le kcat/K_M du F6P est relativement faible.

Par la suite, trois autres substrats donneurs ont été découverts : l'hydroxyacétone (HA) par l'équipe du Pr. Sprenger¹⁵⁰, le 1-hydroxy-2-butanone (HB) par celle du Pr. Wong¹⁵¹ et le glycolaldéhyde (GA) conjointement par notre équipe et celle du Pr. Clapés¹⁵². Ceci est tout à fait remarquable car les aldolases présentent généralement une très grande spécificité vis-à-vis de leur substrat donneur. Ainsi, au-delà de l'intérêt de pouvoir utiliser la DHA et non le DHAP comme substrat donneur, la FSA apparaît comme une aldolase aux multiples possibilités de synthèse.

Le tableau suivant présente les paramètres cinétiques des quatre donneurs connus de la FSA avec le G3P comme accepteur :

	K _M (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/K _M (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
HA	17,4 ± 0,5	2527	145
DHA	32 ± 2	116	4
GA	0,2 ± 0,05	16,5	83
HB	32 ± 17	0,63	20

Tableau 3 : Constantes cinétiques des différents donneurs de la FSA

¹⁴⁹ Schurmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 11055

¹⁵⁰ Schurmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19, 247.

¹⁵¹ Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P. H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14811.

¹⁵² Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guerard-Helaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapes, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5521.

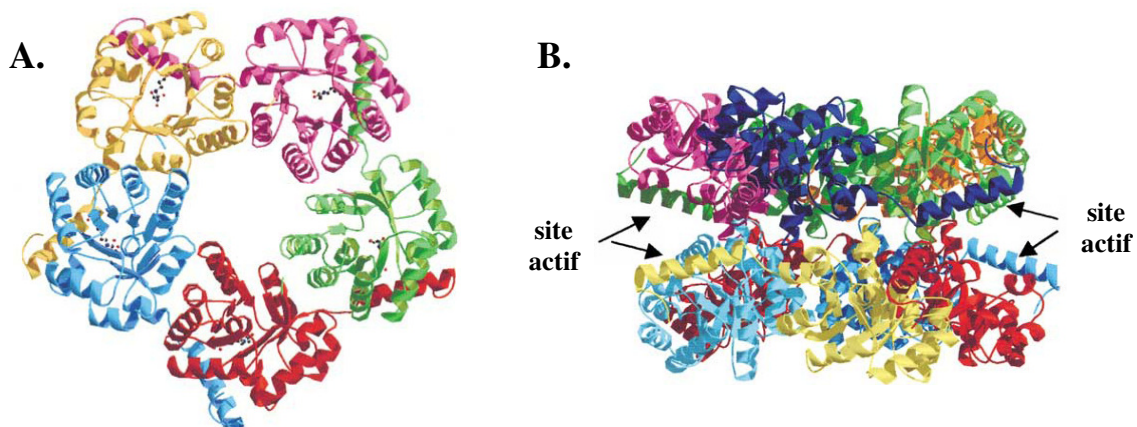
On remarque que le HA est le meilleur donneur, puis ensuite le GA, bien devant le HB et finalement la DHA. Ces résultats sont étonnants car ils désignent les composés GA et HA comme étant de meilleurs substrats que le substrat supposé au départ naturel, la DHA.

A la lecture de ces propriétés catalytiques, il devient difficile de conclure sur le rôle exact de cette aldolase chez *E. coli*. Elle pourrait tout aussi bien être impliquée dans une voie métabolique où l'on trouve l'arabinose-5-phosphate, tout comme il pourrait s'agir d'activité catalytique de promiscuité. Sa « vraie » réaction naturelle demeure donc inconnue.

La découverte la plus originale concerne le glycolaldéhyde en tant que très bon donneur. Sa condensation permet la formation d'aldoses polyfonctionnels souvent difficiles à obtenir par voie chimique. De manière enzymatique, seule la DERA permettait jusqu'alors la formation d'aldoses ; son utilisation était cependant limitée à cause des faibles taux de conversion des substrats non phosphorylés.

2.1.2. Structure

La FSA a été cristallisée et sa structure déterminée par diffraction des rayons X¹⁵³. C'est un décimère de masse moléculaire 257(±20) kDa résultant de l'association de deux pentamères identiques, superposés l'un sur l'autre en forme d'anneau. (Figure 88)



**Figure 88 : A. Vue du dessus de l'assemblage de sous unités de la FSA en pentamère
B. Décimère résultant de l'association de deux pentamères vu de côté**

Chaque pentamère est formé de cinq sous-unités de masse moléculaire 23 kDa chacun. L'hélice C-terminale d'un monomère s'insère dans le site actif de la sous-unité adjacente conférant à la FSA une grande rigidité, stabilité et thermostabilité. (Figure 89)

¹⁵³ Thorell, S.; Schurmann, M.; Sprenger, G. A.; Schneider, G. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 161.

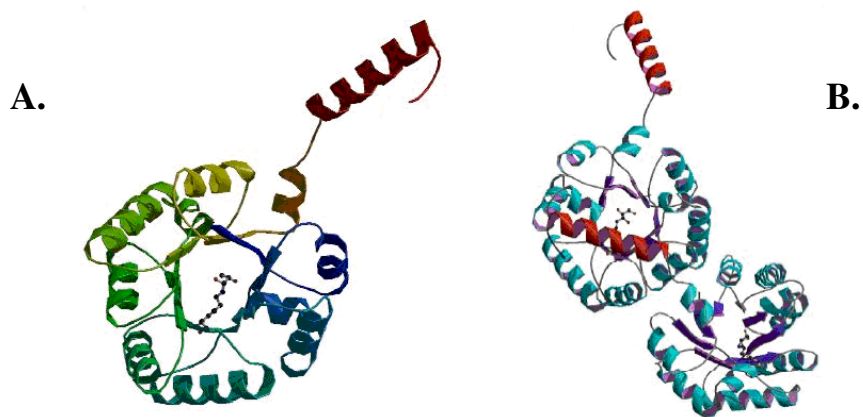


Figure 89 : A. Monomère de la FSA coloré en rouge au niveau de sa chaîne C-terminale
B. Interactions de l'hélice C-terminale dans le site actif voisin

Au niveau mécanistique, c'est une aldolase de classe I. En effet, elle n'est pas inhibée par l'EDTA, ce qui révèle un mode d'action indépendant d'ion métallique. De plus, le résidu lysine 85 est essentiel à son activité, l'échange de la lysine en arginine entraînant une perte totale d'activité.

2.1.3. Modification des propriétés catalytiques de la FSA

Au regard des valeurs des k_{cat}/K_M données précédemment, la FSA fonctionne environ 40 et 20 fois mieux avec HA et GA respectivement, qu'avec la DHA comme donneur. Dans la mesure où cette faible réactivité envers la DHA limite les champs d'application en synthèse, les recherches se sont rapidement portées sur l'obtention de mutants de l'aldolase. L'objectif de ces travaux visait à modifier la spécificité de substrat de la FSA de manière à compléter les possibilités de réactions.

Après étude du site actif de la FSA, Schürmann et Sprenger ont envisagé de modifier le site actif de la FSA, dans le but de changer son activité native d'aldolase en l'activité d'une transaldolase. D'après la structure cristallographique de la FSA, les résidus Leu107 et Ala129 ont été identifiés comme probablement impliqués dans le positionnement, au sein du site actif, du groupement hydroxyle en C1 du substrat donneur. C'est pourquoi trois mutants de la FSA ont été construits par mutagenèse dirigée : deux d'entre eux ne présentent que la modification d'un résidu (A129S et L107N) alors que le troisième comporte deux échanges de résidus (L107N/A129S).

De manière intéressante, aucune activité de transaldolase n'a finalement été observée mais le mutant A129S a présenté des propriétés catalytiques envers la DHA, le D-G3P et le D-F6P remarquablement améliorées. Ainsi, le potentiel de synthèse de ce mutant vient compléter celui de la FSA naturelle. Il est probable que le résidu sérine du mutant permette la formation de liaisons hydrogènes qui stabilisent la DHA dans le site actif de l'enzyme. Ce

résidu est sans doute aussi impliqué dans la stabilisation de la base de Schiff intermédiaire lors du mécanisme catalytique.

La valeur du k_{cat}/K_M de l'enzyme mutante pour la DHA s'est trouvée être 17 fois supérieure à celle de la FSA naturelle. Son efficacité envers les donneurs GA et HA a par contre été diminuée¹⁵⁴ (Tableau 4). Cette différence de spécificité des deux enzymes en fait donc des biocatalyseurs complémentaires de synthèse.

	FSA A129S	FSA
K_M (DHA) (mM)	11 ± 1	32 ± 2
k_{cat}/K_M (DHA) (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	69	4
K_M (HA) (mM)	22 ± 3	17.4 ± 0.5
k_{cat}/K_M (HA) (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	41	145
K_M (GA) (mM)	0.18 ± 0.02	0.2 ± 0.05
k_{cat}/K_M (GA) (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	25	83

Tableau 4 : Comparaison des constantes cinétiques du mutant A129S à la FSA

2.2. Utilisation en synthèse

Grâce à sa grande tolérance en substrat, la FSA a été utilisée avec succès pour la synthèse de différents composés polyhydroxylés, tels les iminosucres, les saccharides et leurs analogues. Ces molécules, souvent d'intérêt thérapeutique, ont été obtenues en peu d'étapes avec de très bons taux de conversion.

2.2.1. Synthèse de la D-fagomine

La D-fagomine est un iminosucre possédant une activité inhibitrice sur les α -, β -glycosidases et les α -, β -galactosidases. Cette molécule a également des propriétés antidiabétiques et antimicrobiennes. Ses dérivés *N*-alkylés ont également montré des activités antifongiques et antibactériennes, ou encore améliorés les propriétés d'inhibition de la D-fagomine¹⁵⁵. L'ensemble de ces molécules représente donc un grand intérêt thérapeutique et a attiré l'attention des chercheurs.

¹⁵⁴ Castillo, J. A.; Guerard-Helaine, C.; Gutierrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schurmann, M.; Inoue, T.; Helaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Joglar, J.; Clapes, P.; Sprenger, G. A.; Lemaire, M. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1039.

¹⁵⁵ Segraves, N. L.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 118.

La synthèse chimique de la D-fagomine est longue et difficile, car elle nécessite des étapes de protection-déprotection coûteuses en temps et en rendement. Les synthèses enzymatiques se sont quant à elles heurtées aux difficultés d'obtention du DHAP, ainsi qu'à des séparations et purifications des produits complexes.

En 2006, l'équipe du Pr. Clapés a étudié cette synthèse via la FSA. L'utilisation de cette enzyme comme biocatalyseur a alors fortement simplifié l'accès à la D-fagomine et à ses analogues¹⁵⁶ (Figure 90).

L'étape centrale de ce nouveau schéma synthétique consiste en l'addition de la DHA sur le *N*-Cbz-3-aminopropanal (molécule achirale et facile d'accès) catalysée par la FSA. Une seule étape supplémentaire est nécessaire à l'obtention des composés désirés (Figure 90 **Error! Reference source not found.**).

La D-fagomine est obtenue avec un rendement global de 51 % et un excès diastéréoisomérique supérieur à 99 %. En présence d'un aldéhyde, l'amination réductrice conduit à des dérivés *N*-alkylés.

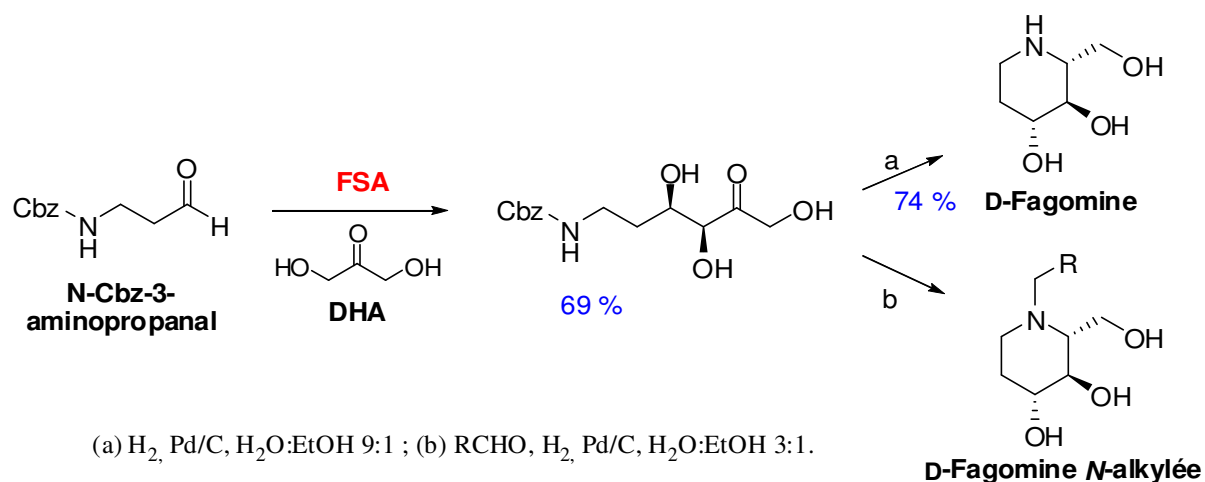


Figure 90 : Synthèse enzymatique de la D-fagomine

2.2.2. Synthèse en un pot d'imino-cyclitols polyhydroxylés

Pour augmenter les chances d'obtenir des inhibiteurs de glycosidases spécifiques et efficaces, Wong *et al.* se sont attachés à synthétiser rapidement tout un panel d'iminosucres à tester. La FSA s'est trouvée être un catalyseur de choix pour ce projet (Figure 91). Cette enzyme, en plus de tolérer différents donneurs, accepte également toute une variété de substrats accepteurs. Parmi eux, les aldéhydes porteurs de groupements azido et Cbz-amino

¹⁵⁶ Castillo, J. A.; Calveras, J.; Casas, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Parella, T.; Inoue, T.; Sprenger, G. A.; Joglar, J.; Clapes, P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6067.

ont permis la synthèse d'iminocyclitols en deux étapes successives dans un seul pot. Ces composés sont obtenus avec de bons rendements¹⁵⁷.

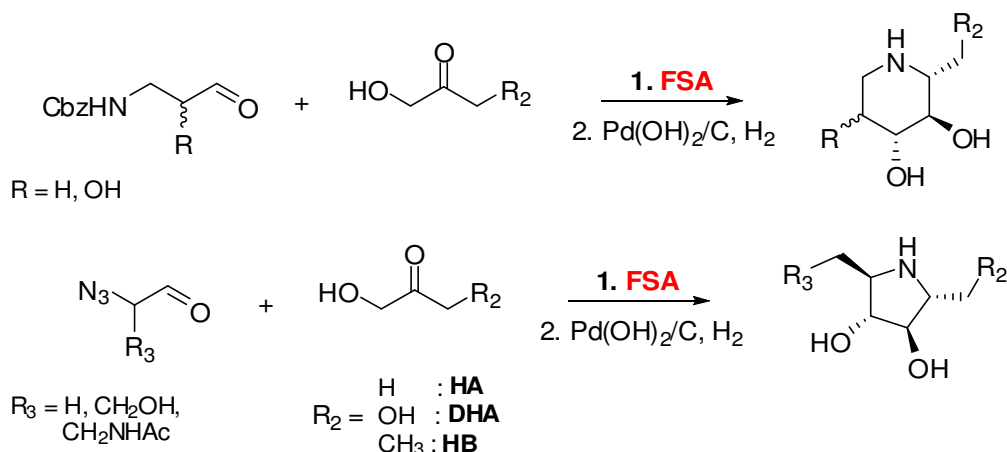


Figure 91 : Synthèse d'iminocyclitols catalysée par la FSA

Avec R et R₂ correspondant à des hydroxyles, les iminosucres formés correspondent à la 1-désoxynojirimycine DNJ et à la 1-désoxymannojirimycine DMJ, connus pour leurs propriétés d'inhibiteurs de glycosidases (voir Chapitre 1). Ces molécules ont été obtenues par cette voie de synthèse avec des rendements respectifs de 49 et 14 %¹⁵⁸.

Cette nouvelle méthodologie rend les iminocyclitols facilement accessibles, et ouvre la voie à des études d'optimisation pour développer ce type d'inhibiteurs afin de les utiliser pour le traitement de nombreuses maladies.

2.2.3. Synthèse de sucres et analogues

La FSA, de la même manière que les autres aldolases, a rapidement été utilisée pour la synthèse de polysaccharides de type hexose. L'intérêt pour cette enzyme a encore été amplifié après la découverte de sa capacité à utiliser le GA comme donneur. Cette activité offre l'opportunité d'accéder pour la première fois à des saccharides de type aldol. Ainsi l'auto condensation du GA sur lui-même ou l'addition aldolique croisée avec un autre aldéhyde à permis de préparer le D-thréose et le 5-désoxy-L-xylose¹⁵² (Figure 92).

¹⁵⁷ Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P. H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14811.

¹⁵⁸ Concia, A. L.; Lozano, C.; Castillo, J. A.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapes, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808.

¹⁵² Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guerard-Helaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapes, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5521.

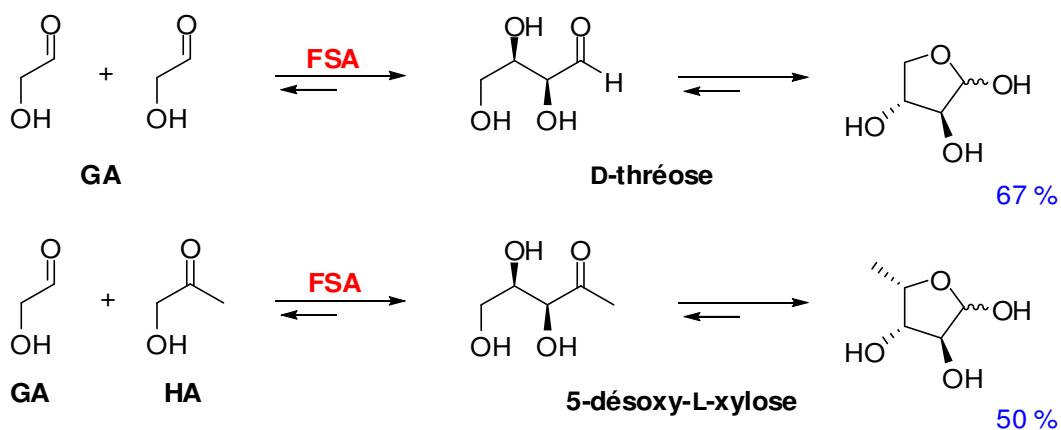


Figure 92 : Synthèse enzymatique du D-thréose et 5-désoxy-L-xylose

Des analogues de sucres de type nitrocyclitols ont aussi pu être formés grâce à la FSA. Ces composés, bien connus de notre laboratoire, sont obtenus par création de deux liaisons C-C lors d'un procédé chimio-enzymatique incluant une aldolisation enzymatique et une cyclisation intramoléculaire. Les résultats de ce type de couplage avec la FSA seront présentés dans la partie résultat discussion de ce manuscrit.

STRATÉGIE

I. Stratégie Générale

Notre objectif est de mettre au point une méthode efficace de synthèse d'aminocyclitols de stéréochimie contrôlée. Cette méthodologie est un pré requis à l'obtention d'une librairie de molécules potentiellement actives en tant qu'inhibiteurs de glycosidases. Plus le nombre de composés à tester est grand, plus les chances de trouver des composés d'intérêt biologique sont élevées, d'où l'importance d'une maîtrise pointue de la synthèse asymétrique. De plus, notre laboratoire est équipé d'un robot pipeteur capable d'effectuer des tests d'inhibitions de plusieurs composés à la fois (plaque de 96 puits) et serait donc en mesure de gérer un grand nombre de molécules à évaluer.

Ce projet s'inscrit dans une thématique de recherche vers le traitement des maladies lysosomales, ayant obtenu un soutien de deux ans de l'association française Vaincre les Maladies Lysosomales. L'objectif général est de contribuer à la préparation d'inhibiteurs de glycosidases agissant spécifiquement sur l'une ou l'autre de ces maladies dans le cadre de la thérapie émergente par molécules chaperones. Ces produits, de stéréochimies différentes et fonctionnalisés différemment, permettraient d'explorer cette nouvelle stratégie thérapeutique pour des maladies qui n'ont pas encore trouvé de traitement, ou au moins d'affiner les modèles existants pour mieux cibler des maladies en particulier.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il s'agit de synthétiser par voie chimioenzymatique de nouveaux aminocyclitols en s'inspirant des molécules modèles β -NOV et β -NOEV (Figure 93). Ces composés, présentés dans le chapitre 1 de la partie bibliographique, ont démontré un effet chaperon sur les β -glucosidases et β -galactosidases (impliquées respectivement dans la maladie de Gaucher et la maladie Gangliosidose G_{M1}). Pour cela, nous nous appuyons sur une méthodologie efficace récemment mise au point au sein de notre équipe. Ainsi, deux nouvelles familles d'aminocyclitols ont été construites par voie chimioenzymatique (Figure 93).

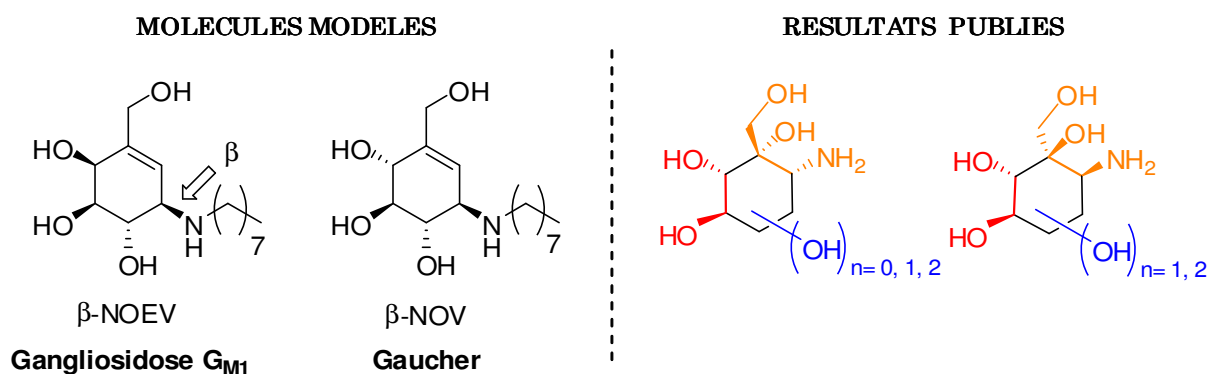


Figure 93 : Inhibiteurs de glycosidases modèles et molécules déjà obtenues au laboratoire

Cette méthodologie de synthèse, originale et performante, permet un accès rapide à des molécules polyfonctionnelles de stéréochimies définies. L'étape clef repose sur un procédé en « un seul pot » d'aldolisation entre le DHAP et un dérivé nitré, suivie d'une cyclisation intramoléculaire de type Henry et d'une désphosphorylation. Les nitrocyclitols obtenus sont alors réduits pour donner les aminocyclitols. Certains de ces composés sont des inhibiteurs modestes de glycosidases commerciales, en raison de l'absence d'un groupement amine en position 5 du cycle. Lors de ces travaux, seule l'aldolase FBA avait été utilisée pour obtenir la liaison C-C (en rouge sur la figure 93) de manière hautement stéréosélective avec la configuration 2*S*,3*R*.

Nous envisageons d'adapter cette stratégie en diversifiant le type d'aldolase utilisé afin d'obtenir des stéréochimies différentes pour cette liaison C-C. Trois aldolases DHAP-dépendantes ont été décrites dans la littérature comme hautement stéréosélectives dans le sens de la synthèse :

- La fructose-1,6-bisphosphate aldolase FBA donnant lieu à une configuration *S,R* ;
- La fucose-1-phosphate aldolase F1PA donnant lieu à une configuration *R,R* ;
- La rhamnULOse-1-phosphate aldolase R1PA donnant lieu à une configuration *R,S*.

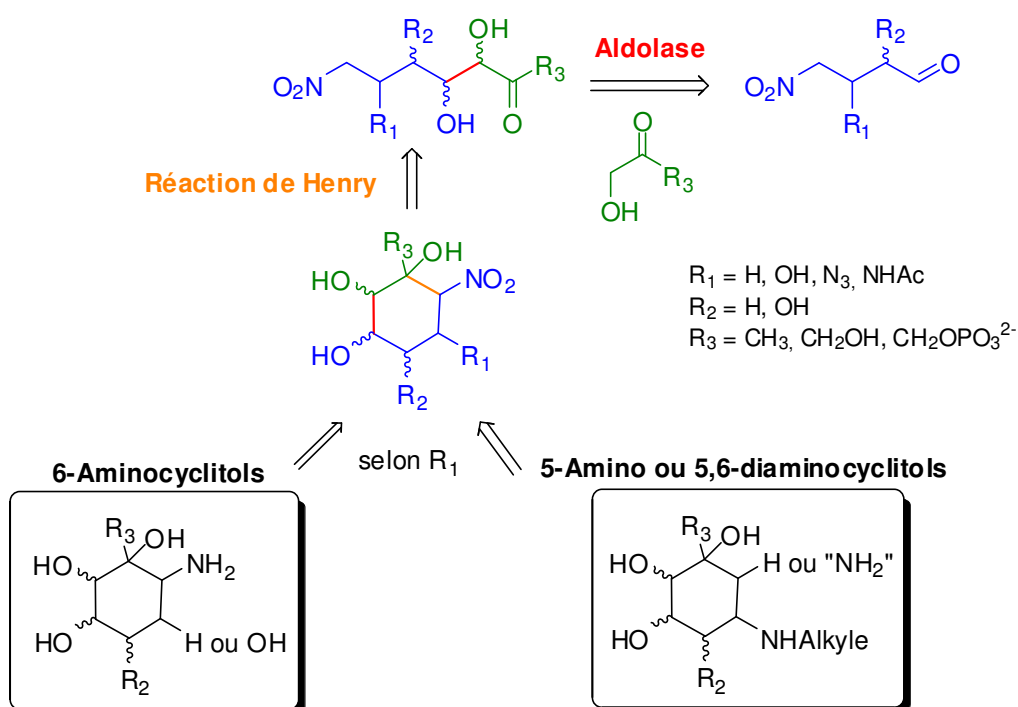


Figure 94 : Schéma général d'obtention de divers aminocyclitols

Nous souhaitons essentiellement exploiter le potentiel de deux de ces trois enzymes (F1PA et R1PA) lors de réactions de couplage entre le donneur DHAP et des accepteurs aldéhydiques nitrés. Une hydrolyse enzymatique du phosphate sera effectuée à la suite de l'aldolisation ($R_3 = \text{CH}_2\text{OPO}_3^{2-}$).

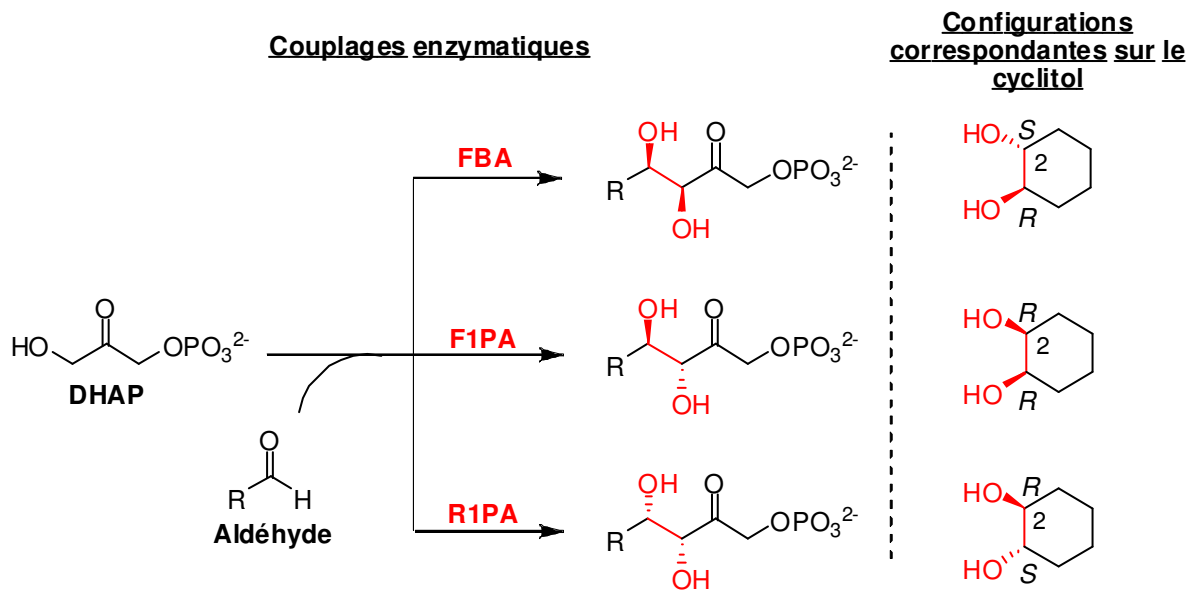


Figure 95 : Présentation des trois DHAP-aldolases utiles en synthèse

Une aldolase non DHAP-dépendante et présentant la même stéréosélectivité que la FBA a récemment été découverte : la fructose-6-phosphate aldolase.¹⁴⁹ Du fait de ses nombreux avantages par rapport à la FBA (pas de DHAP à préparer, thermostabilité, nombreuses unités disponibles, pas de désphosphorylation nécessaire...), nous avons décidé de remplacer la FBA au profit de la FSA lors des couplages (figure 96).

La FSA présente également l'avantage de tolérer plusieurs donneurs. Nous avons alors envisagé d'exploiter cette propriété en mettant en place des voies de synthèse avec la DHA et avec l'HA ($R_3 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{OH}$). Deux FSA seront impliquées selon leurs propriétés cinétiques. Pour la DHA, une FSA mutée (Ala129Ser) aux propriétés cinétiques améliorées vis-à-vis de ce donneur sera employée (voir bibliographie). Pour l'HA, c'est la FSA native qui possède la meilleure efficacité avec ce donneur.

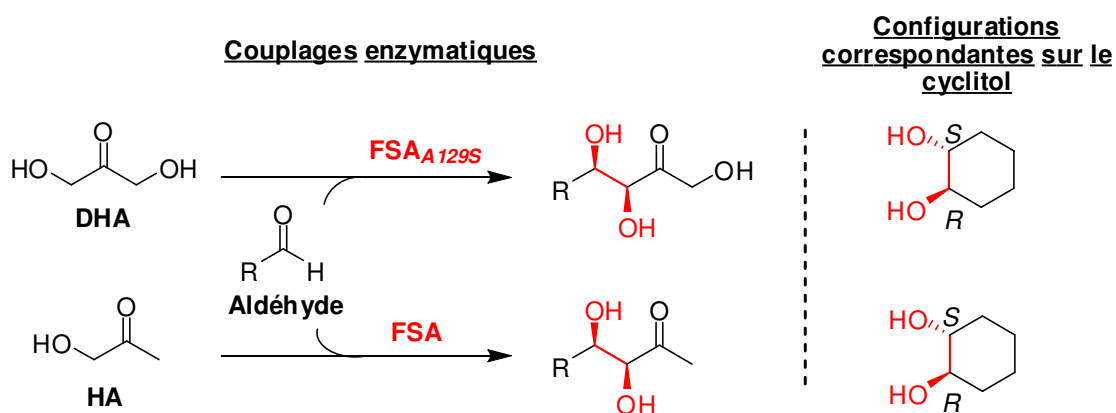


Figure 96 : Présentation des deux FSA employées pour notre projet

Nous avons donc sélectionné les aldolases F1PA, R1PA, FSA et FSA_{A129S}, toutes non commerciales, pour cibler des stéréochimies en lien avec certaines glycosidases lysosomales. La configuration 2*R*,3*R* de la β-NOEV pourrait notamment être accessible avec la F1PA. Dans ce cas de figure, la stéréochimie de la liaison C-C formée par réaction de Henry intramoléculaire sera étudiée : la cyclisation pourrait donner un résultat différent issu de la configuration 2*R*. La R1PA renforcera l'aspect méthodologique du travail, elle donnerait à priori accès à des énantiomères des séries déjà synthétisées les années précédentes.

Enfin, pour améliorer les propriétés inhibitrices et se rapprocher des molécules modèles, l'introduction d'un groupement amine en position 5 du cycle est aussi envisagée (figure 94, R₁ = N₃, NHAc).

L'utilisation des aldolases DHAP-dépendantes implique la mise en place d'une production efficace de ce donneur instable. Par ailleurs, le souhait de polyfonctionnaliser le cyclitol de manière stéréosélective conduit à la synthèse d'aldéhydes nitrés optiquement purs. Ces deux parties sont décrites dans les paragraphes suivants.

II. Stratégie de synthèse du DHAP

Malgré les nombreuses méthodes chimiques décrites dans la littérature, aucune pour l'instant n'est pleinement satisfaisante, que ce soit au niveau de la facilité de mise en œuvre, du nombre important d'étapes ou du rendement global de réaction. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers une synthèse enzymatique nouvellement décrite par l'équipe du Dr Garcia-Junceda, dans le cadre d'une collaboration. L'utilisation d'une kinase permet de former le DHAP simplement à partir de la DHA commerciale en seulement quelques heures et de façon quasi quantitative. Le DHAP, en solution dans l'eau, est alors directement utilisable pour la réaction enzymatique d'aldolisation à suivre. Cette stratégie a été discutée en partie bibliographique.



Figure 97 : Synthèse enzymatique du DHAP à partir du DHA

III. Stratégie de synthèse des aldéhydes

Pour l'étude des réactions impliquant les aldolases citées précédemment, la synthèse d'aldéhydes accepteurs modèles est nécessaire de façon à nous aider à valider la généralisation de la méthode. Ces composés doivent être de structures simples pour augmenter leur chance d'être acceptés par l'enzyme. Leur obtention s'est inspirée du schéma de synthèse décrit dans les travaux de L. El Blidi, en y apportant des variations avec l'objectif de réduire le nombre d'étapes et augmenter le rendement global. Mis à part la synthèse du nitrobutyraldéhyde qui met en jeu une addition de Michael, l'étape commune est une condensation entre le nitrométhane et un aldéhyde (réaction de Henry), ce qui permet l'introduction du groupement nitro à la molécule.

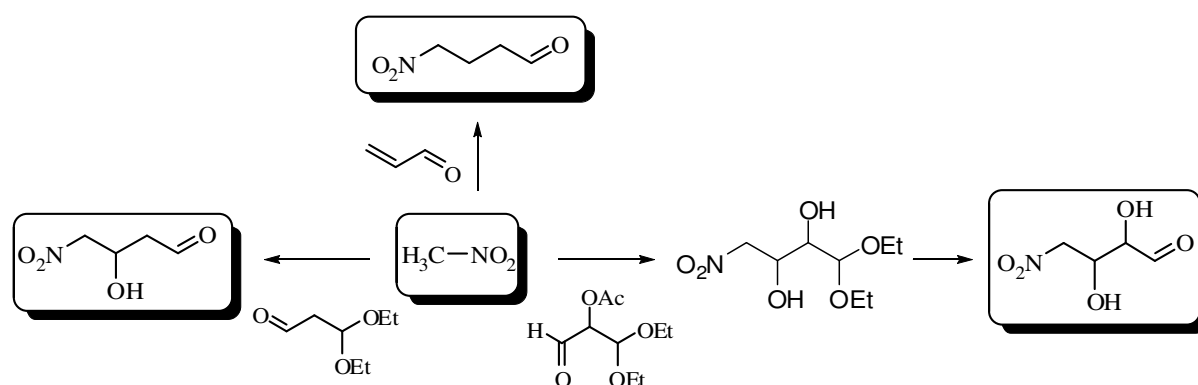


Figure 98 : Schéma général de synthèse de substrats modèles

De manière à avoir une stéréochimie définie en position 4 du cyclitol, les alcools chiraux seront dédoublés à l'aide d'une lipase dans une réaction de transestérification. Plusieurs types de dédoublement, cinétique et dynamique, seront mis à l'étude.

Pour finir, l'introduction d'un groupement amine en position 5 du cyclitol nous a orientés vers la synthèse d'aldéhydes accepteurs porteurs de groupements précurseurs d'une fonction amine. Nous avons logiquement envisagé un groupement azido et un groupement NHAc. A partir des aldéhydes modèles précédents, ces dérivés seraient accessibles en peu d'étapes. Il s'agirait tout d'abord de réaliser une élimination en α du NO_2 de manière à obtenir un alcène, sur lequel on pourrait introduire soit un groupement azido, soit un groupement amine à protéger. Les nitrocyclitols correspondants pourraient alors conduire aux 5-aminocyclitols après réduction du groupement azido, ou après déprotection du groupement NHAc.

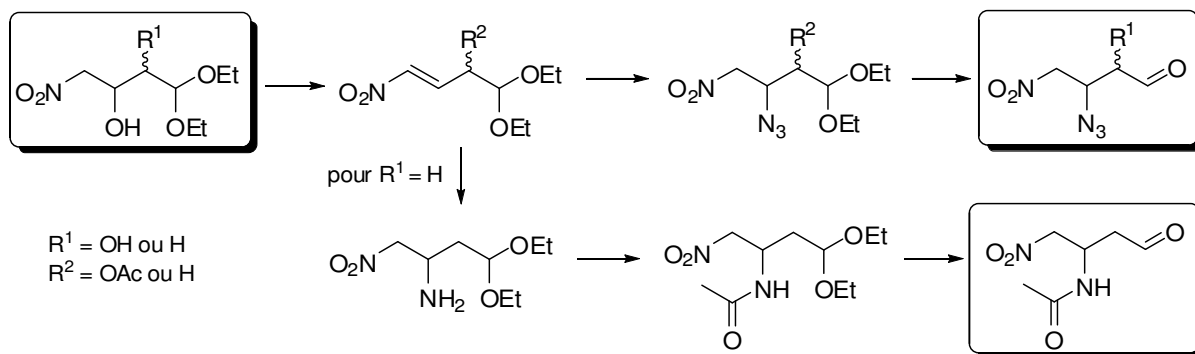


Figure 99 : Schéma général de synthèse de substrats azotés

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chap1 : Aldolases et kinases

I. Production des aldolases

Ce projet d'obtention de nouvelles familles d'aminocyclitols repose sur l'utilisation des aldolases présentées précédemment, qui contrôlent la formation de la liaison C2-C3 des cyclitols. Aucune des quatre enzymes choisies (F1PA, R1PA, FSA, FSA_{A129S}) n'est commerciale, et nous avons donc mis au point leur production et leur purification au laboratoire.

L'étude des DHAP-aldolases impliquant la synthèse *in situ* du DHAP via une kinase a été commencée lors d'un séjour de trois mois durant ma première année de thèse au sein de l'équipe du Dr Eduardo Garcia-Junceda à Madrid.

1. Production et purification de la F1PA et de la R1PA

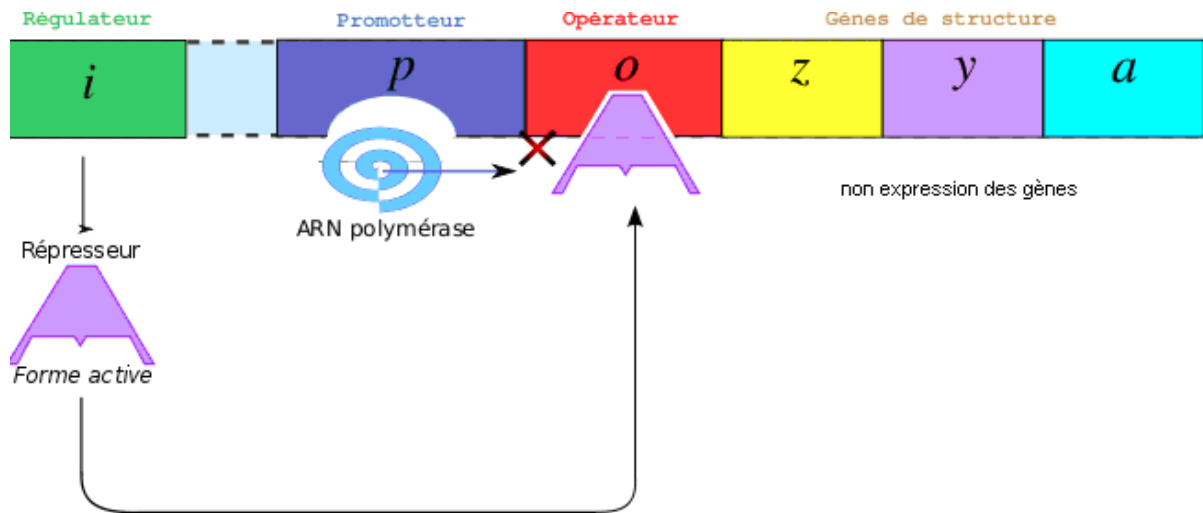
1.1. Production

Les cellules souches d'*E. coli* contenant les plasmides codant pour la F1PA et la R1PA nous ont été données par l'équipe du Dr. Garcia-Junceda. Chaque plasmide construit de façon classique sert à surexprimer la protéine d'intérêt. Ils sont résistants à la kanamycine, qui sert d'antibiotique de sélection.

La culture des bactéries est réalisée à 37°C dans un fermenteur de 1 L en présence de l'antibiotique. L'ajout de l'inducteur se fait durant la phase exponentielle croissante des cellules recombinantes (0,5-0,6 DO). Il s'agit de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

Ce composé est utilisé comme un équivalent de l'allolactose, un métabolite du lactose qui entraîne la transcription de l'opéron lactose (groupement de gènes et de séquences régulatrices servant au métabolisme du lactose chez *E. coli*, Figure 100 : Principe de régulation de l'opéron lactose). Le lactose fait partie des molécules effectrices c'est-à-dire des molécules capables de transmettre un signal permettant un choix transcriptionnel. Le schéma de fonctionnement de l'opéron lactose est le suivant : en absence d'inducteur, le répresseur produit par le gène I reconnaît spécifiquement le site O et s'y fixe. L'encombrement de cette protéine est tel que l'ARN polymérase est incapable de se fixer sur le site promoteur : il n'y aura pas lecture des gènes (Cas A du schéma). Il se trouve que l'allolactose a une affinité pour la protéine répresseur et sa liaison provoque une transition allostérique de celle-ci (modification globale de la structure 3D). Cette déformation ne permet plus d'interaction avec le site O : il y aura lecture des gènes par l'ARN polymérase (cas B du schéma).

Cas A : En absence de lactose



Cas B : En présence de lactose

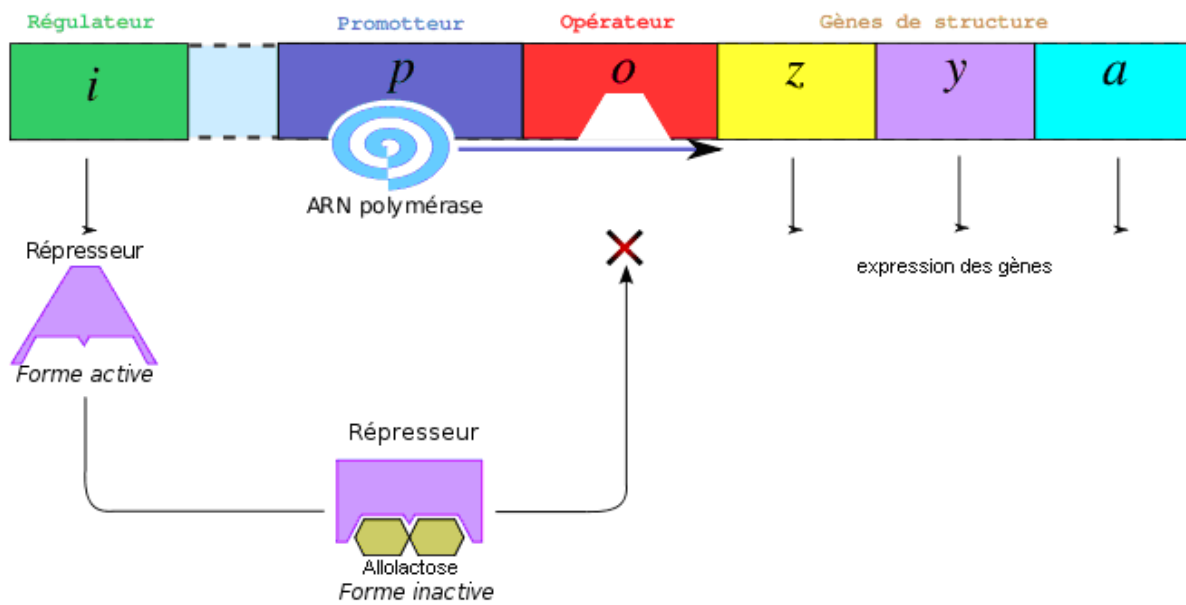


Figure 100 : Principe de régulation de l'opéron lactose

Il s'avère que l'allolactose est loin d'être le meilleur inducteur. Il est en effet souvent métabolisé. Actuellement l'IPTG tend à supplanter le lactose (, l'atome de soufre de l'IPTG est engagé dans une liaison chimique qui n'est pas hydrolysable par les enzymes de la cellule, ce qui rend sa concentration constante).

Dans notre cas, l'IPTG permettra d'induire la transcription du gène codant pour la protéine d'intérêt. Les temps d'induction ont été variables, afin de tenter d'optimiser la production d'enzyme.

Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation. Elles sont cassées en présence de tampon par sonication à 4°C. La suspension résultante est centrifugée et le surnageant, correspondant à l'extrait cellulaire soluble (aussi appelé CFE pour '*cell free extract*'), est recueilli pour être purifié. Il contient l'enzyme surexprimée.

1.2. Purification par chromatographie d'affinité

Les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Le principe de cette méthode est le suivant : par génie génétique, on ajoute à la protéine une séquence contenant plusieurs histidines consécutives ; cette étiquette est capable d'interagir fortement avec des ions métalliques. On utilise cette propriété pour fixer la protéine d'intérêt sur une résine de type agarose sur laquelle est chélaté un ion métallique. Dans notre cas, les protéines désirées sont étiquetées avec une chaîne de six histidines en position N-terminale : on dit qu'elles sont *6-His-tagées*. La séparation a été effectuée à partir d'ions Ni²⁺ liés à une matrice polymère d'agarose.

Initialement, afin d'éviter l'emploi d'imidazole, l'enzyme a été purifiée en suivant la méthodologie utilisée par l'équipe du Dr Junceda¹⁵⁹. Il s'agit d'une purification de la protéine par gradient de pH. Le CFE est chargé sur la colonne pré-équilibrée avec un tampon phosphate pH 6,5 et lavé avec ce même tampon. La protéine d'intérêt est par la suite éluée à pH 4, grâce à la protonation d'un atome d'azote du noyau imidazole de l'histidine. Cette stratégie d'éluion s'est trouvée être efficace sur de petites quantités d'enzyme à purifier (quelques mL de CFE, 2 mL de résine). Malheureusement avec des volumes plus importants, le décrochage de la protéine étiquetée a été moins efficace : beaucoup de pertes ont été dénombrées après passage sur la colonne IMAC.

Nous nous sommes donc tournés vers un autre type de purification sur IMAC, mettant en jeu une éluion à l'imidazole. Après avoir équilibré la colonne avec un tampon phosphate pH 7,5, l'extrait cellulaire est chargé sur celle-ci. La protéine *his-tagée* est éluée par une solution d'imidazole qui décomplexe la chaîne d'histidines de l'ion métallique par déplacement d'équilibre. Un gradient d'imidazole a été utilisé, et les profils d'éluion de la F1PA et de la R1PA sont représentés Figure 101.

¹⁵⁹ Garcia-Junceda, E.; Shen, G.-J.; Alajarin, R.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 1349.

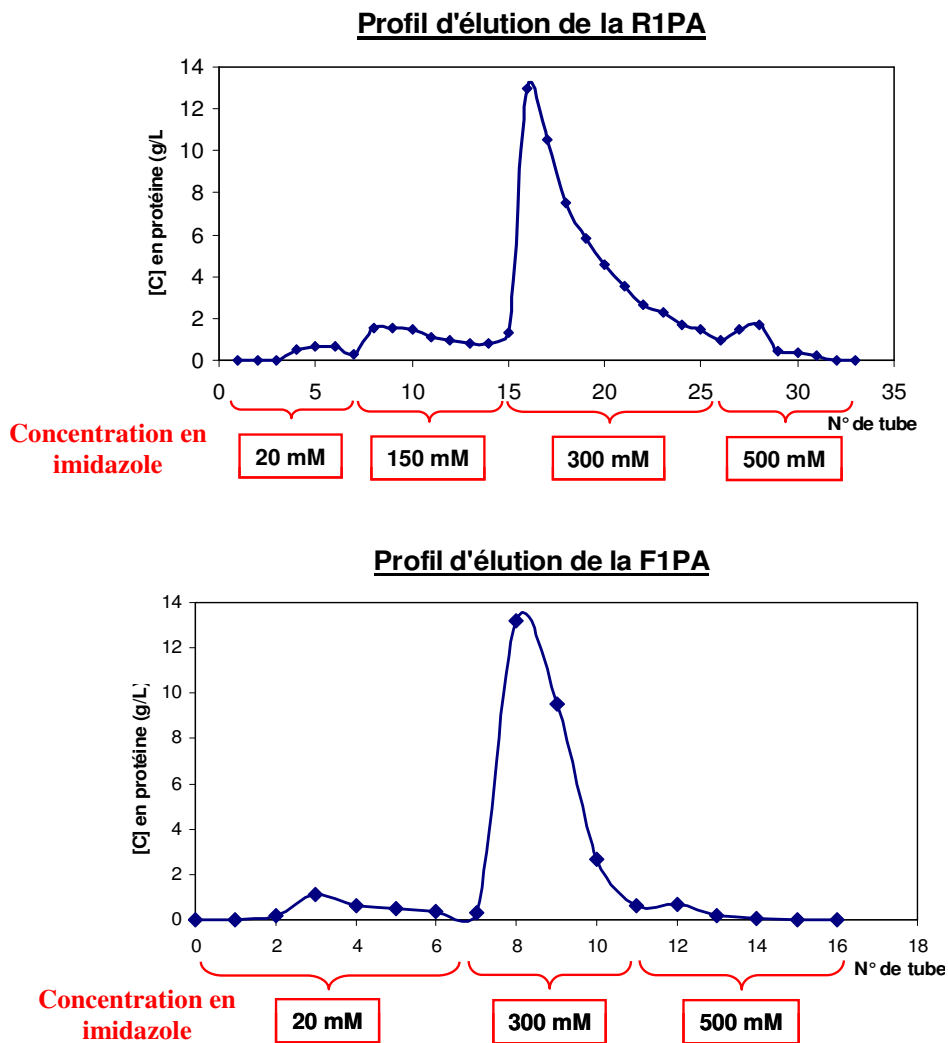


Figure 101 : Profils d'élution des enzymes d'intérêt en utilisant un gradient d'imidazole

Nous avons évalué la concentration en protéine des fractions collectées par le test de Bradford. Cette technique est plus amplement décrite dans la partie expérimentale de ce document. Les fractions éluées à 300 mM d'imidazole et contenant la protéine désirée ont été rassemblées. L'imidazole est éliminé par ultrafiltration sur membrane (poids moléculaire limite de 50 kDa) car il interfère avec les cations métallique des aldolases de type II, et en diminue par conséquent l'activité. Les protéines d'intérêt, contrairement à l'imidazole, ne peuvent pas traverser la membrane et sont récupérées dans le réservoir supérieur de l'appareil d'ultrafiltration. Leurs poids moléculaires sont les suivants :

- F1PA : approximativement 32 kDa x 4 (tétramère) = 128 kDa ;
- R1PA : approximativement 30 kDa x 4 (tétramère) = 120 kDa.

La pureté et la surexpression des deux aldolases ont été vérifiées par électrophorèse dénaturante SDS-PAGE (acronyme anglophone de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Cette technique permet la séparation et la visualisation des protéines selon

leur poids moléculaire. Des exemples de gels obtenus pour la F1PA et la R1PA sont donnés en partie expérimentale. Enfin, l'enzyme purifiée est lyophilisée en présence de son tampon, pour être conservée.

1.3. Purification en batch

Dans la technique décrite ci-dessus, les temps d'élution sur colonne étant relativement longs, nous avons finalement préféré une méthode de purification dite '*en batch*'. Celle-ci présente l'avantage d'être plus rapide, quel que soient les quantités de protéines à purifier. Elle repose sur le même principe d'interactions entre la protéine et un ion métallique lié à une résine agarose. L'enzyme, supportée sur la résine, est centrifugée en présence de solutions d'imidazole à différentes concentrations. Le surnageant à 300 mM en imidazole contient majoritairement la protéine désirée.

Les rendements en protéine restent proches, quelque soit la méthode de purification employée :

- Pour 1 L de culture : 171 mg de poudre lyophilisée contenant la F1PA (activité totale de 36 U dans le sens de la rupture de liaison du F1P).
- Pour 1 L de culture : 252 mg de poudre lyophilisée contenant la R1PA (activité totale de 30 U dans le sens de la rupture de liaison du R1P).

2. Production et purification de la FSA naturelle et de la FSA mutée

Dans le cadre d'une autre collaboration, l'équipe du Pr. Sprenger nous a fourni les deux plasmides codant pour la FSA et la FSA mutée A129S, clonés dans *Escherichia coli*. Ils sont résistants à un antibiotique : l'ampicilline dans le cas de la FSA naturelle, la kanamycine pour la FSA mutée.

La culture des bactéries est réalisée de la même façon que précédemment. Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation. La purification de la protéine est particulièrement simple car elle est thermostable. Cette caractéristique lui est conférée par sa structure rigide en anneau (voir partie bibliographique). Une simple sonication des cellules, et un chauffage du surnageant après centrifugation, suffisent à l'utilisation de cet échantillon brut en synthèse. Les autres enzymes présentes dans l'échantillon sont dénaturées lors du chauffage. L'enzyme est conservée sous forme lyophilisée.

Pour 1 L de culture, nous avons obtenu 224 mg de poudre lyophilisée contenant la FSA native (activité totale de 202 U dans le sens de la rupture de liaison du F6P), et 334 mg de poudre contenant la FSA mutée (activité totale de 1550 U dans le sens de la rupture).

L'électrophorèse SDS-PAGE permet de vérifier la surexpression et la purification de la FSA¹⁴⁹ (Figure 102). La protéine est un décimère composé de 10 sous-unités d'environ 24 kDa chacune.

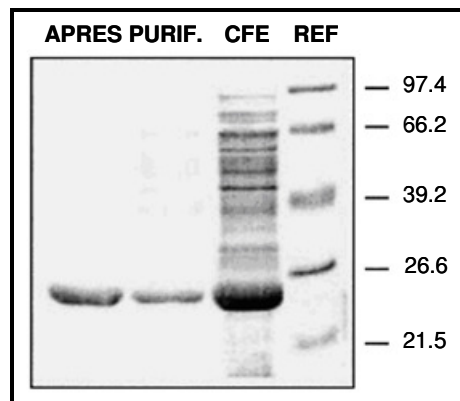


Figure 102 : Analyse SDS-PAGE pour la purification de la FSA

3. Mesure des activités des aldolases purifiées

3.1. Les aldolases DHAP-dépendantes

3.1.1. Principe de la mesure

Le dosage de l'activité de la R1PA et de la F1PA se réalise habituellement dans le sens de la coupure de la liaison C-C du substrat naturel : la coupure du fucose-1-phosphate F1P dans le cas de la F1PA, celle du rhamnolose-1-phosphate R1P pour la R1PA. Ces réactions libèrent du DHAP et du L-lactaldéhyde, quelle que soit l'enzyme dosée. Il s'agit d'un dosage direct où l'apparition du DHAP est quantifiée.

Une enzyme auxiliaire, la glycérophosphate déshydrogénase (GPDH), réduit le DHAP en glycérol-3-phosphate. Cette dernière réaction nécessite le cofacteur NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) comme un agent de réduction qui transfère un hydrure au DHAP. On corrèle ainsi la vitesse de réaction de l'aldolase à celle de la disparition du NADH par spectrophotométrie. Le principe du dosage est indiqué avec la F1PA.

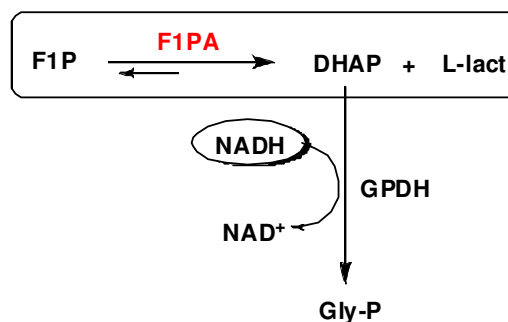


Figure 103 : Principe de mesure de l'activité de la F1PA

¹⁴⁹ Schurmann, M.; Sprenger, G. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 11055.

Il est important de noter que les deux substrats des enzymes dosées (le F1P et le R1P) ne sont pas commerciaux, et qu'il faut donc en premier lieu les synthétiser. Une synthèse enzymatique reste la plus appropriée car elle permet un contrôle de la stéréochimie des cétooses désirés. On se retrouve donc devant le paradoxe suivant : pour mesurer l'activité de l'aldolase, il faut synthétiser son substrat avec cette même enzyme dont on ne connaît pas l'activité. Le principe de la mesure est illustré avec l'exemple de la F1PA Figure 104.

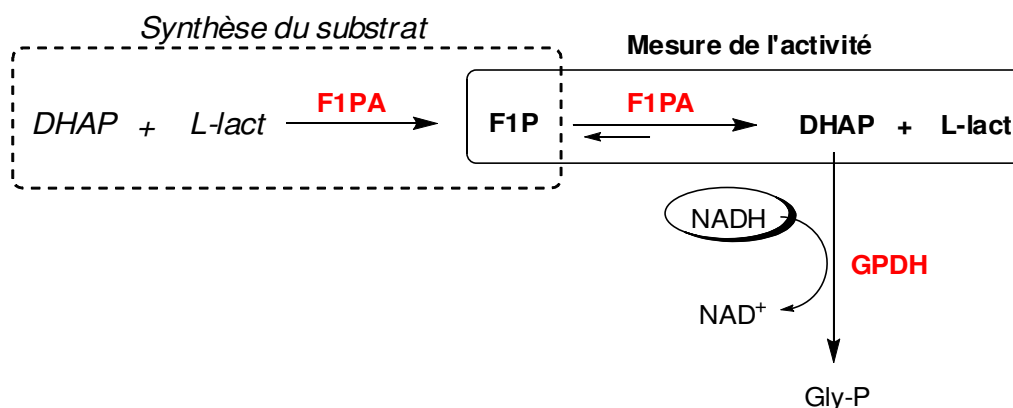


Figure 104 : Mesure de l'activité de la F1PA à partir de son substrat naturel non commercial

3.1.2. Synthèse du substrat naturel de la F1PA

La synthèse du fucose-1-phosphate F1P se fait par voie enzymatique à partir du L-lactaldéhyde et du DHAP (voir II. Synthèse du DHAP). Le L-lactaldéhyde est quant à lui formé chimiquement en trois étapes à partir du lactate de méthyle (Figure 105).

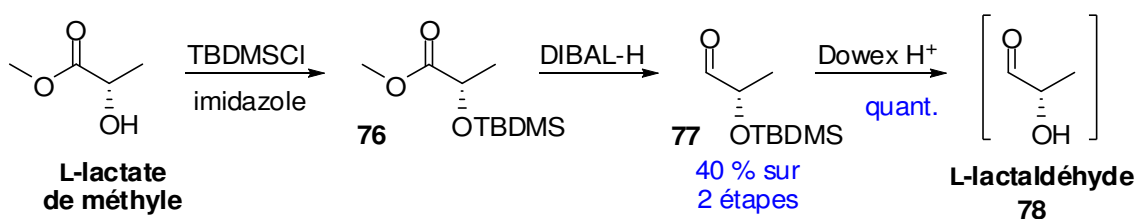


Figure 105 : Synthèse chimique du L-lactaldehyde




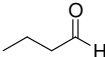
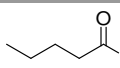

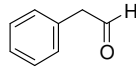
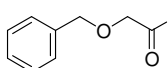
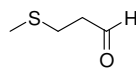
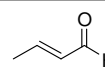
La première étape consiste à protéger la fonction alcool sous forme d'éther silylé pour pouvoir ensuite réduire la fonction ester en aldéhyde. Le lactaldéhyde est obtenu par hydrolyse de l'éther silylé en milieu acide à l'aide d'une résine échangeuse de proton. Cette réaction, suivie par chromatographie sur couche mince (CCM), permet la formation de l'aldéhyde directement dans l'eau. Après disparition complète du produit de départ et filtration de la résine, l'aldéhyde est directement utilisé en solution pour le couplage enzymatique. Nous n'avons pas tenté d'isoler le lactaldéhyde en vue de l'analyser car, par expérience au laboratoire, nous savons que les α -hydroxyaldéhydes sont en général difficiles à

purifier, instables et dotés de spectres de RMN très compliqués à cause de la coexistence de plusieurs formes hydrate et hémiacétal.

Le L-lactaldéhyde est consommé comme accepteur dans une réaction enzymatique catalysée par la F1PA. Le DHAP est utilisé comme donneur. L'activité de l'aldolase n'étant pas connue, elle est ajoutée en aveugle. Le bon déroulement de la réaction est suivi au spectrophotomètre (disparition du DHAP). Le fucose-1-phosphate synthétisé est purifié par formation d'un sel de baryum insoluble. Pour les dosages, il est remis en solution grâce à un échange baryum/sodium en présence d'une résine sous forme Na⁺.

3.1.3. Mesure de l'activité de la F1PA par une méthode alternative

Le fait que le F1P ne soit pas commercial rend la mesure d'activité de la F1PA, à partir de ce substrat, laborieuse. A partir de cette observation, mettre au point une méthode plus simple à partir d'un aldéhyde commercial nous a paru une évidence. Plusieurs aldéhydes ont été testés à Madrid, dans le laboratoire du Dr E. Garcia-Junceda, comme substrat de la F1PA avec l'aide du Dr I. Sanchez. Les résultats que nous avons obtenus sont répertoriés dans le tableau ci-dessous :

Entrée	ALDEHYDE	F-1PA	
		% Aldol produit	% DHAP converti
1	L-lactaldéhyde 	89	95
2	acétaldéhyde 	73	98
3	propionaldéhyde 	29	98
4	butyraldéhyde 	11	28
5	n-valéraldéhyde 	27	93
6	isobutyraldéhyde 	27	99
7	phenylacétaldéhyde 	0,0	0,0
8	benzyloxyacétaldéhyde 	15	55
9	3-méthylthiopropionaldéhyde 	5	5
10	crotonaldéhyde 	11	57

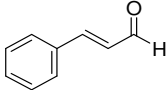
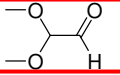
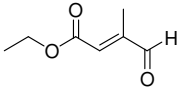
11	trans-cinnamaldéhyde		10	27
12	diméthoxyacétaldéhyde		94	99
13	éthyl-3-méthyl-oxocrotonate		21	49

Tableau 5 : Aldéhydes testés comme substrat de la F1PA

Le diméthoxyacétaldéhyde (DMA), produit commercial, présente le meilleur résultat de couplage avec le DHAP. C'est donc un bon candidat pour être utilisé pour la mesure d'activité de la F1PA par dosage indirect.

Le principe est le suivant : en se plaçant en condition de vitesse initiale, une réaction de couplage, catalysée par la F1PA, est réalisée. L'aldéhyde et le DHAP sont mis à des concentrations permettant de se situer au V_{max} . La disparition du DHAP est mesurée au cours du temps par prélèvements successifs. Il est alors possible de remonter à la quantité de DHAP consommé par minute et par milligramme de poudre lyophilisée contenant l'enzyme. Cette valeur d'activité ne correspond cependant pas à celle traditionnellement donnée dans la littérature, qui est généralement mesurée dans le sens de la coupure du substrat naturel de l'aldolase (dosage direct). Il nous est donc apparu intéressant de comparer les valeurs d'activité obtenues par ces deux types de dosage.

