



**HAL**  
open science

# Biosynthèse de triterpénoïdes bactériens : méthylation d'atomes de carbone saturés non activés

Nader Mallouk

► **To cite this version:**

Nader Mallouk. Biosynthèse de triterpénoïdes bactériens : méthylation d'atomes de carbone saturés non activés. Autre. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAF022 . tel-01359167

**HAL Id: tel-01359167**

**<https://theses.hal.science/tel-01359167>**

Submitted on 2 Sep 2016

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**Institut de chimie de Strasbourg – UMR 7177**

# THÈSE

présentée par

**Nader MALLOUK**

soutenue le : **3 Juillet 2013**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie

**Biosynthèse de triterpénoïdes bactériens : méthylation  
d'atomes de carbone saturés non activés**

**THÈSE dirigée par :**

**M. Michel ROHMER**

Professeur, Université de Strasbourg.

**RAPPORTEURS :**

**M. Philippe BISSERET**

Chargé de Recherche CNRS, Université de Haute-Alsace.

**M. Marius REGLIER**

Directeur de Recherche CNRS, Université de Aix-Marseille.

**MEMBRES DU JURY :**

**M. Michel ROHMER**

Professeur, Université de Strasbourg.

**M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN**

Professeur, Université de Strasbourg.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont soutenu :

Monsieur le Professeur Michel ROHMER, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses nombreuses discussions scientifiques et humaines, pour son attention, son aide et sa confiance durant ces années de thèse.

Messieurs les membres de jury, le Professeur Jean-Pierre LEPOITTEVIN, le Docteur Philippe BISSERET et le Docteur Marius REGLIER pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Monsieur le Professeur Stéphane VUILLEUMIER pour sa contribution dans la partie de biologie moléculaire de ce travail.

Un grand merci au service de RMN (Dr. L. Allouche, B. Vincent, J-D. Sauer, M. Cope) pour leur compétence et leur disponibilité.

A Madame E. Motsch pour les analyses en GC/MS et SM.

A tous les membres de notre laboratoire : Merci à Madame le Professeur Catherine G-B pour son aide en chimie organique, au Docteur Denis T. pour toutes ses réponses à mes questions en biologie, à Myriam S., Magalie P., Huguette D., Clément G., Wenjun L., Fanny K., Mathilde M., Claire F., Agata L., Yasmina S., Grégory H., Erasmienne N., Mathias A. merci pour votre soutien.

A mon père, ma mère et mes frères pour leur soutien.

A toi.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

Un grand merci est attribué au ministère français de la recherche et à la fondation "Frontier Research in Chemistry" (FRC) pour le financement de cette thèse.

# Abréviations

Ac :	acétyle
ATP :	adénosyltriphosphate
AcOEt :	acétate d'éthyle
Bn :	benzyle
CCM :	chromatographie sur couche mince
CoA :	coenzyme A
CPG :	chromatographie gazeuse
DMAPP :	diphosphate de diméthylallyle
DMSO :	diméthyl sulfoxyde
DCM :	dichlorométhane
DTT :	dithiothréitol
DX :	1-désoxy-D-xylulose
DXP :	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
Et <sub>2</sub> O :	diéthyl éther
Fldx :	flavodoxine
GC/MS :	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
HSQC:	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPP:	diphosphate d'isopentényle
J:	constante de couplage
Me :	méthyle
MeCbl:	méthylcobalamine
MEP:	méthylérythritol phosphate
MTases:	méthyltransférases
NOE:	Nuclear Overhauser Effect
ORF:	Open Reading Frames

PLP :	pyridoxal phosphate
Rf:	rappel frontale
RMN :	résonance magnétique nucléaire
SAM :	S-adénosylméthionine
SAH :	S-adénosylhomocystéine
SM :	spectrométrie de masse
t.a :	température ambiante
TBAF :	fluorure de tétrabutylammonium
THF :	tétrahydrofurane
TMS :	triméthylsilyle
TPP :	diphosphate de thiamine
UV :	ultra-violet

# Sommaire

<b>Avant-propos .....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre I SAM et méthyltransférases .....</b>	<b>9</b>
I. Généralités .....	10
II. S-adénosyl méthionine .....	11
II.1 SAM comme source du groupement méthyle .....	11
II.2 SAM comme source du groupement méthylène .....	14
II.3 SAM comme source du groupement amine .....	15
II.4 SAM comme source du groupement ribosyle .....	15
II.5 SAM comme source du groupement aminoalkyle .....	16
II.6 SAM comme source du radical 5'-désoxyadénosyle .....	17
III. Les protéines de la famille « Radical-SAM » .....	19
III.1 Les protéines à centre [Fe-S] .....	19
III.2 La famille des « Radical-SAM » .....	21
III.3 Découverte de la famille des enzymes à radical-SAM .....	21
III.4 Mécanisme réactionnel des enzymes à radical-SAM .....	22
III.5 Structure des enzymes « Radical-SAM » .....	26
IV. Méthyltétrahydrofolate ou Me-THF .....	28
V. Vitamine B <sub>12</sub> .....	30
VI. Méthyltransférases .....	31
VI.1 MTases méthylcobalamine dépendantes .....	32
VI.2 MTases SAM dépendantes .....	37
VII. Objectifs de la thèse .....	42

<b>Chapitre II Synthèse des deux isotopomères 5<i>R</i> et 5<i>S</i> du 1-désoxy-D-xylulose marqués au deutérium en C-5</b> .....	<b>44</b>
I. Introduction.....	45
I.1 Structure des bactériohopanoïdes .....	46
I.2 Biosynthèse des bactériohopanoïdes .....	48
I.3 Diphosphate d'isopentényle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) .....	51
II. 1-Désoxy-D-xylulose .....	55
II.1 Incorporation de 1-désoxy-D-xylulose dans l'isoprène.....	55
III. Synthèses du 1- désoxy-D- xylulose .....	57
III.1 Introduction .....	57
III.2 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose selon Giner.....	58
III.3 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir des dérivés du D- tartrate .....	58
III.4 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir de glucides.....	60
III.5 Synthèse de 1-désoxy-D-xylulose développée au laboratoire .....	62
IV. Etude de la stéréochimie de la méthylation enzymatique en C-2 du cycle A du squelette hopane.....	64
IV.1 3β-Méthylhopanoïdes .....	64
IV.2 2β-méthylhopanoïdes .....	65
IV.3 Hypothèses pour la biosynthèse des méthylhopanoïdes selon M. Zundel .	66
IV.4 Hypothèse d'une méthylation radicalaire de CH <sub>2</sub> non activé.....	67
V. Les deux isotopomères 5 <i>R</i> et 5 <i>S</i> du (5- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> )-1-désoxy-D-xylulose.....	70
V.1 Synthèse de 1-désoxy-D-xylulose (DX) en abondance naturelle.....	70
V.2 Synthèses du (5 <i>R</i> )- et du (5 <i>S</i> )-(5- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> )-désoxy-D-xylulose.....	71
VI. Conclusion .....	81
Partie Expérimentale .....	82

### Chapitre III. Incorporation du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et de (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose dans des 2β-méthylhopanoïdes : stéréo-chimie de la méthylation en C-2..... 117

I. <i>Methylobacterium</i> .....	118
II. 2β-méthyldiploptérol .....	119
II.1 Synthèse du 2β-méthyldiploptérol (Bisseret <i>et al.</i> , 1985) .....	120
II.2 Comportement du diploptérol et du 2β-méthyldiploptérol silylés en spectrométrie de masse à ionisation par impact électronique.....	122
III. Stéréochimie de la réaction de méthylation en C-2 du cycle A du hopane.....	123
III.1 Incorporation de la ( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -méthyl)-méthionine dans des cellules de <i>Methylobacterium organophilum</i> .....	124
III.2 Tentative d'incubation de (CD <sub>3</sub> )-1-désoxy-D-xylulose dans <i>Methylobacterium</i> spp. ....	128
IV. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 .....	130
IV.1 Du tétrahymanol .....	131
IV.3 Incubation de (CD <sub>3</sub> )-1-désoxy-D-xylulose dans des cellules de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 .....	135
V. Recherche de la 1-désoxy-D-xylulose kinase chez <i>Methylobacterium fujisawaense</i> et chez <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	139
VI. Incubation des deux isotopomères (5 <i>R</i> )- et (5 <i>S</i> )- du (5- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> )-1-désoxy-D-xylulose dans <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	142
VI.1 Incubation du (5 <i>R</i> )-(5- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> )-1-désoxy-D-xylulose avec <i>Bradyrhizobium japonicum</i> / Identification de la stéréochimie de la méthylation en C-2 du squelette hopane par RMN du <sup>13</sup> C .....	142
VI.2 Incubation du (5 <i>S</i> )-(5- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> )-1-désoxy-D-xylulose avec <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	149
VII. Conclusion .....	156
VIII. Partie expérimentale .....	162
VIII.1 Techniques biologiques .....	162
VIII.2 Techniques analytiques .....	163
VIII.3 Séparation des triterpénoïdes.....	164



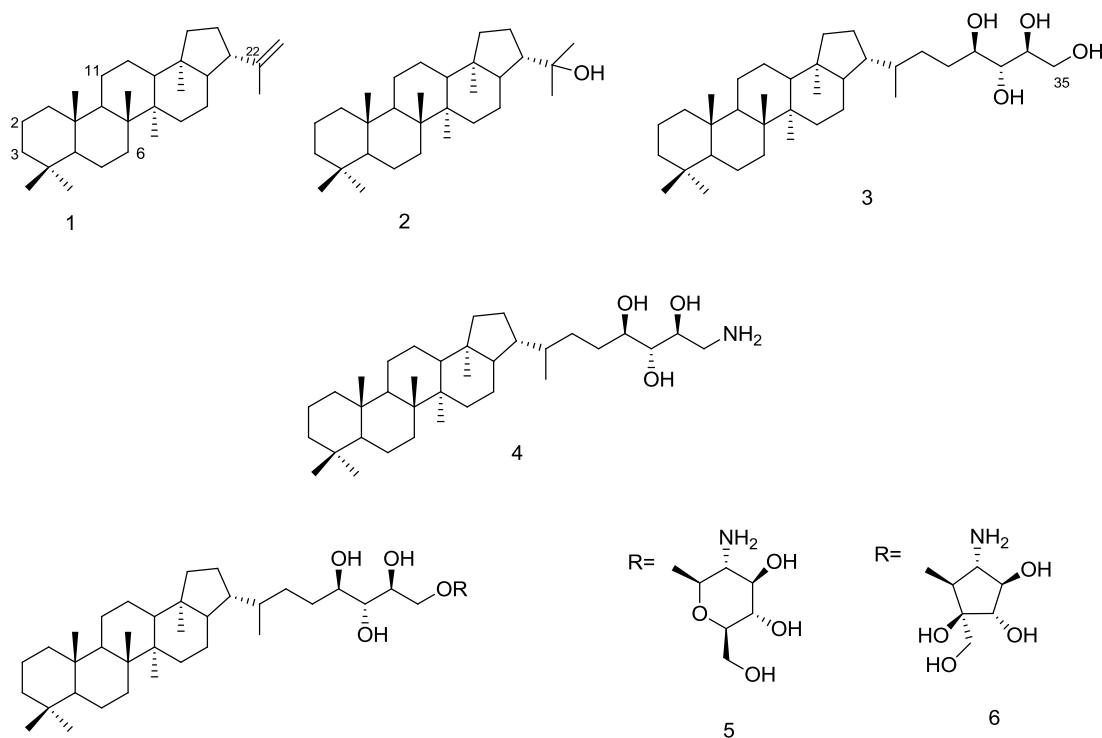
<b>Chapitre IV. Synthèse de la méthylcobalamine marquée en <math>^{13}\text{C}</math> sur le méthyle</b>	<b>166</b>
.....	
I. INTRODUCTION.....	167
II. Méthylcobalamine .....	170
III. Méthyltransférases $\text{B}_{12}$ dépendantes .....	171
III.1 Les méthyltransférases de classe B.....	172
IV. But du travail .....	176
IV.1 Synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine .....	177
V. Conclusion et perspectives .....	182
VI. Partie expérimentale .....	183
VI.1 Synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine .....	183
<b>Chapitre V. Caractérisation d'une enzyme susceptible d'être une méthylase responsable de la méthylation enzymatique en C-2 du cycle A du hopane....</b>	<b>184</b>
I. Introduction.....	185
I.1 Génération de l'Ado $\bullet$ à partir de l'adénosylcobalamine (Coenzyme $\text{B}_{12}$ )....	185
II. Enzymes à radical SAM .....	188
II.1 Lysine 2,3 aminomutase .....	188
II.2 Pyruvate formiate lyase.....	190
II.3 Biotine synthétase.....	191
II.4 Lipoate Synthétase (LipA).....	193
II.5 Autres enzymes à radical SAM .....	194
III. But du travail .....	195
III.1 Une méthylase : enzyme à radical SAM .....	195
IV. Conclusion et perspectives .....	202
V. Matériels et méthodes.....	203
V.1 Clonage .....	203
V.2 Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline .....	204

V.3 Ligation .....	205
V.4 Préparation de cellules compétentes.....	205
V.5 Transformation dans des bactéries compétentes par choc thermique.....	205
V.6 Souches bactériennes .....	206
V.7 Plasmides .....	206
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>207</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>211</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>214</b>

# **Avant-propos**

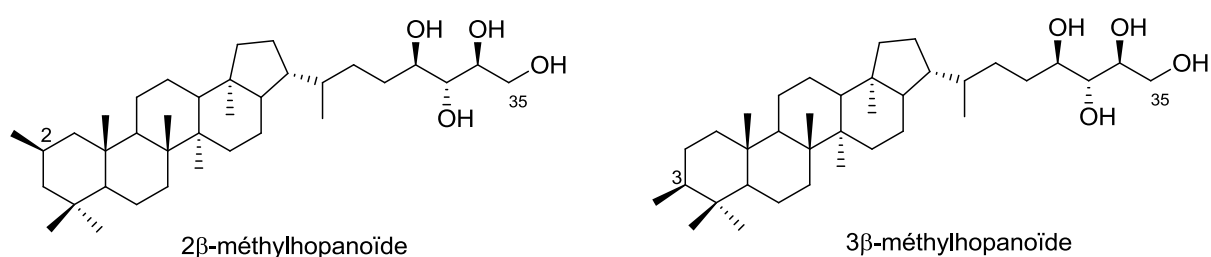
Les hopanoïdes bactériens sont des composés pentacycliques dont le nom provient du genre *Hopea*, des arbres de la famille des Dipterocarpaceae, nommé en l'honneur de John Hope, botaniste britannique du XVIIIème siècle (Ourisson *et al.*, 1987 ; Ourisson et Albrecht, 1992; Rohmer, 1993). Ils sont formés par la cyclisation du squalène et présents dans des nombreuses bactéries de groupes taxinomiques divers (Rohmer *et al.*, 1984).

Dans les bactéries produisant des hopanoïdes, les composés en C<sub>30</sub> tels que le diploptène et le diploptérol sont généralement présents à l'état de traces. Les hopanoïdes bactériens majeurs sont toujours des dérivés de bactériohopanetétrols en C<sub>35</sub> comme le bactériohopanetétrol **(3)**, l'aminobactériohopanetriol **(4)**, le glycoside de bactériohopanetétrol **(5)** ou l'éther de bactériohopanetétrol **(6)** (Figure 1).



**Figure 1.** Exemples de triterpènes pentacycliques de la famille du hopane : diploptène **(1)**, diploptérol **(2)**, bactériohopanetétrol **(3)**, l'aminobactériohopanetriol **(4)**, le glycoside de bactériohopanetétrol **(5)** et l'éther de bactériohopanetétrol **(6)**

Les hopanoïdes bactériens sont caractérisés par une grande diversité structurale. Cette dernière peut se trouver au niveau de la partie triterpénique avec un groupe méthyle supplémentaire au niveau de la position C-2 $\beta$  (Bisseret *et al.*, 1985) ou C-3 $\beta$  (Rohmer et Ourisson, 1976c ; Zundel *et al.*, 1985 b) (Figure 2) ou se trouver au niveau de la présence de doubles-liaisons supplémentaires en C-6 et/ou C-11 (Rohmer et Ourisson, 1976 b; Rohmer et Ourisson, 1986) et de stéréochimies différentes au niveau de la position C-22 (Rohmer et Ourisson, 1976a).



**Figure 2.** Exemples de triterpènes pentacycliques méthylés de la famille du hopane : 2 $\beta$ -méthylhopanoïde et 3 $\beta$ -méthylhopanoïde.

Ce travail de thèse présente une étude sur l'origine de ce groupement de méthyle, sur l'enzyme responsable de l'introduction de ce groupement de méthyle au niveau C-2 du cycle A de l'hopane méthylé ainsi que son mécanisme. La compréhension d'un tel mécanisme présente un défi puisqu'il induit une formation d'une liaison C-C sur un carbone  $sp^3$  saturé non activé.

# **Chapitre I**

## **SAM et méthyltransférases**

# I. Généralités

Un chimiste organicien souhaitant insérer un groupement de méthyle dans un composé peut utiliser par exemple, le triflate de méthyle ou le diazométhane comme agent d'alkylation. En biologie, les donneurs de méthyle sont moins réactifs. Les réactions de transfert d'unités monocarbonées impliquent trois cofacteurs : les folates (vitamine B<sub>9</sub>), la S-adenosylméthionine (SAM/AdoMet) et la méthylcobalamine (vitamine B<sub>12</sub>) (Figure 1).

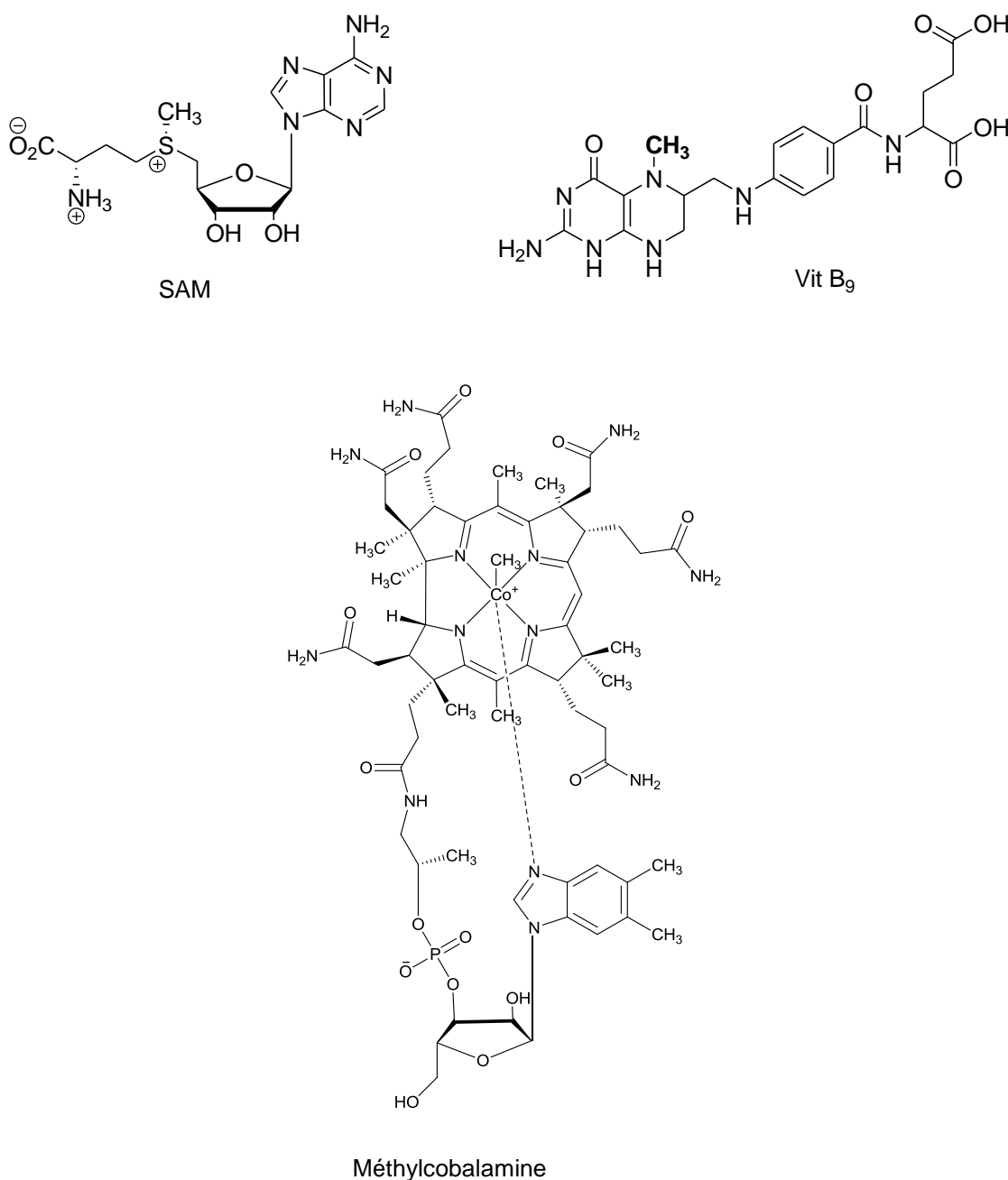


Figure 1. Cofacteurs impliqués dans des réactions de méthylation.

Le métabolisme de ces trois cofacteurs est étroitement imbriqué puisque les folates participent à la synthèse de l'AdoMet ainsi qu'à la méthylation de la cobalamine. Chez tous les organismes, le contrôle de l'homéostasie de ces cofacteurs est essentiel puisqu'ils participent à des processus cellulaires clés comme le métabolisme des nucléotides, des lipides et de certains acides aminés, ainsi que les réactions de méthylation. Les méthylations cellulaires sont extrêmement variées puisqu'elles concernent des métabolites, des acides nucléiques, ainsi que des protéines ; elles sont au cœur de voies de biosynthèse vitales et de processus de régulation indispensables à leur développement. La réaction d'alkylation est le processus d'introduire un groupement hydrocarboné sur une molécule. Ce type de réactions est largement utilisé dans les raffineries pétrolières ainsi que dans la chimiothérapie. Elle aide à détruire les cellules cancéreuses.

## **II. S-adénosyl méthionine**

La S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet) est un sel de sulfonium biologique connu comme étant un donneur de méthyle majeur dans les réactions catalysées par des méthyltransférases (Schéma 1). La SAM est aussi impliquée dans plusieurs processus biochimiques. C'est le second substrat d'enzyme le plus utilisé après l'ATP (Cantoni, 1975). La SAM est obtenue à partir de la méthionine et de l'ATP sous l'action de la méthionine adénosyltransférase ou SAM synthétase (Schéma 1, étape 1) (Markham *et al.*, 1980). Cette réaction est stéréospécifique et induit seulement la production de la configuration S sur l'atome de soufre.

### **II.1 SAM comme source du groupement méthyle**

La SAM est reconnue comme le donneur de méthyle le plus important dans la plupart des réactions de méthylation dans les systèmes biologiques (Cantoni, 1975 ; Chiang *et al.*, 1996) (Schéma 1, étape 2).

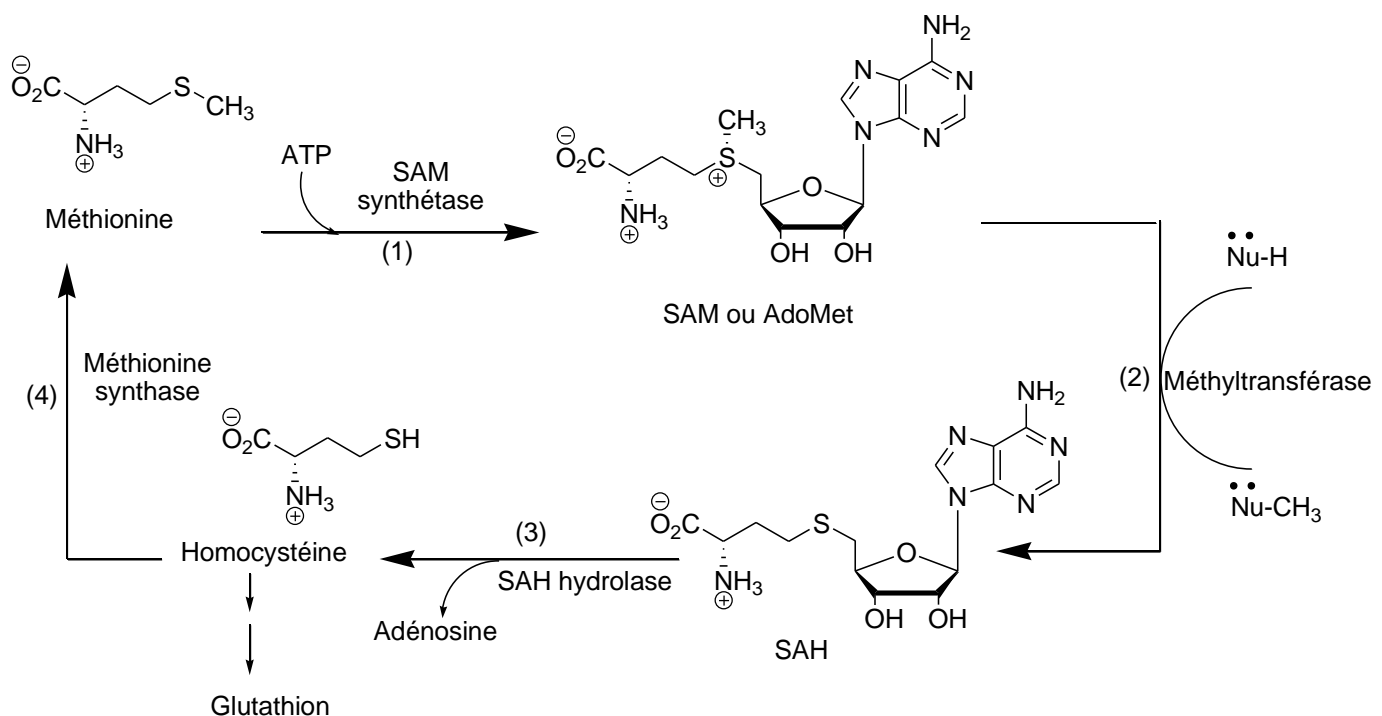
La réaction de méthylation peut affecter divers processus allant du développement fœtal jusqu'au fonctionnement du cerveau. La méthylation de l'ADN est cruciale dans la régulation de l'expression des gènes. La méthylation des hormones, des neurotransmetteurs aide à réguler leurs actions. La méthylation des phospholipides



conserve la fluidité des membranes et la mobilité des récepteurs membranaires. Aucun de ces processus ne serait possible sans l'implication de la SAM.

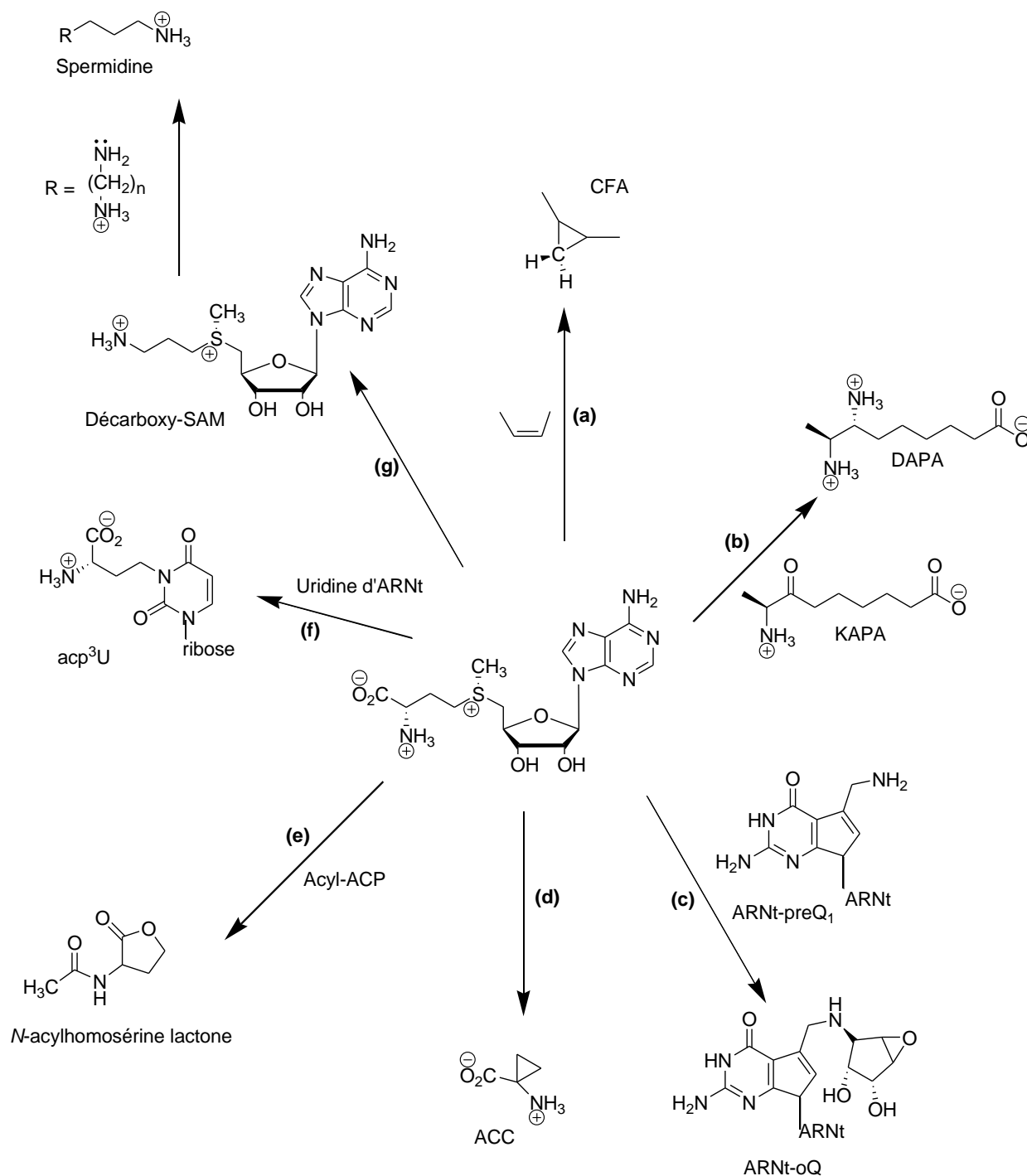
En chimie, le caractère électrophile du groupement méthyle de la SAM a été exploité par la méthyltransférase SAM-dépendante qui amène la SAM au contact des groupements nucléophiles des substrats (Schéma 1, étape 2).

Durant la réaction de méthylation, la SAM est convertie en S-adénosylhomocystéine (SAH) qui peut s'hydrolyser en donnant l'adénosine et l'homocystéine sous l'action de la SAH hydrolase (Palmer et Abeles, 1979) (Schéma 1, étape 3). L'homocystéine peut être transformée en glutathion (un antioxydant cellulaire majeur) ou bien méthyliée pour engendrer la méthionine, par une réaction catalysée par la méthionine synthase (methylcobalamine-dependent enzyme) (Ludwig et Matthews, 1997) (Schéma1, étape 4).



**Schéma 1.** Le cycle de la S-adénosylméthionine ou SAM. Le Nu correspond au substrat nucléophile de la méthyltransférase. La SAM est obtenue à partir d'une réaction entre l'ATP et la méthionine catalysée par la SAM synthétase (1). La méthyltransférase catalyse la réaction du transfert du groupement de méthyle de la SAM vers le substrat nucléophile (2). La méthionine est régénérée à partir d'une hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (3) suivie d'une réaction de méthylation catalysée par la méthionine synthase (4).

Pendant longtemps, la capacité de méthylation de la SAM était sa seule propriété reconnue. En effet, plusieurs excellentes revues récentes ont décrit la chimie de la réaction biologique de méthylation ainsi que la structure des méthyltransférases SAM-dépendante (Schubert *et al.*, 2003 ; Cheng et Roberts, 2001 ; Martin et McMillan, 2002). Elles ont montré aussi que la SAM n'est pas seulement un donneur de méthyle mais aussi une source de plusieurs groupements chimiques (Schéma 2).

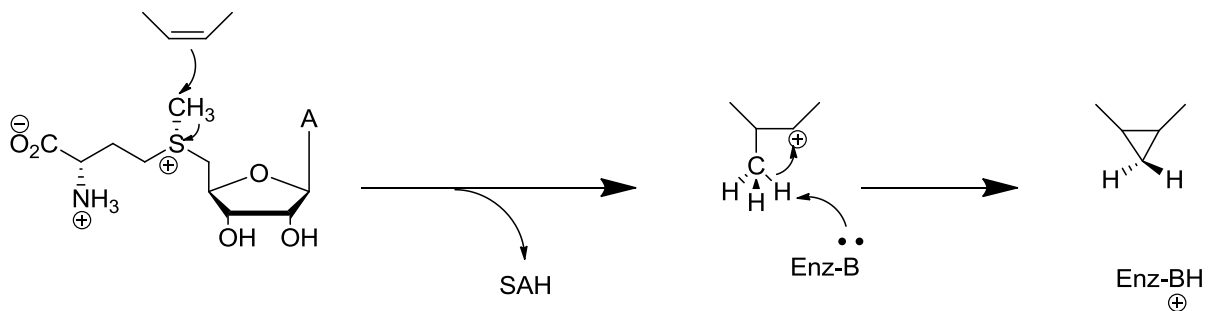


**Schéma 2.** La S-adénylméthionine ou SAM comme donneur de différents groupements chimiques. Les enzymes correspondantes sont :a) Acide gras cyclopropane (CFA) synthase, l'acide gras est représenté par une molécule insaturée. b) Acide 7,8-diaminopelargonique (DAPA) synthase. c) SAM-ARNt ribosyltransferase-isomérase (QueA). d) Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) synthase. e) Acylhomosérine lactone synthase, protéine porteuse de groupement acyle (ACP). f) 3-(3-amino-3-carboxypropyl) uridine (Acp<sup>3</sup>U) synthase. g) SAM décarboxylase ; spermidine synthase.

## II.2 SAM comme source du groupement méthylène

Les acides gras à cyclopropane (CFAs) sont localisés dans les phospholipides membranaires de certaines bactéries. Ils sont formés par une réaction de méthylation au niveau de la double-liaison des acides gras insaturés (Figure 2a). La réaction est catalysée par la CFA synthase qui utilise le groupement de méthyle de la SAM comme précurseur du groupement méthylène.

Le mécanisme de cette réaction est illustré dans le Schéma 3. La double-liaison de l'acide gras va attaquer le groupement méthyle de caractère électrophile de la SAM, contribuant à la libération de SAH et à la formation d'un intermédiaire cationique méthylé. Probablement, suite à une déprotonation à l'aide d'un groupement à effet basique non identifié dans le site actif de l'enzyme, une fermeture du cycle prend place (Grogan et Cronan, 1997).



**Schéma 3.** S-adénylméthionine ou SAM comme donneur de groupement de méthylène. Réaction catalysée par (CFA), B représente un groupement basique dans le site actif de l'enzyme.

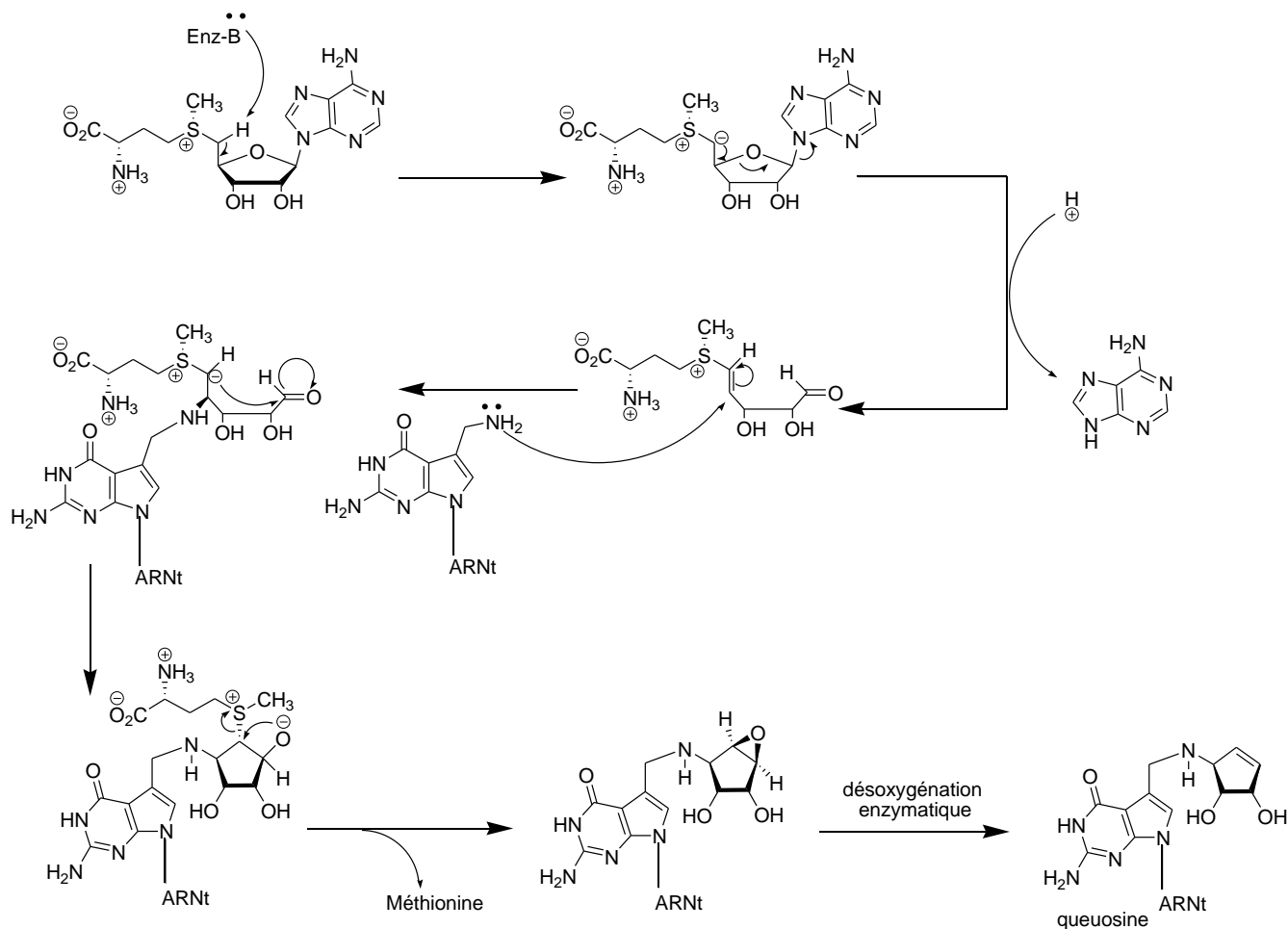
### **II.3 SAM comme source du groupement amine**

Le transfert du groupement amine de la SAM à l'acide 7-céto-8-amino-pélargonique (KAPA) pour obtenir l'acide 7,8-diamino-pélargonique (DAPA) constitue l'étape essentielle dans la biosynthèse de la biotine. Cette réaction est catalysée par la DAPA synthase (Schéma 2b). Cette enzyme appartient à la famille de PLP-dépendant aminotransférases qui catalyse le transfert d'un groupement amine d'un donneur vers un accepteur (Stoner et Eisenberg, 1975). Cette une enzyme qui appartient à la famille des aminotransférases dépendantes du pyridoxal phosphate. La DAPA synthase est la seule aminotransférase reconnue qui utilise la SAM comme donneur du groupement amine (Breen *et al.*, 2003).

### **II.4 SAM comme source du groupement ribosyle**

La SAM est considéré comme l'agent le plus important dans la modification post-transcriptionnelle de l'ARNt. Elle joue un rôle dans la méthylation des riboses des nucléosides. En plus, la SAM agit aussi comme source de groupement ribosyle dans l'avant-dernière étape de biosynthèse de la queuosine (nucléoside d'ARNt modifié) (Iwata-Reuyl, 2003) (Schéma 2c). La 7-déazaguanosine (queuosine) contient comme chaîne latérale un aminométhyl cyclopentanediol. La queuosine se trouve exclusivement dans l'anticodon en position 34 de la boucle de l'ARNt codant pour l'asparagine, l'acide aspartique, l'histidine et la tyrosine.

L'enzyme SAM-tRNA ribosyltransférase-isomérase (QueA) catalyse le transfert du groupement ribosyle de la SAM, avec élimination de la méthionine et de l'adénine, vers la 7-amino-méthyl-7déaza-guanosine dans l'ARNt modifié (ARNt-preQ1 dans le Schéma 4) suivi d'un réarrangement conduisant à la formation de l'époxy-carbocycle (ARNt-oQ dans la schéma 4) (Van Lanen *et al.*, 2003). Ensuite, une désoxygénation enzymatique de cet époxy-carbocycle conduit à la formation de la queuosine (Iwata-Reuyl, 2003).

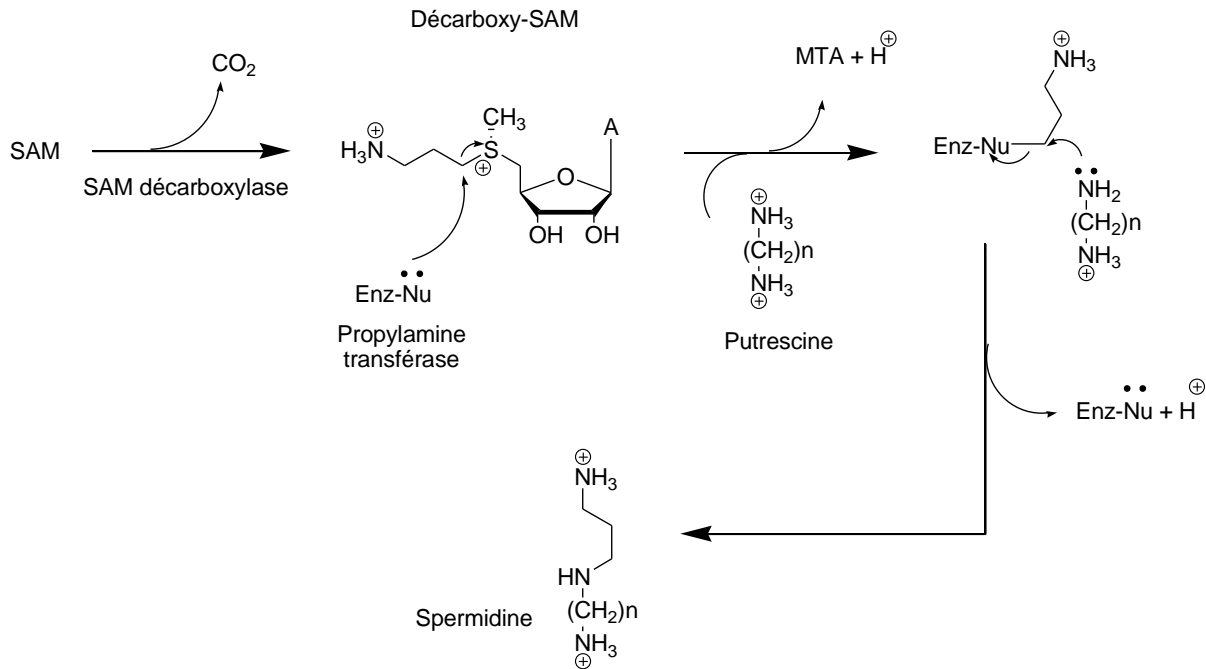


**Schéma 4.** S-adénylméthionine ou SAM comme donneur de groupement de ribosyle. La SAM-tRNA ribosyltransférase-isomérase (QueA) catalyse le transfert du groupement ribosyle de la SAM vers l'ARNt modifié (ARNt-preQ1).

## II.5 SAM comme source du groupement aminoalkyle

La SAM joue un rôle de donneur de groupement aminopropyle aux diamines lors de la biosynthèse des polyamines catalysée par la propylamine transférase. Par contre, ce n'est pas vraiment la SAM qui est donneur de ce groupement d'aminopropyle mais c'est la SAM décarboxylée qui est obtenue par une réaction de décarboxylation de la SAM catalysée par la SAM décarboxylase (Schémas 2g et 5). L'étude de la cinétique de la spermidine synthase, une propylamine transférase bien étudiée, a révélé l'évidence d'un mécanisme ping-pong indiquant l'obtention d'une forme intermédiaire propylaminée de l'enzyme (Schéma 5) (Zappia *et al.*, 1980). La liaison C (propylamine)-S de la SAM décarboxylée est attaquée par un groupement nucléophile (non encore identifié) de la propylamine transférase provoquant la

libération de 5'-méthylthioadénosine (MTA) dans le milieu. Par la suite, le groupement aminopropyle est transféré au substrat diaminé pour former la spermidine avec une régénération du site actif nucléophile.



**Schéma 5.** S-adénylméthionine ou SAM comme donneur de groupement d'aminopropyle. La réaction est catalysée par l'aminopropyl transférase. Le donneur actuel du groupement d'aminopropyle est la SAM décarboxylée. Cette réaction implique une attaque nucléophile de la protéine sur la SAM. L'enzyme alkylée transfère ensuite son groupement aminopropyle vers la putrescine pour former la spermidine.

## II.6 SAM comme source du radical 5'-désoxyadénosyle

Depuis une quinzaine d'années, des études faites sur trois systèmes enzymatiques différents contenant des clusters Fer-Soufre (lysine 2,3-amino-mutase, pyruvate-formate lyase, anaérobie ribonucléotide réductase) et requérant de la SAM pour leur activité ont contribué à confirmer que la SAM est une importante source de radicaux dans les cellules vivantes.

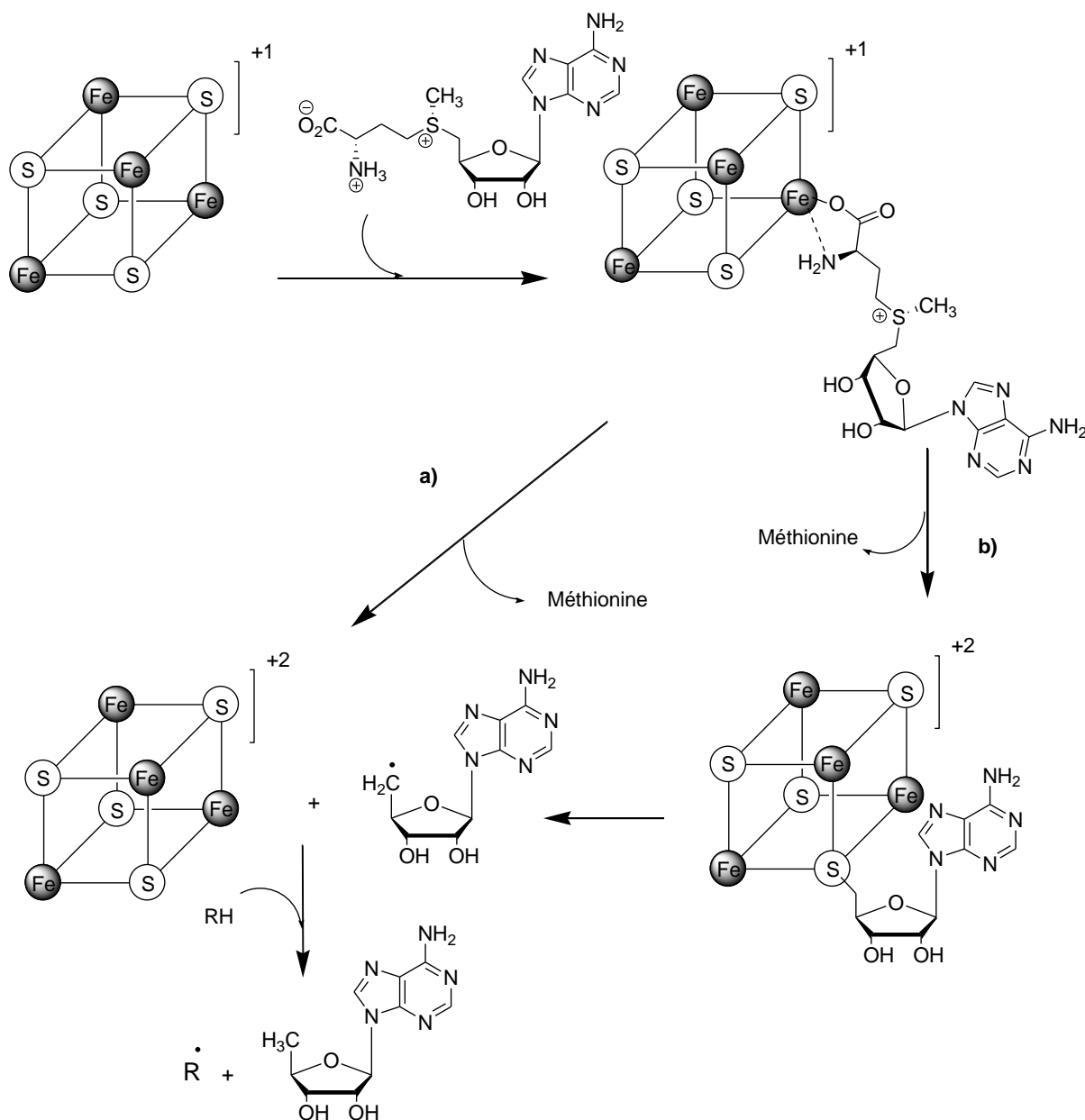
Tous ces systèmes ont besoin d'un cluster [4Fe-4S] fixé par trois thiolates de cystéine de l'enzyme induisant un seul site de coordination de la SAM. Ces cystéines sont présentes dans un motif bien conservé Cys-XXX-Cys-XX-Cys dans le site actif.

Puisque le cluster n'est actif que dans son état réduit  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ , une source d'électrons est nécessaire. Ces enzymes sont considérées comme des prototypes pour une grande famille de métalloenzymes qui ont le motif Cys-XXX-Cys-XX-Cys en commun, un cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  ainsi que la SAM comme substrat. Cette famille d'enzymes est appelée «enzyme à radical SAM» et, selon les données bioinformatiques, cette famille contient des centaines de ces enzymes qui interviennent dans de nombreuses réactions biologiques (biosynthèse des précurseurs d'ADN, vitamines, cofacteurs et antibiotiques), dans des voies de biodégradation, dans la modification d'ARNt et la réparation d'ADN.

La combinaison SAM-[Fe-S]-e<sup>-</sup> a une fonction comme source de radicaux 5'-désoxyadénosyle (schéma 6) obtenus par clivage réductif de la liaison S-C (5'-désoxyadénosyle) de la SAM. L'énergie de dissociation de cette liaison est de ~ 60 Kcal/mole et son clivage homolytique n'est seulement possible qu'après une réduction par un électron résultant de la diminution de l'énergie de liaison.

On a démontré que le mécanisme réactionnel impliquait deux étapes.

En premier lieu, la SAM se lie par ses groupements amino et carboxylate au cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  au niveau de l'atome de fer non lié à une cystéine. Cette liaison a été caractérisée par résonance paramagnétique électronique (RPE), résonance nucléaire double électrons (ENDOR), résonance RAMAN, spectroscopie de Mössbauer (Walsby *et al.*, 2002; Krebs *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003) et récemment par cristallographie de diffraction de rayons X (Layer *et al.*, 2003 ; Berkovitch *et al.*, 2004). Deux scénarios sont ensuite proposés. i) La SAM reçoit un électron du cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  induisant la coupure homolytique de la liaison S-C(5'-désoxyadénosyle) et la libération du radical Ado<sup>•</sup> et de méthionine ; ii) le radical 5'-adénosyle est formé à partir d'une décomposition d'un intermédiaire adénosylé du cluster Fe-S, obtenu à partir d'une attaque électrophile du C-5' de la SAM sur ce cluster. Ce radical Ado<sup>•</sup> est supposé initier une réaction enzymatique provoquant l'arrachement d'un proton d'un substrat RH (Schéma 6) et qui induit la formation de 5'-désoxyadénosine et du radical R<sup>•</sup>.



**Schéma 6.** S-adénosylméthionine ou SAM comme précurseur de radical 5'-désoxyadénosyle, les deux mécanismes hypothétiques de formation du radical 5'-désoxyadénosyle (Fontecave *et al.*, 2004).

### III. Les protéines de la famille « Radical-SAM »

#### III.1 Les protéines à centre [Fe-S]

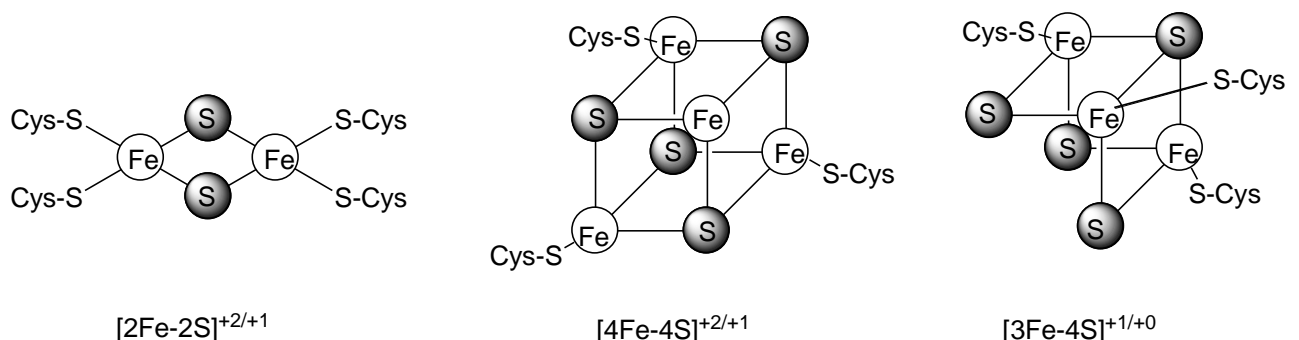
Les protéines à centre Fer-Soufre ([Fe-S]) sont des espèces biologiques très anciennes apparues dans le métabolisme primitif, donc très tôt dans l'évolution (Holliday *et al.*, 2007). Dans les années 1960, une ferrédoxine isolée de *Clostridium*



*pasteurianum* a été identifiée comme première protéine à centre fer-soufre (Mortenson *et al.*, 1962). Les centres [Fe-S] sont très instables vis-à-vis de l'oxygène. Les découvertes tardives des protéines contenant ce groupe prosthétique, pourtant coloré, sont dûes à cette instabilité. Aujourd'hui, plusieurs protéines [Fe-S] ont été identifiées, elles sont présentes dans les trois domaines du vivant (Johnson *et al.*, 2005).

Les centres [Fe-S], présents dans les sites actifs des protéines, sont formés à partir d'un assemblage d'ions sulfures et d'atomes de fer dans différents états d'oxydation (fer ferreux Fe<sup>2+</sup> ou fer ferrique Fe<sup>3+</sup>) en stoechiométrie variable. Ces agrégats forment une structure appelée « cluster » ou « centre » [Fe-S]. La liaison de ces clusters à la protéine est effectuée grâce aux groupements thiols des cystéines présentent dans le site actif. Toutefois, des ligands de nature différente peuvent intervenir dans la liaison de ces clusters à la protéine comme par exemple, les atomes d'azote appartenant à des histidines ou des arginines (Berkovitch *et al.*, 2004, Gurbiel *et al.*, 1991) ou bien des atomes d'oxygène fournis par des résidus aspartate, sérine, glutamine ou tyrosine (Brereton *et al.*, 1999, Calzolari *et al.*, 1995, Dobritzsch *et al.*, 2001). Enfin, la coordination des atomes de fer par des ligands exogènes a pu être observée (substrat d'enzyme, SAM, molécule d'eau) (Lauble *et al.*, 1992, Layer *et al.*, 2003).

Les centres [Fe-S] existent majoritairement dans les protéines sous les formes suivantes : [2Fe-2S]<sup>2+/1+</sup> ou [4Fe-4S]<sup>2+/1+</sup> et son produit de dégradation [3Fe-4S]<sup>1+/0</sup> (Figure 2).



**Figure 2.** Les centres [Fe-S] majoritairement rencontrés dans les protéines. Cys : cystéine

### III.2 La famille des « Radical-SAM »

Dans le cas des enzymes de la famille des enzymes à « Radical-SAM », le centre [4Fe-4S] est coordonné par trois cystéines, et la S-Adénosylméthionine a été identifiée comme quatrième ligand du centre (Frey et Magnusson, 2003). Une étude bioinformatique a permis de regrouper ces enzymes dans une superfamille appelée « Radical-SAM ». Elles sont présentes dans tous les domaines du vivant et procèdent d'un mécanisme commun conservé permettant de réaliser des réactions chimiquement difficiles (Sofia *et al.*, 2001) (Figure 2). Plusieurs réactions variées (méthylations, isomérisations, cyclisations, oxydations, insertions de soufre) impliquées dans diverses voies de biosynthèse (ADN, vitamines, cofacteurs, antibiotiques) peuvent être catalysées par ces enzymes. On dénombre aujourd'hui plus de 40 réactions catalysées par des enzymes appartenant à la famille « Radical-SAM » (Frey *et al.*, 2008).

### III.3 Découverte de la famille des enzymes à radical-SAM

La lysine 2,3-aminomutase (LAM) de *Clostridium subterminale* a été caractérisée comme la première protéine appartenant à cette famille (Chirpich *et al.*, 1970, Zappia et Barker, 1970). Cette enzyme, sensible à l'oxygène et responsable de la conversion de la lysine en  $\beta$ -lysine, exige la présence de dithionite et de S-adénosylméthionine (SAM) dans son mécanisme catalytique (Moss et Frey, 1987). La présence d'un centre [4Fe-4S] a été démontrée grâce à une étude de Résonance Paramagnétique Electronique effectuée par R.M. Petrovitch *et al.* (1991 ; 1992). C'est après une vingtaine d'années que le rôle de la SAM a été élucidé.

En effet, prenant en considération que la même réaction était catalysée par la lysine mutase, ayant pour cofacteur l'adénosylcobalamine, il a été proposé qu'une rupture homolytique de la SAM par une réduction à un électron, engendre un radical 5'-désoxyadénosyle, similaire à celui issu de l'adénosylcobalamine dans le cas de la  $\beta$ -lysine mutase (Baraniak *et al.*, 1989, Moss *et al.*, 1987). Ce radical va ensuite arracher un atome d'hydrogène au substrat, créant le radical substrat correspondant, qui se réarrange ensuite pour conduire au produit réactionnel.

Quatre autres protéines dépendantes de la SAM appartenant à cette nouvelle famille ont été ensuite étudiées (Frey *et al.*, 2008) : l'activase de la pyruvate-formiate lyase

(PFL), l'activase de la ribonucléotide réductase anaérobie (RNR), la biotine synthase (BioB), et la lipoate synthase (LipA), par ordre chronologique. Elles possèdent toutes un centre [4Fe-4S] chélaté par les trois cystéines du motif conservé CxxxCxxC (Figure 3).

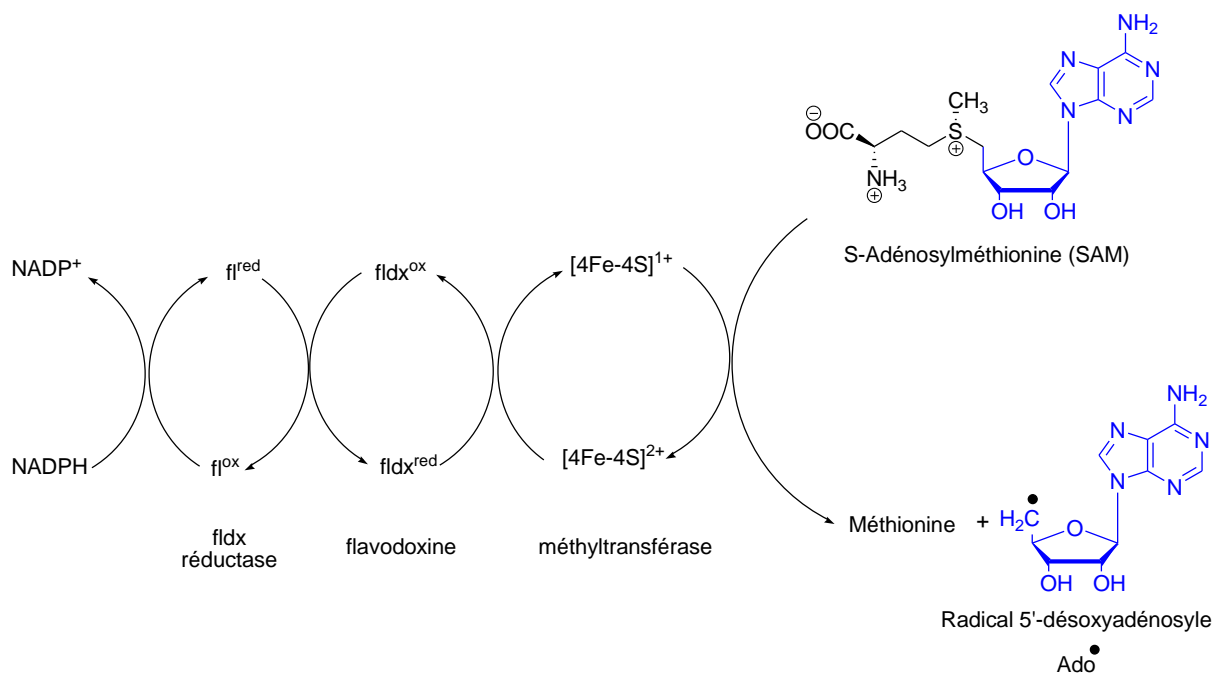
Actuellement, on dénombre près de 3000 protéines contenant ce motif pour 800 génomes séquencés, mais seulement une vingtaine de protéines ont été étudiées biochimiquement et réellement caractérisées (Frey *et al.*, 2008).

LAM ( <i>C. subterminale</i> )	T	D	M	C	S	M	Y	C	R	H	C	T	R	R	Biosynthèse de la lysine
PFL-AE ( <i>E. coli</i> )	F	Q	G	C	L	M	R	C	L	Y	C	H	N	R	Activation de la PFL
RNR-AE ( <i>E. coli</i> )	V	S	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	Activation de la RNR
BioB ( <i>E. coli</i> )	T	G	A	C	P	E	D	C	K	Y	C	P	Q	S	Biosynthèse de la biotine
SPL ( <i>B. subtilis</i> )	A	T	G	C	M	G	H	C	H	Y	C	Y	L	Q	Réparation de l'ADN
HemN ( <i>E. coli</i> )	I	P	F	C	H	K	L	C	Y	F	C	G	C	N	Biosynthèse du coproporphyrinogène
MoaA ( <i>E. coli</i> )	T	D	V	C	N	F	R	C	T	Y	C	L	P	D	Biosynthèse des molybdoptérines
HydE ( <i>C. reinhardtii</i> )	S	N	I	C	Q	N	D	C	S	Y	C	G	I	R	Maturation des Fe-hydrogénases

**Figure 3. Alignement d'une partie des séquences de différentes protéines possédant le motif CxxxCxxC conservé** (Frey *et al.*, 2008). LAM : Lysine 2,3-aminomutase ; PFL-AE : sous-unité activatrice de la Pyruvate- Formiate Lyase ; RNR-AE : sous-unité activatrice de la ribonucléotide réductase anaérobie ; BioB : biotine synthase ; SPL : spore photoproduct lyase ; HemN : coproporphyrinogène III oxydase ; MoaA : biosynthèse des molybdoptérines ; HydE : maturase des hydrogénases à fer.

### III.4 Mécanisme réactionnel des enzymes à radical-SAM

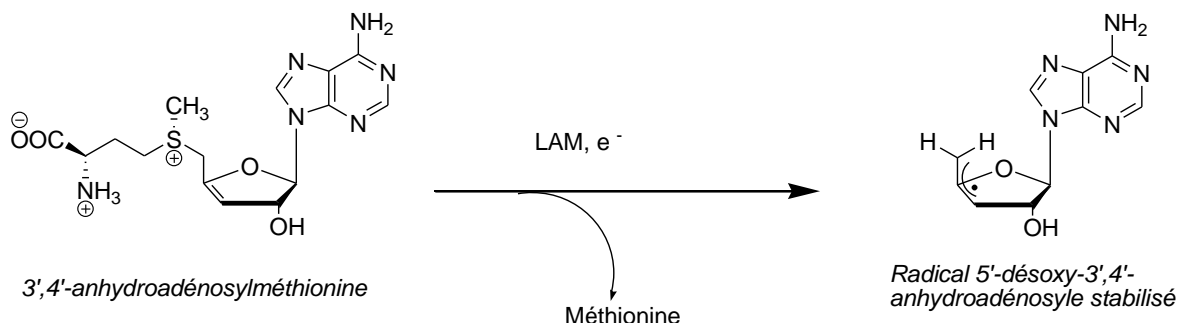
Malgré la diversité des réactions catalysées par les enzymes à radical-SAM, la formation d'un radical, provenant de l'intervention du cluster [Fe-S] et la S-adénosylméthionine, constitue l'étape commune dans tous les mécanismes réactionnels catalysés par ses enzymes (Schéma 7).



**Schéma 7. Mécanisme commun à toutes les protéines « Radical-SAM »** : réductolyse de la S-adénosylméthionine avec formation du radical 5'-désoxyadénosyle. fldx : flavodoxine.

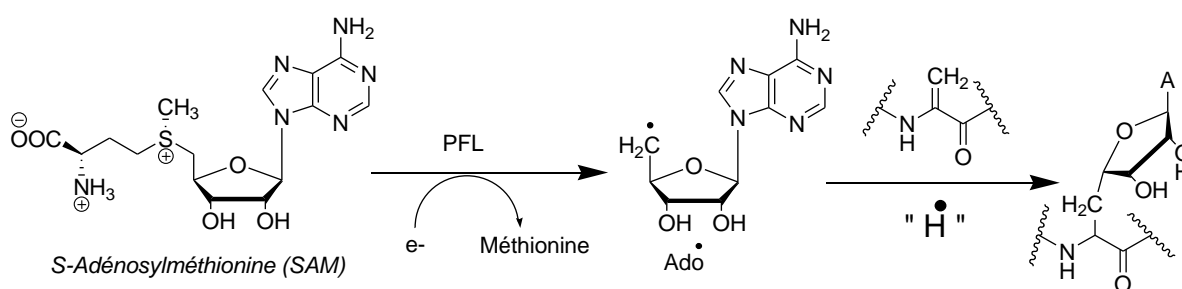
Dans un premier temps, le centre  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  est réduit à l'état d'oxydation +2 à l'état +1 qui est l'état rédox actif  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  pour la réductolyse de la SAM (Fontecave *et al.*, 2001). Le potentiel d'oxydoréduction du couple  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$  pour l'activase de la RNR anaérobie est égale à  $E^0 = -550$  mV (par rapport à l'électrode normale à hydrogène) (Mulliez *et al.*, 2001), à  $E^0 = -440$  mV pour la BioB (Ugulava *et al.*, 2001) et à  $E^0 = -495$  mV pour la MiaB (Pierrel *et al.*, 2003). Le réducteur physiologique des enzymes « Radical-SAM » a été proposé comme étant le système (NADPH : flavodoxine : flavodoxine réductase) (Birch *et al.*, 1995, Blaschkowski *et al.*, 1982, Ifuku *et al.*, 1994, Layer *et al.*, 2002, Mulliez *et al.*, 2001), par contre *in vitro*, la réduction à un électron du centre  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  est généralement réalisée par des réducteurs chimiques puissants, tels que le dithionite ( $E^0 \approx -550$  mV, pH 8) ou la 5-déazaflavine (5-DAF) photoréduite ( $E^0 \approx -650$  mV, pH 8). Le transfert mono-électronique du centre réduit vers la SAM engendrait en clivant homolytiquement la liaison C5–S du sulfonium, la méthionine et le radical 5'-désoxyadénosyle, hautement réactif. Ce radical est responsable de l'initiation des réactions catalysées par les protéines de la famille à « Radical-SAM ». Dû à sa grande réactivité, le 5'-désoxyadénosyle ( $\text{Ado}^\bullet$ ) transitoire n'a jamais été observé directement. Cependant, P. A. Frey *et al.* ont observé et caractérisé un radical allylique stabilisé (Schéma 8),

lors de la réaction de la LAM en présence de la lysine et un analogue de la SAM, le 3',4'-anhydroadénylméthionine (Magnusson *et al.*, 2001 ; Frey et Magnusson, 2003).



**Schéma 8.** Observation d'un analogue stabilisé du radical Ado $\bullet$ . (Magnusson *et al.*, 2001 ; Frey et Magnusson, 2003).

Une autre indication en faveur de l'existence du radical Ado $\bullet$  a été apportée par l'équipe de J. Knappe. Une activase, membre de la famille « Radical SAM », est responsable de la formation d'un radical glycinyle dans la forme active du PFL. Un octapeptide contenant une déshydroalanine à la place de la glycine en question a été synthétisé. Des analyses en spectrométrie de masse et en RMN 2D du produit de la réaction d'activation ont montré la formation d'une liaison covalente entre le carbone C-5' de la partie adénylosylé et le carbone en  $\beta$  du résidu déshydroalanine (Schéma 9) (Wagner *et al.*, 1999).

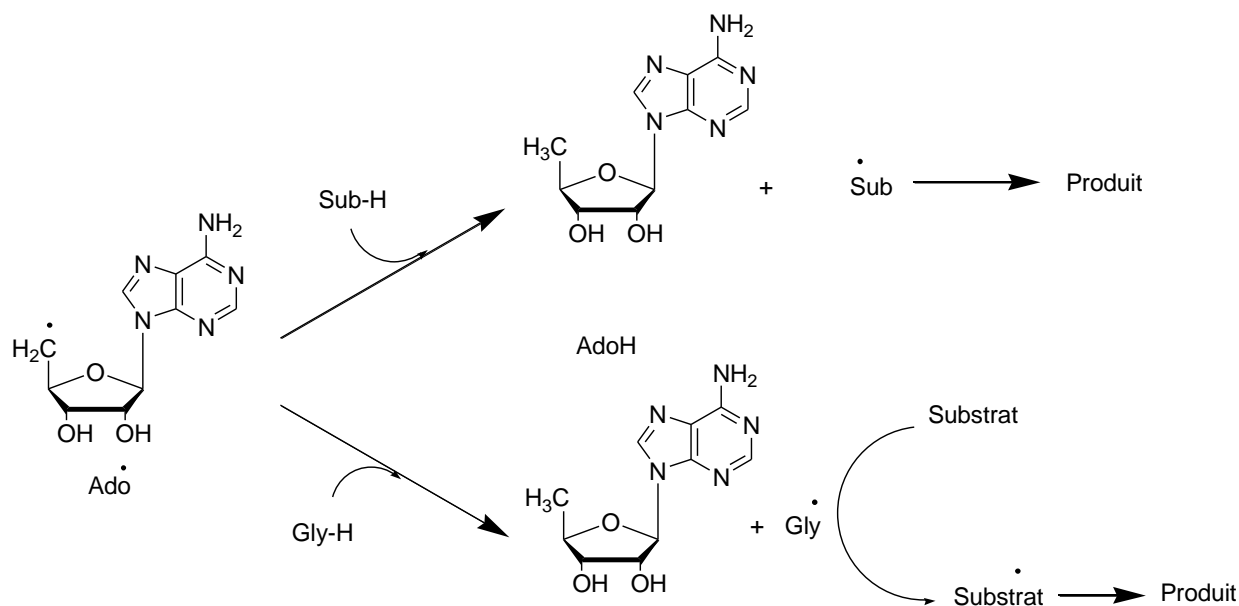


**Schéma 9.** Piégeage du radical 5'-désoxyadénosine par un octapeptide, où seule la déshydroalanine est représentée.

Actuellement, il existe deux hypothèses de mécanisme de formation du radical 5'-désoxyadénylosylé (Fontecave *et al.*, 2004). La SAM est dans tous les cas coordonnée

par son groupement aminocarboxylate de la partie méthionine à un atome de fer du centre [Fe-S] (Krebs *et al.*, 2002, Walsby *et al.*, 2002a). Dans un premier cas, le centre [Fe-S] transfère un électron à la SAM ce qui induit une coupure homolytique de la liaison C-S et conduit directement à la formation d'Ado• (schéma 6a). Dans un deuxième cas, le radical est engendré en deux étapes à partir du complexe cluster-SAM. Un des soufres du cluster substituerait la méthionine sur le carbone 5' de la SAM. La décomposition de cet intermédiaire produit alors le radical 5'-désoxyadenosyle (Schéma 6b).

Les étapes suivant la formation du radical Ado• sont spécifiques à chaque enzyme de la superfamille. Néanmoins, elles peuvent se regrouper en deux sous-familles, selon le type de substrat (petite molécule organique ou protéine) auquel Ado• arrache un atome d'H. Celui-ci peut en effet arracher soit un atome d'hydrogène spécifique du substrat (représenté par Sub – H Schéma 10) qui subit par la suite un réarrangement radicalaire menant au produit (comme dans le cas de la Lysine 2,3-aminomutase LAM), soit l'hydrogène d'un résidu glycine engendrant un radical sur la protéine (comme l'activase de la Ribonucléotide Réductase anaérobie (RNR) ou l'activase de la Pyruvate-Formiate Lyase (PFL)) représenté par Gly – H (Schéma 10). Cependant, il est à noter que le devenir de la 5'-désoxyadénosine (AdoH) formée peut varier selon le système. Ainsi, dans le cas de la Lysine 2,3-aminomutase (LAM), le radical Ado• est régénéré au site actif de l'enzyme à chaque cycle catalytique alors que pour toutes les autres « radical-SAM » étudiées jusqu'à présent *in vitro*, le radical Ado• est irréversiblement transformé en 5'-désoxyadénosine (AdoH) après l'arrachement de l'atome d'hydrogène (Frey et Booker, 2001).

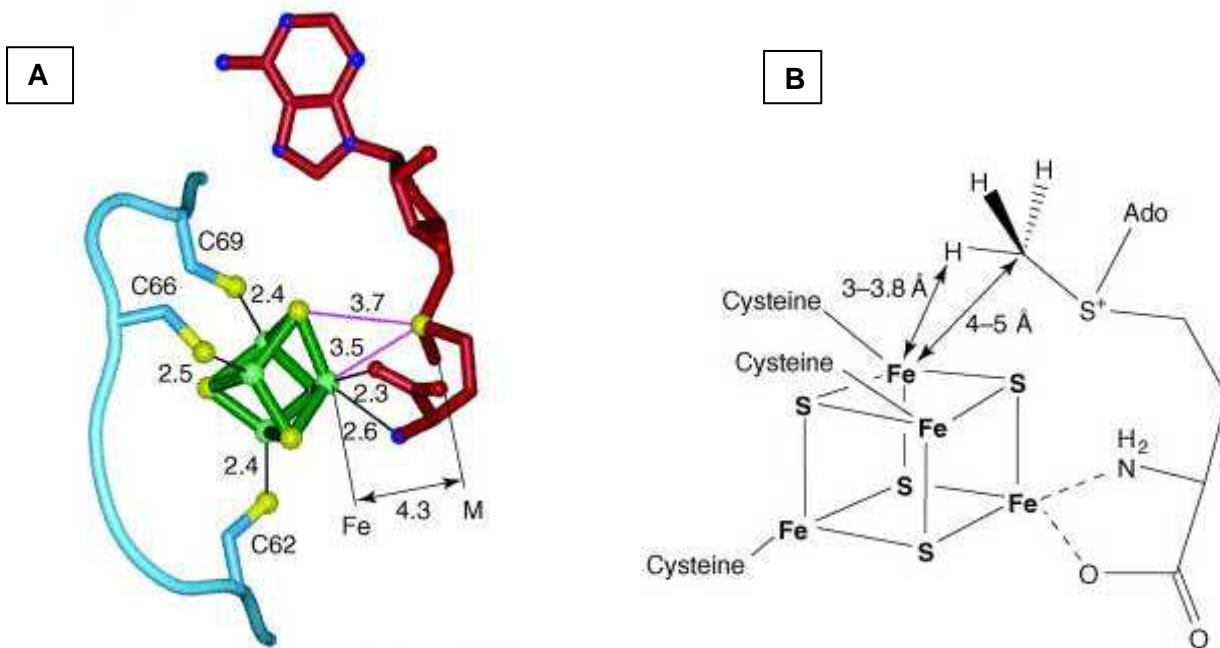


**Schéma 10.** Mécanisme des deux sous-familles de « Radical-SAM ». Sub-H représente le substrat. Glycol représente le résidu glycine de l'enzyme.

### III.5 Structure des enzymes « Radical-SAM »

Des études spectroscopiques ont témoigné que la liaison existante entre le centre [Fe-S] et la SAM est une liaison covalente, vraisemblablement au niveau du quatrième Fer différencié.

Entre 2003 et 2008, l'organisation spatiale du centre [4Fe-4S] et de la SAM a été révélée grâce aux plusieurs études structurales de cinq protéines « Radical-SAM » en présence de leur centre [Fe-S] et de la SAM (Berkovitch *et al.*, 2004, Hanzelmann et Schindelin, 2004, Layer *et al.*, 2003, Lepore *et al.*, 2005, Nicolet *et al.*, 2008). Dans toutes ces structures, les trois atomes de fer du centre [Fe-S] sont liés par les trois cystéines du motif CxxxCxxC. La coordination bidentate du quatrième atome de fer par l'atome d'azote du groupe amino et par un atome d'oxygène du carboxylate de la SAM (Figure 4).

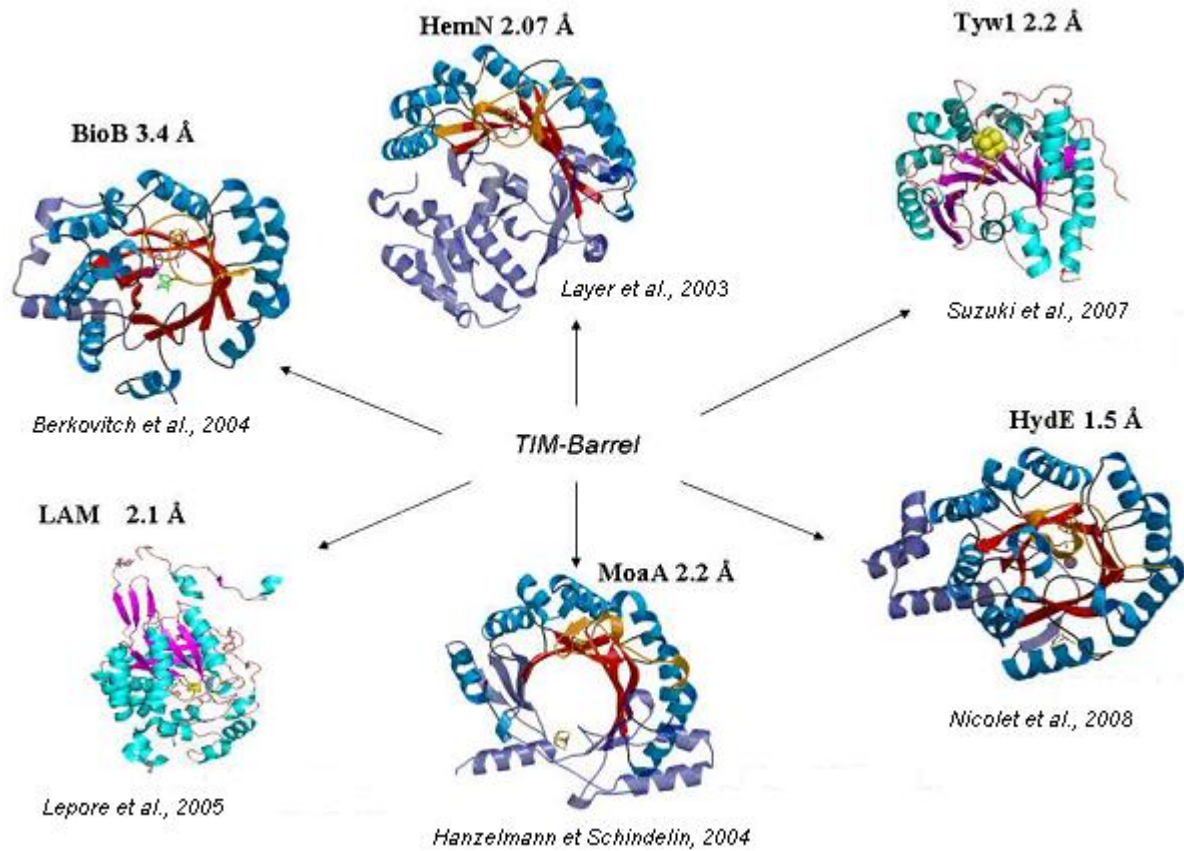


**Figure 4** : Figure issue de la structure tridimensionnelle de HemN d'après (Layer *et al.*, 2003). Les atomes de fer sont indiqués en vert. Trois d'entre eux sont chélatés par les trois cystéines du motif CxxxCxxC C62, C66 et C69. Le quatrième ligand du quatrième fer est le groupement aminocarboxylate de la SAM. Les atomes de soufre sont indiqués en jaune.

Les structures des six protéines « Radical-SAM » actuellement résolues (HemN, BioB, MoeA, LAM et plus récemment HydE et Tyw1) partagent toutes le même repliement de type tonneau  $\beta$  ou tonneau TIM (triose phosphate isomérase), une structure de type  $(\alpha/\beta)$  commune à de nombreuses protéines dans laquelle un anneau interne à huit brins  $\beta$  parallèles est entouré d'une couronne de huit hélices  $\alpha$  (Murzin *et al.*, 1995) (Figure 5). La structure de Tyw1 a été résolue sans SAM et sans le centre [4Fe-4S]. Un modèle a été construit de façon à positionner la SAM, les deux centres [Fe-S] et le substrat de la protéine (Goto-Ito *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2007). C'est au cœur du tonneau où le cluster [Fe-S] et la SAM sont localisés. Seule la biotine synthase possède un repliement complet de type  $(\alpha/\beta)$ , alors que les autres structures disponibles ont un tonneau incomplet contenant entre 4 et 6 paires  $\alpha/\beta$ . Des études en bioinformatique ont prédit que la majorité des enzymes à « Radical-SAM » devrait avoir un repliement  $(\alpha/\beta)$  (Layer *et al.*, 2005, Nicolet et Dernnan, 2004)



tandis que les membres les plus primitifs de la superfamille auraient une structure en demi-tonneau, ( $\alpha/\beta$ ), comme celle de la ribonucléotide réductase anaérobie.

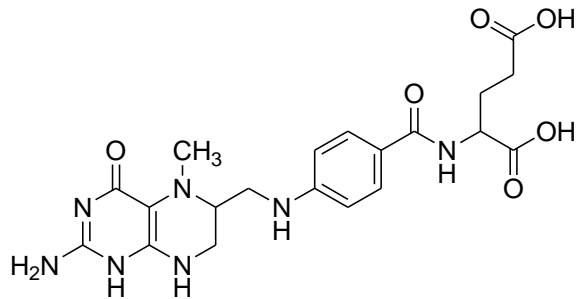


**Figure 5.** Structures des six protéines « Radical-SAM » actuellement résolues (HemN, BioB, MoaA, LAM, HydE et Tyw1).

#### IV. Méthyltétrahydrofolate ou Me-THF

Le tétrahydrofolate (THF) est la forme réduite de l'acide folique. Il était reconnu comme le composé qui se trouve dans la levure de boulangerie et qui lutte contre l'anémie. L'acide folique pur a été isolé par Esmond Snell, Herschel Mitchell et Roger Williams à partir des feuilles d'épinards (Mitchell *et al.*, 1941). Cette vitamine a été cristallisée (Pfiffner *et al.*, 1945 ; Stockstad, 1943) et synthétisée en 1946 par Lederle Laboratories (Angier *et al.*, 1946). L'acide 5-méthyltétrahydrofolique, également appelé acide lévoméfolique (Figure 6), est le dérivé biologiquement actif de l'acide folique, ou vitamine B<sub>9</sub>, qui intervient notamment dans le métabolisme des bases nucléiques (et donc du matériel génétique), de celui de la cystéine et de la régulation

de l'homocystéine. Sa forme ionisée en solution aqueuse est le 5-méthyltétrahydrofolate, généralement abrégé en 5-CH<sub>3</sub>-THF. La vitamine B<sub>9</sub>, absorbée au niveau de l'intestin grêle, doit être convertie en 5-CH<sub>3</sub>-THF pour être utilisée par l'organisme.



**Figure 6.** Structure de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique

Les folates servent de donneurs de méthyle, nécessaires à de nombreuses réactions cellulaires, dont la synthèse de nucléotides (bases puriques et pyrimidiques) et le métabolisme des acides aminés. La synthèse des bases puriques passe en particulier par la voie de la reméthylation de l'homocystéine, dépendant des folates et de la vitamine B<sub>12</sub>.

Le 5-méthyltétrahydrofolate est formé par la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) à partir du 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-CH<sub>2</sub>-THF) et intervient notamment pour convertir l'homocystéine en cystéine par la méthionine synthase (Schéma 11).

Le 5-CH<sub>3</sub>-THF a été proposé pour traiter des maladies cardiovasculaires ainsi que des cancers avancés tels que le cancer du sein et le cancer colorectal ; il favorise l'inhibition de la thymidylate synthase par la 5-fluoro-2'-désoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP) issue de la métabolisation du 5-fluorouracile, un agent anticancéreux.

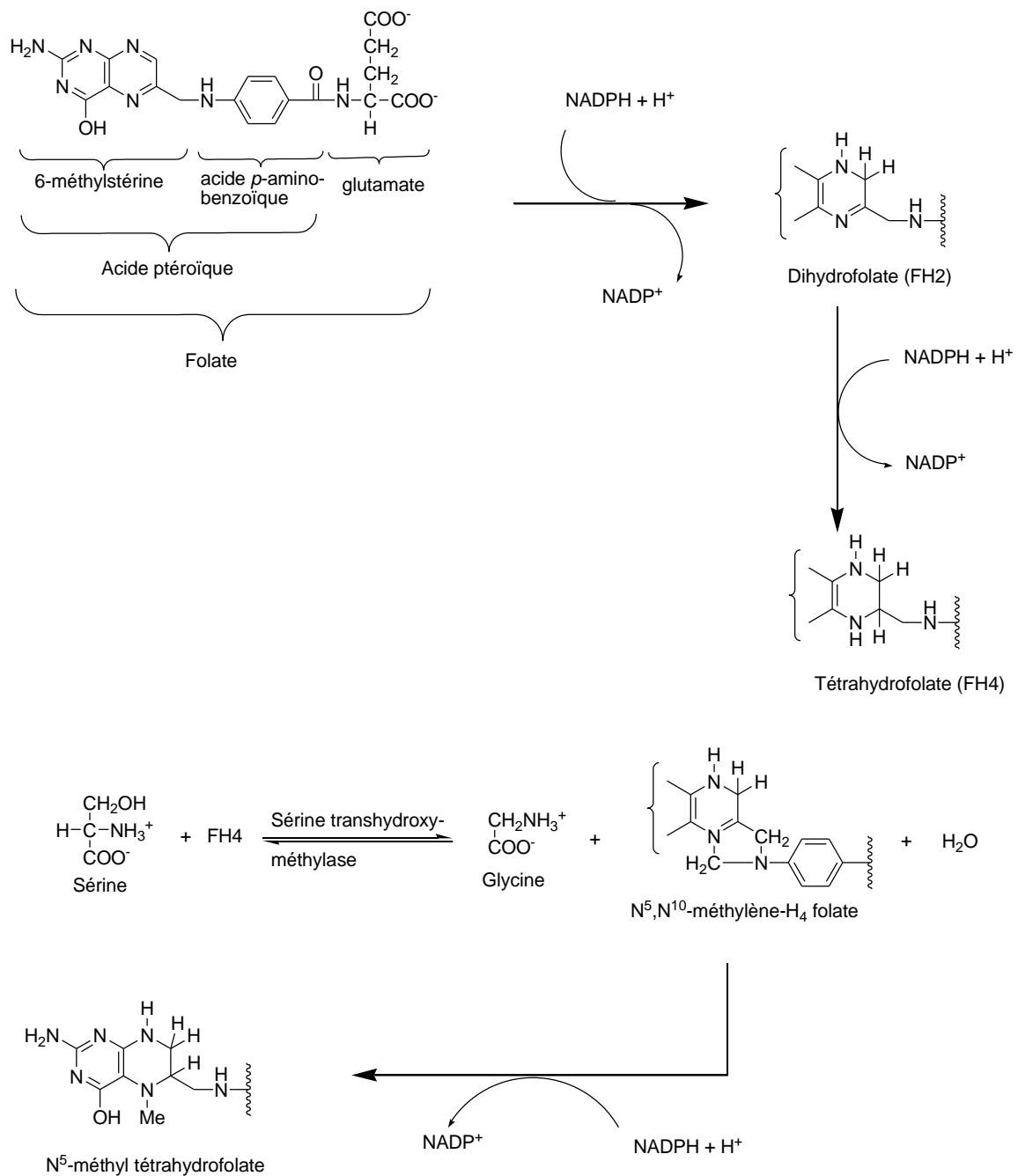


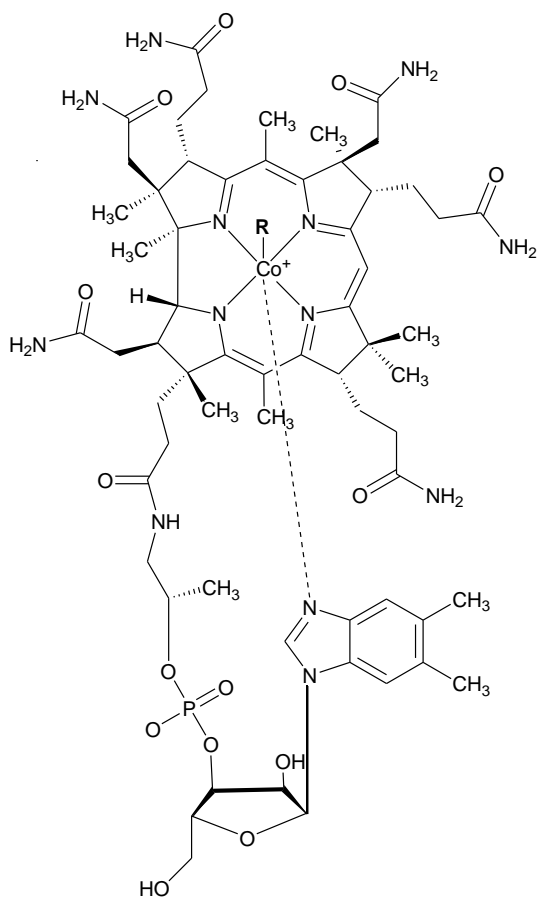
Schéma 11. Biosynthèse du 5-méthyltétrahydrofolate.

## V. Vitamine B<sub>12</sub>

L'histoire de la vitamine B<sub>12</sub> date depuis 1925 quand elle a été décrite comme le facteur permettant de lutter contre l'anémie pernicieuse (Minot et Murphy, 1926 ; Whipple *et al.*, 1925). La cobalamine a été isolée par l'équipe de Smith (Smith, 1948) et a été obtenue cristallisée aussi en 1948 (Rickes *et al.*, 1948). Sa structure a été

déterminée en 1956 (Hodgkin *et al.*, 1956). La vitamine B<sub>12</sub> est un cofacteur tetrapyrrolique avec un atome central de cobalt lié aux quatre ligands équatoriaux par quatre atomes d'azotes. C'est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau (elle participe à la synthèse de neuromédiateurs), du système nerveux (elle est indispensable au maintien de l'intégrité du système nerveux et tout particulièrement de la gaine de myéline qui protège les nerfs et optimise leur fonctionnement) et à la formation du sang.

Elle existe sous plusieurs formes appartenant à la famille des cobalamines : cyanocobalamine, hydroxycobalamine, méthylcobalamine et adénosylcobalamine, les deux premières étant ses formes stables.



**Figure 7.** Plusieurs formes des cobalamines.

R = 5'-désoxyadénosyle (adénosylcobalamine)

R = CH<sub>3</sub> (méthylcobalamine)

R = OH (hydroxycobalamine)

R = CN (cyanocobalamine)

## VI. Méthyltransférases

L'addition d'un groupement méthyle à des molécules biologiquement actives, comme des hormones, des neurotransmetteurs, des lipides, des protéines, ou des acides nucléiques provoque un changement des propriétés physicochimiques de ces

molécules. Les fonctions biologiques de la méthylation sont très larges, allant du métabolisme à la maturation des acides nucléiques en passant par la transduction du signal ou la détoxification. La diversité des fonctions dans lesquelles intervient la méthylation trouve pour reflet la variété étonnante des méthyltransférases (MTases), les enzymes qui catalysent les réactions de méthylation.

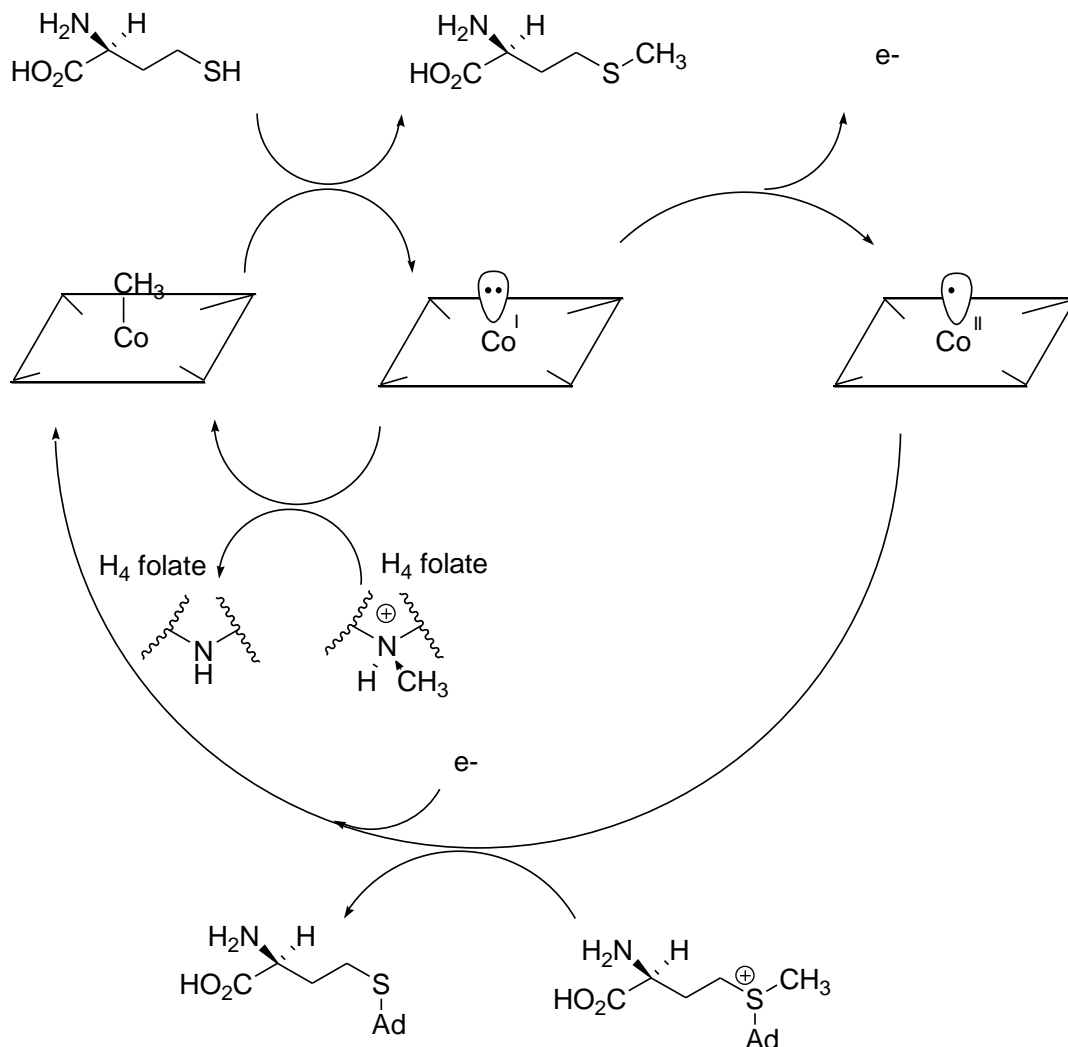
De ces méthyltransférases, nous allons nous intéresser à deux superfamilles : les MTases méthylcobalamine dépendantes et les MTases SAM dépendantes.

## **VI.1 MTases méthylcobalamine dépendantes**

### **VI.1.1 Méthionine synthétase**

La biosynthèse de la méthionine est le système le plus étudié parmi les MTases méthylcobalamine dépendantes. La méthionine synthétase la plus étudiée est celle qui a été purifiée d'*Escherichia coli* (Banerjee *et al.*, 1989). Cette enzyme catalyse le transfert du groupement de méthyle du N<sup>5</sup>-méthyltétrahydrofolate à l'homocystéine pour la formation de la méthionine sous l'action d'une enzyme ayant comme cofacteur la méthylcobalamine. Deux demi-réactions sont comprises dans le mécanisme de cette réaction (Schéma 12). Dans un premier temps, le groupe méthyle de la méthylcobalamine est transféré à l'homocystéine pour former la méthionine en libérant la cob(I)alamine fortement nucléophile. Une coordination du groupement thiol de l'homocystéine à un ion de zinc (Zn<sup>2+</sup>) de l'enzyme permet de diminuer le pK<sub>a</sub> du groupement thiol et favorise la formation de l'anion thiolate capable d'attaquer la MeCbl. Dans un second temps, la méthylcobalamine est régénérée grâce au transfert du groupement de méthyle du N<sup>5</sup>-méthyltetrahydrofolate à la cob(I)alamine. Malgré le fort caractère nucléophile de la cob(I)alamine, le méthyle du N<sup>5</sup>-méthyltétrahydrofolate présente un caractère électrophile faible et c'est l'atome d'azote N-5 qui est protoné dans le site actif pour faciliter l'attaque nucléophile par le cobalt (Matthews, 2001).

La cob(I)alamine est un agent de réduction très puissant, même capable de réduire les protons d'un solvant en hydrogène et conduit à l'oxydation de ce coenzyme en cob(II)alamine (Schéma 12).



**Schéma 12.** Mécanisme réactionnel de la méthionine synthase d'*E. coli* (Matthews, 2001).

Pour dépasser ce problème, l'enzyme possède une activité de méthylation réductive qui utilise la flavodoxine réduite, une protéine caractérisée par un faible potentiel de transfert d'électron, pour réduire le cobalt (II) en cobalt (I). D'autre part, la cob(II)alamine peut aussi utiliser la SAM (très bon donneur de groupement méthyle) comme un agent de méthylation pour former la méthylcobalamine et par la suite réduire l'étape non favorable de la réduction par la flavodoxine (Marsh, 1999).

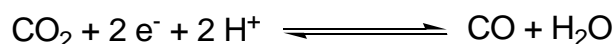
Toutes ces trois activités de méthylation sont contenues dans une seule enzyme de 1227 d'acides aminés. Des études de protéolyse ont montré que l'enzyme a une construction modulaire qui identifie quatre domaines fonctionnels. Vers l'extrémité *N*-

terminale, il y a un domaine de 38-KDa qui se lie à l'homocystéine. Un autre domaine de 33-KDa se lie au méthyltétrahydrofolate. Un troisième de 27-KDa se lie à la méthylcobalamine, et finalement, vers l'extrémité C-terminale, il y a un domaine de 38-KDa responsable de la réactivation de l'enzyme. Les structures des deux derniers domaines ont été identifiées séparément par cristallographie et diffraction des rayons-X (Dernan *et al.*, 1994 ; Dixon *et al.*, 1996) .

### VI.1.2 Acétate synthétase

La voie de Wood-Ljungdahl constitue un ensemble de plusieurs réactions métaboliques permettant à certaines bactéries (acétogènes par exemple) ou à des archéobactéries anaérobies (méthanogènes, notamment) de proliférer d'une manière autotrophe en utilisant le dioxyde de carbone comme source de carbone (Pelmont, 1993). L'enzyme responsable de ce processus est la carbone monoxyde déshydrogénase/acétyl coenzyme A synthase (CODH/ACS). Deux réactions sont catalysées par cette enzyme : la réduction du dioxyde de carbone en monoxyde de carbone (apport de deux électrons) et la formation de l'acétyl CoA par réaction d'un groupement méthyle avec une molécule de monoxyde de carbone, puis par réaction du groupement acyle formé avec la fonction thiol du Coenzyme A.

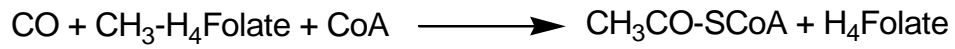
- **Fonction CODH.** Cette fonction est responsable de la réduction du dioxyde de carbone en monoxyde de carbone par réaction avec le dihydrogène (Figure 8).



**Figure 8.** Equation bilan de formation du monoxyde de carbone par la carbone monoxyde déshydrogénase (CODH).

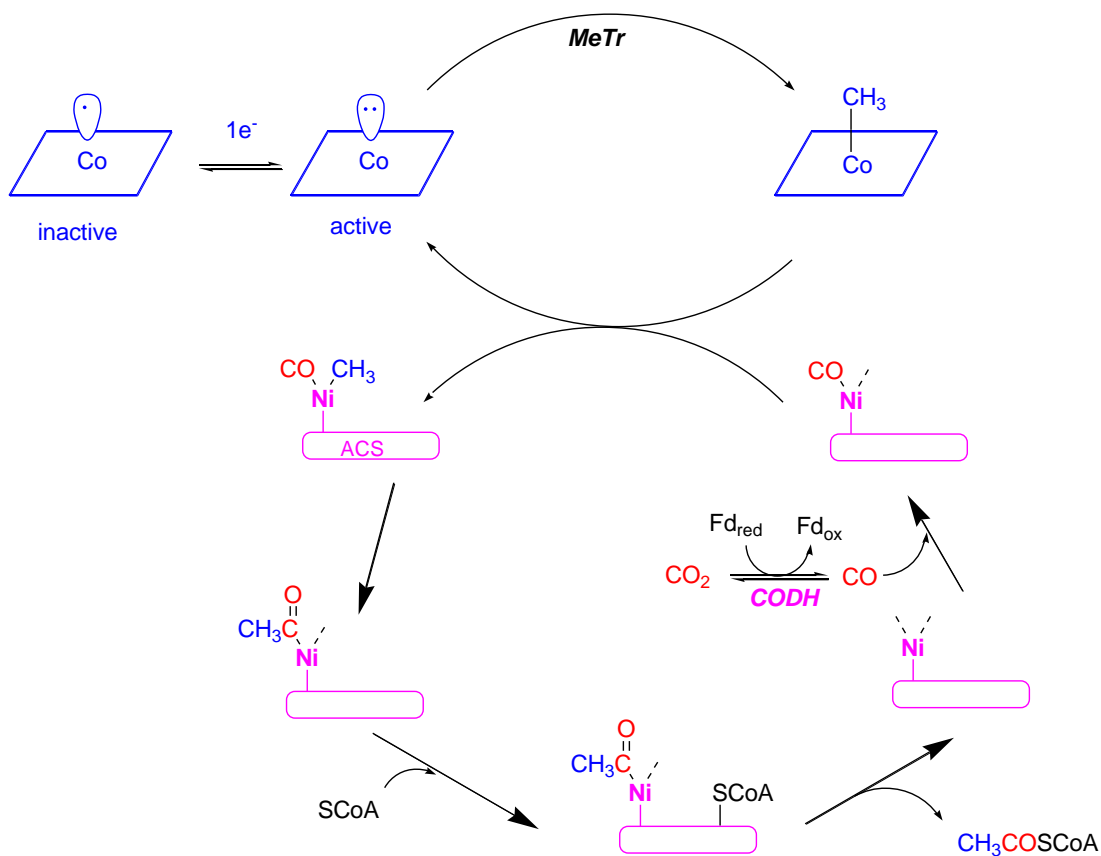
**Fonction ACS.** Plusieurs étapes interviennent dans cette réaction. Tout d'abord, la molécule de monoxyde de carbone synthétisée par la fonction CODH se lie au site catalytique. Une méthylcobalamine va ensuite transférer son groupement méthyle sur le site actif de l'enzyme au niveau d'un atome de nickel pour former un groupement acyle suite à sa réaction avec le monoxyde de carbone (Tucci et Holm, 1995; Linck *et al.*, 2003; Seravalli *et al.*, 1999). Finalement, le thioester acétyl CoA

est formé suite à une attaque du groupement acyle par la fonction thiol du Coenzyme A (Figure 9).



**Figure 9.** Bilan de la formation de l'acétyl CoA dans les organismes utilisant la voie de Wood-Ljungdahl.

Le schéma général de ces réactions est décrit dans le Schéma 13.



**Schéma 13.** Schéma global de l'activité de l'acétate synthétase et conduisant à la formation de CH<sub>3</sub>COSCoA.

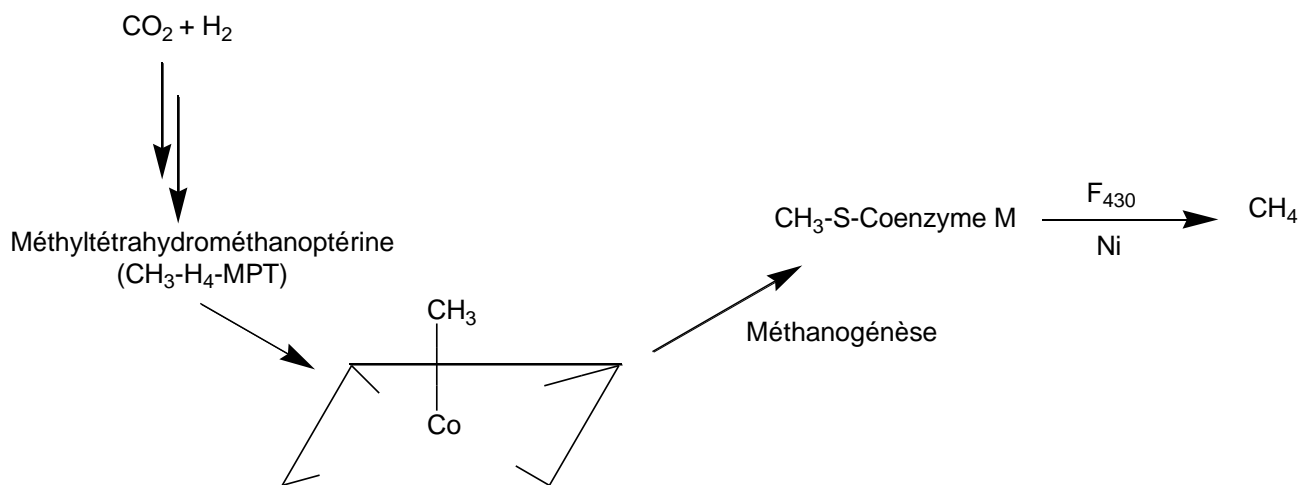


### VI.1.3 Méthane synthétase

Wolin et al ont démontré que la méthylcobalamine est impliquée dans la formation du méthane après plusieurs études effectuées sur des extraits cellulaires de *Methanosarcina barkerii* et *Methanobacillus omelianskii* (Wolin et al., 1963) .

Lezius et Barker (1965) ont isolé et caractérisé chez *Methanobacillus omelianskii* un corrinoïde appelé facteur III corrinoïde. Ce facteur III corrinoïde est une cobalamine avec un 5- hydroxybenzimidazole à la place du 5,6-diméthylbenzimidazole.

Wood et wolfe (1966) ont vérifié l'implication de ce facteur III corrinoïde dans la formation du méthane sous l'action de la méthane synthétase. Un analogue du méthyltétrahydrofolate (Me-H<sub>4</sub>-Folate), la méthyltétrahydrométhanoptérine (Me-H<sub>4</sub>-MPT) va transférer son groupement de méthyle vers le facteur III corrinoïde pour le transformer en méthylcobalamine (Schéma 14). Des expériences plus poussées avec du <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-méthylcorrinoïde ont indiqué que la réduction du groupement méthyle n'est pas homolytique dans le système enzymatique, mais que ce méthyle est transféré du méthylcorrinoïde formé vers une deuxième coenzyme (M) et qu'une réduction homolytique de cette coenzyme (M) méthylée, CH<sub>3</sub>-(M), par la méthylcoenzyme M réductase permettant la formation du méthane. Cette méthylcoenzyme M réductase a besoin comme coenzyme, le F<sub>430</sub> (un macrocycle à base de nickel) (Ermler et al., 1997).



**Schéma 14.** Rôle de la méthylcobalamine dans la biosynthèse du méthane.

## VI.2 MTases SAM dépendantes

Plusieurs enzymes appartenant à la famille des méthyltransférases SAM-dépendantes catalysent des réactions de méthylation. Notons comme exemples, les méthylases d'ADN (responsable de la biosynthèse des acides nucléiques) et les catéchols méthyltransférases (impliquées dans la méthylation des groupements hydroxyles de plusieurs substrats comme la L-DOPA et l'épinéphrine).

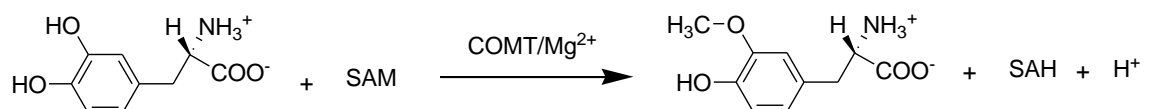
### VI.2.1 Catéchol O-méthyltransférase ou COMT

Plusieurs catéchols sont considérés comme des substrats accepteurs du groupement du méthyle provenant de la SAM et transféré par la COMT. On note comme par exemple, l'épinéphrine et la L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) qui sont deux substrats de cette méthyltransférase.

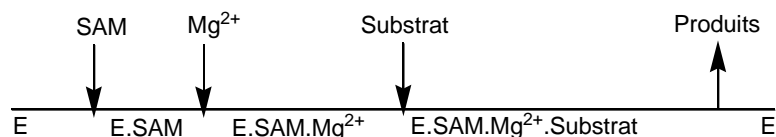
L'action de la catéchol O-méthyltransférase sur la L-DOPA est illustrée dans la Figure 10. Le mode d'action de cette méthyltransférase exige la présence de  $Mg^{2+}$  et la méthylation de la L-DOPA se fait au niveau des groupements hydroxyles mais de préférence sur le groupement hydroxyle en position *meta*.

L'étude cinétique de cette enzyme montre bien que le mécanisme s'effectue dans un ordre bien défini (Figure 10). La SAM se lie dans un premier temps à l'enzyme suivie du  $Mg^{2+}$  et dans un second temps le substrat vient se fixer pour compléter l'action catalytique (Lotta *et al.*, 1995).

A. Réaction



B. Mécanisme cinétique

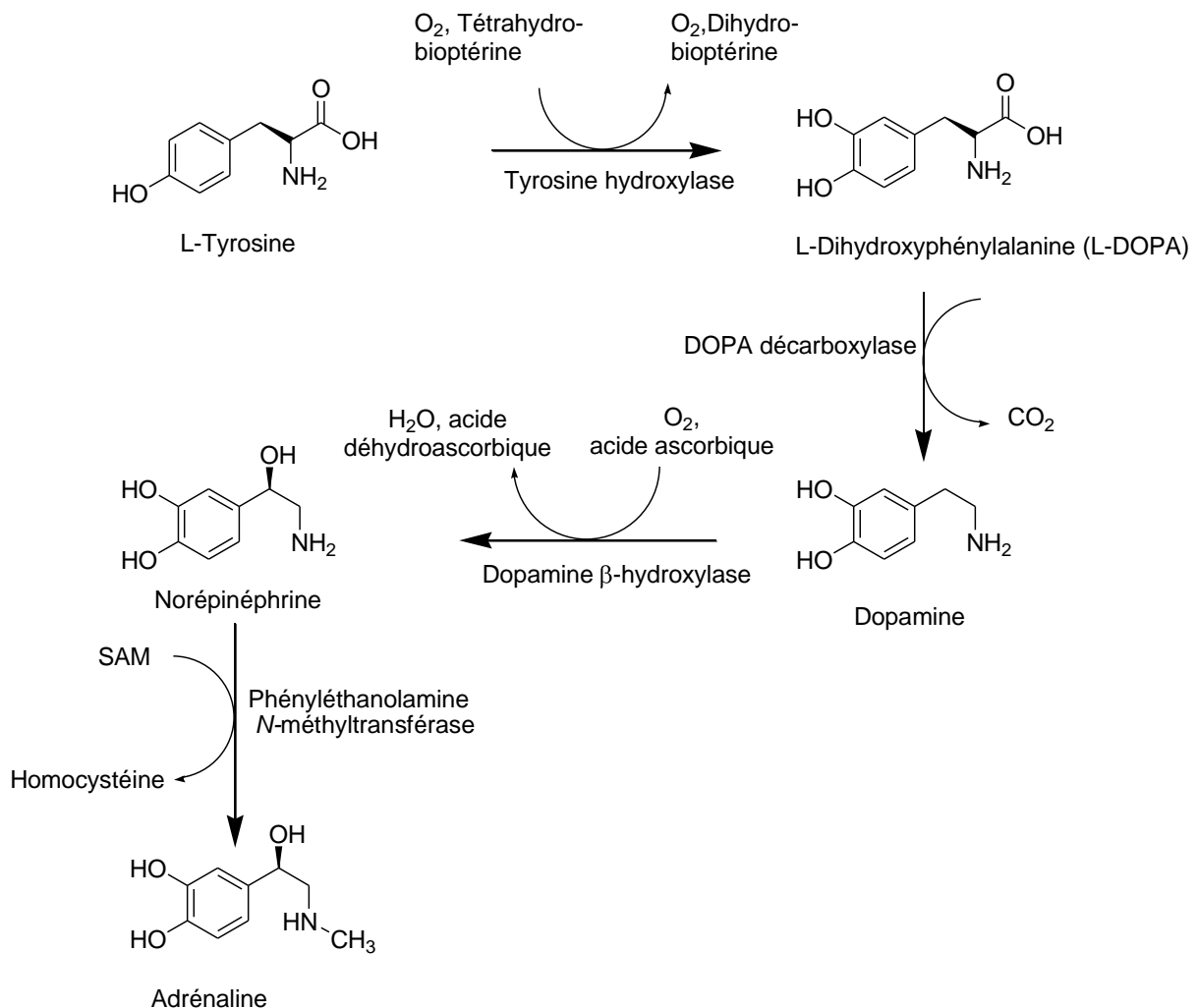


**Figure 10.** Réaction et mécanisme enzymatique de la catéchol O-méthyltransférase.

Cette enzyme est la cible de plusieurs médicaments qui inhibent son activité vis-à-vis de la L-DOPA dans le traitement de la maladie de Parkinson (Bonifacio *et al.*, 2002).

### VI.2.2 Phényléthanolamine *N*-méthyltransférase

La phényléthanolamine *N*-méthyltransférase (PNMT) est une méthyltransférase SAM-dépendante qui catalyse la *N*-méthylation de la norépinéphrine pour former l'adrénaline et est présente dans les neurones adrénergiques du système nerveux central et de la glande médullosurrénale, qui secrète principalement de l'adrénaline (Wong *et al.*, 1992) (Schéma 15).



**Schéma 15.** Biosynthèse de l'adrénaline.

### VI.2.3 Méthylation d'une double-liaison : biosynthèse des phytostérols

Les stérols des plantes et des champignons se différencient de ceux des vertébrés par la présence d'un groupe alkyle supplémentaire en C-24. L'alkylation de la chaîne latérale de ces stérols est catalysée par des méthyltransférases SAM-dépendante (SMTs). La présence des 24-éthyl stérols dans les plantes correspond à un mécanisme de deux transferts distincts du groupement de méthyle provenant de la SAM (Nes et McKean, 1977; Benveniste, 1986). Le cycloarténol (**A**) est le substrat de la première réaction enzymatique de méthylation catalysée par SMT<sub>1</sub>, engendrant le 24-méthylène cycloartanol (**B**) (Malhotra et Nes, 1971; Nes *et al.*, 1991), alors que le 24-méthylène lophénol (**C**) est le substrat de la deuxième réaction de méthylation catalysée par SMT<sub>2</sub>, produisant le 24-éthylidène lophénol (**D**) (Fonteneau *et al.*, 1977; Rahier *et al.*, 1986) (Schéma 16).

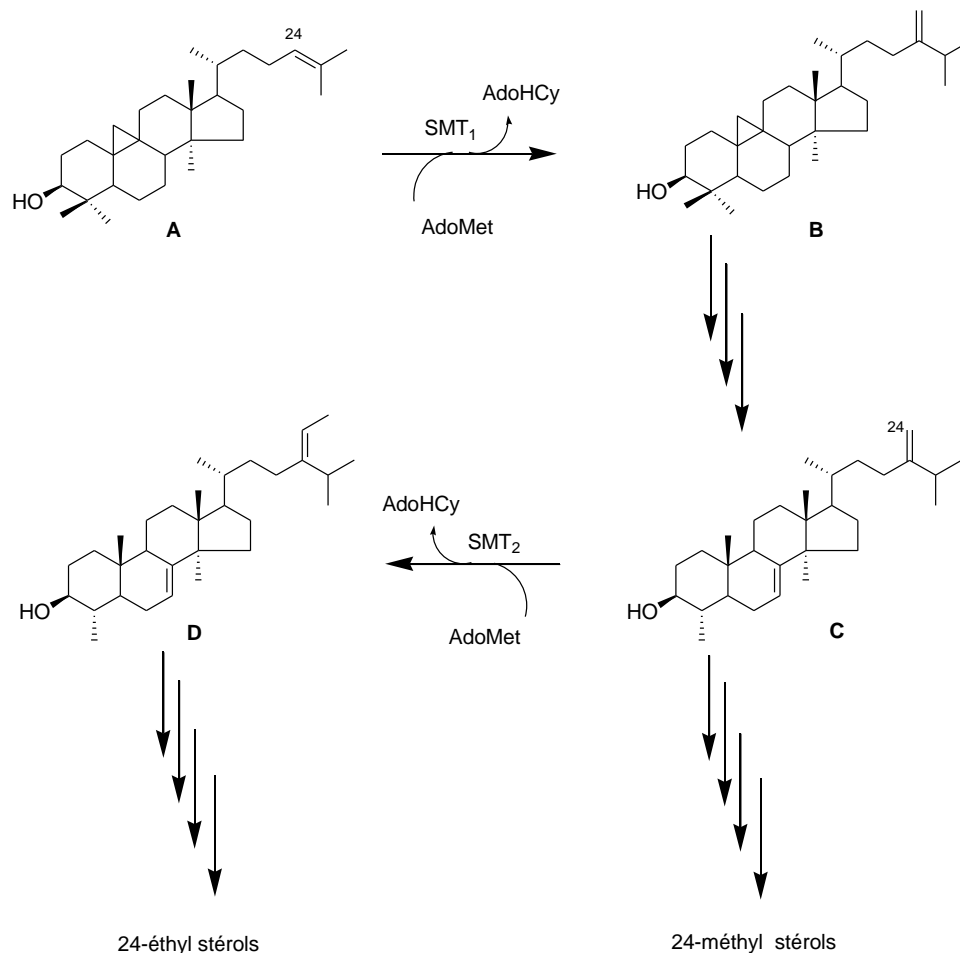


Schéma 16. Biosynthèse des phytostérols.

#### VI.2.4 Méthylation par des enzymes à « radical SAM »

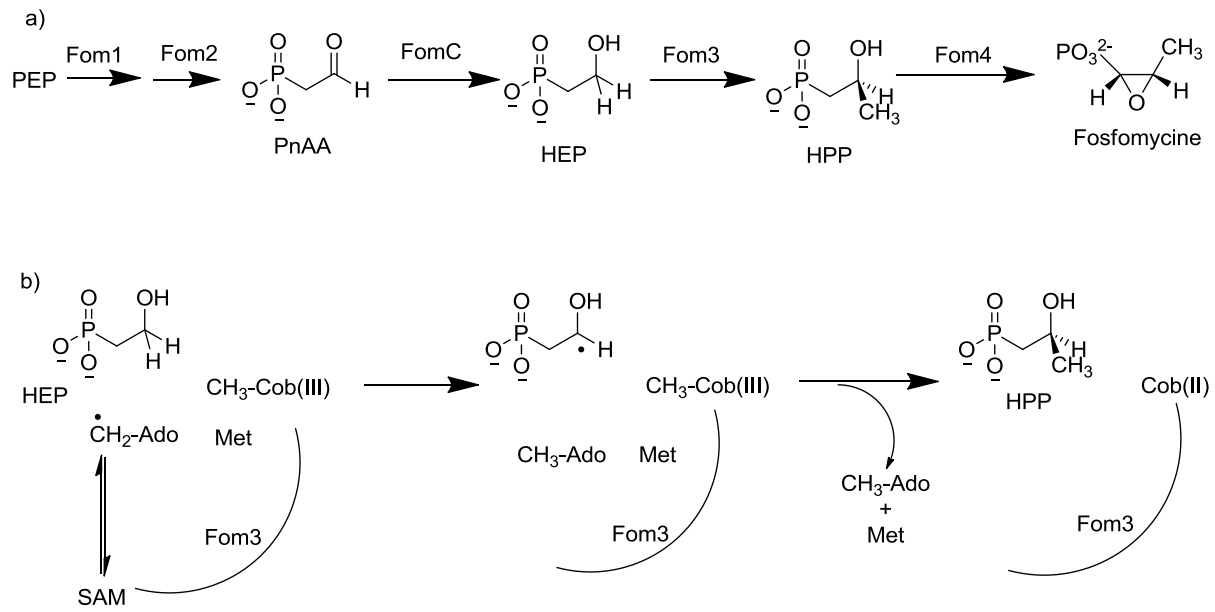
Les substrats accepteurs du groupement de méthyle lors des réactions catalysées par des méthyltransférases SAM dépendantes (COMT, ADN méthylase) ont des caractères nucléophiles et subissent des réactions d'alkylations classiques.

En revanche, les substrats des méthyltransférases à « radical SAM » n'ont pas de caractère nucléophile: ils sont ou bien électrophiles ou bien considérés comme des substrats non réactifs.

La biosynthèse de la fosfomycine constitue un bon exemple de transfert de groupement de méthyle sur un substrat considéré comme non réactif (Schéma 17). Des expériences poussées ont montré que le substrat de cette réaction de méthylation est l'hydroxyéthyle phosphonate (HEP) (Woodyer *et al.*, 2007). De plus, des tests enzymatiques ont identifié que l'enzyme Fom3 catalyse la réaction de méthylation du HEP. L'analyse de sa séquence a indiqué la présence de deux domaines de liaison différents, un pour la SAM et un autre pour la cobalamine.

La méthylation du HEP se fait au niveau du carbone qui porte le groupement hydroxyle et le produit obtenu est l'hydroxypropyle phosphonate (HPP) qui a son tour est converti en fosfomycine sous l'action d'une époxydase, la Fom4.

La méthylation de HEP par la Fom3 exige une élimination d'un hydrogène non activé : un mécanisme hypothétique est illustré dans le schéma 17 (Woodyer *et al.*, 2007). L'abstraction de l'hydrogène par le radical Ado<sup>•</sup> obtenu de la SAM, engendre un radical carbone qui sera ensuite méthylé à l'aide de la méthylcobalamine. Ce mécanisme hypothétique doit être vérifié par un test enzymatique avec la Fom3 purifiée.

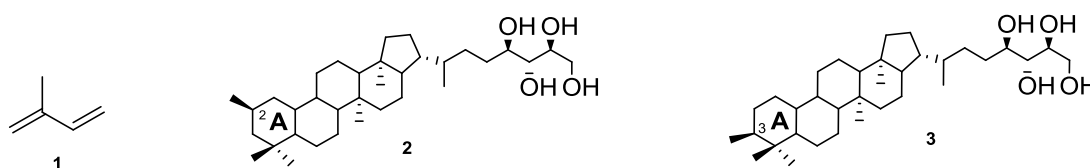


**Schéma 17.** Mécanisme réactionnel hypothétique de la méthylation catalysée par la Fom3 lors de la biosynthèse de la fosfomycine (Woodyer *et al.*, 2007).

## VII. Objectifs de la thèse

Les hopanoïdes (composés pentacycliques) constituent une vaste famille de substances naturelles. Leur squelette carboné est constitué d'un assemblage de sous-unités à cinq atomes de carbones qui sont formellement dérivées de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) **1**.

La biosynthèse de lipides bactériens pose toujours des problèmes stimulants sur le plan de réactions enzymatiques encore inexpliquées et correspondant à des enzymes encore inconnues. La formation de liaisons carbone/carbone sur un atome de carbone saturé non activé, sans réactivité particulière, en est un exemple. Ces réactions sont relativement courantes dans la biosynthèse des hopanoïdes bactériens. En effet, de nombreuses bactéries productrices d'isoprénoïdes de série hopane sont caractérisées par la présence de hopanoïdes majeurs portant un groupement méthyle en C-2 ou en C-3 comme le 2  $\beta$ -méthyldiploptérol des *Methylobacterium* spp., le 2 $\beta$ -méthylbactériohopanetétrol **2** des cyanobactéries (Bisseret *et al.*, 1985), le 3 $\beta$ -méthylbactériohopanetétrol **3** des *Acetobacter* spp. et des bactéries méthanotrophes (Zundel *et al.*, 1985a).



L'incorporation *in vivo* de( $CD_3$ )méthionine dans les triterpènes de diverses bactéries a mis en évidence le transfert du groupement méthyle de cet aminoacide avec rétention des trois atomes de deutérium, ce qui suggère que la *S*-adénosylméthionine (SAM) soit à l'origine du méthyle transféré. La plupart des réactions de méthylation de squelette carboné connues font intervenir la méthylation d'une double-liaison par la SAM. Un tel mécanisme n'est guère envisageable en série hopane : des hopanoïdes insaturés sur le cycle A ont été recherchés à l'aide de  $\Delta^2$ -hopanoïdes synthétiques de référence et n'ont jamais été trouvés.

En fait, des réactions d'alkylations inhabituelles et en particulier de méthylation peuvent être réalisées par la vitamine B<sub>12</sub> (Glasenapp-Breiling et Montforts, 2000). Au cours des dernières années, un certain nombre de méthylation non-usuelles a été décrit en biochimie microbienne: un groupement méthyle provenant de la méthionine est transféré intact avec

réétention de configuration sur un atome de carbone saturé non activé. La méthylcobalamine en particulier est capable de méthyler un radical carboné (Mosimann et Kräutler, 2000).

Les méthylation du cycle A en série hopane constituent un bon exemple pour étudier ce type de méthylation. Le projet de ma thèse consiste donc à identifier les enzymes responsables de ces méthylation et à l'élucidation des mécanismes réactionnels. Ma thèse se divise en quatre parties

- 1- Synthèse des deux isotopomères 5-*R* et 5-*S* du 1-désoxy-D-xylulose (DX, substrat de la voie de méthylérythritol phosphate ou voie de MEP) stéréospécifiquement monodeutéérié en position C-5.
- 2- Détermination de la stéréochimie de la méthylation au niveau du carbone C-2 d'un hopanoïde (dérivé du carbone C-5 du DX) par analyse de la rétention ou de la perte en deutérium venant des isotopomères du DX stéréospécifiquement marqué au deutérium marqué en C-5. Cette analyse sera faite par analyse en RMN du  $^{13}\text{C}$  en recherchant la présence ou l'absence de shift des signaux du  $^{13}\text{C}$  induits par le deutérium.
- 3- Mise en évidence du rôle de la méthylcobalamine dans la réaction de méthylation : synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )cobalamine et incubation avec des systèmes acellulaires de *Methylobacterium*.
- 4- Expression d'un gène isolé de la souche de *Methylobacterium organophilum* et susceptible d'être le responsable de la réaction de méthylation.



**Chapitre II**

**Synthèse des deux**

**isotopomères *5R* et *5S***

**du 1-désoxy-D-xylulose**

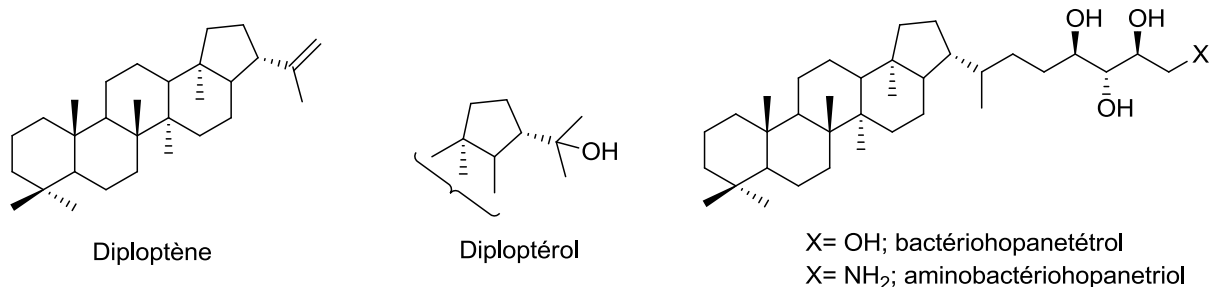
**marqués au deutérium en**

**C-5**

## I. Introduction

Comparés à leurs cousins les stérols, les hopanoïdes sont des triterpénoïdes pentacycliques peu connus. On les divise en deux types : les géohopanoïdes et les biohopanoïdes. Les géohopanoïdes découverts dès les années 60, sont largement ubiquistes dans les roches sédimentaires. Estimée à plus de 5% de la matière organique soluble des sédiments, soit entre  $10^{11}$  et  $10^{12}$  tonnes, la masse des géohopanoïdes dépasse largement celle de toute la matière vivante (Ourisson *et al.*, 1984 ; Ourisson *et al.*, 1987). Ces fossiles moléculaires comptent de nos jours plus de 200 structures, établies principalement par le groupe de géochimistes strasbourgeois de P. Albrecht et G. Ourisson.

L'étude de ces marqueurs biologiques est probablement l'une des voies de la géochimie organique qui a le plus progressé. Ces fossiles moléculaires, qui dérivent de molécules synthétisées par des organismes vivants sont incorporés au sédiment au moment de son dépôt et constituent de véritables témoignages *post mortem* des êtres vivants qui les ont synthétisés. Ils sont aujourd'hui traqués par les pétroliers, car ils permettent d'établir des corrélations entre hydrocarbures et roches mères, ces roches renfermant le kérogène, la matière première des pétroles (Connan, 1989). Les biohopanoïdes sont présents dans de nombreuses bactéries de groupes taxonomiques variés (à l'exception des archéobactéries) et présentent de nombreuses variations structurales concernant le squelette pentacycliques, le centre asymétrique C-22 et le plus souvent la chaîne latérale (Rohmer *et al.*, 1984 ; Rohmer, 1993). Les composés en C<sub>35</sub> sont toujours les composés majoritaires chez toutes les bactéries productrices de hopanoïdes (Rohmer *et al.*, 1984) le bactériohopanétrol (Förster *et al.*, 1973 ; Rohmer et Ourisson, 1976b) et l'aminobactériohopanetriol (Neunlist et Rohmer, 1985) sont les composés les plus fréquents (Figure 1). Ils sont généralement accompagnés de triterpènes en C<sub>30</sub>, diploptène (Gelpi *et al.*, 1970 ; Bird *et al.*, 1971 ; De Rosa *et al.*, 1971) et du diploptérol (Figure 1).



**Figure 1.** Hopanoïdes bactériens en  $C_{30}$  (diploptène et diploptérol) et en  $C_{35}$  (bactériohopanetétrol et aminobactériohopanetriol).

Concernant le rôle physiologique des hopanoïdes, il a été postulé du fait des analogies structurales entre hopanoïdes et stéroïdes une analogie fonctionnelle. Ils agiraient comme renforçateurs membranaires (Rohmer *et al.*, 1979). Cette équivalence fonctionnelle a pu être démontrée ultérieurement par des études menées sur des modèles membranaires (Poralla *et al.*, 1980; Bisseret *et al.*, 1983) ainsi que sur des systèmes biologiques (Poralla *et al.*, 1984; Bringer *et al.*, 1985).

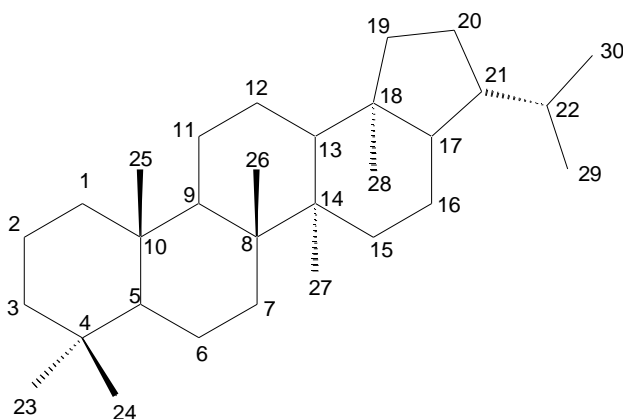
Cependant la diversité et la complexité de certains représentants de la série hopane (porteurs de fragments peptidiques ou nucléosidiques) laissent présager d'autres fonctions physiologiques que celle d'un simple rôle physique pour ces triterpènes amphiphiles (Neunlist *et al.*, 1985).

## I.1 Structure des bactériohopanoïdes

Les hopanoïdes bactériens caractéristiques sont des molécules composées en  $C_{35}$  (Rohmer *et al.*, 1984; Rohmer, 1993). Leur squelette carboné (bactériohopane) (Figure 1) est formé d'une moitié triterpénique en  $C_{30}$  liée à une chaîne latérale polyfonctionnalisée en  $C_5$  correspondant à un dérivé de D-pentose lié par une liaison carbone/carbone au niveau de son atome de carbone C-5 au squelette triterpénique (Flesch et Rohmer, 1988 a,b). Les variations structurales sur le noyau triterpénique impliquent la présence de doubles-liaisons supplémentaires en C-6 et/ou en C-11, d'un méthyle supplémentaire en C-2 $\alpha$ , C-2 $\beta$ , C-3 $\beta$  ou C-12 $\alpha$  ainsi que la stéréochimie en C-22 (Rohmer *et al.*, 1993; Costantino *et al.*, 2000). Au niveau de la chaîne latérale, la diversité structurale est tout aussi grande. Le nombre de groupements hydroxyles est variable. L'hydroxyle terminal peut être lié à un dérivé de glucide ou remplacé par un groupement amino, sur lequel peut se greffer

un aminoacide par une liaison peptidique (Renoux et Rohmer ; 1985 ; Neunlist *et al.*, 1985 ; Rohmer, 1993).

À la différence de la quasi-totalité des triterpènes d'eucaryotes qui possèdent une fonction oxygénée en C-3, ces triterpénoïdes bactériens ne possèdent pas une telle fonction et dérivent d'une cyclisation directe du squalène (Rohmer, 1993).

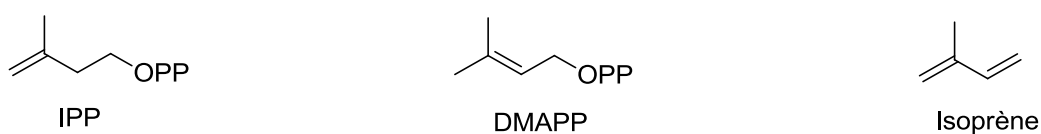


**Figure 2.** Structure et numérotation du squelette hopane

La quasi-totalité des biohopanoïdes possèdent une configuration  $17\beta(\text{H}),21\beta(\text{H})$ . Pendant longtemps, seule cette configuration qui peut dériver d'une cyclisation concertée du squalène était connue pour les biohopanoïdes (Figure 2). Deux autres séries de hopanoïdes ont été cependant identifiées chez des actinomycètes appartenant au genre *Frankia* et à des genres phylogénétiquement proches. Il s'agit de la série du  $17\beta(\text{H}),21\alpha(\text{H})$ hopane (morétane), dont les dérivés hydroxylés en C-3 étaient déjà connus des plantes supérieures, ainsi que de la série du  $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ hopane qui était plutôt inattendue (Rosa-Putra *et al.*, 2001). La présence de  $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ géohopanoïdes, thermodynamiquement plus stables, est généralement interprétée par une isomérisation des  $17\beta(\text{H}),21\beta(\text{H})$ hopanoïdes lors de la maturation du sédiment sous l'effet de la diagenèse. Même si cette interprétation est toujours valable, elle doit cependant être nuancée. En effet, la détection de  $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})$ hopanoïdes chez des bactéries montre que les géohopanoïdes de cette série ne sont pas tous dérivés de phénomènes de maturation.

## I.2 Biosynthèse des bactériohopanoïdes

Les isoprénoïdes sont une famille des substances naturelles dont l'élément de base commun à chacun de ces composés est le diphosphate d'isopentényle (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP), composés à cinq atomes de carbone dont les squelettes sont ramifiés (Ruzicka *et al.*, 1953 ; Ruzicka, 1959). (Figure 3). Ces éléments de base constituent une unité isoprénique. Les diphosphates d'isopentényle et de diméthylallyle sont les équivalents biologiques de l'isoprène.



**Figure 3.** Structures de l'IPP, du DMAPP et de l'isoprène.

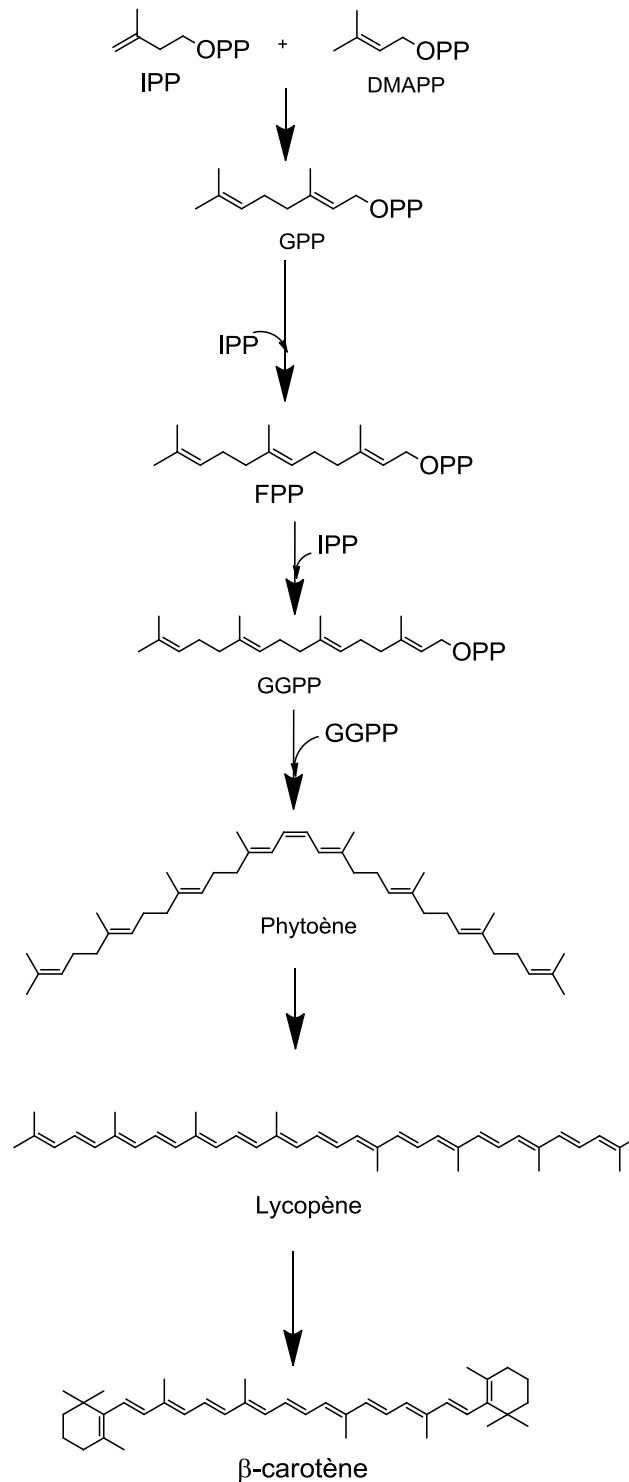
La nomenclature des isoprénoïdes est définie par le nombre d'unité isopréniques constituant la molécule de nature isoprénique. La famille des isoprénoïdes est sous-divisée en hémiterpènes ( $n = 1$ ), monoterpènes ( $n = 2$ ), sesquiterpènes ( $n = 3$ ), diterpènes ( $n = 4$ ), sesterterpènes ( $n = 5$ ), triterpènes ( $n = 6$ ) et tétraterpènes ( $n = 8$ ).