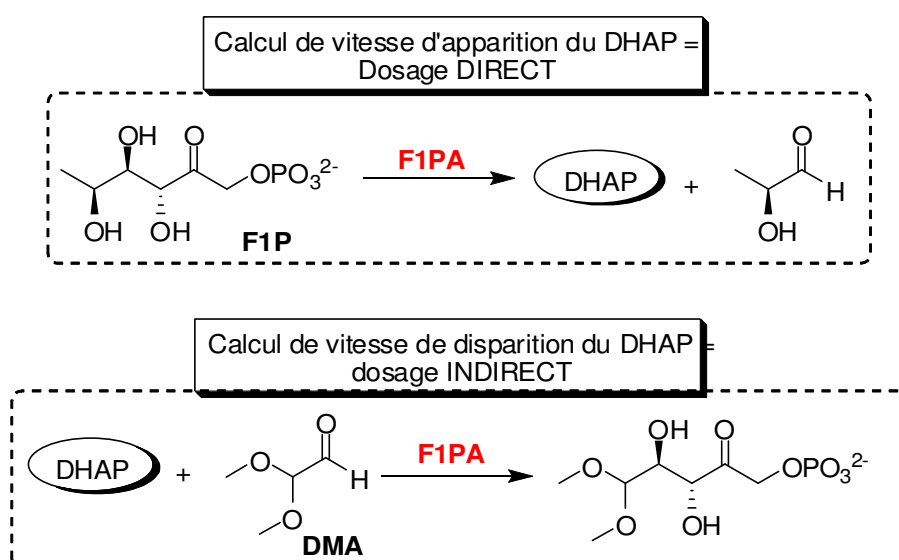


Figure 106 : Accès à l'activité de la F1PA par différents dosages

Plusieurs mesures ont été lancées à partir d'un même lot d'enzyme et les résultats trouvés sont les suivants, exprimés par mg de poudre lyophilisée contenant l'enzyme :

✓ Dosage direct avec le F1P : $\text{Act}_{\text{F1PA}} = 0,21 \pm 0,01 \text{ U/mg}$

✓ Dosage indirect avec le DMA : $\text{Act}_{\text{F1PA}} = 0,24 \pm 0,04 \text{ U/mg}$

Comme attendu, le dosage indirect nous conduit à un résultat moins précis qu'avec le dosage direct, mais permet une détermination beaucoup plus facile de l'activité de l'enzyme. C'est donc ce type de dosage indirect que nous avons sélectionné pour notre méthodologie. En revanche, il est un peu étonnant de trouver des valeurs d'activité aussi proches alors qu'elles sont évaluées dans deux sens réactionnel différents..

3.1.4. Mesure de l'activité de la R1PA

De la même manière que précédemment, l'activité de la R1PA a été mesurée par dosage direct à partir de son substrat naturel, le R1P. La synthèse du R1P étant tout aussi fastidieuse que celle du F1P, un dosage indirect de l'activité à partir du DMA a été mis en place. Les résultats obtenus sont les suivants, exprimés par milligramme de poudre lyophilisée contenant l'enzyme :

✓ Dosage direct avec le R1P : $\text{Act}_{\text{R1PA}} = 0,12 \pm 0,01 \text{ U/mg}$

✓ Dosage indirect avec le DMA : $\text{Act}_{\text{R1PA}} = 0,16 \pm 0,04 \text{ U/mg}$

3.2. Activité de la FSA

Le dosage de l'activité de la FSA se mesure dans le sens de la coupure du fructose-6-phosphate (F6P) en dihydroxyacétone (DHA) et D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Le dosage direct est en effet facile à mettre en œuvre puisque le F6P est un produit commercial. C'est l'apparition du G3P au cours du temps qui est quantifiée. Ceci se fait grâce à deux enzymes auxiliaires. La première, la triose-phosphate isomérase (TPI), est chargée de l'isomérisation du G3P en DHAP. La deuxième, la GPDH, transforme le DHAP en glycérol-3-phosphate, comme vu précédemment. La quantité de DHAP qui apparaît dans le milieu au cours du temps est alors quantifiable au spectrophotomètre.

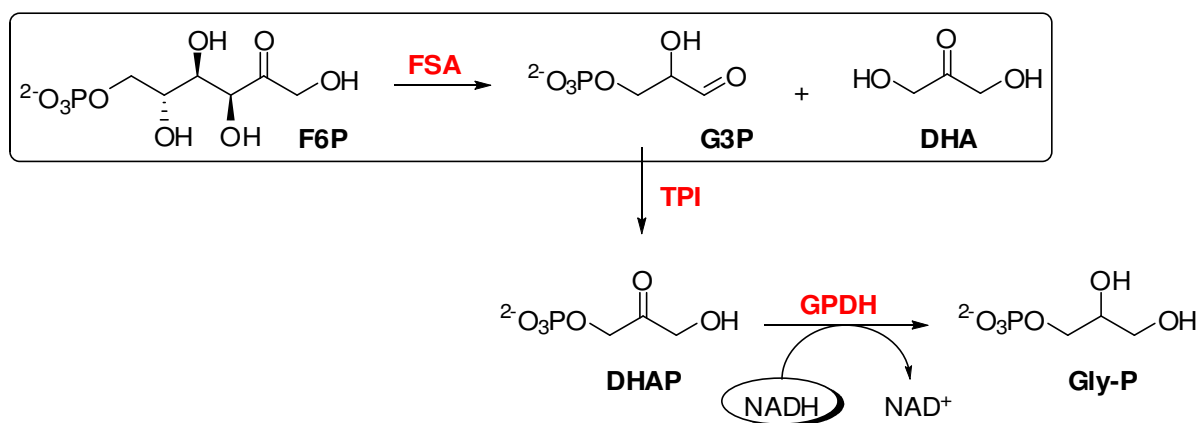


Figure 107 : Principe de la mesure de l'activité de la FSA au spectrophotomètre

Les activités spécifiques obtenues pour la FSA native et la FSA mutée exprimées par milligramme de poudre lyophilisée contenant l'enzyme sont les suivantes :

- ✓ FSA naturelle : **Act_{FSA} = 0,9 ± 0,1 U/mg**
- ✓ FSA A129S : **Act_{FSA A129S} = 4,7 ± 0,1 U/mg**

Ces résultats corrélerent avec l'effet de la mutation Ala129Ser qui améliore les propriétés catalytiques de l'enzyme vis-à-vis de la DHA.

II. Synthèse du DHAP

1. Synthèse enzymatique

Depuis plusieurs années, notre laboratoire utilise la fructose-1,6-bisphosphate aldolase comme catalyseur de synthèse. Dans ce cadre, notre équipe s'est attachée à trouver des méthodes chimiques performantes permettant d'accéder au DHAP. Elles ont été publiées en 1997¹³¹ et 2004¹³². Cependant, la synthèse du DHAP est restée un procédé en plusieurs étapes long à effectuer et aux rendements moyens.

Ce travail de thèse nécessitant la production du DHAP en grandes quantités, nous nous sommes tournés vers une synthèse enzymatique en une étape développée par l'équipe du Dr. Garcia-Junceda à Madrid. Comme mentionné précédemment, nous avons noué une collaboration forte avec ce laboratoire, avec l'objectif d'exploiter et de mettre en valeur leur procédé. Un avantage majeur de cette méthodologie est la possibilité de lancer en cascade les réactions enzymatiques, y compris l'aldolisation, dans un seul pot. Cette synthèse du DHAP, déjà décrite dans la partie bibliographique, met en jeu une kinase, la dihydroxyacétone kinase DHAK, capable de phosphoryler la DHA en DHAP en seulement quelques heures. Le

¹³¹ Gefflaut, T.; Lemaire, M.; Valentin, M. L.; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5920.

¹³² Charmantray, F.; El Bliidi, L.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Bolte, J.; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9310.

donneur de phosphate utilisé est l'ATP, que l'on régénère grâce à l'intervention d'une autre enzyme, l'acétate kinase AK. Les constantes cinétiques de la DHAK sont données Figure 108.

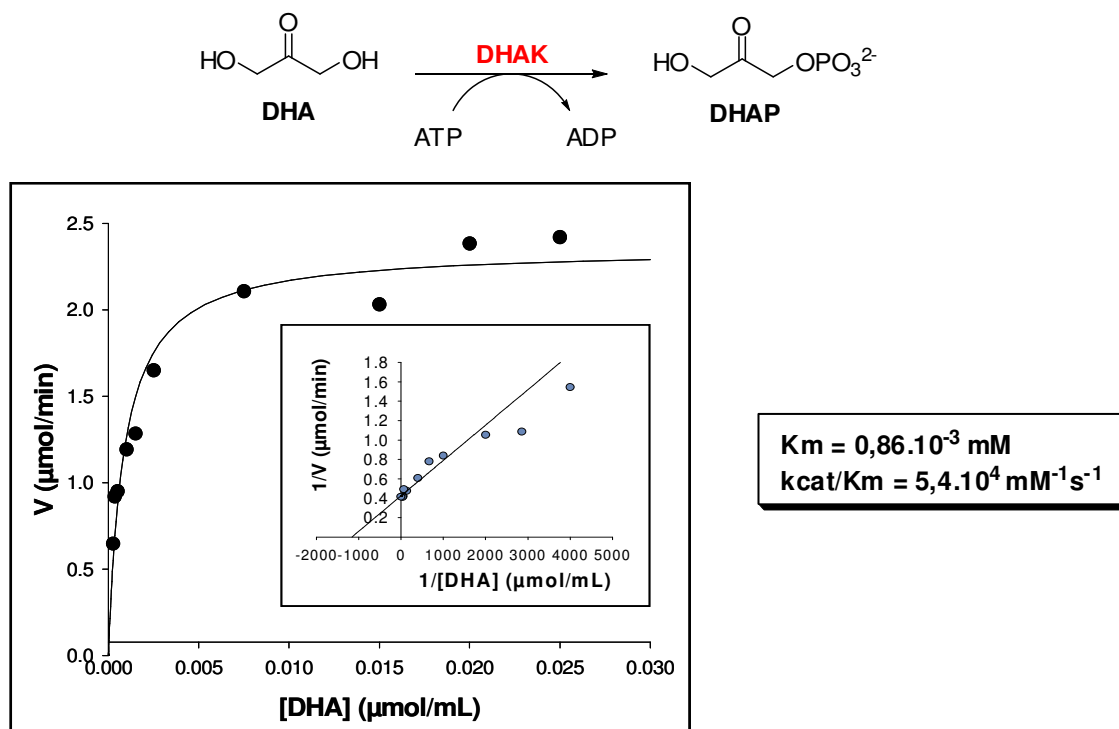


Figure 108 : Constantes cinétiques de la DHA kinase¹⁶⁰

La réaction se déroule à pH 7,5 optimum pour l'activité de l'AK, et l'accumulation du DHAP est suivie au cours du temps (Figure 109). Au bout d'environ 2 heures, la conversion de la DHA est totale et la synthèse du DHAP quasi quantitative (> 95 %). Le DHAP, en solution dans l'eau, est directement utilisable pour la réaction enzymatique d'aldolisation.

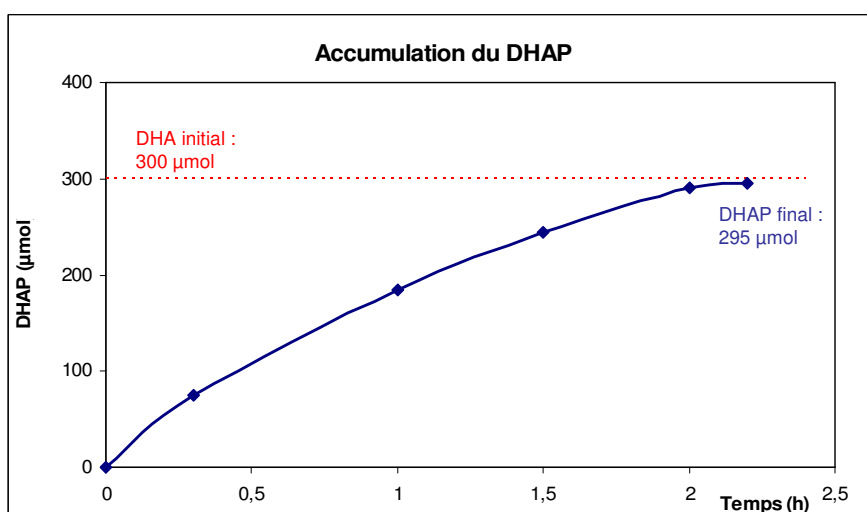


Figure 109 : Suivi spectrophotométrique de la formation du DHAP

¹⁶⁰ Sanchez-Moreno, I.; Garcia-Garcia, J. F.; Bastida, A.; Garcia-Junceda, E. *Chem. Commun.* **2004**, 1634.

Pour la mise en œuvre de cette stratégie de synthèse, la DHAK non commerciale a dû être produite au laboratoire. L'AK est quant à elle commerciale ainsi que son substrat l'acétylphosphate.

2. Production, purification et mesure d'activité de la DHAK

L'équipe du Dr. Garcia-Junceda nous a fourni les cellules souches contenant le plasmide codant pour la DHAK, cloné dans *E. coli*. L'antibiotique de sélection est l'ampicilline. La culture des bactéries est réalisée de la même façon que précédemment par induction à l'IPTG. Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation.

La purification de la protéine peut être faite par IMAC, au même titre que les DHAP-aldolases, car elle est étiquetée par six résidus histidines en position N-terminale. En sortie de colonne, l'enzyme est légèrement polluée par la triosphosphate isomérase TPI. Cette dernière pourrait consommer du DHAP et donc fausser son dosage. Un autre type de purification a donc été testé : la purification par FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) d'exclusion. Pour ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un solide poreux qui permet de séparer des protéines en fonction de leur taille : les protéines trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées les premières. Ce procédé pourrait se montrer utile dans le cas de la séparation de la DHAK et de la TPI :

- DHAK : 63 kDa x 2 (dimère) = 126 kDa
- TPI : approximativement 30 kDa x 1 (monomère) = 30 kDa

Deux types de colonnes ont été testés pour la purification de la DHAK.

- La première est une *Superdex 75 prep grad*, dont la fourchette de fractionnement se situe entre 3 et 70 kDa. Cela signifie que seule la TPI peut rentrer dans les pores de la phase stationnaire, alors que la DHAK n'est pas retenue.
- La deuxième est une *Superdex 200 prep grad*, dont la fourchette de fractionnement se situe entre 10 et 600 kDa. Dans ce cas, les deux protéines entrent dans les pores de la phase stationnaire mais y sont retenues différemment. La TPI, plus petite, est éluée plus lentement.

Les chromatogrammes de sortie de colonne FPLC sont donnés Figure 110.

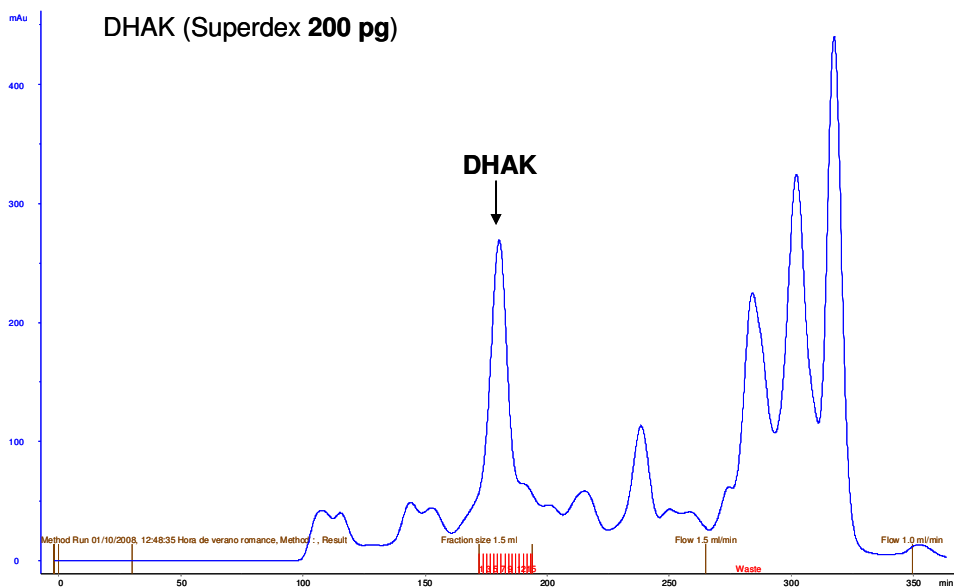
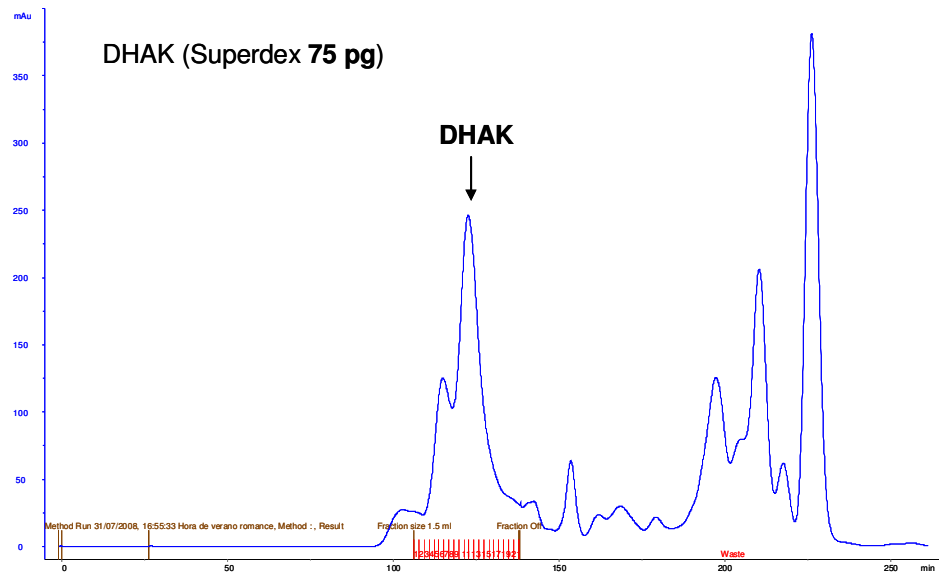


Figure 110 : Chromatogrammes de purification de la DHAK

La DHAK a été parfaitement purifiée par la colonne *Superdex 200 prep grad* qui sera donc utilisée pour l'ensemble de ses purifications.

L'activité de l'enzyme est facilement mesurable par dosage direct : la formation de DHAP sous l'action de la DHAK est quantifiée au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité de la poudre lyophilisée obtenue contenant l'enzyme est relativement élevée, avec une activité spécifique mesurée de **7,00 ± 0,01 U/mg**. Pour un litre de culture, 201 mg de poudre ont été obtenus, soit 1407 U.

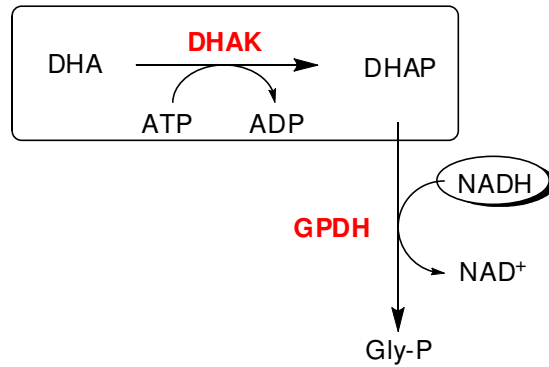


Figure 111 : Principe de la mesure d'activité de la DHAK

Un gel d'électrophorèse SDS-PAGE permet de vérifier la surexpression et la purification de la DHAK (Figure 112). On voit que l'enzyme est très bien purifiée par la technique choisie.

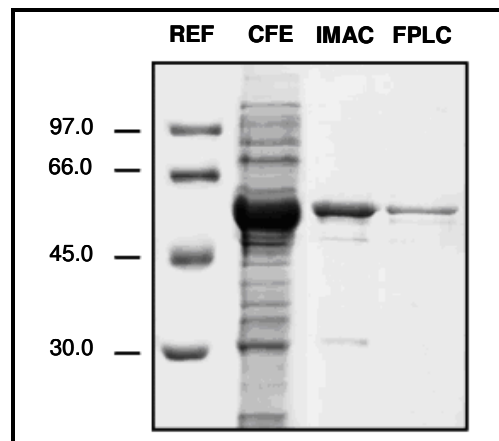


Figure 112 : Analyse SDS-PAGE de la DHAK

Ayant en main les différentes enzymes devant être utilisées pour nos synthèses, nous avons envisagé la production de leurs substrats.

***Chap 2 : Mise en oeuvre des aldolases pour la synthèse
d'aminocyclitols modèles***

Introduction

La méthodologie de synthèse des aminocyclitols au moyen d'aldolases repose sur la capacité de ces dernières à accepter différents substrats aldéhydiques. Ainsi, il a été fait l'hypothèse que ces aldolases seraient capables d'accepter des aldéhydes porteurs d'un groupement nitro en bout de chaîne. Sa présence est indispensable car il permet la réaction de Henry intramoléculaire responsable de la formation du cyclitol.

Lors des travaux de thèse de L. El Blidi, il a été montré que la FBA tolère les aldéhydes nitrés en position 4, porteurs de 0, 1 ou 2 groupements hydroxyles. Dans ce cas, on peut supposer que ces molécules miment assez bien le substrat naturel de l'enzyme, le G3P. En effet, le groupement nitro, par son environnement électronique dense et la charge négative sur l'un des oxygènes, se rapproche du groupement phosphate et on retrouve aussi les alcools.

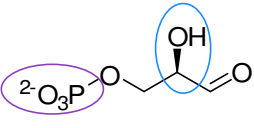
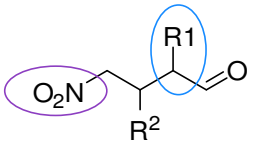
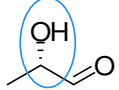
Aldolase	Substrat naturel	Substrats nitrés modèles
FSA, FBA		 $R^1, R^2 = H, OH$
R1PA, F1PA		

Tableau 6 : Substrats à tester comme mimes des substrats naturels des aldolases

Dans le cas de la R1PA et de la F1PA que nous souhaitons employer, le substrat aldéhydique naturel est différent de celui de la FBA. Pour la FSA, l'accepteur naturel est identique à celui de la FBA mais leurs sites actifs sont différents. Il était donc important, en premier lieu, de tester la tolérance de ces enzymes envers des aldéhydes nitrés simples, porteur ou non de groupements hydroxyles. Ces composés nous permettront aussi d'étudier la stéréochimie des nitrocyclitols formés, c'est-à-dire l'influence de groupements en position 2 et 3 de l'aldéhyde sur la stéréospécificité des aldolases et de la réaction de Henry.

Le paragraphe qui suit présente la synthèse des aldéhydes précurseurs, c'est-à-dire la préparation des composés modèles. Les résultats des couplages enzymatiques seront exposés à la suite.

I. Préparation des aldéhydes modèles

La stratégie de synthèse des différents aldéhydes nitrés en position 4 possédants 0, 1 ou 2 groupements hydroxyles est indiquée sur le schéma ci-dessous (Figure 113). Elle est inspirée des travaux de thèse de L. El Blidi.

Mis à part la synthèse du nitrobutyraldéhyde qui met en jeu une addition de Michael, l'étape commune est une condensation entre le nitrométhane et un aldéhyde (réaction de Henry) qui permet l'introduction du groupement nitro. Les substrats aldéhydiques pourront être formés par déprotection en milieu acide de la fonction acétal.

Dans un premier temps, les composés sont synthétisés de manière racémique, afin d'évaluer leur qualité de substrats vis-à-vis des aldolases. Dans un deuxième temps, certains aldéhydes seront dédoublés par voie enzymatique. Le dédoublement de précurseurs de l'aldéhyde **96** est en particulier important. En effet, la présence de deux carbones asymétriques sur la molécule pourrait donner accès à de trop nombreux diastéréoisomères à séparer au niveau des nitrocyclitols si leur configuration n'était pas contrôlée.

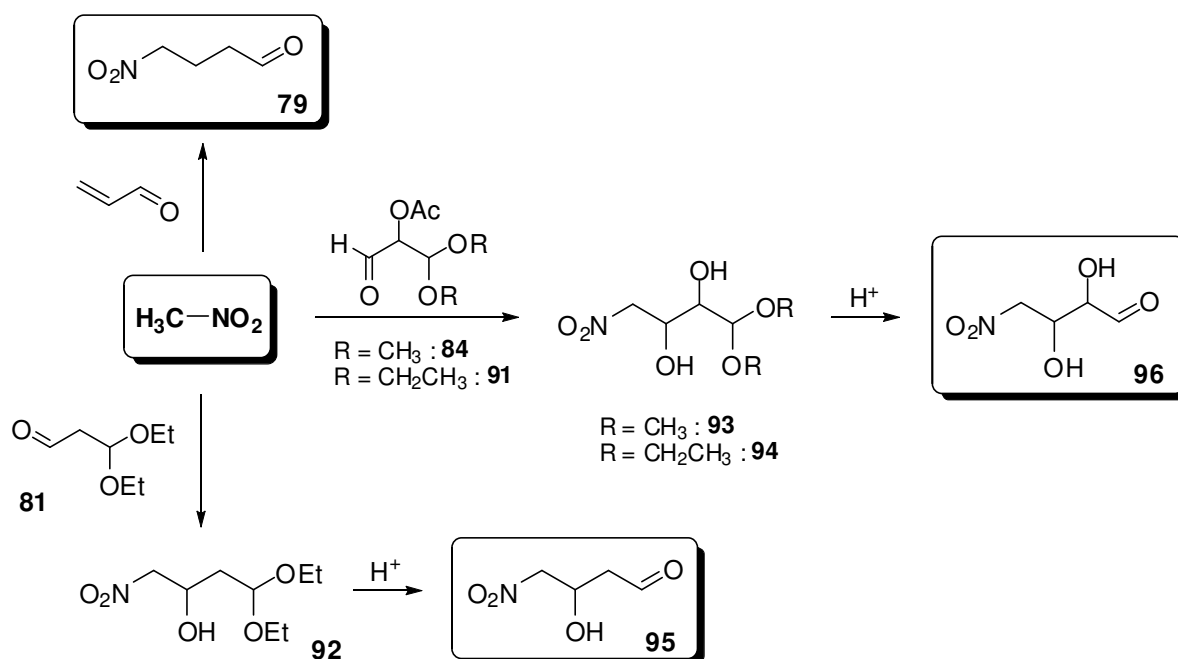


Figure 113 : Schéma général de synthèse des substrats modèles

1. Synthèse du 4-nitrobutanal **79**

L'aldéhyde **79** est obtenu par une réaction d'alkylation entre l'acroléine et le nitrométhane en milieu faiblement basique¹⁶¹.

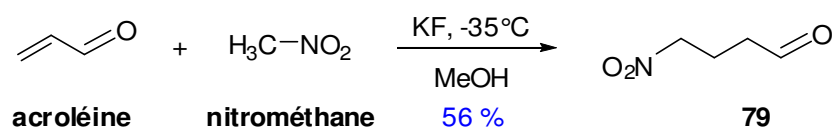


Figure 114 : Synthèse du 4-nitrobutanal

En travaillant à basse température, en présence d'un grand excès de nitrométhane et en milieu basique (KF), l'aldéhyde désiré se forme de façon majoritaire. D'autres conditions testées, notamment en température, conduisent souvent à une double alkylation en alpha du nitro. Cet aldéhyde ne peut être purifié par chromatographie sur gel de silice, car il se produit une réaction secondaire d'aldolisation intermoléculaire. Il faut le distiller sous pression réduite, sans surchauffer en raison du risque explosif du groupement nitro. On obtient l'aldéhyde pur avec un rendement de 56 %.

2. Obtention des réactifs 81, 84 et 91

2.1. Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal 81

Le schéma réactionnel est le suivant :

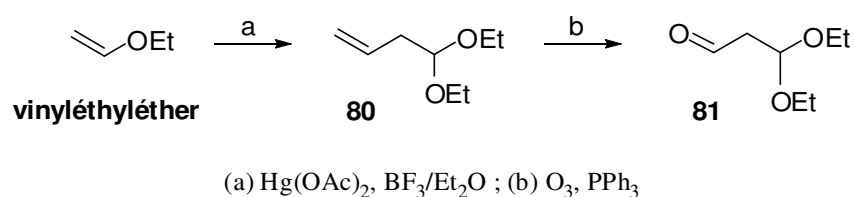


Figure 115 : schéma général de formation de l'aldéhyde 81

Pour l'étape (a) de formation du composé **80**, nous avons appliqué les conditions décrites par Montagna en 1958¹⁶², et déjà utilisées au laboratoire pour cette réaction. Les éthers α, β -insaturés se polymérisent très facilement lorsqu'ils sont mis en présence d'acétate mercurique et de trifluorure de bore. Aussi, le vinyléthyléther est additionné à un mélange de ces deux composés dans l'éther. Après 2 h de réaction, le produit est obtenu.

En effectuant la synthèse à 4°C au lieu de 50 °C, nous avons pu augmenter le rendement de 52 à 85 %. Cette amélioration est entre autre due à la suppression de la purification par chromatographie : à froid la réaction est propre et une simple filtration permet d'obtenir le composé désiré pur. Cela limite les manipulations de l'alcène **80** volatil.

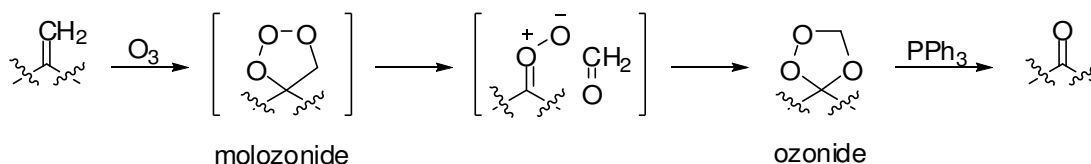
¹⁶² Hoaglin, R. I.; Kubler, D. G.; Montagna, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 5460.

L'étape (b) a tout d'abord été effectuée par ozonolyse classique du composé **80**. Cette oxydation, décrite de nombreuses fois dans la littérature¹⁶³, est effectuée à -78°C sous courant d'ozone dans un mélange MeOH/CH₂Cl₂. Lors de cette réaction, il y a formation d'un ozonide qui est réduit en carbonyle en présence de triphénylphosphine. Nous avons privilégié l'emploi de ce réducteur plutôt que le diméthylsulfure plus classique, car la réaction de réduction est nettement plus rapide. Le produit **81** est purifié par chromatographie éclair et est obtenu avec un rendement de 78%.

Avec l'intention d'optimiser ce rendement et de supprimer dans le meilleur des cas l'étape de purification, nous avons testé trois nouvelles méthodes de synthèse.

La première est une méthode d'ozonolyse d'une double liaison sans formation d'ozonides intermédiaires¹⁶⁴. La réaction est effectuée à 0°C dans un mélange eau/acétone sous courant d'ozone. Le Soudan rouge 7B est utilisé comme indicateur coloré de la fin de réaction. Le milieu se décolore en présence d'un excès d'ozone lorsque la réaction est terminée. L'aldéhyde **81** est obtenu sans étape de purification avec un rendement de 83 %. Cette méthode est intéressante car elle évite la réduction de l'ozonide par PPh₃ ou S(CH₃)₂, donnant des oxydes souvent pénibles à séparer du produit souhaité. La comparaison des mécanismes de réaction avec l'ozonolyse « classique » est présentée Figure 116.

Ozonolyse 'classique' en 2 étapes :



Ozonolyse dans l'eau en 1 étape :

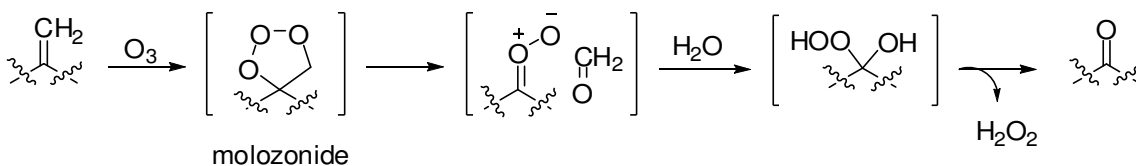


Figure 116 : Intermédiaires réactionnels de deux méthodes d'ozonolyse différentes

Les deux autres méthodes de synthèse testées pour le composé **81** reposent sur l'obtention de l'aldéhyde en deux étapes mais un seul pot, moins propice à l'apparition de sous produits que l'ozonolyse. L'alcène **80** est tout d'abord soumis à un oxydant fort, donnant lieu à la formation d'un diol. La coupure oxydante de ce dernier, par réaction avec du

¹⁶³ Van Ornum, S. G.; Champeau, R. M.; Pariza, R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2990.

¹⁶⁴ Schiaffo, C. E.; Dussault, P. H. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4688.

métaperiodate de sodium supporté sur silice¹⁶⁵, produit l'aldéhyde **81** attendu. Deux oxydants ont été testés : le permanganate de potassium KMnO_4 ¹⁶⁶ et le tétraoxyde de ruthénium RuO_4 ¹⁶⁷. Le meilleur résultat a été obtenu avec le KMnO_4 , correspondant à un rendement de 96 %.

Le bilan des réactions testées pour la synthèse du composé **81** est présenté Figure 117.

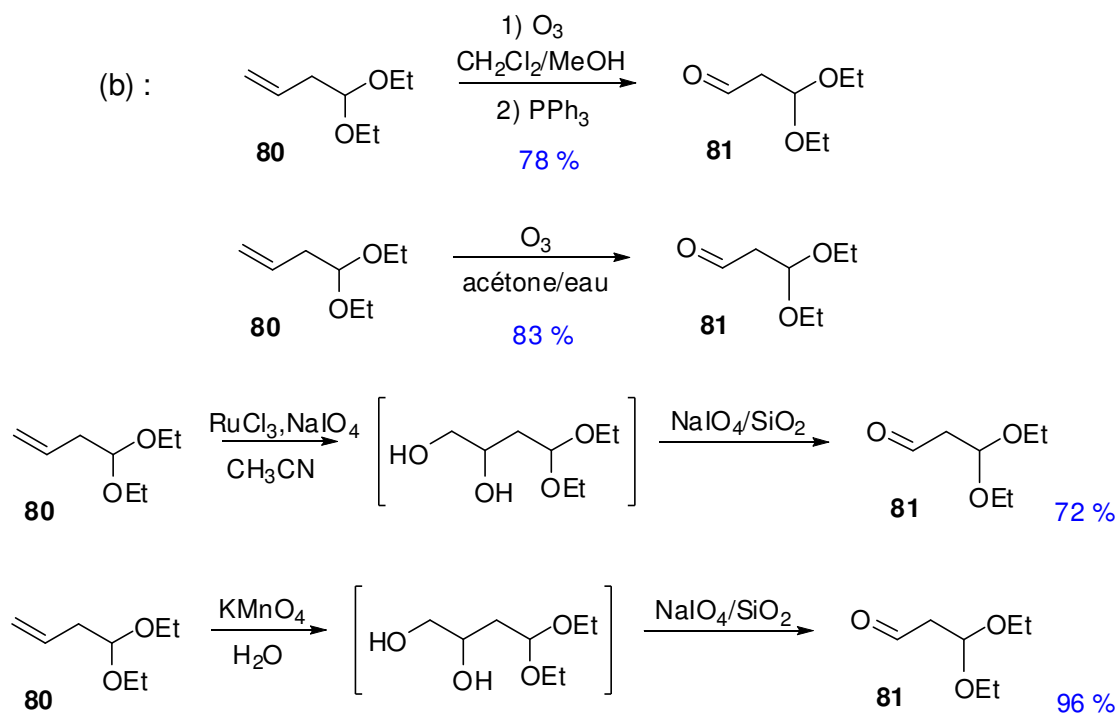


Figure 117 : Différentes conditions testées pour l'étape (b)

Il faut noter que cette mise au point a été réalisée en fin de thèse et qu'elle n'a donc pas pu être mise en place dans les stratégies de synthèse des autres aldéhydes qui vont suivre.

2.2. Synthèse des aldéhydes **84** et **91**

Il y a quelques années, nous avons mis au point une synthèse de l'aldéhyde **84** au laboratoire en 3 étapes selon le schéma suivant¹⁶⁸ :

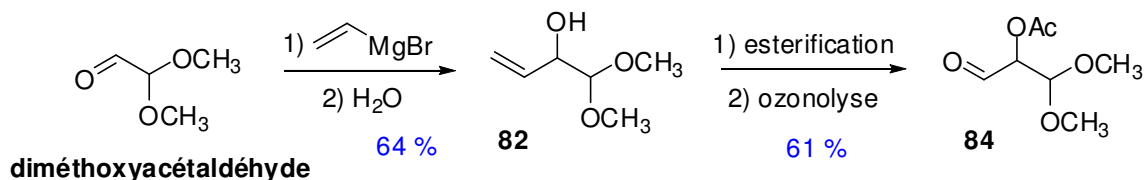


Figure 118 : Synthèse de l'aldéhyde **84** à partir du diméthoxyacétaldéhyde

¹⁶⁵ Zhong, Y. L.; Shing, T. K. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2622.

¹⁶⁶ Page, P.; Blonski, C.; Perie, J. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1403.

¹⁶⁷ Piccialli, V.; Borbone, N.; Oliviero, G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5131.

¹⁶⁸ Chenevert, R.; Gravil, S.; Bolte, J. *Tetrahedron Asym.* **2005**, *16*, 2081.

La première étape consiste en une réaction de Grignard entre le vinylmagnésien fraîchement préparé et le diméthoxyacétaldéhyde. Puis, l'alcool obtenu est estérifié avant ozonolyse. Le rendement global de cette synthèse est de 39 %.

Cependant, le diméthoxyacétaldéhyde n'étant finalement plus commercialisé anhydre, nous avons dû entreprendre sa synthèse. Cela rallonge le schéma général de deux étapes : l'ouverture du furane par du dibrome en présence de méthanol¹⁶⁹, suivie d'une coupure oxydante par KMnO₄/NaIO₄ (Figure 119).

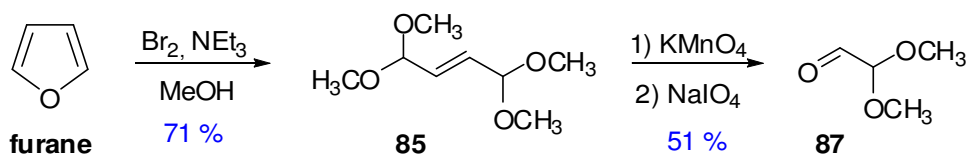


Figure 119 : Synthèse du diméthoxyacétaldéhyde

Comme cette voie de synthèse via un organomagnésien, dotée de faibles rendements, était devenue peu pertinente, nous avons donc exploré d'autres voies d'accès à l'aldéhyde désiré : à partir du cinnamaldéhyde, du crotonaldéhyde, ou encore du 3-benzyloxy-1,2-propandiol. Ces essais se sont soldés par des échecs et ne seront pas développés ici. C'est finalement à partir de l'acroléine diéthylacétal qu'un schéma de synthèse a pu aboutir au composé **91**.

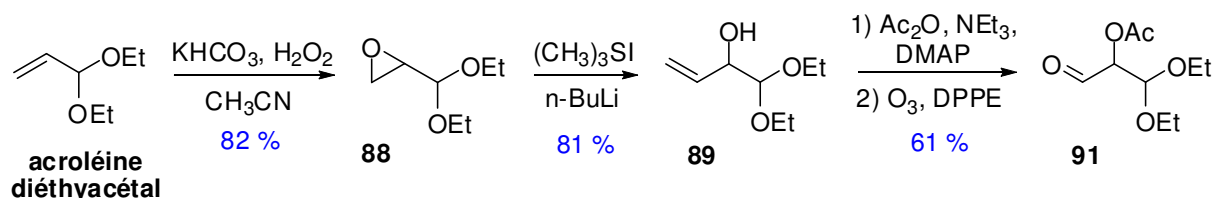


Figure 120 : Synthèse de l'aldéhyde **91** à partir de l'acroléine diéthylacétal

La première étape de la synthèse correspond à la formation de l'époxyde **88**. La méthode générale d'époxydation par l'acide *m*éto-chloroperoxybenzoïque (*m*-CPBA) pose problème, à cause des conditions acides qui pourraient provoquer l'hydrolyse de l'acétal. Suivant des méthodes décrites dans la littérature, deux essais ont tout de même été lancés :

- 1- Une synthèse de l'époxyde en présence de KOH et *m*-CPBA a tout d'abord été testée¹⁷⁰. Après 24 h d'agitation à température ambiante, aucune réaction ne s'est produite sur l'acroléine diéthyl acétal. La double liaison ne doit pas être assez activée électroniquement pour réagir dans ces conditions.

¹⁶⁹ Frederico, D.; Donate, P. M.; Constantino, M. G.; Bronze, E. S.; Sairre, M. I. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9126.

¹⁷⁰ Ruano, J. L. G.; Aleman, J.; Fajardo, C.; Parra, A. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5493.

2- L'emploi d'un milieu tamponné $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,6 et de *m*-CPBA¹⁷¹ a conduit à l'époxyde mais en faible quantité. Cette méthodologie n'a donc pas été retenue.

L'étape d'époxydation a finalement été effectuée en milieu basique, par action de l'eau oxygénée dans l'acétonitrile. Par rapport au mode opératoire décrit dans la littérature¹⁷², le benzonitrile a été avantageusement remplacé par l'acétonitrile. De cette manière, l'acétamide formé au cours de la réaction a pu être précipité puis filtré, et l'acétonitrile en excès facilement évaporé. Le produit est ainsi obtenu suffisamment propre pour être mis en réaction dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. Son rendement brut est de 82 %.

L'ouverture régiosélective de l'époxyde se fait par l'iodure de triméthylsulfonium préalablement mis en solution en présence de *n*-butyllithium¹⁷³. Une élimination sur le sulfonium intermédiaire permet de former la double liaison. Du diméthylsulfure (DMS) est libéré au cours de la réaction. Ce mécanisme est proposé Figure 121. Le milieu réactionnel doit être anhydre et maintenu à -10°C pour éviter les réactions parasites d'attaque de l'eau ou des ions iodures sur l'époxyde. Un passage rapide sur gel de silice permet d'obtenir l'alcool **89** pur avec un rendement de 81 %. La manipulation de ce composé doit se faire en tenant compte de sa volatilité.

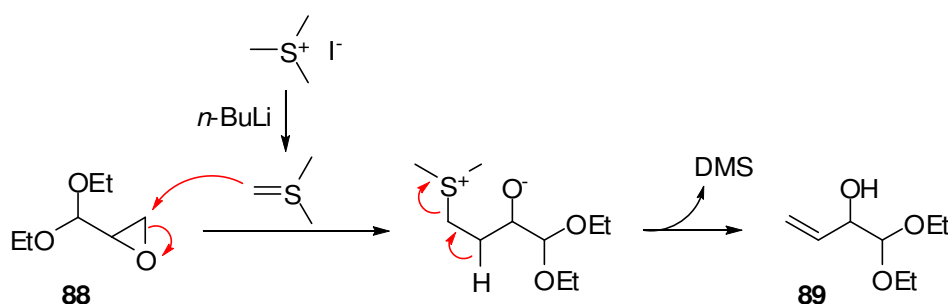


Figure 121 : Mécanisme d'ouverture de l'époxyde

La fonction alcool est estérifiée classiquement par action de l'anhydride acétique en présence de triéthylamine et du catalyseur 4-diméthylaminopyridine (DMAP). Cette étape facilite l'isolement du produit d'ozonolyse et améliore le rendement global.

Enfin, l'ozonolyse de l'intermédiaire acétylé brut donne accès à l'aldéhyde d'intérêt. L'emploi du 1,2-diphénylphosphinoéthane (DPPE)¹⁷⁴, au lieu de la triphénylphosphine ou du

¹⁷¹ Denton, R. W.; Tony, K. A.; Hernandez-Gay, J. J.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 1624

¹⁷² Charmantray, F.; Dellis, P.; Helaine, V.; Samreth, S.; Hecquet, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5526.

¹⁷³ Hodgson, D. M.; Fleming, M. J.; Stanway, S. J. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4763.

¹⁷⁴ O'Neil, I. A.; Thompson, S.; Murray, C. L.; Kalindjian, S. B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7787.

DMS plus classique, a simplifié fortement la procédure de purification. Son oxyde est plus facilement éliminable par précipitation à l'éther. Le rendement sur les deux étapes s'élève à 61 %.

3. Synthèse des aldéhydes 95 et 96 racémiques

3.1. La réaction de Henry : présentation générale

La réaction de Henry, ou nitroaldolisation, est l'une des réactions les plus classiques en synthèse organique pour former des liaisons carbone-carbone par couplage entre un carbonyle et un nitroalcane α -hydrogéné. Un β -nitroalcool est ainsi obtenu avec la création d'un ou deux centres asymétriques¹⁷⁵. Il peut subir ensuite une oxydation, une réduction ou une déshydratation permettant l'accès à d'autres composés comme des nitroalcènes, des β -aminoalcools et des carbonyles nitré en α , selon les différents objectifs de la synthèse (Figure 122).

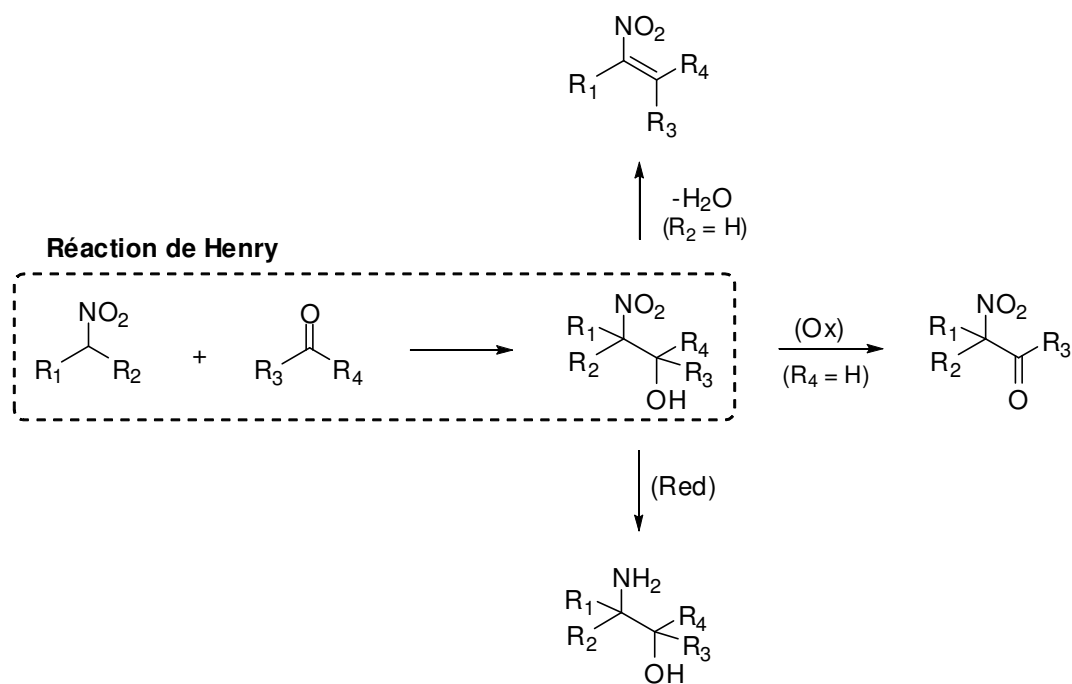
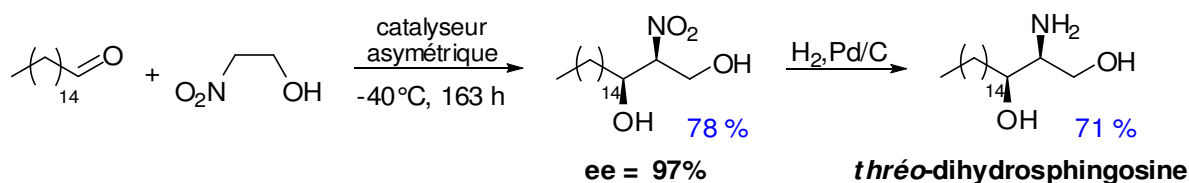


Figure 122 : La réaction de Henry, étape clé dans la synthèse de nombreux composés

La réaction de Henry peut être catalysée par des bases organiques comme par des bases inorganiques, dans des solvants protiques ou aprotiques. Ces conditions dépendent des fonctions des réactifs et de la solubilité du nitronate généré.

¹⁷⁵ (a) Henry, L. C. R. Acad. Sci. Ser. C. **1895**, 120, 1265 ; (b) Luzzio, F. A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 915.

Ces dernières années, de nombreux développements de cette réaction en version asymétrique ont été décrits dans la littérature¹⁷⁶. Ainsi, de considérables efforts ont été portés vers le développement de catalyseurs asymétriques¹⁷⁷. Les exemples en version racémique et stéréosélective sont tellement nombreux que nous avons choisi de présenter simplement un seul exemple : la synthèse de la *thréo*-dihydroshingosine avec intervention d'un catalyseur métallique asymétrique dérivé du (*R*)-Binol¹⁷⁸. La réaction de Henry permet l'obtention de l'intermédiaire nitré, avec la formation stéréosélective d'une liaison carbone-carbone.



Catalyseur asymétrique :

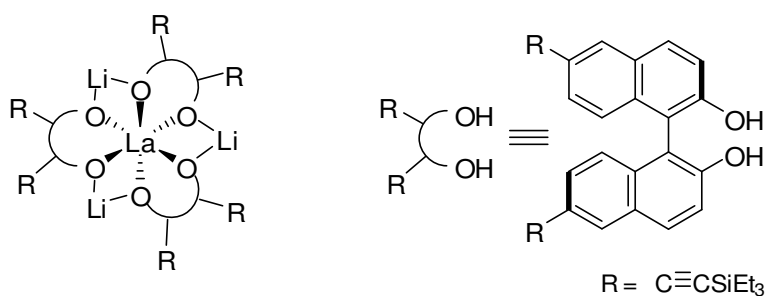


Figure 123 : Exemple d'une réaction de Henry stéréosélective

3.2. Application à la synthèse des composés 92, 93 et 94

Les aldéhydes **81**, **84** et **91** ayant été préparés, ils sont mis en jeu dans l'étape clé d'introduction du groupement nitro sur la molécule. Il s'agit d'une réaction de Henry non stéréosélective avec le nitrométhane. Nous n'avons pas du tout cherché à développer des méthodes impliquant des catalyseurs asymétriques organométalliques.

La réaction du nitrométhane sur l'aldéhyde **81** en milieu basique concentré permet de préparer le produit racémique **92** avec un bon rendement de 86 % (Figure 124).

¹⁷⁶ Boruwa, J.; Gogoi, N.; Saikia, P. P.; Barua, N. C. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 3315.

¹⁷⁷ (a) Trost, B. M.; Yeh, V. S. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 861. (b) Evans, D. A.; Seidel, D.; Rueping, M.; Lam, H. W.; Shaw, J. T.; Downey, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12692.

¹⁷⁸ Sasai, H.; Tokunaga, T.; Watanabe, S.; Suzuki, T.; Itoh, N.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7388.

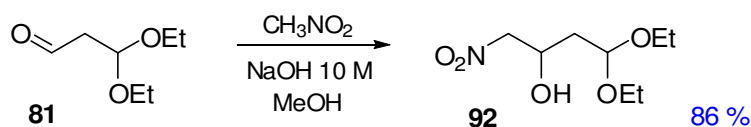


Figure 124 : Synthèse du composé nitré 92

Dans le cas des réactions avec l'aldéhyde **84** ou **91**, plusieurs conditions de réaction ont été testées. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

Type de base	Quantité	Solvant	Procédé	Rendement
NaOH 6M	Stœchiométrique	MeOH	Ajout de l'aldéhyde à 1 éq. de nitronate, 0°C	Alkylation en C3
NaOH 6M	Stœchiométrique	MeOH	Ajout d'1 éq. de nitronate à l'aldéhyde, 0°C	80 %
NEt ₃ ¹⁷⁹	Excès	CH ₂ Cl ₂	Ajout d'1 éq. de nitronate à l'aldéhyde, 0°C	Dégradation
TMG ¹⁸⁰	Catalytique	CH ₃ NO ₂	Nitrométhane comme solvant, 0°C	Alkylation en C3
TMG	Catalytique	CH ₂ Cl ₂	Ajout d'1 éq. de nitrométhane à l'aldéhyde + TMG, TA	Pas de réaction
TBAF ¹⁸¹	Catalytique	THF	Ajout d'1 éq. de nitrométhane à l'aldéhyde + TBAF, -30°C	Dégradation

Tableau 7 : Mise au point de conditions pour l'addition de CH₃NO₂

Le meilleur rendement a été atteint avec une solution d'hydroxyde de sodium 6 M par addition lente du nitronate à une solution diluée de l'aldéhyde à 0°C. La quantité de nitrométhane à introduire dans le milieu doit être maîtrisée, pour limiter la réaction parasite observée de substitution en position 3 du nitroalcool (Figure 125). Pour cette même raison, les manipulations ont été effectuées à froid. L'acétate s'hydrolyse logiquement en alcool en raison de la basicité du milieu.

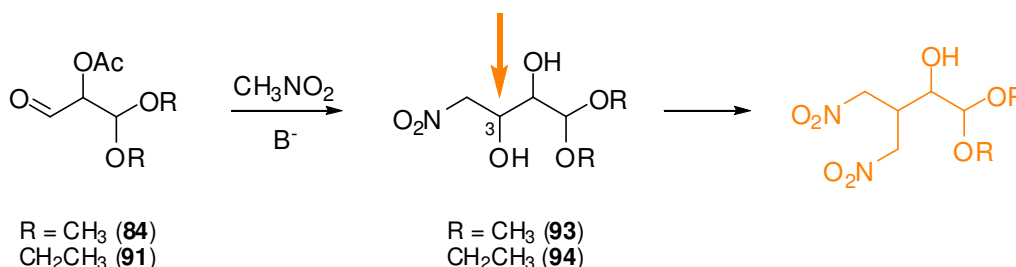


Figure 125 : Réaction secondaire de di-substitution

¹⁷⁹ Maheswaran, H.; Prasanth, K. L.; Krishna, G. G.; Ravikumar, K.; Sridhar, B.; Kantam, M. L. *Chem. Commun.* **2006**, 4066.

¹⁸⁰ Ma, D. W.; Pan, Q. B.; Han, F. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9401.

¹⁸¹ Kudyba, I.; Raczko, J.; Urbanczyk-Lipkowska, Z.; Jurczak, J. *Tetrahedron* **2004**, 60, 4807.

3.3. Déprotection des aldéhydes

L'hydrolyse du groupement acétal, suivie par CCM, est effectuée à 45°C en milieu aqueux, en présence d'une résine Dowex H⁺. Cette réaction étant totale d'après la CCM, elle permet d'obtenir l'aldéhyde en solution dans l'eau après simple filtration de la résine. Le rendement est supposé quantitatif. Après ajustement au pH de travail de l'enzyme utilisée, la solution d'aldéhyde est prête à l'emploi. L'ensemble des aldéhydes 4-nitro α et/ou β-hydroxylés a été déprotégé selon cette procédure.

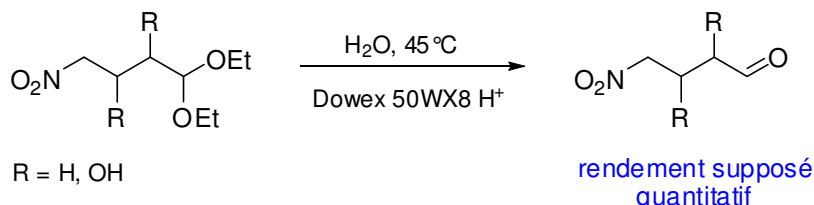


Figure 126 : Déprotection de l'acétal

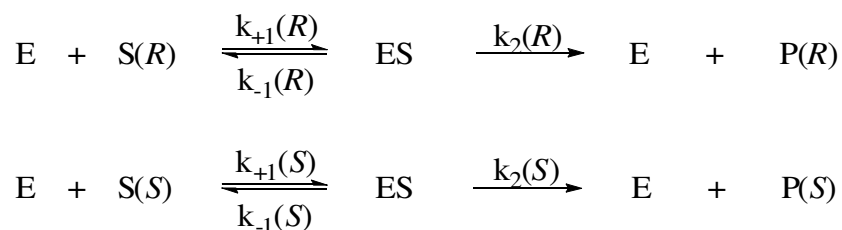
4. Dédoublément enzymatique

Comme les aldolases sont peu énantiosélectives vis-à-vis des aldéhydes, il est souhaitable, pour simplifier la méthodologie de synthèse et les procédures de purification, de travailler avec des substrats optiquement purs.

4.1. Principe

Les enzymes constituent un groupe particulièrement important de catalyseurs chiraux. La catalyse enzymatique est fondée sur une adaptation tridimensionnelle de la molécule dans un site actif, permettant souvent un degré élevé de sélectivité entre deux stéréoisomères. Les enzymes les plus faciles à employer sont celles qui catalysent l'hydrolyse des esters (estérases, lipases). Elles sont couramment utilisées pour réaliser des dédoubléments de composés racémiques ou des désymétrisations.

Dans le cas d'un dédoublément cinétique enzymatique, deux réactions sont en compétition :



Les vitesses de transformation sont différentes pour chacun des énantiomères. On définit le coefficient d'énantiosélectivité E comme le rapport de ces vitesses :

$$E = \frac{V_R}{V_S} = \frac{\left(\frac{k_2}{K_m}\right)_R}{\left(\frac{k_2}{K_m}\right)_S}$$

Les vitesses apparentes V_R et V_S ne sont accessibles que si les deux énantiomères sont ensemble en présence de l'enzyme, et ne sont donc pas toujours faciles à déterminer. Sih *et coll*¹⁸² ont montré que E était lié à l'excès énantiomérique (ee) des substrats et des produits, ainsi qu'au taux de conversion c (degré d'avancement de la réaction). Les équations suivantes sont couramment utilisées :

$$E_{\text{sub}} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_{\text{sub}})]}{\ln[(1-c)(1+ee_{\text{sub}})]} \quad E_{\text{prod}} = \frac{\ln[1-c(1+ee_{\text{prod}})]}{\ln[1-c(1-ee_{\text{prod}})]}$$

Ces expressions sont valables dans le cas où la réaction est irréversible. Le rapport E caractérise l'efficacité de l'enzyme pour le dédoublement cinétique d'un substrat donné. La connaissance du coefficient d'énantiosélectivité permet de savoir à quel taux de conversion on doit s'arrêter pour avoir un excès énantiomérique donné.

4.2. Présentation des techniques de détermination d'excès énantiomériques

Les excès énantiomériques et l'avancement d'une réaction peuvent être déterminés par plusieurs techniques d'analyses. Au cours de ce travail, les méthodes de détermination des ee qui ont été mises en œuvre sont la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) avec des agents de complexation à l'euprium et la chromatographie chirale en phase vapeur.

4.2.1. Spectroscopie de RMN

La spectroscopie de RMN est utilisée depuis longtemps pour déterminer les ee . Elle repose sur la possibilité de différencier des diastéréoisomères. En effet, des énantiomères ne peuvent pas être différenciés en RMN car leurs noyaux sont isochrones, mais l'équivalence chimique n'existe plus pour des diastéréoisomères. La fréquence de résonance devient différente pour les noyaux, et la mesure de l'excès diastéréoisomérique (de) est rendue possible par simple comparaison des intégrales correspondant à ces noyaux.

C'est Hinckel qui a démontré en 1969 que des lanthanides chélatés par des ligands organiques sont capables d'induire des déplacements de résonance pour certains noyaux. Ces agents de complexation sont donc aussi connus sous le terme de « déblindeurs ». Lorsque les

¹⁸² Chen, C.-S. ; Fujimoto, Y. ; Girdaukas, G. ; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1294.

ligands sont chiraux, il se forme avec le mélange d'énantiomères des complexes diastéréoisomériques. Les dérivés du camphre constituent aujourd'hui la majorité des ligands chiraux.

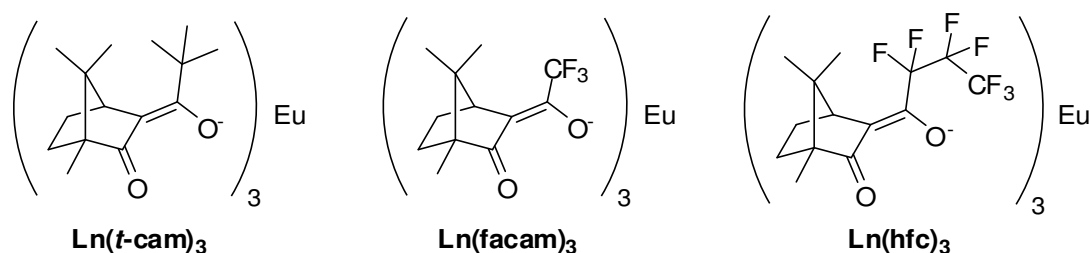


Figure 127 : Agents complexant chiraux dérivés du camphre

Nous avons retenu cette méthode de mesure des *ee* pour sa performance en dédoublement de signaux de RMN et sa simplicité. Les sels d'euprium servant d'agents complexants chiraux sont directement ajoutés dans le tube de RMN contenant le produit à analyser.

4.2.2. Méthodes chromatographiques

La chromatographie en phase vapeur (CPV) est une méthode de choix pour la détermination d'*ee*. Elle possède plusieurs avantages : vitesse, sensibilité, simplicité et rapidité. La séparation des énantiomères se fait à l'aide d'une colonne à support chiral. Les interactions qui se créent entre la phase stationnaire et les substrats expliquent les temps de rétention différents. De nombreuses phases stationnaires chirales sont désormais disponibles.

Ces techniques offrent l'avantage de ne pas être affectées par des impuretés de l'échantillon. Celles-ci donnent des pics supplémentaires sur les chromatogrammes mais ne modifient pas (sauf cas de superposition) l'aire des pics correspondant aux produits. Il devient donc possible de procéder au suivi d'une réaction. Cette méthodologie a donc été retenue pour nos suivis de réactions lors des dédoublements enzymatiques.

4.3. Le dédoublement cinétique enzymatique

Un dédoublement au niveau des fonctions alcools a été envisagé. Les substrats que nous souhaitons dédoublement sont les suivants :

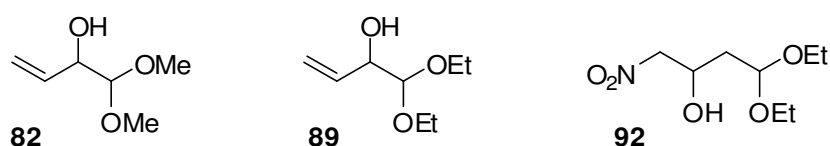


Figure 128 : Alcools ciblés pour un dédoublement

Classiquement, les biocatalyseurs choisis sont des lipases. Celles-ci présentent de nombreux avantages et font partie des enzymes les plus utilisées en synthèse. Comme toutes les hydrolases, les lipases n'ont pas besoin de cofacteur pour fonctionner. Et en raison de leur fonction biologique d'hydrolyse des lipides, elles supportent très bien les solvants organiques. De nombreuses lipases sont disponibles sur le marché et sont en général peu coûteuses. Ainsi, même si les réactions sont lentes, cet inconvénient peut être compensé par la quantité d'enzyme que l'on utilise. Et cela d'autant plus que certaines lipases sont commercialisées supportées sur des billes de polymères, permettant de les recycler.

Nous avons choisi de mettre en œuvre les lipases dans une réaction de transestérification, avec des agents acylants qui rendent la réaction irréversible. Si le coefficient d'énantiosélectivité est suffisamment grand, la méthodologie donnera accès à 50 % de l'ester dans une configuration donnée, et 50 % de l'alcool de départ dans l'autre configuration avec de bons excès énantiomériques autour de 50 % de conversion.

Concernant l'énantiopréférence des lipases, grâce à la compilation d'un grand nombre de cas et à des études de sites actifs, R. Kazlauskas¹⁸³ a proposé une règle empirique qui permet de prédire quel énantiomère d'un alcool secondaire réagira le plus rapidement. Elle se base sur la taille des substituants. L'énantiomère favorisé par un grand nombre de lipases, pour un hydroxyle pointant vers l'avant, est l'énantiomère possédant le groupement le plus volumineux à droite.