Tous les triterpènes incluant les stéroïdes ont pour précurseur le squalène. Ce composé naturel isolé pour la première fois par Tsujimoto (1916) à partir de l'huile de foie de requin est un triterpène acyclique possédant six insaturations.

L'attaque nucléophile d'une unité d'IPP sur le DMAPP avec départ d'un groupe pyrophosphate crée le diphosphate de géranyle (GPP). Les enzymes contrôlant l'élongation des chaînes carbonées sont les prényl-transférases (Ogura et Koyama, 1998). Cette élongation de chaîne se fait avec une inversion de configuration sur le carbone allylique du DMAPP.

Le GPP est le précurseur des monoterpènes, famille d'isoprénoïdes en  $C_{10}$ , comprenant des composés tels que le limonène (schéma 1) ou le géraniol. L'addition d'une unité d'IPP sur le GPP produit le diphosphate de farnésyle (FPP, Schéma 16), précurseur des isoprénoïdes en  $C_{15}$  ou sesquiterpènes. L'hormone

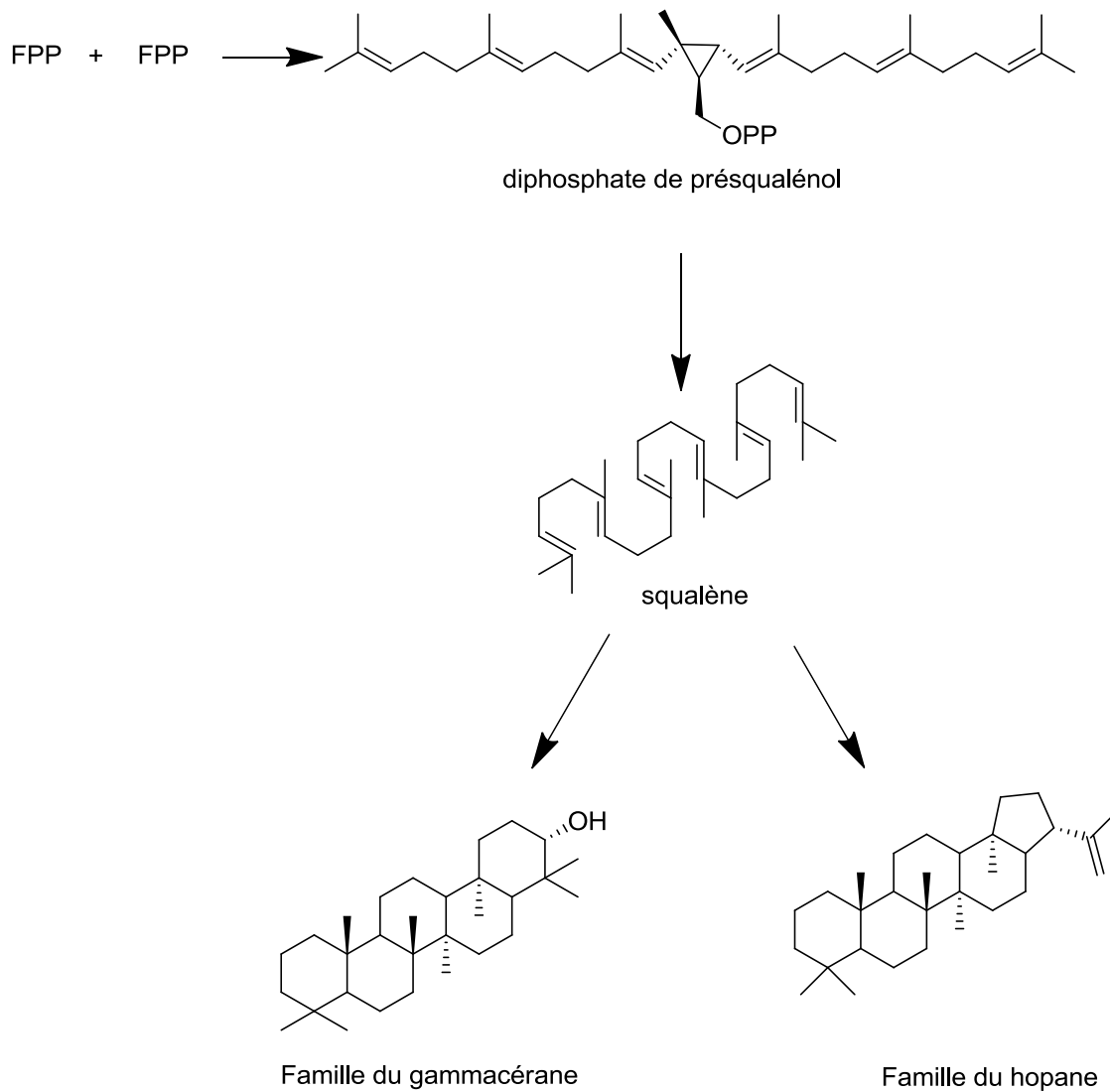
juvénile contrôlant le développement des larves chez les insectes est un exemple de dérivé de sesquiterpènes. A partir du FPP la chaîne prényle peut être allongée de deux façons.



**Schéma 1.** Biosynthèse des caroténoïdes.

Soit une unité d'IPP supplémentaire est incorporée pour donner naissance au diphosphate de géranylgeranyl (GGPP) précurseur des diterpènes et la condensation de deux molécules de diphosphate de géranylgeranyl, mènent au phytoène puis au lycopène et de là aux caroténoïdes à huit unités isopréniques (Schéma 1).

Soit deux unités de FPP sont couplées. Le couplage de deux unités « tête à tête » via un mécanisme de cyclopropanation permet d'obtenir le squalène (Poulter, 1990).



**Schéma 2.** Biosynthèse des hopanoïdes.

Les hopanoïdes sont obtenus par cyclisation directe du squalène sous l'action de la squalène cyclase dans une conformation entièrement pré-chaise (Anding *et al.*, 1976 ; Seckler et Poralla, 1986). La réaction est initiée par une protonation (Schéma 2), et l'atome d'oxygène présent sur le diploptérol provient d'une molécule d'eau comme pour le tétrahymanol (Caspi *et al.*, 1968).

### **I.3 Diphosphate d'isopentényle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP)**

La formation du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) a été considérablement étudiée, spécialement dans les tissus de foie et chez la levure. Cela a permis la découverte dans les années 50 de la voie du mévalonate (MVA), longtemps considérée comme l'unique voie de biosynthèse des isoprénoïdes chez les organismes vivants. Cependant, au cours des deux dernières décennies, une voie alternative indépendante du mévalonate a été mise en évidence chez plusieurs eubactéries, chez les algues vertes unicellulaires et dans les chloroplastes de plantes supérieures.

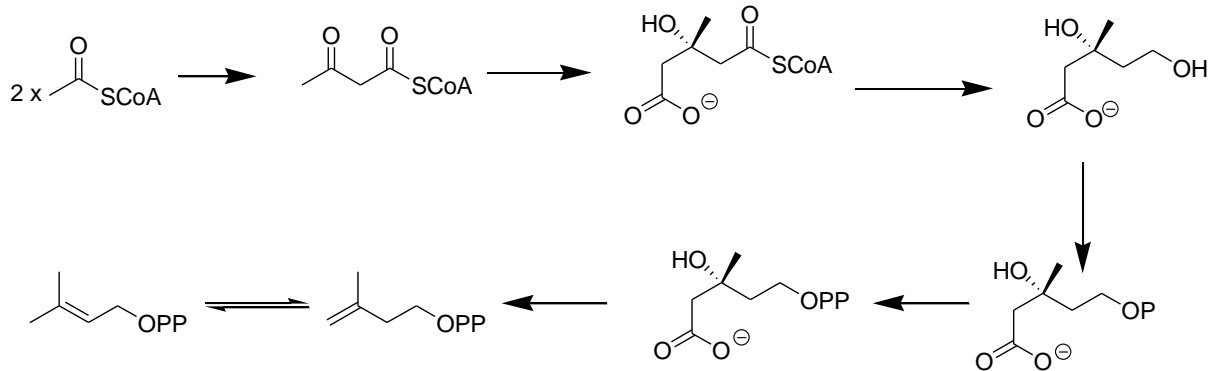
#### **I.3.1 La voie du mévalonate**

Les étapes de la voie du mévalonate ont fait l'objet de nombreuses investigations durant ces dernières décennies. La littérature rapporte de nombreux travaux sur son élucidation, ses caractéristiques et sa régulation, y compris au niveau des gènes (Spurgeon et Porter, 1981; Qureshi et Porter, 1981; Bloch, 1992; Bochar *et al.*, 1999). Les principaux systèmes biologiques étudiés pour son élucidation ont été au départ les tissus de foie et la levure de bière.

Le produit de départ est l'acétate activé sous forme d'acétyl-CoA (Schéma 3). Une condensation de type Claisen de deux unités d'acétyl-CoA mène à l'acétoacétyl-CoA. La condensation d'une troisième molécule d'acétyl-CoA conduit à la formation de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA, qui est réduit en mévalonate par l'HMGCoA réductase. Cette enzyme joue un rôle clé au niveau de la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes chez les animaux. L'hydroxyle primaire du mévalonate est ensuite phosphorylé par la mévalonate kinase, pour mener au phosphate de mévalonate, qui est converti en diphosphate de mévalonate par la phosphomévalonate kinase. Ce dernier est transformé en IPP par la



diphosphomévalonate décarboxylase. Cette enzyme, utilisant de l'ATP, catalyse la phosphorylation de l'alcool tertiaire qui est converti en bon groupe partant, favorisant ainsi la décarboxylation concomitante du  $\beta$ -hydroxy acide phosphorylé. Cette chaîne de réactions partant de l'acétyl-CoA et conduisant à l'IPP est appelée voie du mévalonate.



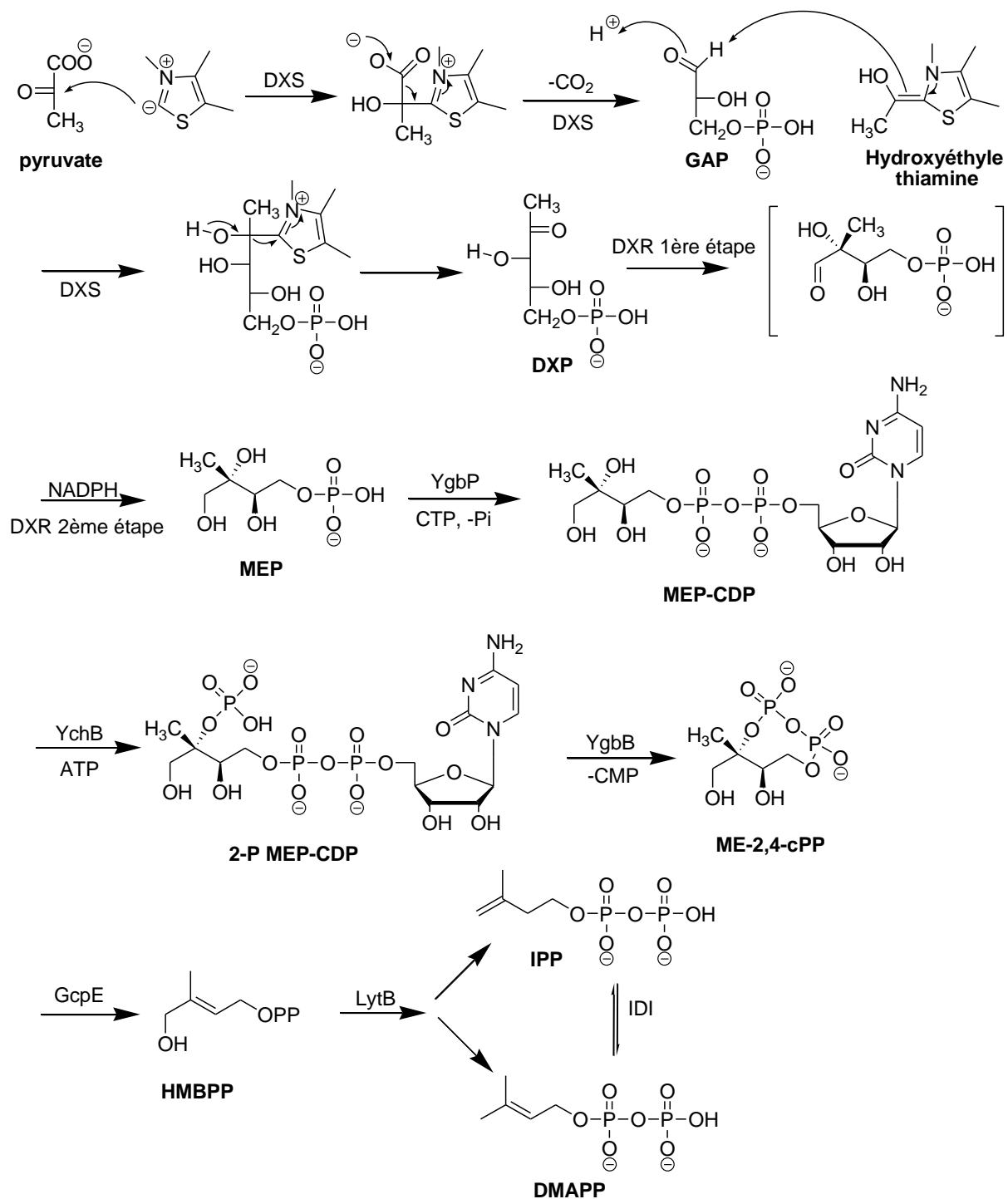
**Schéma 3.** Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle selon la voie de mévalonate.

### I.3.2 La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

Pendant des décennies, la voie du mévalonate a été unanimement acceptée comme étant la seule voie de biosynthèse menant à l'IPP chez tous les organismes vivants. Cependant des résultats expérimentaux contradictoires ont été observés dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez certaines bactéries et chez certaines plantes. En effet, des expériences d'incorporation d'acétate ou de mévalonate marqué au  $^{13}\text{C}$  chez certaines bactéries n'ont pas donné les résultats attendus (Rohmer *et al.*, 1993; Bach, 1995 ; Rohmer, 1999). La localisation du marquage après incorporation d'acétate marqué était en contradiction avec celle attendue avec la voie du mévalonate (Flesch et Rohmer, 1988b). Suite à de nombreuses expériences d'incorporation de précurseurs marqués, une nouvelle voie de biosynthèse indépendante du mévalonate a été découverte chez les eubactéries, les algues et les plantes supérieures (Flesch et Rohmer, 1988 a, b; Rohmer *et al.*, 1993 ; Schwarz et Arigoni, 1999 ).

Les deux premiers précurseurs de cette voie sont le pyruvate et le D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) (Schéma 4), tous deux directement issus du métabolisme du glucose. La première réaction, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose

5-phosphate synthase (DXS), conduit au 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP). Ce pentulose subit un réarrangement intramoléculaire suivi d'une réduction concomitante de l'aldéhyde intermédiaire formé, pour fournir le 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP). Ce tétrol présente d'ores et déjà le motif isoprénique à cinq atomes de carbones. Ces deux réactions consécutives sont catalysées par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR). Les étapes suivantes correspondent à des modifications du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate : la formation du 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) suivie de la phosphorylation de l'hydroxyle tertiaire pour donner le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol (2PCDP-ME) et finalement la formation du 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP). Ce composé est ensuite transformé en diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-méthylbut-2-ényle (HMBPP), le dernier précurseur de cette voie indépendante du mévalonate, qui conduit soit au diphosphate d'isopentényle, soit au diphosphate de diméthylallyle. Toutes ces réactions constituent la voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MEP.



**Schéma 4.** Biosynthèse des diphosphates d'isopentényle et de diméthylallyle selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

Enzymes impliquées dans la voie de MEP: **DXS** : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*dxs*); **DXR** : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (*dxr* ou *ispC*); **YgbP** : 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase (*ispD*); **YchB** : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol Kinase (*ispE*); **YgbB** : 2-C-méthyl-D-érythritol cyclodiphosphate synthase (*ispF*); **GcpE** : (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl-diphosphate synthase (*ispG*); **LytB** : 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl-diphosphate réductase (*ispH*); **IDI** : IPP isomérase (*idi*).

## II. 1-Désoxy-D-xylulose

Le 1-désoxy-D-xylulose (DX), molécule à cinq atomes de carbone et précurseur des isoprénoïdes dans la voie de MEP, a été isolé la première fois dans un moût de fermentation de *Streptomyces hygroscopicus* (Slecht et Johnson, 1976; Hoeksema et Baczynsky, 1976). Il a été identifié plus tard chez certaines bactéries comme le précurseur de cofacteurs tels que le phosphate de pyridoxal (Cane *et al.*, 1999), le diphosphate de thiamine (David *et al.*, 1981; Himmeldirk *et al.*, 1996; Himmeldirk *et al.*, 1998; Spenser et White, 1997) (Figure 4).

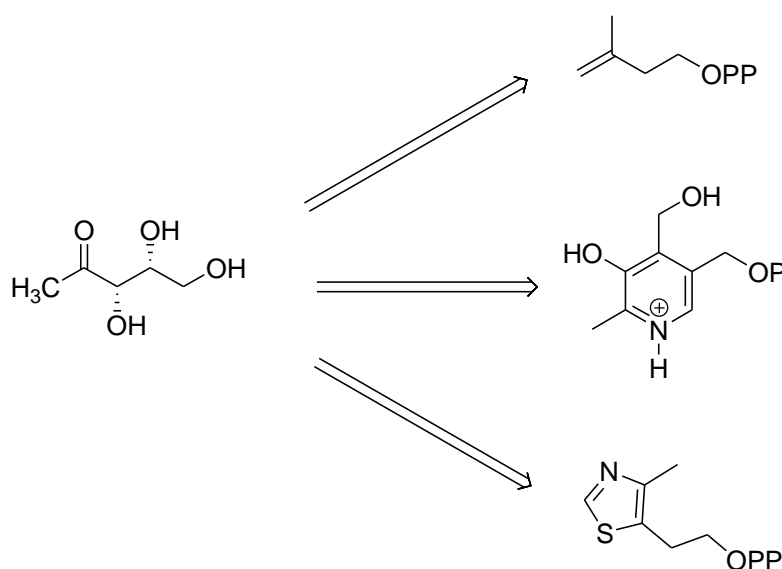
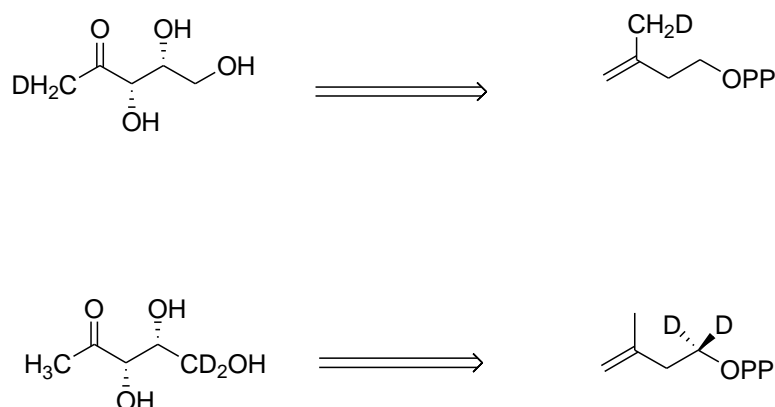


Figure 4. Métabolisme du 1-désoxy-D-xylulose chez les bactéries.

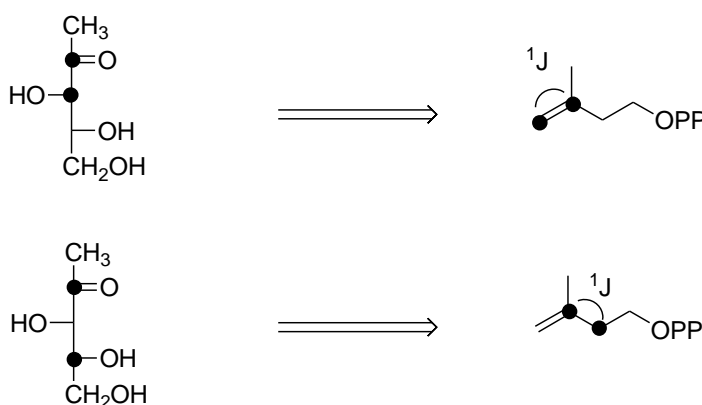
### II.1 Incorporation de 1-désoxy-D-xylulose dans l'isoprène

Des expériences d'incorporation de (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- ou de (5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-1-désoxy-D-xylulose ont montré que le 1-désoxy-D-xylulose intervient dans la biosynthèse des isoprénoïdes puisque des marquages ont été observés dans la chaîne prényle de l'ubiquinone et de la ménaquinone d'*E. coli* (Broers, 1994). La spectrométrie de masse et la spectroscopie RMN du deutérium ont permis de déterminer la présence d'atomes de deutérium et de les localiser au niveau des atomes de carbone correspondant aux positions de C-1 et C-5 du diphosphate d'isopentényle (Figure 5).



**Figure 5.** Incorporation de (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- ou (5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-1-désoxy-D-xylulose, dans les isoprénoïdes d'*E. coli* (Broers, 1994).

Le (2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)- ou (2,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)-DX ont été incorporés dans la chaîne prényle de l'ubiquinone d'*E. coli* (Rosa-Putra *et al.*, 1998). Dans le spectre de RMN de <sup>13</sup>C de l'ubiquinone Q8 obtenue à partir d'une culture faite en présence de (2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)-DX, tous les atomes de carbone correspondant aux positions C-3 et C-4 de l'IPP, sont simultanément marqués. En effet, leurs signaux apparaissent sous la forme de doublets avec une constante de couplage <sup>1</sup>J<sup>13</sup>C/<sup>13</sup>C. De plus, en présence de (2,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)-DX, les atomes de carbone correspondant aux positions C-2 et C-3 de l'IPP sont marqués et à nouveau à leurs signaux se présentent sous la forme de doublets avec une constante de couplage <sup>1</sup>J<sup>13</sup>C/<sup>13</sup>C (Figure 6).



**Figure 6.** Incorporation de (2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)- ou (2,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)-1-désoxy-D-xylulose, dans les isoprénoïdes d'*E. coli* (Rosa-Putra *et al.*, 1998).

Ces résultats d'incorporation ont permis de mettre en évidence que la formation du squelette isoprénique ramifié se fait par une étape de réarrangement intramoléculaire du 1-désoxy-D-xylulose, ou plus probablement du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (Schéma 4) et que le 1-désoxy-D-xylulose est incorporé dans les isoprénoïdes sans aucune dégradation préliminaire.

Finalement, Wungsintaweeikul *et al.* ont montré que la D-xylulokinase d'*E. coli* catalyse la phosphorylation du 1-désoxy-D-xylulose au niveau du groupe hydroxyle du C-5 (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001). Cette réaction constitue une voie essentielle pour la biosynthèse de 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate à partir de 1-désoxy-D-xylulose comme matériau de départ pour la biosynthèse des terpénoïdes, de la thiamine et de pyridoxal.

### III. Synthèses du 1- désoxy-D- xylulose

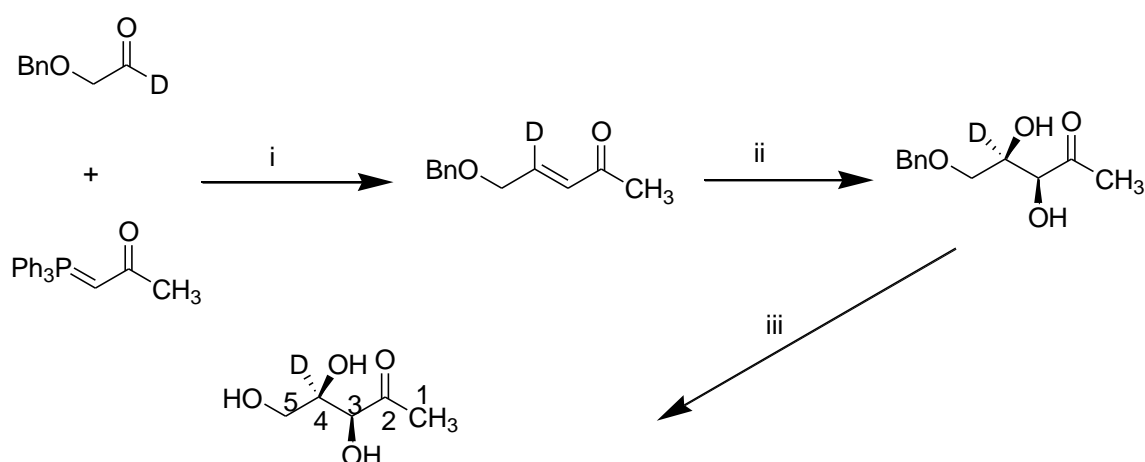
#### III.1 Introduction

Broers et Arigoni ont été les premiers à montrer que le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate participe à la formation du squelette carboné du diphosphate d'isopentényle dans la voie de MEP. Le (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et le (5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-1-désoxy-D-xylulose libre ont été synthétisés et incorporés de manière significative dans la chaîne octaprényle de l'ubiquinone Q8 et de la ménaquinone MK8 chez *Escherichia coli* (Broers, 1994). La spectrométrie de masse et la RMN du deutérium ont permis de déterminer la présence et la localisation des atomes de deutérium au niveau des positions C-1 et C-5 du diphosphate d'isopentényle. Le marquage de l'unité isoprénique résultant de l'incorporation d'isotopomères de 1-désoxy-D-xylulose marqué par des atomes de deutérium est en accord avec le schéma biogénétique proposé par Rohmer (Rohmer *et al.*, 1996). Il est à noter que l'addition de 1- désoxy-D-xylulose au milieu de culture d'*Escherichia coli* augmente dans ces expériences d'un facteur trois à quatre les concentrations en ubiquinone Q8 et ménaquinone MK8 dans les cellules bactériennes (Broers, 1994).

De plus, des isotopomères de 1-désoxy-D-xylulose sont des outils intéressants permettant de connaître le devenir des différents atomes de carbone et d'hydrogène de ce pentose, dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. C'est pourquoi, de nombreuses synthèses de 1-désoxy-D- xylulose ont été publiées.

### III.2 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose selon Giner

L'approche utilisée par Giner implique une réaction de Wittig et l'utilisation de la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless. Une réaction de Wittig entre le benzyloxyacétaldéhyde et la 1-triphénylphosphoranyldiènepropan-2-one fournit sélectivement l'isomère *E* de la 5-benzyloxy-3-pentén-2-one. Cette cétone  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée est traitée par le réactif de Sharpless (AD-mix®), pour fournir le 1-désoxy-D-xylulose monobenzylé qui a comme activité optique un  $[\alpha]_D^{20} = +52.5$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c = 1.17$ ) et qui, après hydrogénation catalytique, conduit au 1-désoxy-D-xylulose (Giner, 1998) (Schéma 5). Cette synthèse est courte, efficace et permet l'introduction de différents marquages comme par exemple en C-4 par du deutérium. Cependant, cette approche ne fournit pas de 1-désoxy-D-xylulose optiquement pur.



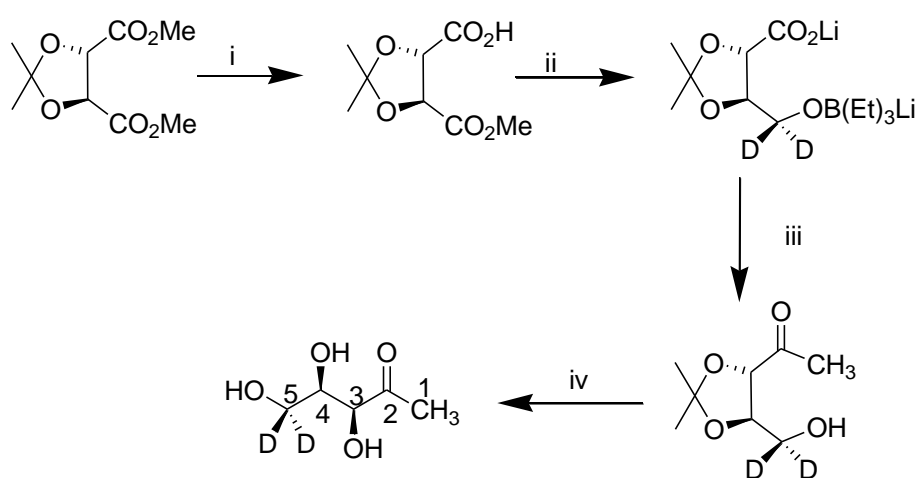
**Schéma 5.** Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose selon Giner avec possibilité de marquage en C-4 par du deutérium (Giner, 1998).

**Réactifs :** (i)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 82%; (ii) réactif de Sharpless (AD-mix  $\beta$ ), 86%; (iii)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, 98%.

### III.3 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir des dérivés du D-tartrate

Plusieurs synthèses de 1-désoxy-D-xylulose (DX) à partir de dérivés du D-tartrate ont été publiées durant ces dernières années. En effet, ces composés possèdent la configuration requise des deux carbones asymétriques C-3 et C-4 du DX et présentent un axe de symétrie  $\text{C}_2$ .

Piel et Boland décrivent une séquence à quatre étapes en partant du 2,3-O-isopropylidène-D-tartrate de diméthyle (Piel et Boland, 1997). L'estérase de foie de porc permet d'hydrolyser sélectivement une seule des fonctions esters. La réduction sélective de l'ester par  $\text{LiEt}_3\text{H}$  ou  $\text{LiEt}_3\text{D}$  conduit au sel de lithium du thréonate protégé. Le groupement carboxylate ensuite est traité par un très large excès de méthyllithium. L'acétonide du désoxyxylulose formé est déprotégé en milieu acide pour fournir le 1-désoxy-D-xylulose (Schéma 6). Cette approche permet de synthétiser du 1-désoxy-D-xylulose marqué en position C-5 par deux deutériums.

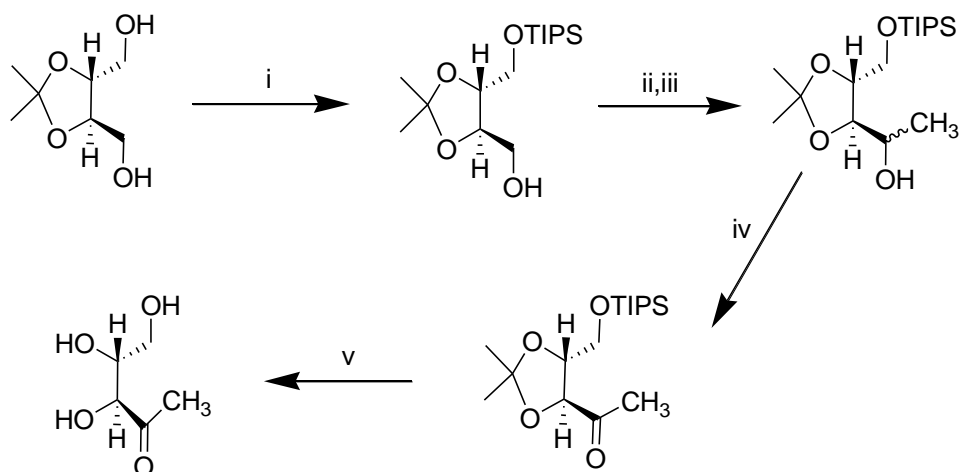


**Schéma 6.** Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir du 2,3-O-isopropylidène-D-tartrate de diméthyle (Piel et Boland, 1997).

**Réactifs :** (i) Estérase de foie de porc (PLE), 25°C ; (ii)  $\text{LiEt}_3\text{D}$ , THF, 0°C ; (iii)  $\text{CH}_3\text{Li}$ , THF, 0°C, 68% sur 2 étapes ; (iv) HCl 2N,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 25°C, 73%.

Dans deux autres publications, Kennedy *et al.* et Blagg et Poulter proposent une synthèse courte et efficace de DX à partir du (-)-2,3-isopropylidène-D-thréitol, dérivé du tartrate correspondant (Kennedy *et al.*, 1995 ; Blagg et Poulter, 1999). Une monosilylation du D-thréitol protégé possédant un axe de symétrie  $\text{C}_2$ , suivie d'une oxydation de Swern et d'une addition de bromure de méthylmagnésium fournit un mélange de deux diastéréomères. Une oxydation par un mélange de TPAP/NMO conduit au DX protégé. Les deux groupes protecteurs sont éliminés dans des conditions acides pour donner le 1-désoxy-D-xylulose (DX) énantiomériquement pur avec 69% de rendement (Schéma 7).





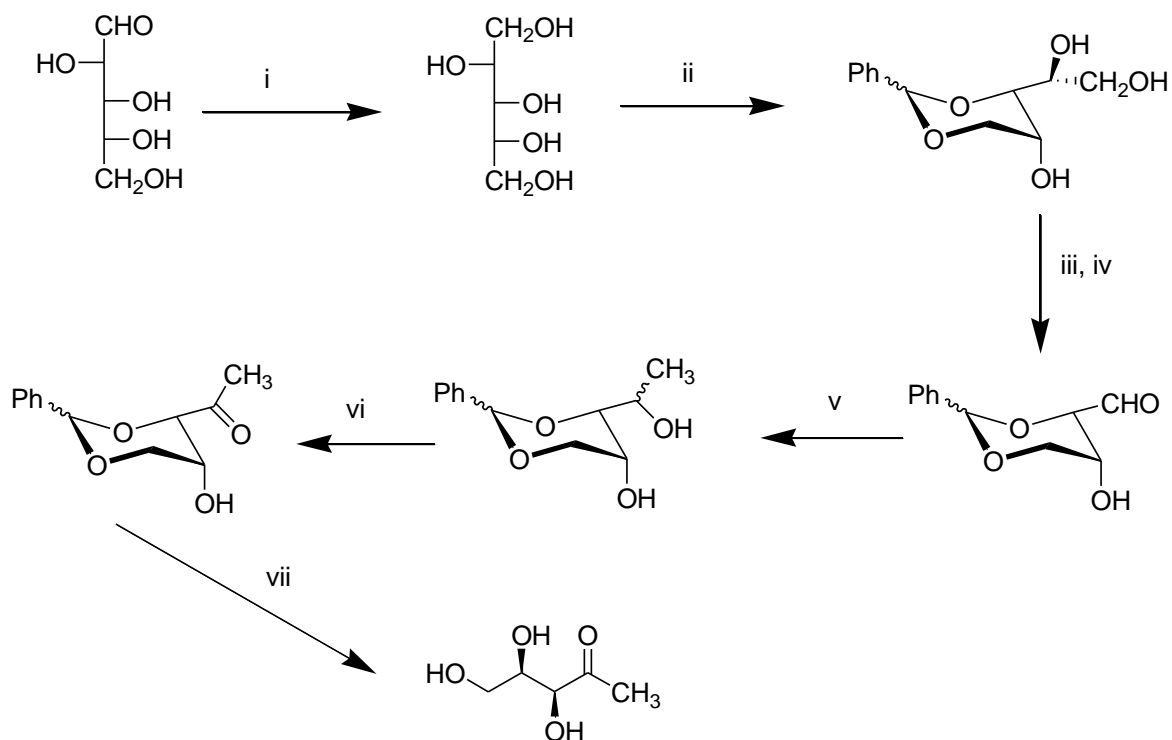
**Schéma 7.** Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir du (-)-2,3-O-isopropylidène-D-thréitol (Kennedy *et al.*, 1995 ; Blagg et Poulter, 1999).

**Réactifs :** (i) NaH, TIPSCl, 96% ; (ii) oxydation de Swern ; (iii) MeMgBr, 88% sur 2 étapes ; (iv) TPAP, NMO, 97% ; (v) AcOH, THF, H<sub>2</sub>O, 84%.

### III.4 Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir de glucides

Seules deux synthèses de 1-désoxy-D-xylulose partant d'un dérivé de sucre ont été décrites dans la littérature (David *et al.*, 1982; Zeidler *et al.*, 1997).

La première approche utilise le D-arabinose comme produit de départ (Schéma 8). Elle débute par la réduction de la fonction aldéhyde suivie par la protection régiosélective d'un des diols-1,3 par un groupement benzylidène. Une coupure oxydante de la liaison entre les deux alcools vicinaux fournit un aldéhyde qui est méthylié pour donner les deux diastéréomères. Le traitement par le dibrome d'un dérivé dibutylstannylidène permet d'oxyder de manière régiosélective ces deux épimères pour donner la cétone unique. Enfin, le groupement benzylidène est hydrolysé en milieu acide pour donner le 1-désoxy-D-xylulose (David *et al.*, 1982). L'approche de cette synthèse est intéressante, mais l'oxydation régiosélective de l'avant-dernière étape n'est pas très efficace avec seulement 33% de rendement.

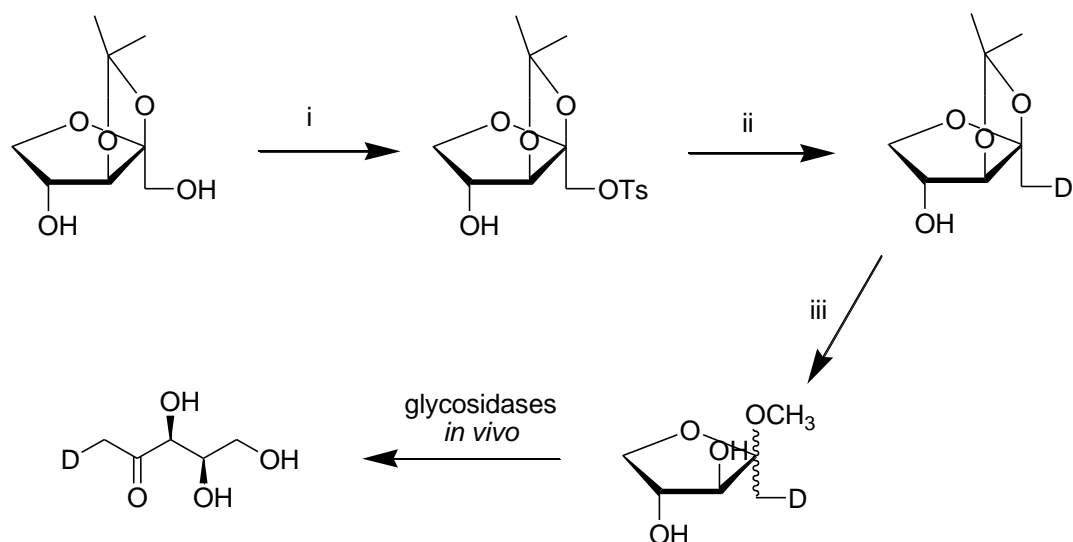


**Schéma 8.** Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir du D-arabinose (David *et al.*, 1982).

**Réactifs :** (i) NaBH<sub>4</sub>, 91% ; (ii) PhCHO, HCl, 72% ; (iii) Bu<sub>2</sub>SnO, benzène ; (iv) PhI(OAc)<sub>2</sub>, 97% sur 2 étapes ; (v) MeMgI, 96% ; (vi) Bu<sub>2</sub>SnO, benzène puis Br<sub>2</sub>, tamis moléculaire, 33% ; (vii) AcOH, H<sub>2</sub>O, 80%.

Afin d'étudier la biosynthèse de l'isoprène dans les plantes, une synthèse de 1-désoxy-D-xylulose deutérié qui utilise le 2,3-O-isopropylidène-β-D-xylulose comme produit de départ, a été développée (Zeidler *et al.*, 1997). Ce dernier peut être synthétisé en quelques étapes à partir de D-xylose. L'idée développée implique la synthèse du (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-α/β-xyluloside de méthyle et non du 1-désoxy-D-xylulose deutérié. En effet, les auteurs de cet article ont supposé que les plantes possèdent des glucosidases qui permettent d'hydrolyser le 1-désoxy-α/β-xyluloside de méthyle en 1-désoxy-D-xylulose.

La première étape consiste à réaliser une tosylation régiosélective de l'alcool primaire du xylulose protégé. Puis le groupe tosyloxy est déplacé par LiAlD<sub>4</sub> ou LiAlH<sub>4</sub>. Une méthanolyse en milieu acide permet de déprotéger le groupement isopropylidène et d'obtenir le (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-α/β-xyluloside de méthyle (Schéma 9). Ce dernier a été directement utilisé pour les expériences d'incorporations.



**Schéma 9.** Synthèse de (1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy- $\alpha/\beta$ -xyluloside de méthyle (Zeidler *et al.*, 1997).

**Réactifs:** (i) TsCl, pyridine, -15°C, 58% ; (ii) LiAlH<sub>4</sub> ou LiAlD<sub>4</sub>, THF, 67% ; (iii) CH<sub>3</sub>OH, HCl 2N, 87%.

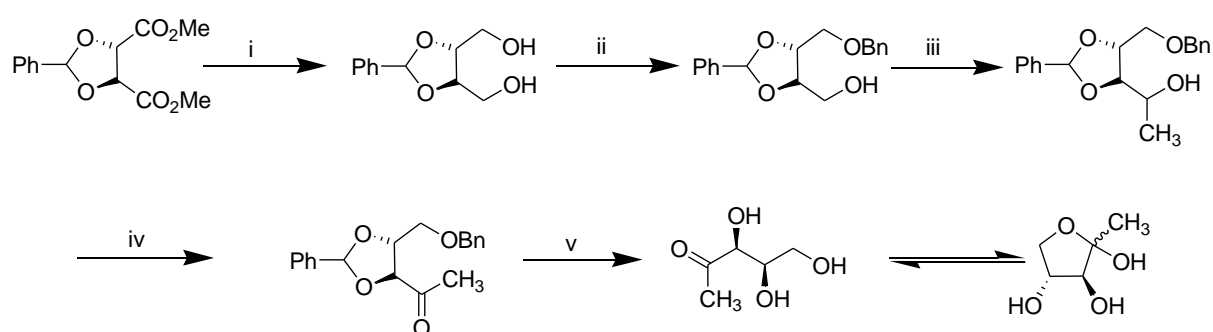
### III.5 Synthèse de 1-désoxy-D-xylulose développée au laboratoire

Du fait des besoins croissants en 1-désoxy-D-xylulose pour étudier la voie du MEP, une synthèse de ce pentulose a été développée permettant d'obtenir rapidement des quantités appréciables de ce glucide. L'utilisation des dérivés du D-tartrate présente un avantage considérable puisqu'ils permettent d'obtenir du 1-désoxy-D-xylulose (DX) énantiomériquement pur (Schéma 26).

C'est pourquoi, en s'appuyant sur les synthèses décrites dans la littérature, le (+)-diméthyl 2,3-O-benzylidène-D-tartrate apparaît comme le produit de départ idéal. En effet, il possède déjà les configurations requises pour obtenir le 1-désoxy-D-xylulose énantiomériquement pur (Meyer *et al.*, 2003). De plus, le groupement benzylidène permettra de limiter les étapes de purification puisqu'il pourra être éliminé par hydrogénolyse.

La première étape de cette synthèse consiste à la réduction du diester en diol, le (+)-2,3-benzylidène-D-thréitol par LiAlH<sub>4</sub>, suivie d'une monoprotection par un groupement benzyle. Il faut bien faire attention à n'utiliser qu'un seul équivalent d'hydrure de sodium afin d'éviter la double protection du diol par les groupements benzyles. Une réaction d'oxydation de Swern de l'alcool primaire suivie, *in situ*, de

l'addition de bromure de magnésium fournit un mélange de quatre diastéréomères (Ireland et Norbeck, 1985). L'oxydation de l'alcool secondaire par le réactif TPAP/NMO (Griffith et Ley, 1990) donne le 1-désoxy-D-xylulose protégé. Enfin, une hydrogénolyse catalytique en présence de palladium sur charbon (10%) dans l'isopropanol permet de déprotéger simultanément les groupements benzylidène et benzyle et d'obtenir sans purification supplémentaire le 1-désoxy-D-xylulose (Schéma 10).



**Schéma 10.** Synthèse de 1-désoxy-D-xylulose à partir (+)-diméthyl 2,3-O-benzylidène-D-tartrate

**Réactifs :** (i)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 98% ; (ii) NaH, BnBr, THF (84%) ; (iii)  $(\text{COCl})_2$ , DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$  à  $-35^\circ\text{C}$  et  $\text{CH}_3\text{MgCl}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  (86%) ; (iv) TPAP, NMO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis moléculaire 4 Å, 97% ; (v)  $\text{H}_2$ , Pd/C, isopropanol/eau (80:20) (96%).

Les groupes protecteurs benzylidène et benzyle ont été choisis afin d'éviter de multiples étapes de déprotection, des réactions secondaires lors des déprotections d'acétone en milieu acide, mais également la purification du produit final.

## IV. Etude de la stéréochimie de la méthylation enzymatique en C-2 du cycle A du squelette hopane

Seules deux séries de méthylhopanoïdes sont connues chez les microorganismes vivants, il s'agit des 3-méthylhopanoïdes (Rohmer et Ourisson, 1976a, Zundel et Rohmer, 1985a) et des 2-méthylhopanoïdes (Rohmer *et al.*, 1984 ; Bisseret *et al.*, 1985 ; Zundel et Rohmer, 1985b). Cette particularité structurale, inconnue chez les eucaryotes, est fréquemment rencontrée chez les hopanoïdes de procaryotes.

### IV.1 3 $\beta$ -Métylhopanoïdes

Dans le spectre de masse de la fraction totale des tétraacétoxybactériohopanes d'*Acetobacter aceti* ssp. *xylinum*, Förster *et al.* (1973) ont déjà remarqué la présence d'homologues du bactériohopane à un atome de carbone supplémentaire, l'un saturé, l'autre mono insaturé, mais n'ont proposé aucune interprétation de ce résultat. M. Rohmer a montré que ce méthyle se trouve en C-3 du cycle A du squelette hopane (Rohmer et Ourisson, 1976a). M. Zundel a pu synthétiser un mélange de 3 $\alpha$ -méthyle et 3 $\beta$ -méthyle et les spectres de masse des deux isomères enregistrés en GC/MS sont identiques entre eux et identiques à celui du produit obtenu à partir de la bactérie. De plus, le temps de rétention du produit naturel est identique à celui de l'un des isomères synthétiques. Zundel a pu aussi analyser en RMN du proton des 3-méthylhopanoïdes isolés à partir d'*Acetobacter pasteurianus* (Figure 7) et de *Methylococcus capsulatus* et la comparaison de ces spectres de RMN de proton des hopanoïdes obtenus à partir de ces bactéries avec ceux des hopanoïdes synthétisés montre sans ambiguïté que le méthyle supplémentaire est en C-3 $\beta$  (Zundel, 1984).

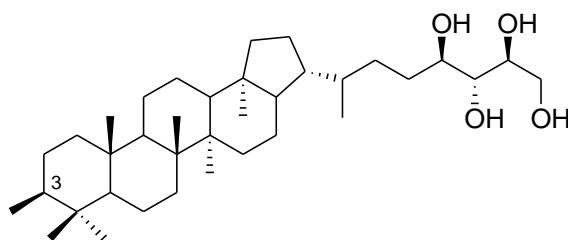
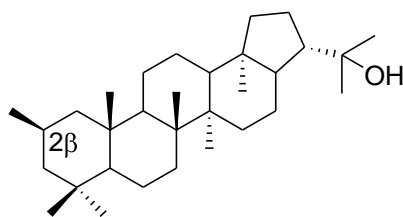


Figure 7. 3 $\beta$ -Métylhopanoïdes isolés d'*Acetobacter pasteurianus* spp. *pasteurianus*.

## IV.2 2 $\beta$ -métylhopanoïdes

Rohmer a signalé dans la cyanobactérie *Nostoc muscorum*, à côté de petites quantités de bactériohopanetétrol méthylé en C-3 $\beta$  identique à ceux d'*Acetobacter pasteurianus* ssp. *pasteurianus*, la présence de dérivés du bactériohopane possédant un atome de carbone supplémentaire, mais différents de ceux d'*Acetobacter pasteurianus* spp. *pasteurianus* par leur temps de rétention en CPG. Il a également détecté ce nouveau type de hopanoïdes dans quelques cyanobactéries sous forme de méthylbactériohopanepolyols (Rohmer, 1975). Zundel a pu identifier un tel, hopanoïde, le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (Figure 8) chez *Methylobacterium organophilum*. Selon le spectre de masse de son éther de triméthylsilyle, le groupement de méthyle supplémentaire se trouve sur le cycle A ou B, comme dans les 3 $\beta$ -métylhopanoïdes, d'après l'ion de masse 205 correspondant aux cycles A et B après rupture du cycle C. En RMN du proton, le signal de ce groupement de méthyle supplémentaire apparaît comme un doublet à 0,83 ppm avec une constante de couplage de 6,4 Hz. L'examen des spectres de RMN du proton de ces nouveaux métylhopanoïdes suggère que le méthyle supplémentaire pourrait se trouver en position axiale en interaction avec les méthyles C-4 $\beta$  et C-10 $\beta$ . Cette condition serait remplie par un groupement méthyle en C-2 $\beta$  ou C-6 $\beta$ . Après avoir effectué les synthèses de 6- et de 2-métylhopanoïdes, la comparaison au niveau de la région du méthyles des produits synthétisés en RMN du proton et leur temps de rétention par CPG avec ceux du produit obtenu de la bactérie, a montré que ce groupement de méthyle supplémentaire est en position C-2 $\beta$  (Bisseret *et al.*, 1985 ; Zundel, 1984).

Le 2 $\beta$ -métylhopanoïde actuellement le plus facilement accessible est le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol produit par le métylotrophe facultatif *Methylobacterium organophilum* (Figure 8).

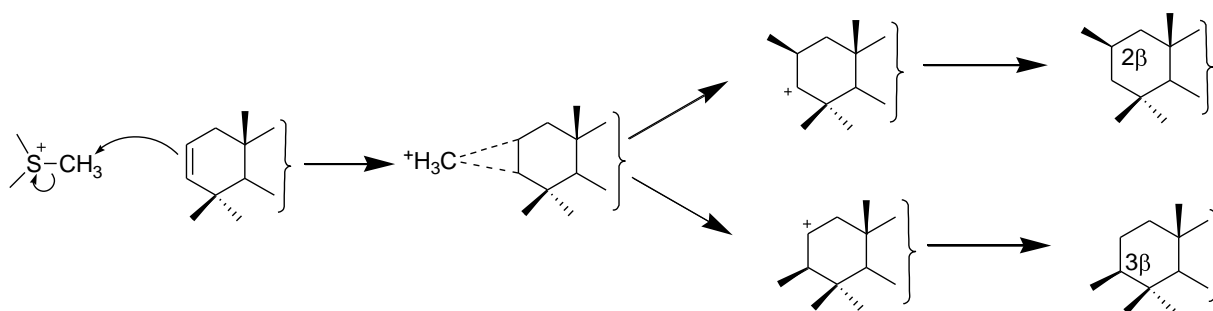


**Figure 8.** 2β-Méthyldiplotérol isolé de *Methylobacterium organophilum*.

### IV.3 Hypothèses pour la biosynthèse des méthylhopanoïdes selon M. Zundel

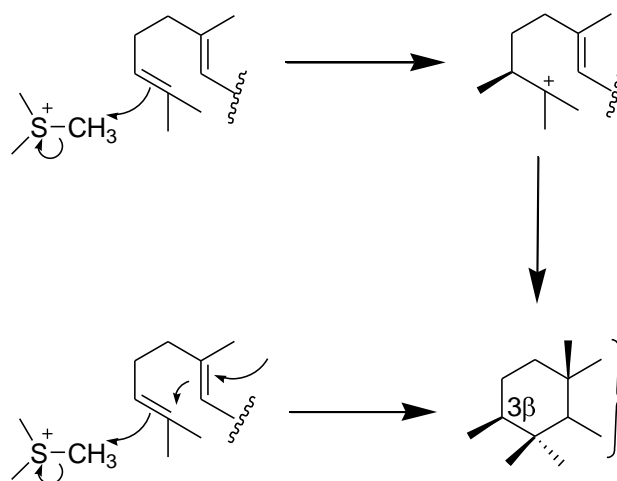
Après l'identification de deux séries 2β- et 3β-méthylhopanoïdes, une hypothèse pour un schéma biogénétique conduisant à ces composés a été formulée. La S-adénosyl méthionine est un donneur biologique de « CH<sub>3</sub><sup>+</sup> ». Deux possibilités permettant l'introduction d'un méthyle supplémentaire en C-2 ou en C-3 sur un squelette hopanique sont présentées (Zundel et Rohmer, 1985b):

- 1- La méthylation pourrait avoir lieu sur un hopanoïde insaturé à double-liaison Δ<sup>2</sup> (Figure 9).



**Figure 9.** Biogénèse hypothétique de méthylhopanoïdes à partir de Δ<sup>2</sup>-hopanoïdes.

- 2- La méthylation s'effectue sur une double-liaison terminale du squalène, similaire à la double liaison Δ<sup>24</sup> de la chaîne latérale des stérols. Le carbocation créé en C-2 induit la cyclisation du squalène en 3-méthylhopane. Ce mécanisme revient à la cyclisation du squalène par l'entité électrophile « CH<sub>3</sub><sup>+</sup> » (Figure 10).



**Figure 10.** Biogenèse hypothétique de 3-méthylhopanoïdes à partir du squalène.

Des incubations de la méthionine marquée avec un groupement méthyle trideutérié avec *Acetobacter pasteurianus* et de *Methylobacterium organophilum* ont contribué à la confirmation du rôle de la SAM comme donneur de groupement de méthyle dans la biosynthèse des 2 $\beta$ - et 3 $\beta$ -méthylhopanoïdes avec rétention des trois deutériums du groupement méthyle transféré (Zundel et Rohmer ,1985 b).

Ces bactéries appartenant à des groupes taxonomiques différents, incorporent le groupement de méthyle de la méthionine dans leurs hopanoïdes méthylés en C-2 ou en C-3 avec des taux très comparables. La recherche de  $\Delta^2$ -hopanoïdes bactériens à l'aide de  $\Delta^2$ -hopanoïdes obtenus par hémisynthèse s'est révélée infructueuse (Bisseret et Rohmer, résultats non publiés). Une autre hypothèse pour la réaction de méthylation devrait être envisagée.

#### **IV.4 Hypothèse d'une méthylation radicalaire de CH<sub>2</sub> non activé**

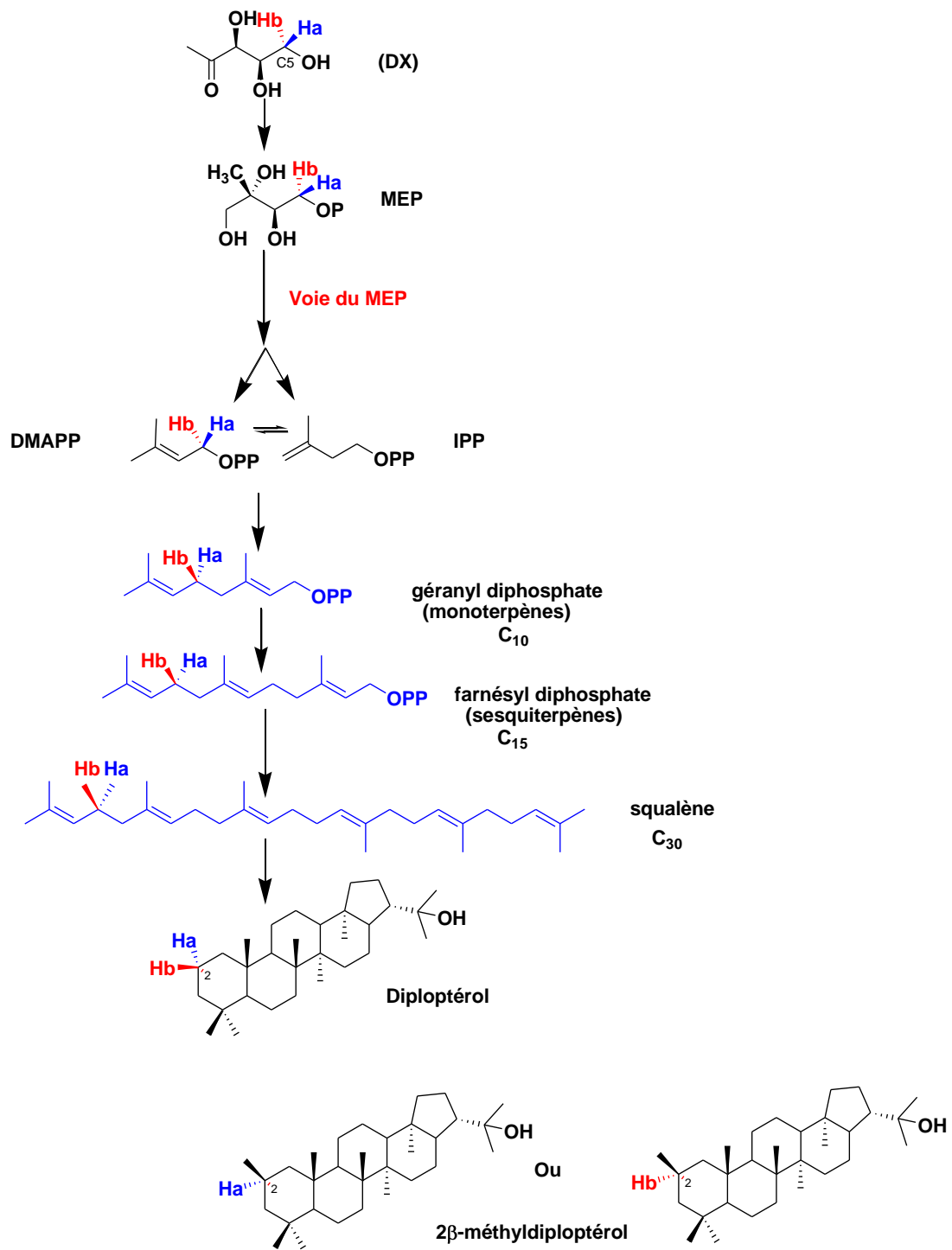
En 2010, Welander *et al.* ont publié leurs travaux sur les hopanoïdes méthylés chez *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1, Ils ont pu identifier un ORF 4269 qu'ils ont nommé *hpnP* et qui semblait être impliqué dans la réaction de méthylation en C-2 des 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes. Cette conclusion était fondée sur plusieurs études génétiques : Une ablation du gène *hpnP* chez les TIE-1 induit l'absence du 2-méthylhopanoïde. Par contre, quand on introduit un plasmide contenant le gène *hpnP* dans ce mutant, la synthèse du hopanoïde méthylé en C-2 est restaurée. La



présence ou absence du hopanoïde méthylé est déterminée par GC-MS. L'ORF 4269 a été annoté dans la banque des données comme un gène qui code pour une enzyme à radical SAM d'où l'hypothèse d'une méthylation radicalaire au niveau du C-2 du cycle A du hopane (Welander *et al.*, 2010).

Ce groupement méthyle est soupçonné provenir d'une réaction enzymatique radicalaire dont le mécanisme demeure toujours inconnu. L'étude de la stéréochimie de cette réaction enzymatique radicalaire de méthylation est d'une grande importance puisqu'il s'agit d'un premier pas vers la compréhension du mécanisme de ce type de réaction biologique qui crée une liaison C-C sur un atome de carbone saturé  $sp^3$  non activé.

Il a déjà été mentionné que les unités isopréniques (IPP et DMAPP) sont obtenues à partir du 1-désoxy-D-xylulose (DX) suivant la voie de méthylérythritol phosphate ou voie du MEP. Selon la voie du MEP, le carbone en position C-5 du DX correspond au carbone C-1 de l'IPP ou du DMAPP, et donc au carbone C-2 du cycle A du hopane (Figure 11). La synthèse des deux isomères 5*R* et 5*S* du DX marqué au deutérium en C-5 et leur incorporation dans le 2β-méthylidiploptérol en présence de la méthionine marquée en  $^{13}\text{C}$  sur le méthyle devraient répondre à cette question (Figure 11). La méthionine marquée en  $^{13}\text{C}$  a pour rôle d'augmenter la sensibilité de la détection par RMN du signal du groupement méthyle en C-2. La rétention ou la perte du deutérium en C-2 du 2β-méthylidiploptérol isolé de *Methylobacterium organophilum* cultivé sur un milieu de culture minimum sera caractérisée par RMN du  $^{13}\text{C}$ . En analysant la présence ou l'absence d'un signal de ce groupement méthyle marqué au  $^{13}\text{C}$  déplacé vers les champs forts sera la signature de la présence ou de l'absence d'un deutérium en position β du groupement méthyle en C-2, c'est à dire en C-2. Cette information devrait permettre de déduire la stéréochimie de la réaction de méthylation



**Figure 11.** Stéréosélectivité de la réaction de méthylation au niveau du carbone C-2 du cycle A du diploptérol : perte ou rétention des hydrogènes en C-2.

## V. Les deux isotopomères 5*R* et 5*S* du (5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose

### V.1 Synthèse de 1-désoxy-D-xylulose (DX) en abondance naturelle

Le but de cette synthèse est de mettre au point les réactions qui seront effectuées lors de la synthèse des deux isomères deutériés du DX.

La réduction des fonctions esters du (+)-diméthyl 2,3-*O*-benzylidène-D-tartrate **1** en alcool primaire est réalisée à l'aide de LiAlH<sub>4</sub> et conduit à l'alcool **2** (Schéma 11).

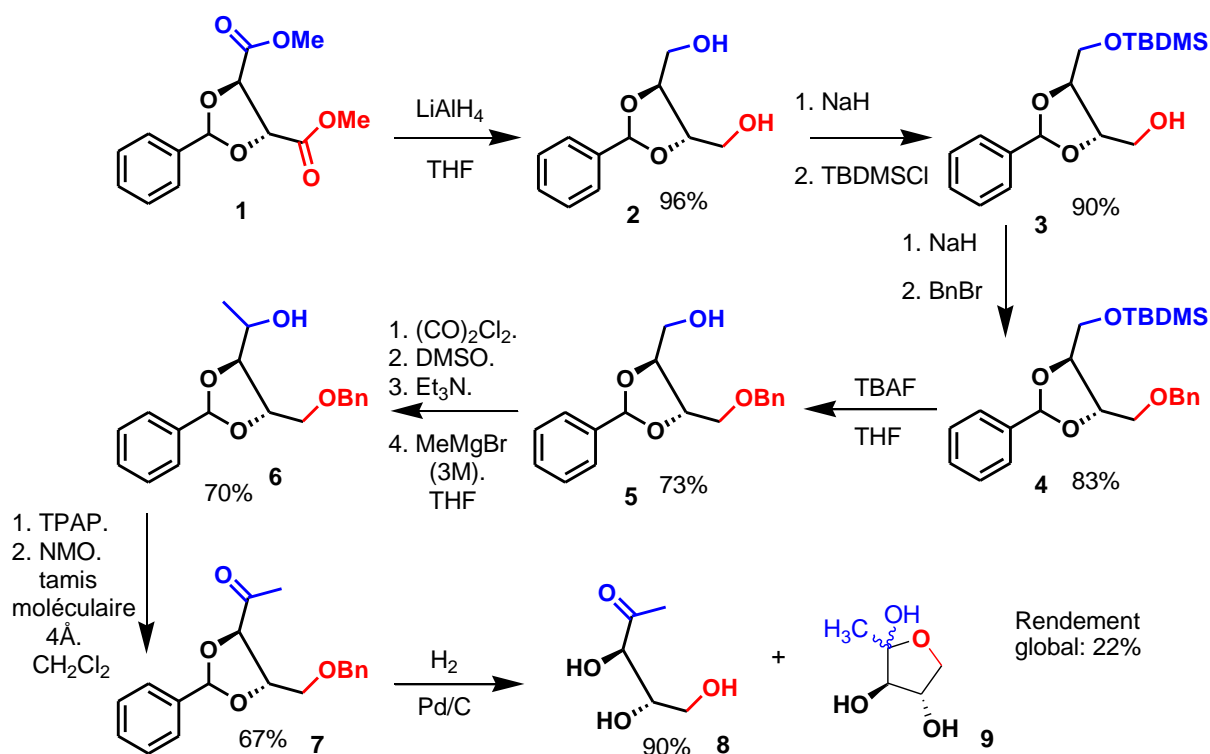


Schéma 11. Synthèse du 1-désoxy-D-xylulose à partir du (+)-diméthyl 2,3-*O*-benzylidène-D-tartrate.

La monoprotection par silylation d'une des fonctions hydroxyles du thréitol **2** est réalisée en utilisant de l'hydrure de sodium et du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle et permet d'obtenir le monosilyléther **3** avec un rendement de 90 %. Une deuxième

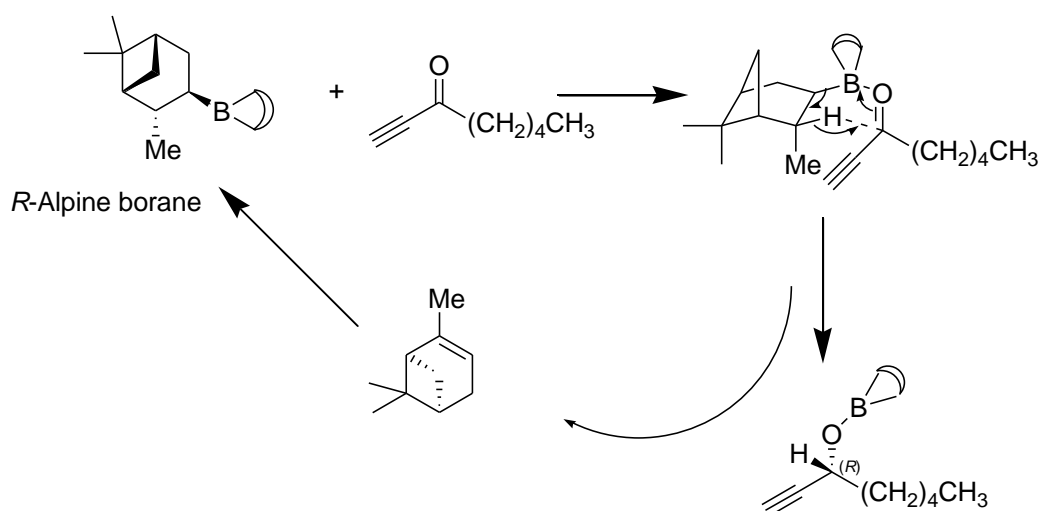
réaction de protection par benzylation est réalisée en utilisant de l'hydrure de sodium et du bromure de benzyle et aboutit au produit **4** doublements protégés avec un rendement de 83%. La déprotection de l'éther de silyle à l'aide de fluorure de tétrabutylammonium, conduit à l'alcool primaire **5** avec 73% de rendement. L'élongation de la chaîne carbonée est effectuée en utilisant la réaction de Swern-Ireland (Ireland et Norbeck, 1985), et l'alcool secondaire **6** est obtenu sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères avec un rendement de 70 %. Cet alcool est ensuite oxydé en cétone **7** en utilisant comme réactifs le TPAP et la NMO (Griffith et Ley, 1990). Le DX protégé **7** est ainsi obtenu avec un rendement de 67 %. La déprotection des groupements benzyles par hydrogénolyse catalytique (Pd/C) fournit quantitativement le 1-désoxy-D-xylulose sous forme de chaîne ouverte **8** et des deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  **9** avec un rendement de 90%.

## V.2 Synthèses du (5*R*)- et du (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose

Comme cela a déjà mentionné, la réponse à la question sur la stéréochimie de la réaction de méthylation sera obtenue par traitement du spectre RMN <sup>13</sup>C du 2- $\beta$  méthyldiploptérol isolés après incubation du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et du (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX marqué au deutérium en position C-5 chez *Methylobacterium organophilum* ou une autre bactérie productrice de 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes. Notre objectif est donc de synthétiser ces deux isotopomères du DX stéréospécifiquement marqués au <sup>2</sup>H en C-5 en quantité suffisante pour effectuer les incubations.