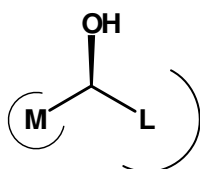


Figure 129 : Enantiopréférence des lipases

Plusieurs auteurs ont d'ailleurs réussi à améliorer l'énantiosélectivité en augmentant la différence de taille entre deux substituants d'un alcool secondaire. De la même façon, d'autres ont pu inverser l'énantiosélectivité en transformant le groupement de taille moyenne en groupement plus volumineux. Mais dans certains cas, des lipases peuvent montrer une énantiopréférence inverse comme illustré par exemple par Xia *et al.*¹⁸⁴

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche a régulièrement utilisé des lipases pour des dédoublements enzymatiques. Lors de ses travaux de thèse, L. El Blidi a étudié le dédoublement de l'alcool en β du NO₂ du produit **92**. Plusieurs lipases ont été criblées et l'enzyme révélée la plus efficace est la lipase B de *Candida antarctica* (notée CAL-B).

¹⁸³ Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis* **1999**, VCH: Weinheim.

¹⁸⁴ Xia, X. L.; Wang, Y. H.; Yang, B.; Wang, X. N. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 83.

Cependant, malgré une attention toute particulière donnée au type de donneur ou au solvant de réaction, ce dédoublement cinétique n'a pas permis d'isoler les deux composés attendus (l'alcool **R-92** et l'acétate **S** correspondant). En effet, l'ester formé évolue spontanément vers le produit d'élimination et n'a jamais pu être isolé.¹⁸⁵ C'est pourquoi pour le projet actuel, nous n'avons pas cherché à dédoubler l'alcool en α du groupement nitro.

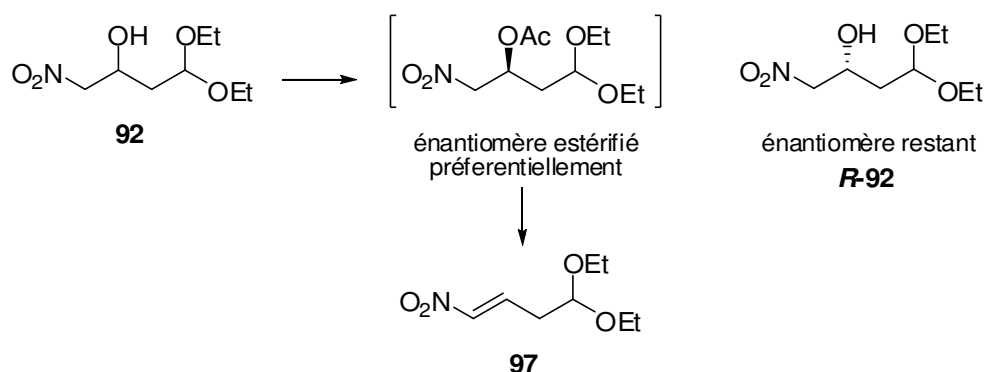


Figure 130 : Dédoublage cinétique de l'alcool **92**

Au cours de ces travaux de thèse nous nous sommes intéressés au dédoublement de l'hydroxyle des acétals **82** et **89**. Celui de l'alcool **82** a été étudié dans notre laboratoire par S. Gravil en 2005¹⁶⁸, et nous avons repris ses travaux pour optimiser les rendements et les excès énantiomériques.¹⁸⁶ Puis nous avons adapté la méthode au cas de l'alcool **89**. L'enzyme utilisée est la CAL-B immobilisée sur support solide, appelée commercialement Novozyme 435. Le donneur d'acyle est l'acétate de vinyle, qui sert aussi de solvant.

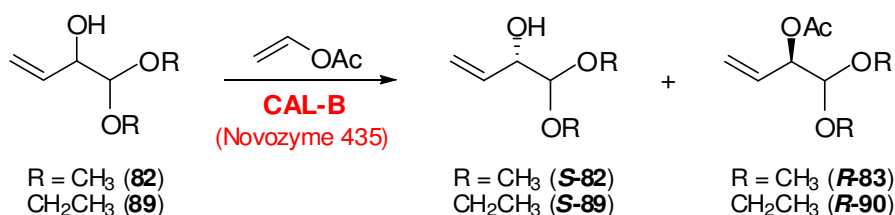


Figure 131 : Dédoublage cinétique des alcools **82** et **89**

Le rapport E pour le dédoublement cinétique de l'acétal **82** étant élevé avec la CAL-B, nous avons supposé qu'il en serait de même pour le dédoublement de l'acétal **89** avec cette même enzyme. Nous nous attendions donc à obtenir les meilleurs excès énantiomériques de l'alcool **S-89** et de l'acétate **R-90** vers 50 % de conversion. Pour vérifier cette supposition, la

¹⁸⁵ El Blidi, Ahbala M., Bolte J ; Lemaire M. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 2684

¹⁶⁸ Chenevert R., Gravil, S., Bolte J. *Tetrahedron Asym.* **2005**, *16*, 2081.

¹⁸⁶ El Blidi L., Assaf Z., Camps Bres F., Veschambre H., Théry V., Bolte J., Lemaire M., *ChemCatChem* **2009**, *1*, 463.

réaction est suivie une première fois en CPV sur colonne chirale. Le dédoublement est stoppé lorsque les meilleurs excès énantiomériques sont observés, soit effectivement vers 50 % de conversion selon notre attente.

Par la suite, lors du lancement de nouveaux dédoublements avec le même substrat et la même enzyme, la réaction est suivie en CPV sur colonne normale. Celle-ci est moins fragile que la colonne chirale et les deux produits sortent à des temps de rétention bien distants avec le même programme de température. Après 50 % de conversion (environ 20 h), la réaction est stoppée par simple filtration de l'enzyme. Le taux de conversion est alors calculé à partir de l'équation suivante :

$$c = 1 - \frac{[\text{substrat}]_t}{[\text{substrat}]_{t=0}}$$

L'ester formé et l'alcool restant sont séparés par chromatographie éclair. Leur excès énantiomérique a été mesuré par CPV chirale. Le détail des analyses est donné en partie expérimentale.

On obtient les résultats suivants :

Produit	Rendement	ee	c	E
Alcool S-82	46 %	98 %	0,49	> 200
Ester R-83	44 %	> 98 %		
Alcool S-89	49 %	96 %	0,47	> 200
Ester R-90	45 %	> 98 %		

Tableau 8 : Résultat du dédoublement cinétique des alcools 82 et 89

L'enzyme peut être recyclée au moins 4-5 fois, la vitesse de la réaction ne diminue que légèrement à chaque fois.

Cette technique de dédoublement est intéressante car elle donne accès à la configuration *R* et à la configuration *S* du composé. Le rendement théorique maximal pour chaque composé est cependant de seulement 50 %. Pour contourner cet inconvénient, nous avons envisagé la mise en place d'un dédoublement cinétique dynamique. Dans ce cas, une seule configuration est accessible, celle correspondant à l'énantiopréférence de l'enzyme, mais avec un rendement maximal de 100 %.

4.4. Le dédoublement cinétique dynamique

4.4.1. Mise en place du procédé

Il est basé sur le principe énoncé ci-dessus, c'est-à-dire la différence de vitesse de réaction des complexes enzyme-substrat avec chacun des deux énantiomères. Cependant, avec ce procédé, l'énantiomère non réactif est impliqué dans un équilibre de racémisation avec son précurseur. Si cet équilibre est suffisamment rapide par rapport à la réaction énantiosélective enzymatique, le substrat reste sous forme racémique jusqu'à ce que la conversion soit totale.

La famille des cyanhydrines est connue pour ce genre d'applications. Nous avons donc cherché une voie de synthèse du composé **84** (ou du diéthyl acétal **91**) faisant intervenir une cyanhydrine sur laquelle nous pourrions effectuer un dédoublement. En nous basant sur nos synthèses précédentes (voir Figure 119), le chemin réactionnel envisagé est le suivant :

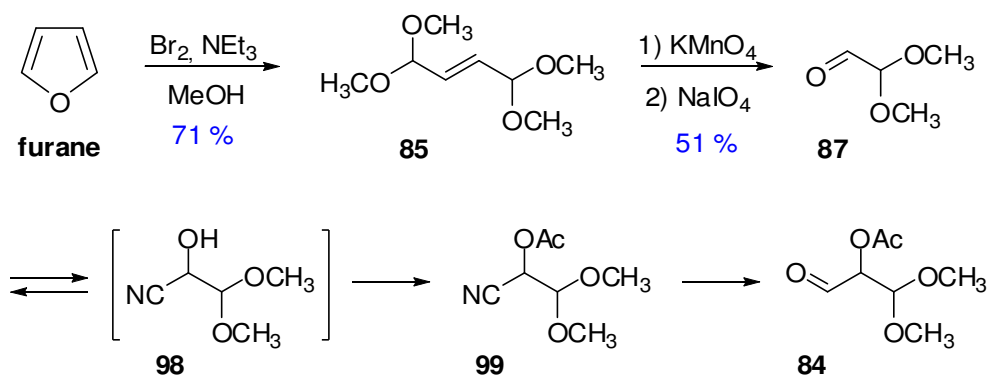


Figure 132 : Synthèse du composé **84** en passant par une cyanhydrine

La formation de l'intermédiaire **87** avait été mise au point précédemment avec un rendement de 51 % pour les deux étapes d'oxydation de la double liaison du composé **85** suivie de la coupure oxydante. Une optimisation était cependant souhaitable vu ce rendement moyen et pénalisant en début de synthèse. En effet, plusieurs inconvénients liés à cette partie ont été relevés, dont la difficulté d'extraction du diol intermédiaire de la phase aqueuse et la formation de sous-produits. Une ozonolyse en remplacement de ces deux étapes n'est quant à elle pas envisageable car elle nécessiterait une purification du produit **87**, ce qui n'est pas possible en raison de sa grande volatilité.

Le premier problème d'extraction du diol a été facilement résolu par une extraction en continu du milieu réactionnel. L'éther, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle ont été testés comme solvant d'extraction. L'acétate d'éthyle a donné les meilleurs résultats et permet une extraction totale du diol en 12 h.

Les impuretés observées en CCM à l'issue de la réaction avec le permanganate de potassium ont été isolées et identifiées. Il y a formation d'un époxyde induisant une élimination de groupement méthoxy (Figure 133). Nous avons tout d'abord pensé pouvoir

régler ce problème en contrôlant le pH de la réaction. C'est pourquoi une réaction a été lancée en milieu tamponné à pH 7 (tampon phosphate 0,5 M). Aucune amélioration n'a été notée, et la formation des impuretés a même augmenté.

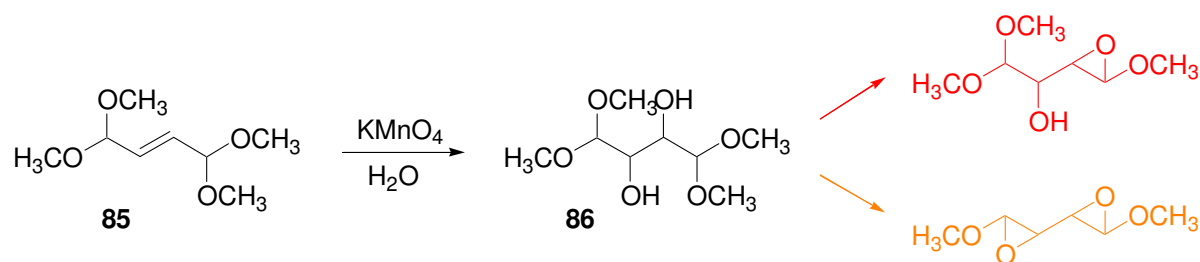


Figure 133 : Réactions parasites lors de la synthèse du composé 86

Nous avons alors effectué un contrôle de la température de réaction. Lors de nos premiers essais, la solution de permanganate était ajoutée assez rapidement au milieu, puis la réaction était chauffée au reflux. Nous avons changé cette procédure pour effectuer la réaction à froid, posant l'hypothèse que la formation des époxydes pouvait être favorisée par le chauffage. La solution de permanganate a été alors ajoutée au milieu par un goutte à goutte lent, à l'aide d'une ampoule de coulée, et en contrôlant que la température du milieu ne dépasse pas les 5°C. Le rendement a été amélioré de 51 % à 67 %.

Ne pouvant limiter complètement les réactions parasites, nous avons alors envisagé l'utilisation de trichlorure de ruthénium comme catalyseur, générant RuO_4 en présence de NaIO_4 . Les meilleurs résultats ont été obtenus dans l'acétonitrile. Selon la quantité de NaIO_4 introduit dans le milieu, on peut contrôler soit la formation du diol ou soit directement celle de l'aldéhyde **87** (Figure 134). Ce dernier étant très volatil, dans certains cas nous avons formé le composé **87** pour l'utiliser directement dans la réaction suivante, ou bien nous avons isolé le diol pour le conserver en solution stock. Les rendements ont été largement optimisés par rapport à la réaction en présence de KMnO_4 et la mise en œuvre est plus rapide et bien plus aisée. En effet, la formation du précipité brun de MnO_2 lors de la réaction précédente compliquait les manipulations. De plus, l'oxydation avec ces nouvelles conditions est plus propre et permet de s'affranchir d'une purification.

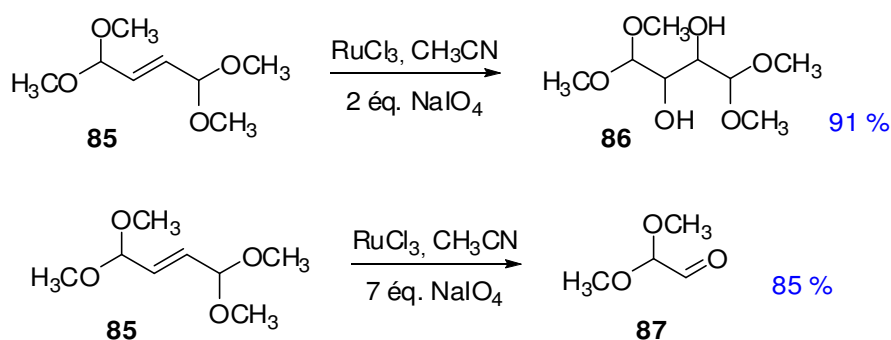


Figure 134 : Utilisation du RuCl_3 pour oxyder l'alcène 85

Pour valider l'accès au composé **84** via une cyanhydrine, la suite de la synthèse a tout d'abord été effectuée en voie racémique sans impliquer d'enzymes.

Au composé **87** fraîchement préparé est ajouté de l'acétone cyanhydrine et de la triéthylamine. L'équilibre qui s'installe entre les composés **87** et **98** est déplacé par addition d'anhydride acétique dans le milieu, responsable de l'estérification de l'intermédiaire **98**. Une légère réaction parasite d'estérification de l'acétone cyanhydrine est observée, donnant lieu à un sous-produit isolable par purification sur gel de silice. Enfin, la réduction du nitrile **99** en aldéhyde **84** se fait en milieu aqueux par de l'hypophosphite de sodium en présence de Nickel de Raney et d'acide acétique¹⁸⁷. L'hypophosphite de sodium $\text{H}_2\text{PO}_2\text{Na}$ sert de donneur de proton selon la demi-équation d'oxydoréduction : $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{PO}_2^- \longrightarrow \text{PO}_3^{3-} + 4 \text{H}^+ + \text{e}^-$.

Après optimisation des conditions opératoires (température, rapport eau/AcOH), cette réaction permet d'obtenir l'aldéhyde **84** désiré, en milieu faiblement basique et avec un rendement de 67 %.

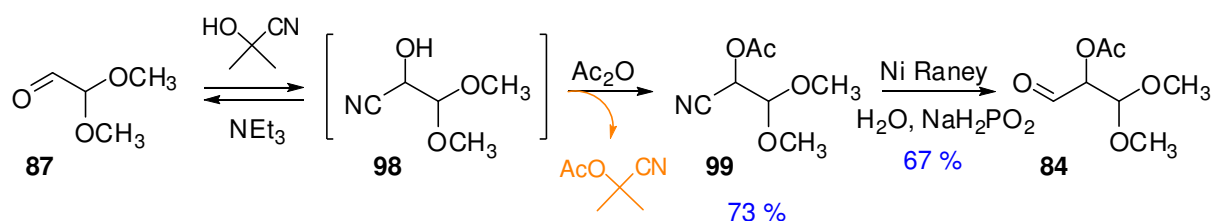


Figure 135 : Synthèse chimique du composé **84** par les cyanhydrines

Nous avons choisi de faire le dédoublement dynamique sur l'alcool **98** par la lipase CAL-B. C'est l'enzyme la plus utilisée dans la littérature pour cette technique (voir ci-après).¹⁸⁸ Le procédé dynamique combine deux réactions. La première est un équilibre sous catalyse basique entre un aldéhyde, l'acétone cyanhydrine, et la cyanhydrine résultante ; la deuxième est l'acylation de l'un des énantiomères de la cyanhydrine intermédiaire catalysée par la lipase.

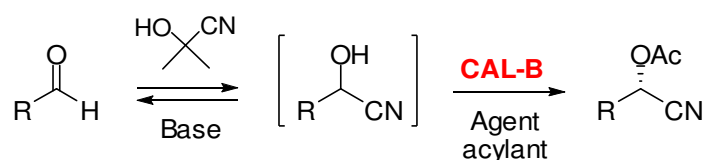


Figure 136 : Principe du dédoublement dynamique à tester

¹⁸⁷ Oppolzer, W.; Grayson, J. I.; Wegmann, H.; Urrea, M. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3695.

¹⁸⁸ Pellissier, H. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1563.

Le dédoublement dynamique impliquant des cyanhydrines a été publié pour la première fois en 1991.¹⁸⁹ Il n'a tout d'abord attiré que modérément l'attention, à cause des mauvais résultats dont il était question avec des substrats aliphatiques. L'utilisation du *n*-pentanal et de l'isobutyraldéhyde comme substrats de départ donnait respectivement 47 % et 83 % de conversion en l'acétate cyanhydrine correspondante, avec respectivement 51 % et 15 % d'excès énantiomérique¹⁹⁰ D'autres essais de dédoublements dynamiques infructueux ont par la suite été publiés¹⁹¹.

En 2004 l'attrait pour cette méthodologie est relancé, après la publication par l'équipe du Dr. Hanefeld d'une forte amélioration dans l'efficacité de la résolution dynamique à partir de cyanhydrines aromatiques. Ils reportent l'obtention énantiospécifique de l'acétate du mandelonitrile (ee = 98 %) avec un très bon rendement de 97 %.¹⁹²

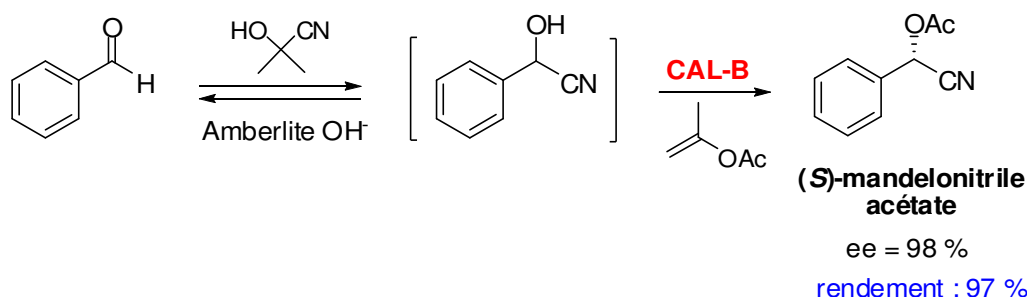


Figure 137 : Obtention de la (S)-mandelonitrile acétate par dédoublement dynamique

Il a été montré que la lipase CAL-B immobilisée sur un polymère méthacrylate (Novozym435[®]) était particulièrement énantiosélective dans le dédoublement cinétique des cyanhydrines¹⁹³. Elle est aussi recyclable par simple filtration. D'un autre côté, la matrice polymère qui la compose présente de l'eau dans ses pores, issue du mode d'immobilisation de l'enzyme. Or l'eau qu'elle relargue dans le milieu est un frein à la réussite de la réaction : elle hydrolyse le produit et l'agent acylant, donnant un acide qui finit par neutraliser la base nécessaire à l'équilibre dynamique. Il peut aussi inactiver l'enzyme. Si plus de base est simplement ajoutée, un autre problème survient car une estérification chimique pourra dans ce cas être favorisée. Nous devons donc chercher d'autres façons de résoudre le problème.

¹⁸⁹ Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9360.

¹⁹⁰ Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643.

¹⁹¹ (a) Zhu, Y.; Yang, L. R.; Zhu, Z. Q.; Yao, S. J.; Cen, P. L. In *Enzyme Engineering XIV*; Laskin, A. I., Li, G. X., Yu, Y. T., Eds. 1998; Vol. 864, p 646 ; (b) Li, Y. X.; Straathof, A. J. J.; Hanefeld, U. *Tetrahedron Asym.* **2002**, *13*, 739.

¹⁹² Veum, L.; Hanefeld, U. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 3707.

¹⁹³ Veum, L.; Kuster, M.; Telalovic, S.; Hanefeld, U.; Maschmeyer, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1516.

Une possibilité serait d'utiliser des sels de cyanure comme base. Ils devraient être capables de neutraliser l'acide formé au cours de la réaction en libérant du HCN, sans influence négative sur le milieu.

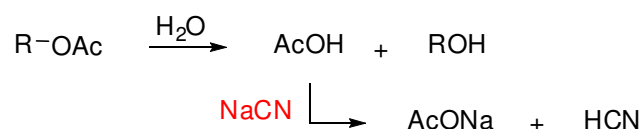


Figure 138 : Intérêt des sels de cyanures dans le dédoublement dynamique

Les sels de cyanures ont déjà été employés lors de dédoublements cinétiques dynamiques d'aldéhydes aromatiques, mais avec des résultats insatisfaisants.¹⁹⁴ Certains sels, tel NaCN, étaient trop basiques et catalysaient essentiellement l'acylation chimique, tandis que d'autres, tel que CuCN, ne donnaient aucune conversion. A l'inverse des cyanhydrines aromatiques, les cyanhydrines aliphatiques ont besoin de base forte pour être racémisées. Il devient donc intéressant de tester ces sels pour nos réactions.

4.4.2. Optimisation du dédoublement

Plusieurs conditions de réaction ont été mises à l'étude. Il a en effet été prouvé que le type de base utilisé, l'agent acylant, la température, et le solvant employés pouvaient jouer un rôle sur l'énantiosélectivité et l'activité de l'enzyme.¹⁹⁵ Il est aussi important que, dans les conditions sélectionnées, la réaction chimique d'estérification ne se produise pas. Pour chaque réaction, un blanc (réaction sans l'enzyme) a donc été effectué en parallèle.

➤ Nous nous sommes tout d'abord penchés sur le type de base à utiliser pour catalyser la formation de la cyanhydrine **98** (Figure 136). L'emploi de triéthylamine ne donne quasiment aucun dédoublement car la réaction chimique d'estérification est trop rapide par rapport à celle enzymatique sûrement. La présence d'eau dans le milieu peut aussi être responsable de ces mauvais résultats (voir explication ci-dessus). Nous avons testé plusieurs moyens pour capter l'eau du milieu (ajout de tamis moléculaire à la réaction, ajout de célite) mais aucune amélioration n'a été remarquée.

En nous appuyant sur la littérature, une résine amberlite OH⁻ a aussi été testée, sans plus de succès qu'avec la triéthylamine. Nous avons alors lancé une série d'essais avec des sels de cyanures. Ces derniers doivent être capables de catalyser la réaction de formation de la cyanhydrine.

¹⁹⁴ Veum, L.; Kanerva, L. T.; Halling, P. J.; Maschmeyer, T.; Hanefeld, U. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1015.

¹⁹⁵ Hanefeld, U. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2405.

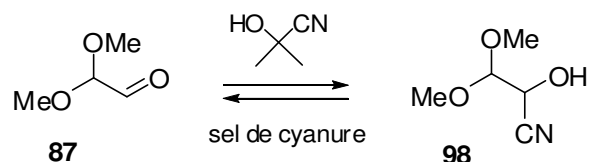


Figure 139 : Introduction du groupement nitrile en catalyse basique

De manière à observer l'alcool intermédiaire, l'agent acylant n'a pas été ajouté au milieu ; par contre l'enzyme a été introduite de manière à se trouver dans des conditions similaires au dédoublement (relargage d'eau dans le milieu). Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. La partie grisée du tableau correspond à des blancs réactionnels sans l'acétone cyanhydrine.

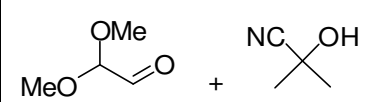
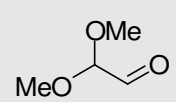
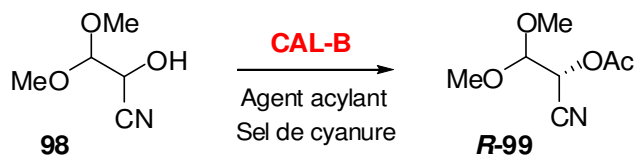
			
Après 1 h	NaCN	Réaction	Réaction
	KCN	Réaction	Réaction
	CuCN	Pas de réaction	Pas de réaction
Après 12 h	CuCN	Réaction	Réaction

Tableau 9 : Test des sels de cyanures comme catalyseurs basiques

Comme il a déjà été mentionné dans la littérature, CuCN n'est pas un bon choix de base pour ce type de réaction : l'équilibre désiré entre l'aldéhyde et la cyanhydrine n'est pas assez rapide pour être exploitable lors d'un dédoublement dynamique. Sa liaison a un caractère quasi covalent, alors que, par exemple, celle de NaCN est complètement ionique. Ainsi l'entité CN^- est plus 'disponible' comme base dans le cas de NaCN que dans le cas de CuCN. Seuls NaCN et KCN seront donc employés par la suite.

L'introduction du groupement nitrile sur l'aldéhyde se fait même en l'absence de l'acétone cyanhydrine et il serait donc envisageable de l'éliminer. En effet les sels de cyanures NaCN et KCN sont des nucléophiles et s'additionnent directement sur le carbonyle du produit de départ. Nous avons cependant fait le choix de garder l'acétone cyanhydrine comme réactif car il est soluble dans le milieu et devrait donc permettre un équilibre plus rapide d'addition de CN^- sur l'aldéhyde **87** que les sels de cyanures en suspension. Ceux-ci seront donc laissés en quantité catalytique dans le milieu.

➤ Nous nous sommes intéressés par la suite au choix de l'agent acylant. Trois réactifs ont été testés : l'acétate d'isopropényle, l'acétate de vinyle et le butyrate de vinyle. Les réactions sont lancées à partir de la cyanhydrine isolée mais en présence de la base NaCN ou KCN pour observer potentiellement une réaction chimique parasite.



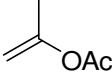
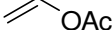
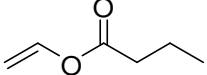
Agents acylant testés		
Acétate d'isopropényle	Acétate de vinyle	Butyrate de vinyle
		

Figure 140 : Présentation des conditions testées pour l'estérification enzymatique

Deux lots de réactions ont été suivis : les réactions avec l'enzyme, et les réactions sans l'enzyme correspondant aux blancs. Les résultats des tests avec NaCN et de ceux avec KCN sont identiques. Après 12 heures d'agitation orbitaire, les observations sont les suivantes :

	Estérification avec l'enzyme	Estérification sans l'enzyme
Acétate d'isopropényle	Pas de réaction	Pas de réaction
Acétate de vinyle	Réaction	Réaction
Butyrate de vinyle	Réaction	Réaction

Tableau 10 : Résultats de l'estérification enzymatique et des blancs correspondants, en présence d'une base

D'après ces résultats CCM, une réaction chimique est détectée (blancs réactionnels). Une analyse par CCM n'étant pas quantifiable il n'est par contre pas possible de conclure quant au déroulement d'une réaction enzymatique. Nous avons donc effectué des réactions tests de l'estérification enzymatique sans le sel de cyanure. Les conditions non basiques devraient nous permettre d'éviter ou de limiter la réaction chimique parasite et de suivre le couplage avec la lipase. Après 12 heures de réaction, nous observons une quantité très faible de produit formé, voir aucune modification du milieu selon l'agent acylant employé.

	Estérification avec l'enzyme	Estérification sans l'enzyme
Acétate d'isopropényle	Pas de réaction	Pas de réaction
Acétate de vinyle	Faible réaction	Pas de réaction
Vinyle butyrate	Faible réaction	Pas de réaction

Tableau 11 : Résultats de l'estérification enzymatique et des blancs correspondants, en l'absence de base

D'après ces observations, la cyanhydrine choisie n'est pas un très bon substrat de l'enzyme. Dans le cas de l'utilisation d'acétate d'isopropényle comme agent acylant, aucune réaction enzymatique n'est détectée.

A ce stade, plusieurs paramètres des conditions opératoires doivent être modifiés pour tenter d'optimiser le couplage enzymatique. Les différents essais effectués sont regroupés dans le Tableau 12. Le nombre d'équivalent a été calculé par rapport à l'aldéhyde de départ.

Paramètres	Conditions « standard »	Conditions étudiées
Quantité d'enzyme ajoutée dans le milieu	21 U/mmol de substrat	21 U/mmol, 380 U/mmol
Quantité d'agent acylant	3 éq.	Stœchiométrique, léger excès (3éq.), large excès (12 éq.), en tant que solvant
Température de réaction	TA	4°C, TA, 37°C
Durée de la réaction	12 h	De 12 h à 6 jours
Solvant	Toluène	Toluène, acétonitrile, diéthyléther
Agent acylant	Acétate de vinyle	Acétate d'isopropényle, acétate de vinyle, butyrate de vinyle
Sel de cyanure	NaCN	NaCN, KCN

Tableau 12 : Modifications des conditions opératoires du couplage enzymatique

Un seul paramètre des conditions de réactions « standard » (utilisées lors de nos premiers essais¹⁹⁶) sera modifié à la fois.

De manière à optimiser le couplage enzymatique et à minimiser la réaction chimique parasite, deux types d'essais ont été suivis en parallèle pour chaque paramètre modifié. Il

¹⁹⁶ Paizs, C.; Tahtinen, P.; Tosa, M.; Majdik, C.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10533.

s'agit d'un côté de l'estérification enzymatique à partir de la cyanhydrine isolée et en l'absence de base, et de l'autre de l'estérification chimique en présence des sels de cyanure mais en l'absence de l'enzyme.

A partir des résultats obtenus les conclusions suivantes ont pu être tirées :

- La cyanhydrine étant un mauvais substrat de l'enzyme, cette dernière doit être ajoutée en quantité importante dans le milieu pour favoriser au maximum le déroulement d'un couplage. L'enzyme étant supportée, elle peut être récupérée en fin de réaction et réutilisée sans perte notable d'activité.

- Pour les mêmes raisons, l'agent acylant est utilisé en large excès. Nous n'avons cependant pas retenu l'option de l'utiliser comme solvant car le brut réactionnel obtenu est alors beaucoup plus sale que dans les autres cas.

- Pour le choix de la température, la température ambiante semble la meilleure option. En effet, à 4°C l'activité de l'enzyme, déjà faible, est encore réduite ; le taux de conversion est alors très faible malgré des temps de réaction prolongés. A 37°C les taux de conversion sont meilleurs mais l'excès énantiomérique de l'acétate chute. La réaction chimique est en effet elle aussi accélérée, et une racémisation du produit peut aussi avoir lieu.

- La réaction enzymatique étant lente, elle est laissée sous agitation pendant 6 jours. Aucune évolution notable n'est par la suite détectée.

- Les réactions lancées dans l'acétonitrile donnent de moins bons excès énantiomériques que celles dans l'éther ou le toluène. L'éther n'a pas non plus été retenu comme solvant de réaction à cause de sa volatilité, difficilement compatible avec des réactions de 6 jours.

- Parmi les agents acylants, l'isopropényle acétate n'a jamais donné de couplage avec la cyanhydrine étudiée. Nous avons donc voulu vérifier que ce composé était bien toléré par l'enzyme, bien que son utilisation fût déjà mentionnée dans plusieurs publications. Pour cela nous avons utilisé un alcool que nous avons déjà estérifié efficacement en présence de Novozyme 435 et de vinyle acétate. Il s'agit de l'alcool **89**.

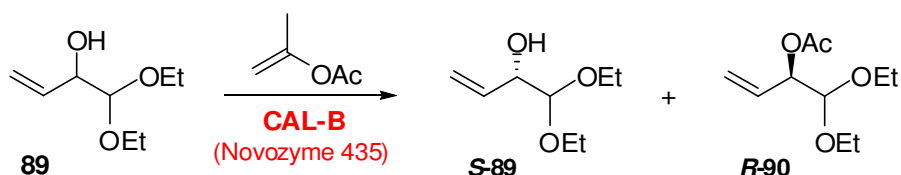


Figure 141 : Test de tolérance de l'isopropényle acétate par Novozyme 435

Le suivi du couplage enzymatique de cet alcool avec l'isopropényle acétate a montré une réaction au bout de quelques heures d'agitation. Cet agent acylant est donc toléré par l'enzyme.

Deux hypothèses peuvent alors être faites pour expliquer qu'aucune réaction enzymatique ne soit détectée par CCM lors du dédoublement de la cyanhydrine **98** :

- ✓ L'utilisation de l'isopropényle acétate comme agent acylant entraîne la formation d'acétone dans le milieu, ce qui peut déplacer l'équilibre vers la gauche entre l'aldéhyde de départ et la cyanhydrine **98** :

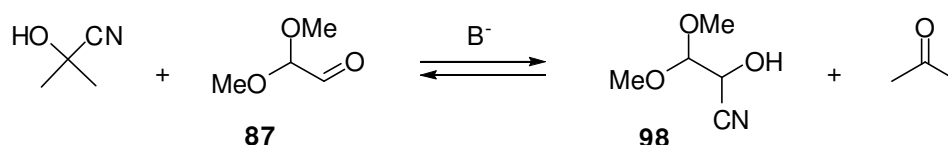


Figure 142 : Rappel de l'équilibre établi entre l'aldéhyde 87 et la cyanhydrine 98

- ✓ La cinétique de réaction de l'enzyme avec l'isopropényle est plus lente qu'avec les autres agents acylant. La cyanhydrine à dédoubleler étant également un mauvais substrat, la réaction enzymatique est beaucoup trop lente pour être visible par CCM sur petite quantité.

Pour ce qui est des essais avec les deux autres agents acylant, aucune différence de réactivité n'a été décelée entre l'acétate de vinyle et le butyrate de vinyle. Nous avons sélectionné comme agent acylant l'acétate de vinyle pour son faible coût.

- Parmi les deux sels de cyanure employés (NaCN et KCN), les réactions avec le cyanure de sodium ont abouti à de meilleurs *ee*. Le rayon atomique du potassium, plus grand que celui du sodium, fait de KCN une meilleure base et favorise la réaction chimique parasite. Ainsi, une disparition totale du produit de départ est observée en seulement 24 h lors de la catalyse par KCN, alors que le même résultat est obtenu en 6 jours par catalyse au NaCN. Les *ee* nous confirment que c'est la réaction d'estérification chimique qui est accélérée avec KCN.

L'ensemble de ces observations nous ont permis d'améliorer sensiblement les conditions du dédoublement dynamique. Néanmoins nous n'avons jamais réussi à éliminer totalement la réaction chimique parasite, d'où des *ee* trop faibles. Le meilleur excès énantiomérique mesuré pour le produit **99** est de 27 %, avec un rendement de 78 %. Il est obtenu lors d'une réaction « améliorée » dont les conditions sont décrites ci-dessous. Par rapport aux conditions « standard » initialement testées, l'*ee* du produit final a été largement amélioré (passage de 6 % à 27 %). Ce ne sera malheureusement pas suffisant pour exploiter ce dédoublement dans notre stratégie de synthèse de composés optiquement purs.

Conditions « améliorées »

(Nombre d'équivalent calculé par rapport à l'aldéhyde de départ)

12 éq. d'acétate de vinyle

1 éq. de NaCN

2 éq. d'acétone cyanhydrine

380 U de Novozyme 435

Toluène, TA, 6 jours

4.4.3. Analyse des résultats

- Suivi des réactions

Le suivi des essais de dédoublement peut être effectué par CCM. Cependant il est difficile de connaître les proportions de chaque produit et donc de conclure quant à l'efficacité de telle ou telle condition. De plus, l'aldéhyde **87** de départ est trop volatile pour être visible par CCM ; l'ester final **99** a quant à lui un R_f proche de celui de l'acétone cyanhydrine, et peut donc être caché par celui-ci pour de petites quantités de produit formé.

Nous avons donc dû développer une méthode d'analyse par CPV. Cette technique chromatographique a été sélectionnée pour sa rapidité et sa précision, et semblait la plus appropriée face à la volatilité des molécules mises en jeu.

Une analyse isochratique à 100 °C nous permet de détecter la présence ou non du produit **99** rapidement. Nous n'avons malheureusement jamais pu observer le pic de l'aldéhyde **87** qui sort en même temps que le solvant. L'équilibre qui devrait s'installer entre l'aldéhyde de départ et la cyanhydrine intermédiaire n'a donc jamais pu être prouvé.

- Mesure des *ee*

La colonne chirale *Chiraldex γ -cyclodextrine trifluoroacétyle* disponible au laboratoire n'a pas permis de mesurer les excès énantiomériques de nos composés par CPV (pics du produit racémique non dédoublés). Nous avons donc effectué les analyses de nos produits en spectroscopie de RMN. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la méthode dite de « déblindeurs chiraux ».

Nous avons procédé à la mise en place des conditions d'analyses sur le composé **99** racémique. Les agents de complexation chiraux utilisés sont des sels d'euprium. Il s'agit de l'euprium tris[3-(trifluorométhylhydroxyméthylène)-(+)-camphorate] noté Eu(tfc)₃, et de l'euprium tris[3-(heptafluoropropylhydroxyméthylène)-(+)-camphorate] noté Eu(hfc)₃.

Le premier déblindeur testé, Eu(tfc)₃ dans CDCl₃, a donné des résultats insatisfaisants. Le second, Eu(hfc)₃, a donné de meilleurs résultats en prenant aussi en compte l'effet du

solvant. Le benzène D-6 est connu pour accentuer la séparation des diastéréoisomères en RMN. On a ainsi pu obtenir des différences suffisantes pour la détermination des *ee*.

Le pic du méthyle de l'ester se dédouble avec un Δ maximum de 0,05 ppm pour des concentrations en sel d'euporium de 40 mg/mL, et un aldéhyde de concentration 13 mg/mL. Les méthyles de l'acétal ont aussi subi un effet mais qui reste inexploitable en raison d'une superposition.

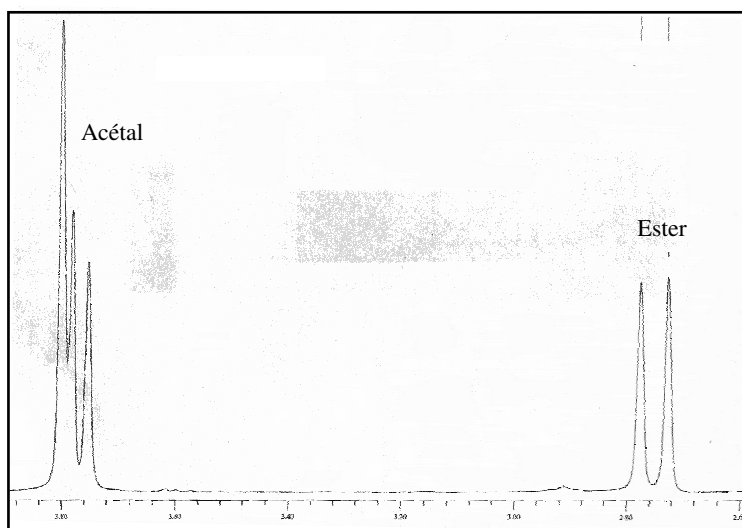


Figure 143 : Spectre de RMN de l'ester 99 racémique complexé par $\text{Eu}(\text{hfc})_3$

La chromatographie phase gazeuse reste cependant une technique d'analyse beaucoup plus rapide et pratique, surtout dans le cas de nombreux échantillons à tester. En parallèle avec les mises au point expérimentales sur la réaction et les mesures effectuées par RMN, nous avons demandé au Dr Alain Archelas de tester le produit racémique sur les colonnes chirales disponibles au sein de son laboratoire.

La colonne *CycloSil-B* (β -cyclodextrines) a été efficace pour un dédoublement du composé. Les temps de rétention de chaque énantiomère sont de 11 et 12 minutes (chromatogramme et détails de l'analyse en partie expérimentale).

Malheureusement, vu les résultats médiocres pour ce dédoublement dynamique, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

II. Couplages enzymatiques avec les aldéhydes modèles

1. Choix du procédé pour les DHAP aldolases

Pour la synthèse des nitrocyclitols par voie enzymatique, nous souhaitons reprendre la méthodologie « *one pot* » mise au point au laboratoire avec la FBA. Lors de ce procédé, déjà exposé dans la partie bibliographique de ce manuscrit, deux liaisons carbone-carbone sont formées lors de réactions domino : l'une enzymatiquement par les aldolases, l'autre chimiquement par une réaction spontanée de Henry intramoléculaire. La stéréosélectivité de ces réactions peut dépendre des substrats aldéhydiques employés et devra donc être étudiée. La Figure 144 rappelle la méthodologie de formation des nitrocyclitols.

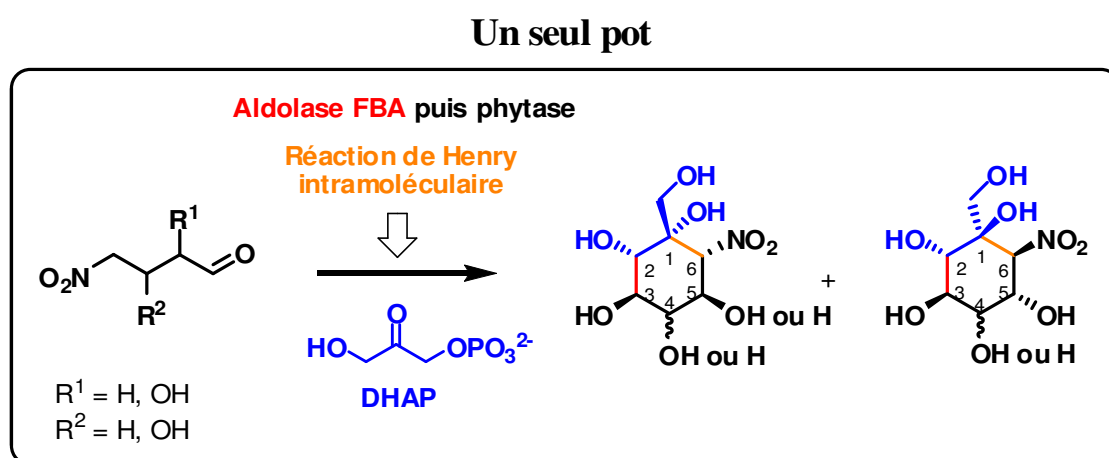


Figure 144 : Formation en un pot des nitrocyclitols

Nous souhaitons coupler ce procédé enzymatique à celui de la formation du DHAP par la DHA kinase. Deux modes opératoires sont envisageables. Ils ont été testés lors de mon séjour à Madrid avec l'aide du Dr Israël Sanchez :

- Une synthèse en un seul pot et une unique étape (« *one pot – one step* »). Dans ce cas, les enzymes nécessaires à la formation du DHAP (la DHAK et l'AK), ainsi que l'aldolase responsable de la formation du nitrocyclitol, sont présentes dès le début de la réaction dans le milieu. Ainsi le DHAP ne s'accumule pas mais est directement consommé par l'aldolase, aucune dégradation n'est possible. Cette stratégie efficace a été mise au point initialement sur le propanal par le groupe du Dr Junceda.¹⁴³

- Une synthèse en un seul pot mais deux étapes (« *one pot – two steps* »). L'une correspond à l'accumulation du DHAP jusqu'à la quasi-totalité de conversion de la DHA, et l'autre est la formation du cyclitol par l'aldolase. Expérimentalement, seules les enzymes DHAK et AK sont présentes en début de réaction, ainsi que la DHA. Puis, après conversion

¹⁴³ Sanchez-Moreno, I.; Garcia-Garcia, J. F.; Bastida, A.; Garcia-Junceda, E. *Chem. Commun.* **2004**, 1634.

totale de cette dernière, l'aldolase est ajoutée dans le milieu, ainsi que l'aldéhyde substrat de l'enzyme. Cette stratégie peut s'avérer nécessaire dans le cas d'inhibition de la DHAK ou/et de l'AK, deux enzymes relativement sensibles au milieu réactionnel.

1.1. Stratégie « one pot – one step »

La première synthèse expérimentée fut celle de l'aldolisation avec le substrat nitré le plus simple : le 4-nitrobutanal **79**. Cet aldéhyde, insoluble dans l'eau, oblige à utiliser un co-solvant organique pouvant entraîner des inhibitions d'enzymes.

On retrouve dans la littérature plusieurs références ayant rapporté la tolérance de certaines DHAP aldolases vis-à-vis de co-solvants organiques¹⁹⁷. Parmi eux, le DMSO semble un bon choix car accepté par plusieurs aldolases jusqu'à 10 %. Trois réactions tests ont été effectuées pour vérifier la tolérance des aldolases vis-à-vis de ce solvant et le pourcentage le plus favorable de DMSO à introduire. Le couplage enzymatique est réalisé en présence de 5 % de DMSO, de 10 %, et en l'absence de celui-ci. Les essais sont réalisés sur petites quantités à partir du DHAP commercial et du 4-nitrobutanal. Les vitesses de disparition du DHAP ont été suivies au spectrophotomètre et montrent de meilleurs résultats dans le cas de 10 % de DMSO. Ces expériences nous indiquent aussi que la GPDH utilisée pour le dosage du DHAP n'est pas inhibée par le DMSO à la concentration du dosage.

Le schéma de synthèse des nitrocyclitols envisagé à partir du 4-nitrobutanal et de la DHA est donc le suivant :

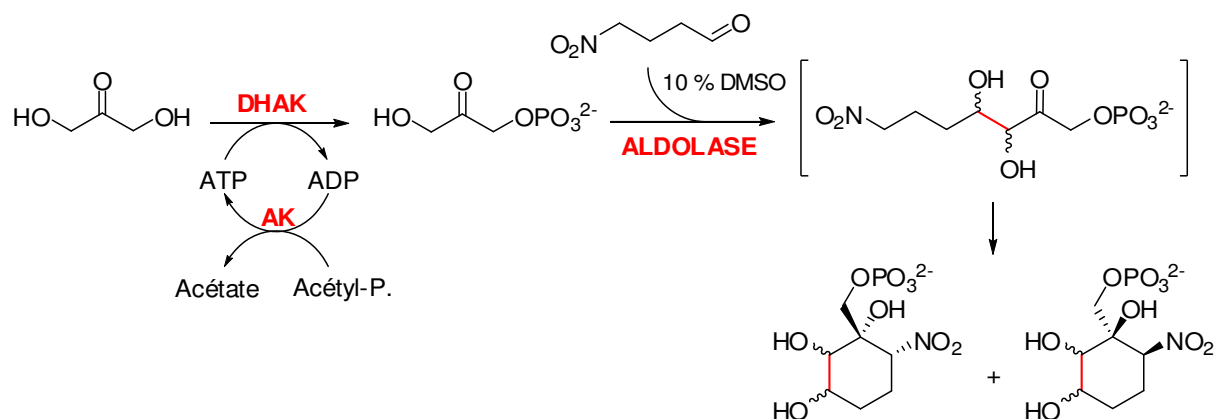


Figure 145 : Couplage enzymatique du 4-nitrobutanal par les DHAP aldolases

Basé sur les résultats antérieurs, nous proposons les deux stéréochimies accessibles via la réaction de Henry.

¹⁹⁷ (a) Calveras, J.; Bujons, J.; Parella, T.; Crehuet, R.; Espelt, L.; Joglar, J.; Clapes, P. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2648. (b) Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapes, P. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4887.

La stratégie « *1 pot - 1 step* » est tout d'abord expérimentée. La réaction est suivie par spectrophotométrie en s'intéressant à la disparition de la DHA. Le taux de celle-ci restant anormalement stable dans le milieu et au cours du temps, des tests d'inhibition ont été mis en place pour les enzymes DHAK et AK. Il s'agit de suivre la formation du DHAP au cours du temps en présence d'un aldéhyde et/ou du DMSO. Les résultats trouvés nous indiquent une inhibition des kinases par le co-solvant ainsi que par l'aldéhyde lui-même (Figure 146).

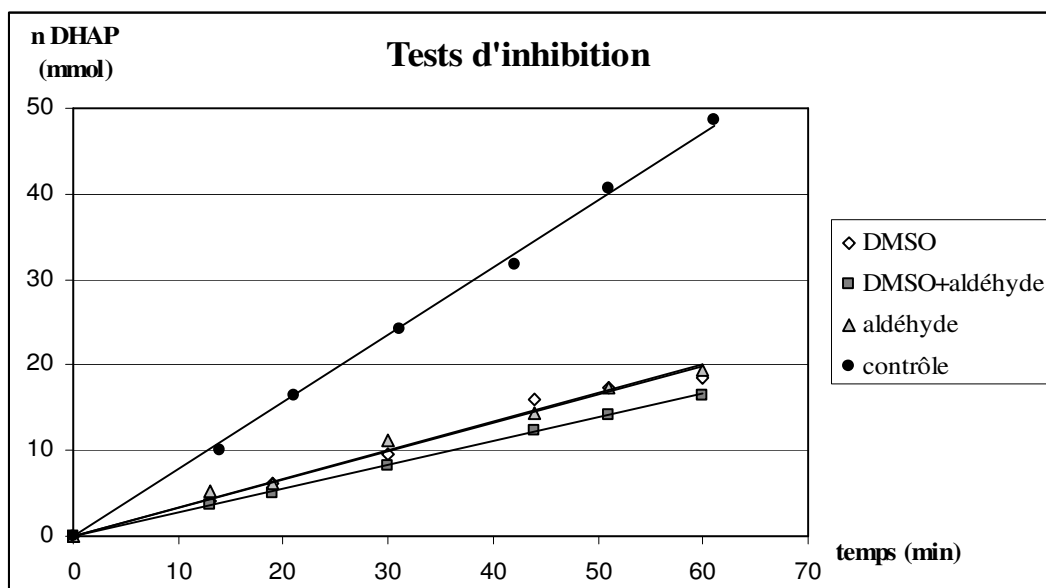


Figure 146 : Tests d'inhibition des kinases

Sur le graphique ci-dessus est représenté en ronds noirs la formation de DHAP au cours du temps dans des conditions 'normales' de réaction (sans DMSO, ni aldéhyde dans le milieu) ; ce sera notre référence, appelée aussi réaction de contrôle. Les trois tests suivants représentent la formation du DHAP, soit en présence de 10 % de DMSO, soit en présence de l'aldéhyde 30 mM, et enfin en présence des deux. Très clairement, la présence de l'un ou l'autre de ces constituants perturbe la formation du DHAP, mais leur effet ne semble pas additif.

Cette inhibition ayant été mise en évidence, il était par la suite important de trouver laquelle des deux kinases est inhibée. En effet, dans la littérature, d'autres types de régénération de l'ATP ont prouvé leur efficacité. L'utilisation de l'AK n'est donc pas indispensable.

✓ Les tests d'inhibition de la DHAK ont été menés avec le même procédé que précédemment, mais sans le système de régénération de l'ATP. Ce dernier a été ajouté dans le milieu en quantité stœchiométrique par rapport à la DHA. Pour ne pas dépenser trop de ce composé onéreux, les tests d'inhibition ont été lancés dans des plaques de 96 puits sur un volume total de 300 μ L, et suivi au spectrophotomètre à l'aide d'un lecteur de plaque. Les

droites d'inhibitions obtenues se trouvent relativement similaires au graphique précédent. La DHAK est donc inhibée par le DMSO et le nitrobutanal.

✓ Les tests d'inhibitions de l'AK ont été menés à l'aide de deux enzymes auxiliaires : la pyruvate kinase (PK) et la lactate déshydrogénase (LDH). Lorsque l'acétate kinase est en présence d'acétyl phosphate et d'ADP, elle catalyse la phosphorylation de ce dernier en ATP. Si dans le même milieu se trouve du pyruvate et la PK, l'ATP formé sera consommé pour redonner de l'ADP. Ainsi, le suivi de la disparition du pyruvate au cours du temps nous renseigne sur l'activité de l'AK. C'est la LDH qui est chargée de catalyser la réaction entre le pyruvate et le NADH, réaction que l'on pourra suivre au spectrophotomètre. Un schéma récapitulatif du suivi d'activité de l'AK est présenté en Figure 147.

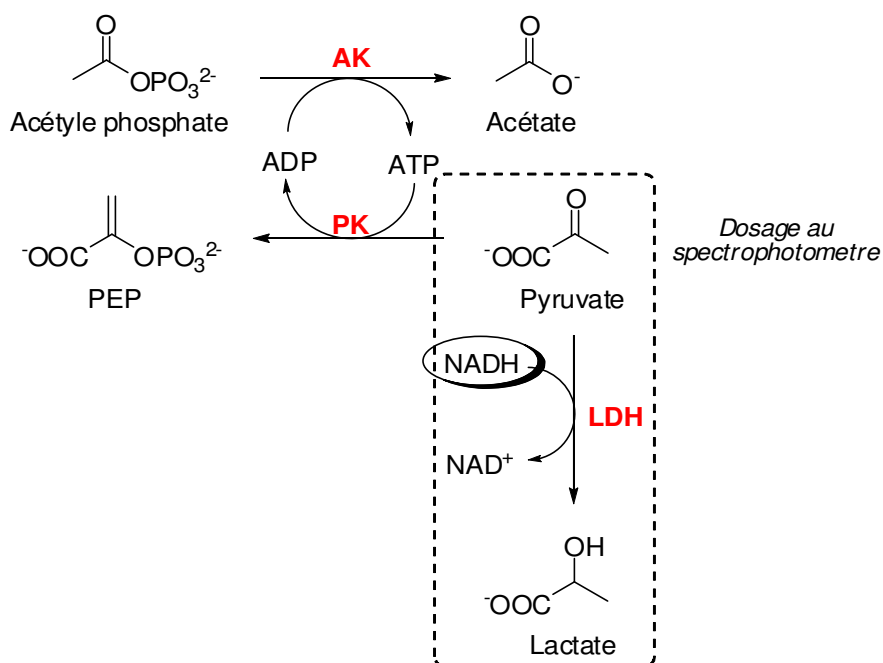


Figure 147 : Schéma général de suivi de l'activité de l'AK

Quatre réactions sont de nouveaux lancées comme tests d'inhibition : en présence de DMSO, en présence du nitrobutanal, en présence des deux et en condition normale (contrôle). Après analyse des données, on remarque que l'activité de l'acétate kinase est ralentie en présence de DMSO, mais qu'elle n'est pas inhibée par l'aldéhyde.

L'ensemble de ces résultats montre que c'est la DHAK qui est inhibée par l'aldéhyde nitré et le DMSO. La stratégie « *1 pot-1 step* » n'est donc pas envisageable dans ce cas.

1.2. Stratégie « *1 pot - 2 steps* »

Face aux inhibitions repérées précédemment, la stratégie « *1 pot - 2 steps* » devient indispensable. Après accumulation jusqu'à 100 % du DHAP, l'aldolase et son substrat

aldéhydique sont introduits dans le milieu. La première réaction expérimentée est celle avec le nitrobutanal et 10 % de DMSO comme co-solvant. Un suivi cinétique montre une réaction lente (environ 12 h) mais totale pour les trois aldolases testées. La disparition du DHAP est relativement rapide les quatre premières heures de réaction (Figure 148), puis est largement ralenti par la faible concentration en substrat résultant dans le milieu.

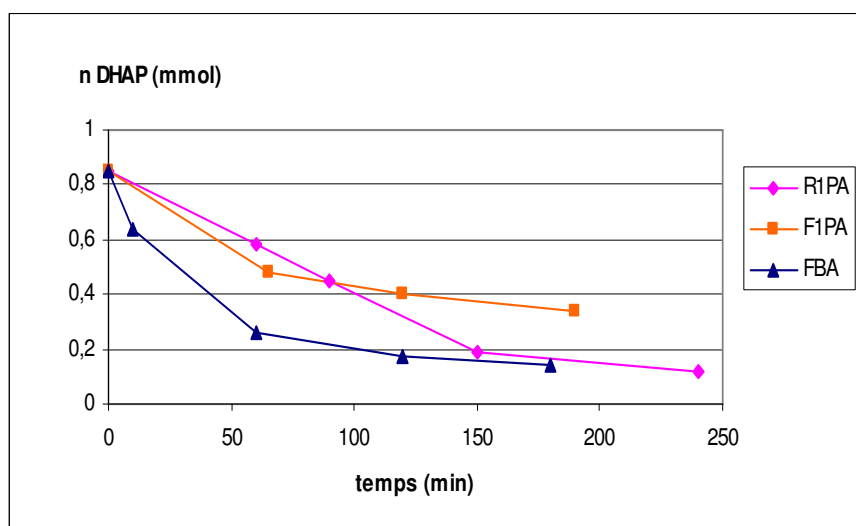


Figure 148 : Suivi cinétique du couplage enzymatique nitrobutanal/DHAP

La cyclisation par réaction de Henry intramolécule au pH de la réaction enzymatique de l'aldol formé est observée au cours des dosages par spectrophotométrie. En effet, le dosage de l'aldol restant dans le milieu au cours du temps nous indique que celui-ci ne s'accumule pas mais est au contraire consommé. Cela corrèle avec l'étude réalisée sur la FBA par Z. Assaf au cours de son stage de master II au laboratoire. La réaction de Henry a lieu rapidement après la formation de l'aldol et par précipitation aux sels de baryum, ce sont les cyclitols phosphorylés qui ont été isolés. Ces résultats ont été publiés dans *ChemCatChem* en 2009¹⁹⁸.

Le principe du dosage de l'aldol est présenté en Figure 149. Il s'agit d'un dosage en deux temps, effectué sur le même prélèvement :

- 1- Dosage du DHAP résiduel du milieu par la GPDH
- 2- Dans la même cuve d'analyse, dosage de l'aldol par ajout de l'aldolase de la réaction. Celle-ci permet la scission de l'aldol en DHAP et nitrobutanal. Le DHAP est alors immédiatement dosé par la GPDH déjà présente dans le milieu.

¹⁹⁸ El Bliidi, L.; Assaf, Z.; Camps Bres, F.; Veschambre, H.; Thery, V.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Chemcatchem* **2009**, *1*, 463.

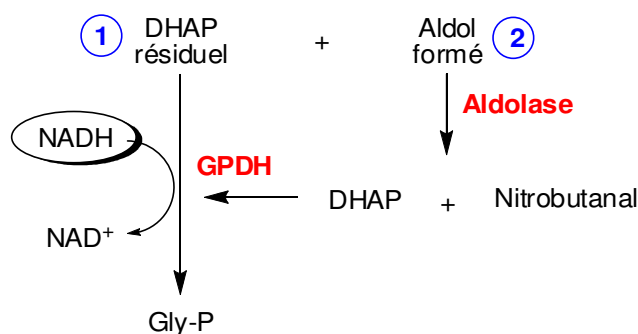


Figure 149 : Principe du dosage de l'aldol formé

Un autre aldéhyde, soluble dans l'eau, a été testé comme substrat des aldolases. Il s'agit du dihydroxy-nitrobutanal **96** racémique (Figure 150). Il a été mis en jeu dans les deux procédés enzymatiques envisagés. Avec ce substrat, nous pouvons de nouveau confirmer le choix de la stratégie « *1 pot – 2 steps* » car une inhibition de la DHAK par l'aldéhyde a aussi été observée.

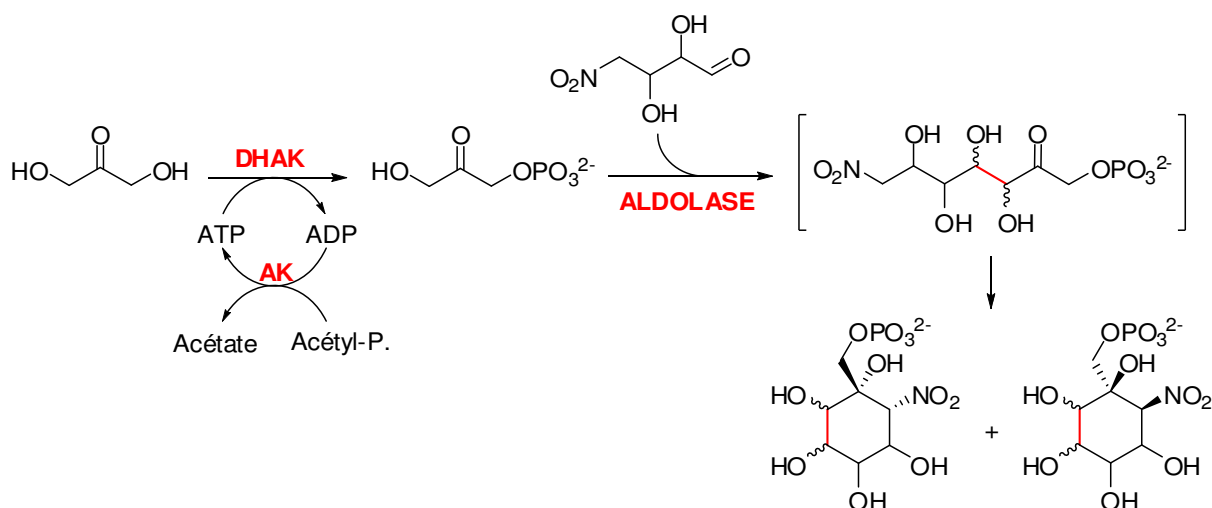


Figure 150 : Couplage enzymatique du dihydroxy-nitrobutanal par les DHAP aldolases

Il est intéressant de noter que cet aldéhyde racémique dihydroxylé est un bien meilleur substrat de la F1PA et de la R1PA que le nitrobutanal. Les réactions d'aldolisation avec le même nombre d'unités d'enzyme ont été plus rapides (moins de 2 heures) et totales. Ce résultat est sans doute dû à la présence d'un hydroxyle en α du carbonyle, substituant retrouvé dans le substrat naturel, le L-lactaldéhyde. L'absence de co-solvant organique peut aussi contribuer à une meilleure réactivité globale.

Avec la FBA, il n'y a pas vraiment une différence de comportement notable envers les deux aldéhydes.

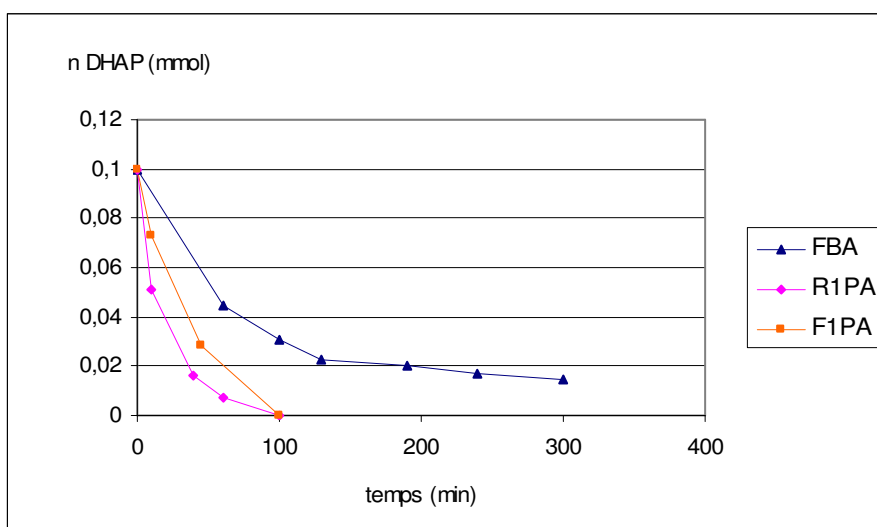


Figure 151 : Suivi cinétique du couplage enzymatique dihydroxy-nitrobutanal/DHAP

A la suite des condensations aldoliques, on réalise la dephosphorylation des composés formés par la phytase d'*Aspergillus ficuum* (EC 3.1.3.8). Avant ajout de l'enzyme, le milieu est ajusté à pH 3,9, pH optimum d'activité de la phytase. A ce pH, les enzymes déjà présentes dans le milieu précipitent et sont centrifugées pour ne pas interagir sur la réaction. Il est à noter qu'au cours de la dernière année de cette thèse, la phytase n'a plus été commercialisée. Nous l'avons alors remplacée par la phosphatase acide de germe de blé (EC 3.1.3.2). Son pH optimum d'activité est 4,8 et des quantités légèrement supérieures en enzyme ont été nécessaires pour déphosphoryler complètement les nitrocyclitols.