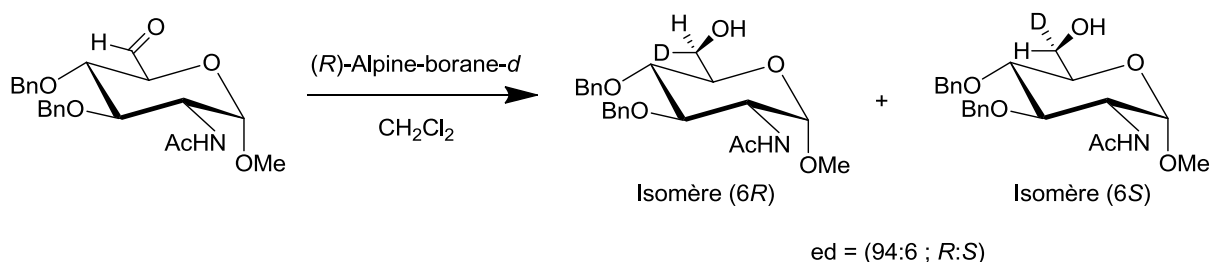
Le produit de départ de cette synthèse est le (+)-diméthyl 2, 3-O-benzylidène-D-tartrate, un produit commercial possédant déjà les configurations requises pour obtenir du 1-désoxy-D-xylulose énantiomériquement pur. De plus, le groupement benzylidène permettra de limiter les étapes de purification puisqu'il pourra être éliminé par hydrogénolyse catalytique. L'étape-clé dans ces synthèses est la réduction stéréosélective (réduction de Midland) de l'aldéhyde par l'Alpine borane<sup>®</sup> (Midland et Tramontano, 1978 ; Midland *et al.*, 1994). La réduction de Midland est une réduction énantiosélective des systèmes carbonylés avec un borane qui ne contient pas d'hydrogène. Le (*R*)-Alpine-borane<sup>®</sup> est le nom commercial donné par la compagnie Aldrich pour le *B*-3-pinanyl-9-borabicyclo-[3.3.1]-nonane. Ce composé est préparé par hydroboration de (+)- $\alpha$ -pinène par le 9-BBN (Midland et Tramontano,

1978). Les deux isomères *R* et *S* de ce borane sont disponibles commercialement. L'Alpine borane<sup>®</sup> est très efficace pour transférer un hydrure sélectivement sur l'une des faces prochirales d'un aldéhyde deutérié et des cétones acétyléniques d'où notre choix de cet agent (Figure 12).



**Figure 12.** Mécanisme de la réduction stéréosélective d'une cétone acétylénique par le (*R*)-Alpine borane<sup>®</sup>.

Dans ce travail, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par Falcone-Hindley et Davis (1998) sur la préparation stéréosélective des hexoses marqués en C-6 au deutérium. Ces auteurs ont décrits la synthèse du méthyl (6*R*)-(6-<sup>2</sup>H)-2-déoxy-2-*N*-acétamido- $\alpha$ -glucoside en utilisant le (*R*)-(+)-Alpine-borane-*d*<sup>®</sup> comme agent de réduction sélective de l'aldéhyde en C-6 de l'hexose. Ils ont ainsi réussi à obtenir l'isomère (6*R*) avec un excès diastéréomérique de (94:6 ; *R*:*S*) (Figure 13).

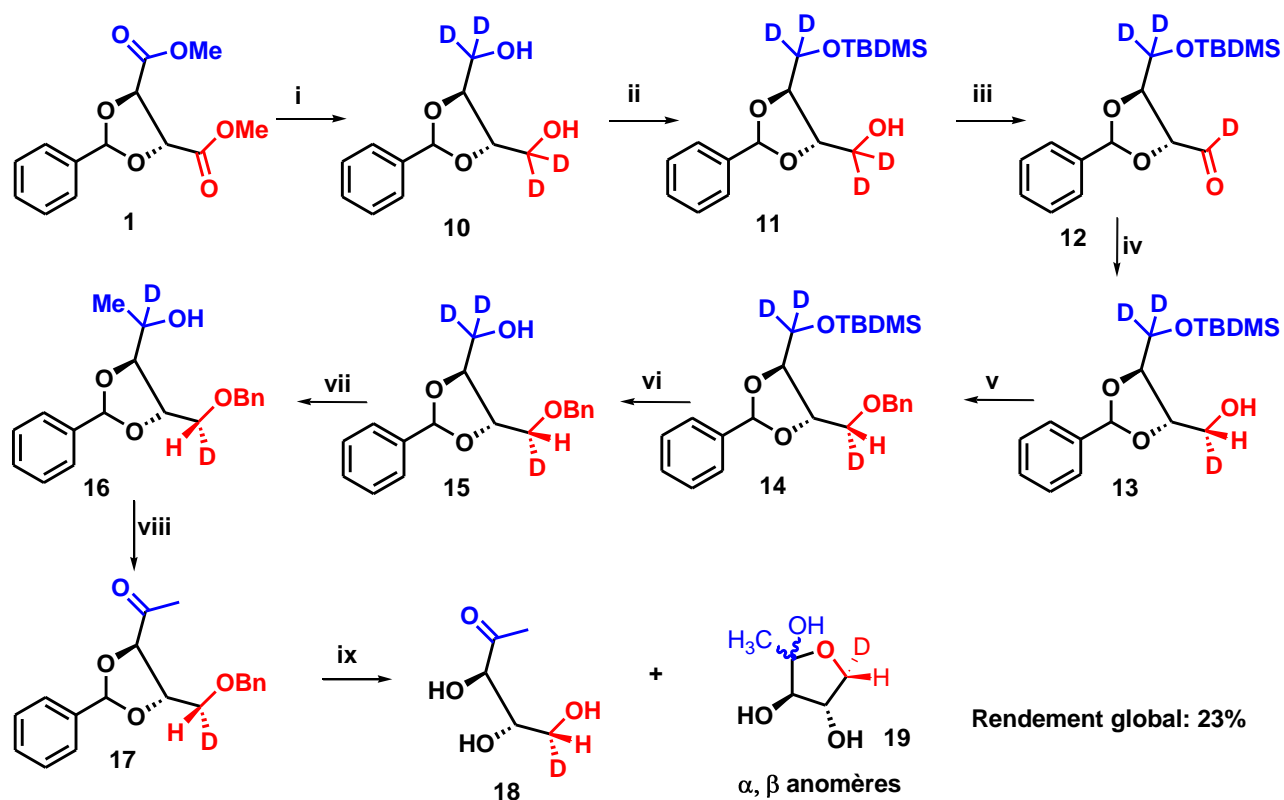


**Figure 13.** L'étape de la réduction stéréosélective d'un aldéhyde par le (*R*)-(+)-Alpine-borane-*d*<sup>®</sup> dans la synthèse du méthyl (6*R*)-(6-<sup>2</sup>H)-2-déoxy-2-*N*-acétamido- $\alpha$ -glucoside (Falcone-Hindley et Davis, 1998).

### V.2.1 Synthèse du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose

La synthèse débute par une réduction du diester **1** à l'aide de LiAlD<sub>4</sub> dont l'abondance relative en isotope de deutérium est supérieure à 99%. Cela permet d'obtenir du (1,1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-2,3-*O*-benzylidène-D-thréitol **10** avec 93% de rendement. Le traitement de ce diol par de l'hydrure de sodium, puis par du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle dans le THF permet d'obtenir le composé monosilylé **11** avec un rendement de 90%. L'oxydation de cet alcool primaire par le réactif de Dess-Martin dans le DCM aboutit à l'aldéhyde **12** correspondant qui a été directement réduit sans purification par un agent de réduction stéréosélective, le (*R*)-Alpine borane (Midland et Tramontano, 1978 ; Midland *et al.*, 1994), pour l'obtention de l'alcool primaire **13** avec une stéréochimie (*R*)- comme configuration et de rendement de 62% sur les deux étapes.

On note que la purification de cet alcool a été très difficile puisqu'on a une dégradation du (*R*)-Alpine borane sur la silice. La protection par benzylation de la fonction hydroxyle est réalisée en utilisant de l'hydrure de sodium et du bromure de benzyle dans le THF et permet d'obtenir le produit **14** avec un rendement de 72%. La déprotection de l'éther de silyle à l'aide de fluorure de tétrabutylammonium, conduit à l'alcool primaire **15** avec un rendement de 75%. L'élongation de la chaîne carbonée est effectuée en utilisant la réaction de Swern-Ireland (Ireland et Norbeck, 1985). L'alcool secondaire **16** est ainsi préparé avec un rendement de 80 % puis est ensuite oxydé à l'aide de TPAP (Griffith et Ley, 1990) en cétone **17** avec 85% de rendement. La déprotection des groupements benzyles est réalisée par hydrogénolyse en présence d'une quantité catalytique de Pd/C dans (isopropanol : eau) (9 : 1), et permet d'obtenir le (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose énantiomériquement pur sous d'un mélange d'isomères (forme à chaîne ouverte **18** et deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  **19** avec un rendement de 90% (Schéma 12).



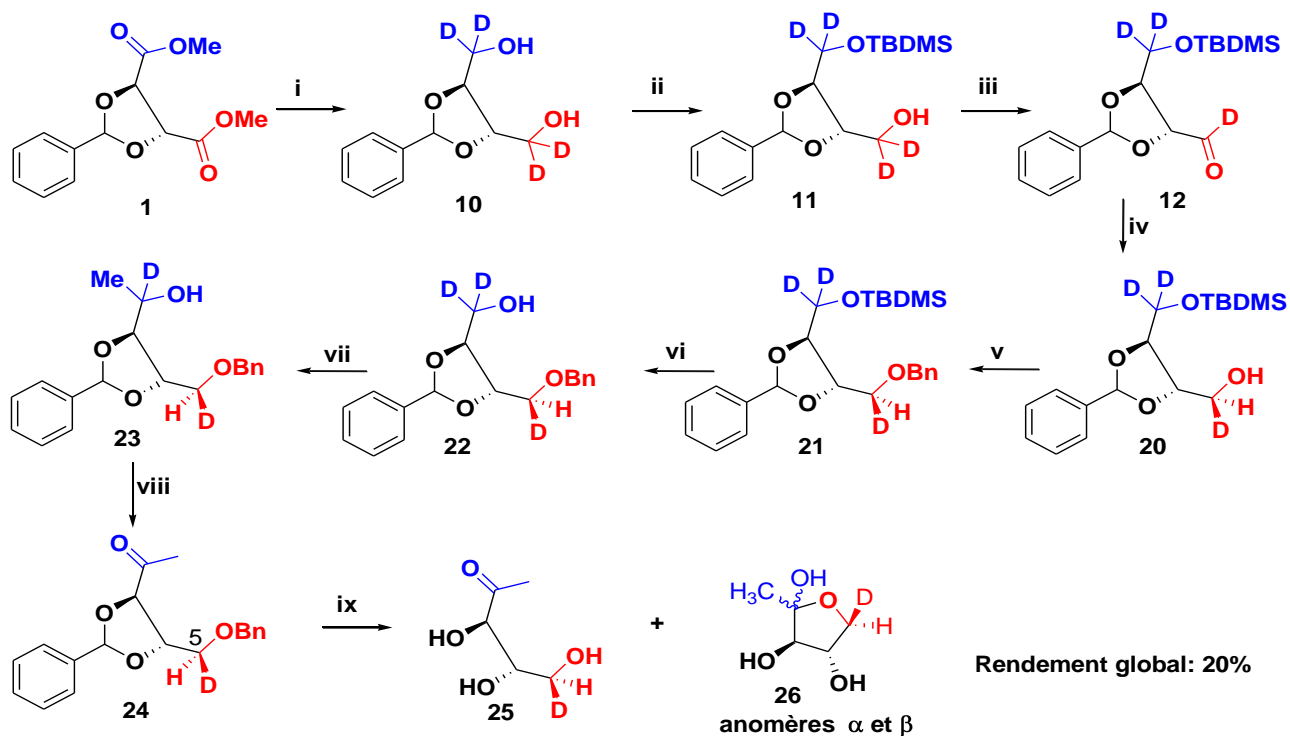
i:  $\text{LiAlD}_4$ , THF (93%); ii: NaH, TBDMSCl, THF (90%); iii: Dess-Martin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; iv: (*R*)-Alpine borane, THF (62% sur les deux étapes précédentes); v: NaH, BnBr, THF (72%); vi: TBAF, THF (75%); vii: a)  $(\text{COCl})_2$ , DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$  / b)  $\text{MeMgBr}$  (3M), THF (80%); viii: TPAP, NMO, tamis moléculaire 4 Å,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (85%); ix:  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C (90%).

**Schéma 12.** Synthèse du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose à partir du (+)-diméthyl 2,3-O-benzylidène-D-tartrate.

### V.2.2 Synthèse du (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose

Dans cette synthèse, nous avons essayé d'obtenir l'alcool secondaire par la réaction de Swern-Ireland (Ireland et Norbeck, 1985) mais nous n'avons obtenu que des traces du produit. Dans l'impossibilité de continuer la synthèse, nous avons été obligés de réaliser cette réaction en deux étapes. La première étape est une oxydation de l'alcool primaire en utilisant la Dess-Martin avec le periodinane comme agent d'oxydation pour obtenir l'aldéhyde. L'aldéhyde formé est traité directement sans purification par le bromure de méthylmagnésium pour obtenir l'alcool secondaire **23** avec 72% de rendement. L'agent de réduction stéréosélective utilisé

est le (*S*)-alpine borane pour l'obtention finale de (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose **25** et **26**. Les rendements des réactions de cette synthèse sont à peu près les mêmes que la synthèse du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose (Schéma 13).



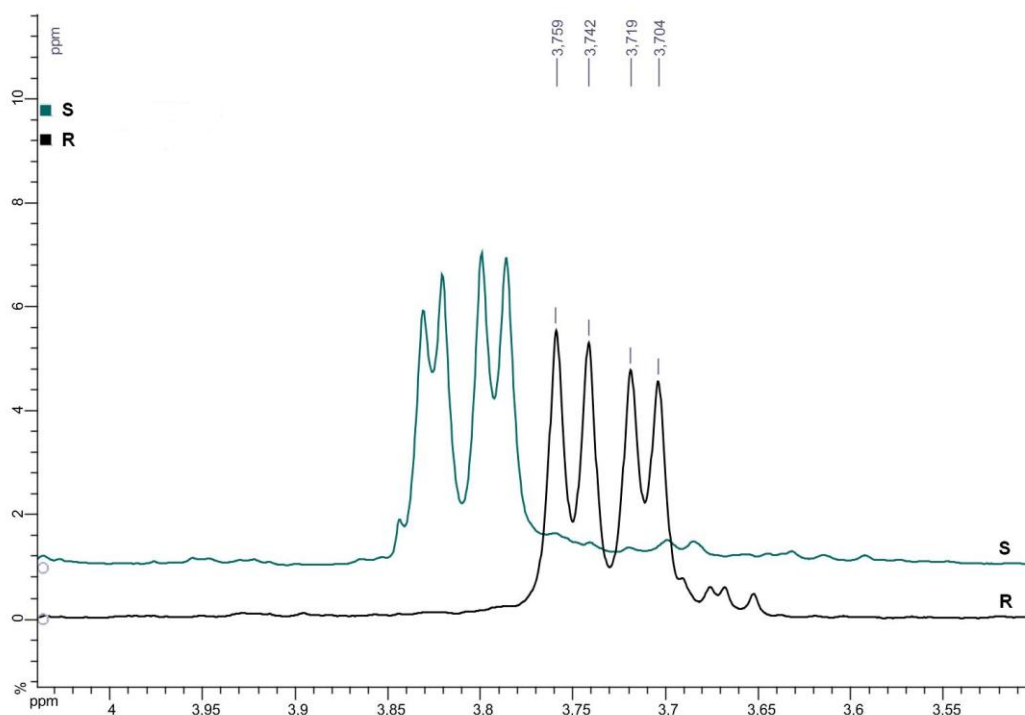
i: LiALD<sub>4</sub>, THF (92%); ii: NaH, TBDMSCl, THF (90%); iii: Dess-Martin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iv: (*S*)-Alpine borane, THF (59% sur les deux étapes précédentes); v: NaH, BnBr, THF (70%); vi: TBAF, THF (80%); vii : a) Dess-Martin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / b) MeMgBr (3M), THF (72%) ; viii: TPAP, NMO, tamis moléculaire 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (86%); ix: H<sub>2</sub>, 10% Pd/C (92%).

**Schéma 13.** Synthèse du (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose à partir du (+)-diméthyl 2,3-*O*-benzylidène-D-tartrate.

La comparaison des spectres de RMN du proton des intermédiaires de synthèse **17** (Schéma 12, Figure 14R) et **24** (Schéma 13, Figure 14S) montre l'absence de l'isotopomère 5*S* dans l'échantillon de (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX ainsi que celle de l'isotopomère 5*R* dans celui de (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX. Les acétals **17** et **24** se présentent chacun comme un mélange de deux diastéréomères à cause du centre stéréogène



supplémentaire provenant du groupement benzyldène. Le signal du proton 5-H apparaît sur les spectres des intermédiaires **17** et **24** comme deux doublets avec des déplacements chimiques très différents sans aucune superposition de signaux. Les signaux du proton 5-H de l'isotopomère 5S **24** sont absents du spectre de l'isotopomère 5R **17**, et ceux de l'isotopomère 5R **17** sont noyés dans le bruit de fond du spectre de l'isotopomère 5S **24**. Dans les limites de la détection par spectroscopie RMN, il est possible de conclure que ces intermédiaires **17** et **24** ont été obtenus avec un excellent excès diastéréomérique (>95% e.d.). Cet excès diastéréomérique ne devrait pas être affecté par l'hydrogénolyse de la dernière étape, et correspond également à celui des produits finaux, (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose **18** et (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose **25**.



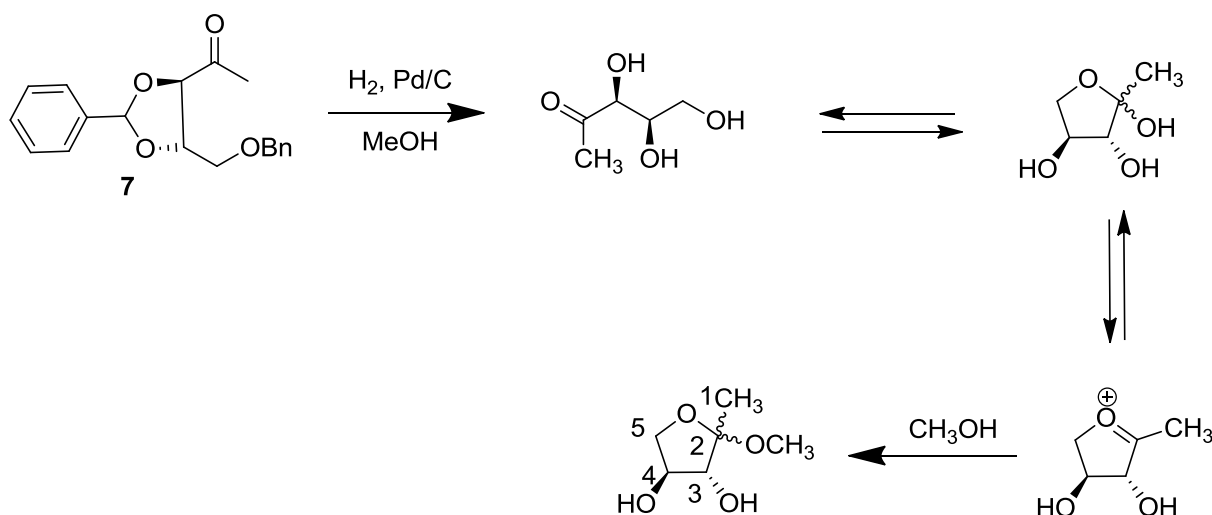
**Figure 14.** Extrait des spectres de RMN de proton au niveau des signaux de H-5 des intermédiaires **17** (5R) et **24** (5S) montrant l'absence détectable d'un isomère dans l'autre.

### V.2.3 Synthèse des $\alpha$ - et $\beta$ -méthyl désoxy-D-xylulofuranosides et vérification de la configuration 5R ou 5S en C-5 des deux isomères deutériés (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX

Pour essayer de compléter la caractérisation des configurations 5R ou 5S du carbone en C-5 du (5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose, nous avons effectué une réaction de glycosylation du DX et étudié ensuite les corrélations NOE entre les protons en position C-3, C-4 et C-5 dans les deux anomères des méthyl-1-désoxy-D-xylulofuranosides (Figure 15).

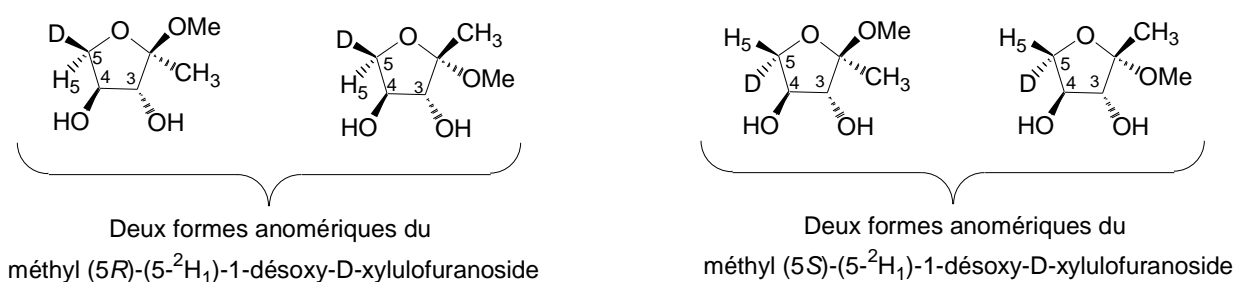
Le DX libre est un mélange du glucide sous forme de chaîne ouverte et de deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de type furane. Après la réaction de glycosylation, il y a conversion totale de la chaîne ouverte du DX en cycle furanosique. Seuls les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du méthyl glycoside du DX sont détectés en proportion 1:1.

Lorsque la déprotection par hydrogénolyse de la cétone **7** (Schéma 11) obtenue après la réaction d'oxydation par le TPAP/NMO (Griffith et Ley, 1990) est réalisée dans le méthanol, les deux anomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -furanose de l'hémicétal peuvent éliminer l'hydroxyle anomérique pour former les  $\alpha$ - et  $\beta$ -méthylglycosides par addition de méthanol sur l'ion carboxonium (Figure 15).



**Figure 15.** Formation des  $\alpha$ - et  $\beta$ -méthylglycosides à partir du 1-désoxy-D-xylulose lors de la déprotection de la cétone **7**.

Les deux formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$  du méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside et du méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside ont été séparés par CCM sur plaque préparative pour vérifier pour chaque anomère la configuration 5*R* ou 5*S* en C-5 des méthylglycosides. On note R1 et R2 les deux formes anomériques du méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H)-1-désoxy-D-xylulofuranoside et S1 et S2 les deux formes anomériques de méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside (Figure 16).



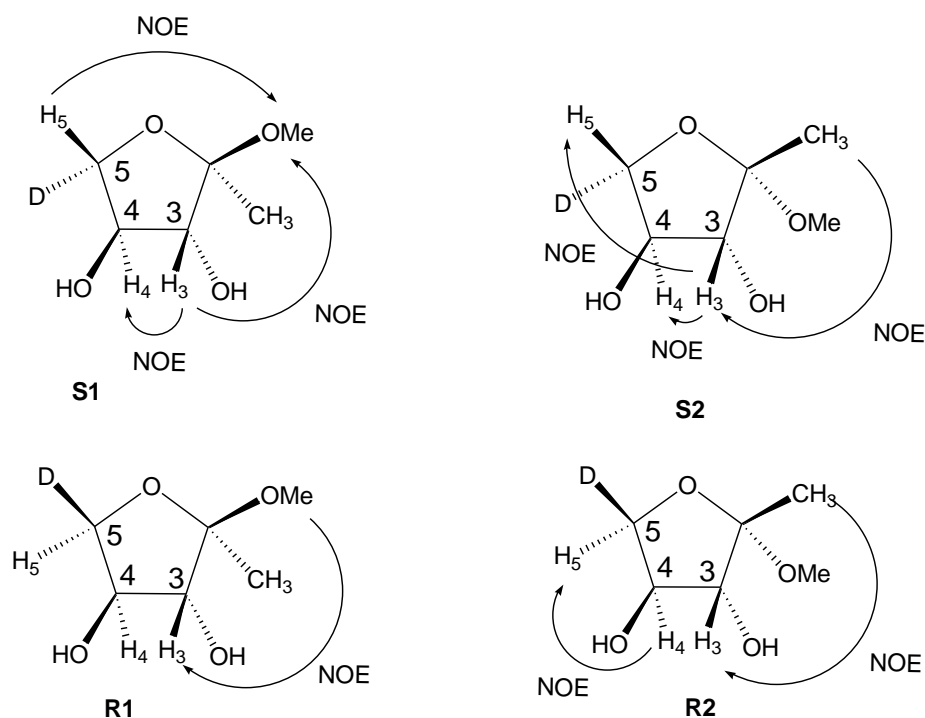
**Figure 16.** Formes anomériques du méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside et du méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside.

Dans les cycles à cinq carbones les angles dièdres C-C-C-C sont significativement inférieurs à 60°. Les protons vicinaux *cis* ont tendance à avoir des angles dièdres H-C-C-H proche de 0° et ceux *trans* sont proches de 120°. Les constantes de couplages entre deux protons vicinaux *cis* dans un cycle à cinq chaînons sont généralement plus grandes que celles entre deux protons vicinaux *trans* (Reich, 2013). Le tableau 1 montre la différence entre les constantes de couplages  $J_{5-4}$  des différentes formes anomériques R1, R2, S1 et S2 mesurées en RMN du proton. On peut remarquer que les constantes de couplages entre les protons H<sub>5</sub> et H<sub>4</sub> ( $J_{5-4}$ ) des deux formes anomériques R1 et R2 de l'isotopomères 5*R* sont significativement plus élevées que celles des deux formes anomériques S1 et S2 de l'isotopomère 5*S* (Tableau 1), ce qui suggère que les deux protons vicinaux H<sub>5</sub> et H<sub>4</sub> sont en positions relatives *cis* dans le méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside et *trans* dans le méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside.

Constante de couplage	R1	R2	S1	S2
$J_{5-4}$	6,7 Hz	7,3 Hz	5,3 Hz	4,4 Hz

**Tableau 1.** Constantes de couplages  $J_{5-4}$  des formes anomériques du méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside (R1 et R2) et méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside (S1 et S2).

De plus, des analyses en RMN 2D ont été effectuées. La figure 17 montre les corrélations NOE majeures identifiées sur les spectres NOESY de R1, R2, S1 et S2. A partir de ces corrélations, R2 et S2 ont pu être identifiés aux anomères  $\alpha$  du méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside et du méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside à cause de la NOE entre H-3 et le groupement méthyle. Par conséquent, R1 et S1 sont les anomères  $\beta$ . La corrélation NOE entre le groupe méthoxy et H-5 dans le spectre de S1 et entre H-3 et H-5 dans le spectre de S2 est en accord avec une configuration 5*S* pour C-5. De façon similaire, la corrélation NOE entre H-4 et H-5 sur le spectre de R2 est en accord avec une configuration 5*R* pour C-5 (Figure 17).



**Figure 17.** Corrélations NOE observés dans les spectres NOESY de R1, R2, S1 et S2.

En conclusion, H-5 et H-4 sont du même côté du plan moyen du cycle furanoside dans le méthyl (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-1-D-xylulofuranoside. Par contre c'est l'inverse dans le méthyl (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulofuranoside. Tous ces arguments confirment les configurations 5*R* et 5*S* en C-5 des deux isomères du (5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX synthétisés.

#### V.2.4 Synthèse du (1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-désoxy-D-xylulose

Pour évaluer l'efficacité de l'incorporation du DX dans les hopanoïdes de la bactérie-cible, il faut synthétiser un isotopomère marqué du DX de synthèse peu coûteuse et disponible en quantités. Le choix s'est orienté vers le (1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-désoxy-D-xylulose. Cet isotopomère permettra d'optimiser les conditions d'incorporation du DX tout en économisant les isotopomères marqués en C-5 coûteux et longs à obtenir.

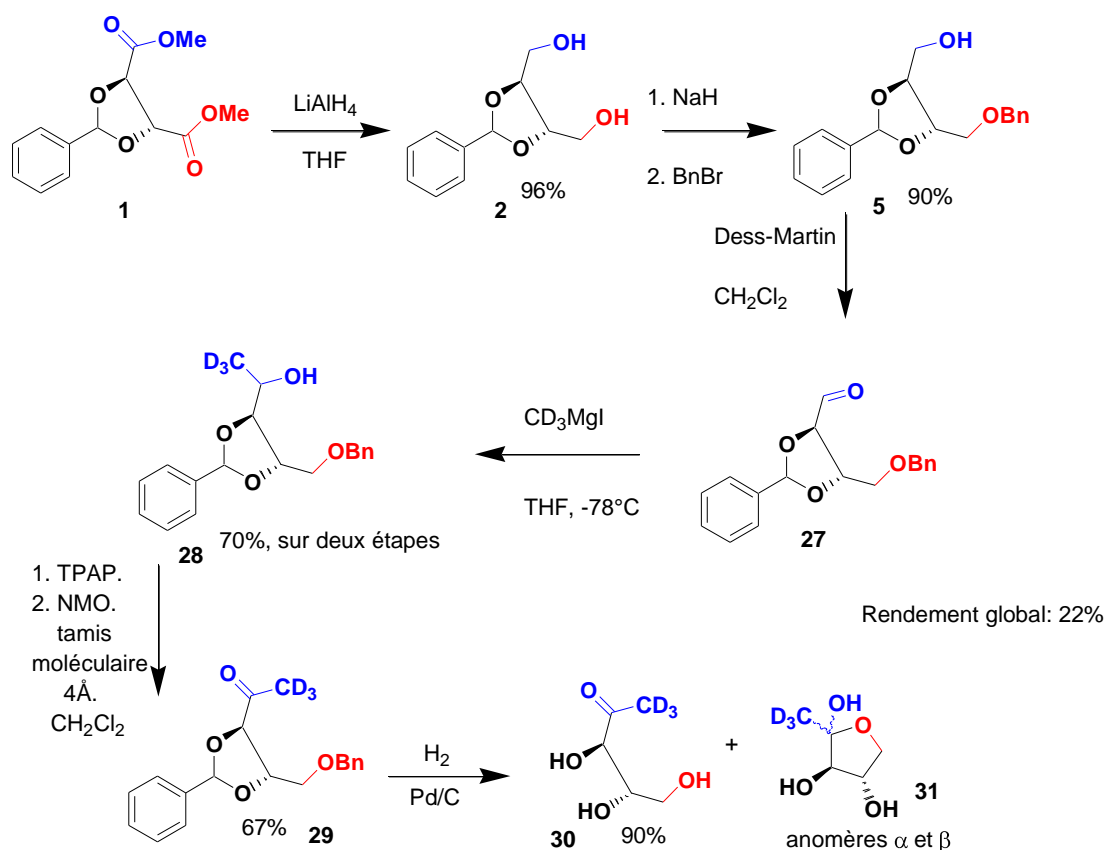


Schéma 14. Synthèse du (1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose à partir du (+)-diméthyl 2,3-O-benzylidène-D-tartrate.

La réduction des fonctions esters du (+)-diméthyl 2,3-O-benzylidène-D-tartrate **1** en alcool primaire est réalisée à l'aide de  $\text{LiAlH}_4$  et conduit à l'alcool **2** (schéma 14).

La monoprotection par benzylation d'une des fonctions hydroxyles du thréitol **2** est réalisée en utilisant de l'hydrure de sodium et du bromure de benzyle et permet d'obtenir le produit monoprotégé **5** avec un rendement de 90 %. L'oxydation de l'alcool primaire obtenu en aldéhyde **27** correspondant est effectuée en utilisant la réaction de Dess-Martin avec le periodinane. L'introduction du groupement de méthyle trideutéié est réalisée à l'aide de l'iodure de méthylmagnésium trideutéié. L'alcool secondaire **28** est obtenu sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères avec un rendement de 70 %. Cet alcool est ensuite oxydé en cétone **29** en utilisant comme réactifs le TPAP et la NMO (Griffith et Ley, 1990). Le DX protégé est ainsi obtenu avec un rendement de 67 %. La déprotection des groupements benzyles par hydrogénation catalytique (Pd/C) fournit le (1,1,1- $^2\text{H}_3$ )-désoxy-D-xylulose sous forme de chaîne ouverte **30** et deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  **31** avec un rendement de 90%.

## VI. Conclusion

Nous avons réussi à synthétiser avec un excellent excès diastéréomérique les deux isotopomères 5*R* et 5*S* du (5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose stéréosélectivement marqués au deutérium en C-5. Ces deux isotopomères ont été utilisés par la suite lors de nos expériences d'incorporation dans des 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes. Le (1,1,1- $^2\text{H}_3$ )-désoxy-D-xylulose a été synthétisé pour évaluer l'efficacité de l'incorporation du DX dans les hopanoïdes chez les bactéries-cibles avant d'engager les deux isotopomères du DX stéréosélectivement deutériés en C-5.

## Partie Expérimentale

### Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaques de gel de silice. Les plaques analytiques sont des plaques commerciales Merck en aluminium de 0,25 mm d'épaisseur, 60F<sub>254</sub>. Les plaques préparatives sont des plaques commerciales Merck en verre d'une épaisseur de silice de 0,5, 1 ou 2 mm, 60 F<sub>254</sub>. Les composés ont été révélés par UV (254 nm) ou après pulvérisation d'un réactif à base de *p*-anisaldéhyde [*p*-anisaldéhyde (2,5%), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,5%), AcOH (1,6%), EtOH (92,4%)], d'une solution d'acide phosphomolybdique [acide phosphomolybdique (25 g), Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O (10 g), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (60 mL), H<sub>2</sub>O (900 mL)], ou bien d'une solution de KMNO<sub>4</sub> à 1% dans l'acétone, suivie de chauffage à plus de 100°C.

### Chromatographie éclair sur colonne

Les chromatographies sur colonne de silice ont été effectuées avec du gel de silice Merck 60 de granulométrie 40-63 µm sous pression d'air. Le diamètre de la colonne a été choisi en fonction de la quantité de produit à purifier. La hauteur de silice standard est de 15 cm et le débit de l'éluant est de 8 ml/min (Clark Still *et al.*, 1978).

### Solvants :

Les solvants utilisés lors des réactions ont été séchés et distillés sous argon. Le dichlorométhane a été distillé sur hydrure de calcium. Le THF a été distillé sur sodium en présence de benzophénone.

### Spectrométrie RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton, du carbone et du phosphore ont été enregistrés à 298 K, soit sur un appareil BRUKER Avance 300 (RMN <sup>1</sup>H : 300 MHz ; RMN<sup>13</sup>C : 75 MHz ), soit sur un appareil BRUKER Avance 400 (RMN <sup>1</sup>H : 400 MHz ; RMN<sup>13</sup>C : 100 MHz), soit sur un appareil BRUKER Avance 500

(RMN  $^1\text{H}$  : 500 MHz ; RMN $^{13}\text{C}$  :100 MHz), soit sur un appareil BRUKER Avance 600 (RMN  $^1\text{H}$  : 600 MHz ; RMN $^{13}\text{C}$  :150 MHz) en utilisant des solutions dans le chloroforme deutérié,  $\text{D}_2\text{O}$  ou le méthanol deutérié. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm en prenant comme référence le signal du  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta = 7,26$  ppm) en RMN  $^1\text{H}$  et celui de  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,030$  ppm) «en RMN  $^{13}\text{C}$  pour des spectres enregistrés en solution dans  $\text{CDCl}_3$ , le signal de DHO ( $\delta = 4,56$  ppm) en RMN  $^1\text{H}$  pour des spectres enregistrés en solution dans le  $\text{D}_2\text{O}$ , le signal du  $\text{CHD}_2\text{OD}$  ( $\delta = 3,30$  ppm) en RMN  $^1\text{H}$  et celui de  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta = 49,00$  ppm) en RMN  $^{13}\text{C}$  pour des spectres enregistrés en solution dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ , le signal du  $\text{CHD}_2\text{SOCD}_3$  ( $\delta = 2,50$  ppm) en RMN  $^1\text{H}$  et celui du  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  ( $\delta = 39,52$  ppm) en RMN  $^{13}\text{C}$  pour des spectres enregistrés en solution dans le  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ .

Les abréviations s, d, t, q et m désignent respectivement la multiplicité du signal : singulet, doublet, triplet, quadriplet et multiplet. Les constantes de couplages sont exprimées en Hz. La pureté des produits est évaluée grâce aux spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

### **Produits marqués**

Le  $\text{LiAlD}_4$  (enrichissement isotopique de >99%) et le  $\text{CD}_3\text{MgI}$  (enrichissement isotopique de >99%).

### **Spectrométrie de masse**

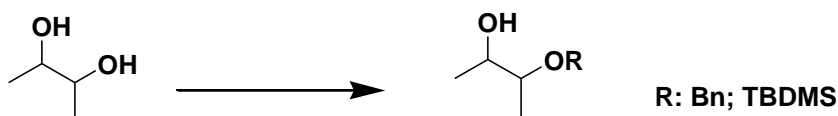
Les spectres de masse ont été enregistrés en mode électrospray sur un spectromètre de masse MSD (Agilent). La spectrométrie de masse haute résolution a été réalisée sur un appareil ZAB-HF avec un potentiel d'accélération de 8 KV en utilisant comme matrice du polyéthylène glycol en présence d'iodure de sodium dans le glycérol.



# Modes opératoires

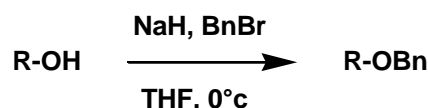
## 1. Protections

### 1A. Monoprotection d'un diol



A une solution portée à 0 °C de diol (1 éq.) dans du THF (2.5 mL/mmol), est ajouté par petites portions de l'hydruure de sodium (1.1 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 min à 0 °C, puis du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyl (1.1 éq.) ou du bromure de benzyle (1.1 éq.) est ajouté. Lorsque le produit de départ est entièrement consommé, la réaction est arrêtée par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

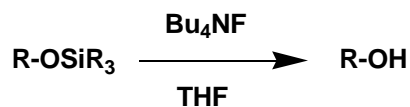
## 1B. Benzylation



A une solution portée à 0 °C de diol (1 éq.) dans du THF (2 mL/mmol), est ajouté par petites portions de l'hydruure de sodium (1.5 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 min à 0 °C, puis du bromure de benzyle (1.5 éq.) est ajouté. Lorsque le produit de départ est entièrement consommé, la réaction est arrêtée par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium (40 mL). La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

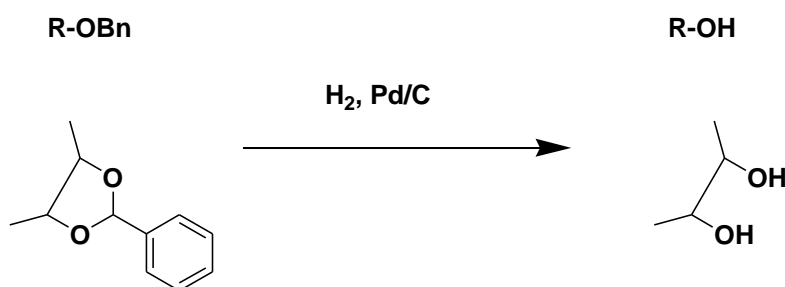
## 2. Déprotections

### 2A. Déprotection d'un groupement silylé



A une solution d'alcool protégé (1 éq.) dans du THF (10 mL/mmol) est ajouté du Bu<sub>4</sub>NF (1.5 éq.). Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, le solvant est évaporé, et le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

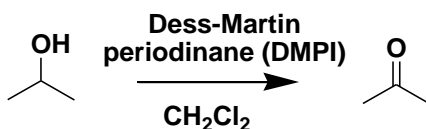
## 2B. Hydrogénation



Le composé est déprotégé par hydrogénation catalytique sur 10 à 15 % de Pd/C dans un mélange (isopropanol : eau) (8 : 2, v : v, 20 mL/mmol) pendant 1 h à température ambiante et à pression atmosphérique. Le brut réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est évaporé.

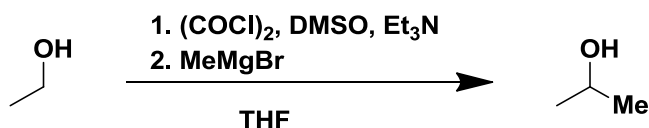
## 3. Oxydations

### 3A. Dess-Martin



A une solution de l'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (15 mL/mmol) est ajouté le DMP (3.5 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Lorsque le produit de départ est consommé, le brut réactionnel est ajouté à une solution saturée dans les deux sels  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{Na}_2\text{CO}_3$  (40 mL) et la solution est agitée pendant 10 min. La phase organique est ensuite lavée avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) et avec de l'eau (30 mL). Les phases aqueuses sont extraites avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

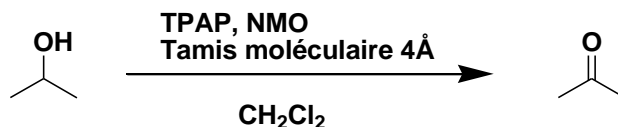
### 3B. Selon Swern-Ireland



A une solution de chlorure d'oxalyle (3,3 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) à  $-78^{\circ}\text{C}$  est ajouté du diméthylsulfoxyde (3,5 éq.). La solution est portée à  $-35^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min puis est refroidie à nouveau à  $-78^{\circ}\text{C}$ . Une solution de l'alcool (1 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) est ajoutée au milieu par canulation. Le brut réactionnel est porté à  $-35^{\circ}\text{C}$ , et après 15 min d'agitation de la triéthylamine (5 éq.) est additionnée. La solution est agitée pendant 1 h à température ambiante puis refroidie à  $-78^{\circ}\text{C}$ . Une solution de bromure de méthyl magnésium dans du diéthyléther (4 éq, 3M) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte. L'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition de l'aldéhyde. La solution est ensuite diluée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium (30 mL).

La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et évaporées à sec. Le résidu jaune est purifié par chromatographie éclair.

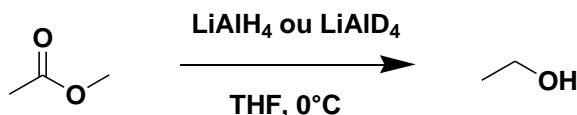
### 3C. TPAP/NMO



A une solution de l'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (2 mL/mmol) sont ajoutés du tamis moléculaire (4 Å) activé, du *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde (3,5 éq) et du TPAP (0.1 éq). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante, et l'évolution de la réaction est suivi par CCM jusqu'à disparition du produit de départ. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur un fritté contenant de la célite. Le solide est lavé à l'acétate d'éthyle, et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

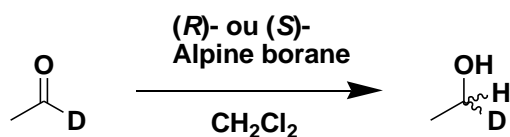
## 4. Réduction

### 4A. LiAlH<sub>4</sub> ou LiAlD<sub>4</sub>



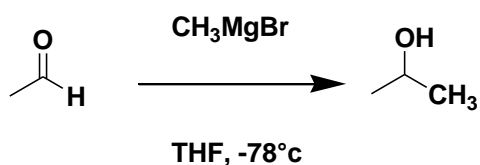
A une solution de l'ester (1 éq.) dans du THF (8 mL/mmol) à 0°C est ajouté LiAlH<sub>4</sub> ou LiAlD<sub>4</sub> par petites portions. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Une solution saturée de tartrate de sodium et de potassium (40 mL) puis de l'éther (50 mL) sont ensuite ajoutés lentement à la suspension grise. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

#### 4B. (S)- ou (R)-Alpine borane



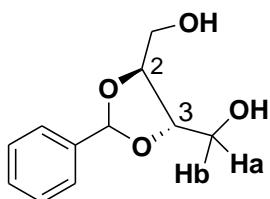
A une solution d'aldéhyde (1 éq) dans le dichlorométhane (8 mL/mmol) est ajouté gouttes à gouttes le (R)- ou le (S)-alpine borane (3 éq). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante, et l'évolution de la réaction est suivi par CCM jusqu'à disparition du produit de départ. Une solution d'acétaldéhyde (15 mL) est ensuite ajoutée pour détruire l'excès d'Alpine borane. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante. L'excès du solvant est évaporé à sec, et le résidu est redissous dans le THF (15 mL/mmol). Une solution 3M de NaOH (15 mL/mmol) est ensuite ajoutée au mélange ainsi que 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 mL/mmol) et le mélange réactionnel est agité pendant 1 h. Le THF est ensuite évaporé à sec, et le produit est purifié par chromatographie éclair.

#### 4C. Organomagnésien



A une solution d'aldéhyde (1 éq) dans le THF (8 mL/mmol) à -78°C est ajouté gouttes-à-gouttes une solution de CH<sub>3</sub>MgBr dans l'éther (3 M) (4 éq). Le mélange réactionnel est agité toujours à -78°C et l'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition du produit de départ. Une solution saturée de chlorure d'ammonium (30 mL) est ensuite ajoutée lentement au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

## 2,3-O-benzylidène-D-thréitol (2)



Ce composé est obtenu à partir de **1** en utilisant la méthode **4A** avec un rendement de **96%**.

Quantité du produit de départ engagé : 3 g ; 11.26 mmole

**Huile incolore**

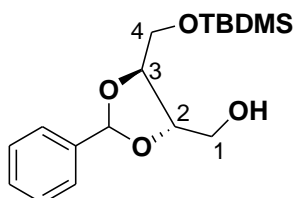
**Rf** : 0.35 (Acétate d'éthyle)

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**: 3.27 (2H, 2 dd, J<sub>OH-Ha</sub> = 1.7 Hz, J<sub>OH-Hb</sub> = 1.7 Hz, OH) ; 3.71 (4H, m, 1-H et 4-H) ; 3.02 (2H, m, 2-H et 3-H) ; 5.91 (1H, s, CHPh) ; 7.32-7.48 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**: 61.5 (CH<sub>2</sub>, C-1 et C-4); 78.5 (CH, C-2); 79.0 (CH, C-3); 103.4 (CH, CHPh); 126.9, 128.8, 130.3 (CH, Ph); 135.9 (C, Ph).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Na 233.110, trouvée 233.104.

**(2S, 3S)-O-Benzylidène-4-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol (3)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **2** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **90%**.

Quantité du produit de départ engagé : 2,1 g; 9,99 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 70 : 30 à 50 : 50).

**Huile incolore**

**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 20/80).

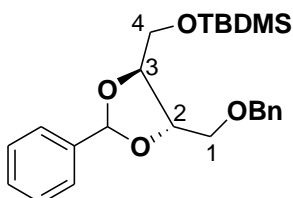
**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.08 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>\*); 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu\*), 2.25 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1a-OH</sub> = 5.4 Hz, J<sub>1b-OH</sub> = 7.3 Hz, OH), 2.32 (1/2 de 1H, t, J<sub>1a-OH</sub> = J<sub>1b-OH</sub> = 6.1 Hz, OH\*), 3.69-4.18 (6H, m, 1-, 2-, 3- et 4-H), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.34-7.51 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), 18.4 (C quaternaire, *t*-Bu), 26.0 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 62.6 (CH<sub>2</sub>, C-1), 63.0 (CH<sub>2</sub>, C-1\*), 63.6 (CH<sub>2</sub>, C-4), 63.7 (CH<sub>2</sub>, C-4\*), 78.2 (CH, C-2), 79.3 (CH, C-2\*), 80.4 (CH, C-3), 80.7 (CH, C-3\*), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.3 (CH, CH-Ph\*), 126.1, 126.7, 128.5, 128.6, 129.1, 129.5, 137.6 et 137.8 (C aromatiques) .

**HRMS (FAB+)** : masse calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>Si : 325.1835, trouvée : 325.1822.



**(2S, 3S)-O-Benzylidène-1-benzyloxy-4-O-tert-butylidiméthylsilyl-D-thréitol (4)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **3** en utilisant la méthode **1B** avec un rendement de **83%**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,5 g ; 4,61 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 95 : 5).

**Huile incolore**

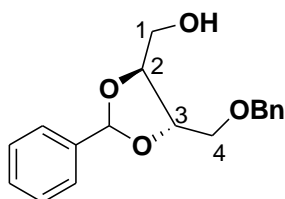
R<sub>f</sub> : 0.30 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 5/95).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.09 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>\*); 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.93 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu\*), 3.69-4.41 (6H, m, 1-, 2-, 3- et 4-H), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.34-7.51 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 63.5 (CH<sub>2</sub>, C-4), 63.7 (CH<sub>2</sub>, C-4\*), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-1), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-1\*), 73.51 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 78.3 (CH, C-2), 78.4 (CH, C-2\*), 78.8 (CH, C-3), 79.1 (CH, C-3\*), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.3 (CH, CH-Ph\*), 126.1, 126.7, 128.5, 128.6, 129.1, 129.5, 137.6 et 137.8 (C aromatiques)

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>SiNa 437.221, trouvée 437.216.

### (2S, 3S)-O-Benzylidène-4-O-benzyl-D-thréitol (5)



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **4** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **73%**.

Quantité du produit de départ engagé : 1 g ; 2,41 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 50 : 50).

#### Huile incolore

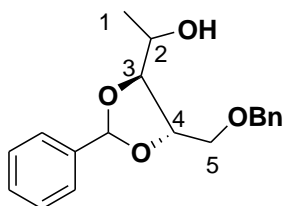
R<sub>f</sub> : 0.40 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.19 (1H, s, OH), 3.76 (4H, m, 1- et 4-H), 4.36 (2H, m, 2- et 3-H), 4.61 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 4.62 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>Ph\*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.33 à 7.50 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 62.6 (CH<sub>2</sub>, C-1), 70.0 (CH<sub>2</sub>, C-4), 73.6 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 76.7 (CH, C-3), 77.8 (CH, C-3\*), 79.8 (CH, C-2), 80.4 (CH, C-2\*) 103.8 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph\*), 125.9, 126.6, 126.7, 127.7, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 129.4, 129.5, 137.3, 137.4, 137.5, et 137.6 (C aromatiques).

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** : masse calculée pour C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub> 301.1440, trouvée 301.1439.

### (3*R*, 4*S*)-O-Benzylidène-5-O-benzylpentan-2-ol (6)



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères en proportion 7:4:2:1 à partir de **5** en utilisant la méthode **3B** avec un rendement de **70%**. Les symboles (#, §, \*, ♂) désignent les différents diastéréomères obtenus.

Quantité du produit de départ engagé : 317mg ; 1,118 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (cyclohexane : acétate d'éthyle, 70 : 30).

#### Huile incolore

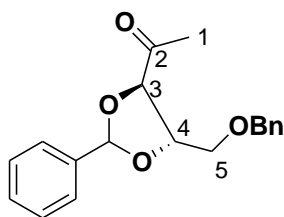
R<sub>f</sub> : 0.45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1.25 (7/14 de 3H, d, J<sub>1-2</sub> = 6.4 Hz, 1-H), 1.29 (4/14 de 3H, d, J<sub>1-2</sub> = 6.4 Hz, 1-H\*), 2.32 (2/14 de 1H, d, J<sub>OH-2</sub> = 5.5 Hz, OH), 2.36 (1/14 de 1H, s, OH\*), 2.49(4/14 de 1H, s, OH<sup>§</sup>), 2.54 (7/14 de 1H, s, OH<sup>#</sup>), 3.71 (2H, m, 5-H), 3.78 (1H, m, 2-H), 3.97(1H, m, 3-H), 4.30 (1H, m, 4-H), 4.62 (7/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.64 (4/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph\*), 5.96 (2/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/14 de 1H, s, CH-Ph\*), 5.98 (7/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>§</sup>), 5.99 (4/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>#</sup>), 7.33-7.51 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 18.7 (CH<sub>3</sub>, C-1), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C-1\*), 19.2 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>§</sup>), 19.6 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>#</sup>), 67.4 (CH, C-2), 67.9 (CH, C-2\*), 68.1 (CH, C-2<sup>§</sup>), 70.1 (CH<sub>2</sub>, C-5), 70.2 (CH<sub>2</sub>, C-5\*), 70.5 (CH<sub>2</sub>, C-5<sup>§</sup>), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-5<sup>#</sup>), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2×CH<sub>2</sub>-Ph), 73.6 (CH<sub>2</sub>, 2×CH<sub>2</sub>-Ph\*), 73.7 (CH<sub>2</sub>, 2×CH<sub>2</sub>-Ph<sup>§</sup>), 76.6 (CH, C-4), 77.2 (CH, C-4\*), 77.7 (CH, C-4<sup>§</sup>), 78.7 (CH, C-4<sup>#</sup>), 82.9 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3\*), 83.2 (CH, C-3<sup>§</sup>), 83.3 (CH, C-3<sup>#</sup>), 103.6 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph\*), 103.8 (CH, CH-Ph<sup>§</sup>), 126.5, 126.6, 126.7, 127.7, 127.8, 128.3, 128.4, 129.3, 129.5, 137.1, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques).

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** : calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub> : 315.1583, trouvée : 315.1591.

**(3*R*, 4*S*)-3,4-*O*-benzylidène-5-(benzyloxy)-pentan-2-one (7)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **6** en utilisant la méthode **3C** avec un rendement de **67 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 245 mg ; 0,779 mmole.

Eluent de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 60 : 40 à 50 : 50).

**Huile incolore**

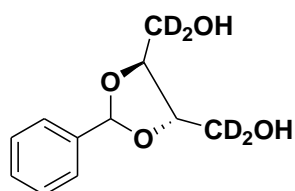
**R<sub>f</sub>** = 0.43 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 30/70).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.29 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.34 (1/2 de 3H, s, 1-H\*), 3.78 (2H, m, 5-H), 4.37 (1H, m, 4-H), 4.43 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6 Hz, 3-H), 4.50 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6 Hz, 3-H\*), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph\*), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.09 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.29-7.54 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 26.5 (CH<sub>3</sub>, C-1), 26.8 (CH<sub>3</sub>, C-1\*), 70.0 (CH<sub>2</sub>, C-5), 70.4 (CH<sub>2</sub>, C-5\*), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 73.6 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph\*), 78.2 (CH, C-4), 78.3 (CH, C-4\*), 82.1 (CH, C-3), 82.3 (CH, C-3\*), 105.1 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), 207.8 (C quaternaire, C-2), 208.4 (C quaternaire, C-2\*).

**HRMS (FAB+)** : masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub> : 313.1440, trouvée : 313.1437.

**(+)-(1,1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-2,3-O-Benzylidène-D-thréitol (10)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **1** en utilisant la méthode **4A** avec un rendement de **93 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 10 g ; 0,037 mole.

**Huile incolore**

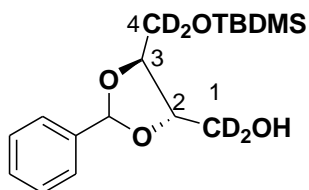
**R<sub>f</sub>** : 0.31 (acétate d'éthyle).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.82 (1/2 de 2H, s, OH), 2.89 (1/2 de 2H, s, OH\*), 4.08 (4H,s, 2- et 3-H), 5.92 (1H, s, CH-Ph), 7.37 - 7.48 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : signal large centré à 61.1 (CD<sub>2</sub>, quint, J<sub>C-D</sub>= 22 Hz, C-1 et C-4), 78.3 et 79.3 (CH, C-2 et C-3), 103.8 (CH, CH-Ph), 126.5, 128.4, 129.6, et 137.1 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>D<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na 237.110, trouvée 237.104.

**(2S, 3S)-(1,1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-O-Benzylidène-4-O-*t*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol (11)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **10** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **90 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 7 g ; 0,032 mole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 70 : 30 à 50 : 50).

**Huile incolore**

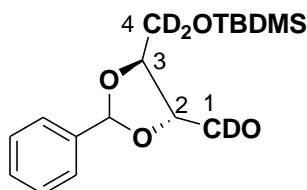
**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 20/80).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.12 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>); 0.91 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.93 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 2.27 (1H, m, OH), 4.05 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H), 4.08 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.14 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H), 4.24 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H<sup>\*</sup>), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CHPh<sup>\*</sup>), 7.35-7.51 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.5 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu<sup>\*</sup>), signal large centré à 62.4 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-1 et C-4), 77.8 (CH, C-2), 78.9 (CH, C-2<sup>\*</sup>), 80.1 (CH, C-3), 80.4 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 103.7 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>D<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SiNa 351.204, trouvée 351.191.

**(2S, 3S)-(1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-O-Benzylidène-4-O-*t*-butyldiméthylsilyl-butanal (12)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **11** en utilisant la méthode **3A**.

Quantité du produit de départ engagé : 7,5 g ; 0,022 mole.

**Huile incolore**

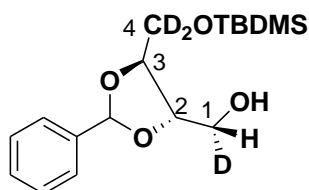
**Rf** : 0.40 (éther /éther de pétrole, 60/40).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.09 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>); 0.91 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92(1/2 de 9H, s, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 4.27 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 5.9 Hz, 3-H), 4.28(1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 5.9 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.52 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.2 Hz, 2-H), 4.53 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.2 Hz, 2-H<sup>\*</sup>), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.98 (1/2 de 1H, s, CHPh<sup>\*</sup>), 7.35-7.51 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu<sup>\*</sup>), signal large centré à 63.5 (CD<sub>2</sub>, m, C-4), 77.8 (CH, C-2), 78.1 (CH, C-2<sup>\*</sup>), 80.1 (CH, C-3), 81.9 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 104.1 (CH, CH-Ph), 105.4 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques), 200.5 (CDO, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 21 Hz).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiNa 348.181, trouvée 348.168.

**(1*R*, 2*S*, 3*S*)-(1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-*O*-Benzylidène-4-*O*-*t*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol (13)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **12** en utilisant la méthode **4B** et le (*R*)-Alpine borane comme réactif. Ce produit est obtenu avec un rendement de **62 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 3 g ; 9,2 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 70 : 30 à 50 : 50).

**Huile incolore**

**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 20/80).

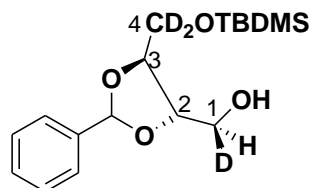
**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.11(1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.12 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>\*); 0.91 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu\*), 2.23 (1/2 de OH, d, J<sub>OH-1</sub>= 7.8 Hz), 2.30 (1/2 de OH\*, d, J<sub>OH\*-1</sub>= 6.7 Hz), 3.76 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub>= 6.0 Hz, 1-H), 3.77 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub>= 5.0 Hz, 1-H\*), 4.10 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H), 4.07 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H\*), 4.24 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub>= 5.3 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H), 4.26 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub>= 5.3 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H\*), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.35-7.51 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub>\*), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu\*), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu\*), signal large centré à 62.5 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-4), 71.9 (CDH, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub>= 21 Hz), 77.8 (CH, C-2), 77.9 (CH, C-2\*), 80.2 (CH, C-3), 80.5(CH, C-3\*), 103.7 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph\*), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiNa 350.192, trouvée 350.184.



**(1S, 2S, 3S)-(1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-O-Benzylidène-4-O-*t*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol (20)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **12** en utilisant la méthode **4B** et le (S)-Alpine borane comme réactif. Ce produit est obtenu avec un rendement de **59 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 3 g ; 9,2 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 70 : 30 à 50 : 50).

**Huile incolore**

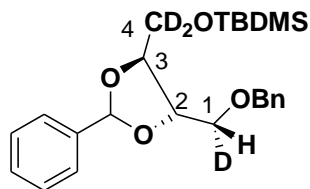
**Rf** : 0.45 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 20/80).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.11 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.12 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>); 0.91 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 2.14 (1/2 de OH, d, J<sub>OH-1</sub>= 5.0 Hz), 2.20 (1/2 de OH<sup>\*</sup>, d, J<sub>OH<sup>\*</sup>-1</sub>= 5.8 Hz), 3.79 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub>= 4.8 Hz, 1-H), 3.87 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub>= 4.3 Hz, 1-H<sup>\*</sup>), 4.10 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H), 4.07 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.24 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub>= 5.3 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H), 4.26 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub>= 5.3 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.8 Hz, 2-H<sup>\*</sup>), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CHPh<sup>\*</sup>), 7.35-7.51 (5H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 62.5 (CDH, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub>= 21 Hz), signal large centré à 62.8 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-4), 77.9 (CH, C-2), 79.1 (CH, C-2<sup>\*</sup>), 80.2 (CH, C-3), 80.5(CH, C-3<sup>\*</sup>), 103.7 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiNa 350.192, trouvée 350.184.

**(1*R*, 2*S*, 3*S*)-(1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-*O*-Benzylidène-1-benzyloxy-4-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-*D*-thréitol (14)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **13** en utilisant la méthode **1B** avec un rendement de **72%**.

Quantité du produit de départ engagé : 2 g ; 5,47 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 95 : 5).

**Huile incolore**

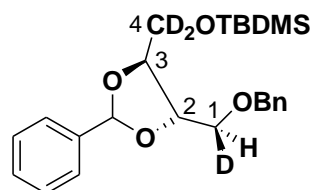
**R<sub>f</sub>** : 0.30 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 5/95).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.09 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>); 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.93 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 3.68 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub> = 5.4 Hz, 1-H), 3.72 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub> = 6.1 Hz, 1-H<sup>\*</sup>), 4.04 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-2</sub> = 6.6 Hz, 3-H), 4.13 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-2</sub> = 6.4 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.27 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub> = 5.4 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.3 Hz, 2-H), 4.37 (1/2 de 1H, t, J<sub>1-2</sub> = 6.4 Hz, 2-H<sup>\*</sup>), 4.63 (2H, s, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.34-7.51 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu<sup>\*</sup>), signal large centré à 63.1 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-4), 70.42 (CDH, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 73.52 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 78.2 (CH, C-2), 78.4 (CH, C-2<sup>\*</sup>), 78.7 (CH, C-3), 79.0 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.3 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiNa 440.243, trouvée 440.232.

**(1S, 2S, 3S)-(1,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-O-Benzylidène-1-benzyloxy-4-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol (21)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **20** en utilisant la méthode **1B** avec un rendement de **70%**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,7 g ; 4,65 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 95 : 5).

**Huile incolore**

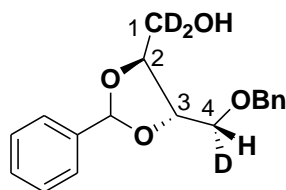
**Rf** : 0.30 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 5/95).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0.09 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub>), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>); 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.93 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 3.67 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub> = 2 Hz, 1-H), 3.69 (1/2 de 1H, d, J<sub>1-2</sub> = 1.3 Hz, 1-H<sup>\*</sup>), 4.02 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-2</sub> = 6.6 Hz, 3-H), 4.10 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-2</sub> = 6.4 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.25 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub> = 3.8 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.3 Hz, 2-H), 4.35 (1/2 de 1H, dd, J<sub>1-2</sub> = 4.3 Hz, J<sub>2-3</sub> = 6.5 Hz, 2-H<sup>\*</sup>), 4.61 (2H, s, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.63 (2H, s, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.34 -7.51 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : -5.3 (2xCH<sub>3</sub>), -5.4 (2xCH<sub>3</sub><sup>\*</sup>), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu<sup>\*</sup>), 25.8 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 25.9 (3xCH<sub>3</sub>, *t*-Bu<sup>\*</sup>), signal large centré à 63.1 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-4), 70.42 (CDH, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 73.50 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 78.2 (CH, C-2), 78.3 (CH, C-2<sup>\*</sup>), 78.7 (CH, C-3), 79.0 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.3 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> SiNa 440.243, trouvée 440.229.

**(2S, 3S, 4R)-(1,1,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-O-Benzylidène-4-O-benzyl-D-thréitol (15)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **14** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **75%**.

Quantité du produit de départ engagé : 2,1 g ; 5,02 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 50 : 50).

**Huile incolore**

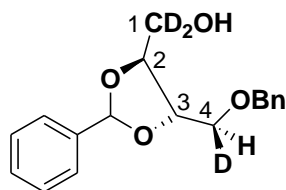
**R<sub>f</sub>** : 0.40 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 2.16 (1/2 de 1H, s, OH), 2.20 (1/2 de 1H, s, OH\*), 3.72 (1/2 de 1H, d, J<sub>4,3</sub>= 4.5 Hz, 4-H), 3.77 (1/2 de 1H, d, J<sub>4,3</sub>=5.2 Hz, 4-H\*), 4.09 (1/2 de 1H, d, J<sub>2,3</sub>= 7.2 Hz, 2-H), 4.19 (1/2 de 1H, d, J<sub>2,3</sub>= 6.9 Hz, 2-H\*), 4.22 (1/2 de 1H, dd, J<sub>3,2</sub>= 6.4 Hz, J<sub>3,4</sub>= 4.3 Hz, 3-H), 4.25 (1/2 de 1H, dd, J<sub>3,2</sub>= 6.7 Hz, J<sub>3,4</sub>= 4.5 Hz, 3-H\*), 4.60 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.62 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph\*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.31 - 7.53 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** signal large centré à 61.9 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-1), 69.72 (CDH, t, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 21 Hz), 73.64 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 77.23 (CH, C-2), 77.76 (CH, C-2\*), 79.76 (CH, C-3), 80.28 (CH, C-3\*), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.0 (CH, CH-Ph\*), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques)

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Na 326.151, trouvée 326.146.

**(2S, 3S, 4S)-(1,1,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-O-Benzylidène-4-O-benzyl-D-thréitol (22)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **21** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **85%**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,9 g ; 4,54 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, 50 : 50).

**Huile incolore**

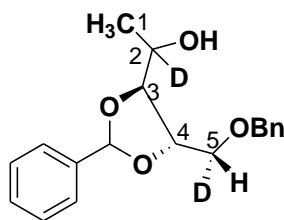
**Rf** : 0.40 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 2.12 (1/2 de 1H, s, OH), 2.16 (1/2 de 1H, s, OH\*), 3.63 (1/2 de 1H, d, J<sub>4-3</sub>= 5.7 Hz, 4-H), 3.67 (1/2 de 1H, d, J<sub>4-3</sub>= 5.1 Hz, 4-H\*), 4.10 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub>= 7 Hz, 2-H), 4.19 (1/2 de 1H, d, J<sub>2-3</sub>= 6.9 Hz, 2-H\*), 4.22 (1/2 de 1H, dd, J<sub>3-2</sub>= 6.4 Hz, J<sub>3-4</sub>= 4.3 Hz, 3-H), 4.25 (1/2 de 1H, dd, J<sub>3-2</sub>= 6.7 Hz, J<sub>3-4</sub>= 4.5 Hz, 3-H\*), 4.60 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.62 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph\*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.31 à 7.53 (10H, m, Ph).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** signal large centré à 62.3 (2 × CD<sub>2</sub>, m, C-1), 69.87, 70.16, 70.45 (CDH, triplet), 74.08 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 77.67 (CH, C-2), 78.20 (CH, C-2\*), 80.21 (CH, C-3), 80.74 (CH, C-3\*), 104.3 (CH, CH-Ph), 104.4 (CH, CH-Ph\*), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Na 326.151, trouvée 326.145.

**(3*R*, 4*S*, 5*R*)-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-ol (16)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 7:4:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **15** en utilisant la méthode **3B** avec un rendement de **80 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,7 g ; 5,01 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (cyclohexane : acétate d'éthyle, 70 : 30).

**Huile incolore**

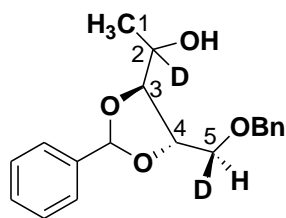
**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: 1.25 (9/14 de 3H, s, 1-H), 1.28 (5/14 de 3H, s, 1-H<sup>\*</sup>), 2.30 (7/14 de 1H, s, OH), 2.46 (1/14 de 1H, s, OH<sup>\*</sup>), 2.50 (4/14 de 1H, s, OH<sup>§</sup>), 3.69 (7/14 de 1H, d, J<sub>5-4</sub>= 5.0 Hz, 5-H), 3.70 (5/14 de 1H, d, J<sub>5-4</sub>= 4.7 Hz, 5-H<sup>\*</sup>), 3.95 (7/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>= 6.3 Hz, 3-H), 3.99 (4/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>= 6.1 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.27 (7/14 de 1H, dd, J<sub>4-5</sub>= 5.0 Hz, 4-H), 4.30 (4/14 de 1H, d, J<sub>4-3</sub>= 6.3 Hz, 4-H<sup>\*</sup>), 4.34 (2/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>= 6.4 Hz, 4-H<sup>§</sup>), 4.62 (2/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.63 (7/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 4.64 (4/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>§</sup>), 4.65 (1/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>#</sup>), 5.96 (7/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (4/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 6.00 (1/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>§</sup>), 7.32-7.53 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 18.7 (CH<sub>3</sub>, C-1), 19.1 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>\*</sup>), 19.4 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>§</sup>), 67.3 (CD, m, C-2), 70.1 (CDH, m, C-5), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 73.60 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 73.65 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph<sup>§</sup>), 76.6 (CH, C-4), 78.5 (CH, C-4<sup>\*</sup>), 78.6 (CH, C-4<sup>§</sup>), 82.8 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 83.2 (CH, C-3<sup>§</sup>), 103.6 (CH, CH-Ph), 103.93 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 103.97 (CH, CH-Ph<sup>§</sup>), 126.5, 126.6, 126.7, 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 129.3, 129.4, 137.1, 137.2, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques) .

**SM (ESI)(M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>D<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na 339.143, trouvée 339.154.

**(3*R*, 4*S*, 5*S*)-(2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-ol (23)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 7:4:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **22** en utilisant la méthode **3A** suivie après la formation de l'aldéhyde par la méthode **4C** avec un rendement de **72 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,4 g ; 4,13 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (cyclohexane : acétate d'éthyle, 70 : 30).