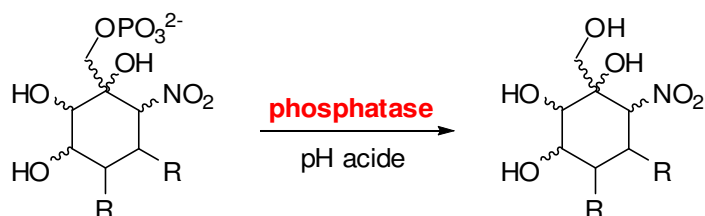


Figure 152 : Déphosphorylation des nitrocyclitols

Cette étape de dephosphorylation, effectuée sans isoler le cyclitol phosphaté, correspond à une troisième étape enzymatique toujours dans le même pot.

Cette procédure de formation des nitrocyclitols mise au point avec les DHAP aldolases est ainsi remarquable car elle met en jeu :

- trois réactions enzymatiques et une réaction chimique consécutives, sans jamais isoler les produits intermédiaires ;

- quatre enzymes de familles distinctes (deux kinases, une aldolase et une phosphatase), aux contraintes opératoires différentes, mais malgré tout utilisées en un seul pot.

1.3. Essai avec deux enzymes fusionnées

L'équipe d'E. Garcia-Junceda a développé une protéine chimère¹⁹⁹ que l'on se propose aussi d'étudier à l'occasion de ce projet et dans le cadre de notre collaboration. Cette enzyme présente à la fois l'activité d'une kinase, la DHAK, et celle d'une aldolase, la FBA, dans la même chaîne peptidique. La DHAK est un dimère et la FBA un monomère, d'où la présence de deux entités FBA fusionnées à la DHAK sur la représentation schématisée de la Figure 153. Les enzymes sont accrochées par l'intermédiaire d'une chaîne de cinq aminoacides présentant une structure suffisamment flexible pour permettre le repliement naturel de chaque protéine. Ainsi, l'enzyme chimère peut catalyser la réaction d'aldolisation en un système « *one pot - one step* ». Cependant, dans le cas des nitrobutyraldéhydes, il a été démontré précédemment que la kinase est inhibée, et c'est donc sans surprise que les essais avec cette nouvelle enzyme n'ont pas abouti.

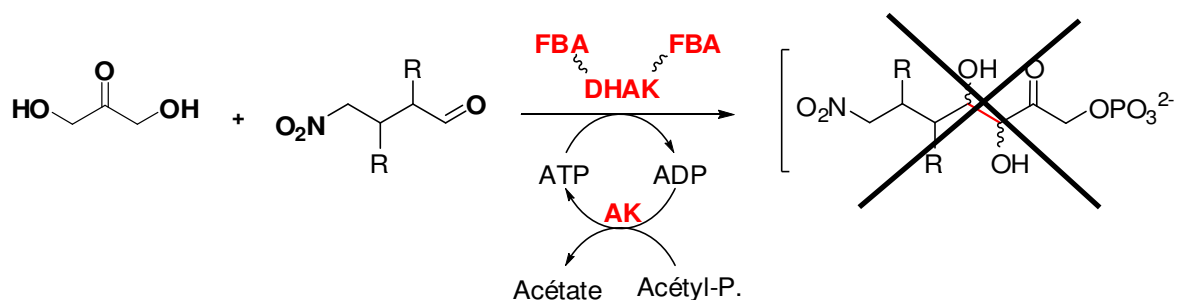


Figure 153 : Essai d'aldolisation avec une enzyme fusionnée FBA-DHAK

D'autres types de substrats pourraient donner de meilleurs résultats et mettre en valeur l'intérêt d'une telle protéine. En effet, l'ensemble des procédures se trouve simplifiée grâce :

- à la production et purification d'une seule enzyme au lieu de deux,
- au passage à un procédé « *1 pot - 1 step* » évitant d'effectuer le suivi cinétique d'accumulation du DHAP et parant à toute dégradation de celui-ci,
- à la moindre diffusion du produit de la kinase qui passe plus rapidement d'un site actif à l'autre. Les cinétiques de formation des produits s'en trouvent donc augmentées.

¹⁹⁹ (a) Garcia-Junceda, E.; Iturrate, L.; Bastida, A. Spanish patent P200701859, 2007

2. Mise en œuvre des FSA

Dans le cas des FSA, native et mutée en A129S, la procédure de couplage est radicalement plus simple. En effet, l'avantage principal de ces enzymes est qu'elles acceptent des donneurs non phosphorylés comme substrats. Les étapes enzymatiques de formation du DHAP et de désphosphorylation ne sont donc pas nécessaires lors de leur utilisation. La procédure d'obtention des nitrocyclitols ne correspond ainsi qu'à l'étape d'aldolisation, suivie de la cyclisation du composé.

Au cours de ces travaux, les deux donneurs choisis sont la DHA et l'HA. Le premier est utilisé avec la FSA mutée et le second avec l'enzyme sauvage compte tenu de leur affinité respective (voir partie bibliographique). La DHA est commercialisée pure, mais l'HA n'est pure qu'à 90 % et doit être purifiée sur gel de silice avant utilisation. La méthodologie a là encore été testée avec le nitrobutanal **79** et le diol **96** racémique comme substrat accepteur. Ces deux substrats ont été très bien acceptés par les deux enzymes et les temps de réaction sont comparables à ceux obtenus avec la FBA (voir Figure 148 et Figure 151).

3. Analyse des produits de couplages

Les tests analytiques précédents adaptés pour travailler à l'échelle quantitative vont nous permettre de mettre au point un bon procédé pour la formation enzymatique des nitrocyclitols. En effet, nous connaissons maintenant la tolérance des aldolases envers différents substrats nitrés, résultat jusqu'à présent montré uniquement avec la FBA. Dans certains cas, les vitesses de réaction de couplage sont favorisées par la présence d'un hydroxyle en α du carbonyle, favorisant ainsi une similarité avec la structure du substrat naturel de l'enzyme. Enfin, il a été noté des réactions plus lentes dans le cas de la FBA ou des deux FSA ; la quantité d'enzyme ajoutée dans le milieu pour ces réactions sera donc adaptée à ces observations.

Des couplages à l'échelle de la centaine de milligrammes sur tous les substrats modèles ont été mis en œuvre. Pour l'ensemble des réactions, le donneur est introduit en léger défaut (0,8 éq.) de manière à ce qu'il soit entièrement consommé sans que les cinétiques de fin de réaction ne soient trop ralenties. Cela permet également une meilleure détermination de la fin de réaction, que l'on repère lorsque plus de DHAP n'est détecté au spectrophotomètre. Le rendement est alors toujours calculé par rapport à la quantité de donneur.

Un tampon phosphate a été utilisé pour maintenir un pH de réaction optimum pour l'enzyme et pour la stabilité du DHAP dans le cas des aldolases dépendantes de ce donneur : pH 6,9 pour la R1PA et la F1PA, pH 8,0 pour les deux FSA.

Le suivi de la réaction se fait au spectrophotomètre pour la disparition des donneurs et par CCM pour l'apparition des produits. En fin de réaction, du méthanol est ajouté au milieu réactionnel pour faire précipiter les enzymes qui sont alors éliminées par centrifugation. L'évaporation des solvants permet d'aboutir au brut réactionnel. Le ou les produits obtenus sont séparés et purifiés par chromatographie éclair à basse pression avant d'être analysés par spectroscopie de RMN. La détermination des stéréochimies est particulièrement importante car elle permet d'étudier la stéréosélectivité de l'aldolase vis-à-vis d'un type de substrat. Egalement, elle aidera à conclure quant à la stéréosélectivité ou non de la réaction de Henry.

Quatre substrats modèles ont été couplés avec les quatre aldolases que nous avons produites au laboratoire, ce qui correspond donc à 16 réactions tests à l'échelle quantitative.

3.1. Couplages avec le 4-nitrobutanal

3.1.1. Catalyse par les DHAP aldolases

A partir du 4-nitrobutanal **79**, des couplages enzymatiques sont lancés avec la F1PA et la R1PA. 9 U d'enzyme sont ajoutées par mmol de substrat. Après 12 h de réaction, le DHAP a été entièrement consommé.

➤ Dans le cas de la R1PA, deux diastéréoisomères, dont un très majoritaire (proportions 95/5), sont observés par CCM. Après désphosphorylation, ils sont isolés et purifiés par chromatographie sur gel de silice (phase normale). Les nitrocyclitols sont ainsi obtenus avec un rendement global de 81 %.

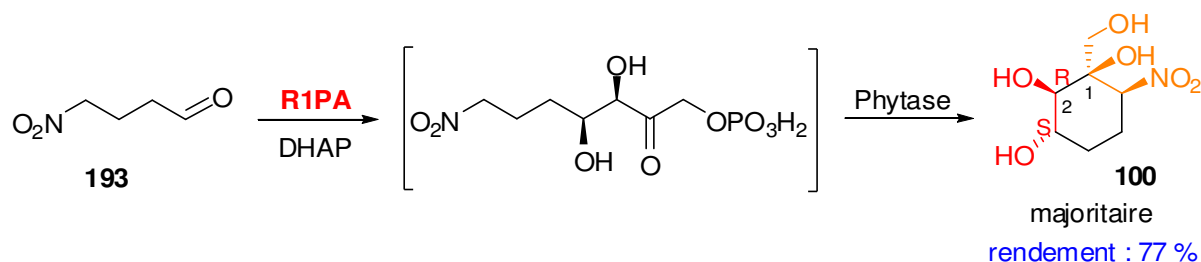


Figure 154 : Produit principal issu du couplage nitrobutanal/DHAP par la R1PA

Nous avons détaillé notre méthode d'analyse structurale pour ce premier composé isolé. Par la suite, la détermination des stéréochimies des nitrocyclitols purifiés ne sera pas expliquée, et il faudra se reporter à la partie expérimentale de ce manuscrit pour y trouver le détail des analyses de chaque diastéréoisomère, ainsi que leur représentation en conformation « chaise ». Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, NOESY sont nos supports de détermination structurale, en se basant sur la stéréosélectivité démontrée des aldolases au niveau du carbone 2 (C3 pour les aldols).

Le tableau suivant présente les déplacements chimiques et les constantes de couplage mesurés sur le spectre du proton du nitrocyclitol **100** :

Proton	H2ax	H3ax	H4éq	H4ax	H5ax	H5éq	H6ax	H7	H7'
δ	3,37	3,73	2,01	1,32	2,43	1,97	4,79	3,82	3,33
m	d	ddd	m	m	m	m	dd	d	d
J (Hz)	9,3 H3ax	9,3 H2ax 4,6 H4éq 11,5 H4ax	/	/	/	/	13,0 H5ax 4,0 H5éq	11,0 H7'	11,5 H7

d : doublet, dd : doublet dédoublé, ddd : doublet dédoublé dédoublé, m : multiplet

Tableau 13 : Analyse du spectre de RMN ^1H du composé 100

D'après ces constantes de couplages, ainsi qu'une expérience NOESY, nous pouvons proposer la stéréochimie et la conformation suivantes :

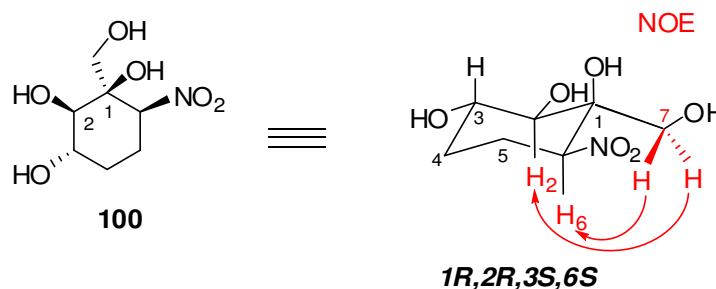


Figure 155 : Effets NOE observés sur le composé 100

L'expérience NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) est ici incontournable dans l'élucidation de la structure de la molécule, notamment au niveau du carbone 1 du nitrocyclitol qui ne porte pas d'hydrogène. Elle met en évidence des interactions entre le spin magnétique de deux hydrogènes proches dans l'espace. Ce type d'interaction est appelé couplage dipolaire, et se différencie du couplage scalaire qui passe par un réseau d'atomes. Il est important de souligner que l'intensité des corrélations, entre deux protons d'un couple, est proportionnelle à la distance qui les sépare.

Pour ce diastéréoisomère, nous obtenons bien la stéréochimie en C2 et C3 *R,S* attendue avec cette aldolase. En présence de DHAP et du 4-nitrobutanal, la R1PA a donc bien catalysé la formation d'une liaison carbone-carbone de manière hautement stéréosélective.

Le diastéréoisomère minoritaire (4 % de rendement) a aussi pu être isolé et caractérisé. Les analyses spectroscopiques nous permettent alors de proposer la structure suivante :

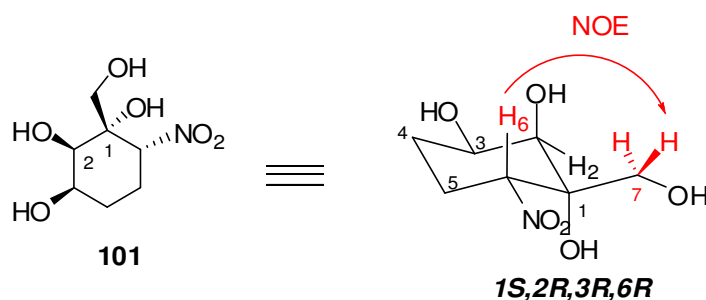


Figure 156 : Effet NOE observé sur le composé 101

On remarque une inversion de la configuration au niveau du carbone 3 du cyclitol par rapport au diastéréoisomère majoritaire. D'après des études mécanistiques sur ce type d'aldolase, il a été montré que la configuration au niveau de ce carbone dépendait de la position de l'aldéhyde accepteur dans le site actif de l'enzyme¹²⁰. Donc, si le nitrobutanal se positionne globalement à l'identique du substrat naturel de l'enzyme, il y aura formation de la liaison C-C avec une configuration 2*R*,3*S*. Mais s'il se positionne différemment dans la cavité de l'enzyme, il y aura formation d'un diastéréoisomère minoritaire 2*R*,3*R*.

Lors de la cyclisation des aldols nitrés par la réaction de Henry intramoléculaire, la stéréochimie des carbones C₁ et C₆ dépend de la nature et de la configuration des groupements portés par le cycle. Ceci implique une étude plus spécifique dans chaque cas.

Lors de précédents travaux, l'équipe du professeur M. Lemaire s'était intéressée à la stéréosélectivité de cette réaction. Il avait été montré que pour les réactions avec la FBA, lorsque l'aldéhyde de départ ne porte pas d'hydroxyle en position 4 et 5, un seul stéréoisomère est obtenu de manière très majoritaire. Il adopte la conformation la plus stable, c'est-à-dire celle portant une majorité de groupements en position équatoriale sur le cycle. Un autre stéréoisomère très minoritaire avait été observé mais n'a pas été caractérisé en raison des faibles quantités obtenues à l'époque.

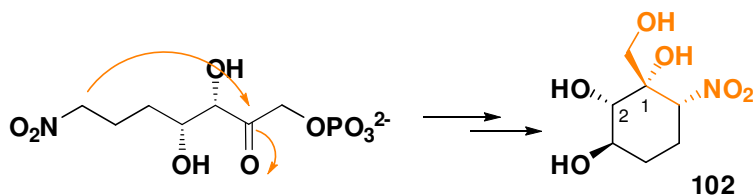


Figure 157 : Diastéréoisomère majoritaire obtenu lors du couplage nitrobutanal/DHAP par la FBA

C'est donc sans surprise que la cyclisation aboutissant aux composés **100** et **101** n'a donné qu'une seule configuration relative en position 1 et 6 du cycle, correspondant au maximum de groupements encombrants en position équatoriale du cycle. Ainsi lors de la formation de la liaison C1-C6 par la réaction de Henry intramoléculaire, les groupements NO₂

et CH₂OH de ces deux molécules se positionnent dans les deux cas en position équatoriale du cycle (voir Figure 155 et Figure 156).

Le bilan de ce premier couplage est donné Tableau 14 :

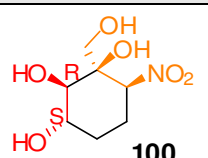
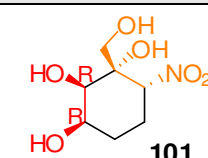
R1PA (DHAP) Attendu : 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	
 100	 101
Rendement : 77 %	Rendement : 4 %
Proportions 95/5	

Tableau 14 : Bilan des produits de la réaction nitrobutanal/DHAP catalysée par la R1PA

Il est aussi intéressant de noter que la R1PA conduit majoritairement à la configuration *R,S*, par rapport à celle de la FBA qui donne *S,R*. Cela correspond donc au niveau de ces deux carbones asymétriques formés à un système d'énantiomères. Et en effet, le composé **100** est bien l'énantiomère du nitrocyclitol obtenu avec la FBA (mêmes spectres de RMN, pouvoirs rotatoires opposés) puisque la cyclisation intramoléculaire a donné le même résultat.

➤ Dans le cas du couplage par la F1PA, des résultats sensiblement différents ont été observés. Deux stéréoisomères ont été obtenus dans un rapport 80/20 avec un rendement global de 83 %, correspondant à deux configurations différentes de la liaison C2-C3 du nitrocyclitol. Cette aldolase n'a donc pas catalysé la formation de la liaison C-C de manière aussi stéréosélective que la FBA ou la R1PA. De plus c'est le nitrocyclitol de configuration 2*R*,3*S* qui est formé majoritairement avec un rendement de 66 % alors qu'en présence de ses substrats naturels, l'enzyme catalyse la création d'une liaison 2*R*,3*R*. Le composé 2*R*,3*R* n'est obtenu qu'avec un rendement de 17 %. Ce couplage donne donc accès aux deux mêmes produits que ceux obtenus par catalyse avec la R1PA, mais en proportion différente.

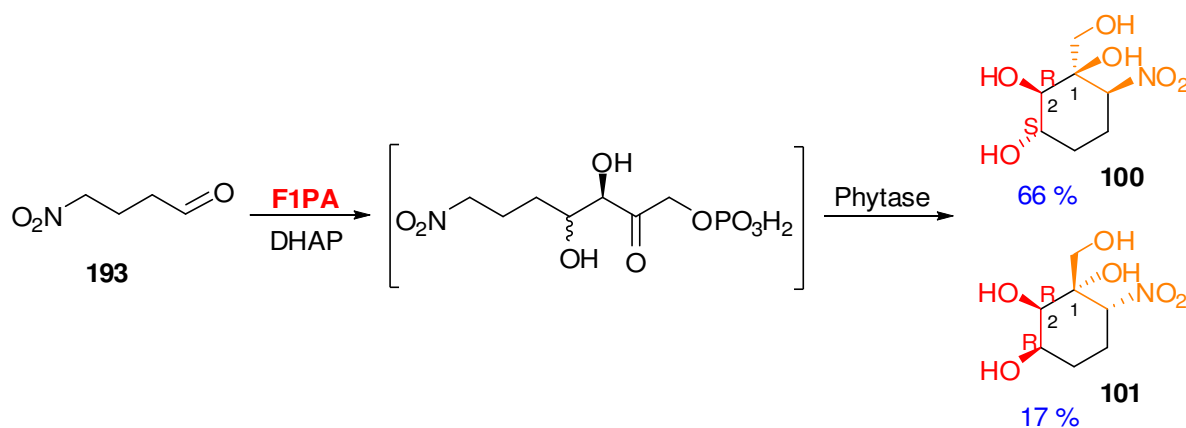


Figure 158 : Produits issus du couplage nitrobutanal/DHAP par la F1PA

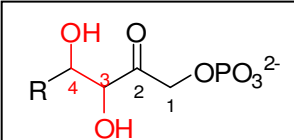
Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature et plusieurs explications ont été avancées.

- La stéréosélectivité au niveau du carbone 4 est générée lors de l'addition du donneur sur l'aldéhyde et dépend donc de la position de ce dernier dans le site actif. Des modélisations moléculaires de complexes enzyme-substrat, effectuées par l'équipe du Dr Clapes, ont montré des gênes stériques significatives pouvant expliquer la perte de stéréosélectivité de l'enzyme.²⁰⁰ Dans le cas d'aldéhydes plus larges que le L-lactaldéhyde, substrat naturel, ceux-ci interfèrent stériquement avec la partie C-terminal de la protéine. Ces interactions auraient lieu avec les résidus Phe131 et Phe206', pouvant influencer l'approche de la face *Si* ou *Re* du carbonyle vers l'endiolate.

De plus, l'étude du mécanisme des DHAP aldolases de type II a mis en évidence l'importance d'une liaison hydrogène entre la fonction alcool du L-lactaldéhyde et le résidu Tyr113' dans le positionnement de l'aldéhyde au sein du site actif. Aussi, dans le cas des accepteurs ne possédant pas de groupement hydroxyle en α du carbonyle, l'absence de cette liaison hydrogène peut changer la stéréosélectivité de l'enzyme.

- Clapes *et al.* ont aussi suggéré que la stéréochimie obtenue lors de l'addition aldolique était contrôlée thermodynamiquement. Lors de l'étude de substrats aldéhydiques *N*-Cbz-Amino ou aromatiques, mis en réaction avec la F1PA, l'énergie conformationnelle minimum de chaque diastéréoisomère obtenu a été calculée²⁰⁰. Le Tableau 15 présente les différences d'énergie calculées pour chaque paire d'épimères en C4. On y trouve aussi les rapports prévisionnels et expérimentaux des produits 4*R* et 4*S*. Les valeurs prévisionnelles ont été déterminées à partir des différences d'énergie mentionnées et de l'équation $\Delta G = -RT \ln K$.

Produit	ΔE^{4R-4S} (kcal/mol)	rappports 4 <i>R</i> :4 <i>S</i> prévisionnel	rappports 4 <i>R</i> :4 <i>S</i> expérimental
1	1,1	13:87	24:76
2	0,4	33:67	20:80
3	-0,6	73:27	~100:0
4	-1,0	84:16	~100:0
5	0,4	33:67	30:70
6	0,9	18:82	30:70



1 R = C₂H₄-NH-Cbz
 2 R = CH₂-NH-Cbz
 3 R = CH(*S*-CH₃)-NH-Cbz
 4 R = CH(*R*-CH₃)-NH-Cbz
 5 R = CH₂Ph
 6 R = CH₂OCH₂Ph

Tableau 15 : Etude thermodynamique de produits d'aldolisation catalysée par la F1PA

L'ensemble de ces résultats montre bien qu'il y a une bonne corrélation entre les valeurs prévues et celles expérimentales. Ainsi, dans chaque cas, le produit majoritaire formé est celui de plus faible énergie. En 2006, la même équipe de recherche a abouti à une

²⁰⁰ Espelt, L.; Bujons, J.; Parella, T.; Calveras, J.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapes, P. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1392.

conclusion identique avec d'autres types de substrats possédant des groupements protecteurs de l'amine différents²⁰¹. Le diastéréoisomère obtenu majoritairement possédait dans chaque cas une énergie minimale plus faible d'environ 1,5 kcal/mol par rapport à son épimère en C4.

En ce qui concerne les résultats avec les aldéhydes nitrés, nous n'avons malheureusement pas accès aux rapports expérimentaux 4*R*:4*S* puisque la réaction spontanée de cyclisation intramoléculaire a lieu très rapidement et qu'en conséquence on ne peut pas isoler chaque épimère sous forme linéaire. Cependant, si on suppose que la réaction de cyclisation est totale pour chaque épimère, on pourrait réaliser ce même type d'étude sur la forme cyclisée. Nous avons donc effectué un calcul d'énergie dans le cas des nitrocyclitols isolés.

Les énergies potentielles ont été calculées en utilisant le champ de force Merck MMFF94, en suivant le modèle de solvation de Born qui est utilisé pour la modélisation de composés polaires ou de sucres. Ainsi, nous avons trouvé une énergie minimale inférieure pour le diastéréoisomère **100** majoritaire par rapport au composé **101** minoritaire, avec un ΔE de 1,5 kcal/mol. Ce résultat correspondrait à un rapport théorique de 93/7. Cette différence de stabilité en faveur de l'épimère *S* (3*S* sur les cyclitols), configuration non naturelle de l'enzyme, pourrait expliquer les rapports expérimentaux de 80/20 des nitrocyclitols. La réaction serait bien majoritairement sous contrôle thermodynamique.

Le bilan du couplage est donné Tableau 16 :

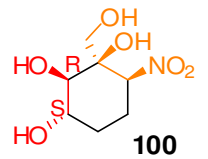
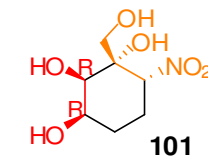
FIPA (DHAP) Attendu : 2 <i>R</i> -3 <i>R</i>	
 <p>100</p>	 <p>101</p>
Rendement : 66 %	Rendement : 17 %
Proportions 80/20	

Tableau 16 : Bilan des produits de la réaction nitrobutanal/DHAP catalysée par la FIPA

3.1.2. Catalyse par les FSA native et mutée

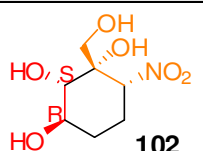
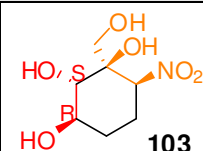
➤ Nous avons tout d'abord effectué la condensation aldolique entre la DHA et le 4-nitrobutanal, catalysée par la FSA A129S. 90 U d'aldolase ont été introduites dans le milieu réactionnel par mmol d'aldéhyde. Après 12 h d'agitation, la totalité du DHA a disparu. Un stéréoisomère est très majoritairement formé, indiquant une grande stéréosélectivité de l'aldolase et de la réaction de Henry.

²⁰¹ Calveras, J.; Bujons, J.; Parella, T.; Crehuet, R.; Espelt, L.; Joglar, J.; Clapes, P. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2648.

Les spectres de RMN du produit majoritaire **102** obtenu avec la FSA mutée sont identiques à ceux observés précédemment au laboratoire avec la FBA (Tableau 17). Le groupement nitro, les hydroxyles en position 2 et 3 du cycle, ainsi que l'hydroxy-méthyle en 1 sont en position équatoriale sur le cycle. Cette configuration est donc la plus favorable. Le nitrocyclitol est obtenu avec un rendement de 70 %. Le composé minoritairement formé **103** est quant à lui obtenu avec un très faible rendement (3 %) et correspond à une fermeture différente du cycle lors de la réaction de Henry intramoléculaire.

➤ Nous avons ensuite effectué le couplage enzymatique entre l'HA et le 4-nitrobutanal catalysé par la FSA native. Dans ce cas, 80 U d'enzyme ont été introduits dans le milieu par mmol de substrat. Après 12 h d'agitation, la réaction est terminée.

Quatre diastéréoisomères ont été isolés avec un rendement global de 87 %. Pour chacun d'eux, la stéréochimie induite par l'aldolase 2*S*,3*R* a été systématiquement retrouvée. La formation de ces différents produits est donc liée à la réaction de Henry intramoléculaire, nettement moins stéréosélective en présence du méthyle. Cette baisse de stéréosélectivité pourrait s'expliquer par la diminution d'effets électroniques ou de liaison hydrogène stabilisant lors de la formation de la liaison C1-C6, du fait de l'absence du groupement hydroxyle. Cela pourrait aussi être dû aux effets stériques, le méthyle et l'hydroxyle en C1 étant plus proches en taille que ne le sont l'hydroxyle et l'hydroxyméthyle. Tout cela pourrait induire une moins grande différence d'énergie entre les états de transition conduisant aux stéréoisomères. Les proportions et structures de chaque diastéréoisomère isolé sont données dans le tableau récapitulatif suivant :

FSA _{A129S} (DHA) Attendu : 2 <i>S</i> -3 <i>R</i>	
	
102	103
Rendement : 70 %	3 %
Proportions 96/4	

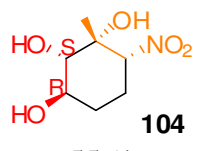
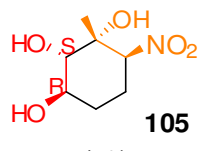
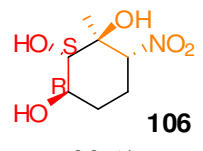
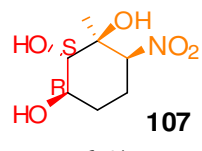
FSA (HA) Attendu : 2 <i>S</i> -3 <i>R</i>			
			
104	105	106	107
55 %	4 %	22 %	6 %
Proportions 63/5/25/7			

Tableau 17 : Nitrocyclitols obtenus avec le nitrobutanal comme substrat des FSA

3.2. Couplage avec les substrats nitrés porteurs de groupements hydroxyyles

Des réactions d'aldolisation catalysées par nos aldolases et mettant en jeu d'autres substrats aldéhydiques modèles ont été menées. Trois accepteurs, porteurs de groupements hydroxyyles augmentant leur solubilité, ont ainsi été testés. Il s'agit des aldéhydes **95**, **R-96** et **S-96**. Les réactions enzymatiques ont été lancées en suivant le même protocole que précédemment.

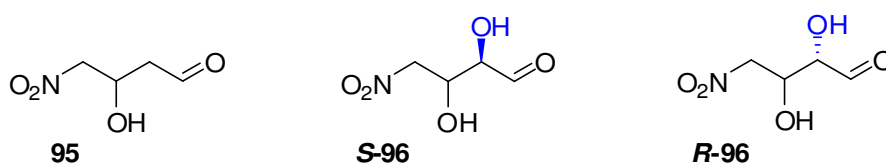


Figure 159 : Rappel des structures des composés hydroxylés à coupler

Pour chaque réaction, la présence en α du NO₂ d'un groupement hydroxyle non dédoublé devrait entraîner la formation de deux stéréoisomères à séparer. Par ailleurs, sachant que certaines enzymes peuvent conduire à deux configurations lors de la formation de la liaison C-C, les réactions vont donc conduire à des mélanges de stéréoisomères. En prenant en compte la grande polarité des nitrocyclitols obtenus, plusieurs méthodes chromatographiques ont été testées pour optimiser la purification et la séparation des composés. Dans tous les cas, l'appareil utilisé est une chromatographie basse pression. Elle présente l'avantage de permettre la séparation à l'échelle préparative de quelques milligrammes à plusieurs grammes de produit selon la taille de la colonne utilisée. De plus c'est un appareillage facile à maîtriser, rapide d'exécution et reproductible. Il permet une séparation « éclair » à des pressions supérieures à celles des colonnes classiques ainsi qu'un contrôle précis du débit de solvant.

Nous avons testé trois types de colonne chromatographique :

- sur phase normale
- sur phase inverse
- sur phase amino

Dans le cas de la phase normale, les composés migrent difficilement et nous avons dû monter à des proportions relativement élevées en méthanol pour sortir nos produits (jusqu'à 15 %). En utilisant un mode d'élution en gradient et en surdimensionnant la hauteur de colonne utilisée (par rapport à la taille de colonne conseillée par le producteur, calculée selon la quantité de produit déposé), les diastéréoisomères des bruts réactionnels ont pu être séparés.

Dans le cas de la phase inverse, les nitrocyclitols sont peu retenus sur la colonne et migrent trop rapidement pour être séparés. Enfin, dans le cas de la phase amino, les produits « traînent » sur la colonne et leur séparation n'est pas améliorée en comparaison d'une phase normale. L'ensemble de nos purifications a donc été effectué sur gel de silice classique avec un éluant dichlorométhane/méthanol utilisé en gradient.

3.2.1. Substrat monohydroxylé : réactions avec l'aldéhyde 95

Avant de présenter les résultats de ces couplages, il est nécessaire d'apporter un éclairage concernant la réaction de cyclisation de Henry en présence d'un groupement hydroxyle en alpha du nitro. L'ensemble des données qui vont suivre sont issues de plusieurs expériences réalisées soit avec la FBA soit avec la FSA dans un ordre chronologique.

Dans le cas du 3-hydroxy-nitrobutanal racémique, par réaction avec le DHAP ou la DHA, on s'attendait à obtenir deux molécules cycliques en proportions 50/50, correspondant aux deux configurations de l'alcool en position 5. Cependant, expérimentalement les proportions obtenues en isolant les cyclitols, et même avant hydrolyse des phosphates, étaient toujours en faveur du stéréoisomère le plus stable : **108** ou **110** (Tableau 18). Par ailleurs, cette tendance a aussi été retrouvée avec d'autres aldéhydes dihydroxylés mis en réaction par L. El Bliidi. Enfin avec la FSA, la condensation de la DHA a donné exactement les mêmes résultats.

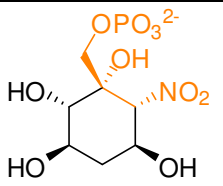
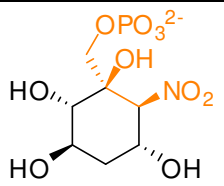
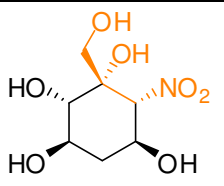
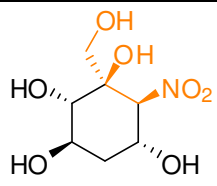
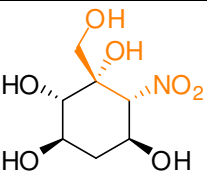
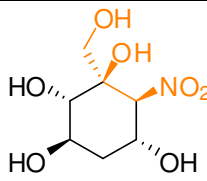
FBA		FBA	
			
Proportion : 55/45		Proportion : 55/45	
FSA (DHA)			
			
Proportion : 55/45			

Tableau 18 : Bilan des proportions obtenues pour les deux stéréoisomères issus des réactions de couplage du 3-hydroxy-nitrobutanal 95 avec la FBA et la FSA

Nous nous sommes donc penchés sur cette question en prenant l'aldéhyde **95** comme modèle (Tableau 18). Plusieurs hypothèses ont alors été envisagées :

- Cela pourrait être lié à une forme de dédoublement cinétique dont l'aldolase FBA serait responsable. Une partie de l'aldéhyde **R-95** ne serait pas consommée. Cela nous paraît néanmoins très peu probable car cette enzyme n'est pas énantiosélective vis-à-vis de la position alpha du carbonyle, donc c'est encore moins probable pour une position beta.

- Cela pourrait être dû à la phytase qui n'hydrolyserait pas tous les phosphates de façon équivalente. Mais là encore c'est peu probable car on utilise justement les phosphatases pour leur spécificité vis-à-vis du phosphate et leur grande tolérance de chaînes alkyles diverses et variées.

Mais ces deux hypothèses ne sont pas logiques non plus avec le résultat obtenu par la suite avec la FSA.

- Enfin, si aucune enzyme n'est liée à cette différence de proportion, il peut s'agir de réactions purement chimiques dues au fait qu'en général les réactions d'aldolisation sont réversibles. Il se produirait des réactions d'isomérisation. On pourrait penser à un contrôle thermodynamique partiel de la réaction de cyclisation.

La première étape a été de vérifier que le pH acide nécessaire à l'hydrolyse du phosphate n'était pas responsable de cette différence. En isolant les phosphates **108** et **109** par précipitation au baryum et en étudiant directement le mélange brut par RMN, nous avons obtenus ces mêmes proportions, en faveur de l'isomère le plus stable (Tableau 18). Nous n'avons pas non plus observé d'aldol sous forme ouverte, ce qui indique que la cyclisation a lieu rapidement et de manière quantitative. Cette expérience confirme aussi que la phytase n'est pas en jeu.

Ayant constaté des variations systématiques dans les rapports diastéréoisomériques obtenus selon les expériences avec la FBA issues de la thèse de L. El Bliidi mais aussi avec la FSA, nous avons alors pensé que ces isomérisations pourraient avoir lieu par simple chauffage. En effet, en fin de réaction nous sommes contraints d'évaporer le milieu réactionnel avant purification. Cette évaporation d'eau nécessite un minimum de chauffage qui pourrait être responsable de taux d'isomérisation différents selon le temps d'évaporation. Ensuite ces isomérisations devraient se faire plutôt en milieu basique d'après la réactivité bien connue des dérivés nitrés.

Ainsi en deuxième étape et pour confirmer cette hypothèse, nous avons pris le composé **111** pur et avons ajouté une solution aqueuse de carbonate de sodium à 2%. Au bout de 30 min à température ambiante, la transformation en l'autre isomère **110** a été complète. Les mêmes résultats ont été observés après 2h de chauffage à 50°C du composé **111** en milieu neutre.

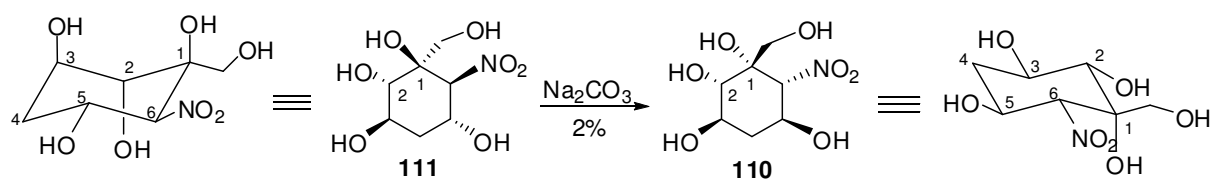


Figure 160 : Réaction d'isomérisation

Comme trois configurations sont inversées au cours de cette isomérisation, ce résultat ne peut s'expliquer que si on envisage deux rétroaldolisations. Sous contrôle thermodynamique, elles conduisent à des proportions plus élevées en stéréoisomère favorisé. Dans le schéma ci-dessous est présenté un intermédiaire putatif de ces rétroaldolisations, sans garantie qu'il puisse réellement se former. De toute évidence, il faut rompre les deux liaisons C1-C6 et C5-C6 pour conduire à l'isomère le plus stable.

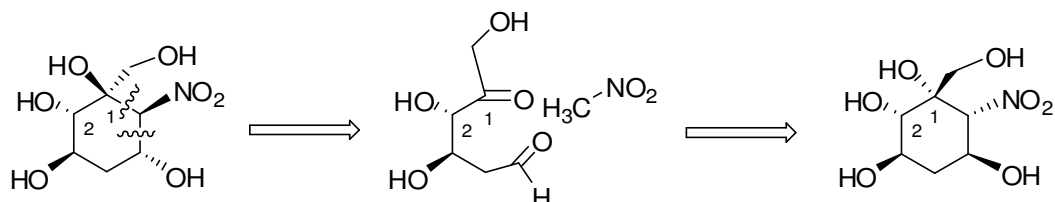


Figure 161 : Rétroaldolisations envisagées pour les nitrocyclitols

Enfin en prenant en compte ces nouveaux résultats et profitant de l'utilisation récente de la FSA_{A129S}, nous avons exploité la capacité de cette enzyme à catalyser la réaction d'aldolisation à pH légèrement basique. En condensant la DHA à l'aldéhyde **95** racémique à pH 8 et en laissant la réaction tourner pendant au moins 24 h, seul le stéréoisomère **110** a été obtenu avec un rendement de 54 %. Ce résultat est particulièrement remarquable puisqu'à partir d'un composé racémique et en contrôlant les conditions de réaction, on peut former en une étape un seul stéréoisomère.

Les possibilités d'isomérisation des nitrocyclitols étant maintenant expliquées, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés sous forme de tableaux récapitulatifs dans la partie qui suit. Le lecteur trouvera aussi un intercalaire détaillant la structure des produits formés associée à la conformation privilégiée (voir aussi en partie expérimentale).

L'obtention des différents stéréoisomères dépendra de la stéréosélectivité stricte ou non des aldolases et de la réaction de Henry intramoléculaire. En commentaire général, on peut dire que les rendements des réactions de couplage sont bons entre 71 et 84 %.

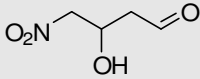
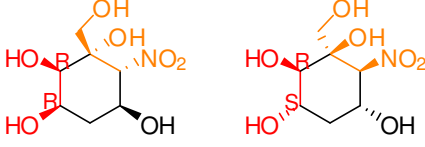
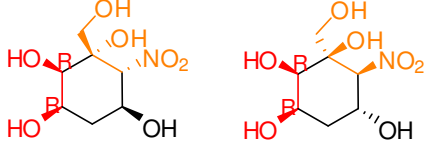
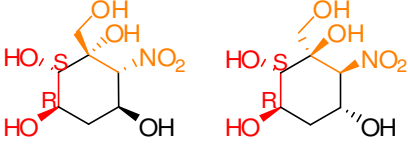
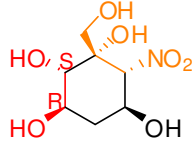
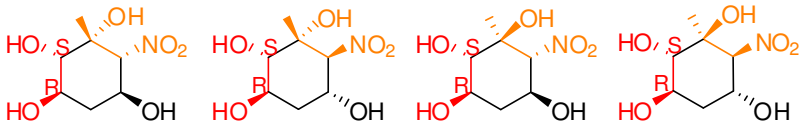
Aldolase (donneur) Stéréochimie attendue	Produits de réaction avec le 3-hydroxy-nitrobutanal 
R1PA (DHAP) 2R-3S	 <p style="text-align: center;">112 113</p> <p style="text-align: center;">Rendement : 13 % 67 % = 80 %</p> <p style="text-align: center;">Proportions : 16/84</p>
F1PA (DHAP) 2R-3R	 <p style="text-align: center;">112 114</p> <p style="text-align: center;">Rendement : 58 % 24 % = 82 %</p> <p style="text-align: center;">Proportions : 71/29</p>
FSA A129S (DHA) 2S-3R	 <p style="text-align: center;">110 111</p> <p style="text-align: center;">39 % 32 % = 71 %</p> <p style="text-align: center;">A pH neutre : proportions : 55/45</p>  <p style="text-align: center;">110</p> <p style="text-align: center;">54 %</p> <p style="text-align: center;">A pH basique : 100</p>
FSA (HA) 2S-3R	 <p style="text-align: center;">115 116 117 118</p> <p style="text-align: center;">52 % 4 % 7 % 21 % = 84 %</p> <p style="text-align: center;">Proportions 115-118 : 71/29</p>

Tableau 19 : Résultats des couplages avec le 3-hydroxy-nitrobutanal

Dans le cas de la R1PA, de la F1PA et de la FSA_{A129S}, seuls deux produits ont été isolés. Avec la FSA native et l'HA, quatre produits sont formés. Nous avons déterminé leur stéréochimie par RMN et sommes arrivés aux conclusions suivantes :

- Cas de la R1PA

Les deux stéréoisomères isolés **112** et **113** (proportions 16/84) sont issus de la stéréosélectivité modérée de l'enzyme. Nous avons déjà observé ce type résultat lors de la formation de **100** et **101** mais dans de moindres proportions (proportions 95/05). On peut donc dire que la présence de l'hydroxyle en alpha du nitro renforce le mauvais placement de l'aldéhyde dans le site actif de l'enzyme et/ou, selon un contrôle thermodynamique, avec un hydroxyle supplémentaire on diminue la différence d'énergie entre les 2 épimères en C3. La

réaction devient globalement moins stéréosélective. Ce type d'inversion de configuration au niveau du C3 avec la R1PA a déjà été remarqué par P. Clapés lors de la formation d'iminopolyols en 2003.²⁰² Néanmoins, les conditions basiques ont permis de limiter la formation des stéréoisomères liés à la réaction de Henry, l'isomérisation par les « rétroHenry » ayant eu lieu. On peut donc supposer que les deux stéréoisomères **112** et **113** sont les deux isomères les plus stables formés uniquement en raison d'un manque de stéréosélectivité de l'enzyme.

- Cas de la F1PA

Ici les résultats sont différents. Les deux stéréoisomères isolés **112** et **114** sont issus de l'excellente stéréosélectivité de l'enzyme révélée en présence de l'aldéhyde hydroxylé. En effet, si en l'absence d'hydroxyle la réaction avait été médiocrement stéréosélective, ne donnant même pas le stéréoisomère de configuration *R,R* majoritairement, cette fois, aucun isomère provenant d'un positionnement différent de l'aldéhyde dans le site actif n'a été isolé. C'est l'inverse de la situation rencontrée avec la R1PA. On peut penser qu'il s'agit de liaisons hydrogène entre l'hydroxyle du substrat et des résidus du site actif de la F1PA qui maintiennent celui-ci dans une position bien déterminée. Les deux produits **112** et **114** sont donc formés en raison de la présence de l'hydroxyle racémique sur l'aldéhyde comme dans le cas de la FBA ou de la FSA.

- Cas de la FSA

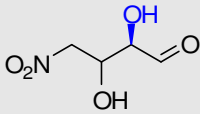
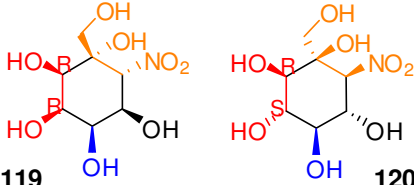
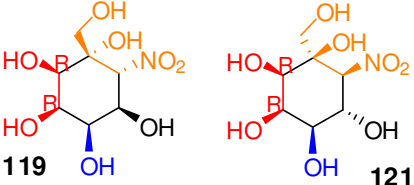
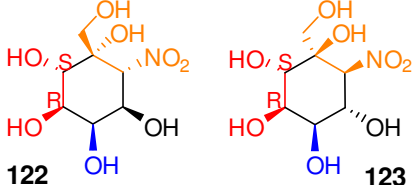
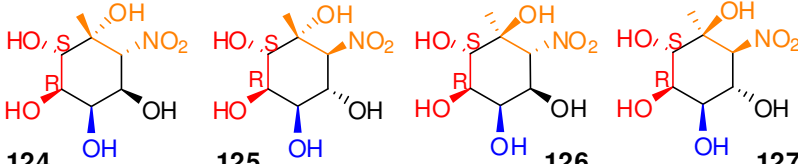
Avec la DHA comme donneur et l'enzyme mutée, les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus initialement avec la FBA. La FSA est très stéréosélective, son utilisation en synthèse par différents groupes de recherche tend à confirmer ce résultat. Il n'a jamais été observé une autre stéréochimie en position 3 (ou 4 si on considère l'aldol linéaire).

Avec l'HA comme donneur et la FSA native, si l'enzyme est stéréosélective, la réaction de Henry ne l'est pas. Celle-ci donne quatre produits de réaction difficiles à séparer. Les deux isomères majoritaires **115** et **118** sont de stéréochimie comparable respectivement à celles de **110** et **111**. Ils sont liés logiquement à l'hydroxyle racémique sur l'aldéhyde de départ. Ce résultat confirme que cette cyclisation intramoléculaire est fortement influencée par la présence de l'hydroxyle en C5.

3.2.2. Substrats dihydroxylés : réactions avec les aldéhydes S-96 et R-96

Comme dans le cas de l'aldéhyde monohydroxylé, l'obtention des différents stéréoisomères dépendra de la stéréosélectivité stricte ou non des aldolases et de la réaction de Henry intramoléculaire. On peut voir que les rendements des réactions de couplage sont bons entre 69 et 86 %.

²⁰² Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapes, P *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4887.

Aldolase (donneur) Stéréochimie attendue	Produits de réaction avec le 2,3-dihydroxy-nitrobutanal 2S 
R1PA (DHAP) 2R-3S	 <p> 119 120 Rendement : 17 % 62 % = 79 % Proportions : 21/79 </p>
F1PA (DHAP) 2R-3R	 <p> 119 121 Rendement : 39 % 44 % = 83 % Proportions : 47/53 </p>
FSA A129S (DHA) 2S-3R	 <p> 122 123 Rendement : 42 % 29 % = 71 % Proportions : 59/41 </p>
FSA (HA) 2S-3R	 <p> 124 125 126 127 38 % 8 % 12 % 27 % = 85 % Proportions : 45/9/14/32 </p>

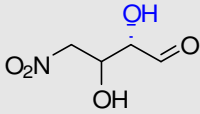
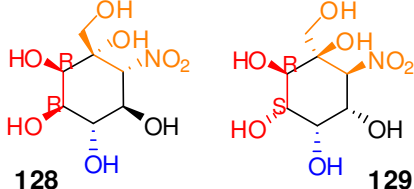
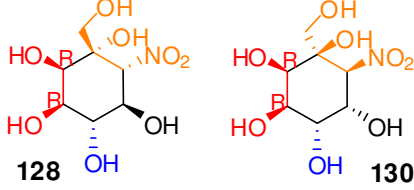
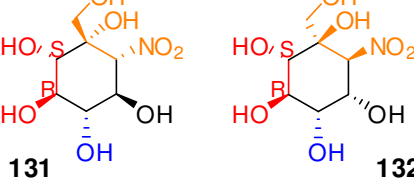
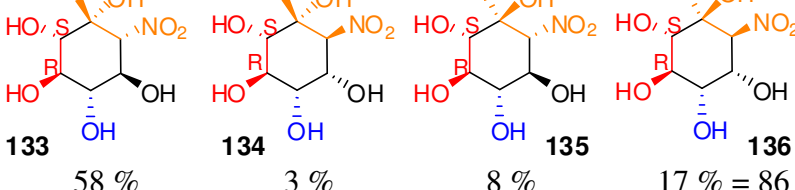
Aldolase (donneur) Stéréochimie attendue	Produits de réaction avec le 2,3-dihydroxy-nitrobutanal 2R 
R1PA (DHAP) 2R-3S	 Rendement : 41 % 41 % = 82 % Proportions : 50/50
F1PA (DHAP) 2R-3R	 Rendement : 44 % 34 % = 78 % Proportions : 57/43
FSA A129S(DHA) 2S-3R	 Rendement : 50 % 19 % = 69 % Proportions : 73/27
FSA (HA) 2S-3R	 Rendement : 58 % 3 % 8 % 17 % = 86 % Proportions : 67/4/9/20

Tableau 20 : Résultats des couplages avec le 2,3-dihydroxy-nitrobutanal

Dans le cas de la R1PA, de la F1PA et de la FSA A129S seuls deux produits ont été isolés. Avec la FSA native et l'HA, quatre produits sont formés. Nous avons déterminé leur stéréochimie par RMN et sommes arrivés aux conclusions suivantes :

- Cas de la R1PA

Les deux stéréoisomères isolés **119** et **120** en rapport 21/79 sont issus de la stéréosélectivité modérée de l'enzyme. Elle devient même médiocre dans le cas de **128** et **129**. De façon surprenante, l'hydroxyle supplémentaire pouvant laisser croire que l'on se rapproche du cas du lactaldéhyde, n'apporte aucune amélioration. Cette faible

stéréosélectivité est étonnante, car elle est même encore plus basse lorsque l'aldéhyde utilisé comme accepteur est de configuration *R* en α du carbonyle, ce qui correspond à la même orientation spatiale de l'hydroxyle que celle du L-lactaldéhyde. Nous aurions donc pu imaginer que cet hydroxyle créerait des liaisons hydrogène favorables dans le site actif de l'enzyme. Sans doute, la présence des autres substituants génère plutôt des interactions défavorables. Comme dans les cas précédents, la cyclisation intramoléculaire est restée stéréosélective.

- Cas de la FIPA

Les stéréoisomères isolés **119** et **121** d'une part et **128** et **130** d'autre part sont issus de l'excellente stéréosélectivité de l'enzyme conservée dans les deux cas. La réaction de Henry est comme dans les cas précédents, dépendante de la stéréochimie de l'hydroxyle en position 5. L'hydroxyle « racémique » de l'aldéhyde conduit bien à deux stéréoisomères dans chaque cas. Cependant, on peut remarquer qu'après couplage de l'aldéhyde **S-96**, c'est le stéréoisomère **121** qui est légèrement majoritaire. C'est assez inhabituel, car en général, cette stéréochimie issue de la réaction de Henry est plutôt défavorisée en raison de la réaction de rétroaldolisation. Cela pourrait s'expliquer par la présence de deux hydroxyles en C2 et C4 en position axiale du cycle pour le composé minoritaire **119**, ce qui serait défavorable à la stabilité cet isomère par rapport à l'autre qui n'a qu'un hydroxyle axial en C3.

- Cas de la FSA

Avec la DHA comme donneur et l'enzyme mutée, les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus initialement avec la FBA et les mêmes produits.

Avec l'HA comme donneur et la FSA native, si l'enzyme est stéréosélective, la réaction de Henry ne l'est pas.

En conclusion générale sur l'ensemble de ces réactions de couplages, plusieurs informations peuvent ressortir.

Tout d'abord il est important de souligner la bonne stéréosélectivité des aldolases sauf pour la RIPA, ce qui permet de limiter le nombre de diastéréoisomères obtenus lors de ces couplages. Par comparaison avec la FBA, les produits formés par catalyse avec la FSA, utilisant comme donneur la DHA, présentent tous la stéréochimie attendue, c'est-à-dire celle obtenue lors de la réaction naturelle de l'enzyme.

En ce qui concerne la FIPA et surtout de la RIPA, la configuration de la liaison C-C nouvellement créée reste à étudier au cas par cas, car l'aldéhyde peut se positionner différemment dans le site actif de la protéine selon sa structure. La présence d'hydroxyles sur les aldéhydes a quand même été un facteur favorable pour la FIPA mais pas pour la RIPA.

En cas de faible stéréosélectivité, une prédiction des stéréoisomères majoritaires est possible puisque la formation de cette liaison C-C est sous contrôle thermodynamique.

Il est aussi intéressant de noter la grande stéréosélectivité de la réaction de Henry lors de la cyclisation de l'aldol sauf en présence du méthyle à la place de l'hydroxyméthyle. Aussi dans le cadre de notre projet, le donneur HA ne sera pas systématiquement retenu.

Concernant l'aspect stéréochimique et la conformation induits par la cyclisation, pour un stéréoisomère donné, il ressort une corrélation entre le nombre de substituants en position axiale du cycle et sa proportion relative. Notamment, lorsque l'on étudie les paires de stéréoisomères, le majoritaire est toujours celui qui possède le moins de substituants en axial. Ce résultat peut s'expliquer grâce à la réaction de rétroHenry en lien avec la stabilité d'un isomère. En effet, la réaction de Henry est sans doute à la fois sous contrôle thermodynamique et cinétique, ce qui permet d'expliquer la formation de stéréoisomères possédant de nombreux substituants en position axiale (par exemple **130**, **132** ou **136**). Néanmoins, l'isomère défavorisé est toujours minoritaire, en proportion variable selon sa stabilité relative par rapport à l'isomère le plus stable. La réaction de rétroHenry apparaît alors plus importante puisque les différences de stabilité des isomères sont accentuées. Par exemple, si on compare **122/123** et **131/132**, on voit que l'on passe d'une proportion 59/41 à 73/27.

Les rendements sont bons avec toutes les aldolases employées ce qui est encourageant pour la suite. Les aldéhydes nitrés sont bien acceptés comme substrats.

Ces réactions de couplage ont permis de valider et d'étendre cette méthode de synthèse de nitrocyclitols. Nous avons en effet montré qu'il était possible d'accéder rapidement et efficacement à plusieurs familles de nitrocyclitols de stéréochimie définie. Elles permettront de former des inhibiteurs de glycosidases potentiellement actifs sur différents types de maladies. Selon les résultats d'activité, les rendements de synthèse d'un nitrocyclitol en particulier pourront être optimisés en favorisant les conditions thermodynamiques ou cinétiques de déroulement des réactions d'aldolisation et de nitroaldolisation.

Chap 3 : Synthèse d'aminocyclitols

Introduction

L'extension de la méthodologie de synthèse de nitrocyclitols ayant été réalisée, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'aminocyclitols potentiellement actifs en tant qu'inhibiteurs de glycosidases lysosomales. Pour cela, nous nous sommes inspirés de deux molécules de la littérature : la β -NOV et β -NOEV. Ces deux composés sont des puissants inhibiteurs de glycosidases ayant démontré leur efficacité en tant que molécules chaperonnes au niveau des lysosomes. Par ailleurs, il a été montré qu'un allongement de la chaîne *N*-alkyle pouvait contribuer à une meilleure activité des molécules (se reporter à la partie bibliographique de ce manuscrit), d'où l'importance de moduler également ce facteur là.

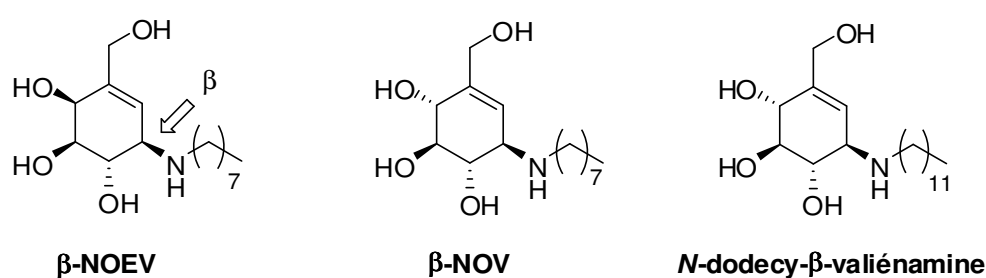


Figure 162 : Aminocyclitols actifs sur des glycosidases lysosomales (inhibiteurs)

En nous basant sur ces molécules modèles (Figure 162) et sur la méthodologie mise en place précédemment, nous pouvons construire des familles d'inhibiteurs potentiels optiquement purs. Ces composés pourraient être *N*-alkylés en position 5 du cycle pour induire une meilleure activité sur les enzymes humaines ciblées.

La spécificité d'un inhibiteur de type aminocyclitol vis-à-vis d'enzymes de stéréospécificité α ou β est liée à la stéréochimie du carbone qui porte la fonction amine. Quand l'amine est au-dessus du plan, la cible sera une β -glycosidase ; quand elle est en-dessous, la cible sera une α -glycosidase. Nous avons montré dans la partie précédente que nous pouvons préparer deux familles de nitrocyclitols qui répondent à ces deux cas pour la position 6. En revanche pour avoir l'amine en position 5, les aldéhydes accepteurs des aldolases doivent porter un groupement azoté en position 3 de la chaîne. Par réduction du groupement 6-nitro, on peut accéder soit à des analogues de valiénamine, soit à des diaminocyclitols (Figure 163).

L'objet de ce chapitre est de présenter les résultats obtenus dans ce domaine avec différents précurseurs azotés.

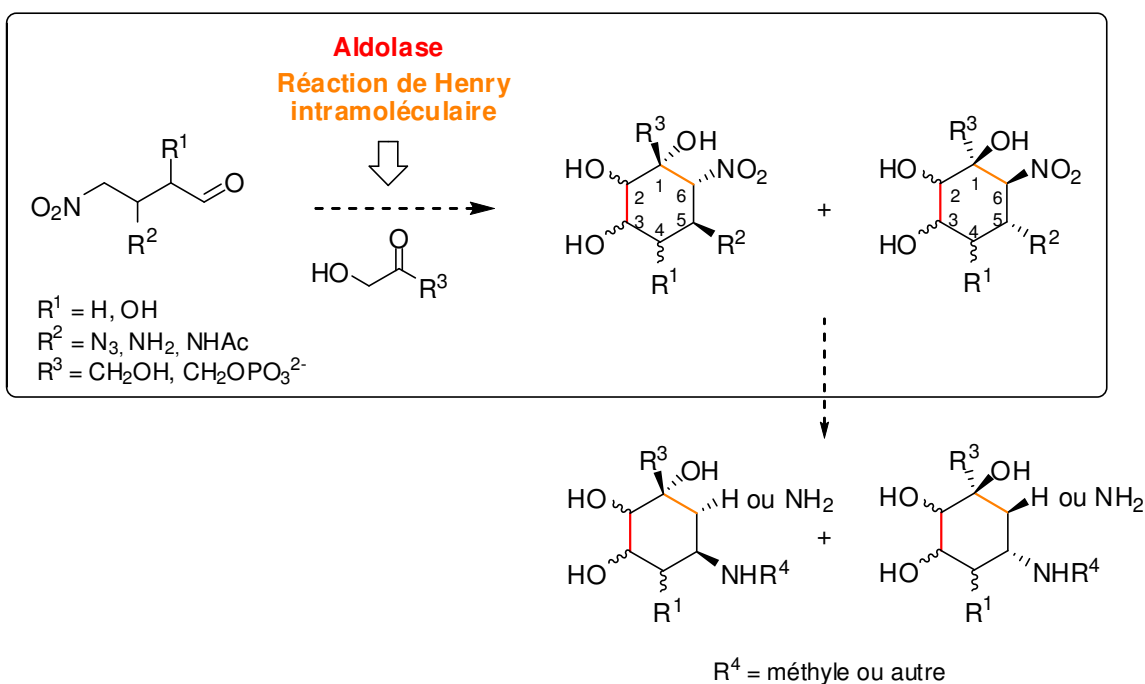


Figure 163 : Méthodologie envisagée pour introduire une amine en C5 sur le cyclitol

Par ailleurs, la mise en place de la procédure d'évaluation des molécules en tant qu'inhibiteur de glycosidases sur un robot pipeteur sera effectuée.

I. Synthèse des aldéhydes portant un groupement azoté

1. Introduction d'un groupement azido

Une voie de synthèse d'aldéhydes porteurs d'un groupement azido a été envisagée en trois étapes à partir des aldéhydes modèles déjà obtenus. Son schéma général est résumé ci-dessous :

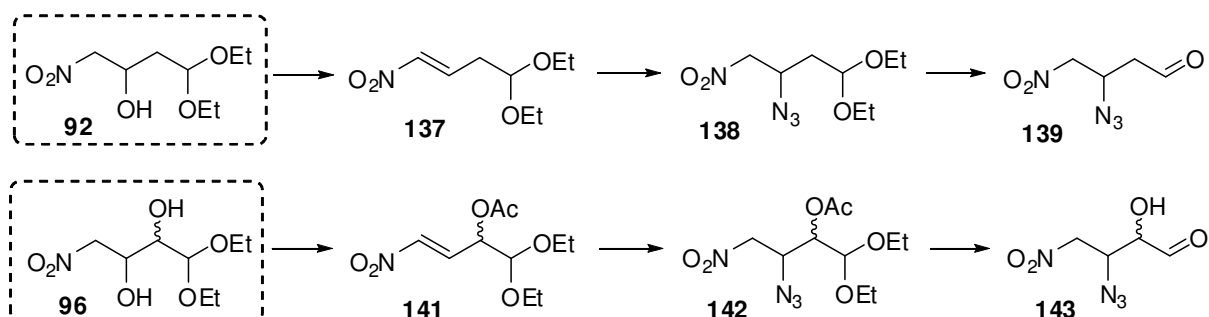


Figure 164 : Synthèse envisagée d'aldéhydes azotés à partir des composés 92 et 96

La première étape consisterait en une acétylation des groupements hydroxyyles, facilitant une élimination en α du groupement nitro très électroattracteur. Cette étape serait suivie de l'introduction du groupement azido au niveau de la double liaison de la molécule par une réaction d'addition. Enfin, une déprotection des fonctions alcool et aldéhyde permettrait d'aboutir aux substrats désirés.

1.1. Synthèse de l'aldéhyde 139

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la synthèse de **139** à partir de l'alcool **92**. Pour faciliter l'élimination de l'hydrogène en α du groupement nitro, nous avons besoin d'un bon groupement partant à la place de l'hydroxyle. Nous avons donc choisi un groupement mésylate par réaction de la fonction alcool du composé **92** avec du chlorure de mésyle. L'élimination du mésylate s'effectue naturellement, sans que l'on puisse isoler le composé mésylé intermédiaire (Figure 165). La réaction est propre, rapide (quelques minutes) et quantitative, mais une courte purification par chromatographie éclair est tout de même nécessaire pour éliminer l'excès de chlorure de mésyle.

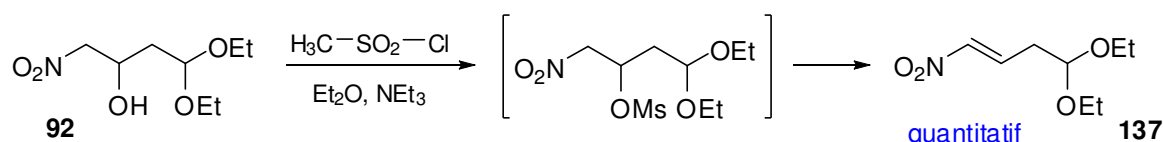


Figure 165 : Synthèse de l'alcène 134

L'étape suivante est l'introduction du groupement azido sur la double liaison de l'alcène **137**. Grâce à la présence du groupement nitro en α , l'addition nucléophile ne devrait se faire que sur le carbone 3 de la molécule.

Le premier protocole mis à l'essai est celui de Nakamura *et al.* faisant réagir de l'azoture de sodium NaN_3 sur la double liaison dans du DMSO²⁰³. Le brut réactionnel de cette réaction montre clairement une dégradation du milieu et l'échec de la réaction.

Nous nous sommes alors intéressés à la procédure d'introduction d'un groupement azido mise au point par l'équipe du Pr. Jorgensen en 2007²⁰⁴. Sa méthodologie s'applique à des nitroalcènes terminaux, ce qui correspond parfaitement à notre cas. De l'azoture de triméthylsilyle est mélangé à de l'acide acétique pour former *in situ* l'acide HN_3 . Celui-ci, en présence de la triéthylamine, est capable de s'additionner sur la double liaison de l'alcène **137**.

²⁰³ Nakamura, Y.; Okada, M.; Sato, A.; Horikawa H.; Koura M.; Saito A.; Taguchi T. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5741.

²⁰⁴ Nielsen, M.; Zhuang, W.; Jørgensen, K. A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5849.

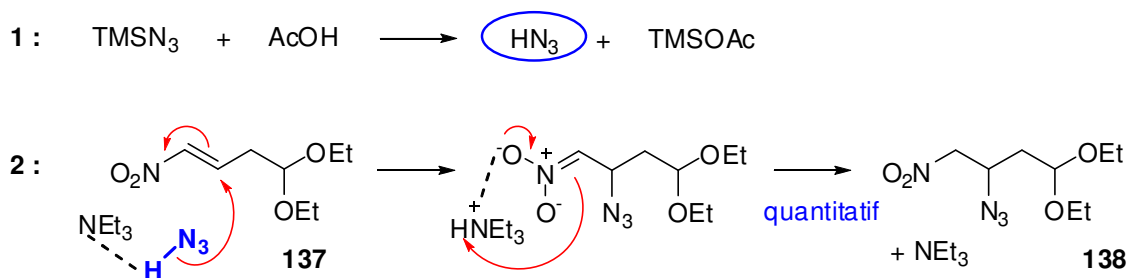


Figure 166 : Formation du dérivé azido 138

La réaction est réalisée dans du toluène anhydre sur 12 h. Elle est totale et quantitative. Aucune purification n'est nécessaire.

L'acétal **138** obtenu est déprotégé dans l'eau en présence de Dowex H^+ , selon le mode opératoire déjà décrit précédemment. L'aldéhyde désiré a été identifié par RMN sur le brut réactionnel à pH acide. Comme nous souhaitons utiliser directement cette solution pour faire le couplage enzymatique, il faut ajuster le pH de la solution à 7, indispensable pour les aldolases. Malheureusement, au cours de cette opération une élimination de HN_3 a lieu.

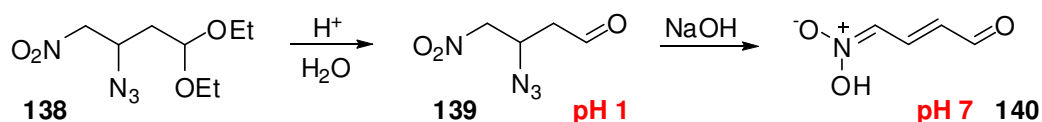


Figure 167 : Etape de déprotection de l'acétal suivie de la neutralisation du milieu

L'élimination du groupement azido est favorisée par la conjugaison du composé **140**. L'obtention du composé **139** comme substrat des aldolases est donc un échec. Malgré ces résultats peu encourageants, nous avons tenté cette approche sur le diol. La réactivité de la molécule pourrait être différente en raison de la présence du deuxième alcool.

1.2. Synthèse de l'aldéhyde 143

La présence d'un groupement hydroxyle en position 2 de l'aldéhyde **143** nous laisse espérer de conserver le groupement N_3 , contrairement à ce qui s'est passé avec le composé **139**. Le produit de départ envisagé est le diol **96**.

Pour effectuer l'élimination en α du NO_2 , le passage par un mésylate n'est pas judicieux car la monofonctionnalisation n'est pas possible. De nombreuses réactions secondaires auraient lieu.

Le passage par un acétate aboutit à de mauvais rendements (Figure 168). A cause de la basicité du milieu, le groupement acétate est hydrolysé lors de la réaction de Henry. Il doit être finalement réintroduit dans l'étape suivante. Cet ensemble réactionnel n'est donc pas très judicieux.

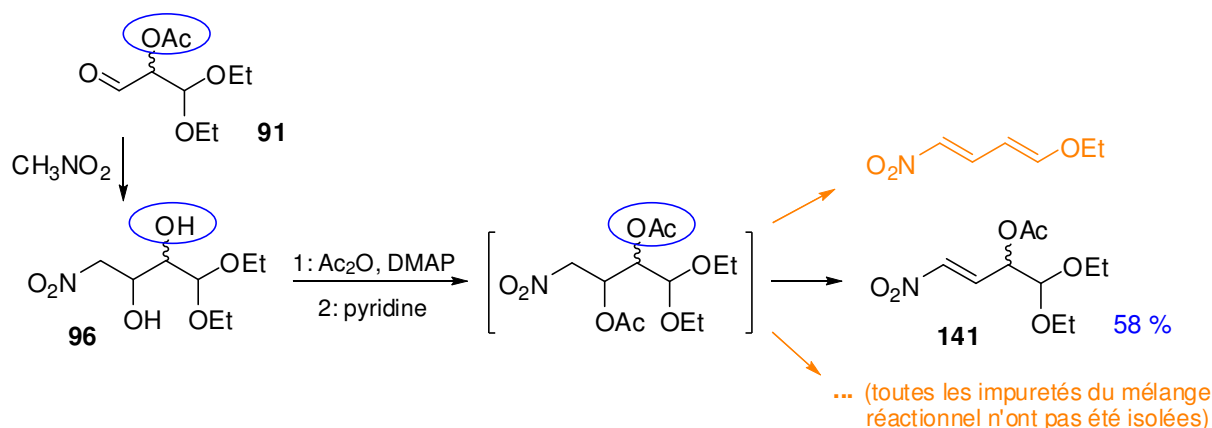


Figure 168 : Passage par des acétates pour l'élimination menant au composé 141

Nous avons finalement décidé de changer la protection de l'hydroxyle dédoublé de la molécule **91** ou **89** et choisi un groupement silylé. Celui-ci est résistant au milieu basique de la réaction de Henry et permet aux deux hydroxyles de la molécule d'être différenciés. La protection se fait avec du chlorure de terbutyldiméthyle silyle en présence d'imidazole dans du DMF²⁰⁵, avec un rendement quantitatif. Le brut réactionnel est directement mis en solution pour être oxydé par ozonolyse classique.

Après purification sur gel de silice, l'aldéhyde formé est mis en réaction avec le nitrométhane pour la réaction de Henry. Le rendement de cette dernière a pu être optimisé. En effet, sur la molécule silylée, l'emploi de la tétraméthylguanidine comme catalyseur en présence d'un grand excès de nitrométhane utilisé comme solvant donne de très bons résultats. La réaction est effectuée à froid et aucun sous-produit n'a été détecté par CCM. Le rendement de la réaction est de 86 %, et aucune purification n'est nécessaire.

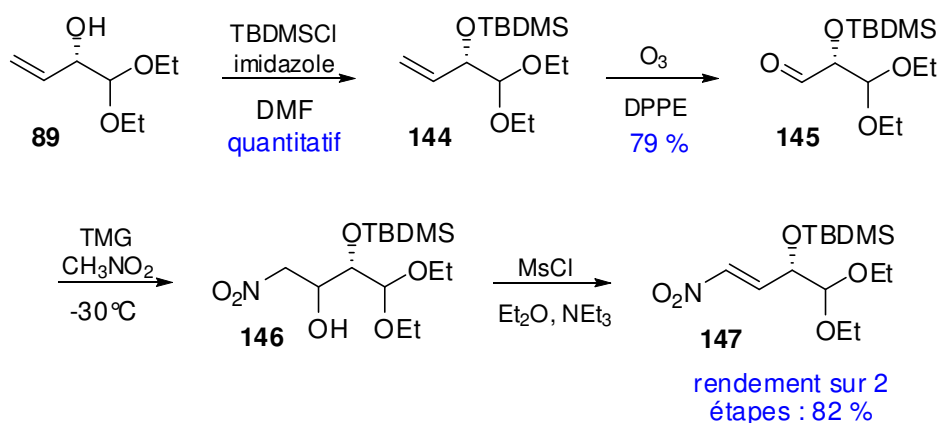


Figure 169 : Passage par un silylé pour l'obtention du composé 147

L'utilisation d'un mésylate pour la réaction d'élimination suivante n'est désormais plus à proscrire. L'alcène **147** est formé quantitativement en seulement 10 minutes de la

²⁰⁵ Corey, E. J.; Venkates.A J. *Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6190.

même manière que précédemment. Les intermédiaires de cette voie synthétique (Figure 169) sont volatiles et devront être manipulés avec précaution pour obtenir un bon rendement.

L'introduction du groupement azido se fait comme précédemment à l'aide de TMSN_3 en présence d'acide acétique et de triéthylamine comme catalyseur (Figure 170). La réaction est quantitative. Le produit est engagé dans la réaction de déprotection suivante sans purification préalable.

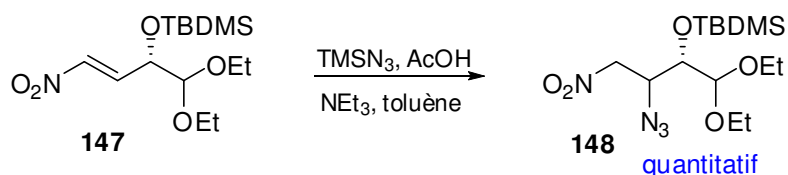


Figure 170 : Synthèse du composé 148

Malheureusement, de manière très surprenante, la déprotection de l'alcool silylé en milieu acide n'a pas eu lieu. Plusieurs modes opératoires ont été testés : utilisation de résines acides (Dowex, Amberlyst 15), d'acide chlorhydrique, d'acide acétique, d'acide trifluoroacétique, d'acide oxalique, ou encore d'acide sulfurique. Plusieurs types de solvants ont aussi été utilisés pour parer à d'éventuels problèmes de solubilité. Au final, soit le produit ne réagit pas, soit il se dégrade.

L'utilisation de fluorure a été envisagée, mais a abouti à l'élimination du groupement N_3 , formant ainsi un carbonyle non désiré (composé 149).

Enfin, des méthodes atypiques en conditions douces ont été testées comme en présence de cuivre, sans résultat.

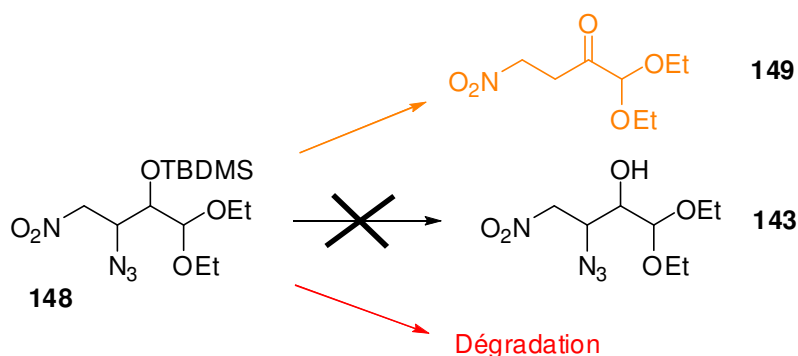


Figure 171 : Déprotection du composé 148

Les déprotections testées sont résumées dans le tableau suivant :

	réactif	solvant	T°	durée	résultat
1 ²⁰⁶	Dowex H ⁺	eau	40 °C	24 h	aucune réaction
2	HCl	THF/HCl (1M) 1:1	40 °C	24 h	aucune réaction
3 ²⁰⁷	HCl	EtOH/HCl (1M) 1:1	40 °C	24 h	aucune réaction
4	HCl	THF/HCl (3M) 3:1	40 °C	24 h	légère dégradation / produit de départ
5	HCl	THF/HCl (6M) 9:1	40 °C	24 h	légère dégradation / produit de départ
6	HCl/KCl	EtOH		12 h	légère dégradation / produit de départ
7 ²⁰⁸	TFA 5% aq.	CH ₂ Cl ₂ /TFA aq. 2:1	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
8 ²⁰⁹	APTS	THF/H ₂ O 20:1	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
9	APTS	acétone	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
10 ²¹⁰	HCOOH	THF/HCO ₂ H/H ₂ O 6:3:1	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
11 ²¹¹	AcOH	AcOH/THF/H ₂ O 3:1:1	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
12	amberlyst 15	acétone	40 °C	12 h	dégradation acétone / produit de départ
13	amberlyst 15	THF	60 °C	12 h	dégradation / résidu produit de départ
14 ²¹²	H ₂ SO ₄ /SiO ₂	CH ₂ Cl ₂	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
15	(COOH) ₂ /SiO ₂	CH ₂ Cl ₂	TA	12 h	dégradation
16 ²¹³	LiBF ₄	CH ₃ CN/H ₂ O 20:1	TA	12 h	aucune réaction
17 ²¹⁴	KF	ether couronne	TA	12 h	légère dégradation / produit de départ
18	TBAF	THF	TA	30 min	dégradation
19 ²¹⁵	TBAF, AcOH	THF	TA	12 h	élimination N ₃ , formation carbonyle
20	TBAF, AcOH	THF	0 °C	12 h	élimination N ₃ , formation carbonyle
21 ²¹⁶	résine HF-pyridine	THF/pyridine 10:1	TA	48 h	légère dégradation / produit de départ
22	résine HF-pyridine	DCM	TA	24 h	légère dégradation / produit de départ
23 ²¹⁷	CuCl ₂ ·2H ₂ O	EtOH 95%	reflux	12 h	dégradation / résidu produit de départ
24	CuCl ₂ ·2H ₂ O	Acetone/H ₂ O	reflux	12 h	dégradation acétone / produit de départ

Tableau 21 : Essais de déprotection du silylé

Une tentative de déprotection de l'hydroxyle sur l'étape précédente (avant introduction de l'azido) a aussi mené au carbonyle non désiré.

²⁰⁶ Corey, E. J.; Ponder, J. W.; Ulrich, P. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 137.

²⁰⁷ Cunico, R. F.; Bedell, L. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4797.

²⁰⁸ Baker, R.; Cummings, W. J.; Hayes, J. F.; Kumar, A. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1986**, 1237.

²⁰⁹ Thomas, E. J.; Williams, A. C. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1987**, 992.

²¹⁰ Kende, A. S.; Liu, K.; Kaldor, I.; Dorey, G.; Koch, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8258.

²¹¹ Kawai, A.; Hara, O.; Hamada, Y.; Shioiri, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6331.

²¹² Riego, J. M.; Sedin, Z.; Zaldivar, J. M.; Marziano, N. C.; Tortato, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 513.

²¹³ Metcalf, B. W.; Burkhart, J. P.; Jund, K. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 35.

²¹⁴ Liotta, C. L.; Harris, H. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2250.

²¹⁵ Smith, A. B.; Ott, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13095.

²¹⁶ Holton, R. A.; Kim, H. B.; Somoza, C.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S. C.; Nadizadeh, H.; Suzuki, Y.; Tao, C. L.; Vu, P.; Tang, S. H.; Zhang, P. S.; Murthi, K. K.; Gentile, L. N.; Liu, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1599.

²¹⁷ Tan, Z. P.; Wang, L.; Wang, J. B. *Chin. Chem. Lett.* **2000**, *11*, 753.

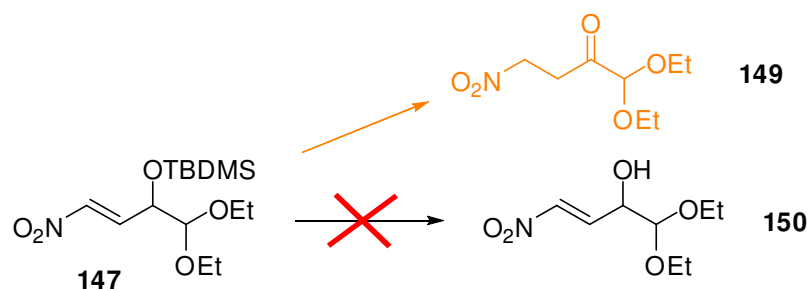


Figure 172 : Déprotection du silylé sur la molécule 147

Devant l'échec de la déprotection du groupement silylé, nous avons tenté l'introduction du groupement azido sur l'alcène **141** (protégé par un acétate), malgré le rendement moyen de 58 % obtenu lors de sa synthèse. Les tentatives de déprotection de l'acétate ont cependant aussi mené à la dégradation du produit. En plus des méthodes de déprotection usuelles en milieu basique (NaOH, K₂CO₃²¹⁸, guanidine²¹⁹), nous avons testé une autre méthodologie, employée dans le cas de composés sensibles aux bases et aux acides. Il s'agit de la déprotection de l'acétate avec du cyanure de potassium comme catalyseur de transesterification en présence d'éthanol 95 %²²⁰. Ce mode opératoire n'a cependant donné aucun résultat dans notre cas (dégradation du composé).

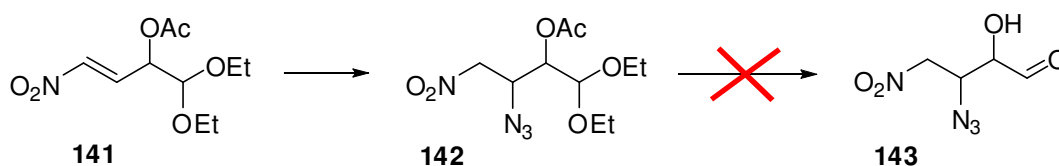


Figure 173 : Essai d'obtention de l'aldéhyde 143

Par manque de temps nous n'avons pas poursuivi dans cette voie et avons conclu que le groupement azido n'était pas un bon choix comme précurseur de la fonction amine.

2. Introduction d'un groupement amino ou amido

Suite à l'échec de l'introduction d'un groupement azido sur les précurseurs des aldéhydes, nous nous sommes intéressés à des groupements amino ou amido. Cette stratégie comporte plus de risques que les substrats ne soient pas ou mal acceptés par l'enzyme, en raison de la polarité de ces fonctions et des liaisons hydrogène possibles pouvant perturber la fixation de l'aldéhyde dans le site actif. De plus le groupement amino est très réactif.

²¹⁸ Plattner, J. J.; Gless, R. D.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8613.

²¹⁹ Kunesch, N.; Miet, C.; Poisson, J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3569.

²²⁰ Herzig, J.; Nudelman, A.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 727.

Les synthèses ont été effectuées à partir de l'alcène **137**. La première étape consiste en l'introduction de la fonction amine au niveau de la double liaison de la molécule. Pour cela, nous avons fait buller à froid de l'ammoniac liquide dans une solution de l'alcène dilué dans du méthanol. Après conversion totale du produit de départ, l'excès d'ammoniac est évacué par de l'argon et le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par lavage acide.

A partir de cet intermédiaire, deux chemins réactionnels ont été suivis. En premier lieu l'acétal a été déprotégé pour donner l'aldéhyde correspondant, qui pourra être testé comme substrat des aldolases. La protection de l'amine sous forme d'acétamide avant déprotection de l'acétal est une autre possibilité. L'acétamide est formé par réaction de l'amine avec de l'anhydride acétique en présence de triéthylamine. Sa purification se fait par chromatographie sur gel de silice.

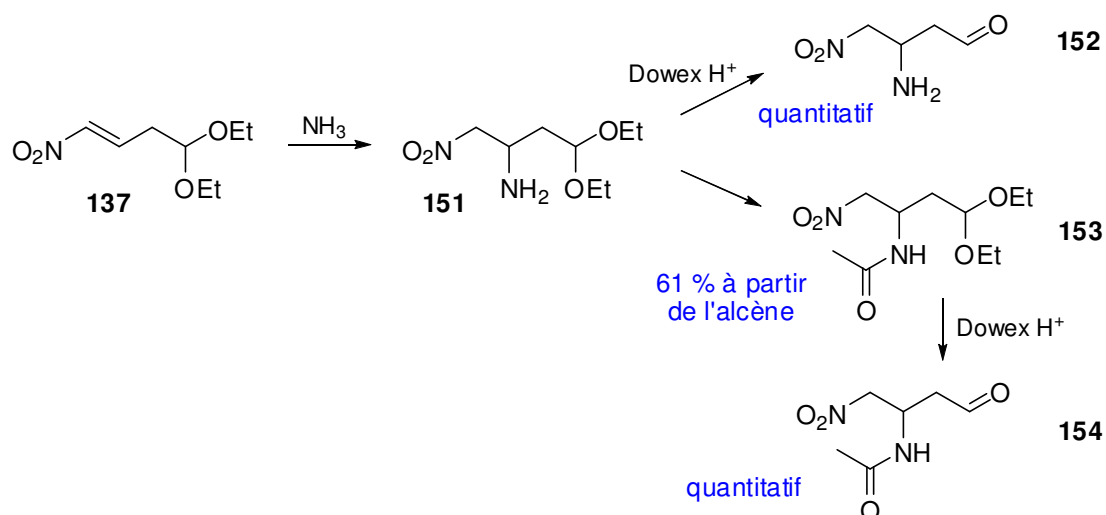


Figure 174 : Accès aux aldéhydes azotés **152** et **154**

L'amine **152** se dégrade rapidement avec le temps et doit être directement utilisée dans la réaction suivante, le couplage enzymatique.

II. Tests de couplage enzymatique des substrats amino et amido

1. Couplage avec la FSA et la FBA

Les couplages enzymatiques des aldéhydes **152** et **154** ont été effectués avec la FSA mutée et la DHA comme donneurs car la procédure est plus simple et moins coûteuse à mettre en place. La détermination des paramètres cinétiques de cet aldéhyde n'a pas été possible puisque c'est un très mauvais substrat. Une procédure de synthèse a quand même été tentée.

Le premier couplage a été lancé avec l'amine **152** et la FSA. Le pH réactionnel est ajusté à pH 7,5. Après 2 heures d'agitation, aucune réaction n'est détectée, de l'enzyme est

alors ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation 17 heures supplémentaires. Une analyse CCM révèle de nombreuses tâches dont la dégradation probable du produit de départ. Une purification par chromatographie sur gel de silice ne nous a pas permis d'isoler un nitrocyclitol aminé en particulier ; la réaction est donc considérée comme un échec. L'utilisation de l'amine **152** instable comme substrat a été abandonnée.

La réaction enzymatique avec l'acétamide **154** a alors été testée. La disparition lente des produits de départ est détectée : une réaction pourrait avoir lieu. Après 24 heures d'agitation, le brut réactionnel est purifié sur gel de silice. Cependant, il reste du réactif de départ et très peu de produit a été isolé. L'échantillon obtenu est un mélange de diastéréoisomères ; l'acétamide **154** n'est donc pas non plus un bon substrat de l'enzyme.

L'utilisation de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase commerciale FBA ne nous a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

De manière à pouvoir accéder à un nitrocyclitol aminé de configuration *2S,3R*, nous avons alors pensé à nous servir des bons résultats obtenus avec les cyclitols hydroxylés modèles pour, par la suite, tenter de les modifier chimiquement. Sachant que la réaction de Henry est réversible et qu'elle pouvait avoir lieu sur les cyclitols polyhydroxylés, nous avons envisagé la suite de réactions suivante :

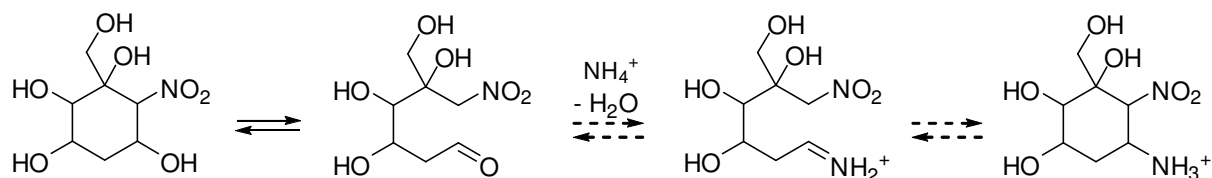


Figure 175 : Mécanisme réactionnel d'introduction d'une amine

C'est pourquoi différentes conditions de réaction en présence de sels d'ammonium ou d'ammoniaque ont été testées. Les essais sont restés sans succès : les analyses CCM et RMN montrent la présence du produit de départ en fin de réaction. Un chauffage au reflux de la solution dégrade le produit. L'utilisation comme réactif d'une amine primaire en milieu acide n'apporte aucun changement.

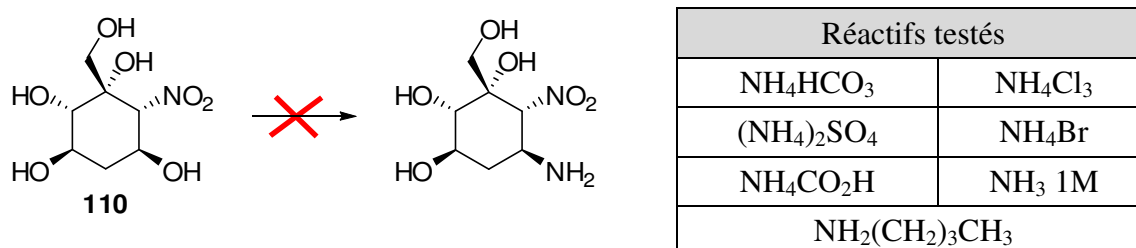


Figure 176 : Essai de modification chimique d'un nitrocyclitol hydroxylé

Une autre stratégie avait été envisagée et concernait l'introduction de l'amine sur les cyclitols après élimination en α du NO_2 . Des essais préliminaires de réactions d'élimination avaient été réalisés par Z. Assaf lors de son master, mais ces tentatives se sont soldées par un échec, sûrement en raison de la position relative des groupements du cycle, non favorable à une *trans*-élimination.

2. Couplage avec la R1PA et la F1PA

2.1. Mesure des K_m

Comme la rhamnulose-1-phosphate aldolase et la fuculose-1-phosphate aldolase sont connues pour être largement tolérantes envers le substrat accepteur, des mesures cinétiques ont été réalisées avec ces deux enzymes et l'acétamide **154**. Une mesure de K_m a été effectuée pour chacune de ces aldolases.

Pour cela nous avons effectué, pour une gamme de concentration en aldéhyde, un suivi cinétique de la disparition du DHAP au cours du temps. Nous avons alors construit une courbe du type $1/[S] = f(1/V)$, $[S]$ étant la concentration en aldéhyde et V la vitesse de disparition de celui-ci. Cette représentation, dite de Lineweaver-Burk nous permet de déterminer graphiquement les valeurs de K_m et V_{max} (Figure 177 et Figure 178).

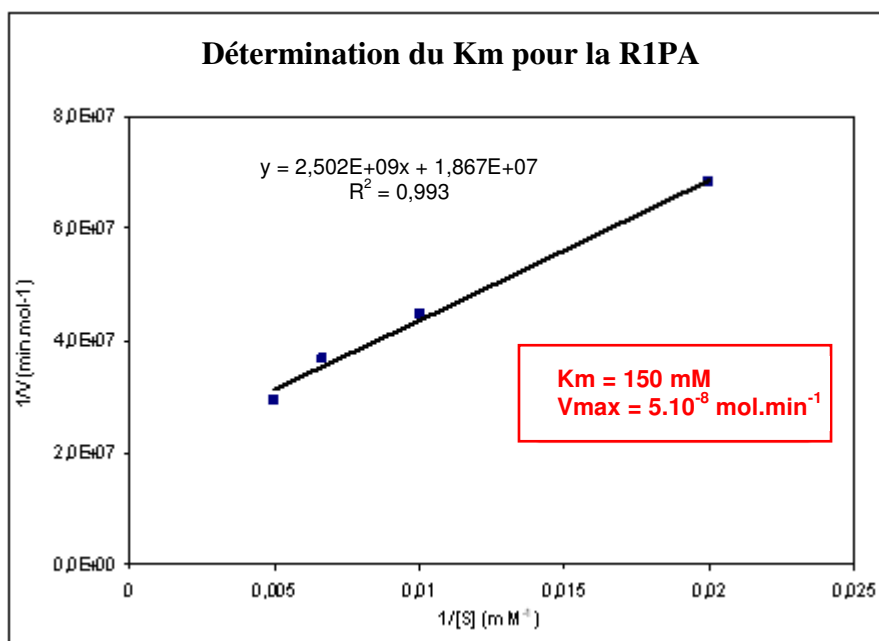


Figure 177 : Détermination du K_m du composé 154 avec la R1PA

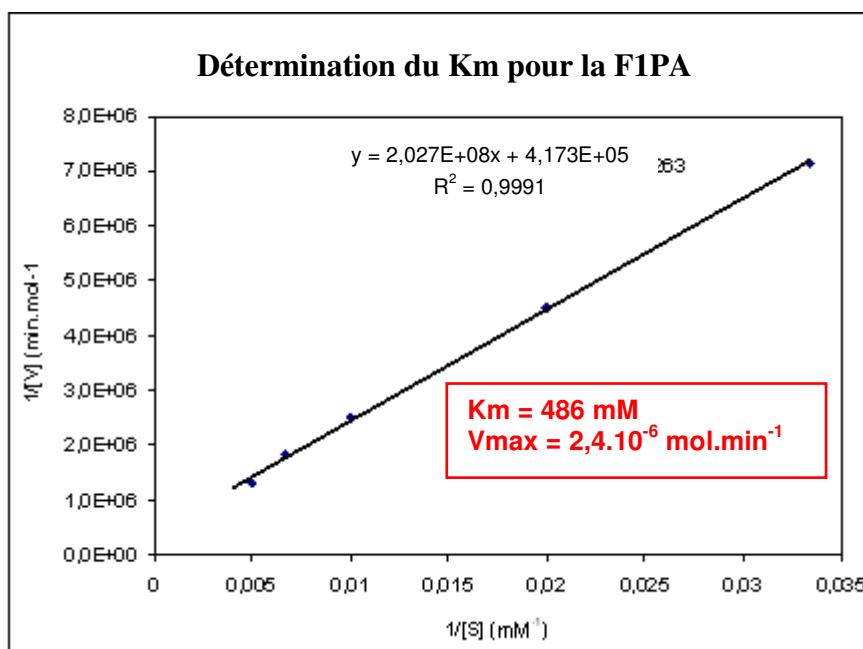


Figure 178 : Détermination du Km du composé 154 avec la F1PA

Les Km obtenus sont relativement élevés, dévoilant une assez mauvaise affinité des enzymes pour ce substrat. Les réactions de couplage peuvent néanmoins être réalisées sur des temps raisonnables si on augmente la quantité d'enzyme dans le milieu réactionnel, ce que nous avons fait (18 U/mmol de substrat). Cela reste acceptable comparé aux quantités d'enzyme mises en jeu pour la FSA.

2.2. Réaction enzymatique et résultats

Deux réactions de couplage entre le DHAP et l'aldéhyde **154** ont été lancées : une catalysée par la R1PA, et l'autre par la F1PA. La méthodologie suivie est celle mise en place lors des travaux avec les substrats modèles hydroxylés. Le donneur est introduit en léger défaut (0,8 éq.) par rapport à l'accepteur (1 éq.). La réaction se déroule dans un tampon phosphate 60 mM à pH 6,9. En fin de réaction, évaluée par dosage au spectrophotomètre, l'ajout de méthanol permet de faire précipiter les enzymes qui seront éliminées par centrifugation. L'évaporation des solvants permet d'aboutir au brut réactionnel. Le ou les produits obtenus sont séparés et purifiés par chromatographie basse pression avant d'être analysés par spectroscopie de RMN.

Les résultats des couplages enzymatiques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

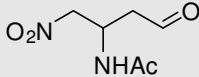
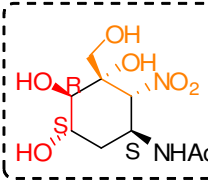
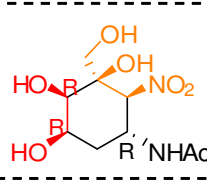
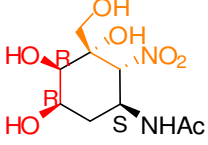
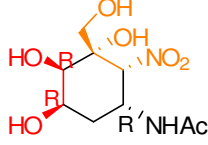
Aldolase (donneur) Stéréochimie attendue	Produits de réaction avec le (1-nitro-4-oxobutan-2-yl)- acétamide 154 
R1PA (DHAP) 2 <i>R</i> -3 <i>S</i>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>155</p> </div> <div style="text-align: center;">ou</div> <div style="text-align: center;">  <p>156</p> </div> </div> <p>Rendement : 28 % 34 % = 62 %</p> <p style="text-align: center;">Proportions : 45/55</p>
F1PA (DHAP) 2 <i>R</i> -3 <i>R</i>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>156</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>157</p> </div> </div> <p>Rendement : 53 % 6 % = 59 %</p> <p style="text-align: center;">Proportions : 90/10</p>

Tableau 22 : Résultats des couplages avec l'acétamide 154

On remarque des rendements moins bons qu'avec les aldéhydes hydroxylés. Ceci illustre bien la moins bonne performance de ces enzymes en présence du groupement NHAc.

Le composé **154** étant sous forme racémique, on s'attend de nouveau à obtenir au minimum deux diastéréoisomères. Expérimentalement, la formation majoritaire de deux nitrocyclitols, que ce soit avec la R1PA ou la F1PA, implique des réactions d'aldolisation et de cyclisation stéréosélectives.

- Dans le cas de la R1PA, nous avons un doute sur la structure de **155**. Deux possibilités pourraient répondre aux spectres de RMN du proton : soit la stéréochimie 2*R*,3*R* est obtenue avec les autres substituants CH₂OH, NO₂ et NHAc en position équatoriale soit la stéréochimie 2*R*,3*S* est obtenue avec dans ce cas, les hydroxyles 2 et 3 en axial et les autres substituants CH₂OH, NO₂ et NHAc en position équatoriale. Par effet NOE on pourrait distinguer entre les deux structures mais pour des raisons de temps, elles n'ont pas pu être réalisées. Si la stéréosélectivité de l'enzyme est exclusivement *R,R* pour les deux produits cela résulterait d'un positionnement différent de l'aldéhyde dans le site actif de la protéine. C'est un résultat qui n'a encore jamais été décrit et qui nous paraîtrait très surprenant. Si c'est l'autre structure qui est correcte, on se trouve face à un autre résultat curieux. En effet, dans ce cas, c'est le stéréoisomère de type « défavorisé » (voir produit **111**) qui serait formé.

Par ailleurs, les proportions similaires de chaque diastéréoisomère nous indiquent que les deux composés sont comparables sur le plan stabilité : un seul hydroxyle est en position axiale dans chaque cas.

- Dans le cas de la F1PA, la présence du NHAc ne change rien au bon comportement de l'aldolase. Elle forme stéréosélectivement les produits de configuration *R,R*.

Initialement, sur les spectres de RMN du brut réactionnel, deux produits **156** et **157** en proportion 56/44 sont observés. Mais après évaporation à 30°C de l'eau du milieu et séparation des deux diastéréoisomères sur gel de silice, ce rapport a changé. On obtient la molécule **156** très majoritairement avec 53 % de rendement alors que la molécule **157** n'est isolée qu'avec un rendement de 6 %. On en déduit qu'un réarrangement s'est produit, et deux hypothèses sont envisageables. Tout d'abord la position axiale initiale du NHAc, ainsi que la nature de ce groupement, peut nous laisser envisager une élimination en α du NO₂ suivie de la réintroduction de l'amide en position équatorial au niveau du C5 du cycle. Il s'agirait ici d'une réaction de retroMichaël. Une autre possibilité est une ouverture du cycle au niveau de la liaison C5-C6, avec passage par un intermédiaire de type imine. Nous sommes dans ce cas en présence d'une réaction de « rétroaza-Henry ». On peut rappeler que lors des essais de modification chimique du nitrocyclitol hydroxylé en position 5, un tel intermédiaire avait été envisagé (voir Figure 175), mais aucune réaction ne s'était produite.

Pour valider notre hypothèse de réouverture du cyclitol, le composé **157** a été remis en solution dans l'eau à 50°C pendant une nuit. Cette manipulation nous a permis d'obtenir le composé **156**, plus stable, de manière quantitative.

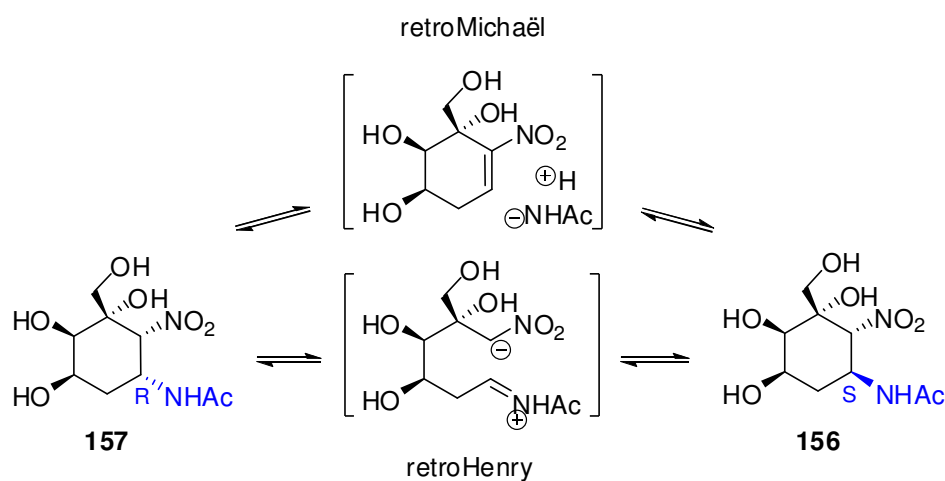


Figure 179 : Possibilités de passage du composé **157** à **156**

De façon très remarquable, c'est la première fois qu'un enchaînement *CH₂OH équatorial en C1 / NO₂ équatorial en C6 / NHAc axial en C5* est observé. En effet, pour l'ensemble des nitrocyclitols hydroxylés en C5 obtenus, nous avons tous ces groupements en position équatoriale. Le diastéréoisomère **157** a donc une configuration en C5 très défavorable puisque le groupement NHAc est en position axiale. En présence du groupement hydroxyle, nous avons conclu que la fermeture de cycle par la réaction de Henry intramoléculaire était dépendante de la configuration en C5 de l'hydroxyle. Nous pouvons maintenant ajouter qu'elle est dépendante de la nature du substituant porté en C5 par le cycle.

Pour plus de clarté, les représentations en conformation chaise des composés **155**, **156** et **157** sont données ci-dessous. En rouge sont marqués les groupements axiaux défavorables, et en violet est mise en évidence la configuration relative de l'enchaînement C1-C6-C5.

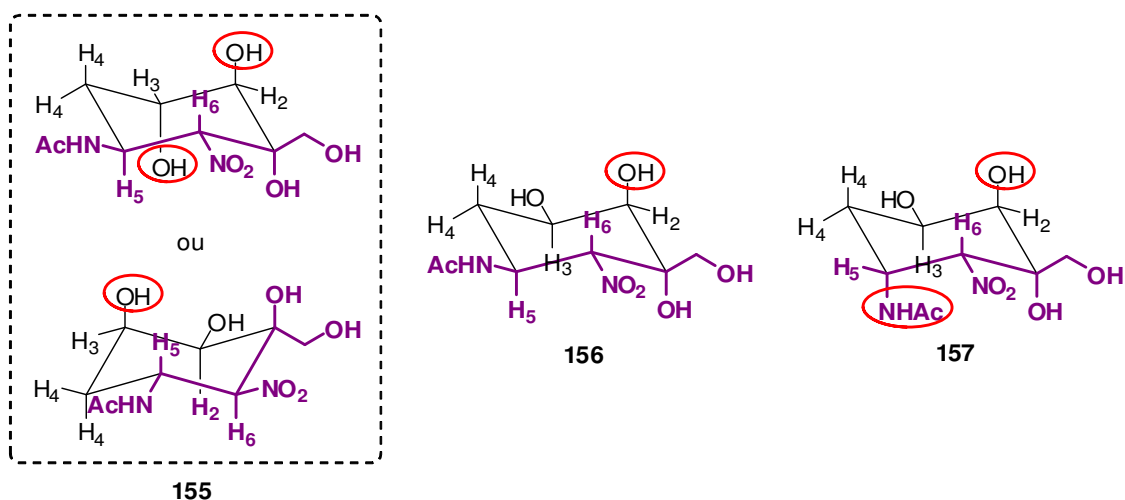


Figure 180 : Représentation dans l'espace des composés 155, 156 et 157

Il est important de noter que les expériences de RMN NOE n'ont pas été faites sur ces composés, et que la configuration des groupements en C1 a été extrapolée à partir des résultats précédemment obtenus avec les nitrocyclitols hydroxylés. Cette expérience devra être réalisée pour confirmer nos structures.

Cette réaction est très intéressante car à partir d'un substrat racémique on peut obtenir un seul ou deux nitrocyclitols diazotés, de configuration définie pour cinq carbones du cycle.

3. Obtention d'aminocyclitols

3.1. Déprotection de l'amine en position 5

Nous avons cherché une méthode de désacylation adaptée à ces cyclitols. Il est surtout important de réussir cette déprotection sans épimérisation au niveau des carbones du cycle dont la stéréochimie a été définie lors des étapes précédentes. Une réaction enzymatique nous paraît comme la plus appropriée.

On trouve dans la littérature des méthodes d'hydrolyse de fonctions amides par l'action d'enzyme hydrolytiques comme les protéases, les acylases, etc... Cependant, ces méthodes sont généralement utilisées pour réaliser le dédoublement d'un mélange racémique. Dans notre cas, nous voulons que les composés optiquement purs **155** et **156** soient simplement substrats d'enzymes hydrolytiques sans intervention de l'aspect stéréochimique. De cette manière, l'hydrolase mise en réaction avec chacun de ces composés catalyserait la conversion de la fonction amide en amine primaire. On espère ainsi obtenir les composés **158** et **159** optiquement pur.

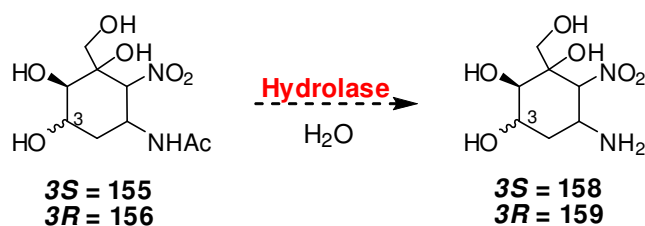


Figure 181 : Hydrolyse de la fonction amide envisagée en position 5 du cycle

Nous avons réalisé des essais avec cinq enzymes différentes, disponibles au laboratoire. Il était important de tester les réactions sur les deux composés amide, même s'ils sont isomères, car leur stéréochimie différente pourrait entrer en jeu lors de l'hydrolyse.

Les cinq enzymes testées sont rapidement présentées dans le paragraphe suivant.

1. La pénicilline amidase catalyse l'hydrolyse de la fonction amide de la pénicilline, son substrat naturel. Elle permet d'hydrolyser la fonction amide linéaire de nombreux autres substrats. En synthèse, cette enzyme est utilisée pour le dédoublement d'amine primaire²²¹.

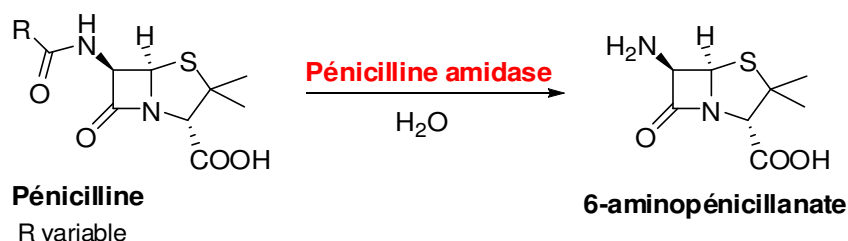


Figure 182 : Réaction naturelle catalysée par la pénicilline amidase

2. La papaïne est une enzyme qui accepte une large gamme de substrats. Elle a comme propriété de fragmenter les protéines par hydrolyse de la liaison peptidique. Elle peut aussi être utilisée dans le sens de la synthèse d'amides de stéréochimie définie (exemple donné Figure 183)²²².

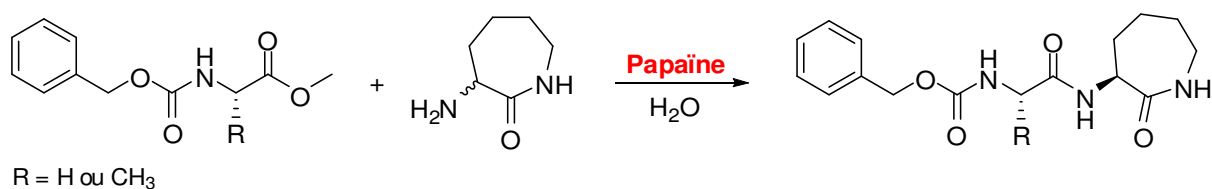


Figure 183 : Exemple de synthèse d'un amide de type caprolactame par la papaïne

²²¹ (a) Ismail, H.; Lau, R. M.; van Langen, L. M.; van Rantwijk, F.; Svedas, V. K.; Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2008**, *10*, 415. (b) Guranda, D. T.; Khimiuk, A. I.; van Langen, L. M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.; Svedas, V. K. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 2901.

²²² Lang, A.; Kuhl, P. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3779.

3. La chymopapaïne est une enzyme protéolytique de la même famille que la papaïne²²³ (même mécanisme catalytique) et issue du même végétal, le papayer. A elles deux, ces enzymes offrent des possibilités d'hydrolyse pour un très grand nombre de substrats de structure différente.

4. L'hydantoïnase catalyse l'ouverture du cycle de l'hydantoïne, par hydrolyse d'une des deux liaisons peptidiques de ce composé. Cette enzyme est utilisée industriellement pour la synthèse de D-4-hydroxyphenylglycine (D-HPG), un intermédiaire clé de plusieurs antibiotiques²²⁴.

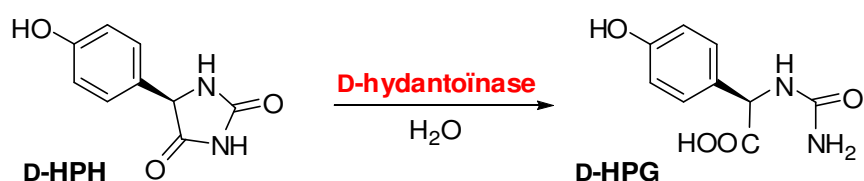


Figure 184 : Synthèse enzymatique de la D-HPG à partir de la D-HPH

5. L'acylase I est une enzyme qui permet d'hydrolyser l'amide terminal de différents types de substrat. En 2001, Baxter *and al.* ont ainsi publié l'hydrolyse de la N-acétyl-L-glutamine par cette acylase²²⁵.

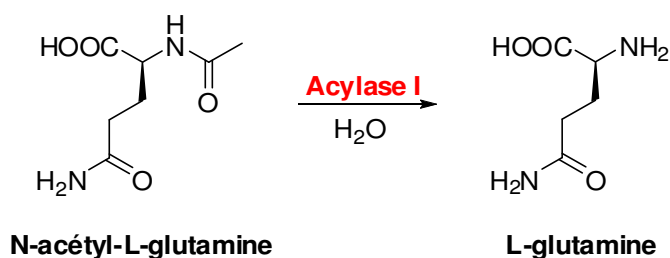


Figure 185 : Hydrolyse de la N-acétyl-L-glutamine par l'acylase I

Chacune de ces enzymes atteint son activité optimale dans des conditions de température et de pH bien particulières, répertoriées dans le Tableau 23. Les essais que nous avons menés ont été réalisés avec une concentration en substrat fixe de 50 mM, dans un tampon phosphate de même concentration, et en présence de 1U/μmol de catalyseur. L'apparition des amines **158** et **159** désirées est suivie par CCM après révélation à la ninhydrine. Ce révélateur réagit avec les amines primaires générant une coloration pourpre et avec les amines secondaires une coloration jaune.

²²³ Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. In *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*; Academic Press Inc: San Diego, **1994**, 244, 461.

²²⁴ Schulze, B.; Wubbolts, M. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 609.

²²⁵ Baxter, J.; Kim, Y.; Snowden, M. J. *J. Food Sci.* **2001**, 66, 1428.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau qui suit :

Enzyme	T°C	pH	Substrat	Résultats		
				Après 2 h	Après 18 h	Après 48 h
Pénicilline amidase	37°C	7,6	155	∅	+	+
			156			
Acydase I	25°C	7,0	155	∅	∅	∅
			156			
Hydantoïnase	40°C	9,0	155	∅	+	+
			156			
Papaïne	25°C	6,2	155	+	++	+++
			156			
Chymopapaïne	25°C	6,2	155	∅	+	+
			156			

∅ : pas de réaction, + : faible réaction, ++ : forte réaction, +++ : réaction totale

Tableau 23 : Résultats des tests de désacylation enzymatique

D'après ces résultats, on remarque que les deux substrats testés présentent le même comportement vis-à-vis de ces enzymes. Parmi elles, l'acydase I n'accepte pas nos composés comme substrat et aucune réaction n'est donc détectée lors de son emploi comme catalyseur.

Pour les quatre autres enzymes, leur utilisation permet la formation d'une amine primaire mais après des temps de réaction plus ou moins long. Ainsi la papaïne est très efficace pour désacyler les composés **155** et **156**, et la présence d'une amine primaire dans le milieu est déjà décelée après seulement deux heures de réaction. Les réactions sont laissées sous agitation 48 heures ; la déprotection de l'amine par la papaïne est alors totale. C'est donc cette enzyme que nous avons sélectionné pour nos réactions d'hydrolyse de l'amide en position 5.

La papaïne est une enzyme de la famille des cystéine-protéases. Elles ont en commun un mécanisme catalytique impliquant un résidu cystéine. Pour ce type d'enzyme, la première étape de la réaction catalytique est la déprotonation du thiol de la cystéine. Ce proton est capté par un acide aminé adjacent ayant une chaîne latérale basique, habituellement une histidine. Dans le cas de la papaïne, les résidus impliqués sont la Cys25 et l'His159.

L'étape suivante est une attaque nucléophile du soufre de la cystéine déprotonée sur un carbone du substrat de l'enzyme. Un fragment du substrat est alors relargué sous forme d'amine primaire, alors que le résidu histidine de l'enzyme revient sous sa forme déprotonée. Un thioester intermédiaire est formé, liant la cystéine du site actif au reste du substrat. La liaison thioester est ensuite hydrolysée, relarguant le reste du substrat sous forme d'acide carboxylique, et libérant la cystéine sous sa forme initiale.

Ce mécanisme est illustré Figure 186 dans le cas de l'hydrolyse d'un acétamide. Il s'applique à l'hydrolyse de nos substrats par la papaïne en considérant le groupement R comme un nitrocyclitol.

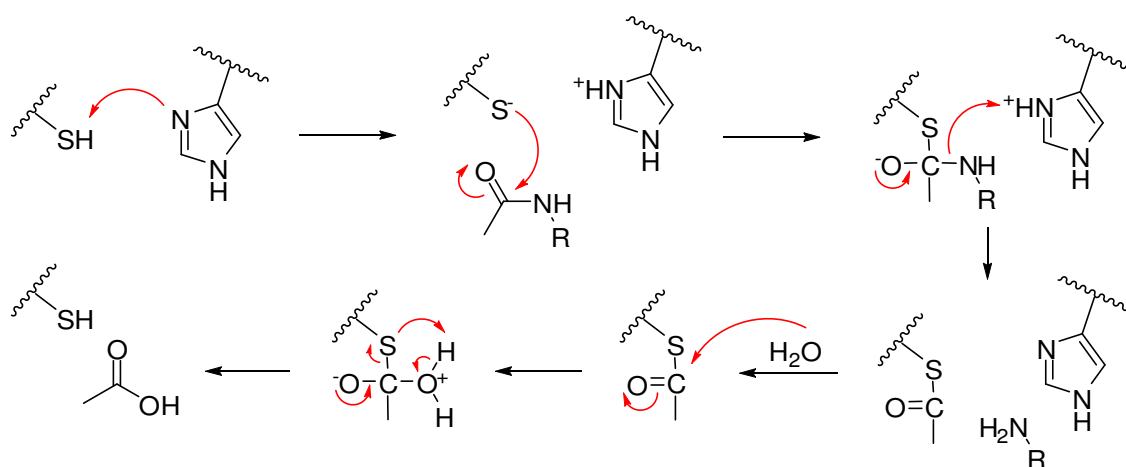


Figure 186 : Mécanisme catalytique d'hydrolyse d'un acétamide par la papaïne

L'hydrolyse des composés **155** et **156** a par la suite été lancée sur plus grosse quantité, de manière à pouvoir effectuer toutes les analyses nécessaires à la caractérisation des produits formés.

Après conversion totale du produit de départ, l'ajout de méthanol au milieu permet de faire précipiter l'enzyme qui sera écartée par centrifugation. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié sur gel de silice greffée amino. Un seul produit de réaction est isolé pour chaque type de substrat hydrolysé. Les analyses par RMN de ces composés nous ont confirmé l'obtention des molécules **158** et **159** à partir de leur précurseur respectif **155** et **156** (Figure 187).

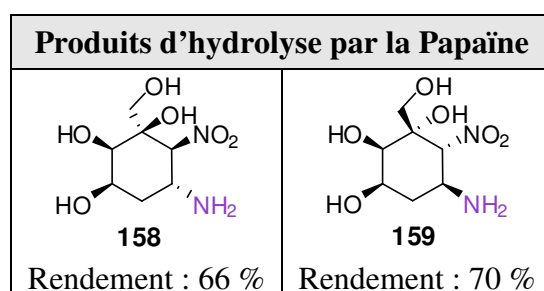


Figure 187 : Résultats d'hydrolyse des composés **155** et **156**

3.2. Réduction du groupement nitro en position 6

Une amine en position 6 du cycle est aussi facilement accessible par réduction du groupement nitro. Elle permettrait d'effectuer tout un ensemble de couplages peptidiques à

l'origine de nombreux composés. Le mode opératoire a été mis au point sur les nitrocyclitols **100** et **101**. Lors de précédents travaux au laboratoire, cette réaction était effectuée avec de l'oxyde de platine sous pression d'hydrogène. Ces conditions étant lourdes et coûteuses à mettre en place, nous avons cherché un nouveau protocole de réduction. Nous avons sélectionné les conditions développées par Chakraborty *et al.* qui utilise du formiate d'ammonium et du palladium sur charbon en milieu alcoolique²²⁶. Après une heure de reflux, la réaction est terminée. Le produit est obtenu avec un rendement de 91 % sans purification nécessaire (Figure 188).

Ainsi, nous disposons d'une méthode très simple à mettre en œuvre, qui devrait être généralisable à l'ensemble des nitrocyclitols. Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu mettre en place ce dernier point.

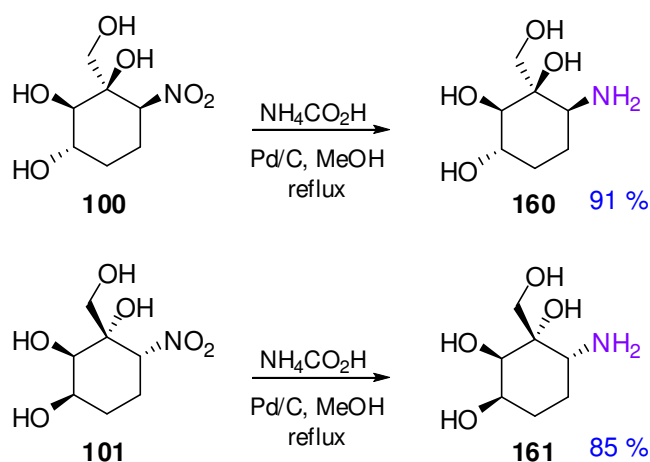


Figure 188 : Réduction du groupement nitro des molécules 100 et 101

III. Mise en place des tests d'inhibition automatisés

L'objectif de nos travaux de synthèse est d'aboutir à des composés de type aminocyclitols, identifiés comme des inhibiteurs potentiels de glycosidases lysosomales. Cette propriété pourrait permettre leur utilisation comme outils thérapeutiques dans le traitement de maladies lysosomales.

Dans ce contexte, l'étude des paramètres cinétiques de nos molécules en présence de glycosidases est particulièrement importante. Or ces études, réalisées dans notre laboratoire à l'aide d'un spectrophotomètre, nécessitent de répéter des opérations de pipetage et de mesures de densité optique un grand nombre de fois ; en conséquence le travail manuel est, en plus de son aspect fastidieux, une source importante de variabilité.

²²⁶ Chakraborty, C.; Vyavahare, V. P.; Puranik, V. G.; Dhavale, D. D. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9574.

Il était donc important de posséder des méthodes d'expérimentations automatisées et efficaces permettant d'obtenir des résultats plus précis en un minimum de temps. Pour cela, le laboratoire SEESIB s'est équipé d'un robot pipeteur. Par ailleurs, les volumes manipulés par cet appareil (plaques de 96 puits) étant très faibles, une économie réelle en réactifs peut être réalisée.

La mise en place du programme de mesure des K_i par un robot pipeteur a été effectuée par E. Gleizes lors de son stage de 2^{ème} année d'ingénieur au sein de notre équipe. Cette méthodologie, ainsi que la présentation du robot, est détaillée dans la partie expérimentale.

La voie de synthèse d'aminocyclitols nous permet d'accéder à des composés présentant un ensemble de stéréochimies différentes. Il est donc important de les tester sur plusieurs types de glycosidases qu'ils pourraient potentiellement inhiber. Lorsque seule une fonction amine est présente en position 6 du cycle, il a déjà été montré que ce type d'aminocyclitols ne représente pas une bonne famille d'inhibiteur^{227,228}. C'est normal puisque la position en 6 différencie nettement ces molécules des inhibiteurs décrits comme la valioline et ses analogues naturels. Les composés **160** et **161**, qui rentrent dans cette catégorie, ne seront donc ici testés qu'à titre méthodologique. Ils nous permettront de valider le programme de mesure de K_i mis au point sur le robot TECAN[®]. Dans le cas d'une amine en position 5 du cycle, on espère accéder à de meilleurs inhibiteurs, d'où le projet de mettre en place tout une bibliothèque de molécules de cette famille à tester.

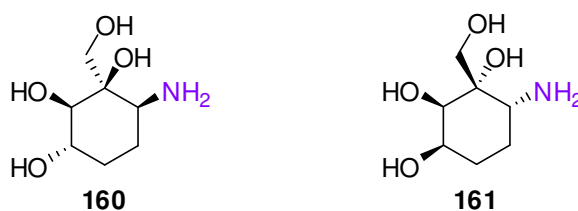


Figure 189 : Aminocyclitols testés comme inhibiteur

Les cinq enzymes testées sont des enzymes commerciales. Il s'agit de l' α -glucosidase de levure de boulanger, de la β -glucosidase d'amandes, de l' α -galactosidase de grains de café vert, de la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* et de l' α -mannosidase de pois sabre.

Les pourcentages d'activité restante (AR) calculés dans chaque cas sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

²²⁷ Gravier-Pelletier, C. ; Maton, W. ; Dintiger, T. ; Tellier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8705-8720.

²²⁸ Mehta, G. ; Lakshminath, S. ; Talukdar, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 335-338.

Enzyme	Km (mM)	%AR 160	%AR 161
α -gal (1mM)	0,36	86,9	84,9
α -glu (1mM)	0,28	94,3	95,9
β -gal (1mM)	3,16	92,9	95,6
β -glu (1mM)	5,04	56,5	77,5
α -man (1mM)	0,65	81,2	91,7

Tableau 24 : Obtentions des %AR pour les composés 160 et 161

En bleu sont indiqués les pourcentages d'activité correspondant à un K_i compris entre 1 et 3 mM. En jaune est souligné l'unique cas d'un K_i inférieur à 1 mM. On obtient :

- ✓ α -galactosidase/composé **160** : $K_i = 2,8$ mM
- ✓ β -glucosidase/composé **161** : $K_i = 1,7$ mM
- ✓ β -glucosidase/composé **160** : $K_i = 0,65$ mM
- ✓ α -mannosidase/composé **161** : $K_i = 2,1$ mM

Les deux molécules testées ne présentent pas de bons résultats d'inhibition sur les glycosidases testées, mais l'on retrouve une certaine spécificité vis-à-vis des différents types de glycosidase. Cette spécificité est due à la stéréochimie contrôlée des aminocyclitols. Elle sera renforcée pour les composés portant des groupements de stéréochimie définis sur chaque carbone du cycle.

De meilleures inhibitions devraient être obtenues pour la famille de composés portant un NH_2 en position 5 du cycle (molécule **158** et **159**). Par manque de temps nous n'avons pas pu tester ces cyclitols. Maintenant qu'une méthode automatisée nous permet de calculer les constantes cinétiques d'un inhibiteur, il serait judicieux d'attendre d'obtenir plusieurs composés de cette famille (les dérivés N-Alkylés) pour lancer une série de tests.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail était orienté principalement sur la mise en place d'une méthodologie efficace de synthèse de différentes familles d'aminocyclitols de stéréochimie définie.

Nous avons atteint la majorité de nos objectifs grâce à l'utilisation de différentes enzymes, et le bilan du travail effectué est le suivant :

✓ Une synthèse chimioenzymatique efficace des substrats aldéhydiques, précurseurs de nitrocyclitols, a été mise au point. La synthèse de nitroaldéhydes α et/ou β hydroxylés a ainsi été modifiée et optimisée par rapport à celle développée auparavant. Peu d'intermédiaires réactionnels ont nécessité une purification, ce qui est notamment très appréciable en gain de temps, de rendement, de coût, et en considération du principe de chimie verte de minimisation des déchets (silice, solvants).

Nous avons réalisé ces synthèses en version racémique puis énantiopure, en dédoublant efficacement un intermédiaire grâce à une lipase commerciale recyclable. L'hydroxyle en α du carbonyle a ainsi pu être obtenu avec des excès énantiomériques excellents pour les deux configurations.

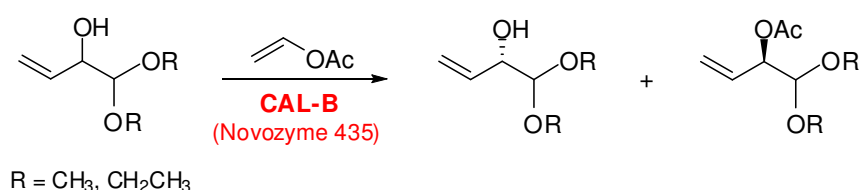


Figure 190 : Dédoublage cinétique d'un intermédiaire réactionnel clé

La synthèse d'un aldéhyde porteur d'un groupement azoté en α du NO₂ a aussi été réalisée en peu d'étapes.

✓ En parallèle de la synthèse des accepteurs, nous avons également mis en place un procédé enzymatique de synthèse du DHAP, donneur indispensable pour certaines aldolases. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Eduardo Garcia-Junceda à Madrid. Une kinase, la DHAK, est exploitée pour sa capacité à phosphoryler directement la DHA commerciale de façon efficace et en un seul pot. La production et la purification de cette DHAK sont maintenant opérationnelles au sein de notre laboratoire.

Cette synthèse est sûrement l'une des plus fortes améliorations apportée à la méthodologie. Par ailleurs, elle est maintenant éprouvée à l'échelle préparative aussi bien sur le plan de la production de l'enzyme que celle du DHAP.

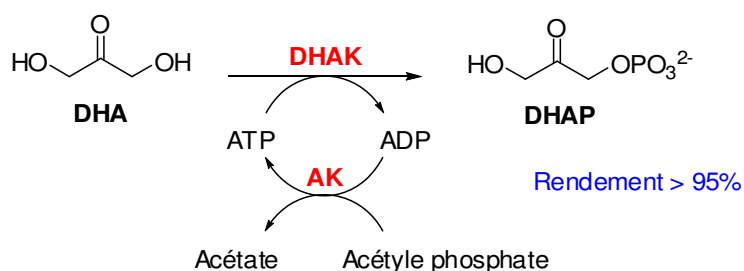


Figure 191 : Synthèse enzymatique du DHAP

✓ La formation d'une quarantaine de nitrocyclitols de stéréochimies définies a été réalisée *via* différentes aldolases avec de bons rendements.