**Huile incolore**

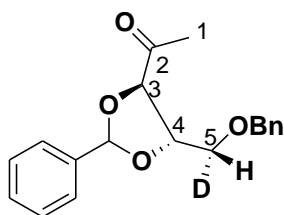
**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: 1.24 (4/14 de 3H, s, 1-H), 1.27 (9/14 de 3H, s, 1-H<sup>\*</sup>), 2.27 (4/14 de 1H, s, OH), 2.30 (1/14 de 1H, s, OH<sup>\*</sup>), 2.44 (2/14 de 1H, s, OH<sup>§</sup>), 2.48 (7/14 de 1H, s, OH<sup>#</sup>), 3.66 (7/14 de 1H, d, J<sub>5-4</sub>= 5.0 Hz, 5-H), 3.70 (5/14 de 1H, d, J<sub>5-4</sub>=4.7 Hz, 5-H<sup>\*</sup>), 3.77 (7/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6.5 Hz, 3-H), 3.87 (4/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6.5 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 3.94 (4/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6.5 Hz, 3-H<sup>§</sup>), 3.98 (4/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>=6.1 Hz, 3-H<sup>#</sup>), 4.26 (2/14 de 1H, dd, J<sub>4-5</sub>= 5.0 Hz, J<sub>4-3</sub>= 6.1 Hz, 4-H), 4.30 (7/14 de 1H, d, J<sub>4-5</sub>= 5.5 Hz, 4-H<sup>\*</sup>), 4.34 (4/14 de 1H, d, J<sub>3-4</sub>= 5.7 Hz, 4-H<sup>§</sup>), 4.61 (2/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.62 (7/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 4.63 (4/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>§</sup>), 4.64 (1/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>#</sup>), 5.95 (7/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.98 (4/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.32-7.53 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 18.7 (CH<sub>3</sub>, C-1), 19.2 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>\*</sup>), 19.4 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>§</sup>), 68.0 (CD, m, C-2), 70.1 (CDH, m, C-5), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 73.70 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 76.2 (CH, C-4), 77.6 (CH, C-4<sup>\*</sup>), 78.6 (CH, C-4<sup>§</sup>), 82.9 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 83.21 (CH, C-3<sup>§</sup>), 83.29 (CH, C-3<sup>#</sup>), 103.6 (CH, CH-Ph), 103.82 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 104.01 (CH, CH-Ph<sup>§</sup>), 126.5, 126.6, 126.7, 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 129.3, 129.4, 137.1, 137.2, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>D<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na 339.143, trouvée 339.16.

**(3R, 4S, 5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-O-benzylidène-5-(benzyloxy)-pentan-2-one (17)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **16** en utilisant la méthode **3C** avec un rendement de **85 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,3 g ; 4,08 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 60 : 40 à 50 : 50).

**Huile incolore**

**R<sub>f</sub>** = 0.43 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 30/70).

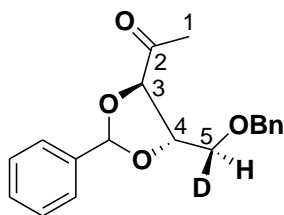
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.29 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.34 (1/2 de 3H, s, 1-H\*), 3.71 (1H, d, J<sub>5-4</sub> = 4.5 Hz, 5-H), 3.75 (1H, d, J<sub>5-4</sub> = 5.2 Hz, 5-H\*), 4.37 (1H, m, 4-H), 4.43 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub> = 6.4 Hz, 3-H), 4.50 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub> = 6.1 Hz, 3-H\*), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph\*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.09 (1/2 de 1H, s, CH-Ph\*), 7.29-7.54 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 26.5 (CH<sub>3</sub>, C-1), 26.7 (CH<sub>3</sub>, C-1\*), 69.9 (signal centré de CDH, m, C-5), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 73.6 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph\*), 78.2 (CH, C-4), 78.3 (CH, C-4\*), 82.0 (CH, C-3), 82.3 (CH, C-3\*), 105.1 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), 207.8 (C quaternaire, C-2), 208.3 (C quaternaire, C-2\*).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>DO<sub>4</sub> Na 336.141, trouvée 336.131



**(3*R*, 4*S*, 5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-*O*-benzylidène-5-(benzyloxy)-pentan-2-one (24)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **23** en utilisant la méthode **3C** avec un rendement de **86 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,1 g ; 3,45 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 60 : 40 à 50 : 50).

**Huile incolore**

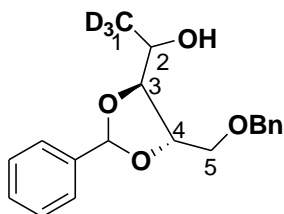
**R<sub>f</sub>** = 0.43 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 30/70).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.29 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.34 (1/2 de 3H, s, 1-H<sup>\*</sup>), 3.79 (1H, d, J<sub>5-4</sub> = 4.1 Hz, 5-H), 3.82 (1H, d, J<sub>5-4</sub> = 3.1 Hz, 5-H<sup>\*</sup>), 4.37 (1H, m, 4-H), 4.43 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub> = 6.5 Hz, 3-H), 4.50 (1/2 de 1H, d, J<sub>3-4</sub> = 6.1 Hz, 3-H<sup>\*</sup>), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.09 (1/2 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.29-7.54 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 26.5 (CH<sub>3</sub>, C-1), 26.7 (CH<sub>3</sub>, C-1<sup>\*</sup>), 69.9 (signal centré de CDH, m, C-5), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 78.1 (CH, C-4), 78.3 (CH, C-4<sup>\*</sup>), 82.0 (CH, C-3), 82.3 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 105.1 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), 207.8 (C quaternaire, C-2), 208.3 (C quaternaire, C-2<sup>\*</sup>).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>DO<sub>4</sub> Na 336.141 , trouvée 336.132.

**(3*R*, 4*S*)-(1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-ol (28)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 7:4:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **5** en utilisant la méthode **3A** suivie après la formation de l'aldéhyde par la méthode **4C** avec un rendement de **70 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 2 g ; 7,05 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (cyclohexane : acétate d'éthyle, 70 : 30).

**Huile incolore**

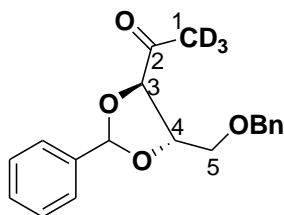
**R<sub>f</sub>** : 0.45 (acétate d'éthyle/éther de pétrole, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: 3.66 - 4.35 (5H, m, 2-H, 3-H, 4-H, 2x 5-H), 4.61 (1/14 de 2H,s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.62 (2/14 de 2H,s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 4.63 (7/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>§</sup>), 4.64 (4/14 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>#</sup>), 5.96 (4/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.98 (7/14 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.32-7.53 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : C-1 (non visible), 62.6 (CH, C-2), 67.3(CH, C-2<sup>\*</sup>), 70.1(CH<sub>2</sub>, C-5), 70.72 (CH<sub>2</sub>, C-5<sup>\*</sup>), 73.68 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph.), 76.76 (CH, C-4), 77.22 (CH, C-4<sup>\*</sup>), 80.39 (CH, C-3), 83.31 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 103.6 (CH,CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph<sup>\*</sup>), 126.5, 126.6, 126.7, 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 129.3, 129.4, 137.1, 137.2, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** calculé pour C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na 340.17, trouvé 340.16

**(3*R*, 4*S*)-(1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-*O*-benzylidène-5-(benzyloxy)-pentan-2-one (29)**



Ce composé est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **28** en utilisant la méthode **3C** avec un rendement de **67 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,6 g ; 5,04 mmole.

Eluant de la chromatographie-éclair : (éther de pétrole : acétate d'éthyle, gradient 60 : 40 à 50 : 50).

**Huile incolore**

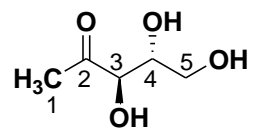
**R<sub>f</sub>** = 0.43 (acétate d'éthyle /éther de pétrole, 30/70).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 3.70 (1H, d, J<sub>5-4</sub>= 4.4 Hz, 5-H<sub>1</sub>), 3.74 (1H, d, J<sub>5-4</sub>= 4.4 Hz, 5-H<sub>2</sub>), 3.82 (1H, d, J<sub>5-4</sub>= 3.1 Hz, 5-H<sub>2</sub><sup>\*</sup>), 3.86 (1H, d, J<sub>5-4</sub>= 3.1 Hz, 5-H<sub>1</sub><sup>\*</sup>), 4.39 (1H, m, 4-H), 4.50 (1H, d, J<sub>3-4</sub>= 6.1 Hz, 3-H), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph<sup>\*</sup>), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.09 (1/2 de 1H, s, CH-Ph<sup>\*</sup>), 7.29-7.54 (10H, m, Ph).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 26.0 (CD<sub>3</sub>, signal centré de C-1), 70.0 (CH<sub>2</sub>, C-5), 70.4 (CH<sub>2</sub>, C-5<sup>\*</sup>), 73.5 (CH<sub>2</sub>, 2xCH<sub>2</sub>-Ph), 77.22 (CH, C-4), 78.21 (CH, C-4<sup>\*</sup>), 82.07 (CH, C-3), 82.30 (CH, C-3<sup>\*</sup>), 105.07 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), 207.9 (C quaternaire, C-2), 208.4 (C quaternaire, C-2<sup>\*</sup>).

**SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na 338.15, trouvée 338.14.

## 1-Désoxy-D-xylulose (8 et 9)



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  et de la forme ouverte à partir de **7** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement de **90 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 100 mg ; 0,35 mmole.

### Huile incolore

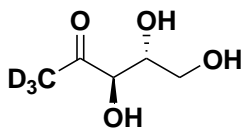
Rf = 0.19 (éther de pétrole / acetate d'éthyle, 50/50).

**RMN,  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 1.38 (s,  $\text{CH}_3$ , anomère furanose) 1.42 (s,  $\text{CH}_3$ , anomère furanose), 2.24 (s, 1-H, forme ouverte), 3.52 (m, anomère furanose, 5-H), 3.58 (dd,  $J_{5a-5b} = 11.0$  Hz,  $J_{4-5a} = 6.6$  Hz, 5-Ha, forme ouverte), 3.64 (m, anomère furanose, 5-H), 3.65 (dd,  $J_{5a-5b} = 11.0$  Hz,  $J_{4-5a} = 6.6$  Hz, 5-Hb, forme ouverte), 3.78 (m, anomère furanose, 4-H), 3.99 (ddd,  $J_{3-4} = 2.2$  Hz,  $J_{4-5a} = J_{4-5b} = 6.6$  Hz, 4-H, forme ouverte), 4.08 (m, anomère furanose, 3-H), 4.21 (d,  $J_{3-4} = 2.2$  Hz, 3-H, forme ouverte).

**RMN,  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :** 21.8 ( $\text{CH}_3$ , C-1), 25.1 ( $\text{CH}_3$ , C-1), 26.6 ( $\text{CH}_3$ , C-1), 63.7 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 71.4 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 73.3 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 73.5 (CH, C-4), 77.4 (CH, C-4), 78.4 (CH, C-4), 78.5 (CH, C-3), 82.7 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3), 103.8 (C quaternaire, C-2), 107.5 (C quaternaire, C-2), 212.4 (C quaternaire, C-2).

**SM (ESI)(M+Na) $^+$**  masse calculée pour  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4\text{Na}$  157.04, trouvée 157.04

**(1, 1, 1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-1-Désoxy-D-xylulose (30 et 31)**



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  et de la forme ouverte à partir de **29** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement de **90 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 1,2 g ; 3,80 mmole.

**Huile incolore**

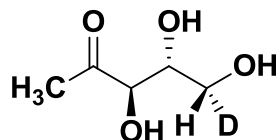
**R<sub>f</sub>** = 0.19 (éther de pétrole / acétate d'éthyle, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**: 3.52 (m, anomère furanose, 5-H), 3.58 (dd,  $J_{5a-5b} = 11.0$  Hz,  $J_{4-5a} = 6.4$  Hz, 5-Ha, forme ouverte), 3.64 (m, anomère furanose, 5-H), 3.65 (dd,  $J_{5a-5b} = 11.0$  Hz,  $J_{4-5a} = 6.4$  Hz, 5-Hb, forme ouverte), 3.78 (m, anomère furanose, 4-H), 3.99 (ddd,  $J_{3-4} = 2.2$  Hz,  $J_{4-5a} = J_{4-5b} = 6.4$  Hz, 4-H, forme ouverte), 4.08 (m, anomère furanose, 3-H), 4.21 (d,  $J_{3-4} = 2.2$  Hz, 3-H, forme ouverte).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** : C-1 (non visible), 63.7 (CH<sub>2</sub>, C-5), 71.4 (CH<sub>2</sub>, C-5), 73.3 (CH<sub>2</sub>, C-5), 73.5 (CH, C-4), 77.4 (CH, C-4), 78.4 (CH, C-4), 78.5 (CH, C-3), 82.7 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3), 103.8 (C quaternaire, C-2), 107.5 (C quaternaire, C-2), 212.4 (C quaternaire, C-2).

**SM (ESI)(M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>D<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na 160.07, trouvée 160.07.

**(5R-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-Désoxy-D-xylulose (18 et 19)**



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  et de la forme ouverte à partir de **17** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement de **90 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 900 mg ; 2,87 mmole.

**Huile incolore**

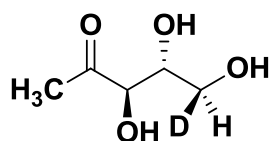
**R<sub>f</sub>** = 0.19 (éther de pétrole / acétate d'éthyle, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**: 1.38 (s, CH<sub>3</sub>, anomère furanose) 1.43 (s, CH<sub>3</sub>, anomère furanose), 2.24 (s, 1-H, forme ouverte), 3.56 (d, J<sub>5-4</sub> = 6.2 Hz, 5-H, forme ouverte), 3.64 (d, J<sub>4-5</sub> = 6.2 Hz, 5-H, anomère furanose), 3.81 (m, anomère furanose), 3.99 (ddd, J<sub>3-4</sub> = 2.0 Hz, J<sub>4-5</sub> = J<sub>4-5</sub> = 6.2 Hz, 4-H, forme ouverte), 4.08 (m, anomère furanose), 4.21 (d, J<sub>3-4</sub> = 2.1 Hz, 3-H, forme ouverte).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** : 22.0 (CH<sub>3</sub>, C-1), 25.2 (CH<sub>3</sub>, C-1), 26.7 (CH<sub>3</sub>, C-1), 63.6 (t, CDH, C-5, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 71.2 (t, CDH, C-5, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 73.1 (t, signalé centré de CDH, C-5, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 73.6 (CH, C-4), 77.5 (CH, C-4), 78.5 (CH, C-4), 78.7 (CH, C-3), 82.9 (CH, C-3), 83.2 (CH, C-3), 103.9 (C quaternaire, C-2), 107.7 (C quaternaire, C-2), 212.4 (C quaternaire, C-2).

**SM (ESI)(M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>DO<sub>4</sub>Na 158.05, trouvée 158.06.

**(5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-Désoxy-D-xylulose (25 et 26)**



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  et de la forme ouverte à partir de **24** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement de **92 %**.

Quantité du produit de départ engagé : 750 mg ; 2,39 mmole.

**Huile incolore**

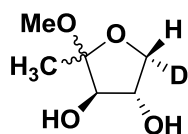
R<sub>f</sub> = 0.19 (éther de pétrole / acétate d'éthyle, 50/50).

**RMN, <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**: 1.37 (s, CH<sub>3</sub>, anomère furanose) 1.42(s, CH<sub>3</sub>, anomère furanose), 2.23(s, 1-H, forme ouverte), 3.56 (d, J<sub>5-4</sub>= 2.9 Hz, 5-H, forme ouverte), 3.64 (d, J<sub>4-5</sub> = 2.7 Hz, 5-H, anomère furanose), 3.79 (m, anomère furanose), 3.99 (ddd, J<sub>3-4</sub> = 2.0 Hz, J<sub>4-5</sub>= J<sub>4-5</sub> = 6.6 Hz, 4-H, forme ouverte), 4.08 (m, anomère furanose), 4.21 (d, J<sub>3-4</sub> = 2.2 Hz, 3-H, forme ouverte).

**RMN, <sup>13</sup>C (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** : 22.0 (CH<sub>3</sub>, C-1), 25.2 (CH<sub>3</sub>, C-1), 26.7 (CH<sub>3</sub>, C-1), 63.6 (t, CDH, C-5, <sup>1</sup>J<sub>C-D</sub> = 19 Hz), 71.2 (m, CDH, C-5), 73.1 (m, CDH, C-5), 73.7 (CH, C-4), 77.5 (CH, C-4), 78.5 (CH, C-4), 78.7 (CH, C-3), 82.9 (CH, C-3), 83.2 (CH, C-3), 103.9 (C quaternaire, C-2), 107.7 (C quaternaire, C-2), 212.5 (C quaternaire, C-2).

**SM (ESI)(M+Na)<sup>+</sup>** masse calculée pour C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>DO<sub>4</sub>Na 158.05, trouvée 158.06.

## (5*R*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\alpha,\beta$ -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  à partir de **17** en utilisant la méthode **2B** avec utilisation du **méthanol** comme solvant à la place du mélange isopropanol : eau.

Quantité du produit de départ engagé : 100 mg ; 0,31 mmole

**Huile incolore**

R<sub>f</sub> = 0.21 (éther de pétrole / acétate d'éthyle, 50/50).

**RMN du (5*R*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\alpha$  -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside , <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :**  
1.32 (s, CH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OMe), 3.78 (d, J<sub>3-4</sub> = 2.2Hz, 3-H), 4.06(dd, J<sub>4-5</sub> = 7Hz, J<sub>4-3</sub> = 2.2Hz, 4-H) ; 4.09 (d, J<sub>5-4</sub> = 6,7 Hz, 5-H).

**RMN du (5*R*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\beta$  -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside , <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :**  
1.37 (s, CH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OMe), 3.65 (d, J<sub>3-4</sub> = 6 Hz, 3-H), 3.96 (d, J<sub>5-4</sub> = 7.3 Hz , 5-H), 4.23(dd, J<sub>4-5</sub> = 7Hz, J<sub>4-3</sub> = 6 Hz, 4-H).

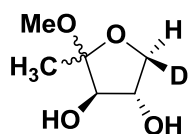
**RMN du (5*R*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\alpha$  -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :**  
17.0 (CH<sub>3</sub>, C-1), 48.4 (OMe), ,72.6 (t, CDH, C-5), 78.2 (CH, C-4,  $\beta$  shift = -112 ppb), 84.0 (CH, C-3), 110.5 (C quaternaire, C-2).

**RMN du (5*R*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\beta$  -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :**  
19.2 (CH<sub>3</sub>, C-1), 50.0 (OMe), 71.4 (t, CDH, C-5), 77.3 (CH, C-4,  $\beta$  shift = -104 ppb), 85.2 (CH, C-3), 106.0 (C quaternaire, C-2).

**Spectre de masse en ionisation chimique par l'isobutane : m/z= 150 (M+H)<sup>+</sup> ; 132 (M+H-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup> ; 118 (M+H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>OH)<sup>+</sup>**



## (5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- α,β-Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside



Ce composé est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  à partir de **24** en utilisant la méthode **2B** avec utilisation du **méthanol** comme solvant à la place du mélange isopropanol : eau.

Quantité du produit de départ engagé : 100 ; 0,31 mmole.

### Huile incolore

R<sub>f</sub> = 0.21 (éther de pétrole / acétate d'éthyle, 50/50).

### RMN du (5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\alpha$ -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :

1.32 (s, CH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OMe), 3.51(d, J<sub>5-4</sub>= 5,3 Hz, 5-H), 3.78 (d, J<sub>3-4</sub>= 2.3 Hz, 3-H), 4.05 (m, de 4-H) .

### RMN du (5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\beta$ -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :

1.37 (s, CH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OMe), 3.52 (d, J<sub>5-4</sub>= 4,4 Hz, 5-H) ; 3.65 (d, J<sub>3-4</sub>= 6 Hz, 3-H), 4.23 (dd, J<sub>5-4</sub>= 4,4 Hz, J<sub>4-3</sub>= 6 Hz, 4-H).

### RMN du (5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\alpha$ -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :

16.8 (CH<sub>3</sub>, C-1), 48.3 (OMe), 72.4 (t, CDH, C-5), 78.2 (CH, C-4,  $\beta$  shift = -111 ppb), 83.9 (CH, C-3), 110.3 (C quaternaire, C-2).

### RMN du (5S-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- $\beta$ -Méthyldésoxy-D-xylulofuranoside, <sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :

19.0 (CH<sub>3</sub>, C-1), 48.7 (OMe), 71.3 (t, CDH, C-5), 77.3 (CH, C-4,  $\beta$  shift = -102 ppb), 85.1 (CH, C-3), 105.8 (C quaternaire, C-2).

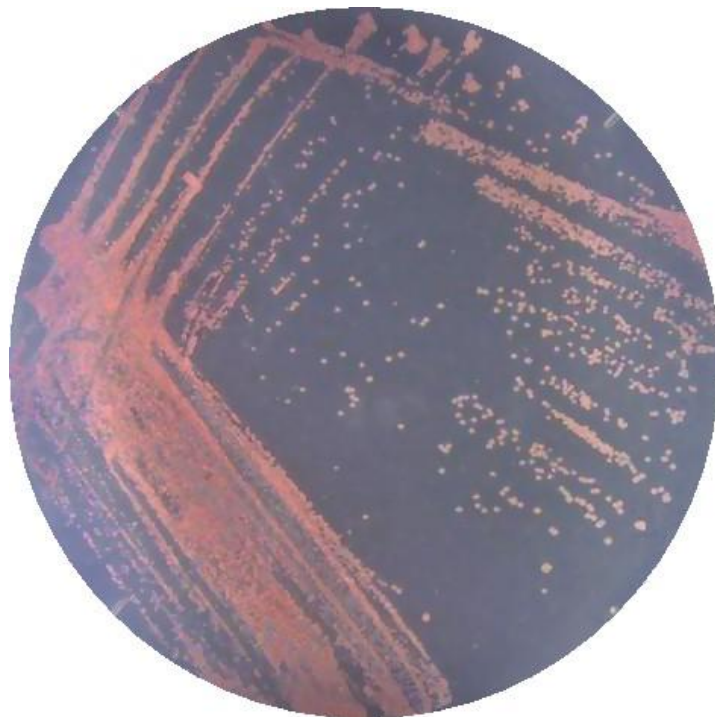
SM (ESI) (M+Na)<sup>+</sup> masse calculée pour C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>DO<sub>4</sub>Na 172.081, trouvée 172.069.

# Chapitre III

**Incorporation du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et de (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-désoxy-D-xylulose dans des 2β-méthylhopanoïdes : stéréochimie de la méthylation en C-2**

## I. *Methylobacterium*

Les bactéries du genre *Methylobacterium* possèdent la capacité d'utiliser des composés en C<sub>1</sub> tels que le formiate, le formaldéhyde, la méthylamine et le méthanol comme seules sources de carbone et d'énergie (Lidstrom, 2001). Ce sont des chimio-organotrophes et méthylotrophes facultatifs. Ils sont donc aussi capables d'utiliser des composés multi-carbonés pour leur croissance (Altschul *et al.*, 1997; Chistoserdova *et al.*, 2007). La figure 1 présente une boîte de Petri où des colonies de *Methylobacterium organophilum* ont été cultivées.



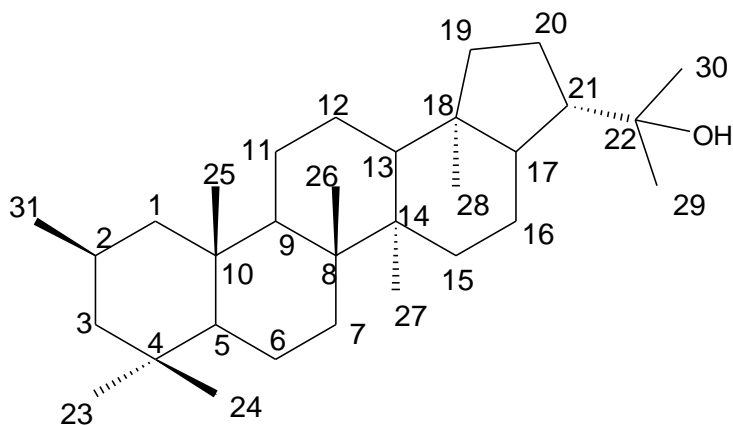
**Figure 1.** *Methylobacterium organophilum* cultivé sur le milieu de Hestrin et Schramm sur une boîte de Petri.

Les cellules sont souvent ramifiées ou pléomorphiques, spécialement chez les cultures en phase stationnaire tardive. Ce sont des bactéries aérobies strictes, à Gram-négatif, oxydase et catalase positives. Elles possèdent une pigmentation rose typique due à la présence de caroténoïdes (Van Dien *et al.*, 2003). Les souches de *Methylobacterium* sont communément appelées "pink-pigmented facultative methylotrophs" (PPFM). Cependant, au moins une espèce, *M. nodulans*, n'est pas

pigmentée (Jourand *et al.*, 2004). Elles sont mésophiles et leur optimum de température est compris entre 25 et 30°C. Les espèces de *Methylobacterium* sont ubiquistes et peuvent être retrouvées dans une grande variété d'habitats naturels comme le sol, les eaux douces, les sédiments des lacs, la surface des feuilles et les nodules de plantes ou dans l'environnement hospitalier (Omer *et al.*, 2004). Les PPFMs possèdent des rôles écologiques importants, car ils peuvent métaboliser plusieurs produits libérés par les plantes (Sy *et al.*, 2005).

## II. 2β-Méthyldiploptérol

La fraction diploptérol représente une part importante des hopanoïdes de *M. organophilum*. Nous savons qu'elle contient en fait deux produits : le diploptérol et le 2β-méthyldiploptérol. Le 2β-méthyldiploptérol (Figure 2) est le chef de file d'une série de hopanoïdes identifiée au laboratoire par Magali ZUNDEL. Elle a synthétisé les 2α-, 2β-, 3α-, 3β-, 6α- et 6β-méthyldiploptérols. Par une comparaison directe (points de fusion, spectres de masse, spectres de RMN du proton et du carbone <sup>13</sup>C et temps de rétention en CPG des éthers de triméthylsilyles) des produits de synthèse et du produit naturel, elle a pu affirmer que c'est bien le 2β-méthyldiploptérol qui est synthétisé par *M. organophilum* (Zundel, 1984 ; Bisseret *et al.*, 1985).



**Figure 2.** Le 2β-méthyldiploptérol.

*M. organophilum* produit essentiellement du 2β-méthyldiploptérol quand il est cultivé sur un milieu complexe, alors que cette bactérie produit un mélange de diploptérol et

de 2 $\beta$ -méthyldiploptérol quand elle est cultivée sur un milieu minéral additionné de méthanol. Cette variabilité est inexplicée. Elle est toutefois moins surprenante que celle observée chez la cyanobactérie *Nostoc muscorum* cultivée en conditions photoautotrophes où la proportion de dérivés méthylés en C-2 peut varier de 0 à 100% suivant les cultures, et ce, sur un même milieu (Renoux, 1984 ; Bisseret *et al.*, 1985). Notons également qu'habituellement, lorsqu'une souche produit des hopanoïdes méthylés (2 $\beta$ -méthyl chez *N. muscorum*, 3 $\beta$ -méthyl chez les *Acetobacter*), ce sont essentiellement les bactériohopanepolyols en C-35 qui sont méthylés. Or dans le cas de *M. organophilum*, seul le diploptérol est méthylé, le 2 $\beta$ -méthylbactériohopanetétrol n'étant présent qu'à l'état de traces (Bisseret *et al.*, 1985 ; Renoux *et al.*, 1985). De tels produits sont en effet facilement identifiés par CPG ou CPG-SM des acétates d'alcools obtenus après une coupure à l'acide periodique de la chaîne latérale des bactériohopanepolyols suivies d'une réduction par le borohydrure de sodium (Rohmer *et al.*, 1984).

## II.1 Synthèse du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (Bisseret *et al.*, 1985)

Le  $\Delta^2$ -diploptérol a été préparé en traitant la tosylhydrazone de la 22-hydroxyhopan-3-one par le *n*-butyllithium avec un rendement de 58%. Ce  $\Delta^2$ -diploptérol obtenu est ensuite soumis à une hydroboration, suivie d'une oxydation par CrO<sub>3</sub> pour donner les deux cétones en C-3 (**3**) et en C-2 (**4**). L'hydrogénation en phase homogène du 2-méthylènediploptérol **5**, obtenu par réaction de Wittig sur la cétone **4**, en utilisant le catalyseur de Wilkinson, le chlorure de *tris*-(triphénylphosphine) rhodium (Osborn *et al.*, 1966), conduit à un produit unique d'après la CPG de l'éther triméthylsilyle qui a été identifié au 2 $\beta$ -méthyldiploptérol **6**, ce qui correspond à l'hydrogénation par la face la moins encombrée du triterpène (Schéma 1 A). Il faut noter aussi qu'une synthèse du 2 $\alpha$ -méthyldiploptérol a été effectuée (Schéma 1 B). Ces deux synthèses ont été réalisées pour identifier lequel de ces deux isomères est le méthyldiploptérol isolé du *Methylobacterium organophilum*.

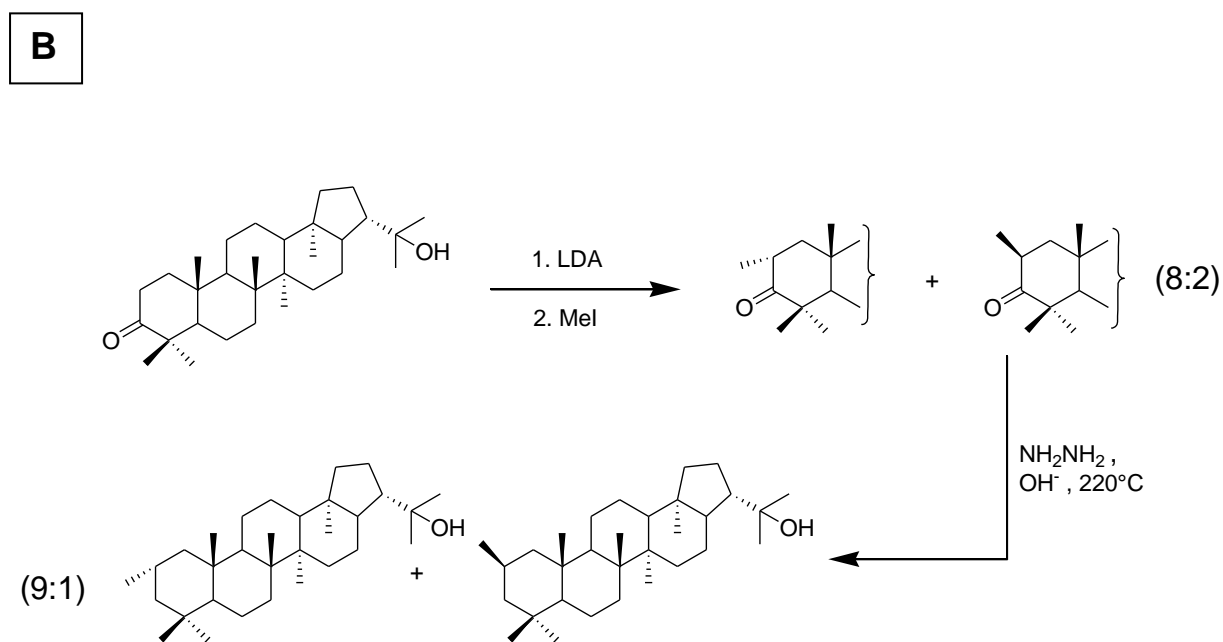
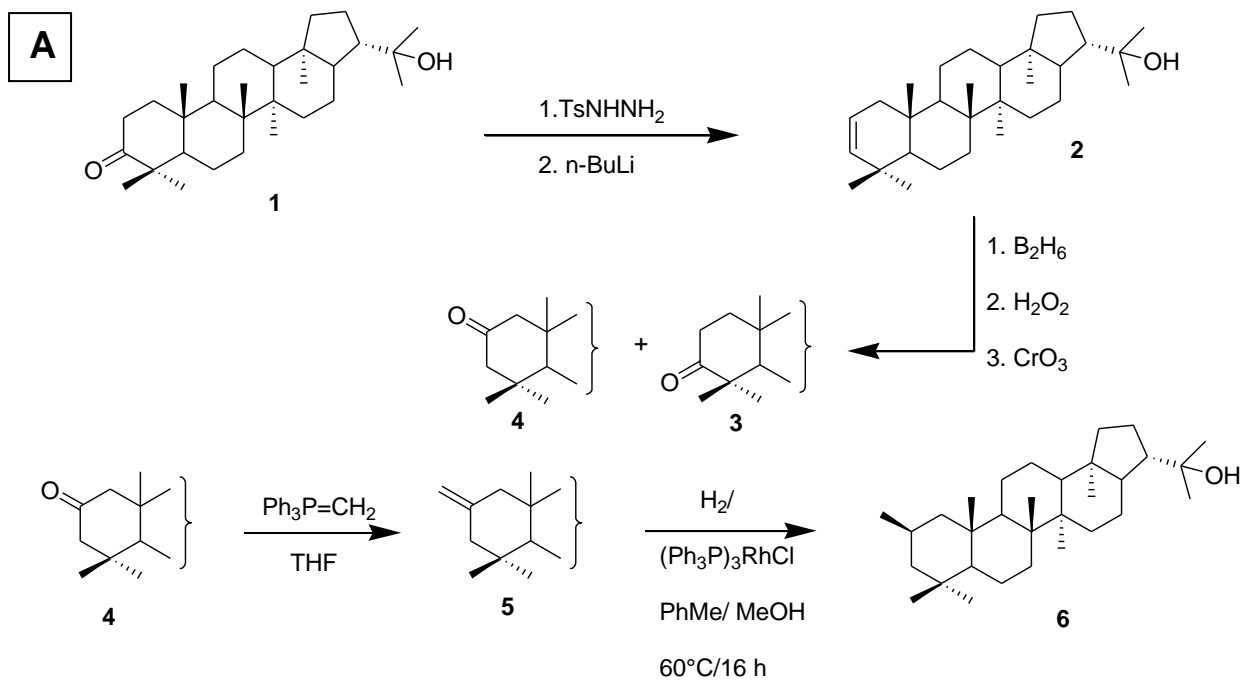


Schéma 1. Synthèse du 2 $\alpha$ - et du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (Bisseret *et al.*, 1985).

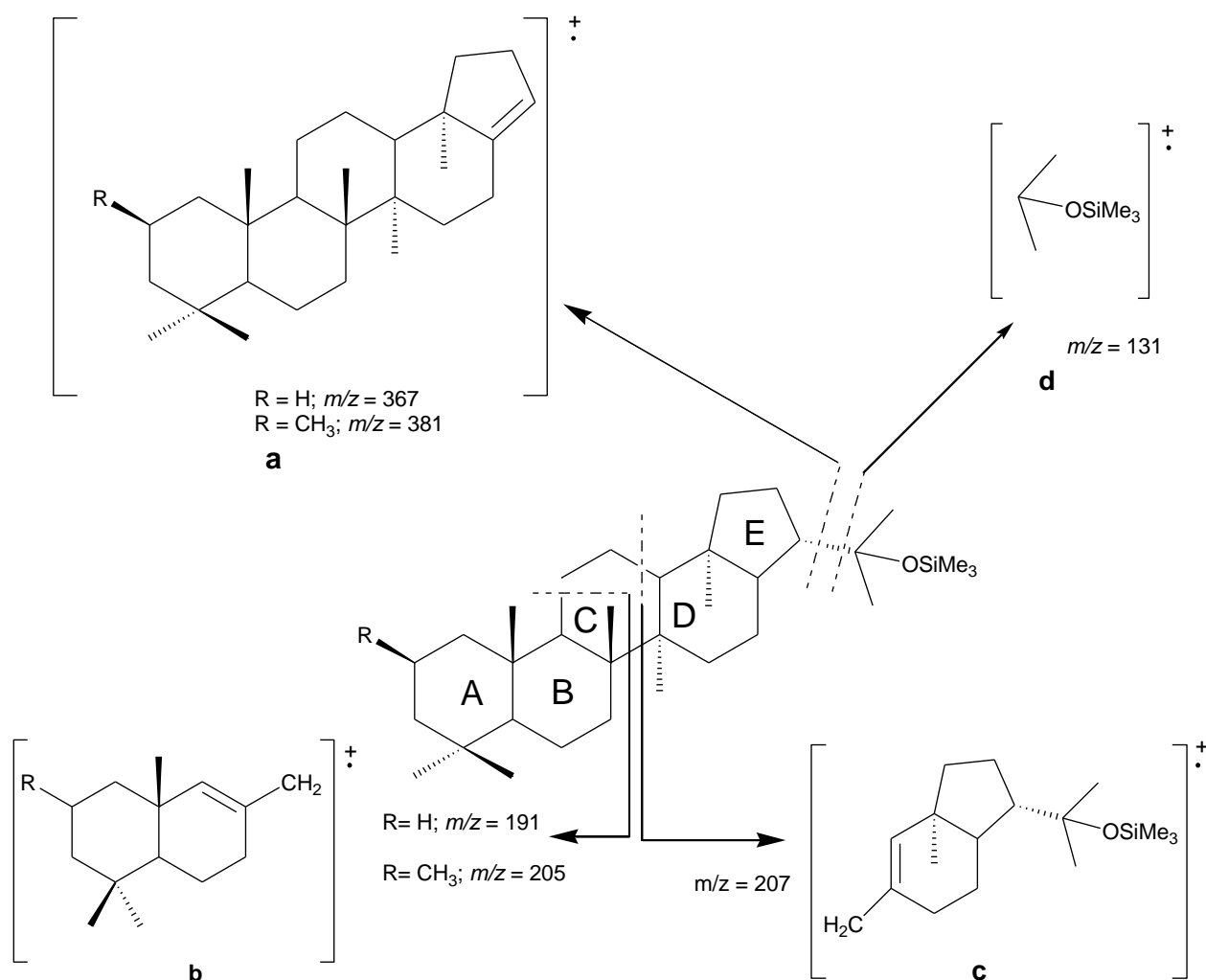
**Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  du diploptérol et du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol ( $\text{CDCl}_3$ , 62,9 MHz) (Stampf, 1992).**

	Diploptérol	2 $\beta$ - Méthyldiploptérol		Diploptérol	2 $\beta$ - Méthyldiploptérol
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)		$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
<b>C1</b>	40,4	45,2	<b>C17</b>	54,0	54,0
<b>C2</b>	18,8	24,8	<b>C18</b>	44,2	44,1
<b>C3</b>	42,2	49,7	<b>C19</b>	41,3	41,3
<b>C4</b>	33,3	32,4	<b>C20</b>	26,6	26,5
<b>C5</b>	56,2	50,9	<b>C21</b>	51,2	51,1
<b>C6</b>	18,8	19,9	<b>C22</b>	73,9	73,9
<b>C7</b>	33,3	32,5	<b>C23</b>	33,4	31,0
<b>C8</b>	41,9	42,0	<b>C24</b>	21,6	26,1
<b>C9</b>	50,4	49,6	<b>C25</b>	15,9*	21,7
<b>C10</b>	37,5	37,8	<b>C26</b>	16,8*	16,3*
<b>C11</b>	21,0	21,9	<b>C27</b>	17,1*	16,9*
<b>C12</b>	24,2	24,4	<b>C28</b>	16,2*	16,3*
<b>C13</b>	50,0	50,3	<b>C29</b>	28,9	28,7
<b>C14</b>	41,9	41,9	<b>C30</b>	30,9	30,8
<b>C15</b>	34,5	34,4	<b>C31 (2<math>\beta</math>-Me)</b>		23,2
<b>C16</b>	22,0	22,0			

\* attributions de signaux pouvant être  
interchangées dans la même colonne.

## **II.2 Comportement du diploptérol et du 2 $\beta$ -méthyl-diploptérol silylés en spectrométrie de masse à ionisation par impact électronique**

Le diploptérol et le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol silylés présentent une fragmentation caractéristique en spectrométrie de masse : le fragment **a** correspond à la rupture de la molécule au niveau de la chaîne latérale et les fragments **b** et **c** à la rupture au niveau du cycle C (Figure 3) (Budzikiewicz *et al.*, 1963). En effet, le fragment caractéristique correspondant à la rupture du cycle C se retrouve à  $m/z$  205 chez le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol alors qu'il est à  $m/z$  191 chez le diploptérol.



**Figure 3.** Fragmentation caractéristique en spectrométrie de masse à ionisation par impact électronique des éthers de triméthylsilyle du diploptérol et du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol.

### III. Stéréochimie de la réaction de méthylation en C-2 du cycle A du hopane

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de la stéréochimie de la méthylation au niveau du carbone C-2 du cycle A du squelette hopane. Cette stéréochimie sera déterminée en incubant les deux isotopomères 5-R et 5-S du 1-désoxy-D-xylulose (DX) stéréospécifiquement marqués au deutérium en position C-5 déjà synthétisés, qui est le substrat de la voie du MEP. L'analyse de la stéréochimie de la



méthylation au niveau du carbone C-2 se fera en cherchant la rétention ou la perte du deutérium provenant du DX marqué au deutérium en C-5. Cette analyse de la rétention ou de la perte du deutérium sera faite par RMN du  $^{13}\text{C}$  en recherchant la présence ou l'absence du shift induit par la présence d'un deutérium sur les signaux en RMN du  $^{13}\text{C}$ . Le signal choisi est celui du méthyle en C-2 $\beta$  (C-31, Figure 2).

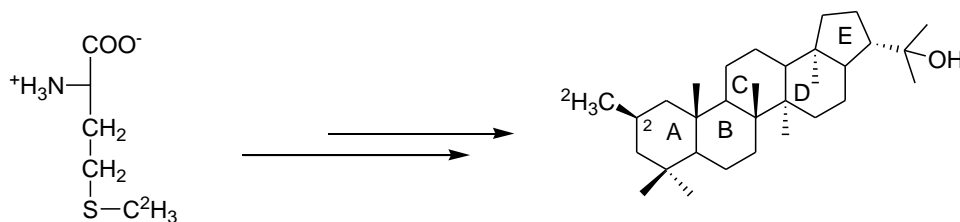
En effet, pour augmenter la sensibilité de la méthode, il est préférable de ne pas travailler en abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$ , mais sur un système enrichi. Il est *a priori* facile de marquer au  $^{13}\text{C}$  ce méthyle C-31 à partir de la méthionine en incubant de la ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine en même temps que le DX deutérié (Zundel *et al.*, 1985b).

Nous avons choisi au départ la bactérie *Methylobacterium organophilum* : elle produit en abondance un hopanoïde méthylé en C-2 du cycle A, le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (Bisseret *et al.*, 1985 ; Zundel *et al.*, 1985b) ; sa composition en hopanoïdes est bien connue et peut dans une certaine mesure être modulée vers la synthèse de 2 $\beta$ -méthyldiploptérol.

### **III.1 Incorporation de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine dans des cellules de *Methylobacterium organophilum***

Nous avons débuté notre travail en incubant de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine avec *Methylobacterium organophilum* cultivé sur milieu minéral AMS (Whitttenbury *et al.*, 1970). La ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine a été testée à deux concentrations (0,1 mM ou 1 mM) pour optimiser l'incorporation du groupement méthyle deutérié en C-2 du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol avant de passer à l'utilisation de la ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine dont le prix est élevé (Figure 4).

*Methylobacterium organophilum* DSM 760 a été cultivé sur un milieu AMS (Ammonium Mineral Salts) (Whitttenbury *et al.*, 1970) avec du méthanol ou de l'acétate comme seule source de carbone. Le méthanol ou l'acétate sont tous deux utilisés par les bactéries pour la biosynthèse *de novo* des hopanoïdes. Les voies métaboliques du méthanol ainsi que de l'acétate se trouvent en annexe. Après isolement des divers triterpènes, nous avons mesuré par spectrométrie de masse les résultats de cette incorporation.



**Figure 4.** Marquage du 2β-méthylcholestérol marqué en position C-2 du cycle A par la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine (Zundel *et al.*, 1985b).

Pour évaluer l'incorporation du deutérium dans le 2β-méthylcholestérol à partir de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine, nous avons mesuré sur le spectre de masse de l'éther de triméthylsilyle du 2β-méthylcholestérol les variations d'intensité des signaux de deux ions qui renferment le groupement méthyle et correspondant, l'un à l'isotopomère en abondance naturelle ( $m/z$ ) et l'autre à l'isotopomère trideutéié ( $m+3/z$ ) synthétisé à partir de la méthionine marquée. Les signaux de l'ion moléculaire et des fragments correspondant à la perte de la chaîne latérale (fragment **a**, Figure 3) sont d'intensités trop faibles pour donner une mesure fiable. Nous avons donc utilisé les signaux du fragment **b** (Figure 3) renferment les deux cycles A et B après rupture du cycle C. Pour cette comparaison, nous avons normé ces deux spectres de masse en prenant comme signal de base celui du fragment **b** de l'isotopomère d'abondance naturelle  $m/z = 205$  et déterminé l'abondance relative du signal  $m+3/z = 208$  par rapport au signal  $m/z = 205$ .

Une valeur approchée des taux d'incorporation du deutérium dans le 2β-méthylcholestérol est donnée par l'équation (E1).

$$P = \frac{(\text{Abondance relative} - \text{Abondance relative naturelle})}{100 + (\text{Abondance relative} - \text{Abondance relative naturelle})} \quad (\text{E1})$$

Pour le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol, on obtient deux isotopomères : l'un obtenu à partir de la méthionine deutériée et qui porte par conséquent trois deutériums, et l'autre obtenu à partir de la méthionine synthétisée *de novo* par la bactérie à partir de la source de carbone habituelle non marquée et qui est par conséquent d'abondance naturelle. Cet état de fait apparaît immédiatement sur les spectres de masse de tous les méthylophanoïdes où l'on observe la superposition du spectre de la molécule non marquée avec celui de la molécule trideutériée.

Dans les incubations que nous avons réalisées, le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol marqué comporte trois atomes de deutérium comme attendu (Zundel *et al.*, 1985b).

Le tableau 1 montre les différents taux d'incorporation obtenus de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol isolé du *M. organophilum* cultivé sur un milieu AMS dans deux différentes conditions de concentrations de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine (1 mM et 0,1 mM) et de source de carbone (MeOH 0,5% ou acétate 12 mM).

Dans l'expérience d'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 1 mM par *Methylobacterium organophilum* cultivé dans un milieu minéral AMS à 0,5 % de méthanol comme seule source de carbone, l'intensité du pic *m+3/z* du fragment **b** du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol isolé est de 116% après marquage tandis qu'il est de 2 % en abondance naturelle (Tableau 1). En appliquant l'équation (E1), on obtient le taux d'incorporation de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol  $p = 53\%$ .

Dans l'expérience d'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 0,1 mM par *Methylobacterium organophilum* cultivé dans un milieu minéral AMS à 0,5 % de méthanol comme seule source de carbone, l'intensité du pic *m+3/z* du fragment **b** du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol isolé est de 74% après marquage tandis qu'il est de 5 % en abondance naturelle (Tableau 1). En appliquant l'équation (E1) on obtient le taux d'incorporation de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol  $p = 41\%$ .

Dans l'expérience d'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 0,1 mM par *Methylobacterium organophilum* cultivé dans un milieu minéral AMS à 12 mM d'acétate comme seule source de carbone, l'intensité du pic *m+3/z* du fragment **b** du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol isolé est de 220% après marquage tandis qu'il est de 5 % en

abondance naturelle (Tableau 1). En appliquant l'équation (E1) on obtient le taux d'incorporation de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2β-méthyldiploptérol p = 68%.

Source de carbone	CH <sub>3</sub> OH 0,5%				Acétate 12 mM	
( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -méthyl)-méthionine	1 mM		0,1 mM		0,1 mM	
Fragment <b>b</b> (figure 18)	<i>m/z</i>	<i>m+3/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m+3/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m+3/z</i>
Intensité après marquage	100	116	100	74	100	220
Intensité en abondance naturelle	100	2	100	5	100	5
Taux d'incorporation de la ( <sup>2</sup> H <sub>3</sub> -méthyl)-méthionine	53%		41%		68%	

**Tableau 1.** Taux d'incorporation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2β-méthyldiploptérol de *M. organophilum* cultivé sur un milieu minéral avec deux sources de carbone différentes (méthanol ou acétate) et à des concentrations de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine différentes.

Nous avons pu constater que le taux d'incorporation dans l'expérience d'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 0.1 mM dans *Methylobacterium organophilum* cultivé sur milieu minéral AMS, à 0,5% de méthanol n'est que légèrement plus faible que celui dans l'expérience à 1 mM. Il est donc inutile d'ajouter un excès de méthionine, ce qui présente un grand avantage économique. Une concentration de 0,1 mM de méthionine deutériée est largement suffisante.

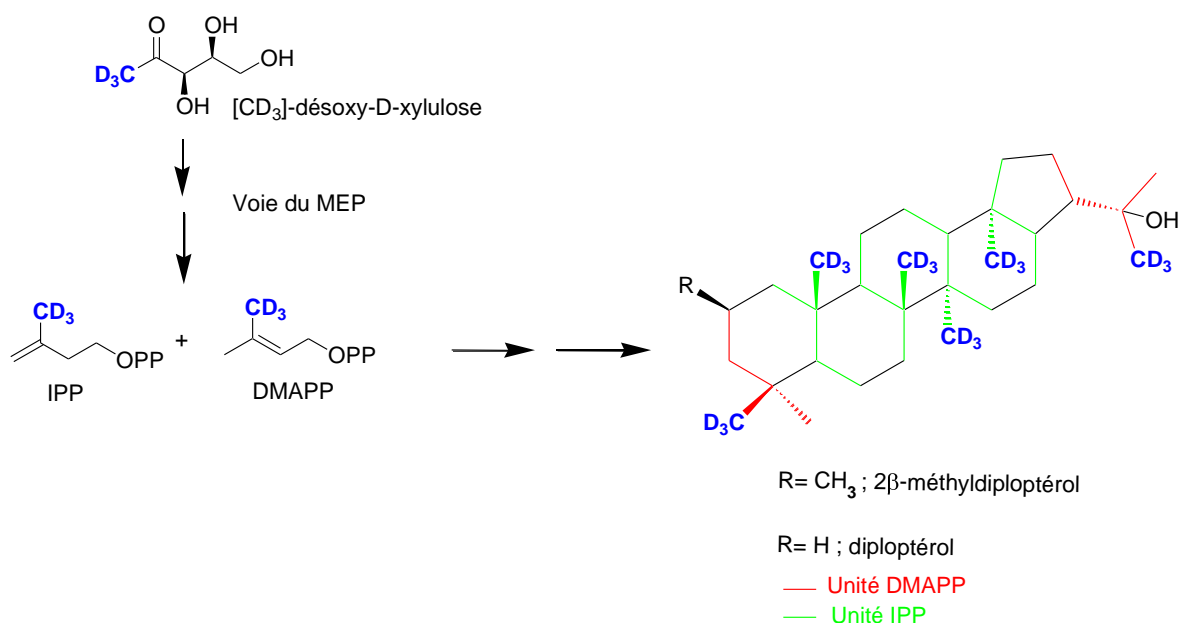
De plus, en comparant ces résultats, on peut conclure que le taux d'incorporation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans le 2β-méthyldiploptérol obtenu par l'expérience d'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 0.1 mM dans des *Methylobacterium organophilum* cultivées dans un milieu minéral AMS avec 0,5% méthanol est nettement plus faible que celui obtenu pour l'incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine à 0.1 mM dans un milieu minéral AMS avec 12 mM d'acétate.

## III.2 Tentative d'incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans *Methylobacterium* spp.

Après avoir vérifié que la méthionine marquée au deutérium sur le méthyle est efficacement incorporée avec ses trois atomes de deutérium dans le méthyle en C-2 du 2β-méthyldiplotérol, nous avons testé l'incorporation du DX dans les cellules de *Methylobacterium organophilum*. Pour économiser les précieux isotopomères du DX spécifiquement marqués au deutérium en C-5, nous avons effectué ces tests avec un isotopomère facilement accessible, le (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose, substrat de la voie du MEP après phosphorylation en 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, en vue d'optimiser les conditions d'incubation.

### III.2.1 Marquage attendu

Selon la voie du MEP, l'incorporation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose par *Methylobacterium organophilum* DSM 760 devrait aboutir au maximum au marquage de six groupements méthyles CD<sub>3</sub> du 2β-méthyldiplotérol, un par unité isoprénique (Figure 5).



**Figure 5.** Marquage attendu de six groupements de méthyles (CD<sub>3</sub>) sur le diploptérol et le 2β-méthyldiplotérol après incorporation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose.

Un premier test d'incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (1 mM) est effectué avec *Methylobacterium organophilum* DSM 760 cultivé sur un milieu minéral AMS avec 0,5% de méthanol comme source de carbone. Après une culture de huit jours à 30°C, le mélange diploptérol/2β-méthyldiploptérol a été isolé, silylé et analysé par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse.

Aucune incorporation du groupement CD<sub>3</sub> n'a été observée, ni dans le diploptérol, ni dans le 2β-méthyldiploptérol. Deux incubations similaires ont été effectuées en changeant les conditions : une première avec une concentration plus élevée de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (1,5 mM) et avec *Methylobacterium organophilum* DSM 760 cultivé sur un milieu minéral AMS avec 0,5% de méthanol comme source de carbone, et une deuxième avec du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (1,5 mM) en changeant la source de carbone et en utilisant l'acétate (12 mM) à la place du méthanol. Dans ces conditions également, aucune incorporation du groupement CD<sub>3</sub> au niveau du diploptérol et du 2β-méthyldiploptérol n'a été détectée.

### **III.2.2 Incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans des cellules de *Methylobacterium fujisawaense***

A la suite de l'échec des expériences d'incubation avec *M. organophilum* et puisque le désoxy-D-xylulose est un glucide à 5 atomes de carbone, nous avons tenté d'incuber le (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose avec une autre souche de *Methylobacterium*, capable d'utiliser un pentose comme seule source de carbone. Trois souches de *Methylobacterium* sont décrites dans la littérature pour pouvoir utiliser le D-(+)-xylose comme source de carbone : *Methylobacterium fujisawaense* (Green *et al.*, 1988), *Methylobacterium mesophilicum* (Austin et Goodfellow, 1979), *Methylobacterium radiotolerans* (Ito et Iizuka, 1971).

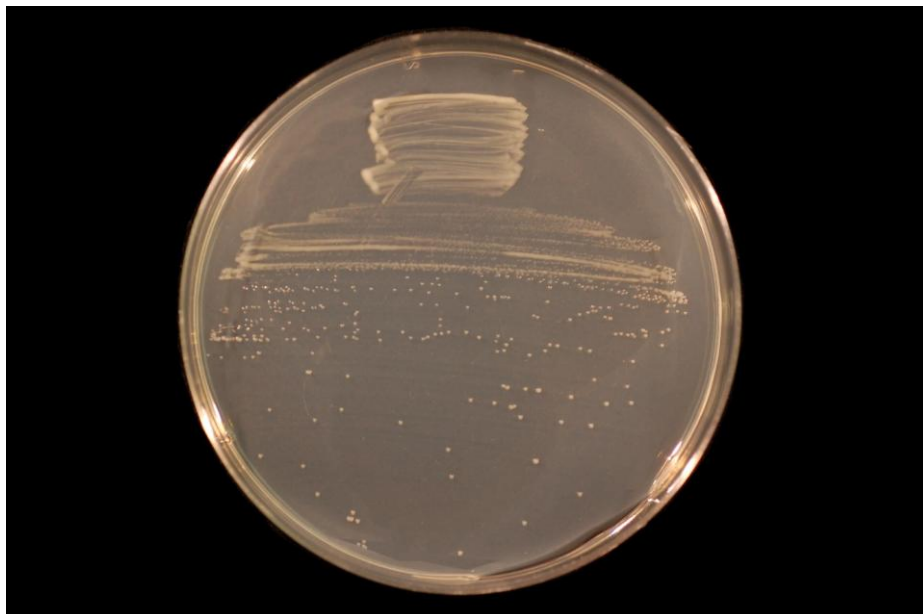
Nous avons choisi travailler avec *M. fujisawaense* (Green *et al.*, 1988), car cette souche était bien connue au laboratoire au niveau de la composition en hopanoïdes (Knani *et al.*, 1994) et a été utilisée avec succès pour les incubations de précurseurs marqués au <sup>13</sup>C dans le cadre de l'élucidation de la voie du MEP (Rohmer *et al.*, 1993). Une incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (1,5 mM) a été réalisée avec *Methylobacterium fujisawaense* cultivé sur un milieu minéral AMS avec 0,5% de méthanol comme source de carbone. Les résultats de l'analyse par GC/MS du

mélange de diploptérol/2 $\beta$ -méthyldiploptérol silylé isolé de cette expérience montrent dans ce cas aussi une absence d'incorporation du DX deutérié dans ces hopanoïdes.

#### IV. *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

Suite aux résultats négatifs des expériences d'incorporation du DX deutérié dans *M. organophilum* et *M. fujisawaense*, nous avons pensé à utiliser une autre bactérie, *Bradyrhizobium japonicum*, pour tenter l'incorporation du DX dans des 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes. J.M. Bravo avait déjà travaillé au laboratoire dans le cadre de sa thèse sur la composition en hopanoïdes de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Bravo *et al.*, 2001). Cette bactérie produit en bonnes quantités du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol ainsi que du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol (Bravo, 1997), ce qui fait d'elle une bonne candidate pour nos expériences d'incubation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose.

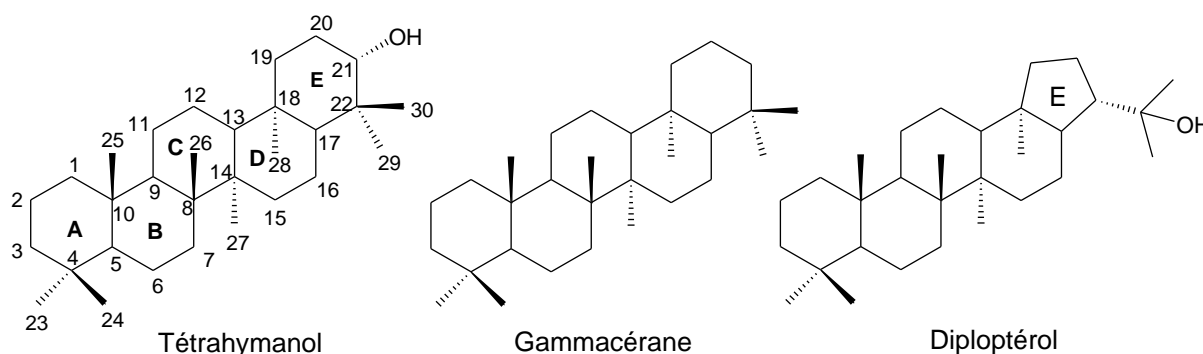
Les bactéries du genre *Bradyrhizobium* sont associées en symbiose à des nodules sur les racines des Fabacées (Figure 6). Elles sont capables de fixer l'azote de l'air dans ces nodules. Des hopanoïdes ont déjà été isolés chez d'autres bactéries capables de fixer de l'azote, telles que *Azotobacter* ou *Beijerinckia* (Vilchèze *et al.*, 1994).



**Figure 6.** *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 cultivé sur milieu YMA sur une boîte de Petri.

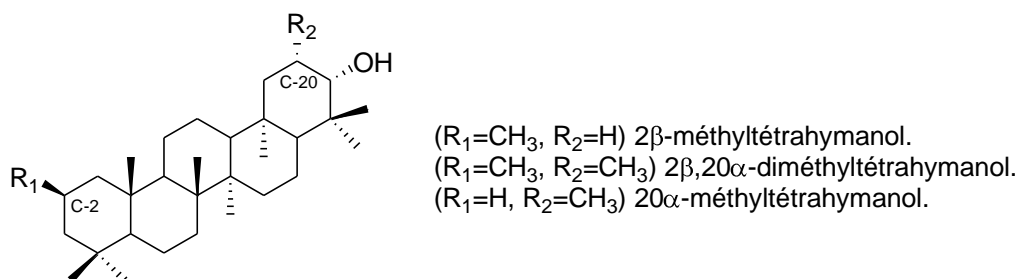
## IV.1 Du tétrahymanol

Le tétrahymanol est un triterpène pentacyclique de la famille du gammacérane, dont les cinq cycles sont à 6 atomes de carbones, contrairement aux hopanoïdes dont le cycle E est un cycle à cinq chaînons (Figure 7). C'est également un isomère du diploptérol.



**Figure 7.** Le tétrahymanol (21 $\alpha$ -hydroxygammacérane), le gammacérane et le diploptérol.

Le tétrahymanol a été identifié pour la première fois par Conner et ses collaborateurs en 1963 chez *Tetrahymena pyriformis*, un protozoaire à qui il doit son nom (Conner *et al.*, 1963). Ce n'est qu'en 1988 que cette molécule fut pour la première fois identifiée dans un procaryote, la bactérie *Rhodopseudomonas palustris* (Neunlist et Rohmer, 1988). Chez *Bradyrhizobium japonicum*, une bactérie phylogénétiquement proche de *Rhodopseudomonas palustris*, le tétrahymanol peut être méthylié en C-2 sur le cycle A pour donner le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol, en C-20 sur le cycle E pour donner le 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol ou bien en position C-2 et C-20 pour donner le 2 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol (Figure 8) (Bravo *et al.*, 2001).

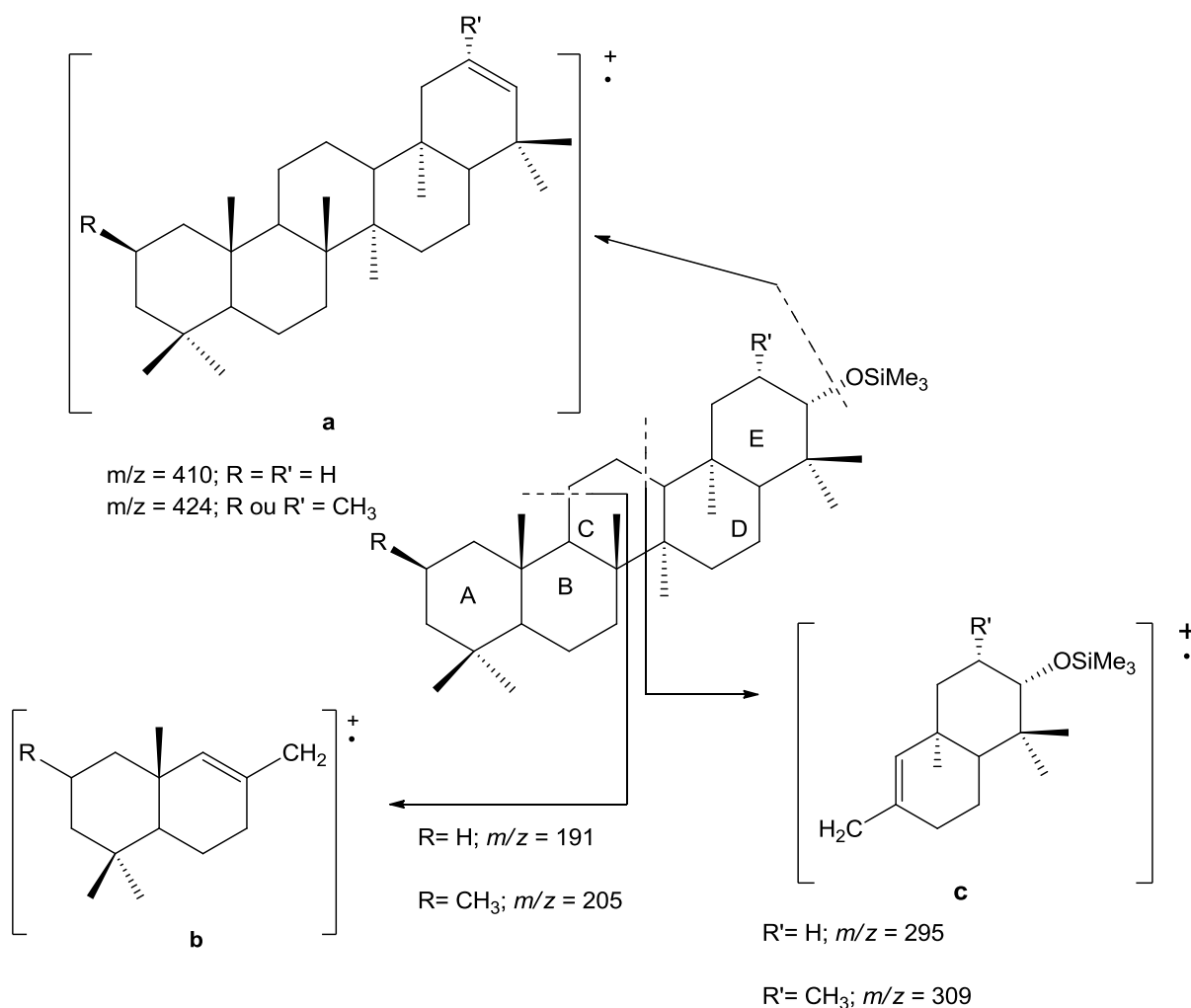


**Figure 8.** *Bradyrhizobium japonicum* : tétrahymanol et dérivés méthyliés.



#### IV.1.2 Fragmentation du tétrahymanol silylé en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS)

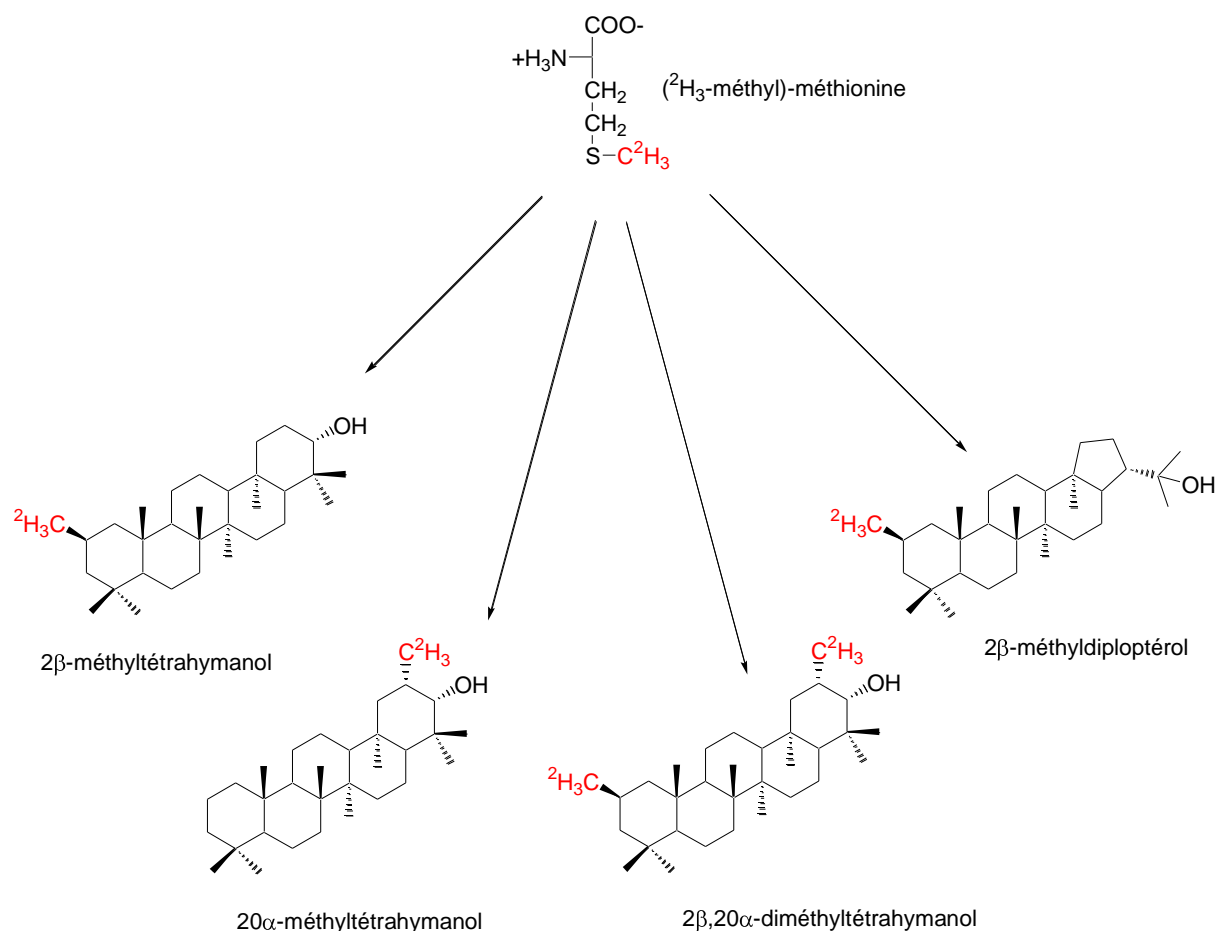
La fragmentation des éthers de triméthylsilyle du tétrahymanol et du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol en GC/MS est similaire à celle du diploptérol silylé. Le fragment **a** correspond à la perte de Me<sub>3</sub>SiOH et les fragments **b** et **c** à la rupture au niveau du cycle C (Figure 9). En effet, les fragments **b** et **c** sont les fragments caractéristiques correspondant à la rupture du cycle C. Le fragment **b** se retrouve à  $m/z = 205$  chez le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol et le 2 $\beta,20\alpha$ -diméthyltétrahymanol alors qu'il est à  $m/z = 191$  chez le tétrahymanol et le 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol. Quant au fragment **c**, il se retrouve à  $m/z = 309$  chez le 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol et le 2 $\beta,20\alpha$ -diméthyltétrahymanol alors qu'il est à  $m/z = 295$  chez le tétrahymanol et le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol.



**Figure 9.** Fragmentation caractéristique du tétrahymanol et de ses dérivés méthylés en GC-MS.

## IV.2 Incubation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine avec *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

La capacité d'incorporer le méthyle de la méthionine (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine en C-2β du tétrahymanol a été testée en incubant de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans une culture de *Bradyrhizobium japonicum*. Le marquage attendu des groupements de méthyles en C-2 et en C-20 est représenté dans la figure 10 (Bravo *et al.*, 2001).



**Figure 10.** Marquage attendu des triterpénoïdes méthylés en C-2 et en C-20 après incorporation de la (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine dans les hopanoïdes de *Bradyrhizobium japonicum*.

Seuls les deux triterpénoïdes méthylés majeurs ont été isolés: le mélange tétrahymanol/2β-méthyltétrahymanol et le mélange diploptérol/2β-méthyldiploptérol.

Pour évaluer l'incorporation du deutérium dans le 2β-méthyltétrahymanol et le 2β-méthyldiploptérol à partir de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyl)-méthionine, nous avons mesuré les variations d'intensité des signaux de deux ions renfermant le groupement méthyle et correspondant l'un à l'isotopomère d'abondance naturelle ( $m/z$ ) et l'autre à

l'isotopomère trideutérié ( $m+3/z$ ) synthétisé à partir de la méthionine marquée. Les signaux de l'ion moléculaire et des fragments correspondant à la perte de  $\text{Me}_3\text{SiOH}$  (fragment **a**, Figure 9) sont d'intensités trop faibles pour donner une mesure fiable. Nous avons donc utilisé les signaux du fragment **b** (Figure 9) renfermant les deux cycles A et B après rupture du cycle C. Pour cette comparaison, nous avons normé ces deux spectres de masse en prenant comme signal de base celui du fragment **b** de l'isotopomère d'abondance naturelle  $m/z = 205$  et déterminé l'abondance relative du signal  $m+3/z = 208$  de l'isotopomère deutérié par rapport au signal  $m/z = 205$ .

Dans le mélange tétrahymanol/2 $\beta$ -méthyltétrahymanol, l'intensité du pic  $m+3/z$  du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol augmente significativement, et c'est aussi le cas pour le mélange diploptérol/2 $\beta$ -méthyldiploptérol (Tableau 2). Toujours en appliquant l'équation E1, nous avons pu calculer le taux d'incorporation de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine dans le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol et le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol.

Il s'avère que l'incorporation du méthyle de la méthionine dans le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol et le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol est quasiment quantitative (96% et 93% respectivement). La contribution de la méthionine en abondance naturelle synthétisée à partir des sources de carbone en abondance naturelle est faible (de l'ordre de 4 à 7%).

Triterpénoïdes méthylés	2 $\beta$ -méthyltétrahymanol		2 $\beta$ -méthyldiploptérol	
( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine	1 mM		1 mM	
Fragment <b>b</b> (figure 25)	$m/z$	$m+3/z$	$m/z$	$m+3/z$
Intensité après marquage	100	2750	100	1366
Intensité en abondance naturelle	100	5	100	5
Taux d'incorporation de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine	96%		93%	

**Tableau 2.** Tableau résumant les taux d'incorporations de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine obtenus après l'expérience d'incorporation de la ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine (1 mM) dans le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol et le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol de *B. japonicum* cultivé sur milieu YMA.

### **IV.3 Incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans des cellules de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110**

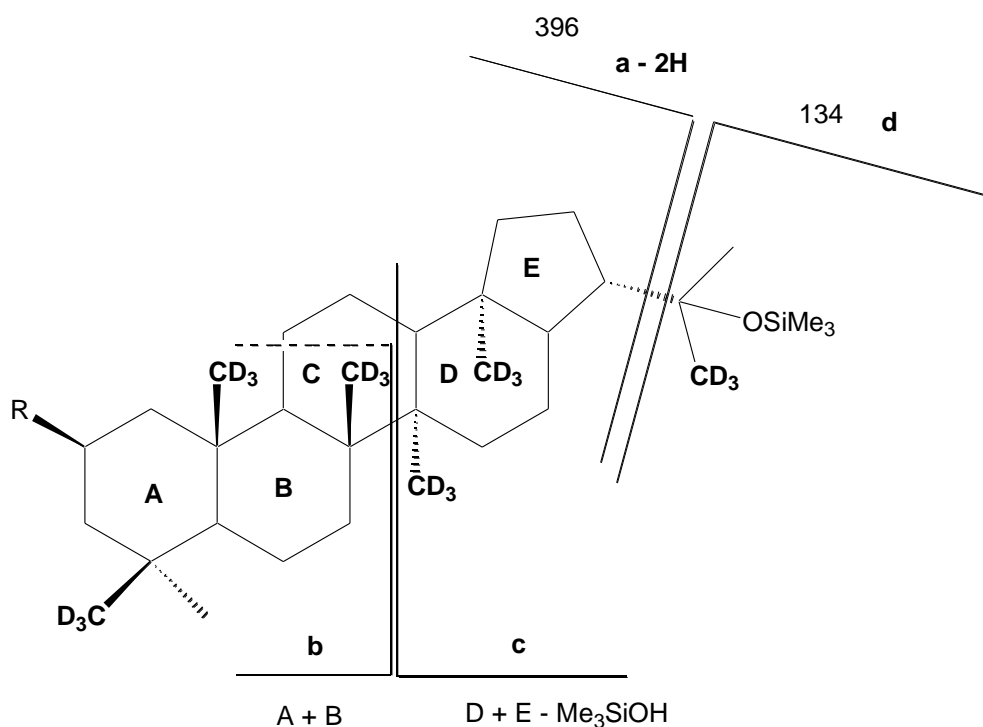
Après le succès de l'incorporation de (<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-méthyle)-méthionine dans le 2β-méthyldiploptérol et le 2β-méthyltétrahymanol de *B. japonicum*, nous avons testé dans un deuxième temps la capacité de cette bactérie à incorporer le désoxy-D-xylulose dans les unités isopréniques.

Pour cela, nous avons incubé cette souche en présence de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose pour analyser par GC/MS une éventuelle incorporation dans les hopanoïdes. Dans cette expérience, les résultats se sont révélés positifs. Jusqu'à six groupements méthylés trideutériés ont été retrouvés dans les hopanoïdes.

#### **IV.3.1 Marquage obtenu après l'incubation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans le diploptérol et le 2β-méthyldiploptérol de *Bradyrhizobium japonicum***

L'incubation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans le diploptérol et le 2β-méthyldiploptérol a donné des indications sur le taux d'incorporation du DX dans les triterpénoïdes (méthylés ou non) de *Bradyrhizobium japonicum* (Schéma 2). Le tableau 3 présente les différents fragments obtenus par GC/MS du diploptérol TMS éther et du 2β-méthyldiploptérol TMS éther après incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-xylulose (1 mM) avec *Bradyrhizobium japonicum*. Les fragments **a**, **b** et **c** correspondent à des signaux d'intensité trop faible pour pouvoir être exploités. Par contre le signal du fragment **d** correspondant à la chaîne latérale est le signal de base le plus intense du spectre de masse. Il contient un groupement méthyle provenant du 1-désoxy-D-xylulose et est caractérisé par un ion de  $m/z = 131$  pour l'isotopomère d'abondance naturelle et par un ion de  $m/z = 134$  pour un isotopomère trideutérié. A partir des intensités relatives des signaux de ces deux fragments non marqué et trideutérié, il est possible d'évaluer le taux d'incorporation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans l'unité isoprénique terminale correspondant à la chaîne latérale et une partie du cycle D. Comme il est raisonnable de postuler que toutes les unités isopréniques d'un squelette triterpénique sont équivalentes, il est possible d'extrapoler la valeur obtenue pour une seule unité isoprénique à celles des cinq autres unités.

A l'aide de la GC/MS, deux fragmentogrammes de masses ont été obtenus pour le fragment **d** : celui de l'ion  $m/z = 134$  correspond au fragment **d** marqué par un  $CD_3$ , celui de l'ion  $m/z = 131$  au fragment **d** non marqué. En comparant les aires de ces deux signaux obtenus pour le fragment ( $m/z = 131$  et  $m/z = 134$ ) dans le spectre de la fraction silylée diploptérol/2 $\beta$ -méthyldiploptérol/2 $\alpha$ -méthyldiploptérol (cf. § VI.1) obtenue à partir de l'incubation du  $CD_3$ -DX avec *Bradyrhizobium japonicum*, il est possible de déterminer que le taux d'incorporation du  $CD_3$ -DX dans le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol est de 88% ( $m/z = 134$ ) et que la présence de fragment non marqué ( $m/z = 131$ , 12%) est due à l'incorporation de 1-désoxy-D-xylulose d'abondance naturelle synthétisé par la bactérie à partir des sources de carbone non marquées présentes dans le milieu de culture.



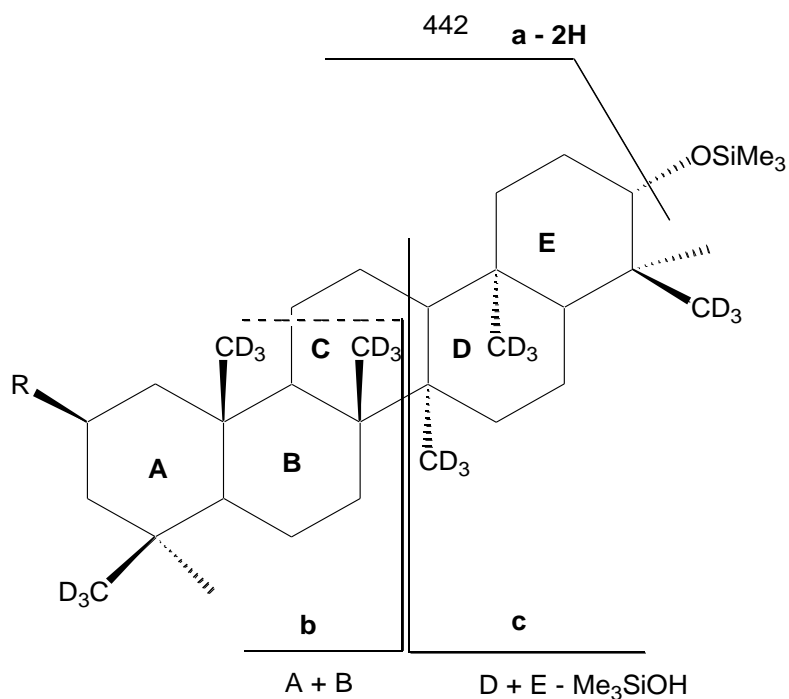
**Schéma 2.** GC/MS des triméthylsilyl'éthers du diploptérol (R = H) 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (R =  $CH_3$ ) marqué obtenu après incorporation de  $(CD_3)$ -1-désoxy-xylulose par *B. japonicum*.

	Diploptérol TMS éther		2β-méthyl-diploptérol TMS éther	
	Abondance naturelle	Incubation du (CD <sub>3</sub> )-DX	Abondance naturelle	Incubation du (CD <sub>3</sub> )-DX
Fragment a (m/z)	367	382	381	396
Fragment b (m/z)	191	200	205	214
Fragment c (m/z)	189	198	189	198
Fragment d (m/z)	131	134	131	134
M <sup>+</sup> -Me <sub>3</sub> SiOH (m/z)	410	428	424	442

**Tableau 3.** Fragments obtenus par GC/MS du diploptérol TMS éther et du 2β-méthyl-diploptérol TMS éther après incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum*.

#### IV.3.2 Marquage obtenu après l'incubation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans le tétrahymanol et le 2β-méthyl-tétrahymanol de *Bradyrhizobium japonicum*

Un spectre de masse GC/MS a été également obtenu par GC/MS sur le mélange silylé de tétrahymanol/2β-méthyl-tétrahymanol/2α-méthyl-tétrahymanol cf. § VI.1) obtenu après incubation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum* (Schéma 3). Les valeurs *m/z* des différents fragments obtenus des TMS éthers du tétrahymanol et des 2α-méthyl- et 2β-méthyl-tétrahymanol TMS sont réunis dans le tableau 4. Les intensités des signaux montrent que pour chaque fragment de l'isotopomère possédant le maximum de groupement CD<sub>3</sub> est toujours majoritaire. Il est donc raisonnable de postuler que, comme pour le diploptérol, le taux d'incorporation du (CD<sub>3</sub>)-DX dans le squelette gammacérane est aussi de l'ordre de 88%.



**Schéma 3.** GC/MS des triméthylsilyléther du 2β-méthyltétrahymanol marquée obtenu après incorporation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-xylulose par *B. japonicum*.

	Tétrahymanol TMS éther		2β-méthyltétrahymanol TMS éther	
	Abondance naturelle	Incubation du (CD <sub>3</sub> )-DX	Abondance naturelle	Incubation du (CD <sub>3</sub> )-DX
Fragment <b>a</b> ( <i>m/z</i> )	410	428	424	442
Fragment <b>b</b> ( <i>m/z</i> )	191	200	205	214
Fragment <b>c</b> ( <i>m/z</i> )	189	198	189	198
M <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	499	517	514	532

**Tableau 4.** Différents fragments obtenus par GC/MS du tétrahymanol TMS éther et du 2β-méthyltétrahymanol TMS éther après incubation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum*.

## **V. Recherche de la 1-désoxy-D-xylulose kinase chez *Methylobacterium fujisawaense* et chez *Bradyrhizobium japonicum***

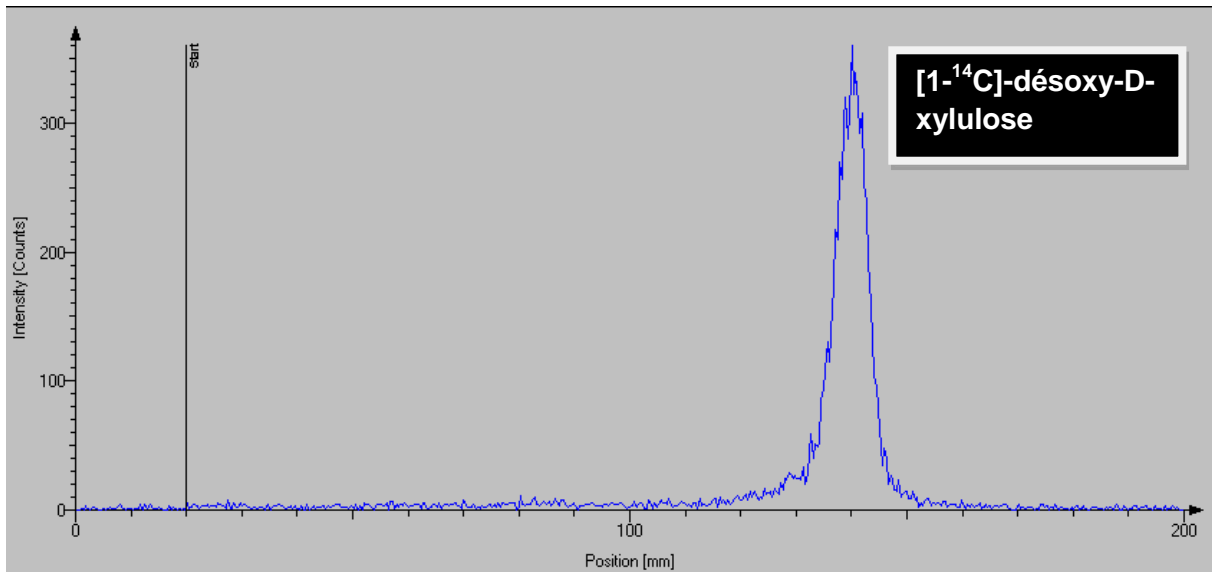
Après l'échec de l'incorporation du (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans le 2β-méthyldiplotérol par deux espèces de *Methylobacterium*, nous avons essayé de caractériser l'activité de la désoxy-D-xylulose kinase. Cette enzyme est responsable de la phosphorylation du désoxy-D-xylulose (DX) en désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) (Hemmerlin *et al.*, 2006 ; Wungsintaweekul *et al.*, 2001) qui est le premier intermédiaire effectif de la voie de MEP chez tous les organismes utilisant cette voie métabolique.

Ce test consiste à mesurer la radioactivité en <sup>14</sup>C du désoxy-D-xylulose phosphate formé à partir d'une incubation du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose dans des systèmes acellulaires bruts de *Methylobacterium fujisawaense* et de *Bradyrhizobium japonicum* (Tritsch *et al.*, 2004). La technique de ce test est décrite dans la partie expérimentale du chapitre.

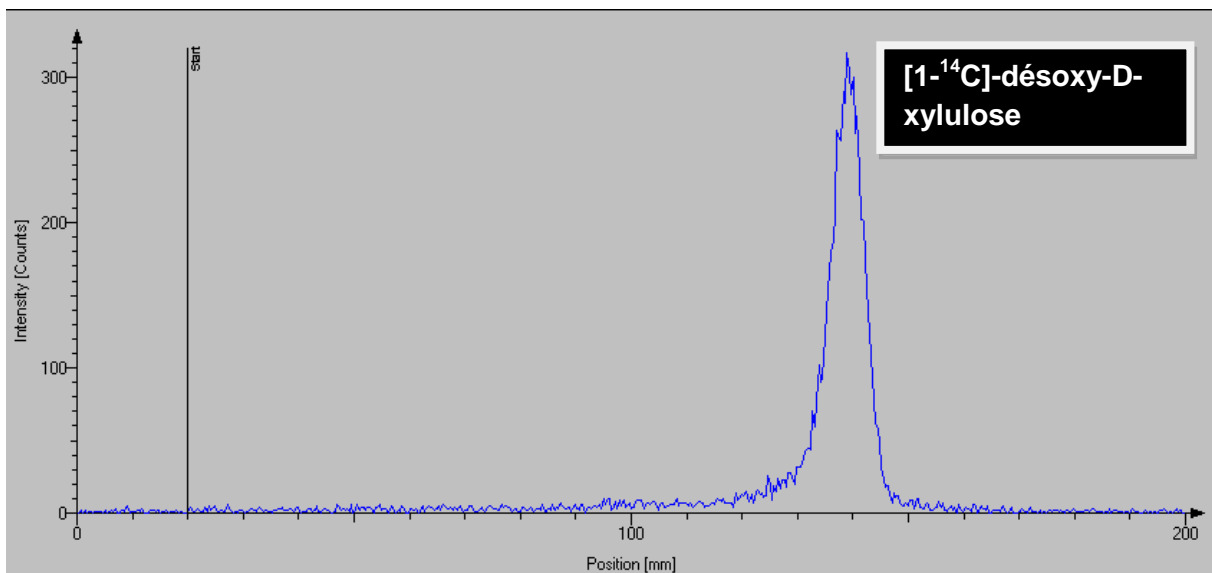
Trois tests ont été effectués : deux pour la souche de *Methylobacterium fujisawaense* cultivée sur deux sources de carbone différentes, (méthanol ou xylose) et un test pour la souche de *Bradyrhizobium japonicum*.

Au début de ce travail, les génomes des *Methylobacterium* spp. et des *Bradyrhizobium* spp. n'étaient pas connus et séquencés. Une recherche dans les données disponibles par la suite de séquence de la D-xylulose kinase (qui phosphoryle aussi le DX libre) s'est révélée infructueuse (Vuilleumier *et al.*, 2009). Ce test enzymatique réalisé montre l'échec de la formation du [1-<sup>14</sup>C]-DXP à partir du [1-<sup>14</sup>C]-DX incubé dans les systèmes acellulaires bruts de *Methylobacterium fujisawaense* d'où l'absence probable d'une kinase capable de phosphoryler le DX en DXP dans cette souche que soit la D-xylulose kinase ou toute autre kinase (Figures 11 et 12).



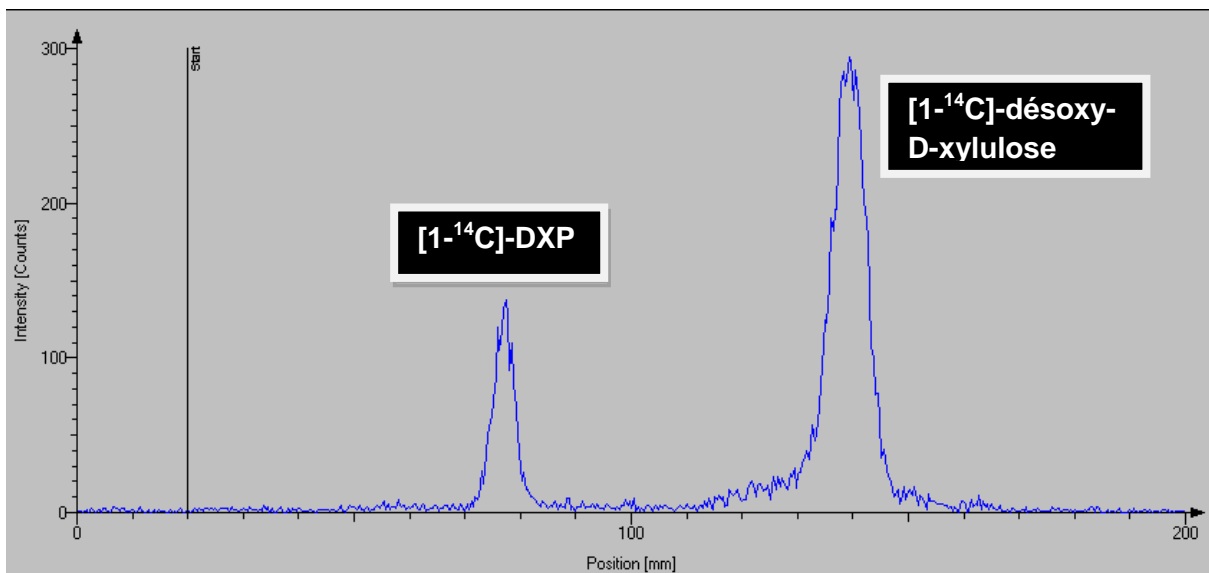


**Figure 11.** Essai de caractérisation de la xylulose kinase chez *Methylobacterium fujisawaense* cultivé sur méthanol. Du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose a été incubé dans des systèmes acellulaires bruts bactériens de *Methylobacterium fujisawaense*. Le chromatogramme de CCM montre un seul signal de radioactivité <sup>14</sup>C qui correspond au signal du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose incubé. Aucun autre signal de radioactivité n'a été détecté sur le chromatogramme.



**Figure 12.** Essai de caractérisation de la xylulose kinase chez *Methylobacterium fujisawaense* cultivé sur D-xylulose. Du [(1-<sup>14</sup>C)-désoxy-D-xylulose a été incubé dans des systèmes acellulaires bruts bactériens de *Methylobacterium fujisawaense*. La CCM montre un seul signal de radioactivité <sup>14</sup>C qui correspond à celui du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose incubé. Aucun autre signal de radioactivité n'a été détecté sur le chromatogramme.

Qu'en est-il chez *Bradyrhizobium*? Pour répondre à cette question, un test enzymatique a néanmoins été réalisé pour vérifier la présence ou l'absence d'une kinase, autre que la D-xylulose kinase, capable de phosphoryler le DX. La figure 13 montre la formation du [1-<sup>14</sup>C]-DXP à partir [1-<sup>14</sup>C]-DX incubé dans du système acellulaire brut de *Bradyrhizobium japonicum* ce qui montre la présence d'une désoxy-D-xylulose kinase dans cette souche.



**Figure 13.** Essai de caractérisation de la D-xylulose kinase chez *Bradyrhizobium japonicum*. Du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose a été incubé dans des systèmes acellulaires bruts bactériens de *Bradyrhizobium japonicum*. La CCM montre deux signaux de radioactivité <sup>14</sup>C : un signal qui correspond au signal du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose incubé, et un autre signal de radioactivité correspondant au [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose phosphate formé à partir du [1-<sup>14</sup>C]-désoxy-D-xylulose incubé.

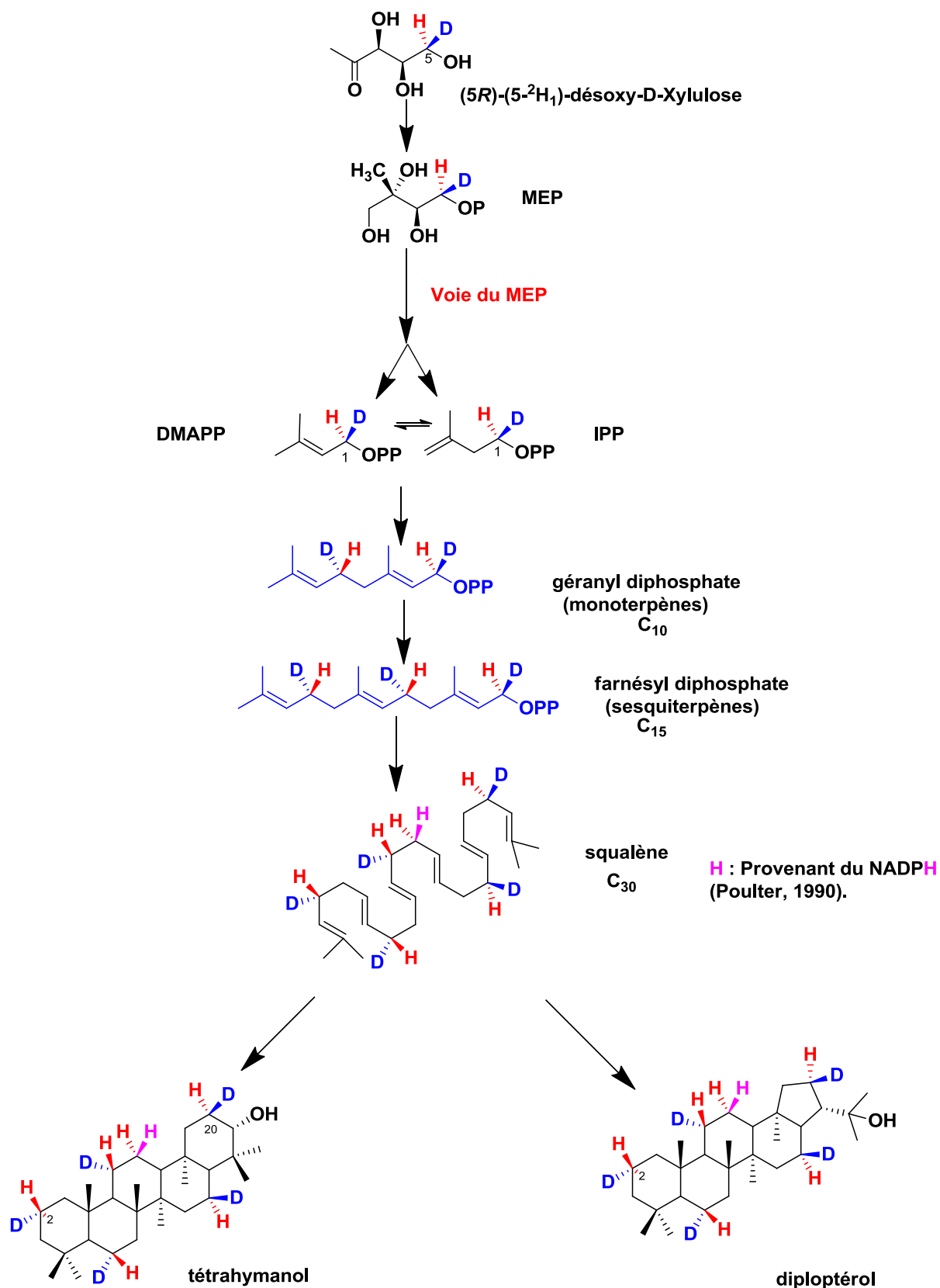
En conclusion, les résultats des tests enzymatiques réalisés ont montré l'absence d'une kinase capable de phosphoryler le DX en DXP dans la souche de *M. fujisawaense* mais par contre sa présence chez *Bradyrhizobium japonicum*. Par conséquent, ces résultats expliquent l'échec de l'incorporation du DX marqué synthétisé dans le 2β-méthylidiploptérol des deux *Methylobacterium* et la réussite de cette expérience chez *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

## **VI. Incubation des deux isotopomères (5R)- et (5S)- du (5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans *Bradyrhizobium japonicum***

Après vérification de la présence de la désoxy-D-xylulose kinase dans les cellules de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 et la réussite de l'incorporation de (CD<sub>3</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans les unités isopréniques du 2β-méthyltétrahymanol et du 2β-méthyl-diploptérol, nous avons incubé les deux isotopomères (5R)- et (5S)- du (5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (synthétisés au préalable) en présence de (<sup>13</sup>C-méthyl)-méthionine pour marquer le méthyle en C-2β de ces deux triterpènes. Ces incubations devraient fournir des renseignements sur la stéréochimie de la méthylation enzymatique en C-2 du cycle A du squelette hopane.

### **VI.1 Incubation du (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum* / Identification de la stéréochimie de la méthylation en C-2 du squelette hopane par RMN du <sup>13</sup>C**

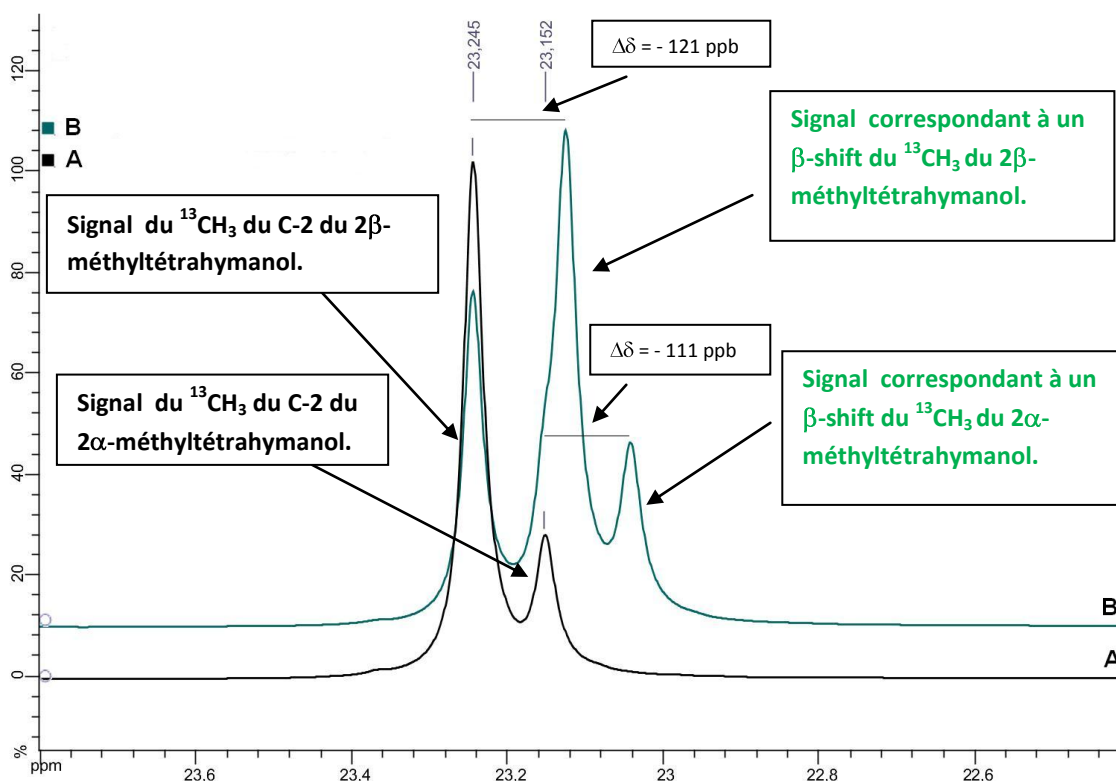
Le (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose a été incubé à une concentration de 1 mM avec *Bradyrhizobium japonicum*. De la (<sup>13</sup>C-méthyl)-méthionine (1mM) a été ajoutée au milieu de culture pour augmenter l'intensité du signal <sup>13</sup>C du groupement de méthyle lors de l'analyse en RMN du carbone et par conséquent améliorer la sensibilité de la détection. La figure 14 montre le marquage au deutérium attendu après incorporation du (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans le tétrahymanol et le diploptérol de *Bradyrhizobium japonicum*. Il faut noter que la chiralité du carbone C-5 est conservée et se retrouve inchangée en C-1 de l'IPP ou du DMAPP. Par contre, il y a inversion de configuration au niveau du C-1 de l'IPP ou du DMAPP lors de la réaction de condensation catalysée par les prényl transférases conduisant aux diphosphates de géranyle et de farnésyle (Liang, 2009).



**Figure 14.** Marquage au deutérium attendu après incorporation du (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans les le tétrahymanol et le diploptérol de *Bradyrhizobium japonicum*.

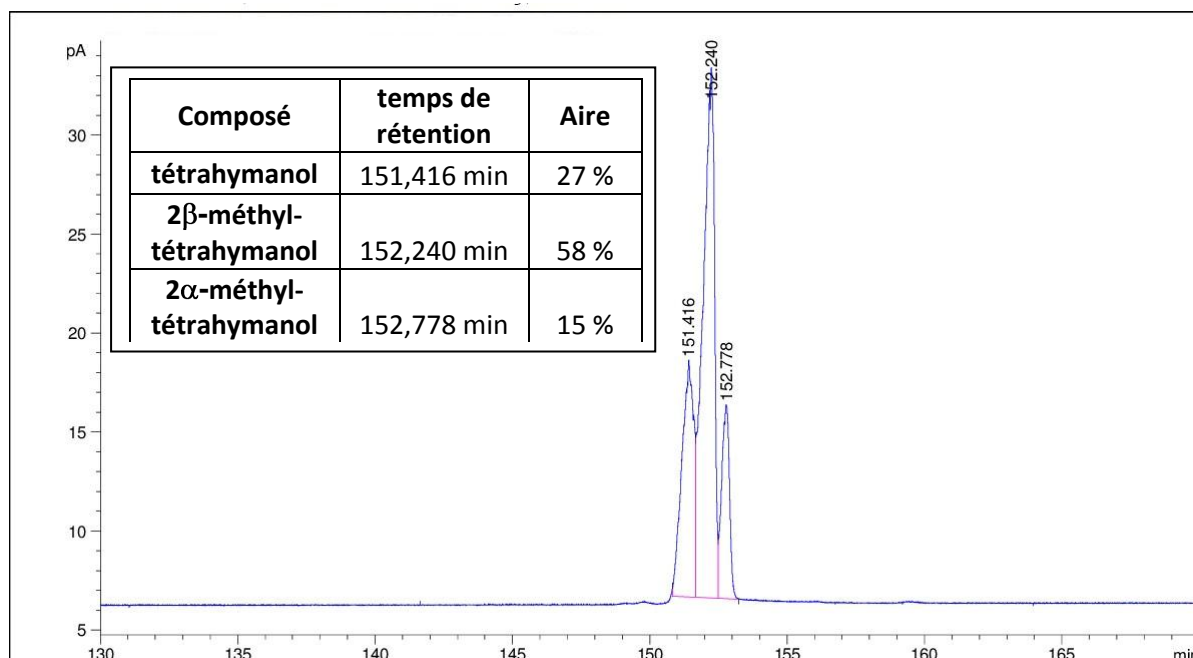
Après avoir séparé les triterpénoïdes sur une plaque préparative de silice et avoir récupéré la bande contenant le mélange tétrahymanol/2 $\beta$ -méthyltétrahymanol ( $R_f = 0,25$  ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), une expérience de RMN du carbone est effectuée pour rechercher un déplacement du signal du méthyle en C-2 vers les champs forts dû à la présence éventuelle de deutérium sur le carbone C-2 du cycle A du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol. La figure 15 montre une comparaison entre les signaux du méthyle en C-2 enrichie en  $^{13}\text{C}$  par la ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol. L'un des spectres correspond à l'expérience témoin sans addition de (5*R*)-(5- $^2\text{H}_1$ )-désoxy-D-xylulose, donc avec une abondance naturelle en deutérium (Figure 15 A), l'autre à l'incubation de l'isotopomère deutérié du DX (Figure 15 B). L'expérience témoin montre en fait deux signaux pour ce méthyle en C-2 à 23,152 ppm et à 23,245 ppm dans les proportions de 1:3 environ (Figure 15 A). Ils sont tous deux enrichis en  $^{13}\text{C}$  et proviennent donc de l'incorporation de la ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine. Ce dédoublement rappelle la découverte du 2 $\alpha$ -méthyldiploptérol comme isomère mineur (5%) accompagnant le 2 $\beta$ -méthyldiploptérol (95%) chez *M. organophilum* (Stampf, 1992 ; Stampf *et al.*, 1991). La comparaison des déplacements chimiques signaux des tétrahymanols méthylés en C-2 de *B. japonicum* avec ceux de 2 $\beta$ -méthyl- et de 2 $\alpha$ -méthylhopanoïdes de synthèse (Stampf, 1992) est en accord avec la présence de 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol dans l'échantillon de 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse du spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  de la fraction tétrahymanol de *B. japonicum*. Les déplacements chimiques des atomes de carbone du cycle A sont caractéristique pour un mélange de tétrahymanol/2 $\beta$ -méthyltétrahymanol/2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol, en particulier pour C-2 pour lequel trois signaux sont observés à 24,691 ppm pour le 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol, à 23,836 ppm pour le 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol et à 18,761 ppm pour le tétrahymanol (Figure 15) (Stampf, 1992). Cette hypothèse est corroborée par l'analyse détaillée du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la fraction « tétrahymanol » de *B. japonicum*. Les déplacements chimiques des atomes de carbone du cycle A sont caractéristiques pour un mélange tétrahymanol/2 $\beta$ -méthyltétrahymanol/2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol, en particulier pour C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-24, C-25 et C-31 (= méthyle en C-2) pour lesquels trois signaux sont observés (Fig. 16 pour les signaux de C-2, Tableau 5) (Stampf, 1992). Une dernière confirmation de la

présence simultanée du tétrahymanol, du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol et du 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol a été obtenue par CPG à l'aide d'une programmation lente de température qui permet de séparer ces trois dérivés du gammacérane : trois signaux sont effectivement obtenus (Figure 17). Le 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol n'avait pas été détecté dans les travaux antérieurs (Bravo *et al.*, 2001) : soit il n'était présent qu'en proportions trop faibles pour être détectées dans les bactéries cultivées en fermenteur de façon différente, soit il est passé inaperçu au cours du protocole d'analyse.

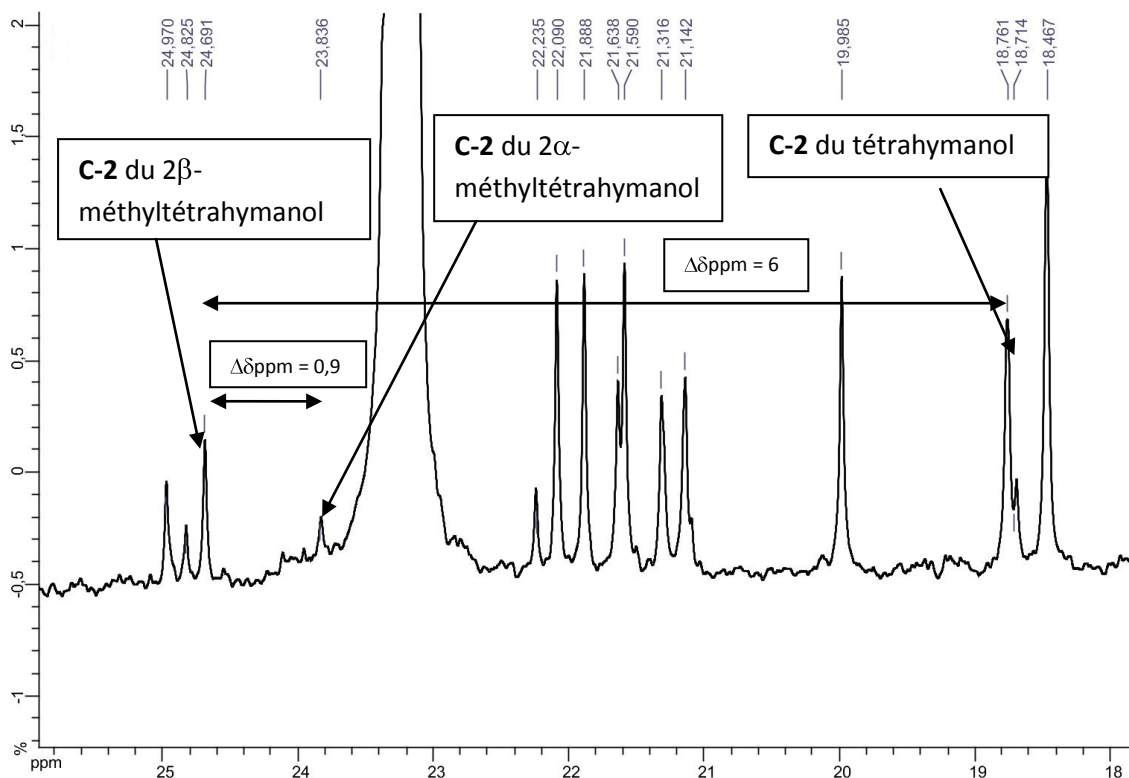


**Figure 15.** Comparaison entre les signaux des groupements  $^{13}\text{CH}_3$  du 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol et du 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol obtenus : l'un sans incorporation de (5R)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (A, abondance naturelle en  $^2\text{H}$ ) et l'autre après incorporation de (5R)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (1 mM, B) en présence de ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine (1 mM).

Après incorporation de (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX, le spectre de RMN du <sup>13</sup>C des méthyles en C-2 montrent quatre signaux. Un premier couple correspond au méthyle supplémentaire du 2β-méthyltétrahymanol avec un signal non shifté à 23,245 ppm et un signal shifté vers les champs forts à 23,124 ppm. Ce Δδ de -121 ppb correspond à un β-shift induit par un deutérium en C-2 (Figure 15, B). Une observation similaire est faite pour le 2α-méthyltétrahymanol, l'isomère minoritaire. Deux signaux sont observés à 23,152 ppm (signal non shifté) et à 23,041 ppm (signal shifté), ce qui correspond à un β-shift de -111 ppb qui est également la signature de la présence d'un deutérium en C-2 (Figure 15, B).



**Figure 17.** Analyse par CPG de la fraction correspondant au mélange tétrahymanol/2β-méthyltétrahymanol/2α-méthyltétrahymanol provenant de l'incubation de la (<sup>13</sup>C-méthyl)-méthionine avec *Bradyrhizobium japonicum*.



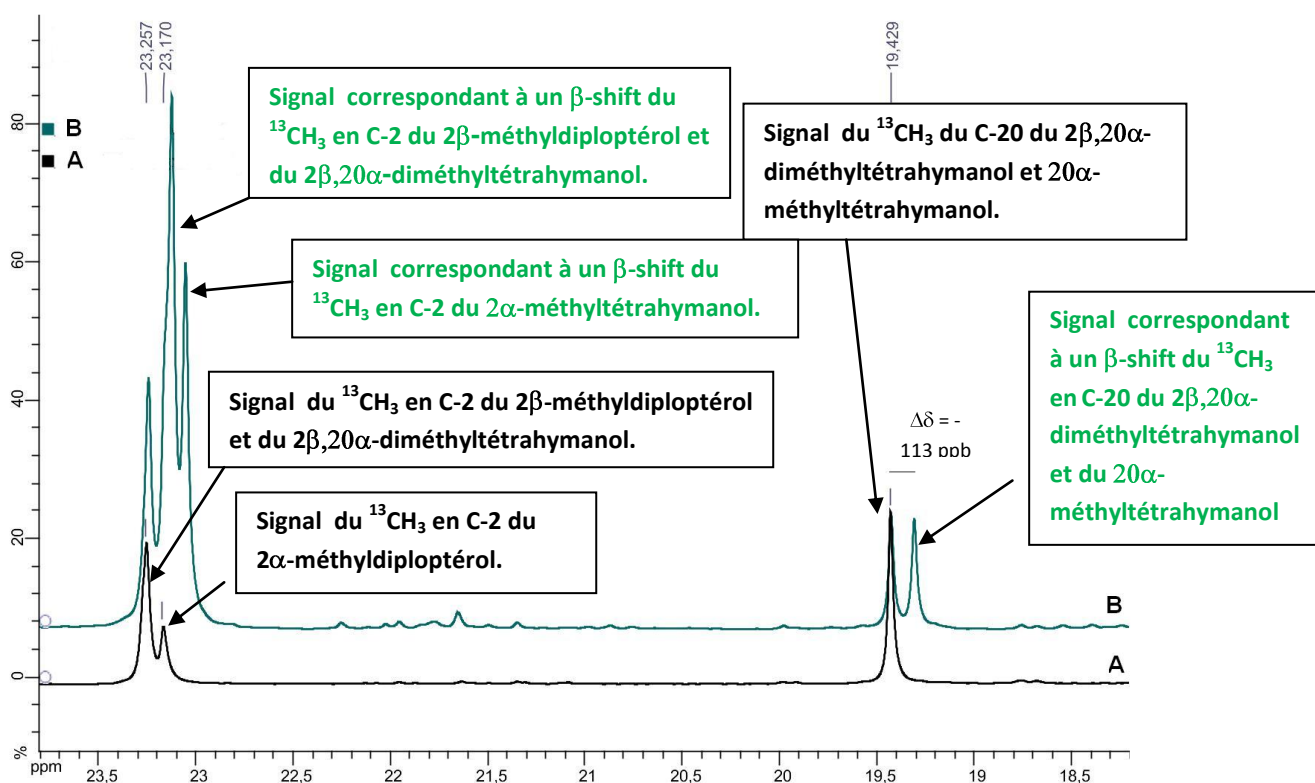
**Figure 16.** Fraction « tétrahymanol » totale de *B. japonicum* : un extrait du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  montrant trois signaux pour C-2 qui correspondent aux trois composés présents : 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol, 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol et tétrahymanol (Stampf, 1992).

	diploptérol	tétrahymanol	2 $\beta$ -méthyl-diploptérol	2 $\beta$ -méthyl-tétrahymanol	2 $\alpha$ -méthyl-diploptérol	2 $\alpha$ -méthyl-tétrahymanol
	référence	<i>B. japonicum</i>	référence	<i>B. japonicum</i>	référence	<i>B. japonicum</i>
<b>C-1</b>	40,41	40,38	49,77	49,77	51,27	51,35
<b>C-2</b>	18,17	18,76	24,8	24,69	29,91	23,82
<b>C-3</b>	33,46	33,5	45,23	45,26	49,6	49,67
<b>C-4</b>	33,35	33,4	32,47	32,41	33,95	33,98
<b>C-5</b>	56,19	56,24	50,92	50,93	55,79	55,9
<b>C-10</b>	37,47	37,4	37,84	37,83	38,07	38,08
<b>C-23</b>	33,47	33,45	31,06	31,1	33,48	35,5
<b>C-24</b>	21,63	21,64	26,1	26,12	22,23	22,24
<b>C-25</b>	15,86	15,42	21,76	21,89	16,66	16,62
<b>2<math>\beta</math>-Me</b>			23,22	23,26		
<b>2<math>\alpha</math>-Me</b>					23,15	23,16

**Tableau 5.** Identification par RMN de  $^{13}\text{C}$  du 2 $\alpha$ -méthyltétrahymanol de *B. japonicum*. Signaux des atomes de carbone du cycle A (Stampf, 1992).



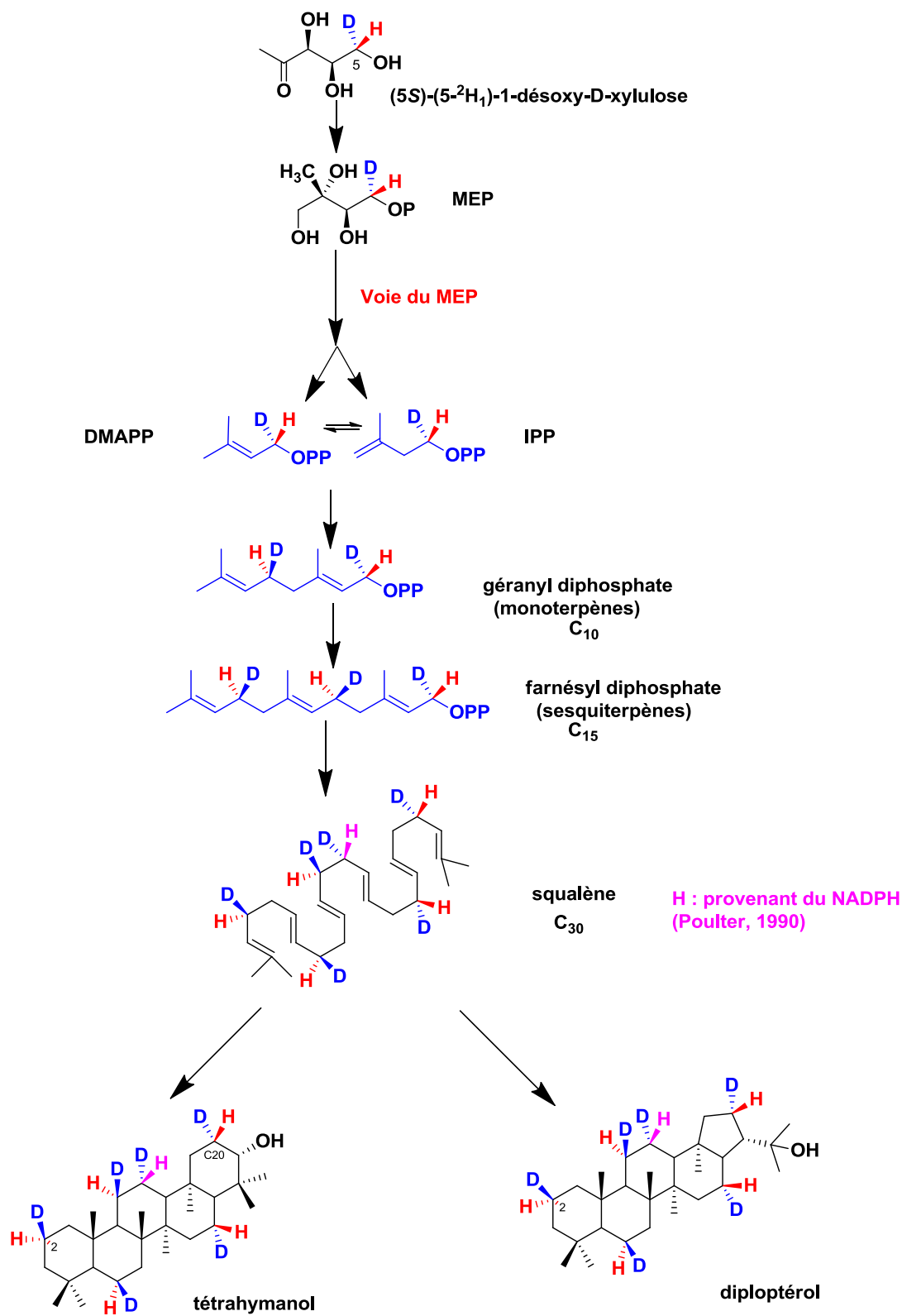
La même étude a aussi été effectuée pour la bande contenant le mélange diploptérol/2 $\beta$ -méthyldiploptérol/2 $\alpha$ -méthyldiploptérol ( $R_f = 0,32$  ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Cette fraction contient aussi le mélange de 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol /2 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol qui en principe est séparable, mais difficilement, des diploptérols (Bravo *et al.*, 2001). Comme nous travaillons sur des métabolites enrichis au  $^{13}\text{C}$  sur un seul carbone et qu'il n'y a pas recouvrement des signaux, il n'est pas gênant de travailler sur un mélange de quatre triterpénoïdes méthylés. A nouveau le 2 $\alpha$ -méthyldiploptérol a été identifiée par le déplacement chimique du méthyle en C-2. Le spectre de RMN du carbone montre aussi la présence d'un signal à 23,137 ppm (Figure 18, B) qui correspond à un  $\beta$ -shift de -120 ppb du signal initial du groupement de méthyle en position C-2 $\beta$  vers 23,257 ppm (Figure 18, A). Le signal minoritaire enrichi en  $^{13}\text{C}$ , présent sur ce spectre à 23,170 ppm (Figure 18, A) est aussi shifté vers 23,065 ppm et correspondant à un  $\beta$ -shift de -105 ppb. Comme pour le tétrahymanol, ce signal correspond au signal du  $^{13}\text{CH}_3$  en C-2 du 2 $\alpha$ -méthyldiploptérol. Ce spectre montre de plus un signal à 19,316 ppm (Figure 18, B) qui correspond à un  $\beta$ -shift d'un signal initial du groupement de méthyle 19,429 ppm (Figure 18, A) marqué au  $^{13}\text{C}$ . Ce  $\beta$ -shift est de -113 ppb. Selon la littérature, ce signal correspond au groupement méthyle positionné en C-20 $\alpha$  (Bravo *et al.*, 2001). On note qu'il faut déduire des intensités des signaux de méthyle en C-2 ou en C-20 des produits non deutériés, la contribution du DXP néoformé d'abondance naturelle (non deutérié, 12%).



**Figure 18.** Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  correspondant aux signaux des groupements de méthyles enrichis en  $^{13}\text{C}$  d'un mélange du  $2\beta$ -méthyldiploptérol,  $2\beta,20\alpha$ -diméthyltétrahymanol et  $20\alpha$ -méthyltétrahymanol isolés l'un sans incorporation du  $(5R)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (A) et l'autre après incorporation de  $(5R)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (1 mM, B) en présence de  $(^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine.

## VI.2 Incubation du $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum*.

Pour compléter l'expérience précédente, du  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (1 mM) a également été incubé dans des cellules de *Bradyrhizobium japonicum*. De la  $(^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine (1 mM) a été ajoutée pour augmenter la sensibilité du signal  $^{13}\text{C}$  du groupement de méthyle lors de l'analyse en RMN de carbone des triterpénoïdes méthylés isolés. La figure 19 montre le marquage en deutérium attendu après incorporation du  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose au niveau des cycles A, B, C, D et E des triterpénoïdes isolés de *Bradyrhizobium japonicum*.

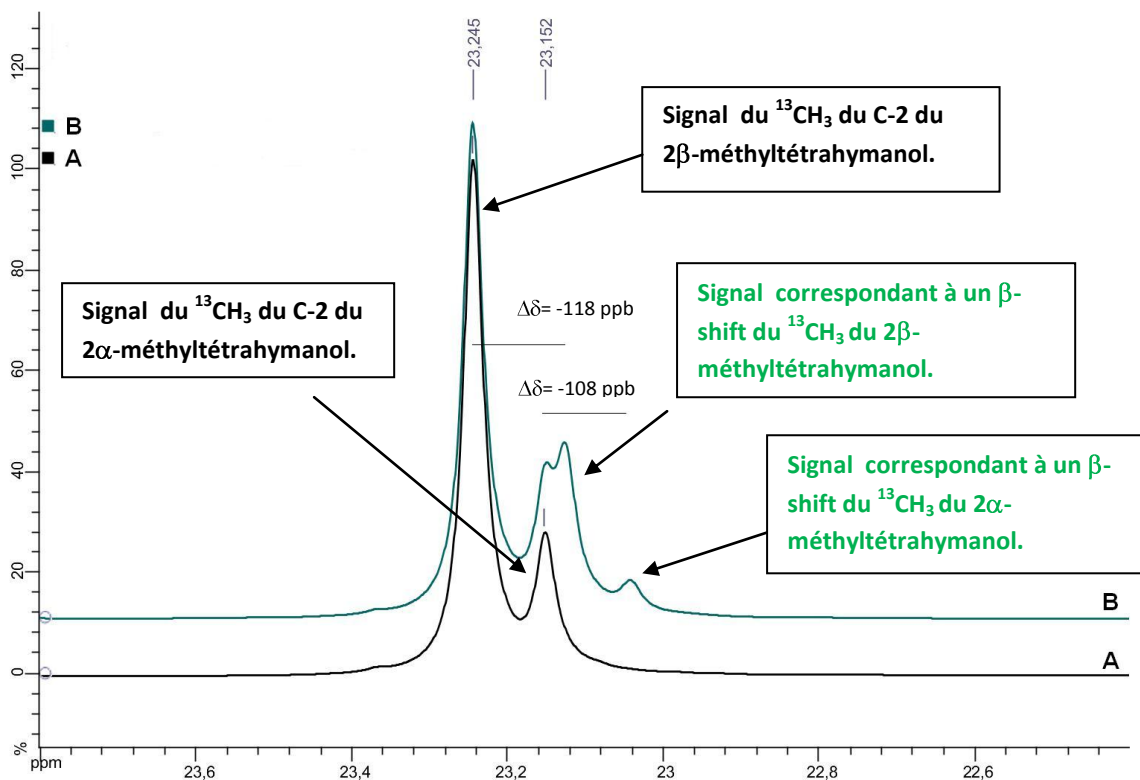


**Figure 19.** Marquage au deutérium attendu après incorporation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans les triterpénoïdes de *Bradyrhizobium japonicum*.

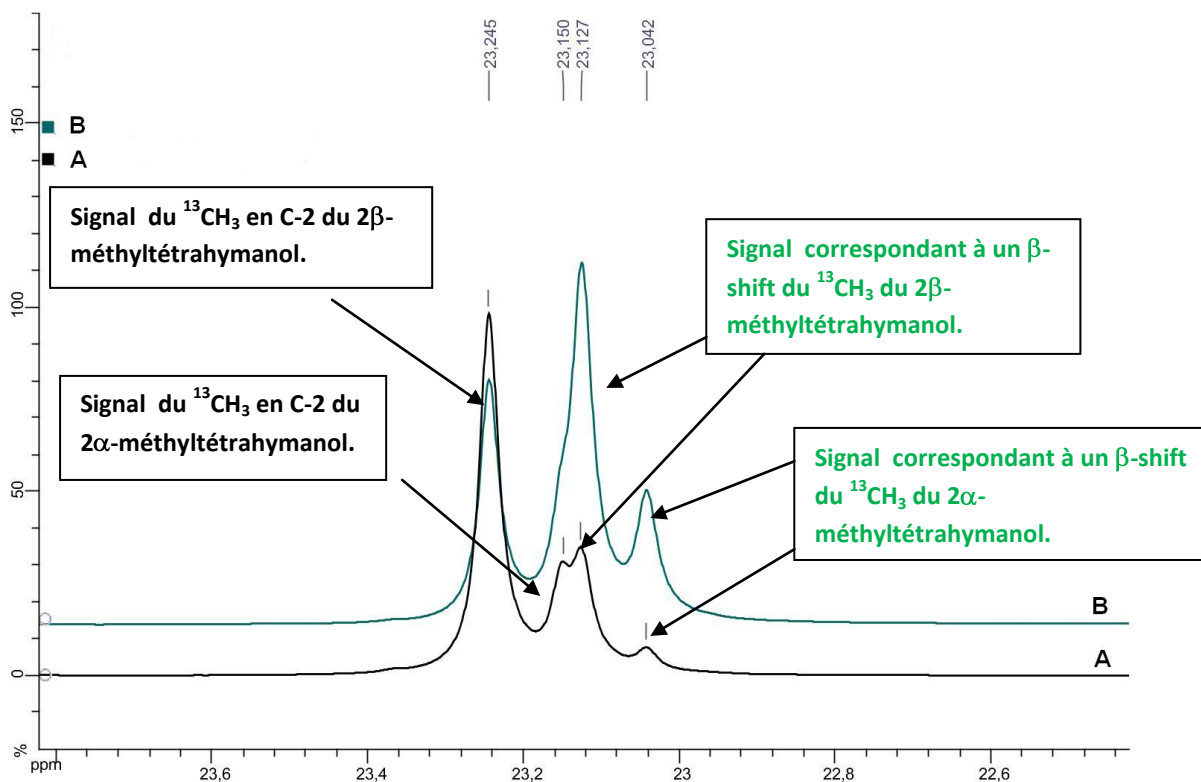
Lors de l'expérience d'incorporation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose dans les hopanoïdes de *Bradyrhizobium japonicum*, la même procédure par CCM préparative que celle décrite pour l'incubation de l'autre isotopomère deutérié a été utilisée pour isoler les triterpénoïdes. Ces derniers ont été analysés par RMN du <sup>13</sup>C pour identifier la présence ou non des signaux qui correspondent à un β-shift du groupement de méthyle en position C-2 du cycle A du diploptérol et du tétrahymanol ainsi que du groupement de méthyle en position C-20 du cycle E du tétrahymanol.

La figure 20 montre une comparaison en RMN du <sup>13</sup>C au niveau du signal du méthyle en C-2 entre le 2β-méthyltétrahymanol isolé à partir de l'expérience d'incorporation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (Figure 20, A) et le 2β-méthyltétrahymanol isolé à partir d'une expérience témoin sans incorporation de (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose avec *Bradyrhizobium japonicum* (Figure 20, B). Ces spectres montrent aussi la présence de β-shifts pour les deux signaux des groupements méthyles enrichis en <sup>13</sup>C en C-2 en position α (Δδ = -108 ppb) et β (Δδ = -118 ppb) des deux méthyltétrahymanols. Par contre, ce qui est intéressant, c'est que les intensités des signaux shiftés sont nettement plus faibles que ceux retrouvés dans l'expérience d'incubation de la (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose chez *Bradyrhizobium japonicum* (Figure 21).

Le signal à 23,127 ppm correspondant à un β-shift du signal initial à 23,245 ppm du groupement méthyle en C-2β du 2β-méthyltétrahymanol isolé à partir de l'expérience d'incorporation du (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (Figure 21, B), est beaucoup plus intense que le signal correspondant provenant de l'incorporation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose (Figure 21, A).



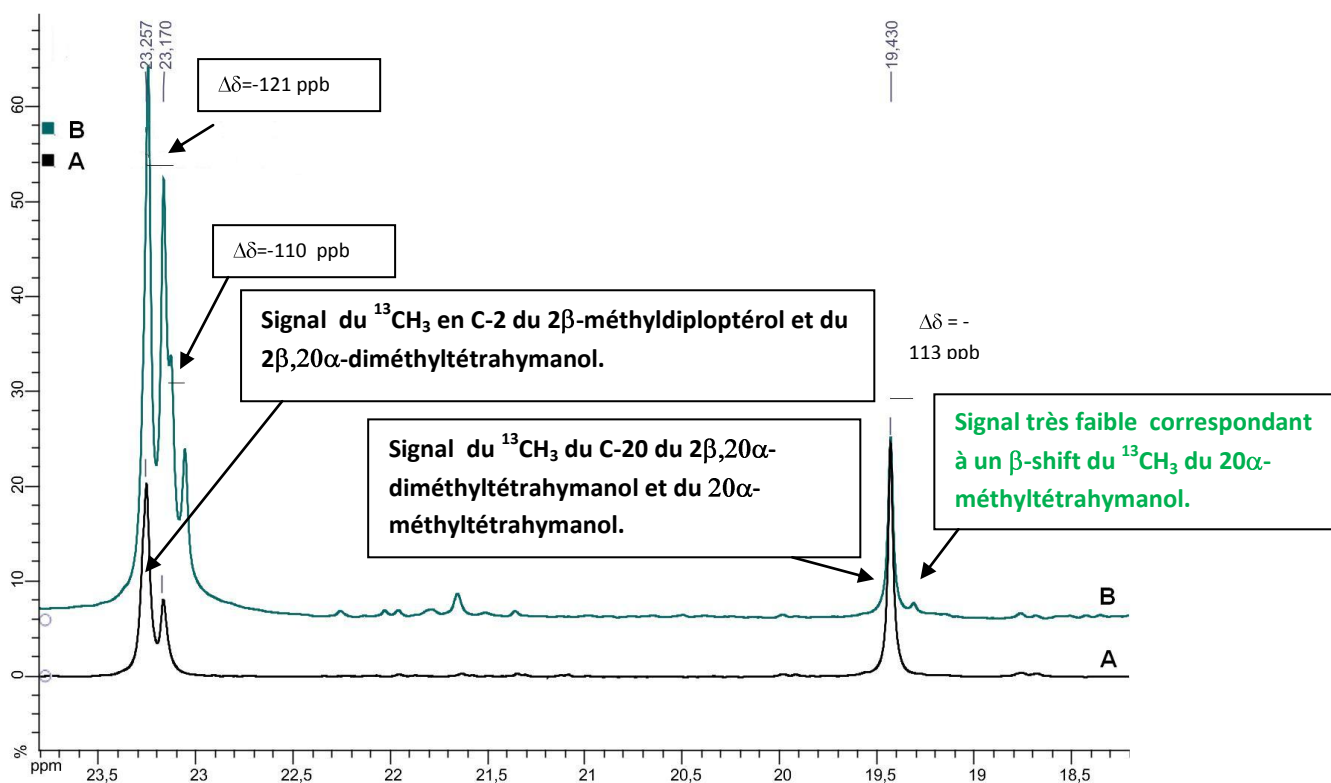
**Figure 20.** Comparaison entre les deux signaux de groupement  $^{13}\text{CH}_3$  du  $2\beta$ -méthyltétrahymanol et du  $2\alpha$ -méthyltétrahymanol dont l'un est isolé sans incorporation de  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (A) et l'autre après incorporation de  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (1 mM, B) en présence de  $(^{13}\text{C}\text{-méthyl})$ -méthionine.



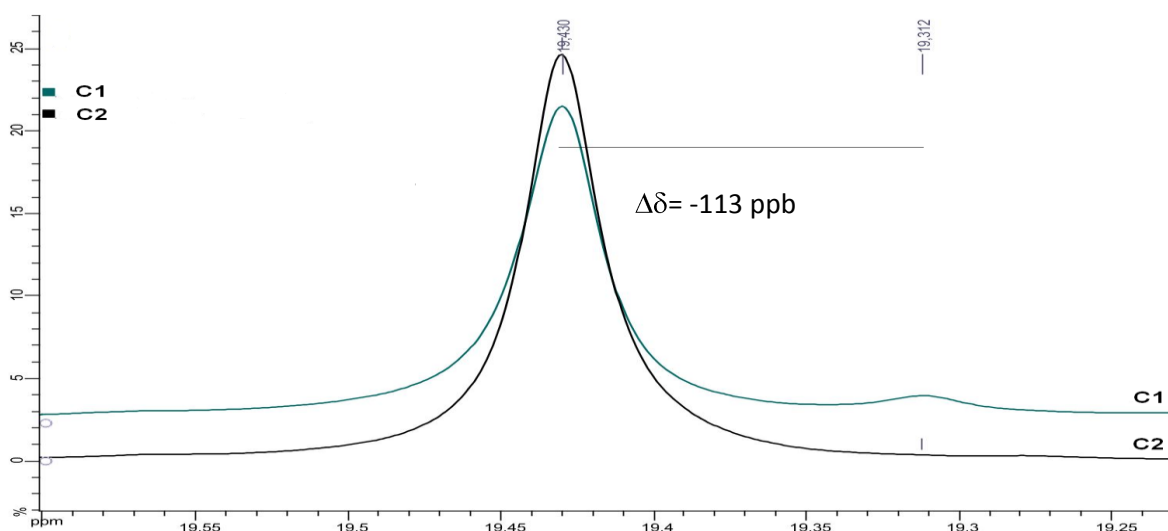
**Figure 21.** Comparaison entre les signaux de groupement  $^{13}\text{CH}_3$  en C-2 du  $2\beta$ -méthyltetrahymanol et du  $2\alpha$ -méthyltetrahymanol dont l'un est isolé après incorporation de  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (1 mM, A) et l'autre après incorporation du  $(5R)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose (1 mM, B).

Des observations similaires sur les  $\beta$ -shifts du méthyle marqué au  $^{13}\text{C}$  ont été faites pour le  $2\beta$ -méthyldiplotérol et le  $2\beta,20\alpha$ -méthyltetrahymanol et le  $2\alpha$ -méthyldiplotérol avec un  $\beta$ -shift de -121 ppb pour le méthyle C- $2\beta$  et de -110 ppb pour le méthyle C- $2\alpha$ . A nouveau, comme précédemment, les intensités des signaux shiftés sont plus faibles que celles observées pour l'incubation de  $(5R)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -DX (Figure 22).

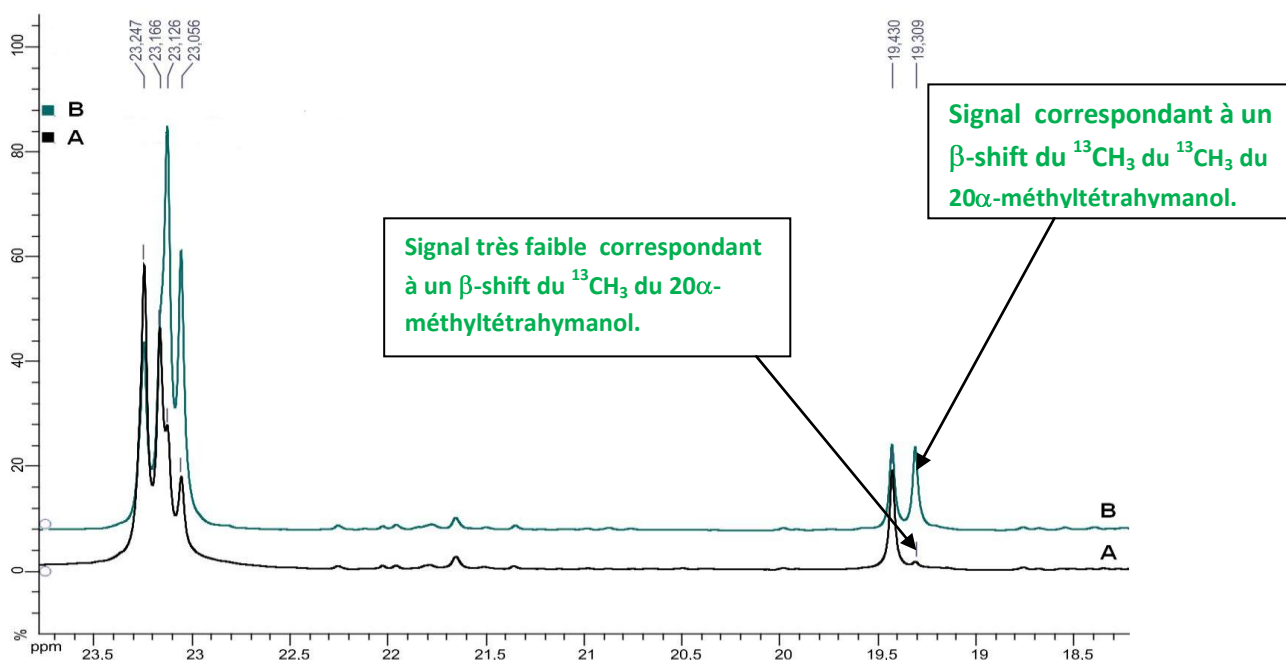
Au niveau du groupement méthyle en C-20 du  $20\alpha$ -méthyltetrahymanol et après incorporation du  $(5S)$ - $(5\text{-}^2\text{H}_1)$ -1-désoxy-D-xylulose, un signal très faible correspond à un  $\beta$ -shift de -113 ppb du signal du groupement méthyle à 19,430 ppm (Figure 22 A et B, Figure 23 et Figure 24 A et B).