Deux aldolases DHAP-dépendantes ont été employées. Non commerciales, elles ont été produites et purifiées pour la première fois au sein de notre équipe. La synthèse des nitrocyclitols avec ces aldolases se déroule en quatre étapes et un seul pot : formation du DHAP, réaction domino d'aldolisation et de Henry et enfin désphosphorylation.

De manière à obtenir une troisième configuration en position 2 et 3 du cycle, une nouvelle aldolase, la FSA, a également été testée. Elle présente l'avantage d'accepter deux donneurs non phosphorylés commerciaux : la DHA et l'HA. La formation des nitrocyclitols se fait donc simplement selon deux réactions, l'aldolisation et la cyclisation de l'aldol.

Cette méthodologie est performante car elle donne accès à des molécules polyfonctionnelles et énantiomériquement pures en s'affranchissant d'étapes lourdes de protection-déprotection rencontrées habituellement dans les synthèses totales. Ainsi nous avons notamment obtenu deux familles d'aminocyclitols porteur d'un groupement amine en position 5 du cycle, mimant précisément celui des composés modèles. Une amélioration de la réduction du groupement amino en position 6 du cycle a également été réalisée.

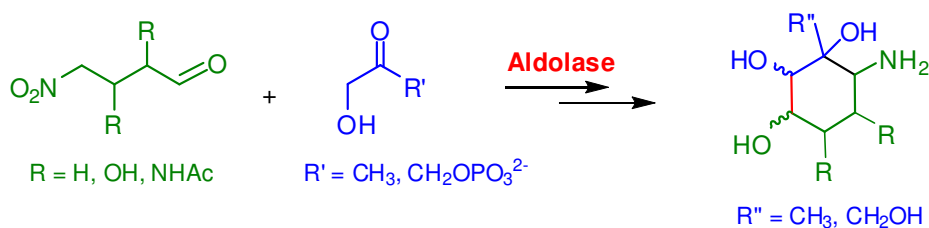


Figure 192 : Méthodologie de synthèse d'aminocyclitols *via* des aldolases

Au cours de ces synthèses, nous avons également été amenés à étudier la stéréosélectivité de ces enzymes et d'explorer les potentialités de la cyclisation intramoléculaire. Les aldolases ont permis la formation stéréosélective d'une liaison C-C, de telle sorte que seuls deux diastéréoisomères ont été obtenus pour la plupart de nos réactions (hors utilisation de HA). La stéréochimie en C2-C3 reste cependant à étudier au cas par cas. La réaction de Henry a aussi permis la formation d'une liaison C-C de manière

hautement stéréosélective, mis à part dans le cas de HA comme donneur. La configuration obtenue au niveau de ces deux carbones dépend de la configuration et de la nature des substituants en position 5 du cycle.

Beaucoup de pistes restent à explorer et quelques perspectives sont présentées ci-dessous.

Tout d'abord, de nouveaux précurseurs aldéhydiques pourraient être synthétisés, en s'appuyant sur la nouvelle voie de synthèse des aldéhydes hydroxylés mise en place. Il serait ainsi possible d'accéder à d'autres familles d'aminocyclitols, toujours dans l'optique de cibler des maladies lysosomales différentes.

Pour cela, la synthèse d'un aldéhyde porteur d'un groupement NHAc en α du NO_2 et d'un hydroxyle en β semble la plus prometteuse. Cet accepteur serait testé sur la RIPA et la FIPA, lesquelles ont montré une tolérance vis-à-vis du groupement amine protégé.

L'introduction de deux groupements azotés sur les positions 2 et 3 des aldéhydes accepteurs est peut être aussi envisageable. Dans ce cas, les glycosidases lysosomales ciblées sont des hexoaminidases, impliquées par exemple dans la maladie de Sandhoff.

Les perspectives de synthèse de nouveaux substrats accepteurs sont résumées dans la figure qui suit :

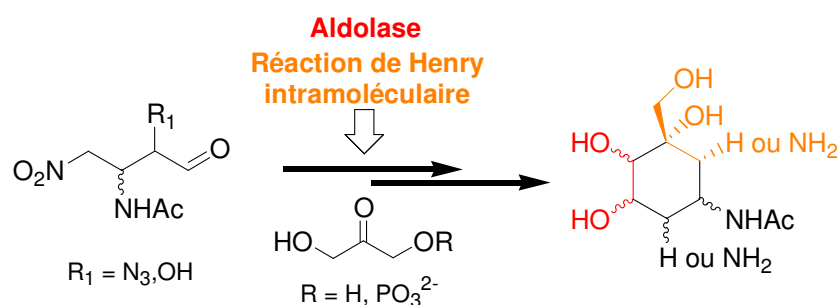


Figure 193 : Synthèse de nouveaux aminocyclitols

Les bons résultats obtenus avec des aldolases, kinases et lipase comme catalyseurs tout au long de ce travail et les nombreux avantages qu'elles présentent ouvrent la voie à d'autres réactions biocatalysées. Il serait envisageable d'effectuer l'introduction du groupement NO_2 sur nos substrats aldéhydiques de manière asymétrique par catalyse enzymatique. En effet, trois groupes ont récemment découvert des activités catalytiques non naturelles pour une hydroxynitrile lyase²²⁹, une transglutaminase²³⁰ et une aminoacylase²³¹. Le mode d'action de ces enzymes serait donc intéressant à étudier plus en détail pour une utilisation potentielle lors des synthèses des accepteurs.

²²⁹ Gruber-Khadjawi, M.; Purkarthofer, T.; Skranc, W.; Griengl, H. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1445.

²³⁰ Tang, R. C.; Guan, Z.; He, Y. H.; Zhu, W. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2010**, *63*, 62.

²³¹ Wang, J. L.; Li, X.; Xie, H. Y.; Liu, B. K.; Lin, X. F. *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 240.

Nous avons pu observer les limites d'utilisation de la FSA qui n'accepte pas les nitroaldéhydes porteurs d'un groupement NHAc en α du NO_2 . Pour bénéficier de la stéréosélectivité de cette protéine, un groupement moins volumineux comme NHCHO pourrait être testé. D'après la littérature, le groupement N_3 en α du carbonyle est aussi toléré par la FSA, et nous pourrions donc continuer nos investigations d'introduction de ce groupement sur les substrats. Une autre possibilité serait de créer des mutants de cette protéine plus tolérants vis-à-vis de l'accepteur.

Par ailleurs, ce travail ouvre la perspective de générer un grand nombre de composés, en quelque sorte des "bibliothèques" de produits, que l'on pourrait ensuite tester. Pour cela, il suffirait d'exploiter la fonction amine que la méthodologie de synthèse permet de positionner sur le C-6 du cycle. Par couplage peptidique avec différents acides carboxyliques, nous pourrions obtenir un grand nombre de composés à évaluer. Le robot pipeteur automatisé du laboratoire faciliterait la mise en place de ce projet. Il permettrait aussi d'effectuer rapidement les tests d'inhibition des nouvelles molécules en plaque de 96 puits. Cela aboutirait à un premier criblage des aminocyclitols d'intérêt potentiel. Les meilleurs inhibiteurs pourraient être envoyés à des laboratoires qui disposent des outils adaptés pour évaluer les « propriétés chaperonnes » sur des glycosidases lysosomales (Y. Suzuki, Japon ; D. Mahuran, Canada).

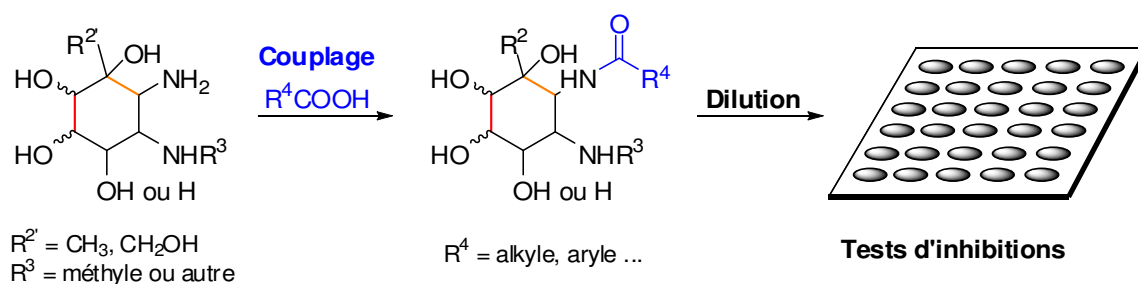


Figure 194 : Projet de création d'une bibliothèque de molécules à tester

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chap 1 : Production et purification des protéines

I. Généralités

1. Outils de production et de purification des protéines

Les cellules souches d'*Escherichia coli* contenant les plasmides codant pour la F1PA, la R1PA et la DHAK nous ont été données par l'équipe du Dr. Garcia-Junceda. L'équipe du Pr. Sprenger nous a fourni quant à elle les deux plasmides codant pour la FSA et la FSA mutée, clonés dans *E. coli*.

Les enzymes α -GPDH, TPI, AK et RAMA ont été achetées chez Sigma-Aldrich, ainsi que les antibiotiques Ampicilline et Kanamycine. L'IPTG a été acquis auprès d'Alexis Biochemicals. Les composants des milieux de culture ont été commandés auprès de Pronadisa.

Les cultures cellulaires ont été incubées dans un **agitateur orbitalaire thermostaté Infors AG AJ118**, cassées par un **sonicateur Sonopuls** de Bandelin, et centrifugées par un appareil *Aventi® J-26 XP Centrifuge* de Beckman Coulter. Le **lyophilisateur** employé est un *RP 2V* du concepteur et fabricant Serail.

La purification des protéines s'est faite selon deux protocoles :

- Sur **colonne d'exclusion Hilo**ad 26/60 *Superdex 75 et 200 pg*, contrôlée par un système *AKTA-FPLC* de GE Healthcare Life Science.
- Sur colonne chromatographique en verre ($\varnothing = 1,6$ cm) de GE Healthcare, remplie manuellement de résine **IMAC Sepharose 6 Fast Flow** (résine agarose) et chargée en ions Ni^{2+} (capacité d'environ 40 mg de protéine His-tagagée par mL de résine).

2. Techniques d'analyse

Le réactif de Bradford a été acquis auprès de Bio-Rad, et l'ensemble des réactifs nécessaires à un gel SDS-PAGE ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les gels d'acrylamide ont été effectués avec un système d'**électrophorèse** verticale modèle *MGV 100* de chez CBS Scientific.

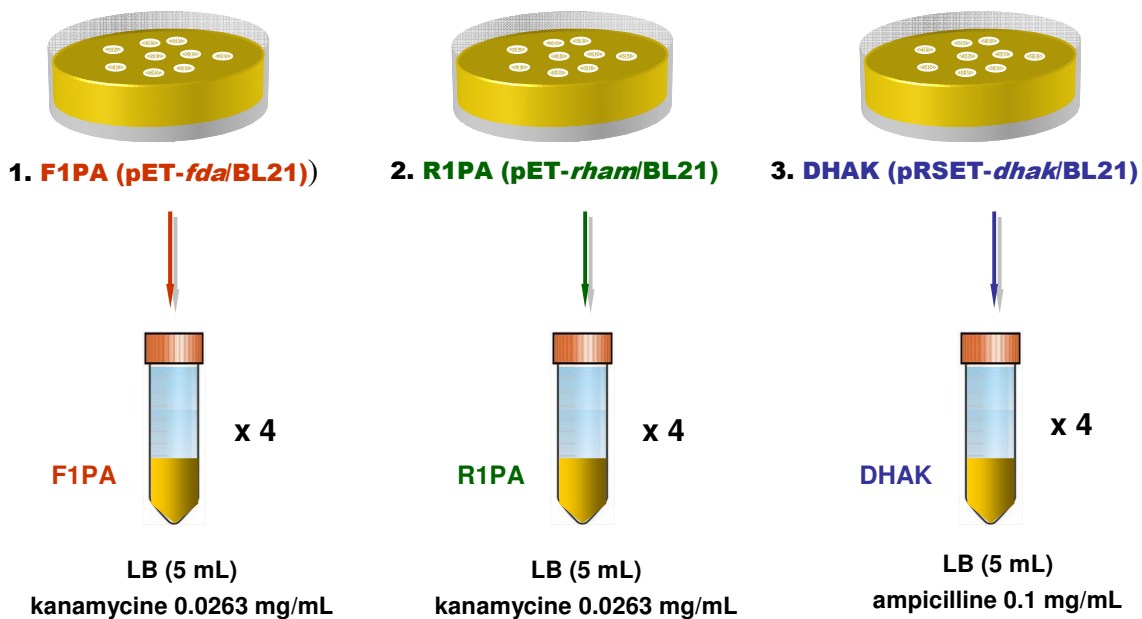
Les mesures d'activité et le suivi cinétique des réactions enzymatiques ont été réalisés sur un **spectrophotomètre Lambda 25** de chez Perkin Elmer à 340 nm, dans des cuves en polystyrène. L'ATP, le NADH et l'acétyl phosphate ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

II. Production et purification de la F1PA, R1PA et DHAK

1. Production des protéines recombinantes

Le mode opératoire général suivi pour la production de la F1PA, la R1PA et la DHAK est identique pour chaque cas, et ne sera donc présenté qu'une seule fois. Avant toute manipulation, la hotte utilisée est stérilisée à l'UV durant 30 min (destruction de l'ADN des bactéries)

- 1- Les souches d'*E. coli* BL21(DE3) contenant le gène des protéines d'intérêt ont été réceptionnées dans des boîtes de pétri où elles ont pu croître sur un milieu Luria-Bertani LB (extrait de levure 5 g/L, tryptone 10 g/L and NaCl 10 g/L), d'agar bactériologique (15 g/L) et de l'antibiotique de sélection approprié (**ampicilline** 0,1 mg/mL pour la DHAK et **kanamycine** 0,0263 mg/mL pour la F1PA et la R1PA).
- 2- A partir d'une colonie, les cellules sont mises à croître à 37°C dans 4 tubes stériles contenant 5 mL de LB et l'antibiotique de sélection.



- 3- Après stérilisation de deux fioles contenant 1 L de milieu LB (120°C, 1 kg/cm², 40 min), l'antibiotique de sélection est ajouté dans les mêmes proportions que précédemment. Ces deux fioles sontensemencées avec les précultures précédentes au 1/50^{ème} et laissées incuber sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre, après environ 3 h, une DO de 0,5 à 600 nm (fin de la phase exponentielle de croissance des bactéries, avant le début de la phase stationnaire).
- 4- A la culture est ajouté le volume de solution d'IPTG (0,5 M) nécessaire pour induire l'expression de la protéine, puis le mélange est laissé agiter de nouveau une nuit à 30°C.

Protéine	Volume de solution d'IPTG pour 1 L de LB	Concentration finale en antibiotique
DHAK	2 mL	1 M
Aldolases (F1PA - R1PA)	1 mL	0,5 M

2. Préparation d'un extrait cellulaire soluble (CFE) à partir d'une culture

- 1- Les cultures sont centrifugées à 8 000 rpm pendant 15 min à 4°C et le surnageant est éliminé. Les cellules sont lavées par ajout de tampon Tris 50 mM pH 8 et re-centrifugées. Elles sont alors suspendues dans environ 8 mL de tampon par gramme de cellule.
- 2- Les cellules en solution sont cassées par sonication à 4°C (bain de glace) selon le programme suivant :
 - 8 s d'ultra-sons alternés par 15 s de repos pendant 15 min
 - Pause de 10 min
 - 8 s d'ultra-sons alternés par 15 s de repos pendant 5 min
- 3- La suspension est centrifugée à 12 000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré (extrait cellulaire soluble CFE) et conservé à 4°C.

3. Purification des protéines étiquetées avec une queue 6-Histidine

➤ Les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité **IMAC** (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography).

Sur colonne

- 1- La phase stationnaire est préparée dans une colonne FPLC Ø 1cm :
 - 15 mL de résine agarose sont introduits dans la colonne (purification d'environ 40 mg de protéine par mL de résine). Elle est rincée plusieurs fois à l'eau distillée.
 - La colonne est chargée d'ions métalliques par passage successif d'une solution de Ni²⁺ 0,3 M et rincée de nouveau à l'eau distillée.
- 2- La phase stationnaire est conditionnée avec un tampon phosphate pH 7,5 (NaH₂PO₄.H₂O/Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM). L'extrait cellulaire est déposé sur la résine et rincé avec le tampon de manière à élué les protéines non taggées.
- 3- La protéine d'intérêt est éluée avec une solution du tampon phosphate supplémenté par de l'imidazole selon un gradient allant de 50 à 500 mM. L'éluat est recueilli dans des tubes à essai d'environ 6 mL.

En batch

- 1- La phase stationnaire de purification est préparée dans 8 tubes à centrifuger. 1 mL de résine agarose est introduit dans chaque tube ainsi que quelques millilitres d'eau distillée. Le mélange est centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 min et le surnageant éliminé. L'opération est répétée deux fois de manière à obtenir un lavage efficace de la matrice agarose.
- 2- La résine est chargée par ajout de 2 mL d'une solution de Ni²⁺ 0,3 M. La phase solide est re-suspendue par agitation douce, centrifugée, et le surnageant jeté. Elle est alors de nouveau rincée à l'eau distillée.
- 3- Dans chaque tube quelques millilitres de l'extrait cellulaire soluble sont ajoutés, en s'assurant de ne pas saturer la résine en protéine (environ 40 mg de protéine par mL de résine). La suspension est incubée une dizaine de minutes en maintenant une légère agitation, puis centrifugée. Le surnageant contient les protéines non taggées.
- 4- L'opération est recommencée avec des solutions d'imidazole à différentes concentration. La protéine d'intérêt est récupérée dans le surnageant à 300 mM d'imidazole.

4. Evaluation de la concentration en protéine des éluats

Une méthode largement utilisée de mesure de concentration protéique est le test de Bradford. Le bleu de Coomassie G250 prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et absorbe à 595 nm.

- 1- Une droite d'étalonnage pour le test de Bradford est effectuée, reliant la concentration en protéine d'une solution à la DO de celle ci :
 - Dans 10 cuvettes plastiques contenant chacune 1 mL de réactif de Bradford sont ajoutés 20 µL de solution de protéine de référence (l'albumine de sérum bovin ou BSA, "*Bovine Serum Albumin*") de concentration croissante de 0,1 à 1 mg/mL.
 - Après 10 min d'incubation dans le noir, les DO de chaque cuvette sont mesurées à 595 nm. La droite d'étalonnage reliant la DO mesurée à la concentration en protéine peut alors être tracée.
- 2- Dans les mêmes conditions, la DO de chaque fraction de sortie de la colonne IMAC est mesurée. Cela permet d'identifier les tubes contenant de la protéine et en quelle concentration. On en déduit la quantité totale de protéine purifiée. Dans le cas d'une purification par batch, le test de Bradford permet d'évaluer la quantité de protéines contenue dans le surnageant obtenu à 300 mM.

5. Vérification de la pureté de la protéine d'intérêt

La pureté de la protéine est vérifiée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (acronyme anglophone de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

La matrice est créée par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide par les agents de polymérisation TEMED (*tétraméthyléthylène diamine*) et APS (*persulfate d'ammonium*), la grosseur des pores formés étant fonction de la concentration en acrylamide. C'est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de *Sodium dodécyl sulfate* SDS.

Les protéines sont tout d'abord condensées dans un gel de concentration puis séparées dans un gel de séparation.

1- le gel d'électrophorèse est préparé par application successive des deux gels suivants :

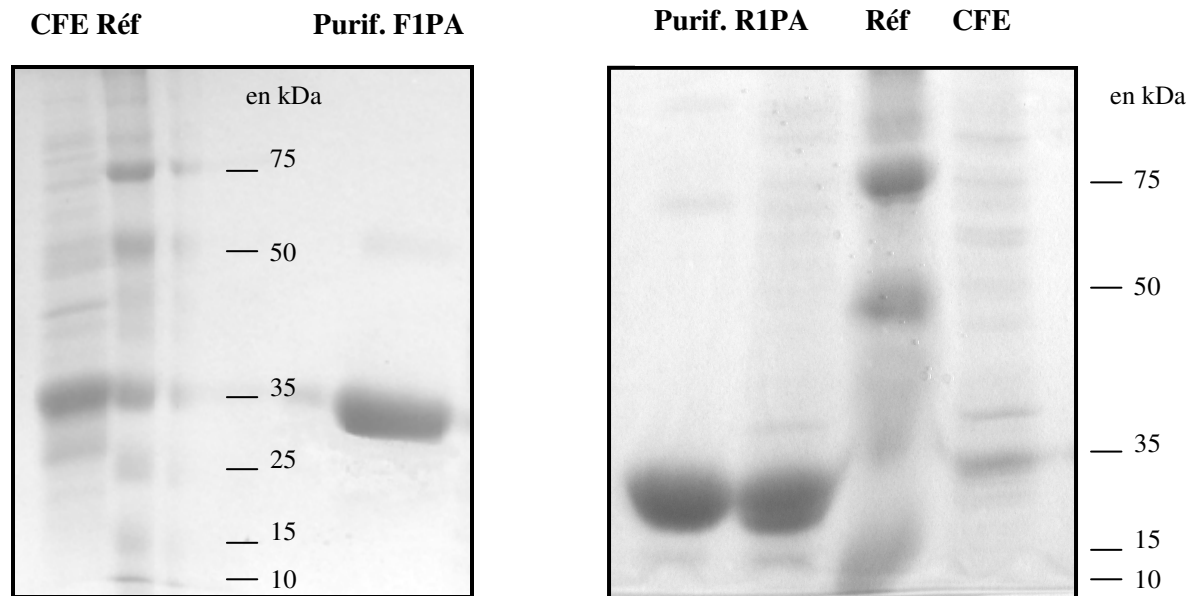
Gel de migration à 12 % d'acrylamide		Gel de concentration à 4 % d'acrylamide	
H ₂ O	5,1 mL	H ₂ O	3,075 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL	0,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL
20 % SDS	0,075 mL	20 % SDS	0,025 mL
Acrylamide/bis-acrylamide (30/0.8 %)	6 mL	Acrylamide/bis-acrylamide (30/0.8 %)	0,67 mL
APS (10 %)	0,075 mL	APS (10 %)	0,025 mL
TEMED	0,075 mL	TEMED	0,025 mL

Après polymérisation, le gel est mis à tremper dans une solution d'électrolytes composée de Tris-HCl (25 mM), de glycine (200 mM) et de SDS (0,1 % massique).

- Les échantillons à déposer sur le gel sont préparés par mélange d'un volume de solution d'enzymes correspondant à 0,02 mg de protéine et de 5 µL de colorant (solution de Bleu de Coomassie). Si nécessaire, ce mélange est complété avec de l'eau jusqu'à 30 µL. la protéine est dénaturée par chauffage à 100°C durant 10 min.
- les échantillons sont déposés dans chaque puit du gel d'électrophorèse et mis à migrer par passage d'un courant électrique (250 V).
- Lorsque les protéines ont été séparées sur le gel, leur visualisation est effectuée en les colorant par du Bleu de Coomassie pendant une nuit. Le gel est ensuite décoloré par un mélange méthanol/acide acétique /eau.

Solution de coloration	Solution de décoloration
50 mL H ₂ O	50 mL H ₂ O
10 mL AcOH	10 mL AcOH
40 mL MeOH	40 mL MeOH
100 mg Bleu de Coomassie	

Les gels de la F1PA et R1PA sont donnés ci dessous. Le gel de la DHAK est présenté dans la partie résultats-discussion.



6. Récupération de la protéine et conservation

- 1- La solution contenant la protéine d'intérêt est purifiée par ultrafiltration sous pression (membrane de 30 kDa) afin d'éliminer l'imidazole. Dans notre cas la protéine est retenue dans le réservoir de l'appareil alors que l'imidazole passe à travers la membrane et peut être jeté. Pour une solution de 80 mL, la filtration est effectuée jusqu'à réduction de la solution à 20 mL. 40 mL de tampon phosphate sans imidazole sont alors ajoutés et la solution refiltrée. Le processus est répété 3 fois.
- 2- La totalité du concentrât est mis à lyophiliser, et le solide obtenu (sels du tampon + protéine) est conservé à 4°C.

III. Production et purification des FSA

1. Surexpression des FSA dans *Escherichia coli*

La cellule souche *E. coli* utilisée est la DH5 α . Cette souche contient soit le plasmide résistant à l'ampicilline pJF119fsa, soit le plasmide résistant à la kanamycine pJF119fsaA129S, codant respectivement pour la FSA et le mutant A129S. Le principe de production des cellules surexprimant la FSA reste identique à précédemment et sera donc présenté plus rapidement.

- 1- Un prélèvement de cellules souche d'*E. coli* est préinoculé une nuit à 37°C dans 5 mL de milieu de culture (extrait de levure: 4g, NaCl : 8g, eau distillée: 8mL) en présence d'ampicilline pour la FSA et de kanamycine pour la FSA mutée (0,1 mg/mL).
- 2- La préculture obtenue est diluée dans un fermenteur de 1 L dans 800mL de milieu de culture en présence de l'antibiotique de sélection. Le milieu est agité à 37°C à 250 rpm jusqu'à atteindre 0,5-0,8 DO.
- 3- L'IPTG, pour une concentration finale de 0,25 mM, est ajouté dans le fermenteur. Le milieu est agité à 37°C durant une nuit.
- 4- La suspension cellulaire est centrifugée (10000 rpm, 30 min, 10°C). Le surnageant est éliminé et le culot lavé dans du tampon glycil-glycine (glycil-glycine 50 mM, 1,4-dithio-D,L threitol (DTT) 1mM, pH 8). Pour cela il est remis en suspension dans le tampon et centrifugé (10 000 rpm, 30 min 10°C). Le surnageant est de nouveau éliminé.

2. Extraction et purification des FSA

1- Le culot congelé est repris dans un tampon glycil-glycine (50 Mm, PH=8). Les cellules en suspension sont broyées par ultrasons (sonicateur, cycles de 8 secondes pendant 10 min), puis centrifugés pendant 15 min à 4°C et 10 000 rpm. Le surnageant est récupéré (extrait cellulaire soluble CFE).

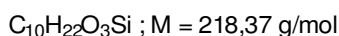
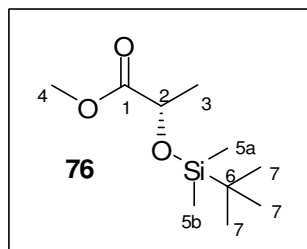
La FSA est une enzyme thermorésistante, il est donc facile de la purifier de toutes autres activités enzymatiques car un choc thermique inactive les autres enzymes.

- 2- L'extrait cellulaire est placé dans un bain d'huile à 75°C pendant 45 min. Après refroidissement, il est centrifugé de nouveau pendant 15 min à 4°C et 10 000 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires restants.
- 3- Une lyophilisation du surnageant est réalisée. Cette étape permet d'obtenir l'enzyme sous forme de poudre et de la conserver à 4°C sans perte d'activité sur plusieurs mois.

IV. Mesure des activités enzymatiques

1. Synthèse du L-lactaldéhyde

(S)-2-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)propanoate de méthyle **76**

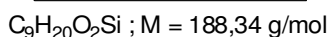
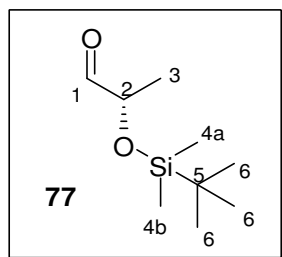


Dans un ballon monocol, 0,8 g de lactate de méthyle commercial (7,7 mmol, 1éq.) sont dissous dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. 1 g d'imidazole (1,4 mmol, 2éq.) sont alors ajoutés. Dans un autre ballon sont dissous 1,7 g de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (11,6 mmol, 1,5 éq.) dans 10 mL de dichlorométhane anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée goutte à goutte au lactate à TA sous agitation. Le mélange résultant est chauffé à reflux pendant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré et la phase organique lavée 4 fois avec une solution saturée de chlorure de sodium. La solution est séchée sur $MgSO_4$ puis filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair (pentane/éther 98/02). 1,6 g de composé sont obtenus sous forme liquide (rendement : 95 %).

CCM (pentane/éther 98/02 : $R_f = 0,3$), révélateur : $KMnO_4$.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 4,28 (q, 1H, $J_{2-3} = 6,8$ Hz, H_2) ; 3,63 (s, 3H, H_4) ; 1,31 (d, 3H, $J_{2-3} = 6,8$ Hz, H_3) ; 0,89 (s, 9H, H_7) ; 0,08 (s, 3H, H_{5a}) ; 0,06 (s, 3H, H_{5b}).

(S)-2-(tert-butyltrimethylsilyloxy)propanal **77**



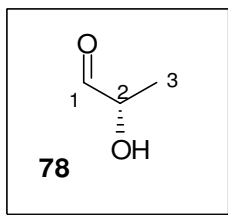
Dans un ballon de 100 mL sous atmosphère d'argon sont introduits du (S)-2-(tert-butyltriméthylsilyloxy)propanoate de méthyle (1,6 g ; 7,4 mmol) dilué dans 70 mL de dichlorométhane anhydre. Le ballon est refroidi à $-70^{\circ}C$. Une solution de DIBAL 1M dans l'hexane (10 mL ; 10 mmol ; 1,3 éq) est alors additionnée goutte à goutte au milieu à l'aide d'une seringue. L'avancement de la réaction est suivi par CCM en utilisant un mélange pentane/éther 98/02 comme éluant et une solution de vanilline comme révélateur (R_f du produit proche de celui du réactif de départ, mais le produit révèle à la vanilline et au $KMnO_4$ alors que le produit de départ révèle uniquement au $KMnO_4$). La réaction est terminée après 2 heures d'agitation à $-70^{\circ}C$.

Une solution de NH_4Cl saturé (5 mL) est ajoutée lentement à l'aide d'une seringue et le mélange est agité en laissant remonter la température à l'ambiante. Un précipité de couleur blanche est formé. Le mélange est filtré, puis le solide est rincé à l'eau et au CH_2Cl_2 . Après extraction, la phase organique est séchée sur $MgSO_4$. Après évaporation sous pression contrôlée de 300 mmHg (le produit final est volatil), le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (pentane/éther : 98/02). Le produit obtenu est une huile visqueuse légèrement jaunâtre ($m = 0,70$ mg ; rendement : 50 %).

CCM (pentane/éther 98/02 : $R_f = 0,25$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 9,61 (d, $J_{1-2} = 1,3$ Hz, 1H, H_1), 4,09 (dq, $J_{1-2} = 1,3$; $J_{2-3} = 6,9$ Hz, 1H, H_2), 1,26 (d, $J_{2-3} = 6,9$ Hz, 3H, H_3), 0,92 (s, 9H, H_6), 0,1 (s, 3H, H_{4a}), 0,09 (s, 3H, H_{4b}).

(S)-2-hydroxypropanal **78** = L-lactaldéhyde



$C_3H_6O_2$; $M = 74,08$ g/mol

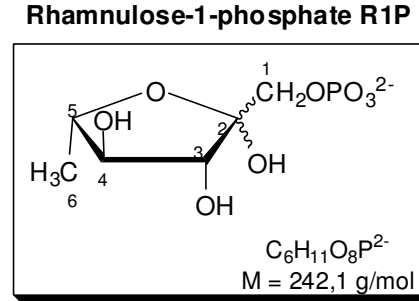
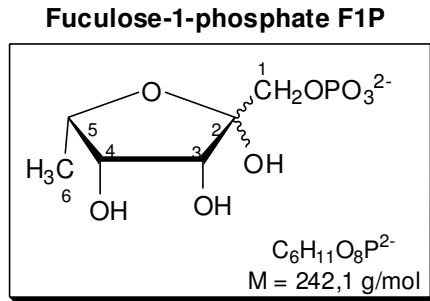
Protocole général de déprotection d'un acétal ou d'un silylé par une résine acide

Dans un ballon de 100 mL sont introduits l'aldéhyde **77** (0,7 g ; 3,7 mmol), 3,7 g de Dowex H^+ (1g par mmol d'aldéhyde) et 20 mL d' H_2O . Le mélange est agité pendant 12 heures à 30°C dans le cas de la déprotection d'un silylé, et à 45°C dans le cas de la déprotection d'un acétal. L'avancement de la réaction est suivi par CCM et la révélation est faite par une solution de vanilline. Le mélange est filtré sur verre fritté puis la résine est rincée avec un minimum d'eau. Le filtrat est conservé au réfrigérateur pour l'étape suivante de la synthèse.

CCM (dichlorométhane/méthanol 95/05 : $R_f = 0,1$), révélateur : vanilline.

Le spectre de RMN 1H ne présente plus les pics caractéristiques de la protection silylée.

2. Synthèse et purification du fucose-1-phosphate et du rhamnULOse-1-phosphate



Pour un volume final de 30 mL est additionné :

- 1 mL de DHA 1 M (1 mmol, 1 éq)
 - 0,5 mL de $MgSO_4$ 0,5 M (0,25 mmol, 0,4 éq)
 - 30 μ L de $ZnCl_2$ 10 mM (0,3 μ mol, 0,01 éq)
 - 112 mg de L-lactaldéhyde (1,5 mmol, 1,5 éq)
 - 4 mL d'acétyl-P 0,5 M (2 mmol, 2 éq)
 - Tampon phosphate 20 mM pH 7.5
 - ~ 10 U de F1PA ou de R1PA selon le produit désiré (respectivement F1P et R1P)
- Le pH est ajusté à 7,5
- 15 U de DHAK
 - 30 U d'AK

Un prélèvement est effectué, correspondant au temps 0 de la réaction

- 136 μ L d'ATP 0,5 M (68 μ mol, 0,07 éq)

La réaction commence immédiatement après addition de l'ATP, et est suivie au spectrophotomètre. Le pH est réajusté à 7,5 tout au long de la réaction pour le bon fonctionnement du système de régénération de l'ATP.

Après disparition totale du DHA et DHAP du milieu, celui-ci est refroidi dans de la glace et 30 mL de MeOH sont ajoutés. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation à 8 000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est collecté, et un équivalent de chlorure de baryum (208 mg, 1 mmol) est ajouté à la solution dont le pH est ajusté à 6. Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation durant 2 h à 0°C. Le précipité formé de phosphates inorganiques est à son tour éliminé par centrifugation, et 5 volume d'éthanol sont additionnés au surnageant maintenu sous agitation. Après quelques heures, le précipité de phosphate organique apparu est lavé avec de l'éthanol et du diéthyl éther, de manière à

recupérer le F1P ou R1P sous forme de sel de barium. Ils sont remis en solution grâce à un échange baryum/sodium en présence de résine Dowex Na⁺.

Les spectres de RMN des produits sont identiques à ceux obtenus par Fessner et *coll.* pour les mêmes produits²³².

▪ F1P

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 4,63 (m, 1H, H_{5α}); 4,52 (d, 1H, $J_{3\beta-4\beta} = 3,5$ Hz, H_{3β}); 4,42 (d, 1H, $J_{3\alpha-4\alpha} = 3,8$ Hz, H_{3α}); 4,31 (m, 1H, H_{4α}); 4,26 (m, 1H, H_{4β}); 4,14 (m, 1H, H_{5β}); 3,89-3,87 (m, 2H, H_{1aα}, H_{1bβ}); 3,89-3,78 (m, 2H, H_{1bα}, H_{1bβ}); 1,30 (d, 3H, $J_{5\beta-6\beta} = 3,5$ Hz, H_{6β}); 1,28 (d, 3H, $J_{5\alpha-6\alpha} = 3,8$ Hz, H_{6α}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) :

Forme α : 104,4 (C₂) ; 78,5 (C₅) ; 75,8 (C₄) ; 74,3 (C₃) ; 64,8 (C₁) ; 14,2 (C₆).

Forme β : 101,8 (C₂) ; 76,3 (C₅) ; 72,5 (C₄) ; 72,3 (C₃) ; 66,4 (C₁) ; 14,6 (C₆).

▪ R1P

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 3,72-3,95 et 4,17-4,05 (2 m, 5H); 1,33 (m, 6H, H_{6β}, H_{6α}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) :

Forme α : 104,5 (C₂) ; 82,6 (C₅) ; 78,0 (C₄) ; 76,3 (C₃) ; 65,1 (C₁) ; 18,1 (C₆).

Forme β : 101,0 (C₂) ; 81,1 (C₅) ; 79,4(C₄) ; 76,3 (C₃) ; 66,4 (C₁) ; 19,2 (C₆).

²³² Fessner, W. D.; Schneider, A.; Eyrisch, O.; Sinerius, G.; Badia, J. *Tetrahedron Asym.* **1993**, 4, 1183.

3. Mesure de l'activité de la F1PA et de la R1PA

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 800µL de tampon Tris-HCl 50mM pH 8
- 150µL d'eau distillée
- 10 µL d'une solution de ZnCl₂ 1 mM
- 10 µL d'α-GPDH-TPI (2,3 U)
- 10 µL de F1PA ou R1PA (~4 mg de poudre enzymatique/mL)

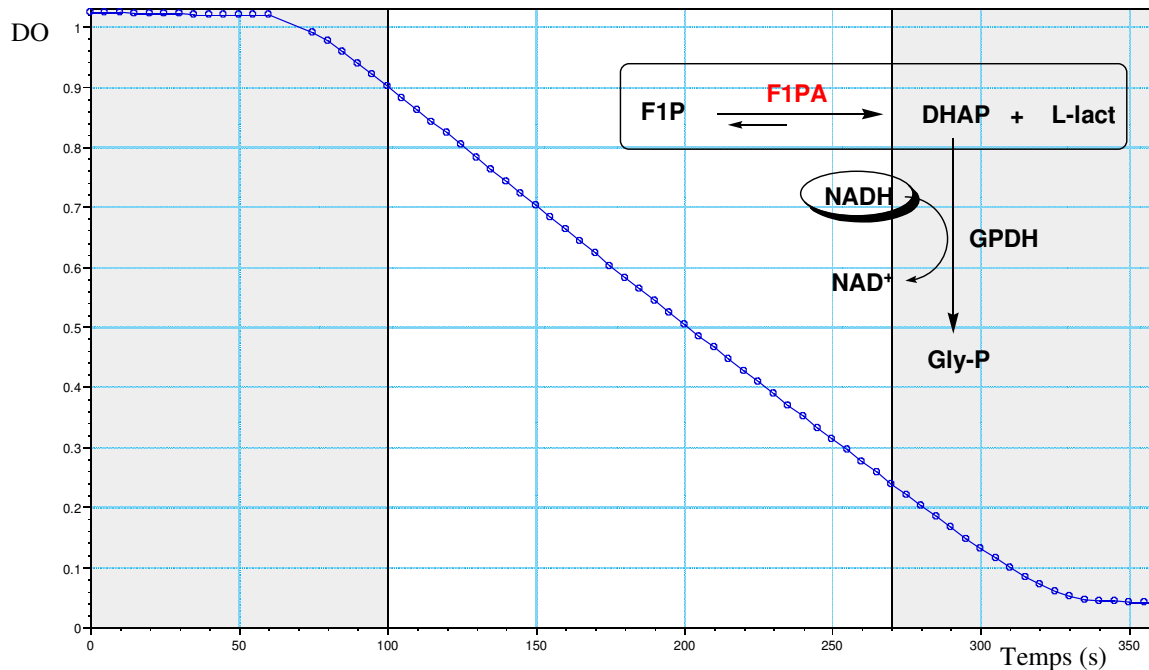
Lecture de la DO de référence

- 10µL de NADH 20 mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1min

- 10 µL de F1P ou R1P 0,2 M

Suivi cinétique de la disparition de NADH par mesure de DO au cours du temps.



Les mesures d'absorbance sont prises à 340 nm toutes les 5 secondes pendant 400 secondes (exemple d'une mesure pour la F1PA sur le graphique ci-dessus).

L'absorbance suit la loi de Beer-Lambert et nous permet de calculer le nombre de moles de DHAP apparues dans le milieu au cours du temps, soit l'activité de l'aldolase.

$$D.O. = \epsilon.C.L$$

D.O. : densité optique (unité de mesure de l'absorbance)

ε : coefficient d'extinction molaire
(à 340 nm $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ L/mol.cm}$)

C : concentration en soluté (mol/L)

L : largeur de la cuve de mesure = 1cm

D'où :
$$\frac{\Delta DO}{\Delta t} = \frac{\epsilon \cdot \Delta C}{\Delta t},$$

$\Delta DO/\Delta t$ étant la valeur de la pente de la droite obtenue ci-dessus.

L'activité de l'enzyme est donc obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta DO \times \text{Vol}_{\text{cuve}}}{\Delta t \times m_{\text{enzyme}} \times \epsilon_{\text{NADH}}}$$

L'activité est exprimée en μmol de substrat formé/min/mg d'enzyme.

4. Mesure de l'activité de la DHAK

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 800 μL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8
- 90 μL de MgSO_4 50 mM
- 70 μL d'ATP 50 mM
- 10 μL d' α -GPDH-TPI (2,3 U)
- 10 μL de DHAK (~2 mg /mL)

Lecture de la DO de référence

- 10 μL de NADH 20 mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1 min

- 10 μL de DHA 0,2 M

Suivi cinétique de la disparition de NADH par mesure de DO au cours du temps.

De la même manière que précédemment, la loi de Beer-Lamber nous permet d'accéder à l'activité de l'enzyme.

5. Mesure de l'activité des FSA

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 930 μL de tampon glycil-glycine 50 mM pH 8
- 10 μL d' α -GPDH-TPI (2,3 U)
- 20 μL de FSA (~4 mg /mL)

Lecture de la DO de référence

- 10 μL de NADH 20 mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1 min

- 30 μL de F6P (20 mg dans 210 μL)

Suivi cinétique de la disparition de NADH par mesure de DO au cours du temps.

La loi de Beer-Lamber nous permet d'accéder à l'activité de l'enzyme.

Chap2 : Synthèses chimiques et enzymatiques

I. Généralités

1. Nomenclature et numérotation

Dans la majorité des cas, la nomenclature utilisée est la nomenclature officielle recommandée par l'IUPAC. Cependant, lorsque c'est possible, la nomenclature spécifique appliquée aux glucides est privilégiée.

Par contre, la numérotation des atomes utilisée pour l'interprétation des spectres de RMN est parfois arbitraire. Elle est mentionnée dans chaque cas sur les molécules encadrées.

2. Techniques chromatographiques

Les **chromatographies sur couches minces** (CCM) ont été effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merk). La révélation a été faite, sauf mention contraire, par exposition sous rayons ultraviolets et par trempage dans une solution de vanilline ou de KMnO₄, suivi d'un chauffage. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas.

Les **chromatographies sur colonne** ont été réalisées les deux premières années sur gel de silice Si 60 (40-63 µm, SiliCycle Inc) selon la technique de "chromatographie éclair". L'éluant utilisé est indiqué pour chaque composé. Dans les cas de la séparation de diastéréoisomères des nitrocyclitols, de la silice sphérique régulière a été employée (Si 60, 40 µm, Interchim).

Durant ma dernière année de thèse, notre laboratoire s'est équipé d'une **chromatographie liquide basse pression** nous permettant d'automatiser nos purifications. L'appareil utilisé est le Spot II Ultimate de chez Armen Instrument (VWR). Pour la chromatographie en phase normale, les colonnes sont remplies manuellement avec la même silice que précédemment. Les débits d'élution sont ceux recommandés selon la taille des colonnes employées :

- 70 g de silice – 60 mL/min
- 30 g de silice – 36 mL/min
- 5 g de silice – 18 mL/min

Dans le cas de chromatographie phase inverse ou phase amino, des colonnes préremplies ont été utilisées : Colonne C18 Puriflash (Interchim) pour la phase inverse, colonne Amino EVF D24 (Merk Chimie) pour la phase amino.

Les **chromatographies en phase vapeur** (CPV) ont été effectuées sur un appareil Delsi Nermag DI200 à détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est de l'hydrogène et les deux colonnes capillaires utilisées sont les suivantes :

- **Phase chirale** : Chiraldex G-TA (γ -Cyclodextrine Trifluoroacétyle) de chez SupelcoTM Analytical (InterChim). Dimension : 30 m x 0,25 mm x 0,12 μ m.
- **Phase Normale** : Optima 1 (diméthylpolysiloxane) de chez Macherey-Nagel. Dimension : 25 m x 0,20 mm x 0,20 μ m.

Les conditions de température et de pression seront données pour chaque analyse.

3. Techniques spectroscopiques et d'analyse

Les **spectres infrarouges** (IR) ont été réalisés sur un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier SHIMADZU FTIR 8400S Modèle IRPrestige-21. Les nombres d'ondes sont donnés en cm^{-1} .

Les **spectres de masse** ont été faits sur un appareil Hewlett Packard 5989B. Le mode d'ionisation utilisé est mentionné dans chaque cas (IC : ionisation chimique ; IE : impact électronique ; ESI : électrospray).

Les **spectres de masse haute résolution** ont été effectués par le Centre Régional de Mesures Physiques de Clermont-Ferrand sur un spectromètre Haute Résolution QTOF micro WATERS, en électrospray (ESI), en ionisation en phase liquide (LSIMS) ou en ionisation chimique (IC) en mode positif (+).

Les **spectres de Résonance Magnétique Nucléaire** (RMN) ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AVANCE 400 (^1H : 400 MHz ; ^{13}C : 100,6 MHz) ou BRUKER AVANCE 500 (pour les spectres NOESY). Les spectres du ^{13}C ont été réalisés en JMOD pour un plus grand confort d'interprétation. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et déterminés par rapport au solvant deutéré utilisé, qui est précisé pour chaque composé. Dans le cas de D_2O , les spectres de ^{13}C sont calibrés automatiquement par rapport à la fenêtre spectrale. Les spectres de RMN du ^1H ont permis de déterminer les rapports diastéréoisomériques des mélanges obtenus.

Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont les suivantes :

s : singulet	t : triplet	dd : doublet dédoublé
se : singulet élargi	q : quadruplet	dt : doublet détriplé
d : doublet	pq : pseudo quadruplet	m : multiplet

Les **pouvoirs rotatoires** ont été mesurés sur un polarimètre JASCO modèle DIP-370 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm) à 25°C. Le solvant d'analyse et la concentration en composé (donnée en g/100 mL) sont précisés dans chaque cas.

Les **analyses élémentaires** ont été effectuées par le Service Central d'Analyse du CNRS de Solaize (Rhône).

II. Synthèse du DHAP

1. Réaction enzymatique de formation du DHAP

Dans un erlenmeyer de 20 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 150 μL de DHA 1 M (0,3 mmol, 1 éq)
- 150 μL de MgSO_4 0,5 M (0,075 mmol)
- 1200 μL d'Acétyl-P 0,5 M (0,6 mmol, 2 éq)
- 1500 μL de tampon phosphate 60 mM pH 7,0
- 2700 μL d'eau distillée

Le pH est ajusté à 7,5

- 160 μL de DHAK (36 U/mL) = 6 U
- 100 μL d'AK (170 U/mL) = 18 U

Un prélèvement est effectué, correspondant au temps 0 de la réaction

- 40 μL d'ATP 0,5 M (9,8 μmol)

La réaction commence immédiatement après addition de l'ATP, et est suivie au spectrophotomètre, jusqu'à accumulation de 100 % du DHAP (soit 0,3 mmol).

Des synthèses jusqu'à 9 mmol de DHA ont été réalisées avec succès.

2. Dosage du DHAP d'un milieu

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 800 μL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8
- 175 μL d'eau distillée
- 5 μL de prélèvement du milieu réactionnel (dilué 2 fois)

Lecture de la DO de référence

- 10 μL de NADH 20 mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1 min

- 10 μL d' α -GPDH-TPI (2,3 U)

Visualisation de la disparition de NADH jusqu'à DO constante.

La concentration en DHAP est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{DHAP}] = \frac{\Delta\text{DO} \times \text{Vol}_{\text{cuvette}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \times \text{Vol}_{\text{prise d'essai}}}$$

$$\Delta\text{DO} = \text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}}$$

3. Dosage du DHA résiduel

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 800 μL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8
- 90 μL de MgSO_4 50 mM
- 75 μL d'ATP 50 mM
- 5 μL de prélèvement du milieu réactionnel (dilué 2 fois)

Lecture de la DO de référence

- 10 μL de NADH 20 mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1 min

- 10 μL d' α -GPDH-TPI (2,3 U)

Visualisation de la disparition de NADH jusqu'à DO constante.

- 10 μL de DHAK (14U/mL)

Visualisation de la disparition de NADH jusqu'à DO constante.

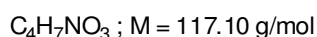
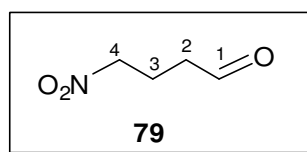
La concentration en DHA est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{DHA}] = \frac{\Delta\text{DO} \times \text{Vol}_{\text{cuvette}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \times \text{Vol}_{\text{prise d'essai}}}$$
$$\Delta\text{DO} = \text{DO}_{\text{après dosage du DHAP}} - \text{DO}_{\text{finale}}$$

III. Synthèse des nitroaldéhydes racémiques

1. Synthèse du 4-nitrobutanal 79

4-nitrobutanal 79



A une solution de nitrométhane (200 mL, 3,7 mol, 50 éq) et de fluorure de potassium (13,83 g, 230 mmol, 3,1 éq) préalablement dissous dans 100 mL de méthanol à -35°C , est ajoutée sous agitation une solution d'acroléine (5 mL, 74 mmol, 1 éq) diluée dans 25 mL de méthanol pendant 25 à 30 min. La réaction est agitée à -35°C pendant 1h30. Le milieu est

repris par 500 mL d'acétate d'éthyle, lavé par 2 × 200 mL d'eau et 200 mL de NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le produit est purifié par distillation sous pression réduite à 0,1 mmHg (100°C). On obtient 4,2 g d'une huile incolore (rendement = 48 %).

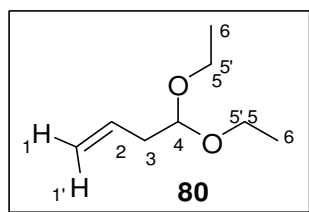
CCM (cyclohexane/AcOEt 6/4 : R_f = 0,4), révélateur : vanilline.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 9,8 (s, 1H, H₁) ; 4,41 (t, 2H, J₃₋₄ = 6,6 Hz, H₄) ; 2,69 (t, 2H, J₂₋₃ = 6,7 Hz, H₂) ; 2,22 (m, 2H, H₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 199,7 (C₁) ; 74,3 (C₄) ; 34 (C₂) ; 19,6 (C₃).

2. Synthèse de l'aldéhyde monohydroxylé 95

4,4-diéthoxybut-1-ène 80



C₈H₁₆O₂; M = 144,21 g/mol

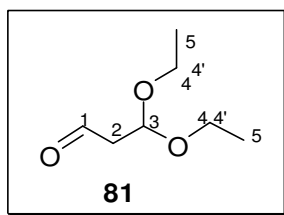
Dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant, d'une ampoule à brome et d'un thermomètre, est ajouté BF₃/OEt₂ (1 mL, 10 mmol) à 25 mL d'éther, ainsi que de l'acétate mercurique Hg(OAc)₂ (4,75g, 15 mmol). L'ensemble est agité à 4°C. Le vinyléthyléther (96 mL, 1 mol) est alors ajouté au goutte à goutte lent, pendant 20 minutes. La température est maintenue à 4°C par un bain de glace. Après 1 h 30 d'agitation à froid, 50 mL de NaHCO₃ à 10 % sont ajoutés. La solution obtenue est filtrée sur célite. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. On obtient 68,9 g d'une huile légèrement jaune (rendement = 85 %).

CCM (cyclohexane/ AcOEt 6/4 : R_f = 0,8), révélateur : KMnO₄.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,72 (m, 1H, H₂) ; 5,04 (2 pd, 2H, J₁₋₂ = 8 Hz, J_{1-1'} ≈ 0 Hz, J_{2-1'} = 15 Hz, H₁, H_{1'}) ; 4,43 (t, 1H, H₄, J₄₋₃ = 7 Hz) ; 3,59 (m, 2H, H₅) ; 3,45 (m, 2H, H_{5'}) ; 2,32 (m, 2H, H₃) ; 1,13 (m, 6H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm) : 134,1 (C₂) ; 117,9 (C₁) ; 103,0 (C₄) ; 61,8 (C₅) ; 39,1 (C₃) ; 15,9 (C₆).

3,3-diéthoxypropanal 81



$C_7H_{14}O_3$; $M = 146,18 \text{ g/mol}$

Protocole général d'oxydation par $KMnO_4/NaIO_4$ d'un alcène

1^{ère} étape : oxydation par $KMnO_4$ dans l'eau

Dans un ballon de 100 mL sont introduits 1 équivalent de l'alcène considéré (7,1 mmol) ainsi que de l'eau distillée (10 mL). 1,1 équivalent de $KMnO_4$ (1,2 g) préalablement dilué dans 30 mL d'eau est ajouté à 0°C (augmentation du volume car apparition d'un précipité brun de MnO_2). L'agitation est maintenue à TA pendant la nuit. 1,2 équivalent de bisulfite de sodium (1,6 g) est ajouté pour détruire MnO_2 (oxydation en Mn^{2+}). L'agitation est prolongée pendant 1 h (décoloration), puis le milieu est filtré. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane puis les phases organiques séchées sur $MgSO_4$. Le solvant est éliminé sous pression réduite.

2^{ème} étape : Coupure oxydante par $NaIO_4$

Préparation du gel de silice : 3,6 g de $NaIO_4$ sont dissous dans 7 mL d'eau chaude (~ 80 °C). A cette solution est ajoutée la silice (13 g) sous forte agitation. La silice résultante, portant le $NaIO_4$, peut être conservée plusieurs mois.

A une suspension de $NaIO_4$ supporté sur silice (13 g, 2,4 éq, 17 mmol) dans du dichlorométhane (32 mL) est ajoutée le diol précédemment obtenu, lui-même dilué dans 30 mL de dichlorométhane. Après 30 minutes à TA, la réaction est terminée. La suspension est filtrée sur verre fritté, le solide rincé plusieurs fois par du dichlorométhane. Après séchage sur $MgSO_4$ de la phase organique, le solvant est éliminé sous pression réduite. Aucune purification n'est nécessaire.

Pour le 3,3-diéthoxypropanal 81

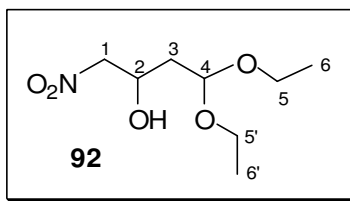
Rendement = 96 % brut.

CCM (cyclohexane/ AcOEt 4/6 : Rf = 0,6), révélateur $KMnO_4$.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,40 (s, 1H, H_1) ; 4,93 (t, 1H, $J_{3-2} = 7 \text{ Hz}$, H_3) ; 3,65 (m, 2H, H_4) ; 3,52 (m, 2H, $H_{4'}$) ; 2,70 (d, 2H, $J_{2-3} = 7 \text{ Hz}$) ; 1,19 (dd, 6H, $J_{4-5} = J_{4'-5'} = 7 \text{ Hz}$, $H_5, H_{5'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 199,1 (C_1) ; 98,0 (C_3) ; 61,3 (C_4) ; 47,3 (C_2) ; 14,5 (C_5).

4,4-diéthoxy-1-nitrobutan-2-ol **92**



$C_8H_{17}NO_5$; $M = 207,22$ g/mol

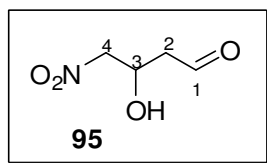
A une solution de **81** (2 g, 13,7 mmol, 1 éq) et de nitrométhane (750 μ L, 13,7 mmol, 1 éq) dans 3 mL de MeOH sous forte agitation, est ajoutée une solution de NaOH (10 M) (1,37 mL, 13,7 mmol, 1 éq) à 0°C. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité à 0°C pendant 45 minutes. De l'acide acétique (785 μ L, 1,7 mmol, 1 éq) est ajouté et le milieu est extrait à l'éther, séché sur $MgSO_4$ et concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4). 2,44 g d'une huile légèrement jaune sont obtenus (rendement = 86%).

CCM (cyclohexane/ AcOEt 6/4 : $R_f = 0,4$), révélateur $KMnO_4$.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,74 (dd, 1H, $J_{4-3} = J_{4-3'} = 5$ Hz, H_4) ; 4,57 (m, 1H, H_2) ; 4,45 (dd, 1H, , $J_{1-1'} = 7$ Hz, $J_{1-2} = 2,3$ Hz, H_1) ; 4,43 (dd, 1H, , $J_{1-1'} = 7$ Hz, $J_{1'-2} = 2,2$ Hz, $H_{1'}$) ; 3,72-3,58 (m, 4H, H_5 , $H_{5'}$) ; 1,88 (m, 2H, H_3 , $H_{3'}$) ; 1,22 (m, 6H, H_6 , $H_{6'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 101,3 (C_4) ; 80,4 (C_1) ; 65,8 (C_2) ; 62,8-62,5 (C_5 , $C_{5'}$) ; 37,2 (C_3) ; 15,2 (C_6 , $C_{6'}$).

3-hydroxy-4-nitrobutanal **95**



La molécule **95** a été obtenue à partir du composé **92**, en suivant le protocole général de déprotection indiqué page 238.

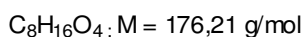
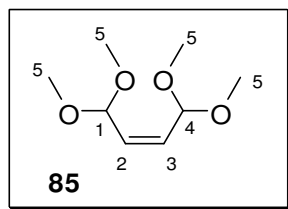
CCM (cyclohexane/ AcOEt 4/6 : $R_f = 0,2$), révélateur : $KMnO_4$.

Le spectre RMN 1H ne présente plus les pics caractéristiques de l'acétal.

3. Synthèse de l'aldéhyde dihydroxylé 96

3.1. Première méthode : à partir du furane

tétraméthoxybut-2-ène 85



Dans un tricol de 250 mL (un thermomètre, un ballon d'argon, une ampoule à brome) est introduit du furane fraîchement distillé (6,8 mL, 94 mmol) ainsi que du méthanol anhydre (70 mL), puis la solution est refroidie à -45°C .

Dans un bicol de 100 mL (1 ballon d'argon, 1 canule) est mélangé du dibrome (4,9 mL, 1,02 éq.) avec 50 mL de méthanol anhydre.

Cette dernière solution est canulée dans l'ampoule à brome du tricol, pour être rajoutée goutte à goutte pendant 30 minutes à la solution de furane. Pendant l'ajout, la température ne doit pas monter au dessus de -35°C . Après addition totale de la solution de dibrome, le milieu réactionnel est agité à -10°C pendant 2 h.

Après neutralisation de l'HBr (susceptible de s'ajouter sur l'alcène formé) à froid par ajout de triéthylamine, l'agitation du milieu est maintenue 15 min avant de laisser la solution revenir à TA. Le milieu passe d'orange à jaune avec précipitation de sels, et le pH de 1 à 12. Une grande partie du méthanol est évaporée sous pression réduite, puis le mélange réactionnel est extrait au dichlorométhane (3 x 150 mL). Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO_4 , et évaporées sous pression réduite.

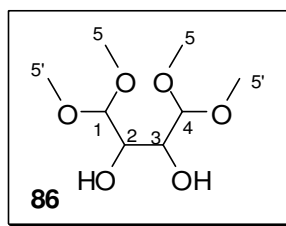
Le produit est distillé au four à boule (12 mmHg, 85°C). Le composé **85** a été obtenu sous forme d'un liquide incolore (18,3 g, 71 % de rendement), configuration Z.

CCM (cyclohexane/AcOEt 8/2 : $R_f = 0,4$), révélateur : vanilline.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 5,81 (d, 2H, $J_{1-2} = 1,8 \text{ Hz}$, H_2, H_3) ; 4,83 (d, 2H, $J_{1-2} = 1,8 \text{ Hz}$, H_1, H_4) ; 3,32 (s, 12H, H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 134,5 (C_2, C_3) ; 101,1 (C_1, C_4) ; 55,7 (C_5).

tétraméthoxybutane-2,3-diol **86**



$C_8H_{18}O_6$; $M = 210,22$ g/mol

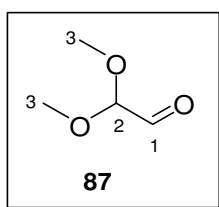
Dans un ballon contenant l'alcène **85** (100 mg, 0,57 mmol) sont introduits 10 mL d'acétonitrile, ainsi que 6 mg de $RuCl_3$ et 2 mL de $NaIO_4$ supporté sur silice (2 éq., 1,14 mmol). Après 1 h d'agitation à TA, la suspension est filtrée sur célite et le filtrat séché sur $MgSO_4$. Après filtration, la phase organique est évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est utilisé brut dans l'étape suivante, et peut être conservé plusieurs mois au réfrigérateur. Rendement : 91 %.

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 2/8 : $R_f = 0,2$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,41 (d, 2H, $J_{1-2} = 6,3$ Hz, H_1, H_4) ; 3,73 (d, 2H, $J_{1-2} = 6,3$ Hz, H_2, H_3) ; 3,42 (s, 6H, H_5) ; 3,41 (s, 6H, H_5') ; 2,74 (s_e , 2H, H_6).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 104,5 (C_1, C_4) ; 69,1 (C_2, C_3) ; 55,7 – 54,2 (C_5, C_5').

diméthoxyacétaldéhyde **87**



$C_4H_8O_3$; $M = 104,10$ g/mol

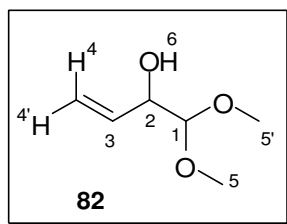
Deux modes opératoires ont été mis au point pour la synthèse de ce composé. Ils sont tous les deux effectués à 0°C pour tenir compte de la grande volatilité du composé.

a. A partir du diol **86**, le protocole général de coupure oxydante par $NaIO_4$ indiqué page 250 a été appliqué. Aucune purification du composé n'est nécessaire. Rendement brut de 91 %.

b. A partir de l'alcène **85**, le protocole précédent a été repris en y modifiant la quantité de $NaIO_4$ supporté sur silice à ajouter au milieu. 7 équivalents sont nécessaires pour obtenir l'aldéhyde **87** (7 mL, 4 mmol). Rendement Brut de 85 %.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,47 (d, 1H, $J_{1-2} = 1,5$ Hz, H_1) ; 4,50 (d, 1H, $J_{1-2} = 1,5$ Hz, H_2) ; 3,46 (s, 6H, H_3).

1,1-diméthoxybut-3-èn-2-ol **82**



$C_6H_{12}O_3$; $M = 132,16$ g/mol

Préparation du magnésien : Dans un bicol (ampoule à brome + réfrigérant/garde $CaCl_2$) sont introduits les copeaux sec de magnésium (1 g, 1,2 éq.), que l'on recouvre par quelques millilitres de THF distillé. Un cristal d'iode est introduit, la solution devient jaune. Sous agitation, quelques gouttes d'une solution de bromure de vinyle dans du THF (5 M) sont introduites, et le mélange est chauffé jusqu'à ce que la réaction s'amorce (décoloration du mélange et démarrage d'un reflux car la réaction est exothermique). La réaction est entretenue par l'ajout au goutte à goutte du bromure de vinyle (2,9 mL, 1,2 éq.). La solution finale de bromure de vinyle magnésium est marron et pâteuse. Elle ne peut être conservée.

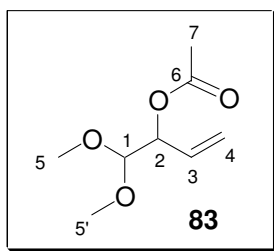
A la solution de bromure de vinyle magnésium, fraîchement préparée (1,2 éq., 41 mmol) et refroidie à 0 °C, est additionnée goutte à goutte une solution de l'aldéhyde **87** (3,5 g, 34 mmol). L'agitation est maintenue 12 heures. La solution est alors hydrolysée à froid par une solution aqueuse saturée de NH_4Cl , puis extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution aqueuse saturée de $NaCl$, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (dichlorométhane/acétone 98/2). 3,0 g d'une huile incolore sont obtenus (rendement = 64 %).