**Figure 22.** Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  correspondant aux signaux des méthyles enrichis en  $^{13}\text{C}$  du mélange du 2 $\beta$ -méthyldiplotérol, 2 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol et 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol isolés sans incorporation du (5S)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (**A**, signal du bas) et du même mélange de triterpénoïdes isolés après incorporation du (5S)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (1 mM, signal B) en présence de ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine.



**Figure 23.** Extrait des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  correspondant aux signaux des méthyles enrichies en  $^{13}\text{C}$  d'un mélange du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol, 2 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol et 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol isolés sans incorporation du (5S)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (C2) et du même mélange de triterpénoïdes isolés après incorporation du (5S)-(5- $^2\text{H}_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (C1, 1 mM) en présence de ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine. Cet extrait présente un agrandissement de la zone du signal du méthyle en C-20 $\alpha$  sur le squelette gammacérane où l'on peut constater la présence d'un signal très faible à 19,312 ppm qui correspond à un  $\beta$ -shift de -113 ppb du signal du groupement de méthyle en C-20 $\alpha$  à 19,430 ppm (C1).



**Figure 24.** Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  : signaux des méthyles enrichies en  $^{13}\text{C}$  d'un mélange du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol, 2 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol et 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol isolés après incorporation de (5S)-(5- $^2\text{H}_1$ )-désoxy-D-xylulose (1 mM, A) et du même mélange de triterpénoïdes isolés après incorporation de (5R)-(5- $^2\text{H}_1$ )-désoxy-D-xylulose (1 mM, B) en présence de ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine.



## VII. Conclusion

L'incubation des deux diastéréomères du DX deutériés en C-5, le (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX et le (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX avec une culture de *Bradyrhizobium japonicum* en présence de (<sup>13</sup>C-méthyl)-méthionine pour enrichir l'abondance isotopique du méthyle transféré a fourni des indications sur la stéréochimie de la méthylation en C-2 des squelettes hopane ou gammacérane et en C-20 du squelette gammacérane, deux atomes de carbone sp<sup>3</sup> non activés.

Une incubation préliminaire de (CD<sub>3</sub>)-DX a été effectuée. Elle a montré que le désoxyxylulose exogène ajouté au milieu de culture dans les unités isopréniques est efficacement incorporé : environ 88 % des unités isopréniques sont dérivés du ce DX deutérié exogène, et 12 % proviennent de DX d'abondance naturelle synthétisé à partir des sources de carbone non marquées disponibles dans le milieu. Les conditions de culture étant identiques pour toutes les incubations, nous admettrons que les contributions de DX exogène marqué et de DX d'abondance naturelle synthétisé *de novo* sont sinon identiques, du moins très similaires pour toutes les expériences, en particulier lors des incubations des isotopomères du DX sélectivement deutériés en C-5.

L'incubation du (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX a conduit majoritairement à une rétention du deutérium en C-2 dans le 2β-méthyldiploptérol et le 2β-méthyltétrahymanol (isomères méthylés majoritaires) ainsi que dans les isomères minoritaires méthylés en C-2α. Une présence significative des isotopomères non deutériés en C-2 est cependant relevée (Figure 24). Les proportions relatives des aires des signaux shifté et non-shifté du méthyle enrichi en <sup>13</sup>C transféré (correspondant respectivement à la présence ou à l'absence de deutérium en C-2) sont respectivement estimés à environ 65% et 35%, et cela pour les deux séries méthylées en C-2β et C-2α. Si l'on tient compte de la contribution du DX d'abondance naturelle synthétisé *de novo* (12% du DX total engagé dans la synthèse des unités isopréniques), cela correspond à 75% de rétention et à 25% de perte en deutérium, et donc à un remplacement préférentiel de l'hydrogène en C-2β par le groupement méthyle introduit.

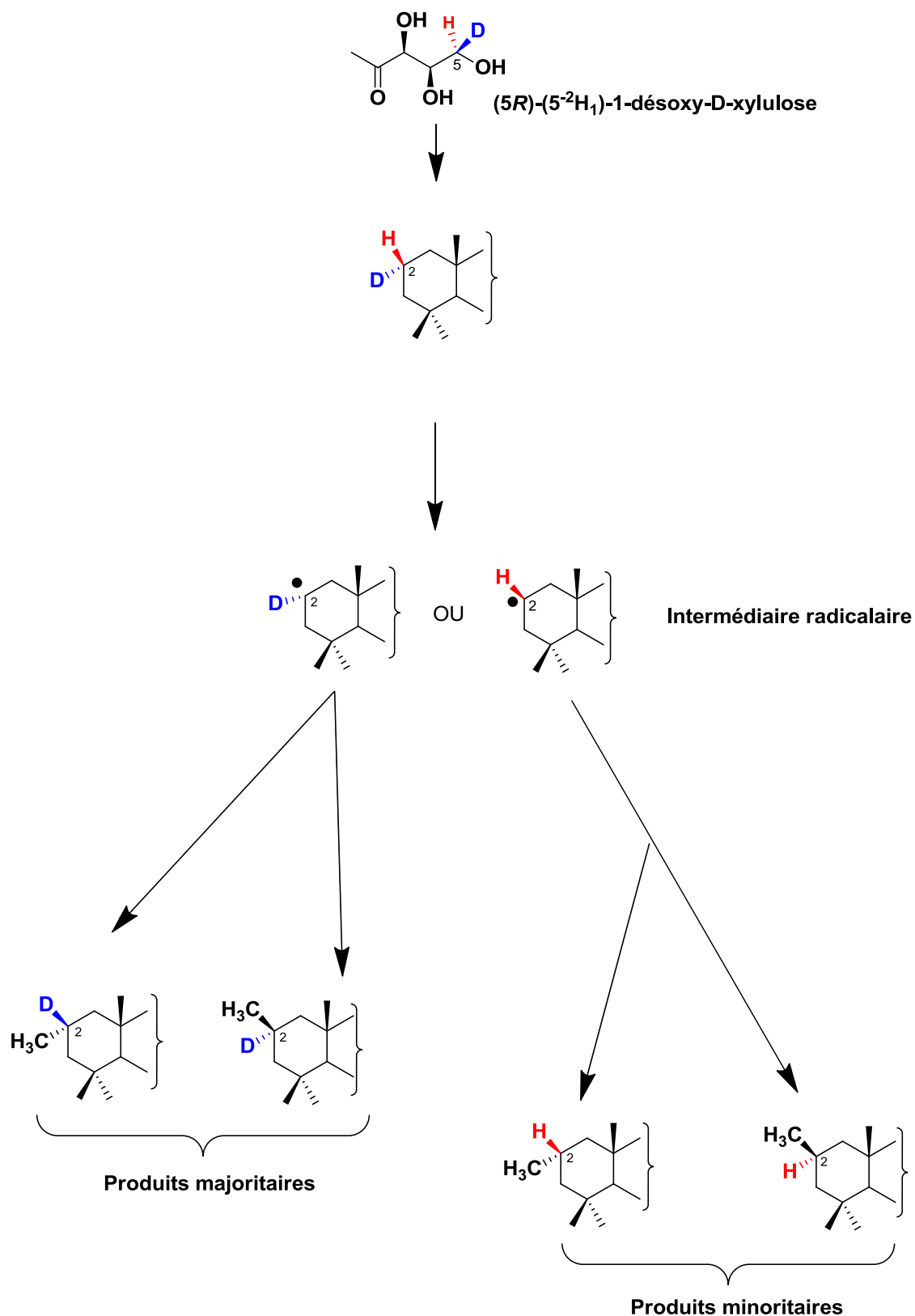
L'incubation de l'autre diastéréomère deutérié en C-5, le (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX, apporte une information complémentaire. Les proportions relatives des aires des signaux shiftés et non-shiftés sont évaluée à 28 % et 72 %, ce qui correspond majoritairement à une perte de deutérium en C-2 $\beta$  (70 %) et à une faible rétention (30 %). A nouveau, c'est l'hydrogène en C-2 $\beta$  qui a été remplacé par le groupement méthyle (Figure 21, Figure 25).

Lors du processus de méthylation en C-2 pour donner les 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes comme les 2 $\alpha$ -méthylhopanoïdes, c'est l'hydrogène en C-2 $\beta$  est préférentiellement éliminé pour donner selon notre schéma hypothétique un radical secondaire conduisant préférentiellement à la série méthylée en C-2 $\beta$  avec rétention de configuration ou à la série C-2 $\alpha$  avec inversion de configuration. Un seul gène de méthyltransférase à radical SAM a été identifié dans le génome de *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1, *Methylobacterium* spp. et d'autres  $\alpha$ -protéobactéries comme *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 qui conduit essentiellement/uniquement à des 2 $\beta$ -méthylhopanoïdes (Welanders *et al.*, 2010), les 2 $\alpha$ -méthylhopanoïdes n'ayant, à une exception près de notre laboratoire (Stampf *et al.*, 1991), n'ayant jamais été signalés. Chez *B. japonicum* est ce la même enzyme qui conduit aux deux séries méthylées en C-2 ou il a t'il deux enzymes ? Quels sont les critères qui régissent la stéréochimie du transfert de méthyle pour aboutir aux séries méthylées soit en C-2 $\beta$  ou en C-2 $\alpha$  ?

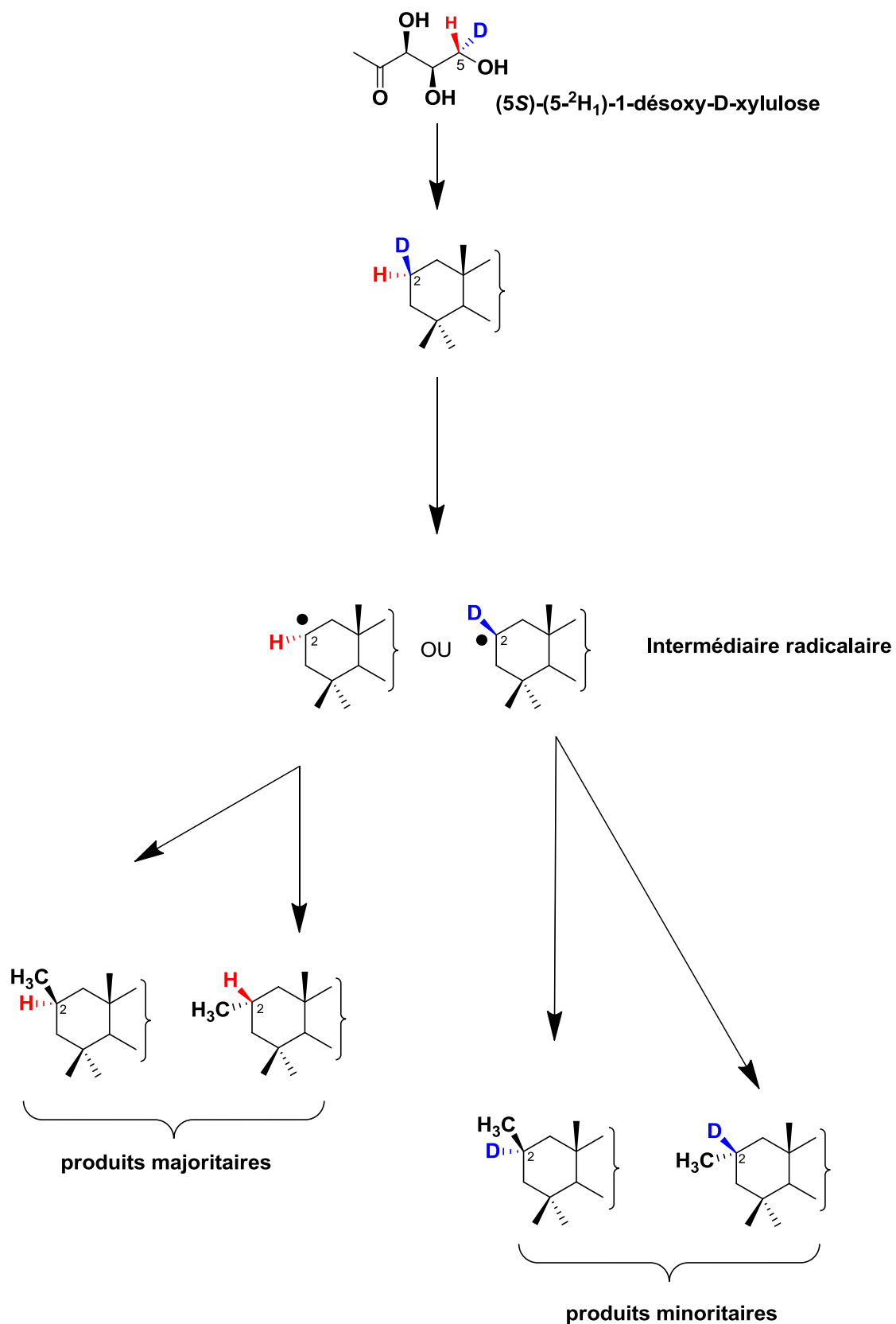
Pour la méthylation en C-20 du squelette gammacérane, seul l'isomère méthylé en C-20 $\alpha$  est connu. L'incubation du (5R)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX conduit presque indifféremment à une perte (48 %) ou à une rétention (52 %) de deutérium d'après les intensités relatives des signaux du méthyle C-20 $\alpha$  non-shifté ou shifté et en tenant compte de la contribution du DX d'abondance naturelle synthétisé *de novo*. Par contre, l'incubation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX conduit presque exclusivement à une perte de deutérium et à une rétention d'hydrogène (92 %) et à une faible rétention de deutérium et perte d'hydrogène (8 %) (Figure 23), ce qui correspond globalement à une rétention de configuration au niveau du carbone C-20 méthylé (Figure 26).

Ces résultats sur la méthylation en C-20 sont très différents de ceux obtenus sur la méthylation en C-2. Ils sont actuellement difficilement interprétables. Même si

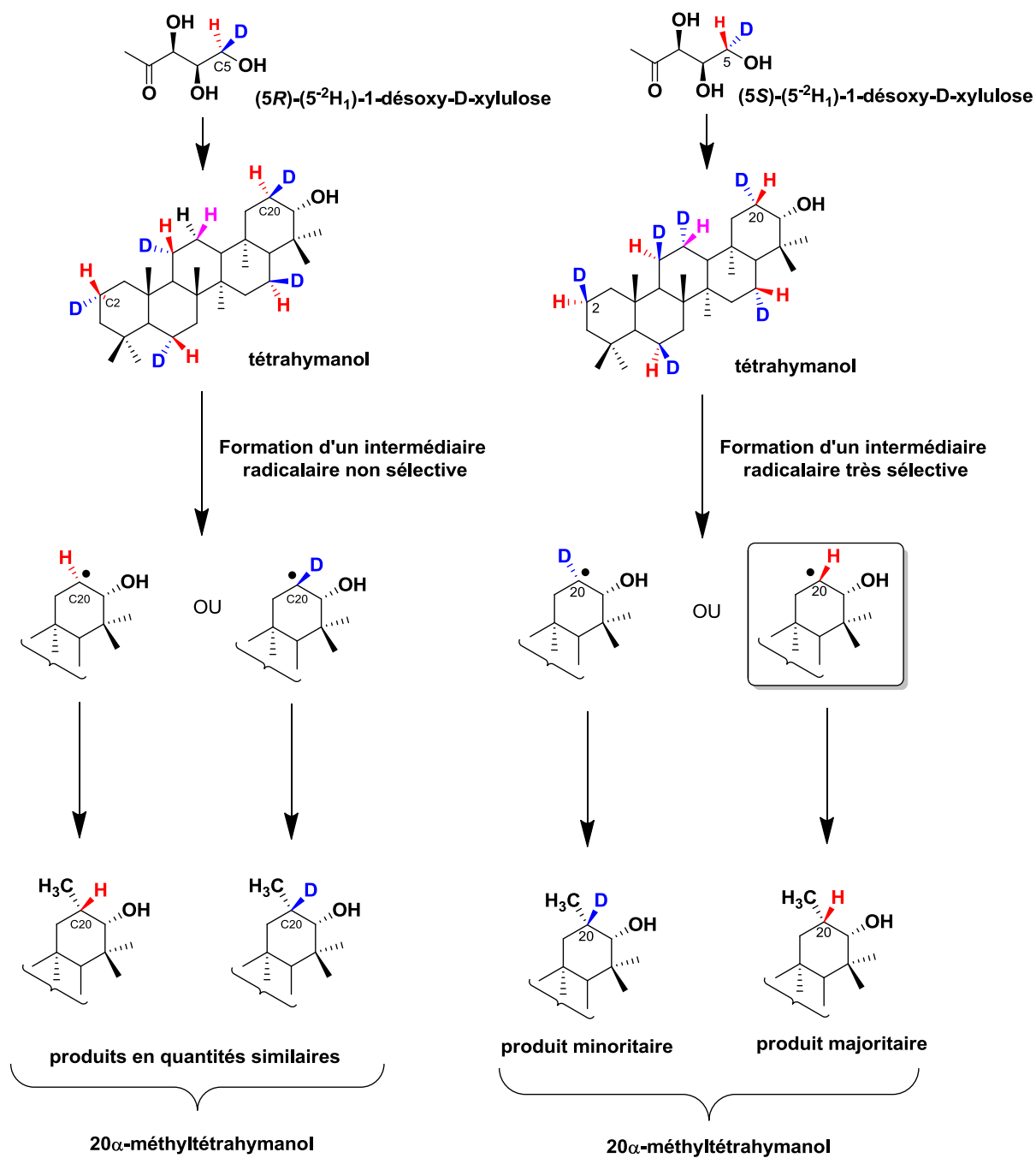
l'incubation de (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX suggère que le transfert de méthyle se fait avec rétention de configuration en C-20 comme pour la biosynthèse des 2β-méthylhopanoïdes, la discordance des résultats des incubations des deux isotopomères du DX, (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX et (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX, pose problème. Un effet isotopique primaire ne donne pas d'explication satisfaisante. Est-ce la même enzyme qui méthyle en C-2β et en C-20α (à noter que les positions C-2β et C-20α sont symétriques l'une par rapport à l'autre sur le squelette gammacérane) ou sommes-nous en présence de deux enzymes ?



**Figure 24.** Isotopomères en C-2 du tétrahymanol et du diploptérol méthylés en C-2 obtenus après l'incorporation du  $(5R)-(5-^2H_1)$ -1-désoxy-D-xylulose chez *Bradyrhizobium japonicum*.



**Figure 25.** Isotopomères en C-2 du tétrahymanol et du diploptérol méthylés en C-2 obtenus après l'incorporation du (5S)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-1-désoxy-D-xylulose chez *Bradyrhizobium japonicum*.



**Figure 26.** Isotopomères en C-20 du  $20\alpha$ -méthyltétrahymanol obtenus après incorporation de  $(5R)-(5-^2H_1)$ -1-désoxy-D-xylulose ou de  $(5S)-(5-^2H_1)$ -1-désoxy-D-xylulose chez *Bradyrhizobium japonicum*.

## VIII. Partie expérimentale

### VIII.1 Techniques biologiques

#### VIII.1.1 Cultures

Les milieux pour les bactéries sont stérilisés pendant 20 min à 120°C. Quand les milieux contiennent du glucose, ce dernier est stérilisé à part, ce qui évite le brunissement du milieu et la formation d'éventuels inhibiteurs de croissance. Les microorganismes sont cultivés dans des fioles d'Erlenmeyer contenant le milieu (300 à 500 mL) obturées par une bourre de coton hydrophile. L'ensemencement se fait stérilement à partir de précultures (10 à 20 mL) cultivés sur le même milieu. La température de culture est en général de 30°C, et l'agitation s'effectue avec une vitesse de 200 rpm.

#### VIII.1.2 Milieu de culture des *Methylobacterium organophilum*

*Methylobacterium organophilum*, peut être cultivé sur un milieu riche (Hestrin et Schramm, 1954) ou sur un milieu minimum (AMS), en utilisant le méthanol comme la seule source de carbone (Whittenbury *et al.*, 1970).

En général, pour les expériences d'incubation, les bactéries sont cultivées dans le milieu minimum.

Milieu Hestrin and Schramm : glucose 20 g/L; peptone 5g/L ; extrait de levure 5g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7g/L ; acide citrique 1,17g/L, pH = 6,0.

Milieu Minimum (AMS) : MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1%; CaCl<sub>2</sub> 0,02% ; sel de Mohr 0.0004%; NH<sub>4</sub>Cl 0,05%; trace element solution (Pfennig) 0,05%; 2% (v : v) (solution phosphate de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ; 15 g dans 300 ml d'eau distillée, pH 6,8) ajouté au milieu après refroidissement. pH = 6,8.

Agar : 15 g/L (pour les milieux solides).

Trace element solution pour 1L d'eau: Na<sub>2</sub>EDTA 3 g ; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,10 g ; COCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 190 mg; MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 50 mg; ZnCl<sub>2</sub> 42 mg; NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O 26,5 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 18 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 300 mg ; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2 mg. pH = 6.

Pour le milieu minimum, du méthanol (concentration finale 0,5%) est ajouté au milieu comme la seule source de carbone après stérilisation (filtration sur des microfiltres de 0,22 µm).

La ( $^2\text{H}_3$ -méthyl)-méthionine (enrichissement isotopique de 98%) et la ( $^{13}\text{C}$ -méthyl)-méthionine (enrichissement isotopique de 99%).

Les solutions de Pfennig, de phosphate et de glucose sont stérilisées à part.

### **VIII.1.3 Milieu de culture de *Bradyrhizobium japonicum* (YMA)**

La souche lyophilisée de *B. japonicum* USDA 110 a été mise en préculture dans un milieu synthétique dont la composition a été mise au point par le Dr. E. Kannenberg.

Milieu YMA:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g; NaCl 0,1 g; D-Mannitol 10 g; extrait de levure 1 g ; Agar 12 g ; eau desionisée 1000 mL ; PH = 6,8.

Durée de culture : huit jours.

### **VIII.1.4 Récolte**

Tous les microorganismes sont récoltés pendant 20 min à 7000 g sur une centrifugeuse Beckman J2-HS réfrigérée à 4°C.

## **VIII.2 Techniques analytiques**

### **VIII.2.1 Chromatographie sur couche mince**

La chromatographie sur couche mince est effectuée, suivant la quantité du produit à séparer, soit sur des plaques de gel de silice Merck 60F254 de 0,5 mm, soit sur des plaques de gel de silice Merck 60F254 de 0,25 mm d'épaisseur. Les produits sont visualisés à la lumière ultra-violette à 366 nm après aspersion par une solution à 0,1% de la berbérine dans l'éthanol.

### **VIII.2.2 Chromatographie en phase gazeuse**

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse sont effectuées sur un appareil Agilent Technologies équipé d'une colonne capillaire (30m x 0,32mm) et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'hydrogène. Les produits sont injectés dans le chloroforme sur injecteur "on column". Ils sont analysés en programmation de température de 55 à 250 °C (12°C/min), de 250 à 300°C (3°C/min) suivie d'un palier de 12 min à 300°C.



### VIII.2.3 Silylation

Aux alcools à silyler ajouter en excès un mélange 1 :1 de pyridine anhydre et de *N,O*-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) contenant 1% de chlorure de triméthylsilyle. Laisser réagir 1 h à température ambiante.

## VIII.3 Séparation des triterpénoïdes

Les quantités indiquées conviennent pour l'analyse d'une masse de 1 à 5 g de microorganismes lyophilisés, ce qui représente les conditions habituelles.

### VIII.3.1 Extraction de microorganismes

Après récolte, les microorganismes sont congelés et lyophilisés, puis extraits sous reflux trois fois pendant 1 h avec du chloroforme-méthanol (2 :1, 50 mL). Les cellules lyophilisées de *B. japonicum* sont extraites par du toluène (six fois) à reflux pendant 40 min. Après filtration, les extraits sont réunis et évaporés à sec.

### VIII.3.2 Saponification des extraits bactériens

A l'extrait brut obtenu, ajouter une solution de KOH à 6% dans le méthanol (15 mL). Agiter 1 h sous reflux. Après addition d'eau (10 mL), extraire les lipides trois fois à l'hexane (10 mL). La phase organique est ensuite séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée à sec.

### VIII.3.3 Séparation par CCM des triterpènes après la saponification

Les produits sont séparés par CCM par deux migrations successives dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Les bandes prélevées chez les *Methylobacterium* spp. sont le diploptène ( $R_f = 0,86$ ) et le mélange diploptérol/ 2 $\beta$ -méthyldiploptérol ( $R_f = 0,57$ ) et chez *Bradyrhizobium japonicum* sont le mélange tétrahymanol / 2 $\beta$ -méthyltétrahymanol ( $R_f=0,25$  ; 1,6 mg/g), le mélange diploptérol/ 2 $\beta$ -méthyldiploptérol ( $R_f = 0,32$  ; 1,7 mg/g), le mélange 20 $\alpha$ -méthyltétrahymanol/ 2 $\beta$ , 20 $\alpha$ -diméthyltétrahymanol ( $R_f = 0,56$  ; 0,3 mg/g). Les quantités des triterpénoïdes sont indiquées par gramme des cellules sèches de *Bradyrhizobium japonicum*.

#### **VIII.3.4 Activité de la désoxy-D-xylulose kinase dans les extraits bactériens**

Les culots bactériens congelés de *Methylobacterium* et de *Bradyrhizobium* ont été broyés séparément dans un mortier en présence d'azote liquide et d'un tampon Tris-HCl (1 ml, 50 mM, pH 7,5 contenant 0,5 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle ainsi que du  $\beta$ -mercaptoéthanol (5 mM). La poudre a été collectée dans des tubes Eppendorf de 2 mL, centrifugée après décongélation pendant 30 min à 17000 g. Le surnageant a été récupéré. Le tampon utilisé pour le test d'activité est un tampon Tris (50 mM, pH 8) contenant et contient  $MgCl_2$  (25 mM), KF (10 mM) et du dithiothréitol (1 mM). La concentration initiale d'ATP utilisé est de 15 mM et celle du ( $^{14}C$ )-1-désoxy-D-xylulose est de 3 mM. La réaction enzymatique est initiée lors de l'addition du système acellulaire bactérien (5  $\mu$ L). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 h. Après l'incubation, ce milieu (4  $\mu$ L) est déposé sur une plaque de silice préparative de 0,25 mm d'épaisseur et la migration est effectuée dans un mélange de isopropanol/eau/acétate d'éthyle (6 :3 :1, v /v /v) dans une chambre froide pour séparer le DX ( $R_f = 0,73$ ) du DXP formé ( $R_f = 0,45$ ) (Hemmerlin *et al.*, 2006).

La mesure de la radioactivité du  $^{14}C$ -DX et du  $^{14}C$ -DXP est effectuée à l'aide d'un TLC–Analyser équipé d'une sonde de rayon Beta (Tritsch *et al.*, 2004).

#### **VIII.3.5 Résonance magnétique nucléaire**

Suite aux quantités minimales obtenues des triterpénoïdes méthylés après la purification sur plaque préparative de silice, les analyses de résonance magnétique nucléaire de carbone sont effectuées en utilisant des microtubes (diamètre 2,5 mm). Le solvant utilisé est le  $CDCl_3$ . Les analyses ont été effectuées sur un appareil Bruker 500 MHz équipé d'une cryosonde.

**Chapitre IV**

**Synthèse de la**  
**méthylcobalamine**  
**marquée en  $^{13}\text{C}$  sur le**  
**méthyle**

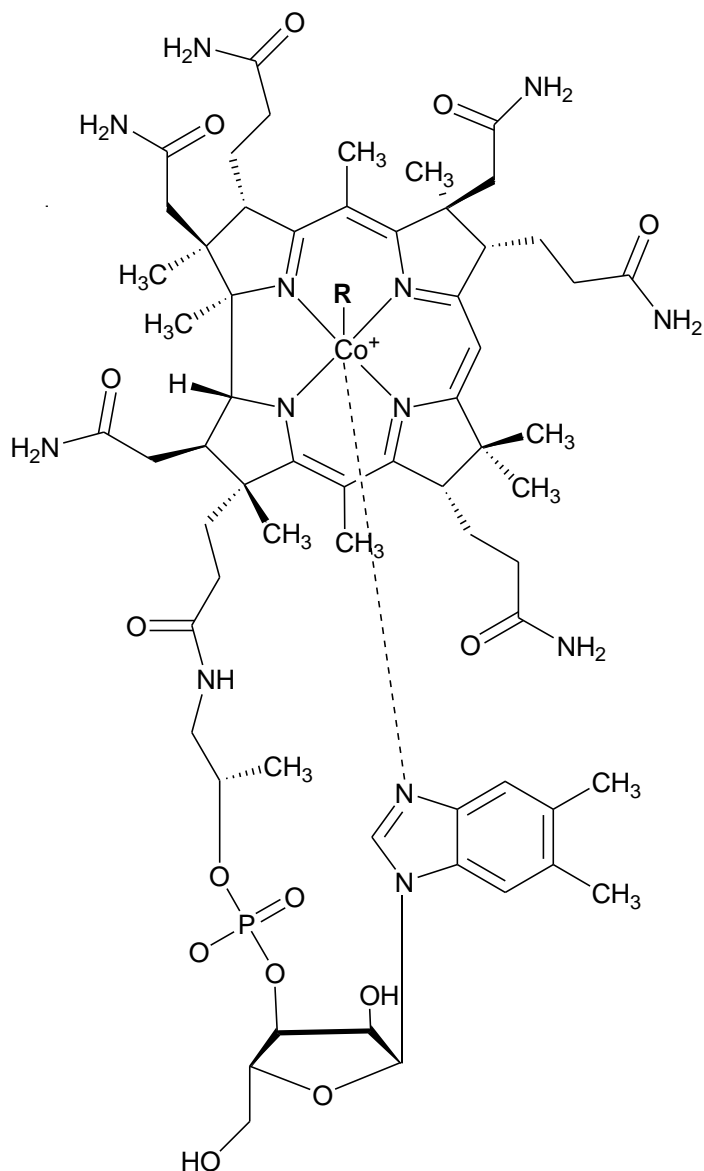
## I. INTRODUCTION

La vitamine B<sub>12</sub>, ou cobalamine, peut exister naturellement sous forme d'hydroxycobalamine (ou aquocobalamine), de coenzyme B<sub>12</sub> et de méthylcobalamine (Figure 1).

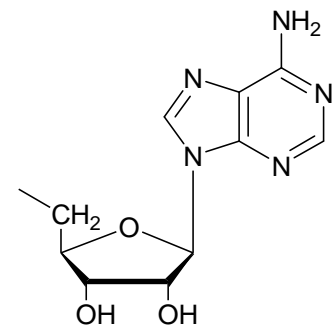
Ces différents composés peuvent être à l'état libre et/ou liés à des protéines. La vitamine B<sub>12</sub> est généralement ajoutée sous forme de cyanocobalamine dans les aliments complétés (Figure 1). La structure de cette vitamine est composée d'un noyau corrine centré sur un ion cobalt, un groupement chimique variable R lié à l'atome de cobalt et un nucléotide constitué de phosphoribose et de 5,6-diméthylbenzimidazole.

Cette vitamine joue un rôle essentiel dans l'assimilation des acides aminés, dans la synthèse de l'ADN, la formation des globules rouges et le fonctionnement du système nerveux ainsi que dans de nombreux processus enzymatiques comme dans le cas de la conversion de l'homocystéine en méthionine.

Le coenzyme B<sub>12</sub> est le coenzyme qui permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, molécule intervenant ensuite dans le cycle de Krebs (Ellenbogen, 1984 ; Scott, 1997).



R = CN pour la cyanocobalamine  
 R= OH pour l'hydroxycobalamine  
 R= H<sub>2</sub>O pour l'aquocobalamine  
 R= CH<sub>3</sub> pour la méthylcobalamine  
 R= 5'-déoxyadénosyl pour le coenzyme B12



**Figure 1.** Structures des différentes cobalamines.

Plusieurs anomalies de la division cellulaires peuvent être causées par une hypovitaminose de la vitamine B<sub>12</sub>, tout particulièrement au niveau des cellules du sang avec risques d'anémie du fait de la difficulté de synthèse de l'ADN. Des inflammations de la peau et des muqueuses et des troubles psychologiques peuvent aussi se manifester. Il n'y aurait pas d'hypervitaminose. Pour un adulte, la prise recommandée est de 1 µg par jour.

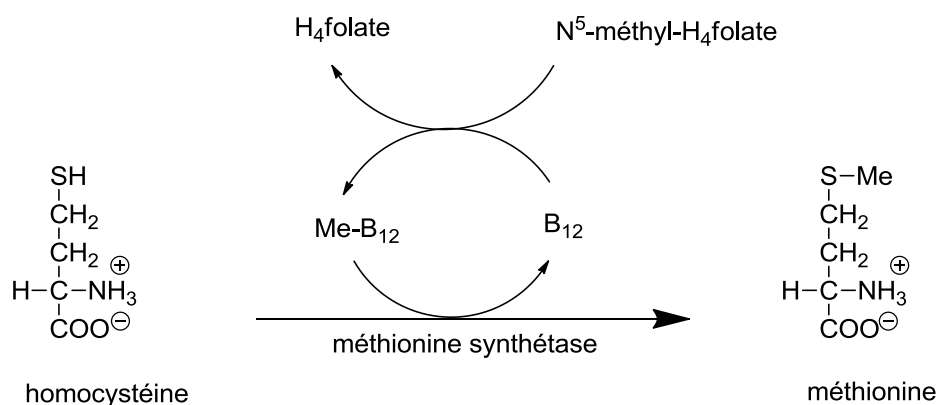
Le tableau 1 présente les teneurs en ng.g<sup>-1</sup> de la vitamine B<sub>12</sub> présentent dans les aliments (Souci *et al.*, 1994).

Aliment	Teneur (ng.g <sup>-1</sup> )
<i>Produits carnés</i>	
foie de bœuf	650
foie de porc	230-550
rognon de veau	140-400
gigot de mouton	30
filet de bœuf	20
lard	3,0-12,0
jambon	5,7-6,1
<i>Poissons, mollusques, crustacés</i>	
huître	146
maquereau	50,0-140
hareng	50,0-120
thon	37,0-48,0
saumon	28,9
crevette	7,3-17,1
cabillaud	4,5-12,8
<i>Produits laitiers</i>	
camembert (30% m.g)	29,0-35,0
gruyère	20
œuf	8,4-31,3
fromage blanc maigre	7,5-10,0
lait entier	3,0-7,6
lait écrémé	3
yaourt	0,8-1,0

**Tableau 1.** Teneurs en vitamine B12 de différents aliments (selon Souci *et al.*, 1994).

## II. Méthylcobalamine

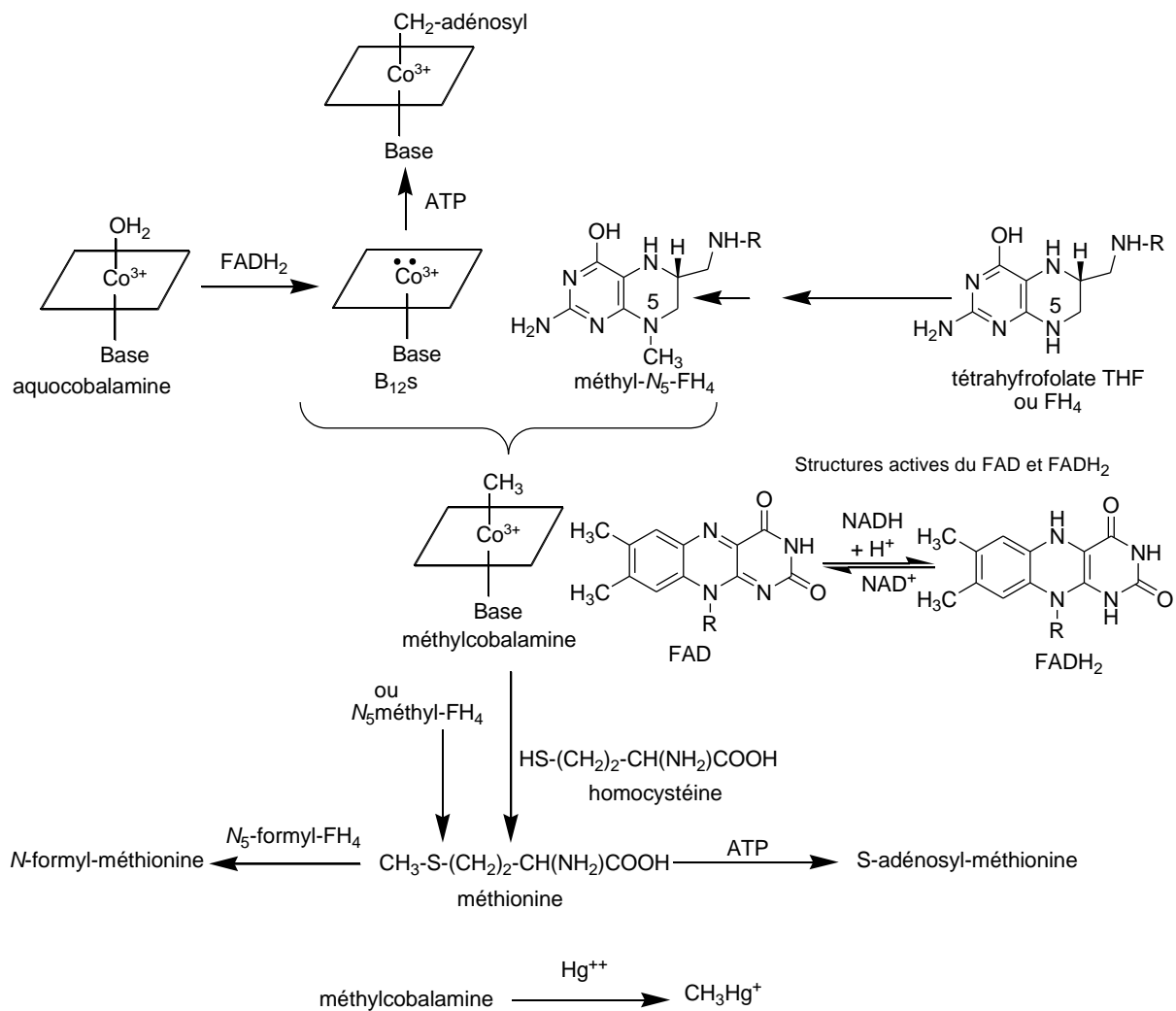
Chez les mammifères, la méthylcobalamine est l'agent de la méthylation de l'homocystéine catalysée par la méthionine synthétase (Col *et al.*, 2007) (Schéma 1). Dans les bactéries méthanogènes, la méthylcobalamine peut intervenir dans la production du méthane par protolyse (Gottschalk et Thauer, 2001). Dans les microorganismes produisant de l'acide acétique, la méthylcobalamine transfère un groupe méthyle sur le CO<sub>2</sub> (Poston *et al.*, 1964 ; Ljungdahl *et al.*, 1966).



**Schéma 1.** Biosynthèse de la méthionine.

La méthylcobalamine est formée à partir de l'aquocobalamine, qui, en présence de FADH<sub>2</sub>, est réduite en vitamine B<sub>12s</sub> (Cob(I)alamine) capable d'être méthylée par le N<sub>5</sub>-méthyl-FH<sub>4</sub>. Elle est une source de groupes méthyles, sous formes de radicaux, d'ions carbonium ou de carbanions. L'homocystéine est méthylée en méthionine qui a son tour peut être transformée en N-formyl-méthionine sous l'action du N<sub>5</sub>-formyl-FH<sub>4</sub>. La N-formyl-méthionine est nécessaire à la biosynthèse des protéines dans les ribosomes bactériens (Hauschild-Rogat, 1968). La méthionine mise en présence d'ATP conduit à la S-adénosylméthionine, agent de méthylation important n'utilisant que des équivalents d'ions carboniums méthyles.

La méthylcobalamine est aussi capable de transférer le groupe méthyle aux ions mercuriques. L'ion méthylmercurique qui en résulte est stable et soluble dans l'eau. (Choi *et al.*, 1994) (Schéma 2).



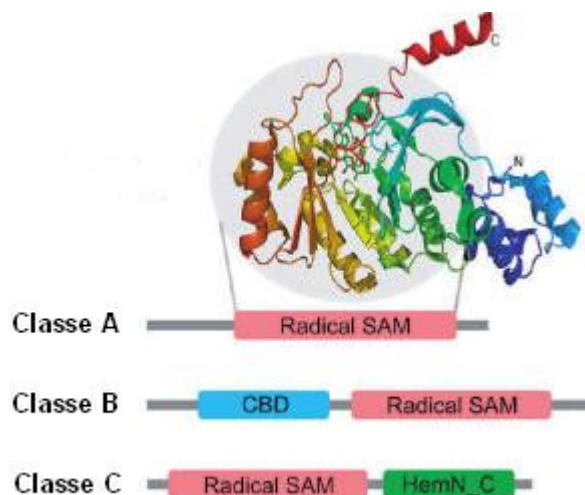
**Schéma 2.** Formation de la méthylcobalamine et métabolisme.

### III. Méthyltransférases B<sub>12</sub> dépendantes

Les transferts de méthyle catalysés par des méthyltransférases dépendantes de la vitamine B<sub>12</sub> sont considérés comme les réactions les plus importantes dans le métabolisme humain, animal et bactérien. Ces enzymes contrôlent des réactions de la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine (méthionine synthétase), de la formation du méthane chez les bactéries méthanogéniques (méthane synthétase) ainsi que dans la fixation du dioxyde de carbone via la voie de l'acétyl-coenzyme A (acétate synthétase). La méthylcobalamine a été identifiée aussi comme cofacteur de plusieurs enzymes à radical SAM et agent donneur de méthyle (Frey *et al.*, 2007).



Les analyses de séquences des différentes méthyltransférases à radical SAM identifiées peuvent être regroupées dans trois classes A, B et C selon le mécanisme de la réaction catalysée et l'architecture de la protéine. Les méthyltransférases de classe A qui comportent principalement les méthyltransférases d'ARN ribosomiale (Cfr et RlmN), ont un seul domaine canonique de radical SAM. En revanche, les méthyltransférases de classe B contiennent un domaine de fixation de la méthylcobalamine à l'extrémité N-terminale de la protéine (Sofia *et al.*, 2001) et un domaine pour le radical SAM à l'extrémité C-terminale. Les méthyltransférases de classe C présentent une similarité significative de séquence avec la coproporphyrinogène oxydase HemN. Ces méthyltransférases comportent un domaine de fixation du substrat à l'extrémité C-terminale à côté du domaine du radical SAM (Layer *et al.*, 2003)(Figure 3)

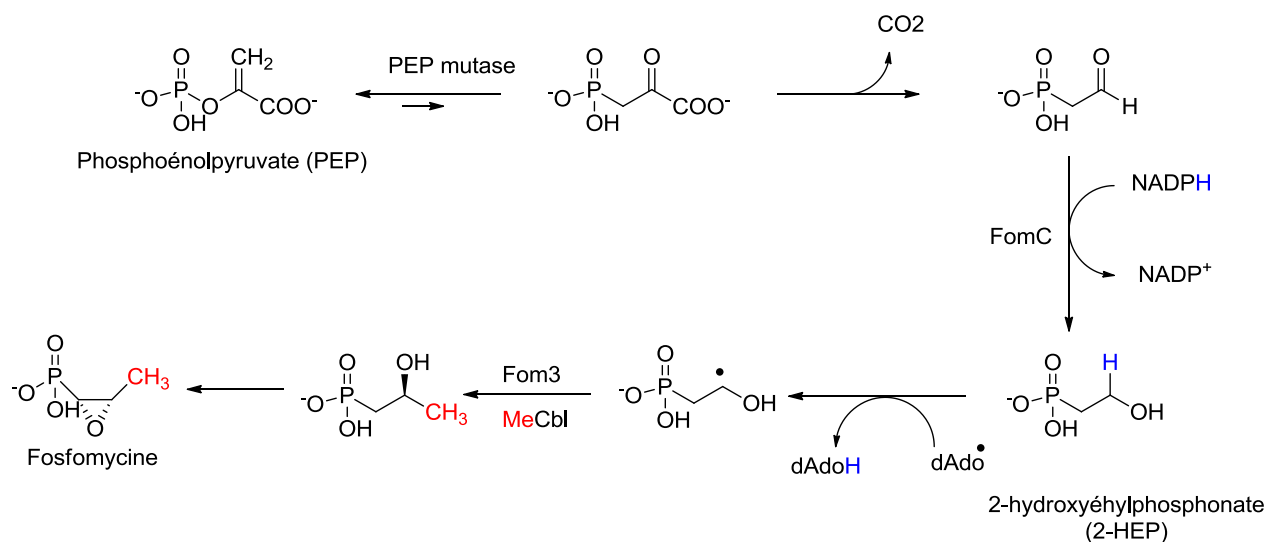


**Figure 3.** Structures des domaines des différentes classes des méthyltransférases.

### III.1 Les méthyltransférases de classe B

Les méthyltransférases de classe B sont des méthyltransférases à radical SAM dont la structure présente deux domaines : l'un pour la fixation de la méthylcobalamine à l'extrémité N-terminale de la protéine et l'autre à l'extrémité C-terminale, qui correspond au domaine de fixation du radical SAM. Cette classe comporte des enzymes capables de méthyler des carbones  $sp^3$  non activés, des hétérocycles aromatiques et des phosphinates (woodyer *et al.*, 2007 ; Liao *et al.*, 2009 ; Kamigiri

*et al.*, 1992). L'utilisation de la méthylcobalamine par ces enzymes a été prouvé par des incorporation de méthylcobalamine marquée au  $^{14}\text{C}$  dans la biosynthèse de la fosfomycine qui ont suggéré que le 2-hydroxyéthylphosphonate (2-HEP) est méthylyé par la Fom3 (Kuzuyama *et al.*, 1992) (Schéma 3).



**Schéma 3. Voie de la biosynthèse de la fosfomycine.** La Fom3 catalyse le transfert du groupement de méthyle de la méthylcobalamine vers le HEP (Kuzuyama *et al.*, 1992).

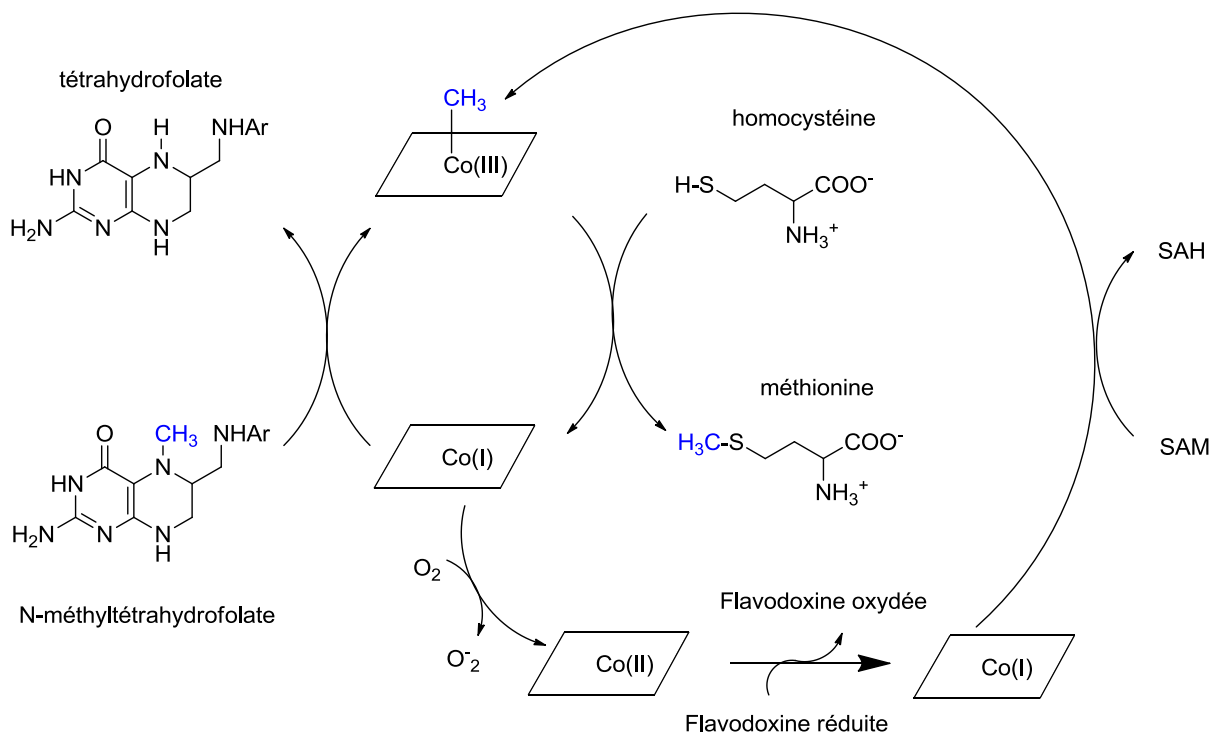
Des études de la stéréochimie des réactions de méthylation dans les voies de biosynthèses de quelques produits naturels ont été réalisées en utilisant de la SAM possédant un méthyle chiral. Elles ont montré une rétention de la stéréochimie au niveau du méthyle et non pas une inversion de configuration comme celle qui serait obtenue par simple substitution nucléophile  $\text{S}_{\text{N}}2$  (Houck *et al.*, 1986 ; Zhou *et al.*, 1989, Frenzel *et al.*, 1990). Un mécanisme plausible de la réaction de méthylation catalysée par les méthyltransférases de classe B a été proposé en se fondant sur la chimie générale des protéines à radical SAM et sur la rétention de configuration de la stéréochimie du méthyle (Van der donk, 2006 ; woodyer *et al.*, 2007 ; Metcalf et Van der donk, 2009). Le radical  $\text{Ado}^\bullet$  obtenu par le clivage réductif de la SAM arracherait un atome d'hydrogène du substrat pour former un radical intermédiaire. La réaction de ce radical avec la MeCbl conduit à la formation du substrat méthylyé avec la libération de la cob(II)alamine (Mosimann et Kräutler, 2000). En revanche, la stéréochimie du transfert homolytique du groupement de méthyle est inconnue : on

pensait qu'une inversion de configuration aurait lieu. Finalement, la régénération de la méthylcobalamine est accomplie via une méthylation réductive de la cob(II)alamine par la SAM, avec une inversion de configuration au niveau du méthyle. Une molécule de flavodoxine réduite va servir à transférer un électron dans cette dernière étape comme dans le cas de la méthionine synthétase (Matthews, 2001 ; Matthews *et al.*, 2008) (Schéma 4). La rétention globale de configuration du méthyle transféré proviendrait donc de deux inversions de configuration consécutives (Zhang *et al.*, 2011).



**Schéma 4.** Cycle catalytique proposé pour les méthyltransférases de classe B (Zhang *et al.*, 2011).

La chimie de la MeCbl prédite pour les méthyltransférases de classe B présente une certaine similitude avec celle de la méthionine synthétase (MetH), qui est une enzyme cobalamine-dépendante modulaire composée de quatre domaines distincts. L'extrémité C-terminale de MetH contient un domaine de liaison pour la méthylcobalamine et un autre pour la SAM qui se ressemblent à l'architecture supposée pour les méthyltransférases de classe B. La MetH catalyse le transfert du groupement de méthyle du méthyltétrahydrofolate (Me-FH<sub>4</sub>) à l'homocystéine, dans lequel la cobalamine joue le rôle d'un cofacteur qui oscille entre les deux formes, MeCbl et cob(I)alamine, comme elle est alternativement déméthylé par l'homocystéine et re-méthylé par le Me-FH<sub>4</sub>. Le domaine de liaison de la SAM dans la MetH est impliqué dans la méthylation réductive du co(II)balamin, produit par l'oxydation du co(I)balamin par une molécule d'oxygène (Matthews, 2001 ; Matthews *et al.*, 2008)(Schéma 5).



**Schéma 5.** Cycle catalytique de la méthionine synthétase.

Ce mécanisme de réparation de MetH montre qu'en plus du Me-FH<sub>4</sub>, la SAM peut également être un donneur de groupement de méthyle pour la cobalamine dans certaines conditions.

La stéréochimie de la réaction de méthylation catalysée par MetH, dans laquelle la rétention de configuration est observée dans l'ensemble réactionnel (Zydowsky *et al.*, 1986), est compatible avec les différentes réactions de méthylation et de déméthylation de la cobalamine. La différence majeure entre la MetH et les méthyltransférases de classe B est au niveau mécanistique du transfert de méthyle de la MeCbl au substrat. Dans la MetH, cet objectif est atteint par la chimie hétérolytique alors que le mécanisme proposé pour les méthyltransférases de classe B implique une chimie homolytique.

## IV. But du travail

La méthylcobalamine a été identifiée comme un agent donneur de groupement de méthyle dans quelques réactions de méthylation (Col *et al.*, 2007).

Dans la biosynthèse des hopanoïdes, Welander *et al.* (2010) ont identifié un gène *hpnP* chez *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 qui code pour une méthylase soupçonnée être responsable de la réaction de méthylation en position C-2 du cycle A du squelette hopane (Figure 4). L'enzyme codée par le gène *hpnP* (ORF 4269) est représenté dans la banque de données comme une «putative B-12 binding radical SAM protein » et par la suite classée comme une enzyme membre des méthyltransférases de classe B (Welander *et al.*, 2010).

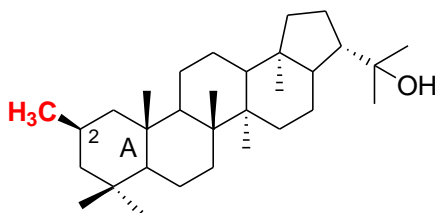


Figure 4. Un hopanoïde méthylié: le 2β-méthylidiploptérol

Pour la biosynthèse de ces hopanes méthyliés en position C-2, nous avons pensé à un mécanisme enzymatique radicalaire qui ressemble au mécanisme de l'enzyme Fom3 impliqué dans la biosynthèse de la fosfomycine. La méthylcobalamine serait l'agent donneur de groupement de méthyle dans cette réaction enzymatique de méthylation d'un carbone  $sp^3$  non fonctionnalisé.

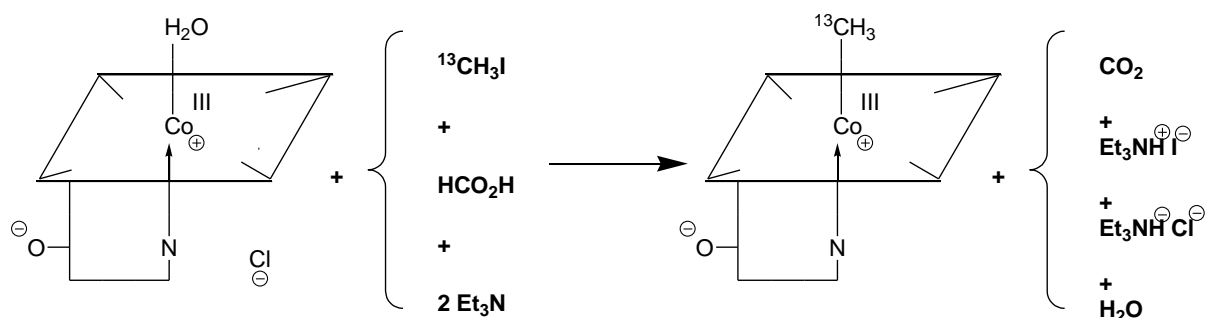
Pour tenter de vérifier une telle contribution de la méthylcobalamine dans la méthylation en C-2 du cycle A de l'hopane, nous avons synthétisé de la méthylcobalamine marquée en  $^{13}C$  sur le groupement de méthyle pour l'incuber avec des systèmes acellulaires bactériens bruts. Les triterpénoïdes méthyliés seront ensuite isolés et analysés en RMN du carbone pour détecter l'éventuelle présence de marquage au  $^{13}C$  sur le groupement méthyle en C-2. Le marquage de la

méthylcobalamine au  $^{13}\text{C}$  est d à augmenter la sensibilité de la méthode de détection lors de l'analyse par RMN du carbone.

#### IV.1 Synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine

La préparation de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine est fondée sur une alkylation rapide de la cob(I)alamine fortement nucléophile obtenue après une réduction de la cyanocobalamine. La cob(I)alamine peut être obtenue après une réduction de la cyanocobalamine ou l'aquocob(III)alamine par du borohydrure de sodium (Smith *et al.*, 1964).

Tollinger *et al.* ont décrit une synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine en utilisant le formiate de triéthylammonium comme agent de réduction et l'iodométhane marqué en  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ ) comme l'agent de méthylation (Tollinger *et al.*, 1997) (Schéma 6).



**Schéma 6.** Synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine à partir de l'aquacobalamine (Tollinger *et al.*, 1997).

Dans notre synthèse de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine, nous avons suivi le même mode opératoire que celui décrit par Tollinger *et al.* mais nous l'avons modifié au niveau de la purification où nous avons utilisé une colonne de CM-Sepharose et l'eau comme éluant à la place de la purification par colonne de silice utilisée par Tollinger *et al.* où l'éluant utilisé était (méthanol : eau, 9 :1). Le tableau 2 représente les déplacements chimiques des signaux de protons et de carbones de la méthylcobalamine synthétisée marqué en  $^{13}\text{C}$  sur le méthyle du cobalt.

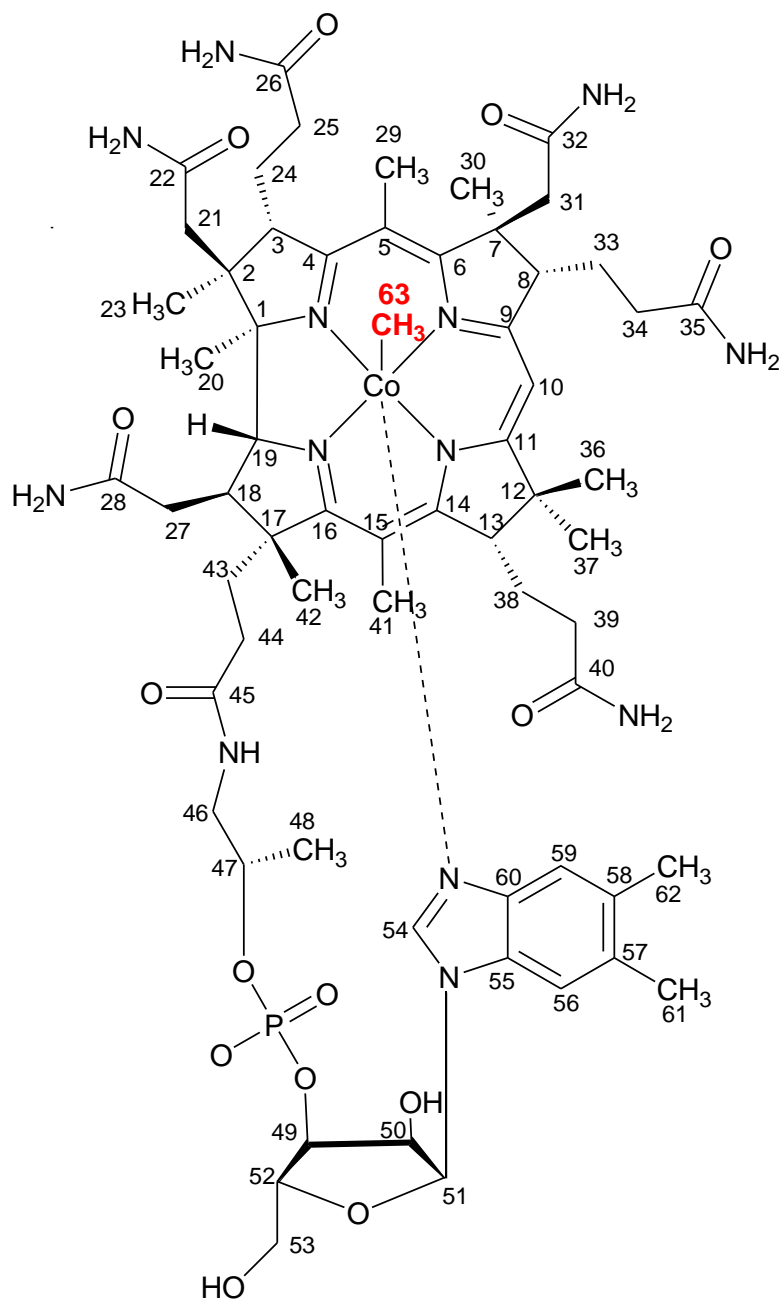


Figure 5. Numérotation de la méthylcobalamine

Tableau 2. Spectres de proton et de carbone de la <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-méthylcobalamine

Assignement	δ ( <sup>1</sup> H) ppm	δ ( <sup>13</sup> C) ppm	Assignement	δ ( <sup>1</sup> H) ppm	δ ( <sup>13</sup> C) <sup>a</sup> ppm
C-1		86,3	C-33	1,88(H <sub>33</sub> , m)/0,94(H <sub>33</sub> <sup>*</sup> , m)	27,1
C-2		48,4	C-34	1,72(H <sub>34</sub> , m)/1,06(H <sub>34</sub> <sup>*</sup> , m)	32,9
C-3	4,12 (m)	57,4	C-35		179,0
C-4		176,6	C-36	0,94 (s)	33,5
C-5		108,7	C-37	1,4 (s)	20,4
C-6		167,1	C-38	2,03(H <sub>38</sub> , m)/1,98(H <sub>38</sub> <sup>*</sup> , m)	29,3
C-7		52,6	C-39	2,60 (m)	35,7
C-8	3,39(dd, J <sub>1</sub> = 5Hz, J <sub>2</sub> = 11,3 Hz)	56,9	C-40		181,2
C-9		174,8	C-41	2,45 (s)	16,5
C-10	5,92 (s)	95,9	C-42	1,34 (s)	17,0
C-11		175,7	C-43	2,47(H <sub>43</sub> , m)/1,77(H <sub>43</sub> <sup>*</sup> , m)	32,5
C-12		48,4	C-44	2,43(H <sub>44</sub> , m)/2,09(H <sub>44</sub> <sup>*</sup> , m)	32,5
C-13	3,05 (m)	54,8	C-45		176,7
C-14		166,4	C-46	3,58(H <sub>46</sub> , dd, J <sub>1</sub> =2 Hz, J <sub>2</sub> = 14 Hz)/3,08(H <sub>46</sub> <sup>*</sup> , m)	46,5 <sup>1</sup>
C-15		105,2	C-47	4,34 (m)	74,0 <sup>2</sup>
C-16		176,0	C-48	1,22 (d, J <sub>48-47</sub> = 6,2 Hz)	20,1 <sup>3</sup>
C-17		60,4	C-49	4,71 (m)	74,4 <sup>4</sup>
C-18	2,61 (m)	40,1	C-50	4,25 (m)	70,0 <sup>5</sup>
C-19	3,96(d, J <sub>19-18</sub> = 10,4 Hz)	76,1	C-51	6,27 (d, J <sub>51-50</sub> = 3 Hz)	88,1
C-20	0,48 (s)	21,1	C-52	4,07 (m)	83,2 <sup>6</sup>
C-21	2,31(H <sub>21</sub> , d, J <sub>H21-H21*</sub> =9,7 Hz)/2,28(H <sub>21</sub> <sup>*</sup> , d, J <sub>H21*-H21</sub> =9,6 Hz)	44,1	C-53	3,89(H <sub>53</sub> , dd, J <sub>1</sub> =3,6 Hz, J <sub>2</sub> =12,8 Hz)/3,76(H <sub>53</sub> <sup>*</sup> , dd, J <sub>1</sub> =3,8 Hz, J <sub>2</sub> = 13 Hz)	61,6
C-22		178,6	C-54	6,98 (s)	143,0
C-23	1,36 (s)	17,9	C-55		131,1
C-24	2,01(H <sub>24</sub> , m)/1,93(H <sub>24</sub> <sup>*</sup> , m)	27,2	C-56	7,19 (s)	112,6
C-25	2,49(H <sub>25</sub> , m)/2,42(H <sub>25</sub> <sup>*</sup> , m)	36,1	C-57		136,2
C-26		180,0	C-58		134,1
C-27	2,67(H <sub>27</sub> ,m)/2,66(H <sub>27</sub> <sup>*</sup> , m)	33,8	C-59	6,29 (s)	117,5
C-28		178,0	C-60		137,9
C-29	2,49 (s)	16,3	C-61	2,23 (d, J <sub>61-57</sub> = 3,8Hz)	20,4
C-30	1,77 (s)	20,2	C-62	2,22 (d, J <sub>62-58</sub> = 3,8 Hz)	20,5
C-31	2,40(H <sub>31</sub> , d, J <sub>H31-H31*</sub> = 13,7 Hz)/1,94(H <sub>31</sub> <sup>*</sup> , d, J <sub>H31*-H31</sub> = 13,2 Hz)	43,7	C-63	-0,07 (s)	9,5
C-32		176,7			



Les spectres ont été enregistrés en solution dans le D<sub>2</sub>O.

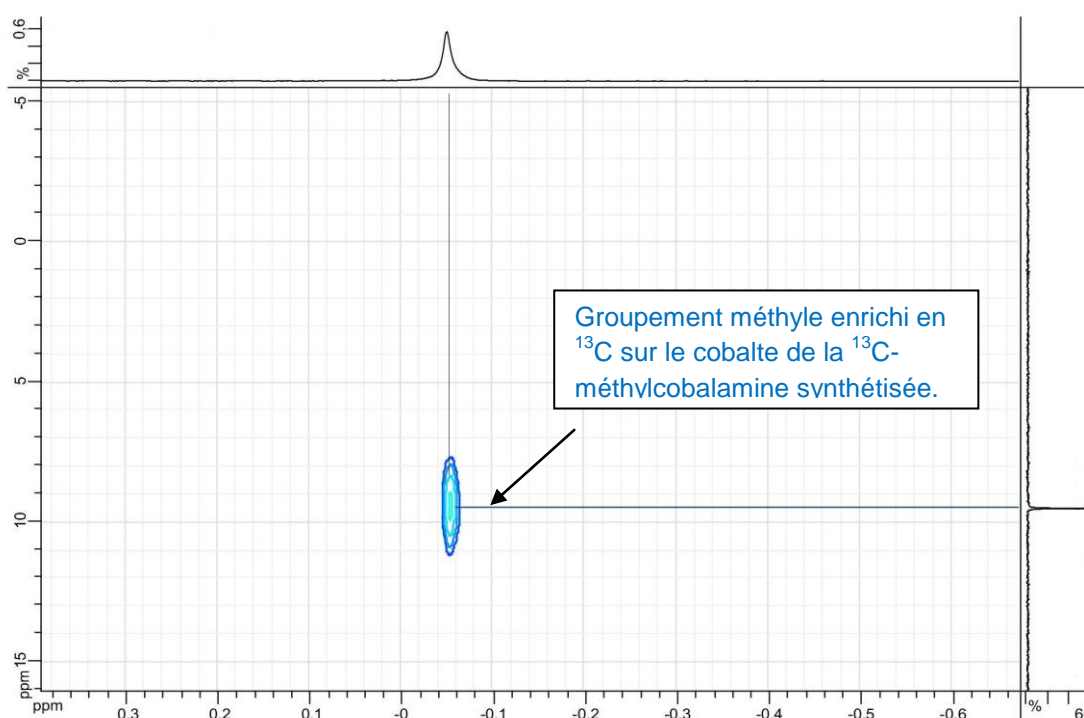
<sup>a</sup> Couplage <sup>31</sup>P-<sup>13</sup>C : (1)  $J_{CP} = 2,8$  Hz ; (2)  $J_{CP} = 5,9$  Hz ; (3)  $J_{CP} = 4,2$  Hz ; (4)  $J_{CP} = 4,6$  Hz ; (5)  $J_{CP} =$  non visible ; (6)  $J_{CP} = 8,9$  Hz.

\* Hydrogène diastéréotope.

MS (ESI) :  $m/z = 1345,603$  [M+H]<sup>+</sup>.