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4), révélateur : vanilline, $R_f = 0,4$.

RMN^1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 5,86 (ddd, 1H, $J_{3-4} = 17,4$ Hz, $J_{3-4'} = 10,6$ Hz, $J_{3-2} = 5,3$ Hz, H_3) ; 5,37 (dd, 1H, $J_{4-3} = 17,4$ Hz, $J_{4-4'} = 1,6$ Hz, H_4) ; 5,20 (dd, 1H, $J_{4'-3} = 10,6$ Hz, $J_{4-4'} = 1,6$ Hz, H_4') ; 4,13 (d, 1H, H_1 , $J_{1-2} = 6$ Hz) ; 4,08 (m, 1H, H_2) ; 3,40 (s, 3H, H_5) ; 3,37 (s, 3H, H_5') ; 2,51 (se, 1H, H_6).

$RMN^{13}C$ (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 135,5 (C_3) ; 116,7 (C_4) ; 106,5 (C_1) ; 72,1 (C_2) ; 54,9 (C_5) ; 54,5 (C_5').

1-(1,1-diméthoxyméthyl)pro-2-ényl acétate **83**



$C_8H_{14}O_4$; M = 174,19 g/mol

Protocole général de protection d'un hydroxyle par un acétate

A une solution de l'alcool **82** (0,9 g, 6,8 mmol) dans du dichlorométhane (20 mL), sont ajoutés la triéthylamine (2,9 mL, 3 équ.) suivi de l'anhydride acétique (1,9 mL, 3 équ.) et du DMAP (80 mg, 0,1 équ.). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. La réaction est alors stoppée par ajout d'eau (15 mL). Après extraction au dichlorométhane et lavage des phases organiques avec une solution saturée de NaCl, celles-ci sont séchées sur $MgSO_4$ avant d'être concentrées sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/acétone 99/1) pour conduire au composé **83**. 1 g d'une huile légèrement jaune est obtenu.

Pour le 1-(1,1-diméthoxyméthyl)prop-2-ényl acétate **83**

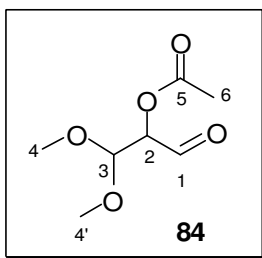
Rendement : 83 %

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4 : $R_f = 0,8$), révélateur : vanilline.

RMN¹H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 5,84 (m, 1H, H_3) ; 5,31 (m, 2H, H_4) ; 5,29 (dd, 1H, $J_{2-3} = 10,6$ Hz, $J_{1-2} = 7,3$ Hz, H_2) ; 4,28 (d, 1H, $J_{1-2} = 7,3$ Hz, H_1) ; 3,38 (s, 3H, H_5) ; 3,37 (s, 3H, $H_{5'}$) ; 2,08 (s, 3H, H_7).

RMN¹³C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 169,8 (C_6) ; 132 (C_3) ; 118,2 (C_4) ; 104,4 (C_1) ; 73 (C_2) ; 55,4-54,5 ($C_5, C_{5'}$) ; 21 (C_7).

2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal 84



C₇H₁₂O₅; M = 176,17 g/mol

Protocole général d'oxydation d'un alcène par ozonolyse classique

Une solution contenant l'alcène à oxyder (10 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane distillé est refroidie à -78°C. L'ozone est mis à buller jusqu'à ce que la solution – incolore au départ – devienne bleue par excès d'ozone. Le courant d'ozone est alors remplacé par un courant d'oxygène pour chasser cet excès jusqu'à décoloration de la solution. 2 g de 1,2-bis(diphénylphosphino)éthane DPPE (5 mmol, 0,5 éq.) sont alors ajoutés à froid. On laisse revenir à TA et agiter une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le précipité blanc d'oxyde de diphénylphosphine est filtré et rincé avec de l'éther froid. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant en fonction de la polarité de chaque produit).

Pour le 2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal 84

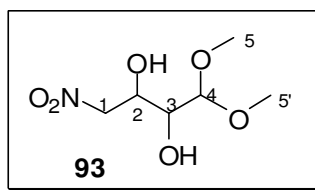
Rendement : 74 %

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4), révélateur : vanilline, $R_f = 0,6$.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 9,6 (d, $J_{1-2} = 2,2$ Hz, 1H, H₁) ; 5,2 (dd, 1H, H₂, $J_{2-3} = 4,9$ Hz, $J_{2-1} = 2,2$ Hz) ; 4,6 (d, 1H, H₃, $J_{3-2} = 4,9$ Hz) ; 3,47-3,46 (s, 6H, H₄, H_{4'}) ; 2,2 (s, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 195,6 (C₁) ; 169,8 (C₅) ; 102,7 (C₃) ; 77 (C₂) ; 56-54,9 (C₄, C_{4'}) ; 20,5 (C₆).

4,4-diméthoxy-1-nitrobutan-2,3-diol 93



$C_6H_{13}NO_6$; $M = 195,17$ g/mol

Protocole général de la réaction de Henry entre un aldéhyde et le nitrométhane

A une solution de nitrométhane (550 μ L, 10,1 mmol, 1,01 éq) dans 10 mL de méthanol sont ajoutés 2 mL de NaOH 6M (1,2 éq.). Après quelques minutes d'agitation, la solution devient jaune, témoin de la formation du nitronate. Cette solution est refroidie avant d'être ajoutée goutte à goutte à 0°C à l'aldéhyde considéré (10 mmol, 1 éq), préalablement dilué dans du méthanol (10 mL). Après 30 minutes d'agitation à 0°C, le milieu est neutralisé par ajout d'acide acétique. Le méthanol est alors évaporé sous pression réduite et 20 mL d'eau sont ajoutés avant d'extraire à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur $MgSO_4$, et évaporées sous pression réduite.

Le composé est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant correspondant à sa polarité.

Pour le 1,1-diméthoxy-4-nitrobutan-2,3-diol 93

Rendement : 80 %

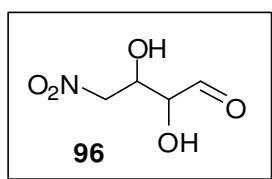
CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 2/8 : $R_f = 0,4$ et $0,35$), révélateur : vanilline.

La présence de diastéréoisomères complique les spectres RMN.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,68-4,52 (2dd, 1H, $J_{1-1'} = 10,5-13,0$ Hz, $J_{1-2} = 2,2-2,6$ Hz, H_1) ; 4,50-4,46 (2dd, 1H, $J_{1-1'} = 10,5-13,0$ Hz, $J_{1'-2} = 2,3-2,6$ Hz, $H_{1'}$) ; 4,41 (m; 1H, H_3) ; 4,39 (2d, 1H, $J_{4-3} = 5,9$ Hz, H_4) ; 3,60 (m, 1H, H_2) ; 3,51-3,49 (2s, 6H, $H_5, H_{5'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 106,3-104,8 (C_4) ; 76,7-75,4 (C_1) ; 71,2-70,2 (C_3) ; 69,2-68,7 (C_2) ; 55,4-55,3 ($C_5, C_{5'}$).

2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal **96**



$C_6H_{13}NO_6$; $M = 195,17$ g/mol

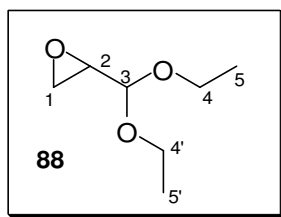
La molécule **96** a été obtenue à partir du composé **93**, en suivant le protocole de déprotection général indiqué page 238.

CCM (cyclohexane/ AcOEt: 4/6), révélateur : $KMnO_4$, $R_f = 0,2$.

Le spectre RMN 1H ne présente plus les pics caractéristiques de l'acétal.

3.2. Deuxième méthode : à partir de l'acroléine diéthylacétal

2-(diéthoxyméthyl)oxirane **88**



$C_7H_{14}O_3$; $M = 146,18$ g/mol

A une suspension de $KHCO_3$ (3,1 g, 30 mmol, 0,2 éq.) dans 80 mL de méthanol sont ajoutés l'acroléine diéthylacétal commerciale (23,4 mL, 150 mmol, 1 éq.) suivie de l'acétonitrile (9,7 mL, 180 mmol, 1,2 éq.) et de l'eau oxygénée à 30 % (18,9 mL, 180 mmol, 1,2 éq.). La solution est chauffée au bain marie à 40°C à l'abri de la lumière. Après 8 h, 20 h et 28 h de réaction, on ajoute un équivalent d'eau oxygénée (16 mL) et d'acétonitrile (8 mL).

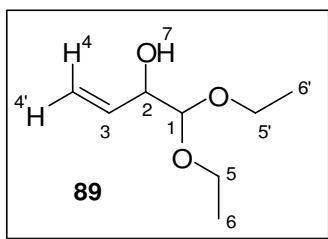
Après 40 h, la réaction est arrêtée par addition de 150 mL d'eau. On concentre sous pression réduite, puis le mélange réactionnel est extrait au dichlorométhane ; la phase aqueuse se trouble en raison de la présence d'acétamide. Les phases organiques rassemblées sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur $MgSO_4$, et évaporées sous pression réduite. 18,3 g d'un liquide incolore sont obtenus (rendement brut : 82 %). Le composé brut est utilisé dans la réaction suivante sans purification.

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2 : $R_f = 0,4$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,32 (d, $J_{2-3} = 4,4$ Hz, 1H, H_3) ; 3,72-3,58 (m, 4H, $H_4, H_{4'}$) ; 3,08 (m, 1H, H_2) ; 2,76 (m, 2H, H_1) ; 1,23 (pt, $J_{4-5} = 7,0$ Hz, 3H, H_5) ; 1,20 (t, $J_{4'-5'} = 7,0$ Hz, 3H, $H_{5'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 101,4 (C_3) ; 62,8 (C_4) ; 62,3 ($C_{4'}$) ; 51,8 (C_2) ; 43,8 (C_1) ; 15,2 ($C_5, C_{5'}$).

1,1-diéthoxybut-3-èn-2-ol **89**



$C_8H_{16}O_3$; $M = 160,21$ g/mol

Après recristallisation dans l'éthanol de l'iodure de tetraméthylsilane, le solide blanc obtenu (21 g, 0,1 mol, 3 éq.) est mis en suspension dans un mélange THF/pentane anhydre 50/50 (350 mL) avant d'être refroidi à $-10^{\circ}C$ sous argon. Une solution de *n*-BuLi (2,5 M dans l'hexane, 40 mL, 0,1 mmol, 3 éq.) est alors ajoutée goutte à goutte à cette température. La réaction est agitée 90 min à $-10^{\circ}C$. A ce mélange est ajouté lentement l'époxyde **88** (5 g, 34 mmol, 1 éq.) préalablement dilué dans 100 mL de THF distillé. Le milieu réactionnel est agité 30 min à $-10^{\circ}C$, puis 1 h à TA.

La réaction est stoppée par ajout de 200 mL d'une solution aqueuse saturée de NH_4Cl (50 mL). On concentre sous pression réduite ($20^{\circ}C$ -300 mmHg), on décante pour recueillir la phase organique. La phase aqueuse restante est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur $MgSO_4$, et évaporées sous pression réduite.

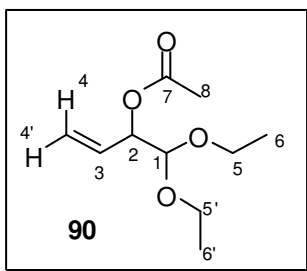
Le composé est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant en gradient dichlorométhane/acétone 98/02-96/04. 4,4 g d'un liquide jaune sont obtenus (rendement : 81 %).

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2 : $R_f = 0,3$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 5,92 (ddd, $J_{3-2} = 5,3$ Hz, $J_{3-4'} = 10,8$ Hz, $J_{3-4} = 17,4$ Hz, 1H, H_3) ; 5,39 (dd, $J_{4-4'} = 1,6$ Hz, $J_{3-4} = 17,4$ Hz, 1H, H_4) ; 5,22 (dd, $J_{4-4'} = 1,6$ Hz, $J_{3-4'} = 10,6$ Hz, 1H, $H_{4'}$) ; 4,28 (d, $J_{1-2} = 6,0$ Hz, 1H, H_1) ; 4,07 (dd, $J_{3-2} = 5,3$ Hz, $J_{1-2} = 6,0$ Hz, 1H, H_2), 3,75-3,57 (m, 4H, H_5 , $H_{5'}$) ; 2,28 (se, 1H, H_7) ; 1,23 (pt, $J_{5-6} = 7,0$ Hz, 3H, H_6) ; 1,20 (pt, $J_{5'-6'} = 7,0$ Hz, 3H, $H_{6'}$).

RMN ^{13}C (100, MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 135,6 (C_3) ; 116,6 (C_4) ; 104,6 (C_1) ; 72,7 (C_2) ; 63,5 (C_5 , $C_{5'}$) ; 15,2 (C_6 , $C_{6'}$).

1-(1,1-diéthoxyméthyl)prop-2-ènyl acétate **90**



$C_{10}H_{18}O_4$; $M = 202,25$ g/mol

La molécule **90** a été obtenue à partir du composé **89**, en suivant le protocole général d'estérification indiqué page 255.

Rendement = 83 %

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4 : $R_f = 0,8$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 5,90 (ddd, $J_{2-3} = 5,9$ Hz, $J_{4'-3} = 10,6$ Hz, $J_{3-4} = 17,2$ Hz, 1H, H_3), 5,31 (m, 2H, $H_4, H_{4'}$), 5,25 (ddd, $J_{4-2} = 1,5$ Hz, $J_{2-3} = 5,9$ Hz, $J_{2-1} = 5,7$ Hz, 1H, H_2), 4,44 (d, $J_{1-2} = 5,7$ Hz, 1H, H_1), 3,70-3,56 (m, 4H, $H_5, H_{5'}$), 2,10 (s, 3H, H_8), 1,20 (t, $J_{5-6} = 7,1$ Hz, 3H, H_6), 1,19 (t, $J_{5'-6'} = 7,1$ Hz, 3H, $H_{6'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 169,9 (C_7), 132,3 (C_3), 118,1 (C_4), 102,3 (C_1), 73,7 (C_2), 63,5 (C_5), 62,8 ($C_{5'}$), 21,0 (C_8), 15,2 (C_6), 15,1 ($C_{6'}$).

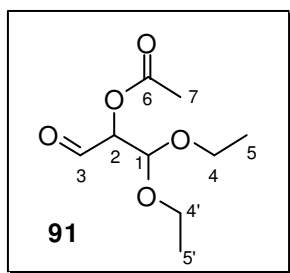
Analyse élémentaire :

	$C_{10}H_{18}O_4$ (202,25)		
	C %	H %	O %
Calculé :	59,39	8,97	31,64
Trouvé :	59,62	9,19	31,19

IR (cm^{-1}) : 3092 (v =C-H); 2976-2888 (v C-H alkyles) ; 1744 (v C=O) ; 1645 (v C=C) ; 1445-1373 (δ C-H alkyles) ; 1236 (v C-O ester) ; 1067 (v C-O acétal) ; 737 (δ =C-H).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{10}H_{18}O_4 + Na^+$] 225,1103 ; trouvée 225,1105.

1-(1,1-diéthoxyméthyl)-1-formylméthyl acétate **91**



$C_9H_{16}O_5$; $M = 204,22$ g/mol

La molécule **91** a été obtenue à partir du composé **90**, en suivant le protocole général d'oxydation par ozonolyse classique indiqué page 256.

Rendement = 74 %

CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4 : $R_f = 0,6$), révélateur : vanilline.

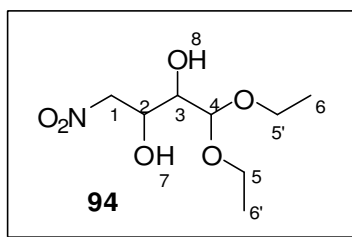
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,62 (s, 1H, H_3), 5,17 (d, $J_{2-1} = 4,8$ Hz, 1H, H_2), 4,72 (d, $J_{2-1} = 4,9$ Hz, 1H, H_1), 3,75-3,59 (m, 4H, H_4, H_4'), 2,18 (s, 3H, H_7), 1,23 (m, 3H, H_5), 1,21 (m, 3H, H_5').

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 195,9 (C_3), 169,9 (C_6), 101,0 (C_1), 77,7 (C_2), 64,3 (C_4), 63,5 (C_4'), 20,5 (C_7), 15,0 (C_5-C_5').

IR (cm^{-1}) : 2980-2899 (ν C-H alkyles) ; 2733 (ν C-H aldéhyde) ; 1740 (ν C=O) ; 1445-1375 (δ C-H alkyles) ; 1233 (ν C-O ester) ; 1067 (ν C-O acétal).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_9H_{16}O_5 + CH_3OH + Na^+$] 259,1158 ; trouvée 259,1158.

4,4-diéthoxy-1-nitrobutane-2,3-diol **94**



$C_8H_{17}NO_6$; $M = 223,22$ g/mol

La molécule **94** a été obtenue à partir du composé **91**, en suivant le protocole général de la réaction de Henry indiqué page 257.

Rendement = 80 %

CCM (cyclohexane/AcOEt 2/8 : $R_f = 0,4-0,35$), révélateur : vanilline.

La présence de diastéréoisomères complique les spectres RMN.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,71-4,51 (m, 2H, H_1) ; 4,61-4,51 (m, 1H, H_2) ; 4,61-4,60 (2 d, $J_{4-3} = 5,4-7,0$ Hz, 1H, H_4) ; 3,82-3,63 (m, 4H, $H_5, H_{5'}$), 3,63-3,51 (2 dd, $J_{4-3} = 5,4-7,0$ Hz, $J_{3-2} = 1,1-1,5$ Hz, 1H, H_3) ; 3,35-2,99 (se, 2H, H_7-H_8) ; 1,25 (pt, $J_{5'-6'} = 7,0$ Hz, 3H, H_6) ; 1,24 (pt, $J_{5'-6'} = 7,0$ Hz, 3H, $H_{6'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 102,6 (C_4), 78,1-77,8 (C_1), 71,2-70,8 (C_2), 69,0-67,5 (C_3), 64,8-64,1 (C_5), 64,0-63,8 ($C_{5'}$), 15,0 (C_6), 14,9-14,8 ($C_{6'}$).

Analyse élémentaire :

$C_8H_{17}NO_6$ (223,22)

	C %	H %	O %	N %
Calculé :	43,04	7,68	43,01	6,27
Trouvé :	42,88	7,65	43,39	6,08

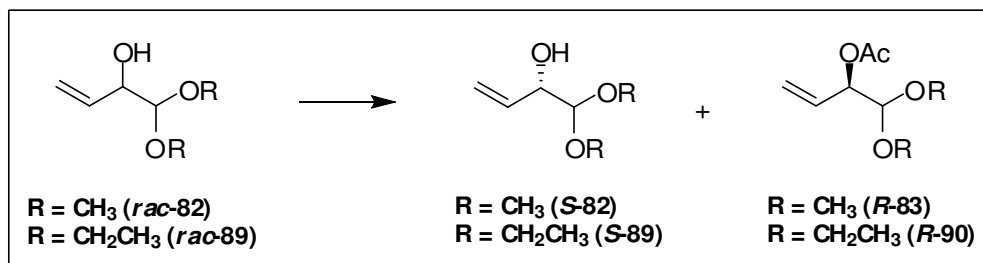
IR (cm^{-1}) : 3430 (v O-H); 2978-2901 (v C-H alkyles) ; 1557 (v N=O) ; 1423-1348 (δ C-H alkyles) ; 1381 (v N=O) ; 1117 (v C-O alcool) ; 1061 (v C-O acétal).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_8H_{17}NO_6 + Na^+$] 246,0962 ; trouvée 246,0954.

4. Synthèse des aldéhydes dihydroxylés *S*-96 et *R*-96 optiquement purs

4.1. Le dédoublement cinétique

Dédoublement cinétique des composés 82 et 89



Protocole général présenté avec l'alcool 89 :

A l'alcène racémique **89** (4,4 g, 27 mmol) dilué dans 80 mL d'acétate de vinyle, est ajoutée la lipase de *Candida antarctica* supportée (Novozym435[®], 10 U/mg, 2,2 g). La réaction est agitée sur un plateau orbitalaire 28h à TA. La réaction, suivie par CPV, est stoppée par filtration après 50 % de conversion. Le solvant de réaction est évaporé, et le mélange obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient dichlorométhane/acétone 99,5/0,5 - 96/04).

L'alcool **S-89** (2,0 g, rendement : 49 %, *ee* = 96 %) et l'acétate **R-90** (2,5 g, rendement : 45 %, *ee* > 98 %) ont ainsi pu être isolés sous forme énantiomériquement purs.

Alcools **S-82** et **S-89**

Les spectres de RMN du ¹H et du ¹³C sont conformes à ceux obtenus pour les alcools racémiques.

$$\mathbf{S-82} : [\alpha]_D^{25} = -46 \text{ (c = 1, CHCl}_3\text{)}$$

$$\text{Rendement : 46 \%, ee = 98 \%}$$

$$\mathbf{S-89} : [\alpha]_D^{25} = -29 \text{ (c = 1, CHCl}_3\text{)}$$

$$\text{Rendement : 49 \%, ee = 96 \%}$$

Acétate **R-83** et **R-90**

Les spectres de RMN du ¹H et du ¹³C sont conformes à ceux obtenus pour les acétates racémiques.

$$\mathbf{R-83} : [\alpha]_D^{25} = 31 \text{ (c = 1,34 ; CHCl}_3\text{)}$$

$$\text{Rendement : 44 \%, ee > 98 \%}$$

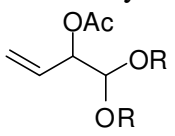
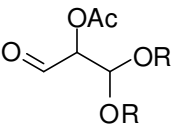
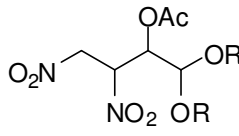
$$\mathbf{R-90} : [\alpha]_D^{25} = 27 \text{ (c = 1,005, CHCl}_3\text{)}$$

$$\text{Rendement : 45 \%, ee > 98 \%}$$

Suivi CPV des dédoublements :

Colonne normale <i>OPTIMA.1</i>	<u>Gradient de température</u> T1 = 40°C, 5 min V = 5°C/min T2 = 150°C, 5 min Injecteur/détecteur : 230°C Gaz vecteur : H ₂ , 12 Psi (0,8 bar)	<u>Temps de rétention</u> -alcool 82 : 467 s -ester 83 : 785 s -alcool 89 : 702 s -ester 90 : 952 s
Colonne chirale <i>Chiraldex G-TA</i>	<u>Isotherme</u> Alcool : T = 65°C, 30 min Ester : T = 70°C, 30 min Injecteur/détecteur : 230°C Gaz vecteur : H ₂ , 21 Psi (1,5 bar)	<u>Temps de rétention</u> -alcool R-82 : 756 s alcool S-82 : 814 s -ester R-83 : 1145 s ester S-83 : 1197 s -alcool R-89 : 961 s alcool S-89 : 1019 s -ester R-90 : 1388 s ester S-90 : 1435 s

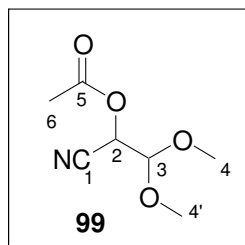
La suite réactionnelle aboutissant aux aldéhydes **S-96** et **R-96** est identique à la version racémique et les modes opératoires ne seront donc pas redétaillés. Les pouvoirs rotatoires de chaque composé optiquement pur sont présentés dans le tableau suivant :

Analyses dans CHCl ₃	Analyses dans CHCl ₃
 R = CH ₃ , 83 R = CH ₂ CH ₃ , 90	R-83 : $[\alpha]_D^{25} = 31$ (c = 1,34) S-83 : $[\alpha]_D^{25} = -30$ (c = 1,3) R-90 : $[\alpha]_D^{25} = 27$ (c = 1,005) S-90 : $[\alpha]_D^{25} = -27$ (c = 1)
 R = CH ₃ , 84 R = CH ₂ CH ₃ , 91	R-84 : $[\alpha]_D^{25} = 32$ (c = 1,04) S-84 : $[\alpha]_D^{25} = -39$ (c = 1,29) R-91 : $[\alpha]_D^{25} = 29$ (c = 1,005) S-91 : $[\alpha]_D^{25} = -28$ (c = 1)
 R = CH ₃ , 93 R = CH ₂ CH ₃ , 94	R-93 : $[\alpha]_D^{25} = 20$ (c = 1,05) S-93 : $[\alpha]_D^{25} = -7$ (c = 1,1) R-94 : $[\alpha]_D^{25} = 20$ (c = 1) S-94 : $[\alpha]_D^{25} = -21$ (c = 1,65)

4.2. Le dédoublement dynamique

Mise au point de la synthèse chimique de l'aldéhyde 84 racémique par les cyanhydrines

1-cyano-2,2-diméthoxyéthyl acétate 99



C₇H₁₁NO₄ ; M = 173,17 g/mol

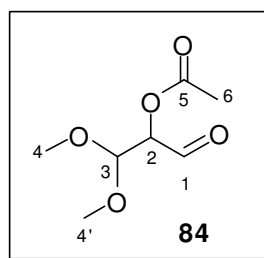
A l'aldéhyde **87** fraîchement préparé (2,85 mmol, 300 mg) et dilué dans 5 mL de dichlorométhane anhydre sont ajoutés l'acétone cyanhydrine (1,5 éq 400 µL), suivie de la triéthylamine (2 éq., 800 µL) et de l'acide acétique (1,5 éq., 400 µL). Le milieu est agité sous argon à TA durant une nuit. On ajoute 6 mL d'une solution de NH₄Cl saturée et le mélange est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3. Le produit est obtenu avec un rendement de 73 %.

CCM (cyclohexane/AcOEt 7/3 : R_f = 0,3), révélateur : vanilline.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 5,40 (d, J₃₋₂ = 5,9 Hz 1H, H₂), 4,60 (d, J₃₋₂ = 5,9 Hz 1H, H₃), 3,53 (s, 3H, H₄), 3,43 (s, 3H, H_{4'}), 2,17 (s, 3H, H₆).

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) 170,2 (C₅), 120,6 (C₁), 102,9 (C₃), 70,3 (C₂), 54,7-54,5 (C₄-C_{4'}), 20,3 (C₆).

2-acétoxy-3,3-diméthoxypropanal 84



C₇H₁₀O₅ : M = 176,17

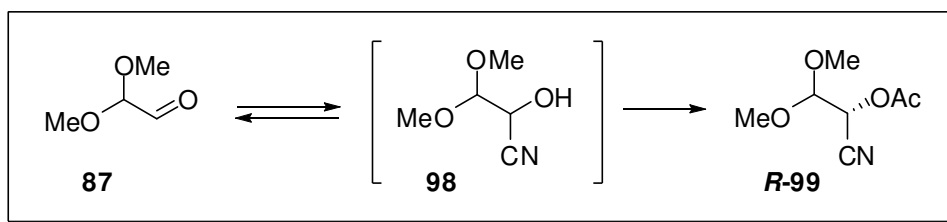
Au composé **99** dilué dans un mélange AcOH/eau 1/1 est ajouté à 0°C le nickel de Raney suivi de l'hypophosphite de sodium. Le mélange est agité 30 min à 0°C. On filtre par ultrafiltration et la phase aqueuse obtenue est extraite au dichlorométhane. Les phases

organiques sont lavées avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5 %, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit est obtenu avec un rendement de 67 % sans purification.

Les analyses du produit restent identiques à celles obtenues précédemment.

Conditions optimisées de dédoublement dynamique de la cyanhydrine **98**

Dédoublement dynamique de la cyanhydrine **98**

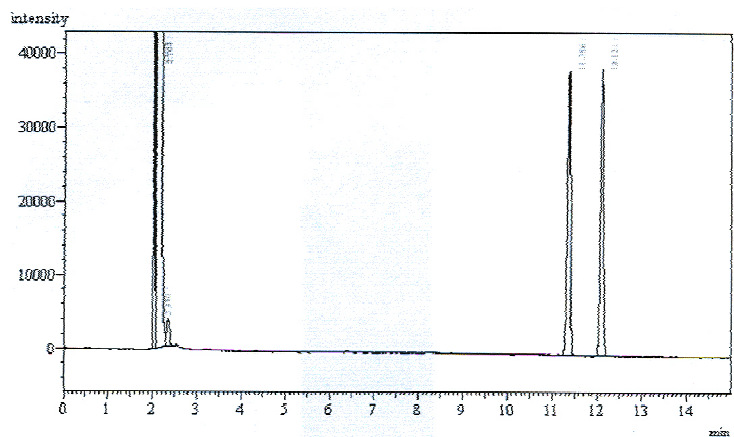


A l'aldéhyde **87** (1 mmol, 100 mg) fraîchement préparé et dilué dans 2 mL de toluène anhydre sont ajoutés NaCN (50 mg, 1 éq.), suivi de l'acétone cyanhydrine (180 µL, 2 éq.). L'acétate de vinyle (1,1 mL, 12 éq.) et l'enzyme Novozym435[®] (0,1 g, 1000 U) sont alors ajoutés. La réaction est agitée sur un plateau orbitalaire 6 jours à TA. L'enzyme est filtrée et la phase organique est concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4). Rendement : 78 %, *ee* = 27 %.

Suivi CPV des dédoublements :

	<u>Gradient de température</u>	
	T1 = 40°C, 5 min	
	V = 5°C/min	
	T2 = 150°C, 5 min	
Colonne normale <i>OPTIMA.1</i>	Injecteur/détecteur : 230°C	<u>Temps de rétention</u>
	Gaz vecteur : H ₂ , 14 Psi (1 bar)	-acétone cyanhydrine : 183 s
	<u>Isotherme</u>	-alcool 98 : 113 s
	T = 100°C	-ester 99 : 1020 s
	Injecteur/détecteur : 230°C	
	Gaz vecteur : H ₂ , 14 Psi (1 bar)	<u>Temps de rétention</u>
	<u>Isotherme</u>	-ester 99 : 241 s
	T = 120°C	
Colonne chirale <i>CycloSil-β</i> (60 m)	Injecteur/détecteur : 230°C	<u>Temps de rétention</u>
	Gaz vecteur : H ₂ , 2 bar	R-99 et S-99 : 11,4 et 12,1 min

**Chromatogramme de
l'acétate racémique 99 sur
colonne chirale :**

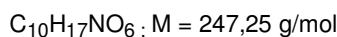
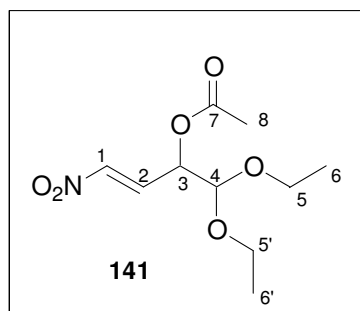


IV. Synthèse des précurseurs azotés (amine masquée)

1. Essais d'obtention de l'aldéhyde 143

Première méthode : passage par un acétate

1-(1,1-diéthoxyméthyl)-3-nitroprop-2-ènyl acétate 141



A une solution du diol **96** (220 mg, 1 mmol) dans 5 ml de dichlorométhane anhydre est ajouté sous argon 180 μ L d'anhydride acétique et quelques milligrammes du catalyseur DMAP (0,04 éq.). La réaction est agitée une nuit à TA. Un suivi par CCM montre l'apparition d'un nouveau produit supposé être la molécule diacétylée. 5 équivalents de triéthylamine distillée sont alors ajoutés, et la réaction, suivie régulièrement par CCM, est agitée 25 min (attention, un temps de réaction plus long dégrade le produit). Le milieu réactionnel après dilution au dichlorométhane est lavé trois fois par de l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée, et évaporées sous pression réduite. Le composé est purifié par chromatographie sur gel de silice avec du dichlorométhane pur comme éluant.

140 mg d'un liquide orangé sont obtenus, rendement = 58 %.

CCM (dichlorométhane pur : $R_f = 0,5$), révélateur : vanilline.

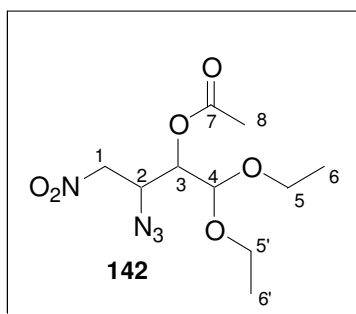
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7,28 (dd, $J_{2-3} = 4,8$ Hz, $J_{2-1} = 13,5$ Hz 1H, H_2) ; 7,08 (dd, $J_{1-3} = 1,1$ Hz, $J_{1-2} = 13,5$ Hz, 1H, H_1) ; 5,56 (ddd, $J_{1-3} = 1,1$ Hz, $J_{2-3} = 4,8$ Hz, $J_{4-3} = 4,9$ Hz, 1H, H_3) ; 4,55 (d, $J_{4-3} = 4,9$ Hz, 1H, H_4) ; 3,73-3,57 (m, 4H, H_5 , $H_{5'}$) ; 2,15 (s, 3H, H_8) ; 1,21 (m, 6H, H_6 , $H_{6'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 169,3 (C_7) ; 140,8 (C_2) ; 136,1 (C_1) ; 101,5 (C_4) ; 69,9 (C_3) ; 64,6-63,5 (C_5 - $C_{5'}$) ; 20,6 (C_8) ; 15,1-15,0 (C_6 - $C_{6'}$).

IR (cm^{-1}) : 2980-2889 (v C-H alkyles) ; 1750 (v C=O) ; 1532 (v N=O) ; 1353 (v N=O) ; 1225 (v C-O ester) ; 1066 (v C-O acétal).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{10}H_{17}NO_6 + Na^+$] 270,0954 ; trouvée 270,0956.

2-azido-1-(1,1-diéthoxyméthyl)-3-nitropropyl acétate 142



$C_{10}H_{18}N_4O_6$; $M = 290,27$ g/mol

Protocole général d'introduction d'un groupement azido en α d'un NO_2

Dans 7 mL de toluène anhydre sont dilués du $TMSN_3$ (500 μ L, 4 mmol, 4 eq.) et AcOH (220 μ L, 4 mmol, 4 eq.) sous argon. Après 15 min d'agitation à TA, la triéthylamine est ajoutée (26 μ L, 0,2 mmol, 0,2 eq.), suivie de l'alcène considéré (1 mmol, 1 eq.) dilué au préalable dans 3 mL de toluène. Après une nuit d'agitation à TA, la réaction est stoppée par ajout d'eau (10 mL). Le milieu est extrait au dichlorométhane puis les phases organiques sont lavées avec une solution saturée de NaCl. Après séchage sur $MgSO_4$, elles sont filtrées et concentrées sous pression réduite. Le rendement est quantitatif.

Pour le composé 142

CCM (dichlorométhane pur : $R_f = 0,45$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,75 (dd, $J_{1-1'} = 2,4$ Hz, $J_{2-1} = 14,1$ Hz 1H, H_1) ; 4,52-4,36 (m, 3H, H_2 , H_4 , $H_{1'}$) ; 4,86 (m, 1H, H_3) ; 3,73-3,57 (m, 4H, H_5 , $H_{5'}$) ; 2,15 (s, 3H, H_8) ; 1,23 (m, 6H, H_6).

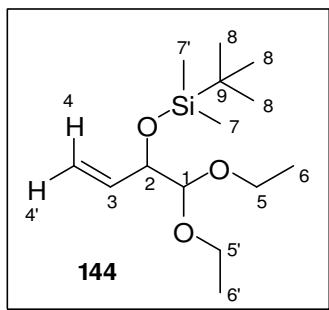
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 169,8 (C_7). 101,0 (C_4) ; 75,0 (C_1) ; 72,6 (C_3) ; 64,7 (C_5) ; 64,1 ($C_{5'}$) ; 58,5 (C_2) ; 20,6 (C_8) ; 15,2 (C_6) ; 15,1 ($C_{6'}$).

IR (cm^{-1}) : 2980-2897 (v C-H alkyles) ; 2134 (v $-N=N=N$) ; 1750 (v C=O) ; 1559 (v N=O) ; 1376 (v N=O) ; 1225 (v C-O ester) ; 1066 (v C-O acétal).

HR-MS ES $^+$: m/z calculée [$C_{10}H_{18}N_4O_6 + Na^+$] 313,1124 ; trouvée 313,1135.

Deuxième méthode : passage par un silylé

2-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-1,1-diéthoxybut-3-ène 144



$C_{14}H_{30}O_3Si$; $M = 274,47$ g/mol

A l'alcool **89** (500 mg, 3,1 mmol, 1 éq.) dilué dans du DMF distillé (20 mL) est ajoutée du TBDMSCl (0,6 g, 3,7 mmol, 1.2 éq.) ainsi que de l'imidazole (0,4 g, 6,2 mmol, 2 éq.). La réaction est agitée une nuit sous argon à TA. Le milieu est alors extrait au dichlorométhane (3 x 20 mL) et lavé à l'eau (2 x 10 mL). Les phases organiques sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur $MgSO_4$, et évaporées sous pression réduite. Le composé brut obtenu est utilisé dans la réaction suivante sans purification. Le rendement est quantitatif.

CCM (cyclohexane/AcOEt 8/2 : $R_f = 0,8$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 5,94 (ddd, $J_{3-2} = 5,1$ Hz, $J_{3-4'} = 10,6$ Hz, $J_{3-4} = 17,4$ Hz, 1H, H_3) ; 5,31 (td, $J_{4-4'} = 1,5$ Hz, $J_{3-4} = 17,4$ Hz, 1H, H_4) ; 5,15 (td, $J_{4-4'} = 1,5$ Hz, $J_{3-4'} = 10,4$ Hz, 1H, $H_{4'}$) ; 4,17 (d, $J_{1-2} = 5,9$ Hz, 1H, H_1) ; 4,08 (m, 1H, H_2) ; 3,69-3,57 (m, 2H, $H_5, H_{5'}$) ; 1,21 (m, 6H, H_6-H_6') ; 0,89 (s, 9H, H_8) ; 0,07 (s, 3H, H_7) ; 0,04 (s, 3H, $H_{7'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 137,2 (C_3) ; 115,6 (C_4) ; 105,7 (C_1) ; 74,8 (C_2) ; 64,0-63,8 (C_5-C_5') ; 25,8 (C_8) ; 18,3 (C_9) ; 15,2 (C_6-C_6') ; -4,7 (C_7-C_7').

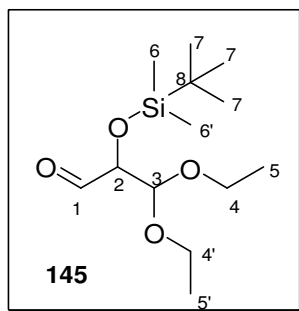
Analyse élémentaire : $C_8H_{17}NO_6$ (223,22)

	C %	H %
Calculé :	61,26	11,02
Trouvé :	61,01	11,34

IR (cm^{-1}) : 2976-2859 (v C-H alkyles) ; 1647 (v C=C) ; 1473-1362 (δ C-H alkyles) ; 1256 (δ Si-C) ; 1119 (v C-O ether, v Si-O) ; 1069 (v C-O acétal) ; 837 (γ Si-C) ; 777 (v Si-C).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{14}H_{30}O_3Si + Na^+$] 297,1862 ; trouvée 297,1874.

2-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3,3-diéthoxypropanal **145**



$C_{13}H_{28}O_4Si$; $M = 276,47$ g/mol

La molécule **145** a été obtenue à partir du composé **144**, en suivant le protocole général d'ozonolyse indiqué page 256.

Rendement : 79 %

CCM (cyclohexane/ AcOEt 7/3 : $R_f = 0,7$), révélateur : vanilline.

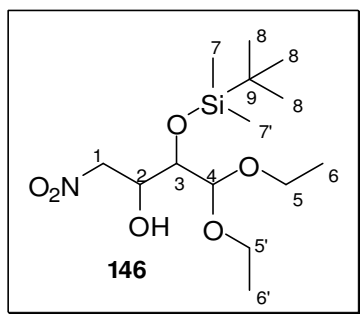
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,67 (d, $J_{1-2} = 1,5$ Hz, 1H, H_1) ; 4,52 (d, $J_{2-3} = 5,1$ Hz, 1H, H_3) ; 4,10 (dd, $J_{1-2} = 1,3$ Hz, $J_{2-3} = 5,1$ Hz, 1H, H_2) ; 3,75-3,60 (m, 4H, H_4) ; 1,23 (t, 3H, H_5) ; 1,96 (m, 3H, H_5') ; 0,91 (s, 9H, H_7) ; 0,09 (s, 6H, H_6, H_6').

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 200,7 (C_1) ; 100,2 (C_3) ; 79,2 (C_2) ; 64,2-64,1 (C_4 - C_4') ; 25,6 (C_7) ; 17,9 (C_8) ; 15,2 (C_5) ; -3,6 (C_6) ; -5,1 (C_6').

IR (cm^{-1}) : 2976-2859 (v C-H alkyles) ; 1740 (v C=O) ; 1473-1362 (δ C-H alkyles) ; 1256 (δ Si-C) ; 1163 (v Si-O) ; 1117 (v C-O ether) ; 1071 (v C-O acétal) ; 837 (γ Si-C) ; 779 (v Si-C).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{13}H_{28}O_4Si + Na^+$] 299.1655 ; trouvée 299.1669.

3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-4,4-diéthoxy-1-nitrobutan-2-ol **146**



C₁₄H₃₁NO₆Si ; M = 337,48 g/mol

A une solution de l'aldéhyde **145** (0,25 g, 1,2 mmol) dans du nitrométhane (1,5 mL) est ajouté à -20°C deux gouttes de tétraméthylguanidine ; le milieu se colore en jaune. Après 1 h d'agitation à cette température, on neutralise par un ajout d'acide acétique.. 30 mL d'eau sont ajoutés au milieu avant extraction à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄, et évaporées sous pression réduite.

Le composé est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 85/15.

0,34 g d'un liquide incolore sont obtenus, rendement = 84 %.

CCM (cyclohexane/ AcOEt 7/3 : R_f = 0,4), révélateur : vanilline.

La présence de diastéréoisomères complique les spectres de RMN.

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) 4,68 (m, 1H, H₂), 4,56 (m, 1H, H₁), 4,47 (m, 1H, H_{1'}), 4,41-4,39 (2d, J₄₋₃ = 4,2 Hz, 1H, H₄), 3,76 (m, 1H, H₃), 3,75-3,58 (m, 2H, H₅, H_{5'}), 1,23 (m, 6H, H₆-H_{6'}), 0,91-0,92 (2s, 9H, H₈), 0,13-0,12 (2s, 6H, H₇-H_{7'}).

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) 104,6-104,5 (C₄), 78,6-78,2 (C₁), 74,4-72,6 (C₃), 70,5-69,5 (C₂), 65,5-65,3 (C₅), 64,6-64,3 (C_{5'}), 26,9 (C₈), 25,8-25,7 (C₉), 15,3 (C₆), 15,1 (C_{6'}), -4,4 (C₇), -4,8 (C_{7'}).

Analyse élémentaire :

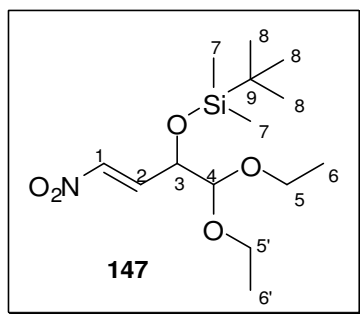
C₁₄H₃₁NO₆Si (337,48)

	C %	H %	N %
Calculé :	49,82	9,26	4,15
Trouvé :	49,91	9,55	4,34

IR (cm⁻¹) : 3478 (ν O-H) ; 2976-2859 (ν C-H alkyles) ; 1557 (ν N=O) ; 1471-1422 (δ C-H alkyles) ; 1375 (ν N=O) ; 1254 (δ Si-C) ; 1118 (ν C-O ether, ν Si-O) ; 1063 (ν C-O acétal) ; 837 (γ Si-C) ; 779 (ν Si-C).

HR-MS ES⁺ : m/z calculée [C₁₄H₃₁NO₆Si + Na⁺] 360,1818 ; trouvée 360,1824.

3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-4,4-diéthoxy-1-nitrobut-1-ène 147



$C_{14}H_{29}NO_5Si$; $M = 319,48$ g/mol

Protocole général d'élimination d'un hydroxyle en α d'un NO_2

Au nitroalcool (1,5 mmol) dilué dans 10 mL d'éther anhydre est ajouté sous argon de la triéthylamine (625 μ L, 3 éq.). Après refroidissement du mélange à 0°C, 345 μ L de chlorure de mésyle (3 éq.) sont ajoutés goutte à goutte. Après 15 min à 0°C, on ajoute 10 mL d'eau puis on extrait au dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur $MgSO_4$ et évaporées sous pression réduite. Le composé est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant correspondant à sa polarité et de manière à éliminer l'excès de MsCl.

Pour le composé 147

Rendement : 97 %

CCM (cyclohexane/ AcOEt 8/2 : $R_f = 0,7$), révélateur : vanilline.

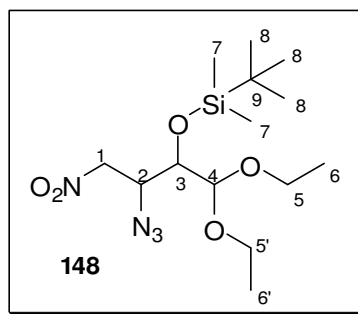
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7,38 (dd, $J_{2-3} = 3,8$ Hz, $J_{2-1} = 13,2$ Hz 1H, H_2) ; 7,12 (dd, $J_{1-3} = 2,0$ Hz, $J_{1-2} = 13,2$ Hz, 1H, H_1) ; 4,39 (ddd, $J_{1-3} = 2,0$ Hz, $J_{2-3} = 3,8$ Hz, $J_{4-3} = 5,3$ Hz, 1H, H_3) ; 4,28 (d, $J_{4-3} = 5,3$ Hz, 1H, H_4) ; 3,73-3,57 (m, 4H, H_5 , $H_{5'}$) ; 1,23 (t, $J_{6-5} = 7,0$ Hz, 3H, H_6) ; 1,20 (t, $J_{6'-5'} = 7,0$ Hz, 3H, $H_{6'}$) ; 0,91 (s, 9H, H_8) ; 0,11 (s, 3H, H_7) ; 0,07 (s, 3H, $H_{7'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 142,0 (C_2) ; 140,4 (C_1) ; 104,9 (C_4) ; 71,8 (C_3) ; 64,8 (C_5) ; 64,7 ($C_{5'}$) ; 25,7 (C_8) ; 18,1 (C_9) ; 15,3 (C_6) ; 15,2 ($C_{6'}$) ; -5,0 (C_7) ; -4,9 ($C_{7'}$).

IR (cm^{-1}) : 2978-2859 (v C-H alkyles) ; 1557 (v N=O) ; 1375 (v N=O) ; 1254 (δ Si-C) ; 1225 (v Si-O) ; 1118 (v C-O ether) ; 1066 (v C-O acétal) ; 837 (γ Si-C) ; 779 (v Si-C).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{14}H_{29}NO_5Si + Na^+$] 342,1710 ; trouvée 342,1714.

2-azido-3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-4,4-diéthoxy-1-nitrobutane **148**



$C_{14}H_{30}N_4O_5Si$; $M = 362,5$ g/mol

La molécule **148** a été obtenue à partir du composé **147**, en suivant le protocole général d'introduction d'un groupement N_3 en α d'un NO_2 indiqué page 270.

CCM (cyclohexane/ AcOEt 8/2 : $R_f = 0,65$), révélateur : vanilline.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,75 (dd, $J_{1-1'} = 2,4$ Hz, $J_{2-1} = 14,1$ Hz 1H, H_1) ; 4,52-4,36 (m, 3H, $H_2, H_4, H_{1'}$) ; 4,86 (m, 1H, H_3) ; 3,73-3,57 (m, 2H, $H_5, H_{5'}$) ; 1,23 (m, 6H, H_6) ; 0,91 (s, 9H, H_8) ; 0,15 (s, 3H, H_7) ; 0,12 (s, 3H, $H_{7'}$).

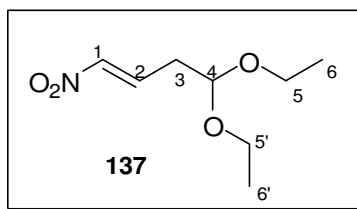
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 103,7 (C_4) ; 75,4 (C_1) ; 75,0 (C_3) ; 65,5 (C_5) ; 64,7 ($C_{5'}$) ; 61,0 (C_2) ; 25,7 (C_8) ; 18,0 (C_9) ; 15,3 (C_6) ; 15,2 ($C_{6'}$) ; -4,6 (C_7) ; -4,9 ($C_{7'}$).

IR (cm^{-1}) : 2978-2859 (v C-H alkyles) ; 2124 (v $-N=N=N$) ; 1553 (v $N=O$) ; 1375 (v $N=O$) ; 1254 (δ Si-C) ; 1118 (v C-O ether, v Si-O) ; 1066 (v C-O acétal) ; 837 (γ Si-C) ; 779 (v Si-C).

HR-MS ES+ : m/z calculée [$C_{14}H_{30}N_4O_5Si + Na^+$] 385,1883 ; trouvée 385,1894.

2. Synthèse de l'aldéhyde 154

4,4-diéthoxy-1-nitrobut-1-ène 137



$C_8H_{15}NO_4$; $M = 189,21$ g/mol

La molécule **137** a été obtenue à partir de l'alcool **92**, en suivant le protocole général d'élimination d'un hydroxyle en α d'un NO_2 indiqué page 274.

Rendement quantitatif, configuration E.

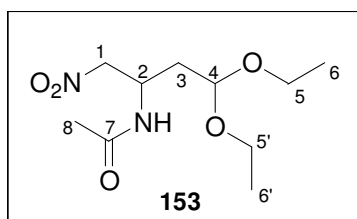
CCM (cyclohexane/ AcOEt 7/3 : $R_f = 0,6$), révélateur : vanilline.

IR : ν (cm^{-1}) : 1652 (ν C=C) ; 1527 (ν N=O) ; 1350 (ν N=O) ; 1122-1061 (ν C-O acétal).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7,17 (m, 1H, H_2) ; 6,96 (d, $J_{1-2} = 14$ Hz, 1H, H_1) ; 4,53 (t, 2H, $J_{4-3} = 5,3$ Hz, H_4) ; 3,62-3,43 (m, 4H, H_5) ; 2,51 (dd, 2H, $J_{3-4} = 5,3$ Hz, $J_{3-2} = 5,4$, H_3) ; 1,16 (t, 6H, $J_{6-5} = 7,2$ Hz, H_6).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : 141,1 (C_1) ; 137,3 (C_2) ; 100,5 (C_4) ; 62,0 (C_5) ; 33,2 (C_3) ; 15,2 (C_6).

N-(3,3-diéthoxy-1-nitrométhylpropyl) acétamide 153



$C_{10}H_{20}N_2O_5$; $M = 248,28$ g/mol

Dans une solution de l'alcène **137** brut (8,94 g, 47 mmol) dans 160 mL de méthanol et refroidie à 4 °C est mis à buller de l'ammoniaque liquide pendant environ 1 heure. Le courant d'ammoniaque est arrêté (suivi CCM) et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est une huile rouge pâteuse. Celle-ci est dissoute dans 100 mL de dichlorométhane avant ajout de pyridine (21 mL, 7 éq.) et d'anhydride acétique (25 mL, 7 éq.). La réaction est agitée une nuit à 4°C. Le milieu est lavé par une solution aqueuse saturée de $CuSO_4$ et extrait par du

dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite. 7,2 g d'une huile marron sont obtenus (61 % de rendement brut depuis **137**). Celle-ci peut être purifiée par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/MeOH 96/4). Rendement purifié : 51 %.

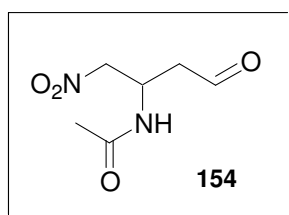
CCM (cyclohexane/ AcOEt 4/6 : $R_f = 0,25$), révélateur : vanilline.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) 6,46-6,39 (m, 1H, -NH), 4,70-4,50 (m, 4H, H_1 , H_4 , H_2), 3,67-3,48 (m, 4H, H_5 , H_5'), 1,99-1,94 (m, 4H, H_8 , H_3), 1,25-1,15 (m, 6H, H_6 , H_6').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 170,0 (C_7), 100,8 (C_4), 77,3 (C_1), 62,8 and 62,6 (C_5 - C_5'), 44,9 (C_2), 35,0 (C_3), 23,1 (C_8), 15,2-15,1 (C_6 - C_6').

HR-MS ES+: m/z calculée [$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{Na}$] $^+$ 271,2700; trouvée 271,1270.

N*-(1-nitrométhyl-3-oxopropyl) acétamide **154*



$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$; $M = 174,15$ g/mol

La molécule **154** a été obtenue à partir de l'acétal **153**, en suivant le protocole général de déprotection indiqué page 238.

CCM (cyclohexane/ AcOEt 4/6 : $R_f = 0,1$), révélateur : vanilline.

Le spectre RMN ^1H ne présente plus les pics caractéristiques de l'acétal.

V. Couplages enzymatiques : formation des nitrocyclitols

1. Protocole enzymatique général avec la F1PA et la R1PA

La première étape enzymatique, correspondant à la formation du DHAP, est tout d'abord réalisée sur 0,3 mmol de DHA et un volume total de réaction de 6 mL (voir mode opératoire décrit précédemment). Après accumulation du DHAP jusqu'à 100 %, la deuxième réaction enzymatique (l'aldolisation) peut être lancée à la suite. Au milieu réactionnel sont ainsi ajoutés, pour un volume total de 9 mL :

- 53 mg de l'aldéhyde (450 μ mol, 1,5 éq)
- 10 μ L de ZnCl_2 10 mM
- 900 μ L de DMSO (pour un aldéhyde non soluble dans l'eau, sinon remplacer par H_2O)
- 1900 μ L d'eau distillée

Le pH est ajusté à 6,9

- 200 μ L de l'aldolase (43 U/mL) = 9U

Le dosage de l'aldol linéaire formé est possible les premières heures de réaction, puis disparaît du milieu par cyclisation. C'est donc un dosage du DHAP du milieu qui nous permet de suivre la réaction (mode opératoire dans la partie précédente).

Après disparition totale du DHAP, le pH de la réaction est ajusté à 3,9 et le milieu est centrifugé. La phytase acide est alors additionnée (18 mg = 20 U) et le mélange est agité pendant 24 h. Après centrifugation de la réaction, la solution est concentrée sous pression réduite dans un bain à 30°C. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1).

La phytase n'étant plus commerciale, elle a été remplacée par la phosphatase de germe de blé (pH optimal de 4,8) en suivant le même protocole que ci-dessus, mais en augmentant le nombre d'unités utilisées (30 U au lieu de 20 U).

2. Protocole enzymatique général avec les FSA

A l'aldéhyde (4,3 mmol) dissout dans 50 mL d'eau sont ajoutées la DHA (320 mg, 3,6 mmol) et la FSA (338 U). La réaction est agitée 17 h à 25°C. Après disparition totale de la DHA, 50 mL de méthanol sont ajoutés, et le mélange est centrifugé (40 min, 10000 rpm, 5°C). Le surnageant est concentré sous pression réduite, aboutissant à une huile jaune. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1). Les énantiomères isolés sont analysés par RMN.

3. Dosage de l'aldol formé

Dans une cuvette plastique de 1 mL sont introduits dans l'ordre suivant :

- 800 μ L de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8
- 165 μ L d'eau distillée
- 5 μ L de prélèvement du milieu réactionnel (dilué 2x)

Lecture de la DO de référence

- 10 μ L de NADH 20mM

Vérification de la stabilité du milieu par suivi de DO sur 1min

- 10 μ L d' α -GPDH-TPI

Visualisation de la disparition de NADH par mesure de DO jusqu'à stabilisation de celle-ci

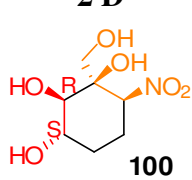
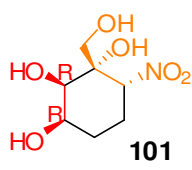
- 10 μ L de l'aldolase (10U/mg)

Visualisation de la disparition de NADH par mesure de DO jusqu'à stabilisation de celle-ci.

4. Caractérisations des nitrocyclitols obtenus

4.1. Avec le 4-nitrobutanal 79 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3-triols et préparation des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3-triols

- Réaction avec la R1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères	Proportions (sur 100)	Rendement
1R, 2R, 3S, 6S	<p>2 D</p>  <p>100</p>	95	77 %
1S, 2R, 3R, 6R	<p>3 D</p>  <p>101</p>	5	4 %

IR : ν (cm⁻¹) 3367 (O-H) ; 2495 (C-H) ; 1553 (N=O).

Nitrocyclitol 100⁸⁹

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,79 (dd, $J_{5ax-6ax} = 13,0$ Hz, $J_{5eq-6ax} = 4,0$ Hz, 1H, H_{6ax}), 3,82 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H₇), 3,73 (ddd, $J_{3ax-2ax} = 9,3$ Hz, $J_{3ax-4ax} = 11,5$ Hz, $J_{3ax-4eq} = 4,6$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,37 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,3$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,33 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,43 (m, 1H, H_{5ax}), 2,01 (m, 1H, H_{5eq}), 1,97 (m, 1H, H_{4eq}), 1,32 (m, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 86,4 (C₆), 77,1 (C₁), 75,1 (C₂), 71,0 (C₃), 61,8 (C₇), 29,6 (C₄), 24,7 (C₅).

$[\alpha]_D^{25} = -20$ (c = 1, CH₃OH).

CCM (dichlorométhane/MeOH 9/1 : R_f = 0,60), révélateur : KMnO₄.

Nitrocyclitol 101

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,75 (dd, $J_{5ax-6ax} = 12,4$ Hz, $J_{5eq-6ax} = 4,0$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,00 (m, 1H, H_{3ax}), 3,88 (d, $J_{3ax-2eq} = 2,6$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3,83 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H₇), 3,55 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,41 (m, 1H, H_{5eq}), 1,93 (m, 2H, H_{5ax}, H_{4eq}), 1,76 (m, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 87,8 (C₆), 76,6 (C₁), 74,8 (C₂), 71,3 (C₃), 65,1 (C₇), 28,5 (C₄), 25,7 (C₅).

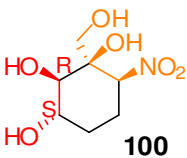
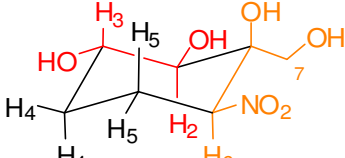
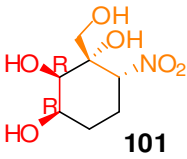
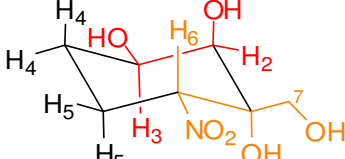
⁸⁹ El Blidi, L.; Ahbala, M.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 2684.

HR-MS ES- : m/z calculée pour [C₇H₁₃NO₆ + Na⁺] 230,0641 ; trouvée 230,0632.

$[\alpha]_D^{25} = +18$ (c = 1, CH₃OH)

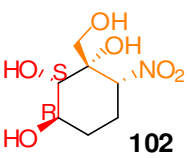
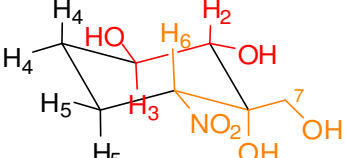
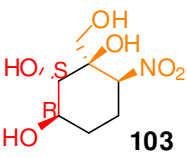
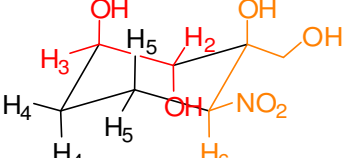
CCM (dichlorométhane/MeOH 9/1 : R_f = 0,65), révélateur : KMnO₄.

• **Réaction avec la F1PA et le DHAP**

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1R, 2R, 3S, 6S	 <p>100</p>		80	66 %
1S, 2R, 3R, 6R	 <p>101</p>		20	17 %

Les analyses des nitrocyclitols **100** et **101** sont identiques à précédemment.

• **Réaction avec la FSA mutée et la DHA**

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1S, 2S, 3R, 6R	 <p>102</p>		96	70 %
1R, 2S, 3R, 6S	 <p>103</p>		4	3 %

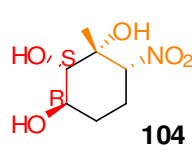
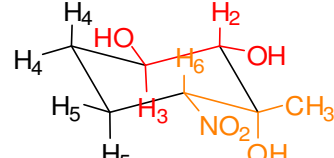
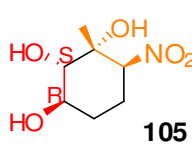
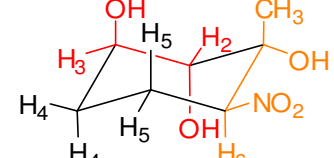
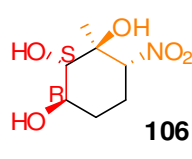
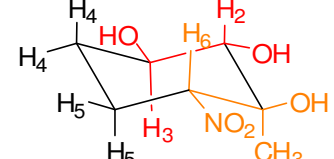
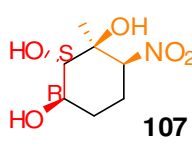
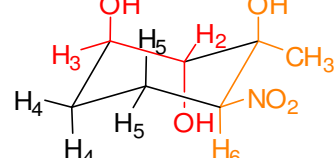
Le composé **102** étant l'énantiomère du composé **100**, leurs spectres de RMN sont identiques.

CCM (dichlorométhane/MeOH 9/1 : R_f = 0,65), révélateur : KMnO₄.

Nitrocyclitol 103

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,69 (dd, J_{5ax-6ax} = 13,0 Hz, J_{5eq-6ax} = 4,0 Hz, 1H, H_{6ax}) ; 4,01 (ddd, 1H, J_{3eq-2eq} = 3,0 Hz, J_{3eq-4ax} = 3 Hz, J_{3eq-4eq} = 3,1 Hz, H_{3eq}) ; 3,96 (d, 1H, J_{2eq-3eq} = 3 Hz, H_{2eq}) ; 3,82 (d, J_{7-7'} = 11,0 Hz, 1H, H₇) ; 3,40 (d, J_{7-7'} = 11,0 Hz, 1H, H_{7'}) ; 2,33 (m, 1H, H_{5ax}) ; 2,01 (m, 1H, H_{5eq}) ; 1,95 (m, 1H, H_{4eq}) ; 1,33 (m, 1H, H_{4ax}).

• Réaction avec la FSA naturelle et l'HA

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>R</i>	 104		63	55 %
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 105		5	4 %
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>R</i>	 106		25	22 %
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 107		7	6 %

Nitrocyclitol 104

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,52 (dd, $J_{6ax-5ax} = 12,7$, $J_{6ax-5eq} = 3,8$ Hz, 1H, H_{6ax}), 3,69 (ddd, $J_{3ax-4ax} = 11,6$, $J_{3-2} = 9,3$, $J_{3-4eq} = 5,2$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,02 (d, $J_{2,3} = 9,3$ Hz, 1H, H_{2ax}), 2,41 (m, 1H, H_{5ax}), 2,03–1,95 (m, 1H, H_{4eq}), 1,92 (ddd, $J_{gem} = 12,7$, $J_{3-4ax} = 7,3$, $J_{5eq-6} = 3,8$ Hz, 1H, H_{5eq}), 1,36 (s, 3H, CH₃), 1,40–1,28 (m, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 91,6 (C₆), 80,0 (C₂), 74,7 (C₁), 70,9 (C₃), 29,6 (C₄), 25,0 (C₅), 23,0 (C₇).

$$[\alpha]_D^{25} = +21 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}$$

Nitrocyclitol 105

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,68 (t, $J_{6-5ax} = 5,4$, $J_{6,5eq} = 5,4$ Hz, 1H, H₆), 3,82 (ddd, $J_{3,4ax} = 7,9$, $J_{3,2} = 7,0$, $J_{3,4eq} = 4,4$ Hz, 1H, H₃), 3,66 (d, $J_{2,3} = 7,0$ Hz, 1H, H₂), 2,14 – 2,09 (m, 2H, H₅), 1,94–1,85 (m, 1H, H₄), 1,85–1,74 (m, 1H, H_{4'}), 1,32 (s, 1H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 92,0 (C₆), 77,6 (C₂), 73,7 (C₁), 71,1 (C₃), 28,2 (C₄), 25,0 (C₅), 22,0 (C₇).

$$[\alpha]_D^{25} = +43 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}$$

Nitrocyclitol 106

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,55 (dd, $J_{6,5ax} = 9,7$, $J_{6,5eq} = 7,1$ Hz, 1H, H₆), 3,45 (ddd, $J_{3,4ax} = 11,3$, $J_{3,2} = 9,6$, $J_{3,4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H₃), 3,23 (d, $J_{2,3} = 9,6$ Hz, 1H, H₂), 2,11 – 1,98 (m, 3H, 2H₅ et H_{4eq}), 1,47 – 1,34 (m, 1H, H_{4ax}), 1,18 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 92,7 (C₆), 81,6 (C₂), 76,1 (C₁), 71,3 (C₃), 29,8 (C₄), 26,0 (C₅), 15,2 (C₇).

$$[\alpha]_D^{25} = -58 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}$$

Nitrocyclitol 107

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,71 (dd, $J_{6,5ax} = 10,4$, $J_{6,5eq} = 3,8$ Hz, 1H, H₆), 3,79 (dd, $J_{3,4ax} = 8,4$ Hz, $J_{3,2} = 4,5$ Hz, 1H, H₃), 3,69 (d, $J_{2,3} = 4,5$ Hz, 1H, H₂), 2,52 – 2,41 (m, 1H, H_{5ax}), 1,98 – 1,89 (m, 1H, H_{4eq}), 1,87–1,83 (m, 2H, H_{4ax}, H_{5eq}), 1,28 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 90,2 (C₆), 75,9 (C₂), 75,0 (C₁), 71,6 (C₃), 27,3 (C₄), 23,7 (C₇), 22,3 (C₅).

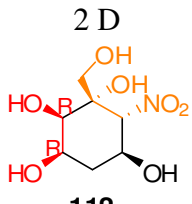
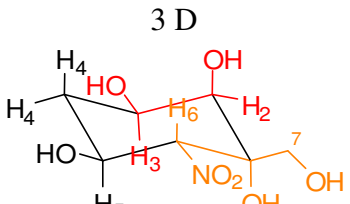
$$[\alpha]_D^{25} = -17 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}$$

Ces spectres de RMN correspondent à ceux de la littérature¹⁶⁵.

¹⁶⁵ Castillo, J. A.; Guerard-Helaine, C.; Gutierrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schurmann, M.; Inoue, T.; Helaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Joglar, J.; Clapes, P.; Sprenger, G. A.; Lemaire, M. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1039.

4.2. Avec le 3-hydroxy-4-nitrobutanal 95 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,5-tetrols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,5-tetrols

- Réaction avec la R1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères	Proportions (sur 100)	Rendement
2 D 1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>	 <p>112</p>	16	13 %
3 D 1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 <p>113</p>	84	67 %

IR : ν (cm⁻¹) 3481 (OH) ; 1545 (NO) ; 1378 (CN) ; 1064 (CO).

Nitrocyclitol 112

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,55 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,2$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,43 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 10,2$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 10,8$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,8$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,06 (m, 1H, H_{3ax}), 3,82 (d, $J_{3ax-2eq} = 2,4$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3,79 (d, $J_{7-7'} = 11,3$ Hz, 1H, H₇), 3,50 (d, $J_{7-7'} = 11,3$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,02 (m, 1H, H_{4eq}), 1,82 (ddd, $J_{4ax-4eq} \approx J_{4ax-3ax} = 11,9$ Hz, $J_{4ax-5ax} = 10,8$ Hz, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,2 (C₆), 76,4 (C₁), 73,5 (C₂), 67,4 (C₅), 66,9 (C₃), 65,7 (C₇), 36,4 (C₄).

HR-MS ES+ : m/z calculée pour [C₇H₁₃NO₇ + Na⁺] 246,0590 ; trouvée 246,0588.

$[\alpha]_D^{25} = +22$ (c = 1 ; CH₃OH).

Nitrocyclitol 113²¹⁶

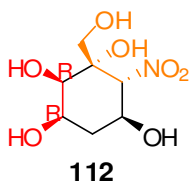
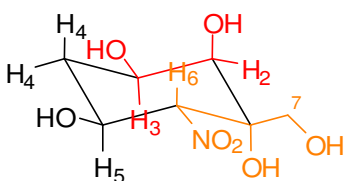
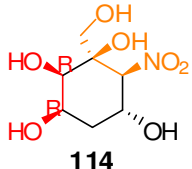
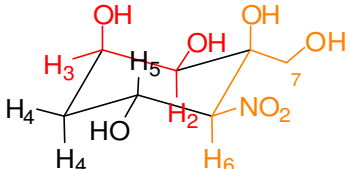
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,66 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,50 (ddd, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 11,0$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,86 (m, 1H, H_{3ax}), 3,77 (d, $J_{7-7'} = 11,2$ Hz, 1H, H₇), 3,41 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,5$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,24 (d, $J_{7-7'} = 10,8$ Hz, 1H, H₇), 2,26 (m, 1H, H_{4eq}), 1,41 (pq, $J_{4ax-4eq} \approx J_{4ax-5ax} \approx J_{4ax-3ax} = 12,1$ Hz, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,4 (C₆), 76,6 (C₁), 74,8 (C₂), 69 (C₅), 66,7 (C₃), 62,0 (C₇), 39,2 (C₄).

$[\alpha]_D^{25} = -26$ (c = 1 ; CH₃OH).

²¹⁶ El Blidi, L.; Assaf, Z.; Bres, F. C.; Veschambre, H.; Thery, V.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Chemcatchem* **2009**, *1*, 463.

- Réaction avec la F1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>			71	58 %
1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>			29	24 %

Les analyses du composé **112** sont identiques à précédemment.

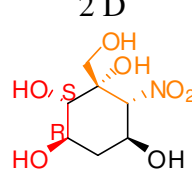
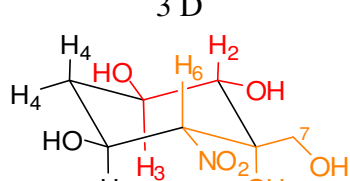
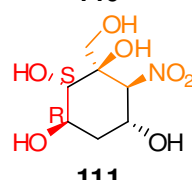
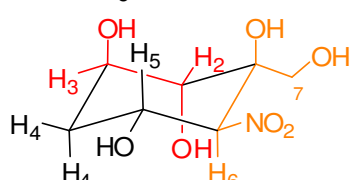
Nitrocyclitol 114

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,75 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 10,8$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,6$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,70 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,15 (m, 1H, H_{3eq}), 3,76 (d, $J_{7-7'} = 12,4$ Hz, 1H, H₇), 3,65 (d, $J_{3eq-2ax} = 2,2$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,17 (d, $J_{7-7'} = 11,2$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,26 (m, 1H, H_{4eq}), 1,59 (ddd, $J_{4ax-4eq} = 12,1$ Hz, $J_{4ax-5ax} = 10,8$ Hz, $J_{4ax-3eq} \approx 0$, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,4 (C₆), 79,1 (C₁), 72,2 (C₃), 69,0 (C₂), 64,6 (C₅), 61,8 (C₇), 38,1 (C₄).

$[\alpha]_D^{25} = -29$ (c = 1 ; CH₃OH).

- Réaction avec la FSA mutée et la DHA

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>	 <p>110</p>		55	39 %
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 <p>111</p>		45	32 %

Le composé **110** étant l'énantiomère du composé **113**, leurs spectres de RMN et IR sont identiques.

$$[\alpha]_D^{25} = 27 \text{ (c = 2,7, CH}_3\text{OH)}$$

Nitrocyclitol 111

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,67 (ddd, 1H, $J_{5ax-4ax} = 11$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4$ Hz, $J_{5ax-6ax} = 11$ Hz, H_{5ax}) ; 4,63 (d; 1H, $J_{6ax-5ax} = 11$ Hz, H_{6ax}) ; 4,03 (ddd, 1H, $J_{3eq-2eq} = 3$ Hz, $J_{3eq-4ax} = 3$ Hz, $J_{3eq-4eq} = 3$ Hz, H_{3eq}) ; 3,96 (d, 1H, $J_{2eq-3eq} = 3$ Hz, H_{2eq}) ; 3,77 (d, 1H, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, H₇) ; 3,42 (d, 1H, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, H_{7'}) ; 2,15 (ddd, 1H, $J_{4eq-3eq} = 3$ Hz, $J_{4eq-5ax} = 3$ Hz, $J_{4eq-4ax} = 13,5$ Hz, H_{4eq}) ; 1,98 (ddd, 1H, $J_{4ax-3eq} = 3$ Hz, $J_{4ax-5ax} = 11$ Hz, $J_{4ax-4eq} = 13,5$ Hz, H_{4ax}).

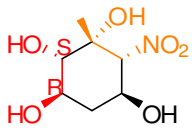
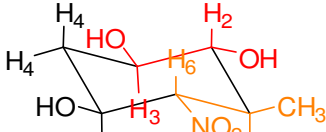
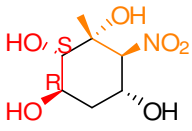
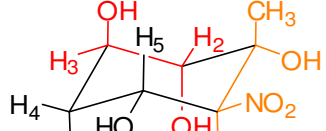
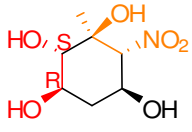
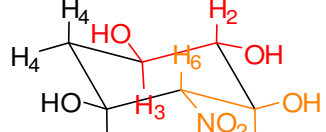
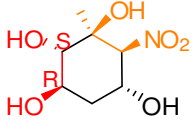
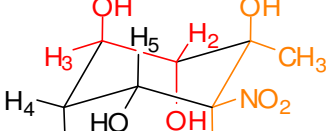
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,5 (C₆) ; 78,4 (C₁) ; 72 (C₃) ; 70,3 (C₂) ; 65,4 (C₇) ; 64,9 (C₅) ; 36,4 (C₄).

$$[\alpha]_D^{25} = -33 \text{ (c = 4,25 ; CH}_3\text{OH)}.$$

Les spectres sont conformes à ceux de la littérature⁸⁹.

⁸⁹ El Blidi, L.; Ahbala, M.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Tetrahedron Asym.* **2006**, *17*, 2684.

• Réaction avec la FSA naturelle et l'HA

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1R, 2S, 3R, 5S, 6R	 <p>115</p>		62	52 %
1R, 2S, 3R, 5R, 6S	 <p>116</p>		5	4 %
1S, 2S, 3R, 5S, 6R	 <p>117</p>		8	7 %
1S, 2S, 3R, 5R, 6S	 <p>118</p>		25	21 %

Nitrocyclitol 115

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,43 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 10,2$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 10,6$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,35 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,2$ Hz, 1H, H_{6ax}), 3,76 (ddd, $J_{3ax-4ax} = 12,2$ Hz, $J_{3ax-2ax} = 9,1$ Hz, $J_{3ax-4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,07 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,1$ Hz, 1H, H_{2ax}), 2,25 (m, 1H, H_{4eq}), 1,42 (ddd, $J_{3ax-4ax} = 12,2$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 10,6$ Hz, $J_{4eq-4ax} = 11,9$ Hz, 1H, H_{4ax}), 1,32 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 98,2 (C₆), 79,6 (C₂), 74,3 (C₁), 69,2 (C₃), 66,7 (C₅), 39,3 (C₄), 23,1 (C₇).

115 non séparé de **117** : $[\alpha]_D^{25} = +13$ (c = 1, CH₃OH)

Nitrocyclitol 116

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,63 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,35 (m, 1H, H_{5ax}), 3,97 (m, 1H, H_{3eq}), 3,54 (d, $J_{3eq-2eq} = 2,4$ Hz, 1H, H_{2eq}), 1,98 (m, 1H, H_{4eq}), 1,91 (ddd, $J_{5ax-4ax} \approx J_{4eq-4ax} = 11,3$ Hz, $J_{3eq-4ax} = 3,3$ Hz, 1H, H_{4ax}), 1,34 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 97,9 (C₆), 78,1 (C₂), 74,7 (C₁), 70,5 (C₃), 66,6 (C₅), 36,5 (C₄), 21,7 (C₇).

$[\alpha]_D^{25} = 32$ (c = 1, CH₃OH)

Nitrocyclitol 117

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,41 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,8$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,16 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 10,8$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 11,2$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,46 (ddd, $J_{3ax-4ax} = 11,2$ Hz, $J_{3ax-2ax} = 9,5$ Hz, $J_{3ax-4eq} = 4,9$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,26 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,5$ Hz, 1H, H_{2ax}), 2,25 (m, 1H, H_{4eq}), 1,46 (pq, $J_{3ax-4ax} \approx J_{5ax-4ax} \approx J_{4eq-4ax} = 11,7$ Hz, 1H, H_{4ax}), 1,17 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 99,6 (C₆), 81,3 (C₂), 74,7 (C₁), 68,8 (C₃), 66,9 (C₅), 39,7 (C₄), 16,4 (C₇).

Nitrocyclitol 118

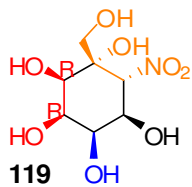
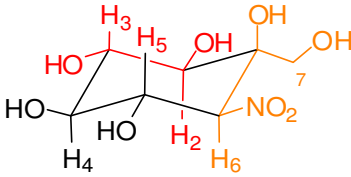
RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,62 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 11,3$ Hz $\approx J_{5ax-4ax}$, $J_{5ax-4eq} = 4,8$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,52 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,4$ Hz, 1H, H_{6ax}), 3,97 (m, 1H, H_{3eq}), 3,57 (d, $J_{3eq-2eq} = 2,0$ Hz, 1H, H_{2eq}), 2,12 (ddd, $J_{5ax-4eq} = 4,8$ Hz, $J_{3eq-4eq} = 2,1$ Hz, $J_{4eq-4ax} = 13,5$ Hz, 1H, H_{4eq}), 1,93 (ddd, $J_{5ax-4ax} \approx J_{4eq-4ax} = 11,3$ Hz, $J_{3eq-4ax} = 2,4$ Hz, 1H, H_{4ax}), 1,28 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 96,3 (C₆), 77,1 (C₁), 74,8 (C₂), 72,6 (C₃), 65,0 (C₅), 36,4 (C₄), 24,2 (C₇).

$[\alpha]_D^{25} = -15$ (c = 1, CH₃OH)

4.3. Avec le (2R)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal R-96 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols

- Réaction avec la R1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères	Proportions (sur 100)	Rendement
1S, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R	2 D 	21	17 %
1R, 2R, 3S, 4R, 5S, 6S	3 D 	79	62 %

IR : ν (cm⁻¹) : 3418 (O-H) ; 1556 (N=O) ; 1378 (C-N) ; 1109 (C-O).

Nitrocyclitol 119

RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,71 (d, $J_{5\text{ax}-6\text{ax}} = 10.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{ax}}$), 4,47 (dd, $J_{5\text{ax}-6\text{ax}} = 10.8$ Hz, $J_{5\text{ax}-4\text{eq}} = 3.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{ax}}$), 4,15 (m, 1H, $\text{H}_{4\text{eq}}$), 4,06 (dd, $J_{3\text{ax}-4\text{eq}} = 3.1$ Hz, $J_{3\text{ax}-2\text{eq}} = 3.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{ax}}$), 3,99 (d, $J_{3\text{ax}-2\text{eq}} = 3.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{2\text{eq}}$), 3,76 (d, $J_{7-7'} = 11.0$ Hz, 1H, H_7), 3,20 (d, $J_{7-7'} = 11.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{7'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 91,1 (C_6), 79,3 (C_1), 76,4 (C_4), 75,4 (C_2), 69,4 (C_5), 67,1 (C_3), 65,2 (C_7).

$[\alpha]_D^{25} = +21$ (c = 1, CH_3OH).

HR-MS ES- : m/z calculée pour $[\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_6 + \text{Na}^+]$ 262,0539 ; trouvée 262,0530.

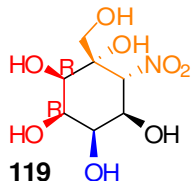
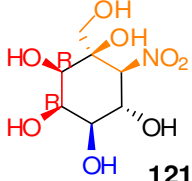
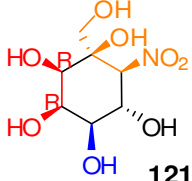
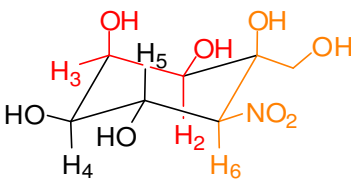
Nitrocyclitol 120

RMN ^1H (400 MHz, MeOD): δ (ppm) 4,47 (d, 1H, H_6 , $J_{6-5} = 11$ Hz) ; 4,05 (dd; 1H, H_5 , $J_{5-6} = 11$ Hz, $J_{5-4} = 9$ Hz) ; 3,53 (d, 1H, H_7 , $J_{7-7'} = 11$ Hz) ; 3,42 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-4} = 10$ Hz, $J_{3-2} = 10$ Hz) ; 3,26 (d, 1H, H_2 , $J_{2-3} = 10$ Hz) ; 3,07 (dd, 1H, H_4 , $J_{4-5} = 9$ Hz, $J_{\text{H}_4-\text{H}_3} = 10$ Hz) ; 3,03 (d, 1H, $\text{H}_{7\text{A}}$, $J_{7-7'} = 11$ Hz).

RMN ^{13}C (100MHz, MeOD): δ (ppm) 90,5 (C_6) ; 76,4 (C_1) ; 75,8 (C_4) ; 74,2 (C_3) ; 72,2 (C_2) ; 71,7 (C_5) ; 61,9 (C_7).

$[\alpha]_D^{25} = -10$ (c = 1, CH_3OH).

• Réaction avec la F1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1S, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R			47	39 %
1R, 2R, 3R, 4R, 5S, 6S			53	44 %

Les analyses du composé **119** sont identiques à précédemment.

Nitrocyclitol 121

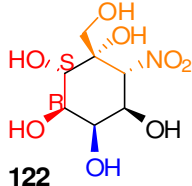
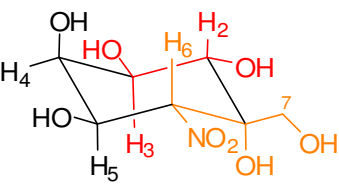
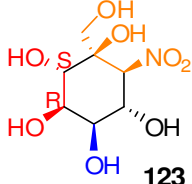
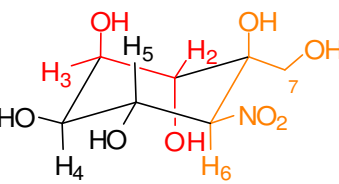
RMN ^1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,88 (d, $J_{5\text{ax}-6\text{ax}} = 9.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{ax}}$), 4,55 (dd, $J_{5\text{ax}-6\text{ax}} = 9.7$ Hz, $J_{5\text{ax}-4\text{ax}} = 10.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{ax}}$), 4,15 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{eq}}$), 3,85 (d, $J_{7-7'} = 11.5$ Hz, 1H, H_7), 3,72 (d, $J_{3\text{eq}-2\text{ax}} = 2.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{2\text{ax}}$), 3,52 (d, $J_{7-7'} = 11.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{7'}$), 3,44 (dd, $J_{3\text{eq}-4\text{ax}} = 2.7$ Hz, $J_{5\text{ax}-4\text{ax}} = 10.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{ax}}$).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 91,1 (C₆), 76,0 (C₁), 76,4 (C₄), 75,4 (C₂), 69,4 (C₅), 67,1 (C₃), 61,5 (C₇).

HR-MS ES- : m/z calculée pour [C₇H₁₃NO₈ + Na⁺] 262.0539 ; trouvé 262.0551.

$[\alpha]_D^{25} = -20$ (c = 1, CH₃OH)

• Réaction avec la FSA mutée et la DHA

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>	 122		59	42 %
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>	 123		41	29 %

Nitrocyclitol 122²¹⁶

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 5,02 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,45 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,0$, $J_{5ax-4eq} \approx 0$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,07 (s, $J_{5ax-4eq} \approx J_{3ax-4eq} \approx 0$ Hz 1H, H_{4eq}), 3,86 (d, $J_{2ax-3ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,76 (d, $J_{3ax-2ax} = 10,2$ Hz, $J_{3ax-4eq} \approx 0$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,76 (d, $J_{7-7'} = 10,2$ Hz, 1H, H₇), 3,26 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H_{7'}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 89,2 (C₆), 76,1 (C₁), 73,3 (C₂), 71,7 (C₄), 69,8 (C₃), 69,3 (C₅), 62,0 (C₇).

$[\alpha]_D^{25} = 11$ (c = 1, CH₃OH).

Nitrocyclitol 123²¹⁶

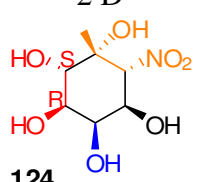
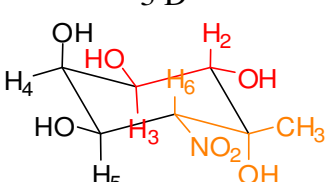
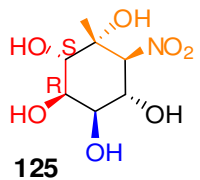
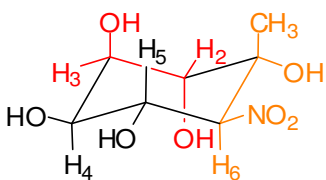
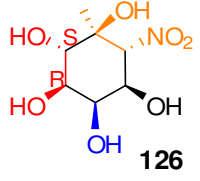
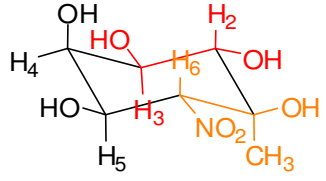
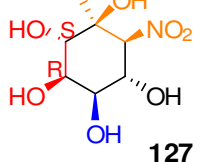
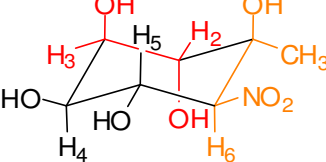
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,63 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,4$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,48 (dd, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 10,4$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,08 (d, $J_{2eq-3eq} = 3,5$ Hz, 1H, H_{2eq}), 4,03 (dd, $J_{3eq-2eq} \approx J_{3eq-4ax} = 3,5$ Hz, 1H, H_{3eq}), 3,80 (dd, $J_{5ax-4ax} = 9,7$ Hz, $J_{3eq-4ax} = 3,3$ Hz 1H, H_{4ax}), 3,76 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H₇), 3,40 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H_{7'}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 92,2 (C₆), 78,2 (C₁), 75,2 (C₃), 72,6 (C₄), 70,9 (C₂), 65,5 (C₅), 65,2 (C₇).

$[\alpha]_D^{25} = -10$ (c = 1, CH₃OH).

²¹⁶ El Blidi, L.; Assaf, Z.; Bres Camps, F.; Veschambre, H.; Thery, V.; Bolte, J.; Lemaire, M. *Chemcatchem* **2009**, *1*, 463.

• Réaction avec la FSA naturelle et l'HA

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>	 <p>124</p>		45	38 %
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 <p>125</p>		9	8 %
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>	 <p>126</p>		14	12 %
1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>	 <p>127</p>		32	27 %

Nitrocyclitol 124

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,64 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,8$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,39 (dd, $J_{5ax-6ax} = 10,8$, $J_{5ax-4eq} = 3,1$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,03 (pt, $J_{5ax-4eq} \approx J_{4eq-3ax} = 3,1$ Hz, 1H, H_{4eq}), 3,70 (dd, $J_{3ax-4eq} = 3,1$ Hz, $J_{3ax-2ax} = 9,7$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,46 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,7$ Hz, 1H, H_{2ax}), 1,33 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 94,0 (C₆), 77,0 (C₁), 74,7 (C₂), 73,3 (C₄), 71,8 (C₃), 69,3 (C₅), 23,2 (C₇).

124 non séparé de **125** : $[\alpha]_D^{25} = + 33$ (c = 1, CH₃OH)

Nitrocyclitol 125

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,67 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,0$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,16 (dd, $J_{5ax-6ax} = 11,0$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,99 (m, 1H, H_{3eq}), 3,75 (m, 1H, H_{4ax}), 3,65 (d, $J_{3eq-2eq} = 3,5$ Hz, 1H, H_{2eq}), 1,36 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 96,1 (C₆), 78,4 (C₂), 76,4 (C₁), 76,1 (C₄), 73,4 (C₃), 70,4 (C₅), 21,9 (C₇).

Nitrocyclitol 126

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,79 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,2$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,10 (dd, $J_{5ax-6ax} = 11,0$, $J_{5ax-4eq} = 3,3$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,00 (pt, $J_{5ax-4eq} \approx J_{4eq-3ax} = 3,3$ Hz, 1H, H_{4eq}), 3,72 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,40 (dd, $J_{3ax-4eq} = 3,1$ Hz, $J_{3ax-2ax} = 10,2$ Hz, 1H, H_{3ax}), 1,19 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 95,3 (C₆), 75,3 (C₄), 73,2 (C₂), 72,2 (C₁), 72,6 (C₃), 69,8 (C₅), 15,9 (C₇).

126 non séparé de **127** : $[\alpha]_D^{25} = -35$ (c = 1, CH₃OH)

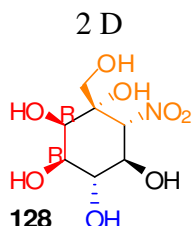
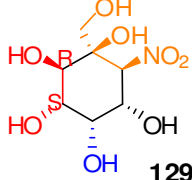
Nitrocyclitol 127

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,56 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,43 (pt, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,99 (m, 1H, H_{3eq}), 3,75 (dd, $J_{5ax-4ax} = 9,7$ Hz, $J_{4ax-3eq} = 3,5$ Hz, 1H, H_{4ax}), 3,69 (d, $J_{3eq-2eq} = 3,5$ Hz, 1H, H_{2eq}), 1,28 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 94,9 (C₆), 75,8 (C₃), 75,4 (C₂), 73,7 (C₁), 72,6 (C₄), 69,6 (C₅), 24,0 (C₇).

4.4. Avec le (2S)-2,3-dihydroxy-4-nitrobutanal S-96 : préparation des 1-hydroxyméthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols et des 1-méthyl-6-nitrocyclohexane-1,2,3,4,5-pentols

- Réaction avec la R1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères	Proportions (sur 100)	Rendement
2 D 1S, 2R, 3R, 4S, 5R, 6R	3 D 	21	17 %
1R, 2R, 3S, 4S, 5S, 6S	3 D 	79	62 %

Nitrocyclitol 128

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,69 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,47 (dd, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,03 (dd, $J_{3ax-4ax} = 10,1$ Hz, $J_{3ax-2eq} = 3,4$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,92 (d, $J_{3ax-2eq} = 3,4$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3,80 (dd, $J_{5ax-4ax} = 10,6$ Hz, $J_{3ax-4ax} = 10,1$ Hz, 1H, H_{4ax}), 3,74 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H₇), 3,25 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H_{7'}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 91,0 (C₆), 78,1 (C₁), 75,4 (C₄), 73,6 (C₃), 72,9 (C₂), 69,9 (C₅), 65,0 (C₇).

$$[\alpha]_D^{25} = +11 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}.$$

Le composé **129** étant l'énantiomère du composé **122**, leurs spectres de RMN et IR sont identiques.

$$[\alpha]_D^{25} = -13 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}$$

- **Réaction avec la F1PA et le DHAP**

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>			47	39 %
1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>			53	44 %

Les analyses du composé **128** sont identiques à précédemment.

Nitrocyclitol 130

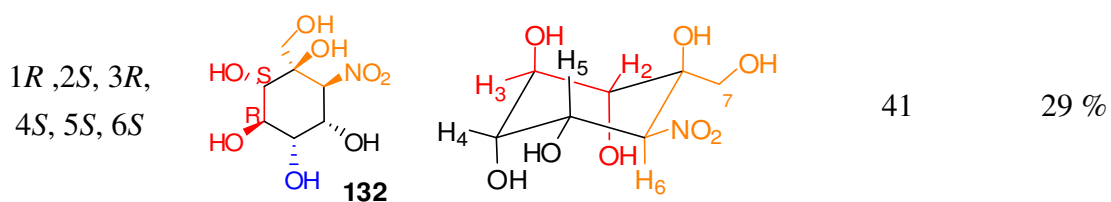
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,82 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,0$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,55 (dd, $J_{5ax-6ax} = 10,0$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 3,1$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,15 (m, 1H, H_{4eq}), 4,05 (m, 1H, H_{3eq}), 3,85 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H₇), 3,72 (d, $J_{3eq-2ax} = 2,3$ Hz, 1H, H_{2ax}), 3,52 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H_{7'}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 91,5 (C₆), 78,0 (C₁), 76,3 (C₄), 75,4 (C₂), 68,2 (C₅), 65,9 (C₃), 60,3 (C₇).

$$[\alpha]_D^{25} = -18 \text{ (c = 1,05, CH}_3\text{OH)}$$

- **Réaction avec la FSA mutée et la DHA**

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>			59	42 %



Le composé **131** étant l'énantiomère du composé **120**, leurs spectres de RMN et IR sont identiques.

$$[\alpha]_D^{25} = 10 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}.$$

Nitrocyclitol 132

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,82 (d, 1H, $J_{6ax-5ax} = 10$ Hz, H_{6ax}) ; 4,52 (dd; 1H, $J_{5ax-6ax} = 10$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 3,5$ Hz, H_{5ax}) ; 4 (dd, 1H, $J_{4eq-5ax} = 3,5$ Hz, $J_{4eq-3eq} = 3,5$ Hz, H_{4eq}) ; 3,97 (dd, 1H, $J_{3eq-4eq} = 3,5$ Hz, $J_{3eq-2eq} = 3,5$ Hz, H_{3eq}) ; 3,9 (d, 1H, $J_{2eq-3eq} = 3,5$ Hz, H_{2eq}) ; 3,74 (d, 1H, $J_{7-7} = 11$ Hz, H₇) ; 3,37 (d, 1H, $J_{7-7} = 11$ Hz, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 89,7 (C₆) ; 78,5 (C₁) ; 75,3 (C₄) ; 72,7 (C₂) ; 72,4 (C₃) ; 67,7 (C₅) ; 65,1 (C₇).

HR-MS ES- : m/z calculée pour [C₇H₁₃NO₈ + Na⁺] 262,0539 ; trouvé 262,0540.

$$[\alpha]_D^{25} = -23 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}.$$

• Réaction avec la FSA naturelle et l'HA

Configuration	Diastéréoisomères	Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D	
1R, 2S, 3R, 4S, 5R, 6R			67 58 %
1R, 2S, 3R, 4S, 5S, 6S			4 3 %
1S, 2S, 3R, 4S, 5R, 6R			9 8 %
1S, 2S, 3R, 4S, 5S, 6S			20 17 %

Nitrocyclitol 133

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,60 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,41 (dd, $J_{5ax-6ax} = 10,6$, $J_{5ax-4ax} = 11,0$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,01 (pt, $J_{5ax-4ax} \approx J_{4ax-3ax} = 11,1$ Hz, 1H, H_{4ax}), 3,71 (dd, $J_{3ax-4ax} = 11,1$ Hz, $J_{3ax-2ax} = 9,7$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,43 (d, $J_{3ax-2ax} = 9,7$ Hz, 1H, H_{2ax}), 1,33 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 94,1 (C₆), 69,3 (C₁), 73,7 (C₂), 71,8 (C₄), 70,2 (C₃), 69,3 (C₅), 23,1 (C₇).

133 non séparé de **134** : $[\alpha]_D^{25} = +27$ (c = 1, CH₃OH).

Nitrocyclitol 134

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,79 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,2$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,12 (dd, $J_{5ax-6ax} = 11,0$, $J_{5ax-4eq} = 3,2$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,00 (dd, $J_{4eq-3eq} = 3,1$ Hz, $J_{2eq-3eq} = 2,5$ Hz, 1H, H_{3eq}), 3,69 (pt, $J_{3eq-4eq} \approx J_{4eq-5ax} = 3,1$ Hz, 1H, H_{4eq}), 3,45 (d, $J_{3eq-2eq} = 2,5$ Hz, 1H, H_{2eq}), 1,18 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 95,1 (C₆), 75,6 (C₄), 73,2 (C₂), 72,2 (C₁), 71,6 (C₃), 68,7 (C₅), 14,9 (C₇).

Nitrocyclitol 135

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,69 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,0$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,09 (dd, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,99 (pt, $J_{4ax-3ax} \approx J_{5ax-4ax} = 9,9$ Hz, 1H, H_{4ax}), 3,72 (dd, $J_{3ax-4ax} \approx J_{3ax-2ax} = 10,0$ Hz, 1H, H_{3ax}), 3,40 (d, $J_{3ax-2ax} = 10,0$ Hz, 1H, H_{2ax}), 1,19 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 95,3 (C₆), 75,3 (C₄), 73,2 (C₂), 72,2 (C₁), 72,6 (C₃), 69,8 (C₅), 15,9 (C₇).

135 non séparé de **136** : $[\alpha]_D^{25} = -25$ (c = 1, CH₃OH).

Nitrocyclitol 136

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 4,60 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,39 (dd, $J_{5ax-6ax} = 11,0$, $J_{5ax-4eq} = 3,3$ Hz, 1H, H_{5ax}), 3,99 (dd, $J_{3eq-2eq} = 3,5$ Hz, $J_{3eq-4eq} = 3,1$ Hz, 1H, H_{3eq}), 3,75 (pt, $J_{3eq-4eq} \approx J_{4eq-5ax} = 3,1$ Hz, 1H, H_{4eq}), 3,61 (d, $J_{3eq-2eq} = 3,5$ Hz, 1H, H_{2eq}), 1,28 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 94,9 (C₆), 75,8 (C₃), 75,4 (C₂), 73,7 (C₁), 72,6 (C₄), 69,6 (C₅), 24,0 (C₇).

4.5. Réaction avec l'acétamide 154

- Réaction avec la R1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> ou 1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i>			45	28 %
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>			55	34 %

Nitrocyclitol 156

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 5,06 (ddd, $J_{5ax-6ax} = 11,5$ Hz, $J_{5ax-4ax} = 12,3$ Hz, $J_{5ax-6ax} = 5,1$ Hz, 1H, H_{5ax}), 5,00 (d, $J_{5ax-6ax} = 11,5$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,14 (m, 1H, H_{3ax}), 3,82 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H₇), 3,64 (d, $J_{3ax-2eq} = 2,2$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3,15 (d, $J_{7-7'} = 11,0$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,13 (m, 1H, H_{4eq}), 1,89 (s, 3H, H₉), 1,69 (ddd, $J_{4ax-5ax} = 12,3$ Hz, $J_{4ax-4eq} = 12,4$ Hz, $J_{4ax-3eq} \approx 0$ Hz, 1H, H_{4ax}).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 172,9 (C₈), 90,0 (C₆), 76,8 (C₁), 74,5 (C₂), 69,1 (C₃), 61,8 (C₇), 46,6 (C₅), 36,5 (C₄), 22,8 (C₉).

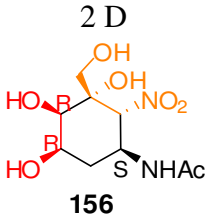
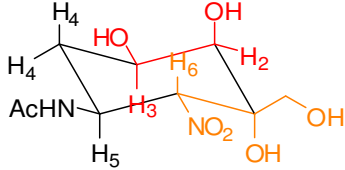
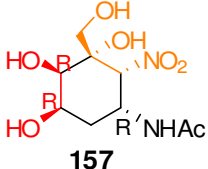
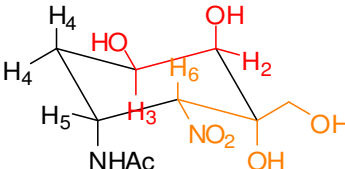
Nitrocyclitol 155

RMN ¹H (MeOD) : δ (ppm) 5,00 (m, 1H, H_{5ax}), 4,87 (d, $J_{5ax-6ax} = 12,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,00 (m, 2H, H_{3eq}, H₂), 3,79 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H₇), 3,43 (d, $J_{7-7'} = 11,5$ Hz, 1H, H_{7'}), 2,01 (m, 2H, H_{4eq}, H_{4ax}), 1,88 (s, 3H, H₉).

La position axiale ou équatoriale de H₂ reste indéterminée. Une expérience NOE serait nécessaire. Deux configurations sont donc possibles.

RMN ¹³C (MeOD) : δ (ppm) 170,0 (C₈), 90,2 (C₆), 77,8 (C₁), 71,5 (C₂), 70,0 (C₃), 65,5 (C₇), 44,3 (C₅), 34,2 (C₄), 22,7 (C₉).

- Réaction avec la F1PA et le DHAP

Configuration	Diastéréoisomères		Proportions (sur 100)	Rendement
	2 D	3 D		
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>	 <p>156</p>		90	53 %
1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>	 <p>157</p>		10	6 %

Les analyses du composé **156** sont identiques à précédemment.

Nitrocyclitol 157

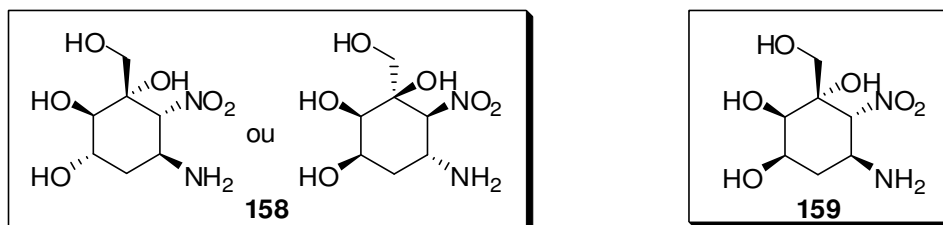
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4.79 (m, 1H, H_{5eq}), 4.79 (d, $J_{5eq-6ax} = 3.8$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4.11 (m, 1H, H_{3ax}), 3.86 (d, $J_{2eq-3ax} = 1.3$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3.79 (d, $J_{7-7'} = 11.3$ Hz, 1H, H₇), 3.53 (d, $J_{7-7'} = 11.3$ Hz, 1H, H_{7'}), 1.93 (m, 1H, H_{4eq}), 1.80 (ddd, $J_{4ax-4eq} = 11.5$ Hz, $J_{4ax-5eq} \approx 0$ Hz, $J_{4ax-3ax} = 11.3$ Hz H_{4ax}), 1.88 (s, 3H, H₉).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 170,0 (C₈), 89.9 (C₆), 78.9 (C₁), 71.6 (C₂), 66.9 (C₃), 65.8 (C₇), 44.1 (C₅), 33.8 (C₄), 22.7 (C₉).

VI. Obtentions des aminocyclitols

1. Déprotection du NHAc en position 5 du cycle

5-amino-1-(hydroxyméthyl)-6-nitrocyclohexane-1,2,3-triol **158** et **159**



$C_7H_{13}NO_7$; $M = 223,18$ g/mol

A une solution de l'acétamide **155** ou **156** (40 μ mol) dilué dans 0,8 mL de tampon phosphate (20 mM, pH 6,2) sont ajoutés 60 mg (80 U) de papaïne. Le milieu est agité 12 heures à 25  C. On ajoute 0,8 mL de méthanol, on centrifuge, et on concentre le surnageant sous pression réduite (30  C). Le brut réactionnel est purifié sur silice greffée amino (dichlorométhane/méthanol 9/1).

Aminocyclitol **158**

RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,85 (ddd, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 10,5$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,3$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,73 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,6$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,15 (m, 1H, H_{3eq}), 3,76 (d, $J_{7-7'} = 12,4$ Hz, 1H, H_7), 3,65 (d, $J_{3eq-2eq} = 2,2$ Hz, 1H, H_2), 3,17 (d, $J_{7-7'} = 11,2$ Hz, 1H, $H_{7'}$), 2,26 (m, 1H, H_{4eq}), 1,59 (t, $J_{4ax-4eq} \approx J_{4ax-5ax} = 12,1$ Hz, $J_{4ax-3eq} \approx 0$, 1H, H_{4ax}).

La position axiale ou équatoriale de H_2 reste indéterminée. Une expérience NOE serait nécessaire. Deux configurations sont donc possibles.

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,4 (C_6), 79,1 (C_1), 72,2 (C_{3^2}), 69,0 (C_2), 61,8 (C_7), 38,1 (C_4), 34,6 (C_5).

Aminocyclitol **159**

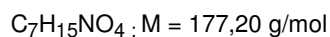
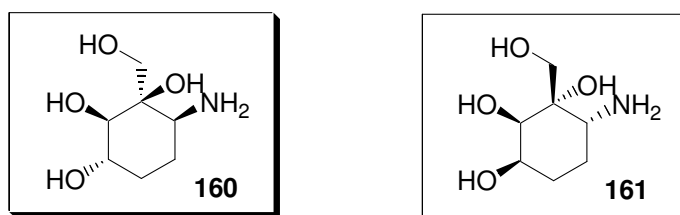
RMN 1H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 4,55 (d, $J_{5ax-6ax} = 10,2$ Hz, 1H, H_{6ax}), 4,43 (ddd, $J_{5ax-6ax} \approx J_{5ax-4ax} = 10,8$ Hz, $J_{5ax-4eq} = 4,8$ Hz, 1H, H_{5ax}), 4,06 (m, 1H, H_{3ax}), 3,82 (d, $J_{3ax-2eq} = 2,4$ Hz, 1H, H_{2eq}), 3,79 (d, $J_{7-7'} = 11,3$ Hz, 1H, H_7), 3,50 (d, $J_{7-7'} = 11,3$ Hz, 1H, $H_{7'}$), 2,02 (m, 1H, H_{4eq}), 1,82 (pq, $J_{4ax-4eq} \approx J_{4ax-5ax} \approx J_{4ax-3ax} = 11,9$ Hz, 1H, H_{4ax}).

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 93,2 (C_6), 76,4 (C_1), 73,5 (C_2), , 66,9 (C_3), 65,7 (C_7), 37,4 (C_5), 36,4 (C_4).

HR-MS ES+ : m/z calculée pour $[C_7H_{13}NO_7 + Na^+]$ 246,0590 ; trouvée 246,0588.

2. Réduction du NO₂ en position 6 du cycle

1-(hydroxyméthyl)-6-aminocyclohexane-1,2,3-triol **160** et **161**



Au nitrocyclitol dilué dans du méthanol sont ajoutés le formiate d'ammonium et le palladium sur charbon. La réaction est chauffée à reflux pendant 1 h. Après refroidissement, le milieu est filtré sur célite, avant d'être concentré sous pression réduite. Un solide blanc est obtenu (**160** : rendement = 91 %, **161** : rendement = 85 %).

Aminocyclitol 160

$$[\alpha]_D^{25} = -21 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}.$$

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 3,74 (d, 1H, H₇, J₇₋₇ = 11 Hz), 3,64 (ddd, J = 11,3, 9,2, 4,5 Hz, 1H, H₃), 3,37 (d, 1H, H₇, J₇₋₇ = 11 Hz), 3,10 (m, 1H, H₆), 3,08 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H₂), 1,99-1,91 (m, 1H, H₄), 1,86-1,73 (m, 2H, H₅), 1,44 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 79,5 (C₂), 73,2 (C₁), 70,9 (C₃), 69,1 (C₇), 57,0 (C₆), 30,0 (C₄), 25,4 (C₅).

HR-MS ES⁺ : m/z calculée pour [C₇H₁₆NO₄ + Na⁺] 178,1079 ; trouvé 178,1072.

Aminocyclitol 161

$$[\alpha]_D^{25} = +19 \text{ (c = 1, CH}_3\text{OH)}.$$

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 3,71 (d, 1H, H₇, J₇₋₇ = 11 Hz), 3,85 (d, 1H, H₇, J₇₋₇ = 11 Hz), 3,59 (ddd, J = 11,3, 9,2, 4,5 Hz, 1H, H₃), 3,08 (m, 1H, H₆), 3,06 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H₂), 1,99-1,91 (m, 1H, H₄), 1,85-1,71 (m, 2H, H₅), 1,30 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 78,5 (C₂), 72,2 (C₁), 70,9 (C₃), 67,5 (C₇), 57,0 (C₆), 30,0 (C₄), 25,1 (C₅).

HR-MS ES⁺ : m/z calculée pour [C₇H₁₆NO₄ + Na⁺] 178,1079 ; trouvé 178,1070.

VII. Mise en place des tests d'inhibition automatisés

1. Matériel : le TECAN Freedom EVO® couplé Saphire

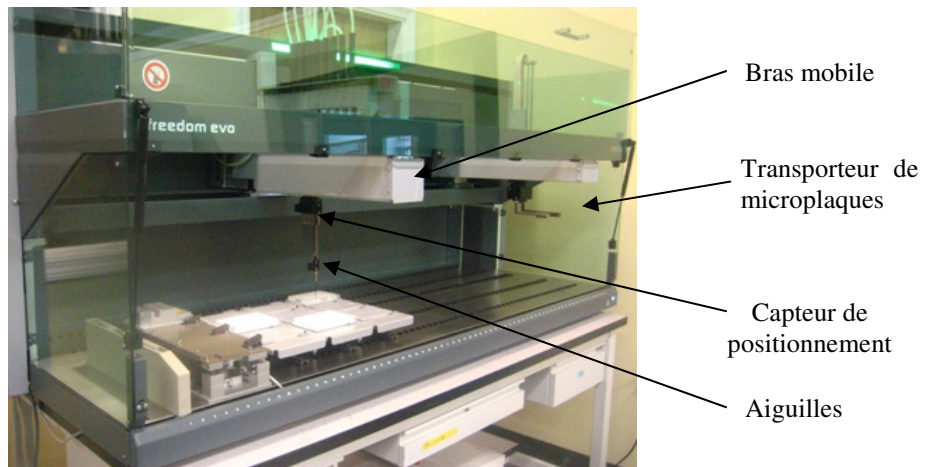


Figure 195 : TECAN Freedom EVO® 150

Le TECAN Freedom EVO® 150 est un dispositif fortement polyvalent équipé de deux bras mobiles, l'un avec quatre aiguilles et l'autre permettant le déplacement des plaques 96 puits sur le plan de travail.

L'instrument permet une large variété d'opérations de transfert de liquides pour toutes les tailles de microplaques et peut exécuter des opérations incluant l'addition de réactif, le transfert d'échantillon, la reproduction de plaque, le transfert de plaque à plaque, les dilutions en série ainsi que le mélange.

L'EVO® peut dispenser avec une précision plus ou moins grande des volumes entre 1 et 980 μL et a la capacité d'exécuter pratiquement n'importe quel transfert de liquide, remplaçant le pipetage manuel.

Il est piloté par le logiciel EVOWARE, facile d'utilisation. Ce dernier fonctionne en créant une image virtuelle de la plate-forme et offre donc au manipulateur une construction aisée de programmes avec un cliquer-déplacer sur l'interface graphique de l'utilisateur.

Pour finir, cet automate est couplé à un lecteur de microplaques (appelé Saphire) afin de permettre une automatisation non seulement des manipulations, mais aussi des analyses.

Les méthodes d'analyse sont éditées à l'avance à l'aide du logiciel propre au lecteur de plaques puis intégrées dans le programme de l'automate. Le bras mobile se charge de déplacer la microplaque du TECAN® au spectrophotomètre et inversement : les interventions humaines ne sont donc plus nécessaires.

2. Méthode d'évaluation des propriétés inhibitrices

Brefs rappels sur l'inhibition enzymatique

Il existe trois principaux types d'inhibition : l'inhibition compétitive, l'inhibition incompétitive et l'inhibition non compétitive.

Dans notre cas nous avons cherché à synthétiser des analogues structuraux du substrat naturel de l'enzyme, qui sont généralement des inhibiteurs de type compétitifs. Nos rappels se limiteront donc à ce type d'inhibition. Il apparaît une compétition entre le substrat (S) et l'inhibiteur (I) pour l'occupation du site actif de l'enzyme (E) et il y a formation de complexes dissociables (ES) et (EI). L'existence du complexe (EI) diminue la quantité d'enzyme libre et ralentit fortement la réaction de formation du produit (P) (Figure 196).

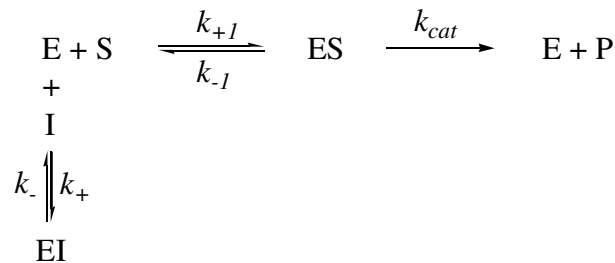


Figure 196 : Principe de l'inhibition enzymatique

Avec $K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$, $K_i = \frac{k_{-}}{k_{+}} = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$ et $[E]_t = [E] + [ES] + [EI]$, on peut alors définir

la vitesse de la réaction en présence d'inhibiteur :

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K'_m}$$

K'_m est la constante de Michaelis apparente. Elle augmente avec la concentration en inhibiteur. Par contre, la vitesse maximale v_{\max} est inchangée en présence d'un inhibiteur compétitif. K_i est la constante d'inhibition, qui définit l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Plus la valeur de cette constante est faible et plus l'inhibiteur est efficace.

Pour déterminer ces paramètres cinétiques graphiquement, on peut transformer l'équation donnant la vitesse de la réaction v_i en :

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K'_m}{v_{\max}}$$

La représentation de Hanes-Woolf pour différentes concentrations en inhibiteur donne alors plusieurs droites parallèles, qui permettent d'obtenir les différents K'_m . L'obtention de droites parallèles permet d'affirmer que l'inhibition observée est compétitive (

Figure 197).

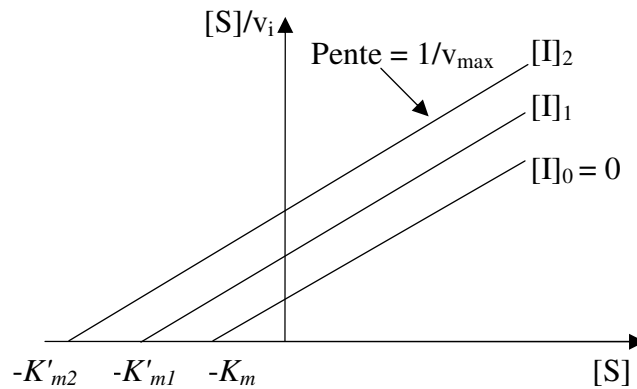


Figure 197 : Représentation de Hanes-Woolf pour différents [I]

Si l'on considère l'équation $K'_m = K_m (1 + [I]/K_i)$ et que l'on reporte les valeurs de K'_m obtenues en fonction de la concentration en inhibiteur [I], on obtient également une droite, qui coupe l'axe des abscisses en $-K_i$ (Figure 198).

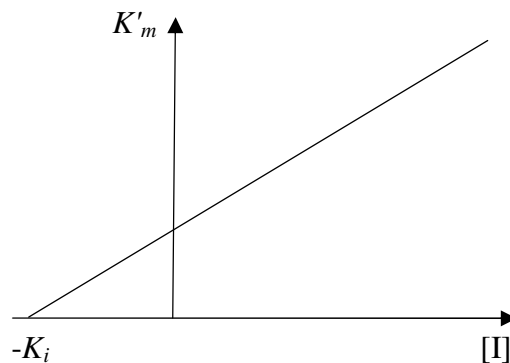


Figure 198 : Obtention graphique du K_i

Principe général des tests enzymatiques et présentation du programme

Le principe général de ces tests consiste à utiliser comme substrats des composés libérant des produits détectables en ultraviolets ou dans le visible sous l'action d'enzymes spécifiques, les glycosidases. Les substrats classiquement utilisés sont des nitrophénylglycopyranosides. En effet, au moyen d'un spectrophotomètre UV- visible, il est possible de mesurer à 400 nm la vitesse de libération du nitrophénol (Figure 199).

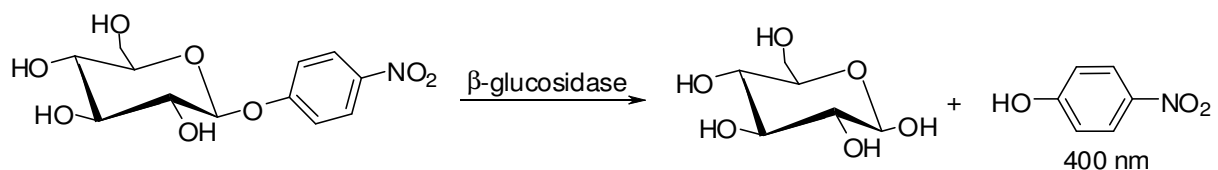


Figure 199 : Réaction enzymatique mise en jeu lors de tests d'inhibitions

Ainsi, comme nous l'avons rapporté précédemment, la mesure de cette vitesse pour différentes concentrations en substrat et en inhibiteur nous permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et K_i . En effet, les valeurs des pentes $\Delta DO/\Delta t$ sont données directement par le spectrophotomètre et les vitesses initiales peuvent facilement être calculées car $v_i = \Delta DO/(\Delta t \cdot \epsilon l)$. En portant ensuite sur un graphique les valeurs de $[S]/v$ obtenues pour différentes concentrations en substrat $[S]$ et inhibiteur $[I]$, on peut obtenir les différents K'_m grâce à la représentation de Hanes-Woolf, et donc déduire la constante d'inhibition K_i .

Nous avons travaillé avec les glycosidases commerciales suivantes : l' α -glucosidase de levure de boulanger, la β -glucosidase d'amandes, l' α -galactosidase de grains de café vert, la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* l' α -mannosidase de pois sabre et l' α -fucosidase.

Enzyme	Substrat
α -Glucosidase	4-Nitrophényl α -D-Glucopyranoside
β -Glucosidase	4-Nitrophényl β -D-Glucopyranoside
α -Galactosidase	4-Nitrophényl α -D-Galactopyranoside
β -Galactosidase	2-Nitrophényl β -D-Galactopyranoside
α -mannosidase	4-Nitrophényl α -D-mannopyranoside
α -Fucosidase	4-Nitrophényl α -L-Fucopyranoside

Tableau 25 : enzymes et substrats utilisés

Le pourcentage d'activité restante (% AR) est défini comme étant le rapport entre la vitesse de libération du nitrophénol en présence d'inhibiteur et cette même vitesse en absence d'inhibiteur :

$$\%AR = \frac{v_i}{v} \times 100 = \frac{[S] + K_m}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \times 100$$

Lors de la détermination de ces pourcentages, les différentes vitesses ont été mesurées pour une concentration en substrat équivalente au K_m et pour une concentration en inhibiteur de 1 mM. La valeur approximative du K_i peut être calculée à partir de ce pourcentage d'après la formule issue de l'équation précédente :

$$K_i = \frac{1}{2 \times \left(\frac{100}{\%AR} - 1 \right)}$$

Ainsi, lorsque le pourcentage d'activité restante est inférieur à 66 %, le K_i est inférieur à 1 mM. S'il est compris entre 67 % et 86 %, le K_i est compris entre 1 mM et 3 mM. Les composés donnant un pourcentage supérieur à 86 % ont été considérés comme non inhibiteurs de l'enzyme testée. Seules les constantes d'inhibition inférieures à 3 mM ont été déterminées

avec plus de précision. Le volume final d'un puit est de 200 μL , et chaque mesure est doublée.

Le programme est le suivant :

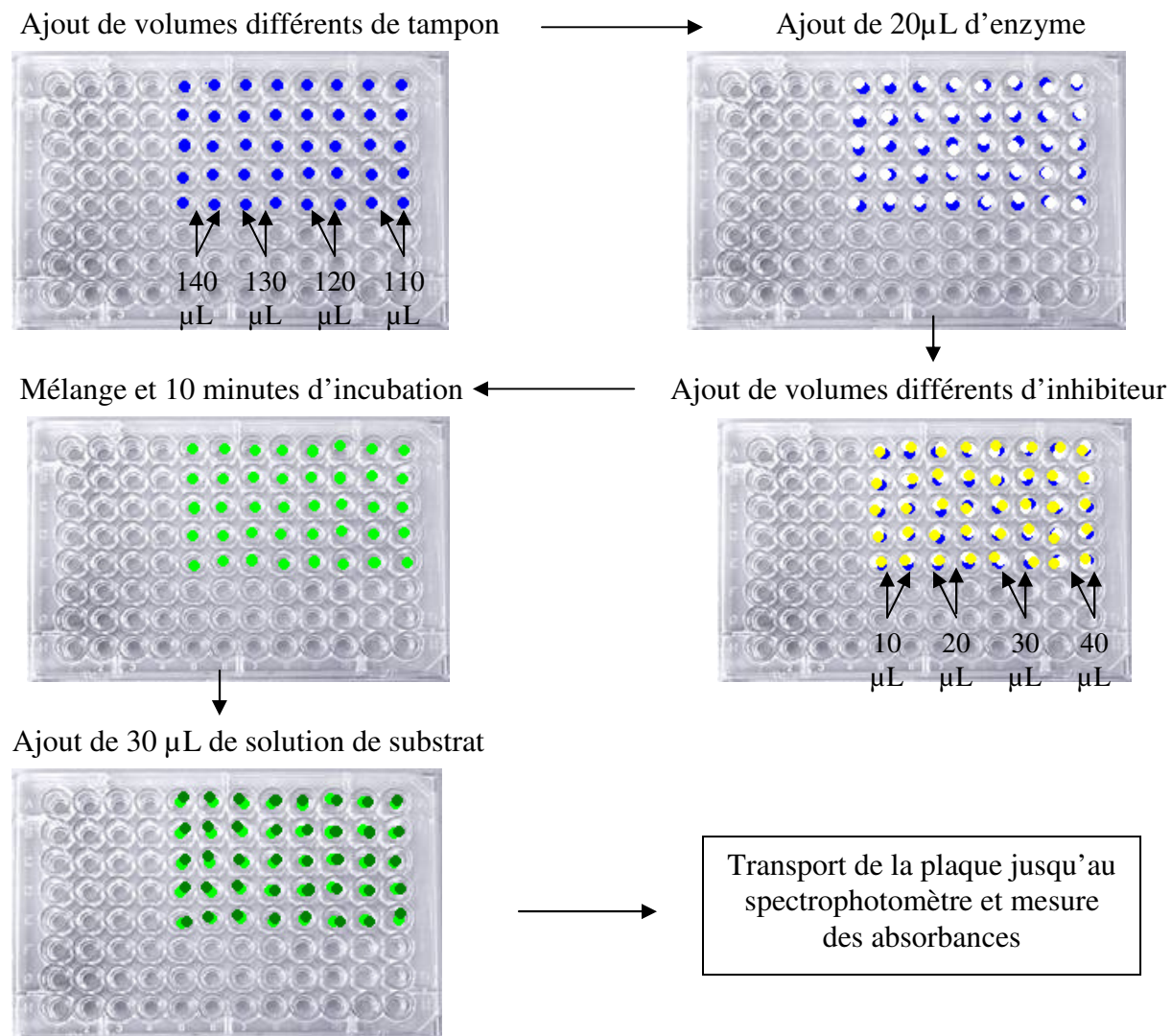
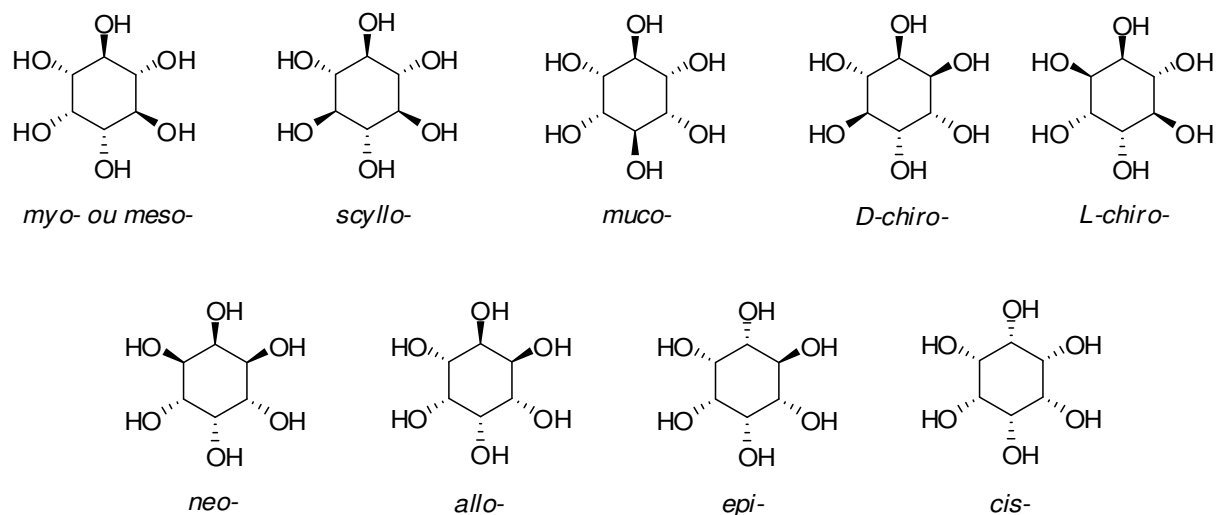


Figure 200 : Illustration du programme automatisé de mesure de K_i

ANNEXE

La nomenclature des différentes configurations de cyclitols est définie à partir de l'inositol qui comporte six groupements hydroxyles. Chaque configuration est différenciée par un préfixe en italique, comme indiqué ci-dessous :



RESUME

Les glycosidases sont des enzymes impliquées dans de nombreux processus biologiques. Entre autres, elles sont responsables de la dégradation des déchets polysaccharidiques de nos cellules. Lorsqu'une modification génétique touche un gène qui code pour une de ces enzymes, des pathologies graves regroupées sous l'appellation de « *maladies lysosomales* » peuvent être déclenchées.

L'objectif de ce projet a été de proposer une méthode de synthèse efficace de molécules potentiellement actives spécifiquement sur l'une ou l'autre de ces maladies. Les molécules ciblées sont des **inhibiteurs de glycosidases** de la famille des aminocyclitols, utilisés dans une stratégie thérapeutique émergente « *par molécules chaperonnes* ». La méthode de synthèse développée s'appuie sur une étape enzymatique clé utilisant les **aldolases** comme catalyseurs et répondant aux contraintes environnementales actuelles de la **chimie verte**.

Nous avons atteint nos objectifs grâce à l'utilisation de trois aldolases différentes, produites et purifiées pour la première fois au sein de notre laboratoire. Il s'agit de la fucose-1-phosphate aldolase F1PA, de la rhamnulose-1-phosphate aldolase R1PA et de la nouvellement découverte fructose-6-phosphate aldolase FSA. La formation d'une quarantaine de nitrocyclitols, de stéréochimies définies, précurseurs des aminocyclitols correspondant, a ainsi été réalisée avec de très bons rendements de synthèse.

Mots-clés : maladie lysosomale, molécule chaperonne, inhibiteur de glycosidases, aminocyclitol, nitrocyclitol, synthèse chimioenzymatique, aldolase.

ABSTRACT

Glycosidases are enzymes involved in many biological processes. For example, they are responsible for breaking up polysaccharide waste materials of our cells. When a genetic mutation concerns a gene encoding for one of these enzymes, acute pathologies named lysosomal storage disorders can appear.

Aim of this work was to find an effective synthesis method of molecules potentially active specifically on one or others diseases. Target molecules are glycosidases inhibitors from the aminocyclitols family, used in an emergent strategy "by molecular chaperones". The method of synthesis developed in the course of this work is based on an enzymatic key step using aldolases as catalyst, and follows current environment constraints of the green chemistry concept.

Goals were reached thanks to the use of three different aldolases, produced and purified for the first time in our lab. It consists in fucose-1-phosphate aldolase F1PA, rhamnulose-1-phosphate aldolase R1PA and the newly discovered fructose-6-phosphate aldolase FSA. Formation of around forty nitrocyclitols (aminocyclitols precursors) with a defined stereochemistry was realised with very good yields of synthesis.

Key words : lysosomal storage disorder, molecular chaperone, glycosidases inhibitor, aminocyclitol, nitrocyclitol, chemoenzymatic synthesis, aldolase.