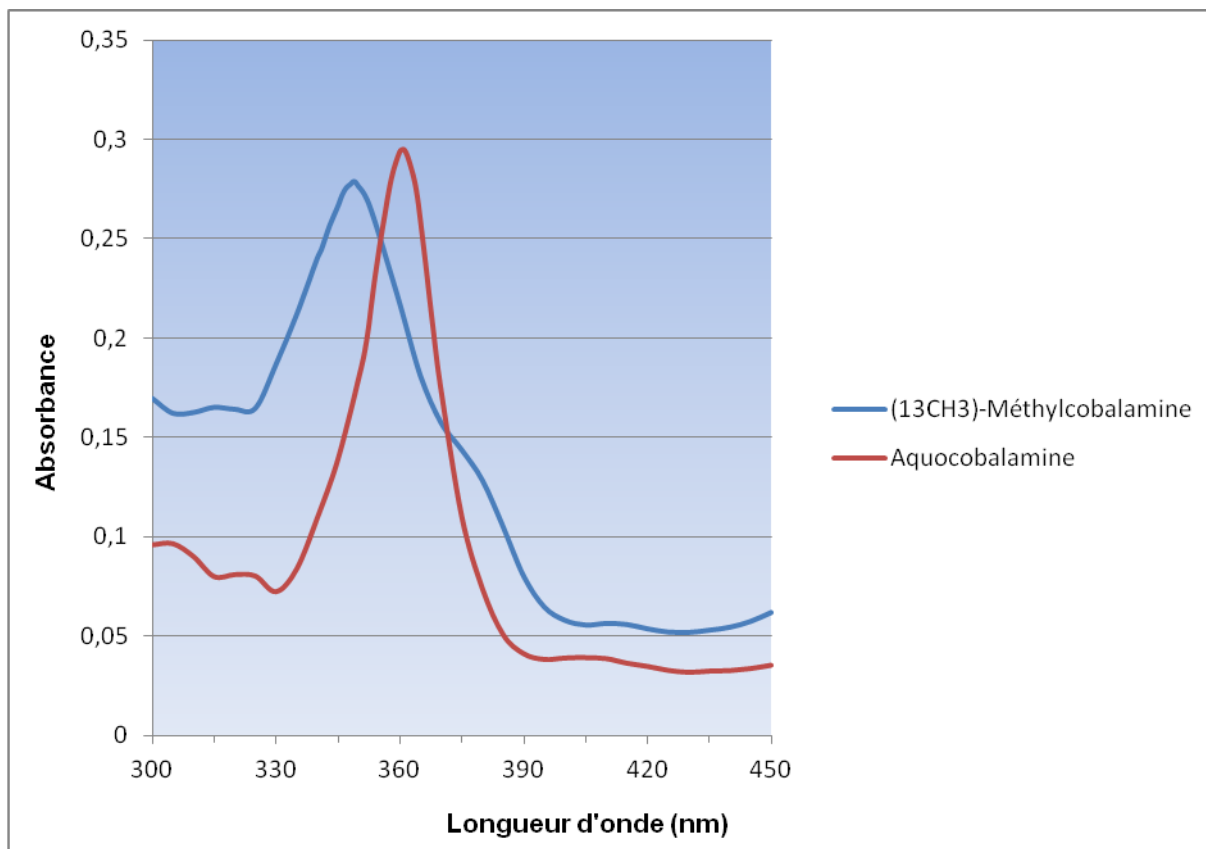
RMN <sup>31</sup>P, (D<sub>2</sub>O, 300MHz) = - 0.44 ppm.

Les signaux de carbones de la (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine synthétisée ont été caractérisés par simple comparaison avec ceux de la méthylcobalamine décrite par Tollinger *et al.* (1997). Les déplacements chimiques des carbones de la (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine synthétisée correspondent aux déplacements chimiques décrits par Tollinger *et al.* Une analyse par HSQC a été réalisée pour corrélérer les signaux de protons à ceux des carbones correspondants, pour ainsi démontrer la corrélation entre les protons du groupement du méthyle et son carbone enrichie en <sup>13</sup>C. L'effet d'enrichissement en <sup>13</sup>C du méthyle est illustré au niveau de l'intensité du signal de corrélation entre les trois protons et le carbone du <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> (Figure 6).



**Figure 6. Analyse d'HSQC réalisé sur la méthylcobalamine marqué en <sup>13</sup>C.** Ce spectre montre une partie du spectre HSQC réalisé où est présente la tache de corrélation entre le signal du proton et le carbone marqué en <sup>13</sup>C du groupement de méthyle. L'intensité de la tache de corrélation est due au marquage en <sup>13</sup>C du carbone du groupement de méthyle.

De plus, des spectres d'absorptions entre 300 et 450 nm ont été réalisées pour montrer la différence d'absorption entre la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine synthétisée ( $\lambda_{\text{max}}= 349 \text{ nm}$ ) et l'aquocobalamine (produit de départ) ( $\lambda_{\text{max}}= 361 \text{ nm}$ ) (Figure 7).



**Figure 7.** Spectres d'absorptions de la ( $^{13}\text{CH}_3$ )-méthylcobalamine synthétisée et l'aquocobalamine réalisées entre 300 nm et 450 nm.

## V. Conclusion et perspectives

Nous avons synthétisé dans ce chapitre la méthylcobalamine marqué en  $^{13}\text{C}$  sur le méthyle. Des analyses d'RMN une dimension et deux dimensions ont été effectuées pour identifier la bonne incorporation du groupement de méthyle enrichie en  $^{13}\text{C}$  sur le cobalt.

Comme perspective, il nous reste à chercher les bonnes conditions pour incuber la méthylcobalamine marqué en  $^{13}\text{C}$  dans des systèmes acellulaires bactériens et, par la suite, identifier en GC/MS et en RMN de carbone, la présence du marquage au niveau du groupement méthyle en C-2 ou en C-20 des triterpénoïdes méthylés.

## VI. Partie expérimentale

### VI.1 Synthèse de la (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine

Tous solvants et les liquides réactifs ont été dégazés avant de commencer la synthèse qui a été performée à température ambiante à l'abri de la lumière. (100 mg,  $0,724 \times 10^{-4}$  moles) de l'aquocobalamine chlorhydrate ont été dissous dans 10 mL d'eau. De l'acide formique (0,05 mL,  $0,13 \times 10^{-2}$  moles) et de la triéthylamine (0,185 ml,  $0,13 \times 10^{-2}$  mole) ont été ajoutés à la solution. A cause de la réduction de l'aquocobalamine, la couleur rouge foncé de la solution a été immédiatement modifiée en brun. De l'iodométhane marqué en <sup>13</sup>C (0,1 mL,  $0,16 \times 10^{-2}$  moles, 99% atome de <sup>13</sup>C) a été ajouté, et la solution a été agitée vigoureusement pendant 5,5 h à l'abri de la lumière jusqu'à la récupération de la couleur rouge foncé. Toutes les opérations qui suivent ont été réalisées à l'abri de la lumière. Le mélange réactionnel a été appliqué sur une colonne de CM-Sepharose (30 cm x 2 cm). Cette colonne a été lavée au préalable, tout d'abord avec une solution d'HCl (20 mL ; 0,1 M) et ensuite avec de l'eau jusqu'à neutralité complète des effluents. La (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine a été éluée avec de l'eau et la première fraction rouge a été récupérée.

Les fractions réunies ont été lyophilisées pour enlever l'excès d'eau et le résidu rouge obtenu a été dissous dans de l'eau (2 mL) et cristallisé par addition goutte à goutte d'acétone (0,8 mL). La (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine cristallisée a été séparée de sa solution mère lavé avec quelques gouttes d'acétone et séchée sous vide à l'aide d'une pompe à palette à température ambiante à l'abri de la lumière, (85 mg,  $0,65 \times 10^{-4}$  moles, 90 %) de <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-méthylcobalamine cristallisée ont été obtenus.

# **Chapitre V**

**Caractérisation d'une  
enzyme susceptible d'être  
une méthylase  
responsable de la  
méthylation enzymatique  
en C-2 du cycle A du  
hopane**

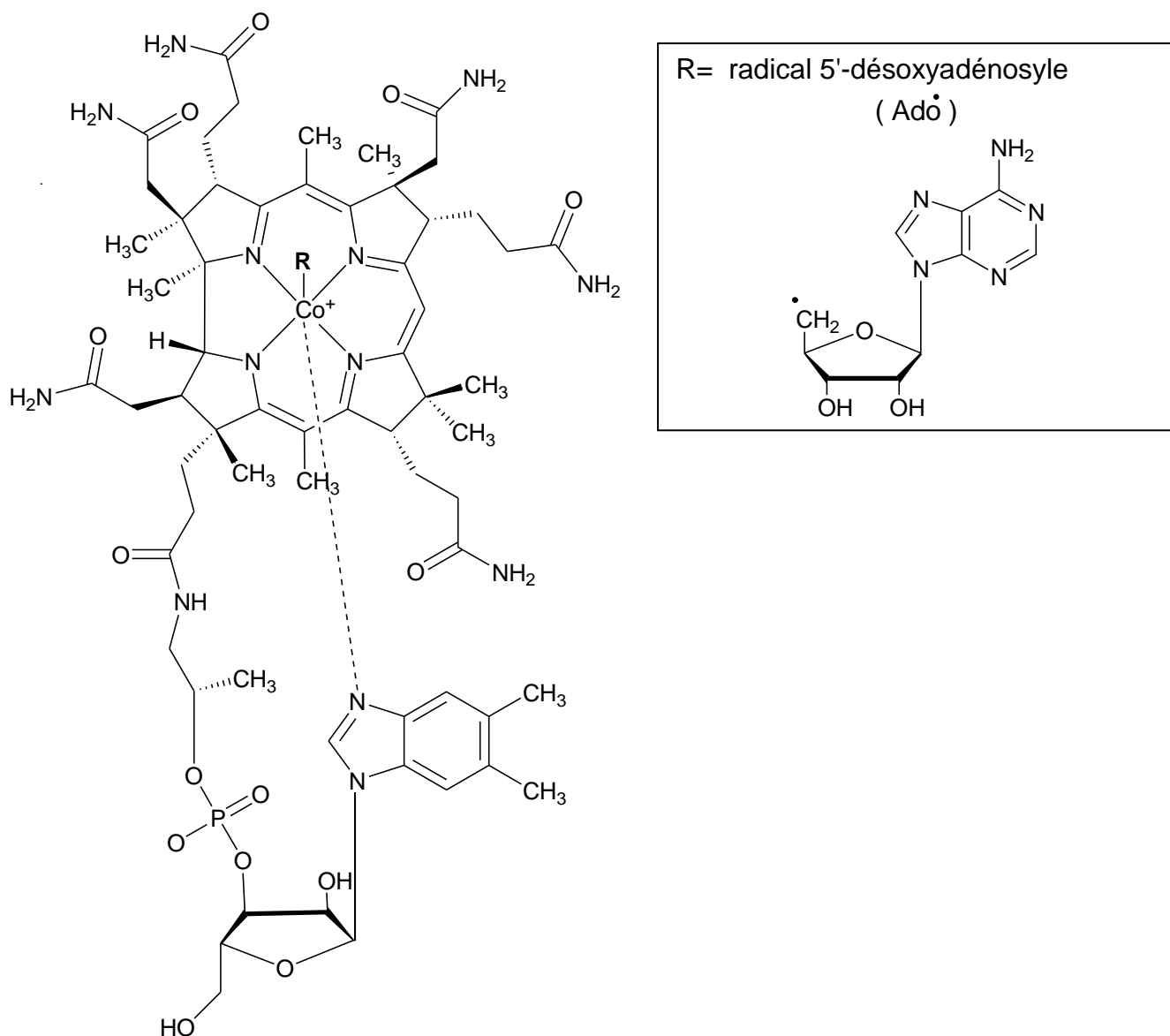
## I. Introduction

Une superfamille des enzymes utilisant la S-adénosylméthionine (SAM) comme un agent d'oxydation dans la biosynthèse des vitamines, des coenzymes et des antibiotiques ainsi que dans la réparation d'ADN a été récemment découverte. Tous les membres de cette superfamille, enzymes à radical SAM, conservent dans leur séquence un motif de trois cystéines, CxxxCxxC, qui fixe un cluster [4Fe-4S] dans le site actif de chacune de ces enzymes.

La S-adénosylméthionine (SAM) était bien connue pour son rôle comme agent de méthylation (Grillo et Colombatto, 2008 ; Fontecave *et al.*, 2004). Après plusieurs études, on connaît maintenant qu'en plus de son rôle de méthylation, la SAM peut générer des radicaux organiques (Marsh, 1999 ; Frey et Magnusson, 2003). Ces radicaux sont impliqués dans des réactions enzymatiques : ils sont formés par une réaction de réduction de la SAM par un seul électron en libérant le radical 5'-désoxyadénosyle (Ado<sup>•</sup>) et la méthionine.

### I.1 Génération de l'Ado<sup>•</sup> à partir de l'adénosylcobalamine (coenzyme B12)

L'adénosylcobalamine est un cofacteur complexe (Figure 1).

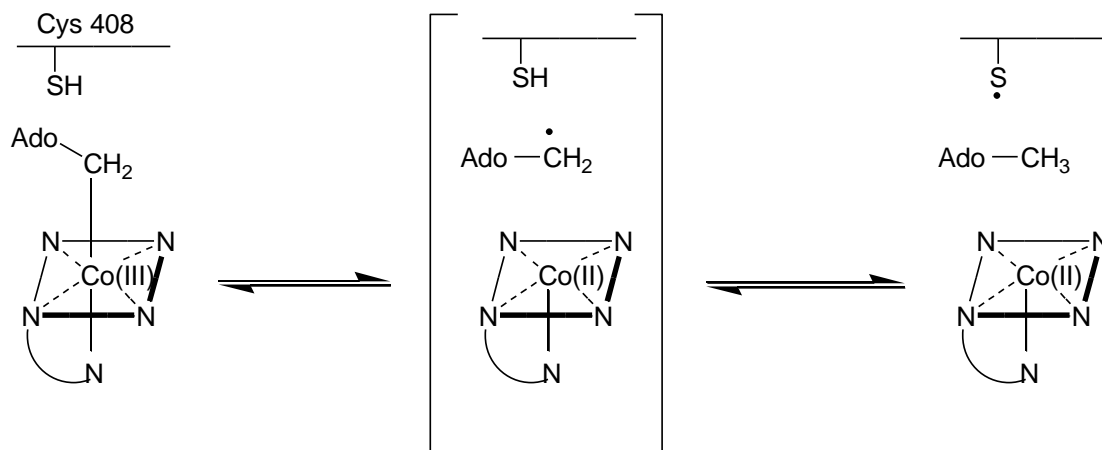


**Figure 1. Structures de l'adénylco-balamine (AdoCbl) et du radical 5' désoxyadényosyle issu de l'homolyse de la liaison Co-C de l'AdoCbl.** Au centre de l'AdoCbl se trouve un atome de cobalt coordonné à 4 atomes d'azote situés dans le plan équatorial. Le ligand 5'-désoxyadényosyle est situé en *cis* et le ligand en *trans* est une base volumineuse, le diméthylbenzimidazole, relié à un noyau pyrrole par une chaîne ribofuranosyle.

L'énergie de dissociation de la liaison Co-C5' de l'adénylco-balamine est de l'ordre de 30 kcal mol<sup>-1</sup> (Halpern *et al.*, 1984 ; Finke et Hay, 1984). Le potentiel de rupture homolytique de cette liaison est une propriété essentielle de l'adénylco-balamine, dûe à cette faiblesse de l'énergie de dissociation. Les radicaux 5'-désoxyadényosyles issus de cette rupture homolytique sont utilisés par de nombreuses enzymes pour initier une catalyse radicalaire (Frey, 1990). La réaction de coupure homolytique de la

liaison Co-C5' est accélérée par un facteur de 1012 environ suite à la fixation du substrat et du cofacteur par l'enzyme partenaire (Finke et Martin, 1990).

La plupart des enzymes adénosylcobalamine dépendantes catalysent des réactions d'isomérisation; dans ces systèmes le radical Ado<sup>•</sup> arrache un atome d'hydrogène spécifique du substrat qui subit par la suite un réarrangement radicalaire menant au produit. Le radical Ado<sup>•</sup> peut également oxyder un résidu cystéine de la protéine pour donner une molécule de 5'-désoxyadénosine et un radical cystéinyle qui oxyde ensuite le substrat. La distance entre le radical Cys<sup>•</sup> et la cob(II)alamine a été estimée à 5-7 Å (Licht *et al.*, 1996 ; Gerfen *et al.*, 1996). La figure 2 schématise la formation du radical Cys<sup>•</sup> des réductases de ribonucléotides (RNRs) de classe II, en accord avec les différentes études réalisées.



**Figure 2. Formation du radical thiyle des RNRs de classe II.** La distance entre le radical Cys<sup>•</sup> et la cob(II)alamine est estimée à 5-7Å (Licht *et al.*, 1996 ; Gerfen *et al.*, 1996)

Les radicaux adénosyles peuvent être engendrés d'une autre manière, à partir de l'action conjointe de deux cofacteurs, la S-adénosylméthionine et un centre [4Fe-4S] particulier. Cette chimie récemment découverte (Frey, 1990) et mise en oeuvre par de nombreuses enzymes fait l'objet du paragraphe suivant.

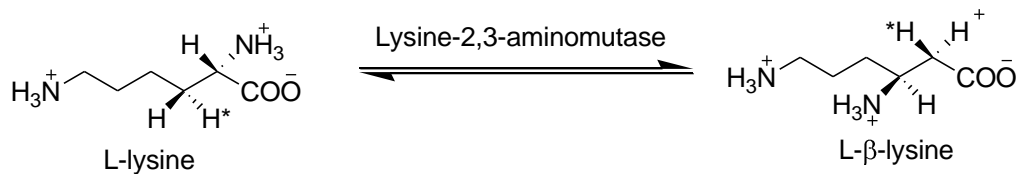


## II. Enzymes à radical SAM

Les enzymes à radical SAM les plus étudiées sont les suivantes : La Lysine 2,3 aminomutase (LAM), le pyruvate formiate lyase (PFL), la biotine synthétase (BioB) et la lipoate synthétase (LipA).

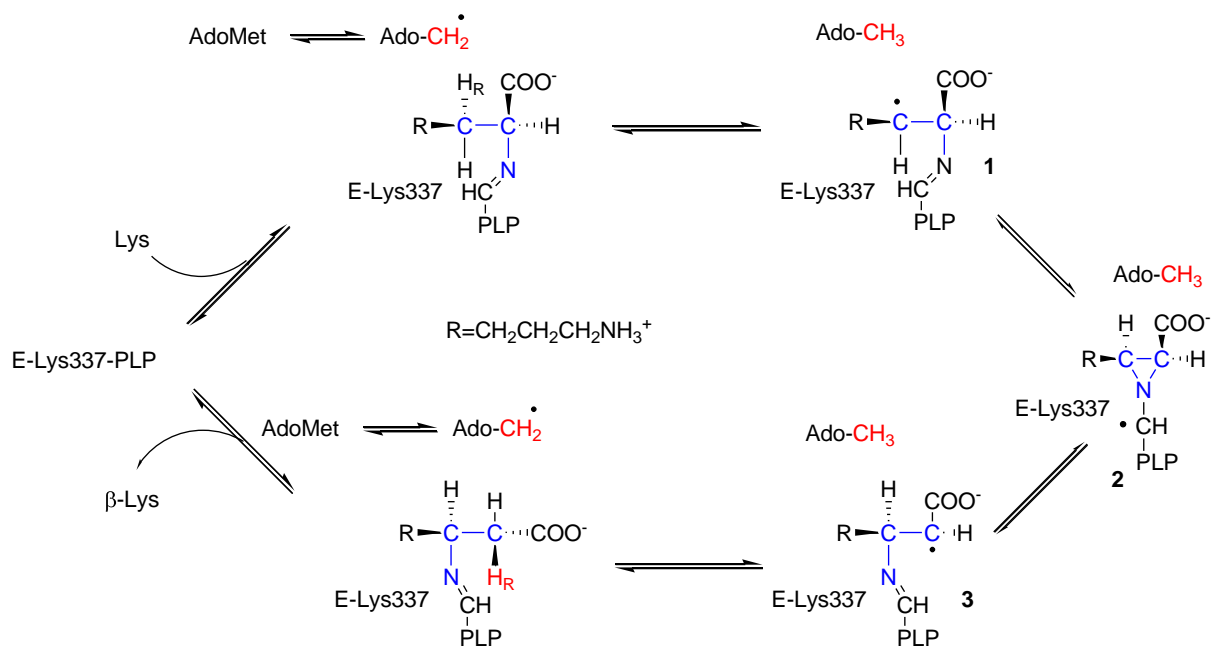
### II.1 Lysine 2,3 aminomutase

Cette enzyme a été identifiée pour la première fois en 1970 (Chirpich *et al.*, 1970 ; Frey et Reed, 2000). Cette enzyme catalyse la transformation réversible de L-lysine en L-β-lysine, une réaction qui induit sur la L-lysine un échange de l'hydrogène en position C-3 avec un groupement amino en position C-2 (Figure 3).



**Figure 3.** Transformation réversible de L-lysine en L-β-lysine.

Cette réaction présente une grande similarité mécanistique avec les réactions de réarrangement catalysées par les enzymes adénosylcobalamine dépendantes (Marsh, 1999 et 2000). La lysine 2,3 aminomutase ou LAM est impliquée dans le métabolisme de la L-lysine chez les *Clostridium subterminale* souche SB4 et dans la formation de la β-lysine lors de la biosynthèse des antibiotiques. Elle n'est active que dans des conditions anaérobiques qu'en présence de la dithionite *in vitro*. L'enzyme purifiée contient un pyridoxal-5'-phosphate (PLP) et du fer, deux éléments essentiels pour l'activité de l'enzyme. La SAM et le dithionite sont aussi indispensables pour l'activité de cette enzyme. La présence du PLP n'était a priori pas surprenante pour une enzyme de métabolisme des acides aminés. L'exigence en SAM était par contre extraordinaire pour une telle enzyme (Schéma 1).



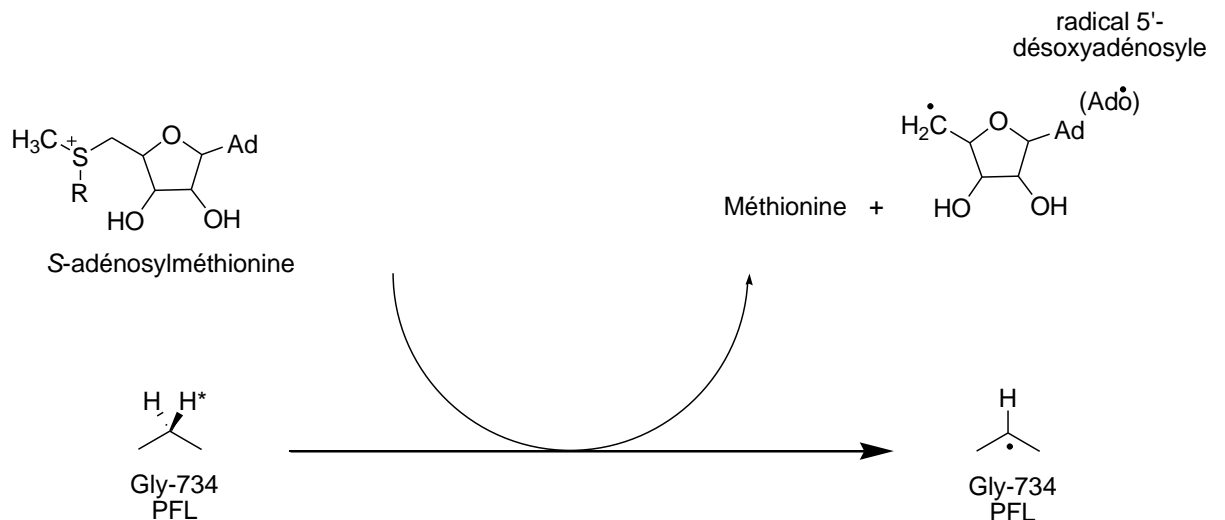
**Schéma 1. Mécanisme d'isomérisation dans la réaction radicalaire de la Lysine 2,3 aminomutase (LAM).** La coupure homolytique de la SAM engendre le radical 5'-désoxyadénosyl, induisant une abstraction de l'hydrogène *pro-R* de la chaîne latérale pour former le substrat intermédiaire **1**. L'isomérisation procède par une cyclisation interne du radical azacyclopropylcarbonyl **2**, et une ouverture du cycle induit la formation de l'intermédiaire **3**. L'abstraction de l'hydrogène de la SAM par **3** engendre la formation du PLP-aldimine de la β-lysine et une transaldimination libère la β-lysine et restaure la PLP-aldimine (Lepore *et al.*, 2005).

L'adénosylcobalamine qui a pour fonction générateur du Ado• se lie à l'enzyme apparentée et un clivage de la liaison Co-C5' provoque la libération du 5'-désoxyadénosyle radical et de la réduction de la Co(III) en Co(II). Ce radical induit le transfert d'un hydrogène dans le mécanisme enzymatique pour former le produit.

Dans le cas de la LAM, le radical adénosyle obtenu de la SAM induit aussi le transfert de l'hydrogène ainsi que dans plusieurs réactions enzymatiques catalysées par des enzymes de la superfamille à radical SAM.

## II.2 Pyruvate formiate lyase

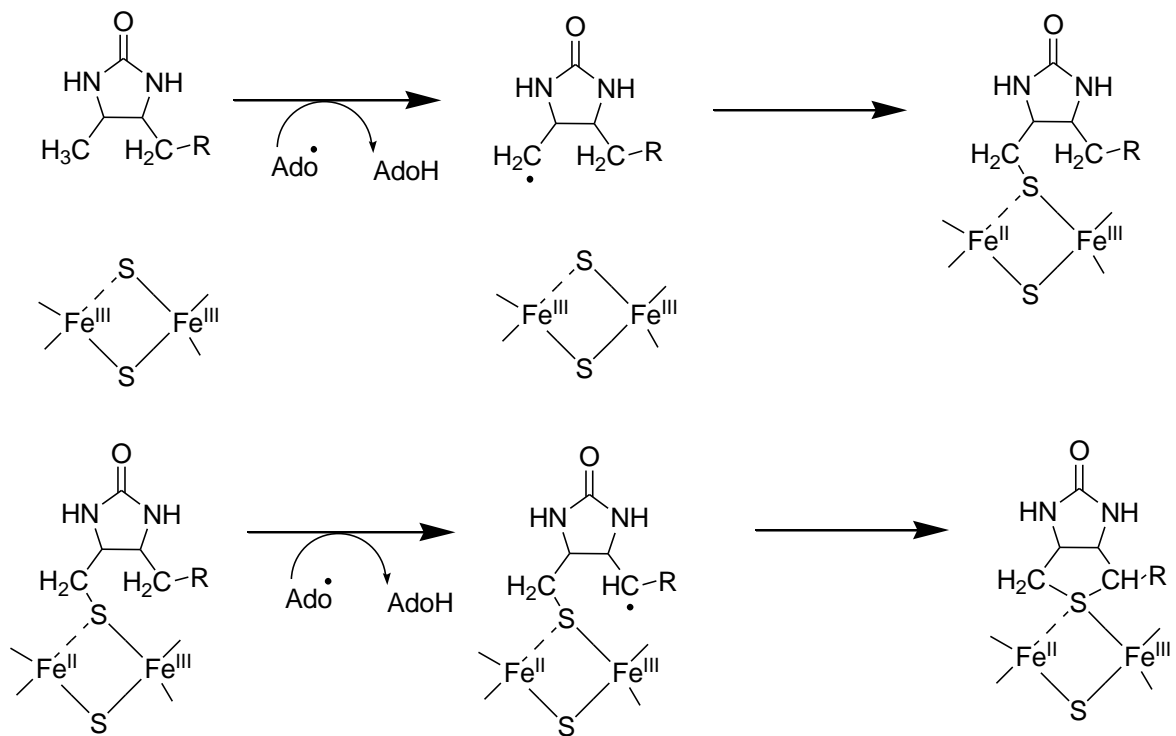
La pyruvate formiate lyase (PFL) est considérée comme la première enzyme à radical glycyll découverte par Knappe et al (Knappe et Schmitt, 1976). Cette enzyme catalyse la dégradation du pyruvate en formiate et en acétyl-CoA. Le formiate est ensuite transformé en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> et l'acétyl-CoA en acétate. La SAM est considérée comme le substrat d'une enzyme (PFL activase) (Knappe, 1984) qui sert à engendrer le radical glycyll de la glycine 734 du PFL tout en libérant la méthionine et la 5'-déoxyadénosine. La coupure de la SAM par la PFL activase contribue à la formation de la méthionine et du radical 5'-déoxyadénosyle qui à son tour va arracher un proton de la Gly734 de la PFL pour engendrer la 5'-déoxyadénosine et le radical glycyll activé (Wagner *et al.*, 1992) (Schéma 2).



**Schéma 2.** Formation du radical Glycyll dans le mécanisme enzymatique catalysé par la pyruvate formiate lyase activase (PFL).

La PFL activase a été reconnue par la suite comme une nouvelle enzyme de la superfamille du radical SAM.



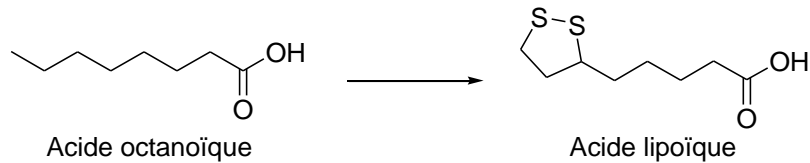


**Schéma 4.** Mécanisme proposée pour la réaction catalysée par la biotine synthase (Florentin *et al.*, 1994 ; Brich *et al.*, 1995 ; Sanyal *et al.*, 1996).

En addition du centre [4Fe-4S] présent dans le site actif de la BioB, l'enzyme contient aussi un centre [2Fe-2S]. Ces deux clusters sont responsables de l'insertion des atomes de soufre dans la biotine (Jarrett, 2003 ; Bui *et al.*, 2003)

## II.4 Lipoate synthétase (LipA)

Cette enzyme radical SAM catalyse la formation de l'acide lipoïque à partir de l'acide octanoïc. Comme chez la BioB, l'étape clé de cette biosynthèse est l'insertion d'un atome de soufre sur une liaison C-H non activé pour former une liaison C-S.



LipA et comme toutes les enzymes radical SAM contient dans leur séquence un motif (CXXXCXXC) caractéristique des enzymes à radical SAM et un cluster [4Fe-4S] présent dans le site actif servant comme site de fixation de la SAM (Jarrett, 2003). Le radical 5'-désoxyadénosyle provenant de la SAM sert à oxyder les deux atomes de carbones non activés de l'acide octanoïque pour former des radicaux organiques réagissant directement avec des atomes de soufre pour engendrer des liaisons C-S (Marsh *et al.*, 2004).

De plus, un deuxième cluster [4Fe-4S] a été identifié dans l'enzyme. Ce cluster joue un rôle de donneur d'atomes de soufre lors du mécanisme de la formation de l'acide lipoïque. Les deux atomes de sulfures sont dérivés du même cluster du LipA (Cicchillo *et al.*, 2004).

## II.5 Autres enzymes à radical SAM

Le tableau 1 présente une liste de plusieurs enzymes à radical SAM avec leurs fonctions biochimiques

Enzyme	Fonction biochimique
SpIB	Réparation d'ADN
ARR activase	Synthèse des dNTPs
MoaA	Biosynthèse de Molybdoptérine
HemN	Biosynthèse des hèmes
MiaB	Thiométhylation de l'adénosine d'isopentényle dans l'ARNt
BssD	Formation du radical glycyI lors du métabolisme du toluène
GD activase	Formation du radical glycyI lors du métabolisme du glycérol déshydratase
ThiH	Biosynthèse de la thiamine
PqqE	Biosynthèse de la pyrroloquiniline quinone
DesII	Biosynthèse de la désosamine
Fom3	Biosynthèse de la fosfomycine
Fms7	Biosynthèse de la fortimicine
BcpD	Biosynthèse de la bialaphos
CloN6	Biosynthèse de clorobiocine.

**Tableau 1.** Quelques exemples d'enzymes à radical SAM.

Abbreviations: BcpD, protéine responsable de la biosynthèse du bialaphos; GD, glycerol déshydratase; BssD, protéine responsable de la biosynthèse du benzylsuccinate; CloN, protéine responsable de la biosynthèse du clorobiocine; DesII, protéine responsable de la biosynthèse de la désosamine; Fms7, protéine responsable de la biosynthèse de la fortimicine; Fom3, protéine responsable de la biosynthèse de la fosfomycine; PqqE, protéine responsable de la biosynthèse de la pyrroloquinoline quinone; SpIB, spore photoproduct lyase; ThiH, protéine responsable de la biosynthèse de la thiamine; ARR activase, enzyme ribonucléotide réductase activase anaérobique; HemN, coproporphyrinogen oxydase chez les bactéries anaérobiques; MoaA, enzyme responsable de la biosynthèse du molybdoptérine; MiaB, enzyme de méthylation de l'ARNt (Frey et Hegeman, 2007).

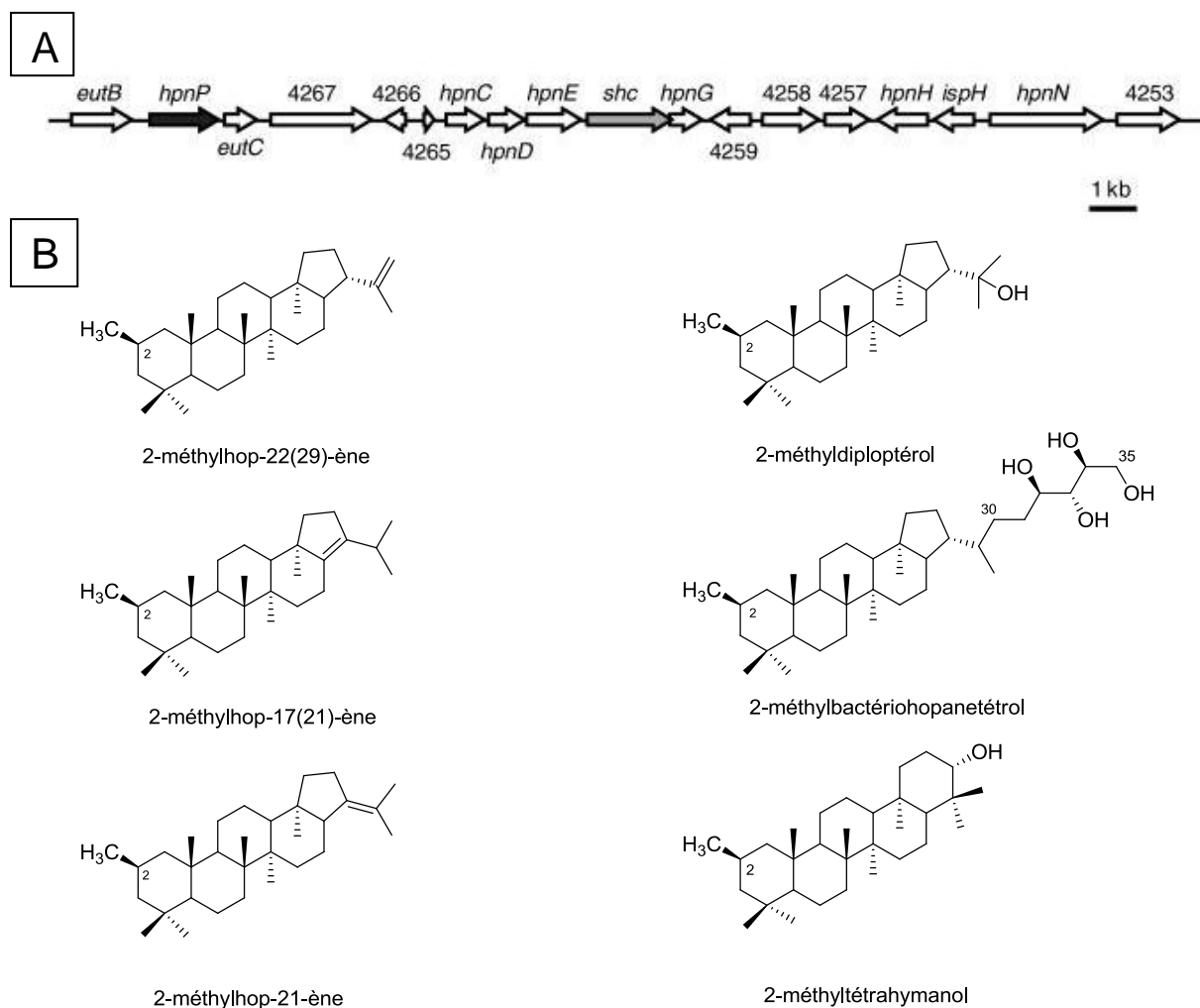
### III. But du travail

#### III.1 Une méthylase : enzyme à radical SAM

Pour déterminer le gène responsable de la réaction enzymatique de méthylation en C-2 des triterpénoïdes méthylés, Welander *et al.* ont identifié dans le génome de *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 et en amont du gène *shc* récemment identifié par Perzl *et al.* et responsable de la cyclisation du squalène (Perzl *et al.*, 1998), un ORF 4269 qu'ils ont nommé (*hpnP*) et décrit dans la base de données NCBI comme un gène codant pour une protéine à radical SAM avec un site de liaison pour la vitamine B<sub>12</sub> (Welander *et al.*, 2010).

Puisque les cellules de *Rhodopseudomonas palustris* ont été identifiées comme productrices des tritérpenoïdes méthylés en C-2 et que le mécanisme de cette méthylation est catalysé par une enzyme à radical SAM, *hpnP* semble être le gène codant pour cette méthylase (Figure 4).





**Figure 4.** L'identification d'un groupe de gènes susceptible être inclus dans la biosynthèse des hopanoïdes chez *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. (A) Le locus *shc* (squalène-hopène cyclase) (flèche grise), est entouré de plusieurs gènes putatifs de biosynthèse des hopanoïdes. En amont de *shc*, un hypothétique gène codant pour une méthylase en C-2 a été identifié (*hpnP*, flèche noire). (B) Des triterpénoïdes méthylés produites par *R. palustris* TIE-1 (Welander *et al.*, 2010).

Cette enzyme est codée par le gène, *hpnP*, responsable de la méthylation en position C-2 sur cycle A du hopane. Ce gène était retrouvé dans les cyanobactéries, dans les  $\alpha$ -proteobactéries et dans les acidobactéries. Les hopanoïdes méthylés sont produits par les cyanobactéries, par les *Methylobacterium* ainsi que par les *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 cultivé dans des conditions anaérobiques. Welander *et al.* ont utilisé une approche génétique et phylogénétique pour identifier la protéine responsable de la réaction de méthylation des hopanoïdes chez *R. Palustris* TIE-1. Une délétion du gène *hpnP* chez cette souche induit l'absence des hopanoïdes méthylés. Par contre quand un plasmide contenant le gène *hpnP* est

introduit dans ces mutants la biosynthèse des hopanoïdes méthylés est rétablie d'après l'empreinte en hopanoïdes obtenue par GC-MS (Welanders *et al.*, 2010).

Chez les *Methylobacterium*, nous sommes intéressés à identifier l'enzyme susceptible être responsable de la réaction de méthylation au niveau du carbon C-2 du cycle A du diploptérol (2 $\beta$ -méthyldiploptérol).

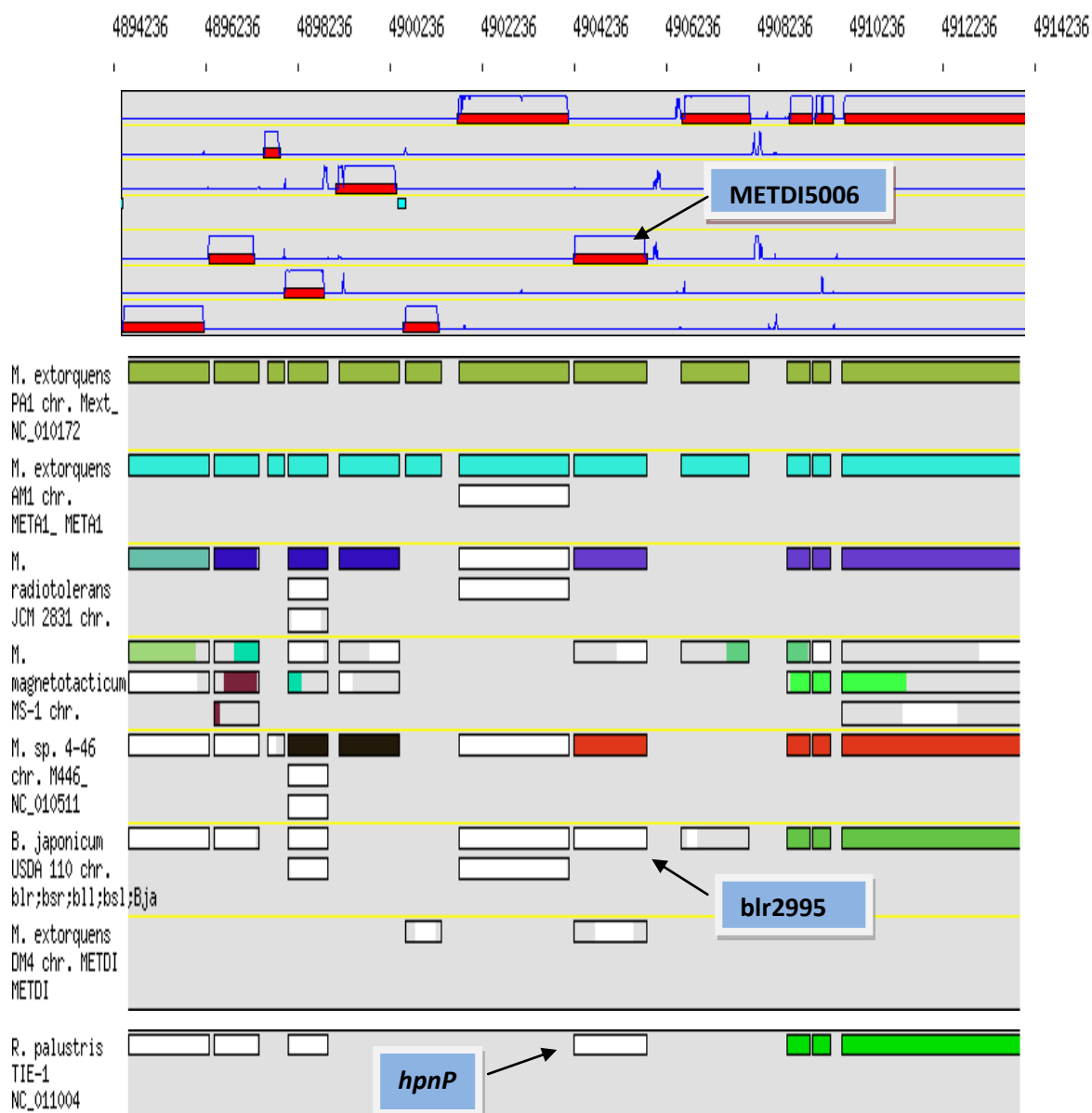
### **III.1.1 Identification du gène soupçonné être responsable de la réaction de méthylation chez les *Methylobacterium extorquens* DM4**

La séquence du génome de *Methylobacterium extorquens* DM4, et sa comparaison avec la séquence de la souche de référence du genre *Methylobacterium* incapable de dégrader le dichlorométhane nous permettent de repérer des zones à des fonctions inconnues intéressantes à être étudiées tel le gène METDI5006 .

La carte synténique représente une comparaison entre le génome *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 et ceux d'autres souches comme le *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 et *Methylobacterium extorquens* DM4. Cette carte montre la présence d'un gène chez *Methylobacterium extorquens* DM4 appelé METDI5006 et chez *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 appelé blr2995 toujours conservé au même niveau que celui du gène *hpnP* dans le génome de *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 étudié par Welanders *et al.* (2010). Le gène METDI5006 décrit dans la base des données NCBI comme un gène qui code pour une protéine à radical SAM (Figure 5).

Le gène *hpnP* est responsable de la réaction enzymatique de méthylation au niveau C-2 des hopanoïdes de *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 (Welanders *et al.*, 2010). En revanche, la présence des tritérpénoïdes méthylés en C-2 isolés des cellules de *Methylobacterium organophilum* (Zundel, 1984) et de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Bravo *et al.*, 2001) permet de soupçonner que le gène METDI5006 de 1644 paires de bases est le gène qui code pour une enzyme à radical SAM contenant un cluster Fe-S et que cette protéine est la méthylase responsable de la réaction de méthylation en C-2 des hopanoïdes méthylés chez *Methylobacterium extorquens* DM4 .

***Methylobacterium extorquens* DM4 - chromosome METDI  
4894236 -- 4914236  
(sequence length: 5943768 bases)**



**Figure 5.** Carte syntenique avec la représentation du gène METDI5006 chez *Methylobacterium extorquens* DM4 et la présence de son homologue dans autres souches bactériennes comme le *hpnP* chez les *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 et le *blr2995* chez *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

La séquence de la protéine METDI5006 (*Methylobacterium extorquens* DM4) conserve toujours comme toutes les enzymes appartenant à la superfamille des enzymes à radical SAM un motif CXXXCXXC (Figure 6).

```
MRCSLSVSSRRRILCVFPAYTPSFGTFSHAYPLMGGVKAFMPPQGGLLLIAAYMPETWECRF
VDENIRPASAKDFAWADAVFVSGMHIQEGQIHDIGRRAHAAGKVAALGGPSVSGAPEKYPD
FDYLVHVGGEIGDATDRLEILDRDLSRPAAQVVLDTKERLALSDFPAPAYEAAPLKRYLIGSLQF
SSGCPYRCEFCDIPQLYGRQPRLKSPEQMCAELDAIISQPGHPAVVYFVDDNFIANRKATRE
MLPHLVQKNNYPLQFACEATLNMAKQPEILELMRQANFMTVFGIETPEADALKGIDKT
HNAAVPMYEAITLNSYGLEVTSGIILGLDSDSKSEQNLIIDFKSAIPVLTINLLQALPKTPL
WDRLQREGRLLDASLESNVLFKRPHTVSSWRRRAIAHAYTPEHLFERFKHQCDVTYGN
RIVTPTKGKLTKTNLRRGLILGFNIITRVGLFSDYRRPFWRAAGHALKRGQIEAVFNMGFVAH
HLIRFTREALRGEHNASFYAAKAAEAQRRERSWWENARRRLAPEREA*
```

**Figure 6.** Séquence protéique du gène METDI5006.

L'expérience d'alignement par ClustalW entre la séquence protéique de HpnP de *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 et celle du METDI5006 de *Methylobacterium extorquens* DM4 montre une homologie de 73%. Une homologie de 59% est retrouvée entre la séquence protéique de HpnP de *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 et la séquence protéique du blr2995 de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. On peut aussi constater la conservation du motif CXXXCXXC caractéristiques des protéines à radical SAM dans ces trois séquences : *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 (C189 ; C193 ; C196), *Methylobacterium extorquens* DM4 (C190 ; C194 ; C197), *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (C207 ; C211 ; C214).

### III.1.1.1 Clonage du gène METDI5006

Nous avons collaboré pour ce travail avec le professeur Stéphane VUILLEUMIER de l'Institut de Botanique à Strasbourg qui nous a fourni des souches d'*E. coli* transformées avec des plasmides contenant le gène METDI5006 de *Methylobacterium extorquens* DM4.

Les souches ont été cultivées dans un milieu LB avec de l'ampicilline (100 µg/mL). L'ADN plasmidique contenant notre gène a été purifié selon le Kit QIAGEN (QIA prep Spin Miniprep 27104). Pour amplifier par PCR le gène obtenu après la

procédure de purification des amorces ont été dessinées PC1/PC2 et PC3/PC4 et reçues d'Aldrich.

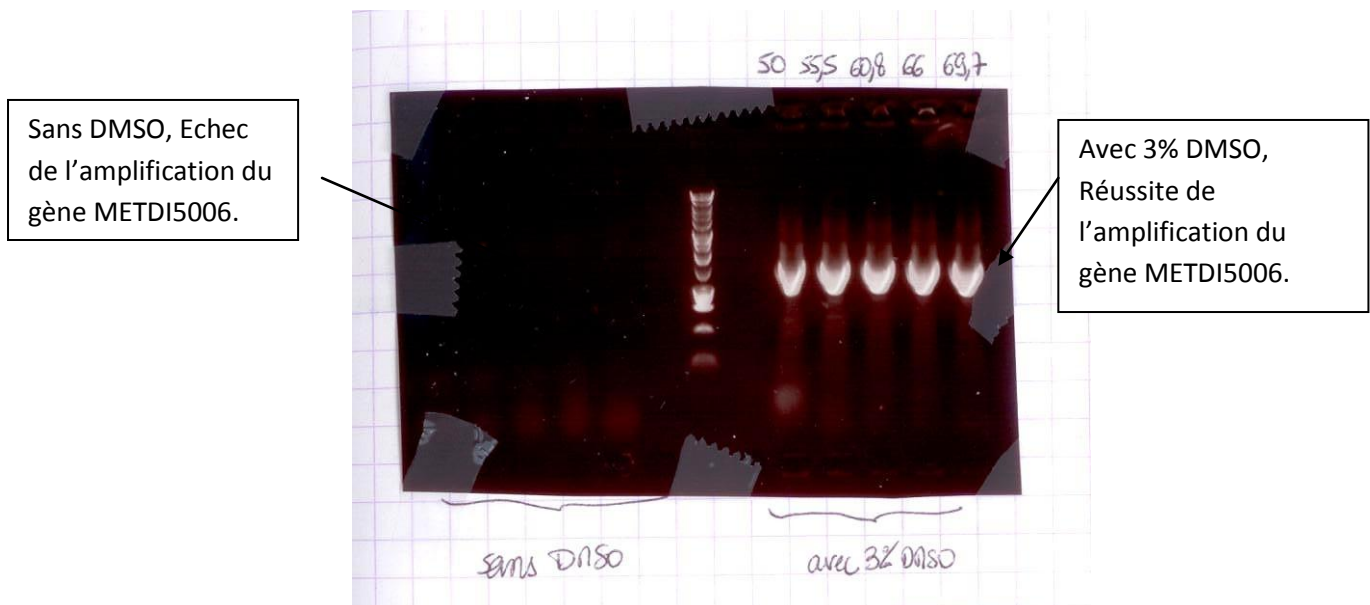
PC1: TAGGAGCATATGCGATGCTCCCTTTCCGT Forw prim, NdeI site for METDI 5006

PC2: aaaaaaGGATCCGGAAACGCTCAGGCCGCT Rev prim, BamHI site for METDI 5006

PC3: aaaaaaTCTAGACTGGGCTGTGCTAGATAGGAGGCC Forw prim, XbaI site for METDI 5006

PC4: aaaaaaGAATTCTCAGTGGTGATGGTGATGATGGGCCGCTTCCCGCTCCGGCG Rev prim, BamHI site for METDI 5006

Dans un premier temps, nous ne sommes pas arrivés à amplifier le gène METDI5006, mais après ajout de DMSO (3%) l'amplification a réussi (Figure 7).



**Figure 7.** Gel d'agarose du produit de la PCR effectuée sur le gène METDI5006.

Les deux vecteurs utilisés pour l'expression du gène pRJ2454 de 7009 pb et pCM160 de 7974 pb ont également été fournis par le Professeur VUILLEUMIER. Des cellules d'*E.coli* (DH5 $\alpha$ ) contenant ces vecteurs ont été cultivés dans un milieu LB avec de la kanamycine (20  $\mu$ g/mL) puisque ces vecteurs présentent dans leur séquence un gène résistant à la kanamycine. La purification de ces plasmides a été effectuée selon la même procédure que celle décrite dans le Kit QIAGEN et celle qu'on a utilisée pour purifier le gène METDI5006.

Les amorces PC1/PC2 ainsi que le vecteur pRJ2454 contiennent dans leurs séquences deux sites pour deux enzymes de restrictions NdeI et BamHI tandis que les amorces PC3/PC4 et le vecteur pCM160 contiennent dans leurs séquences deux sites différents pour d'autres enzymes de restrictions XbaI et BamHI. Ces vecteurs offrent aussi la possibilité de marquer la protéine à produire avec une étiquette 6His en N-terminale pour le pRJ2454 et en C-terminale pour le pCM160.

### **III.1.1.3 Digestion enzymatique des plasmides et des inserts**

La double digestion des inserts et des vecteurs est effectuée en suivant la procédure décrite dans le Kit Qiagen. Une migration sur gel d'agarose de 0,8% est effectuée pour identifier la réussite de la digestion enzymatique des inserts ainsi que des vecteurs et le marqueur de taille utilisé est le ( $\lambda$ HindIII) pour les vecteurs et le (1Kb DNA ladder) pour les inserts. La digestion des vecteurs ainsi que nos inserts. Les bandes correspondantes aux inserts ainsi qu'aux vecteurs digérés sont purifiées en suivant la procédure du Kit QIAGEN (Gel extraction Kit) et la quantité des inserts et des vecteurs est identifiée en procédant à une migration sur gel d'agarose de 0,8% et à une comparaison visuelle entre les intensités des bandes des inserts et des vecteurs digérés avec celles qui correspondent au même déplacement du marqueur  $\lambda$  Hind III pour les vecteurs et 1Kb DNA ladder pour les inserts.

### **III.1.1.4 Ligation et transformation dans des cellules compétentes**

La ligation des inserts dans les vecteurs digérés est effectuée à l'aide d'une ligase T4 tout en respectant un ratio de 3/1 (inserts/vecteur) dans le mélange. La transformation des vecteurs obtenus après ligation dans des cellules d'*E. coli* XL1-Blue est réalisée en suivant le mode opératoire décrit ci dessous mais

malheureusement aucune colonie n'est obtenue sur les boîtes de Petri qu'on a effectuée et incubée à 37°C.

#### **IV. Conclusion et perspectives**

Nous n'avons pas réussi à obtenir de colonies sur les boîtes de Petri après l'expérience de transformation par des plasmides contenant le gène METDI5006 dans la souche d'*E. coli* compétente XL-1 Blue. Nous pensons qu'un problème est survenu lors de la ligation des inserts dans les plasmides.

Pour savoir si le problème est survenu lors de la ligation, il faut envoyer le produit de cette ligation au séquençage pour vérifier la bonne introduction de l'insert dans le plasmide. Une fois l'insertion réussie, il faut exprimer et purifier la protéine dotée d'un His-tag sur une colonne à base de  $Ni^{2+}$ .

Des tests d'activités seront faits pour la protéine purifiée pour élucider son rôle dans la réaction enzymatique de méthylation en C-2 des triterpénoïdes méthylés.

## **V. Matériels et méthodes**

### **V.1 Clonage**

Le gène MetDI5006 de *Methylobacterium extorquens* DM4 a été cloné dans les vecteurs d'expressions pRJ2454 qui appartient à la famille des vecteurs pET-28a et le pCM160. Les amorces dessinées afin d'accomplir la PCR sont obtenues chez Sigma Aldrich.

#### **V.1.1 Réaction de PCR**

Les réactions PCR sont réalisées en utilisant le kit « Expand High Fidelity PCR System » (Roche Applied Science 12 140 314 001). La longueur du produit d'amplification est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et comparée à une échelle d'ADN (1Kb DNA ladder) (PROMEGA G5711). Quand la longueur du fragment amplifié est la bonne, les étapes subséquentes de clonage présentées ci-après sont effectuées. La purification du produit PCR est faite en utilisant le kit « QIAquick PCR purification kit » (QIAGEN 28104).

#### **V.1.2 Séparation de fragments ADN sur gel d'agarose**

La séparation des fragments d'ADN est obtenue par migration électrophorétique sur gel d'agarose dans du tampon TBE 0,5X. Le gel d'agarose est préparé dans le même tampon (TBE 10X : tris 1M, acide borique 1M, EDTA 25 mM), auquel on ajoute du BET (1 $\mu$ L) dans le gel (50 mL) (solution stock de BET à 10 mg/ml dilué de l'eau distillée, et conservé à l'abri de la lumière). La concentration en agarose varie entre 0,7 et 2% (p/v) en fonction de la taille des fragments à isoler (Sambrook *et al.* 1989). Les échantillons sont préparés dans un tampon de dépôt (tampon de dépôt 10X : glycérol stérile 30% v/v, bleu de bromophénol 0,25 % p/v, xylène de cyanol 0,25% p/v, qsp eau stérile). La migration est réalisée sous voltage constant (20 V/cm de gel). L'ADN est visualisé à 320 nm, grâce au BET, agent intercalant des acides nucléiques.



## **V.2 Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline**

De manière générale, cette opération est réalisée à partir de cultures de cellules DH5 $\alpha$  transformées avec les plasmides désirés pRJ2454 et pCM160. Classiquement, du milieu LB (10 mL) complétés en kanamycine (20  $\mu$ g/mL) estensemencé avec une colonie et incubés pendant une nuit à 37°C sous agitation. L'extraction de l'ADN plasmidique s'effectue ensuite en utilisant le kit QIAGEN (QIA prep Spin Miniprep 27104). Cette méthode utilise une procédure de lyse cellulaire alcaline comportant un traitement à la RNase et une précipitation à l'isopropanol. L'ADN plasmidique est ensuite purifié grâce à une matrice de verre. Le sel chaotropique (guanidine) nécessaire à la fixation de l'ADN permet également de dénaturer et d'éliminer les protéines de l'échantillon. L'ADN plasmidique est finalement élué dans un tampon de faible force ionique (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). La pureté de l'ADN plasmidique est analysée sur gel d'agarose et sa concentration est estimée par spectroscopie d'absorption UV-visible sachant qu'une absorbance à 260 nm de 1 correspond à une concentration de 50  $\mu$ g/mL.

### **V.2.1 Digestion enzymatique**

Les vecteurs d'expressions et/ou le produit PCR à digérer sont mis en présence des enzymes de restriction choisies, dans le tampon fourni par le manufacturier de l'enzyme (PROMEGA), et la digestion se fait en incubant le mélange pendant 2 h à 37°C. Les digestions enzymatiques sont effectuées dans un volume total de 10  $\mu$ L. La vérification de l'ADN digérée ainsi que les vecteurs est effectué sur un gel d'agarose de 0.8% en utilisant comme marqueur de taille pour les vecteurs le ( $\lambda$  Hind III) et le (1Kb DNA ladder) pour les inserts. La récupération des bandes d'ADN (inserts) et des vecteurs digérés du gel d'agarose est effectuée selon la procédure décrite dans le catalogue (QIAquick gel extraction kit QIAGEN 28704).

### **V.3 Ligation**

La ligase du phage T4 (Invitrogen) est utilisée pour les réactions de ligation. Un ratio molaire de 3 inserts pour 1 vecteur est utilisé dans toutes les ligations. Les réactions de ligation sont effectuées à 16°C pendant 16 h.

### **V.4 Préparation de cellules compétentes**

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB (10 mL) jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (soit une absorbance à 600 nm d'environ 0,4). Après centrifugation (5000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont resuspendues dans une solution de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M, 10 mL) et incubées 30 min à 0°C. Le traitement des cellules par du CaCl<sub>2</sub> provoque un afflux d'ions chlorure accompagnés de molécules d'eau dans la cellule. La déformation de la bicouche lipidique qui en résulte est nécessaire à la pénétration de l'ADN lors de l'étape suivante de transformation. Les cellules sont ensuite récoltées comme précédemment et resuspendues dans une solution de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M, 2 mL, glycérol 10%). Les cellules rendues compétentes sont alors aliquotées et stockées à -80°C.

### **V.5 Transformation dans des bactéries compétentes par choc thermique**

Les bactéries compétentes *E.coli* XL1-Blue sont mises à 0°C pendant 30 min en présence de plasmides (1 à 50 ng), dans des microtubes de 1,5 mL. Le choc thermique est fait à 42°C pendant 90 s. Les bactéries sont ensuite mises à 0°C pendant 5 min. On ajoute du milieu LB (1 mL) et on incube les bactéries sous agitation à 37°C pendant 45 minutes. Les bactéries sont ensuite étalées sur une gélose de LB contenant de la Kanamycine (20 µg/mL). Le gène de résistance à la Kanamycine contenu dans les vecteurs d'expressions pRJ2454 et du PCM160 permet la sélection des bactéries dans lesquelles le vecteur a été inséré. Les boîtes de Petri sont incubées entre 12 à 16 h à 37°C.

## V.6 Souches bactériennes

### V.6.1 *E. coli* DH5 $\alpha$

Les bactéries DH5 $\alpha$  ont un taux de transformation très élevé. Elles sont très utilisées pour les transformations ne nécessitant pas de spécificités particulières et les transformations effectuées en vue de purifier de l'ADN plasmidique.

### V.6.2 *E. coli* XL1-Blue

Cette souche d'*Escherichia coli* possède un gène conférant une résistance à la tétracycline ainsi qu'une mutation *lacIqZ $\Delta$ M15* fournissant une possibilité d' $\alpha$ -complémentation (Stratagène, <http://www.stratagène.com/manuals/200256.pdf>). Elle est utilisée pour les clonages.

## V.7 Plasmides

### V.7.1 Vecteurs pRJ2454 et pCM160

Les ADN sont clonés dans les deux vecteurs pRJ2454 et pCM160.

Le Plasmide pRJ2454 était construit par une insertion d'un fragment de NdeI-BamHI de 540 pb ainsi que d'un autre fragment BamHI-EcoRI de 1,1Kb du vecteur pRJ2403 dans le vecteur pET 28a(+).

Chez ce vecteur, l'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'une région régulatrice Lac permettant une induction par l'IPTG.

Le vecteur pCM160 était construit par une insertion d'un fragment de la région du promoteur citM de 819 pb dans le vecteur pJM 116.

Ces vecteurs offrent la possibilité de marquer la protéine à produire avec une étiquette 6His en Nter pour le pRJ2454 et en Cter pour le PCM160. Ils ont aussi dans leur séquence un gène responsable de la résistance à la Kanamycine.

# **Conclusion générale**

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à déterminer la stéréochimie de la réaction enzymatique de méthylation en C-2 du cycle A du hopane. L'étude de cette stéréochimie est de grand intérêt pour la compréhension de ce type de réactions qui engendre une liaison C-C sur un atome de carbone  $sp^3$  saturé non activé. Cette stéréochimie de la méthylation au niveau du carbone C-2 du cycle A du hopane a été étudiée par vérification de la rétention ou non du deutérium provenant du (5*R*)-et du (5*S*)-(5- $^2H_1$ )-1-désoxy-D-xylulose (substrat de départ de la voie de MEP), incubés en présence de la ( $^{13}C$ -méthyl)-méthionine dans des cellules bactériennes produisant des triterpénoïdes méthylés en C-2. Cette vérification de la rétention ou non du deutérium est faite par analyse en RMN du  $^{13}C$  des triterpénoïdes méthylés en C-2 isolés à partir de ces expériences d'incubation.

La première partie de ce travail est consacrée à la synthèse des deux isotopomères (*R*) et (*S*) marqué au deutérium en C-5 du 1-désoxy-D-xylulose (DX). Ces deux isotopomères ont été synthétisés et ont été incubés avec *Bradyrhizobium japonicum*, une bactérie productrice de triterpénoïdes méthylés en C-2 et C-20, pour l'étude en RMN de  $^{13}C$  de la stéréochimie de la réaction enzymatique de la méthylation. L'étape clé dans ces synthèses est l'utilisation de (*R*)-Alpine Borane et de (*S*)-Alpine Borane, agents de réduction stéréosélective, assurant les deux configurations (*R*) et (*S*) du C-5 du 1-désoxy-D-xylulose marqué au deutérium en C-5. Les deux configurations (*R*) et (*S*) en C-5 du DX ont été vérifiées par des analyses 1D et 2D de RMN de protons des deux anomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -méthyl-désoxy-D-xylulofuranosides de chacun des deux isomères (*R*) et (*S*). De plus, nous avons synthétisé le (1,1,1- $^2H_3$ )-DX, cette molécule relativement peu coûteuse et facile d'accès a été utilisée dans des tests d'incubations dans de *Bradyrhizobium japonicum* afin de vérifier le taux d'incorporation du DX dans les triterpénoïdes méthylés biosynthétisés par cette bactérie avant d'engager les deux isotopomères (*R*) et (*S*) du DX sélectivement marqués au deutérium en C-5.

La deuxième partie de ce travail est consacrée aux incubations des deux isotopomères (*R*) et (*S*) du DX marqués au deutérium en C-5 dans les triterpénoïdes bactériens méthylés en C-2. Au début, nous avons commencé à utiliser *Methylobacterium organophilum*, une souche connue au laboratoire et qui produit majoritairement du 2 $\beta$ -méthyldiploptérol, pour effectuer les tests d'incubations. Le 2 $\beta$ -

méthyldiploptérol isolé du *Methylobacterium organophilum* ne présente aucun marquage sur son squelette hopane après avoir incubé du (CD<sub>3</sub>)-DX dans le milieu de culture. Suite à cet échec, nous avons choisi d'utiliser une autre souche, *Bradyrhizobium japonicum* également connue au laboratoire et qui produit majoritairement du 2β-méthyltétrahymanol et du 2β-méthyldiploptérol. Après avoir incubé du (CD<sub>3</sub>)-DX dans le milieu de culture de cette bactérie, nous avons réussi à incorporer le (CD<sub>3</sub>)-DX dans les unités isopréniques de ces deux triterpénoïdes méthylés avec 88% d'incorporation. Suite à la réussite de l'incorporation du DX dans *Bradyrhizobium japonicum* et son échec dans *Methylobacterium organophilum*, des tests de DX kinase utilisant du [1-<sup>14</sup>C]DX ont été effectués pour vérifier la présence d'une kinase responsable de la phosphorylation du DX en DXP (qui est le substrat initial de la voie de MEP) chez *Methylobacterium organophilum* et *Bradyrhizobium japonicum*. Les résultats ont montré l'absence de la kinase dans *Methylobacterium* ce qui est en accord avec la réussite de l'incorporation du DX dans le 2β-méthyltétrahymanol et le 2β-méthyldiploptérol de *Bradyrhizobium japonicum* et son échec dans le 2β-méthyldiploptérol de *Methylobacterium organophilum*. Des incubations des deux isotopomères synthétiques (*R*) et (*S*) du DX sélectivement marqués au deutérium en C-5 ont ensuite été effectuées avec *Bradyrhizobium japonicum* en présence de la (<sup>13</sup>C-méthyl)-méthionine pour étudier la stéréochimie de la réaction enzymatique de méthylation en C-2 du cycle A du hopane. Les analyses par RMN de <sup>13</sup>C des triterpénoïdes méthylés des deux expériences d'incubations des (5*R*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)- et du (5*S*)-(5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-DX marqués au deutérium en C-5 avec *Bradyrhizobium japonicum* ont montré que la méthylation en C-2 n'est pas totalement stéréosélective, mais majoritairement on a une rétention du proton pro (*S*) et que c'est le proton pro (*R*) qui est substitué par le groupement méthyle.

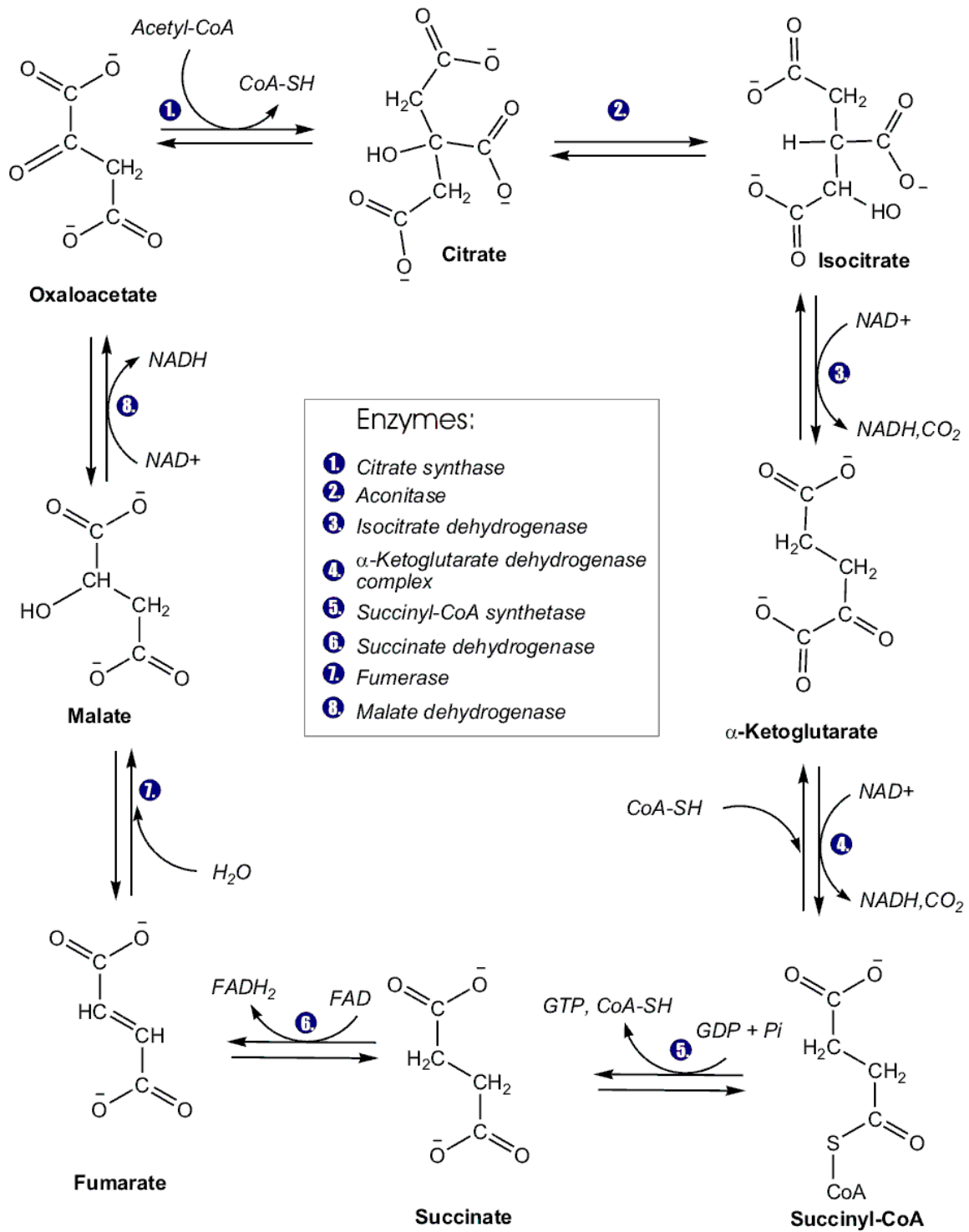
Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la contribution de la méthylcobalamine comme agent de donneur de méthyle dans la réaction enzymatique de méthylation en C-2 du cycle A du hopane. Dans ce projet, nous avons réussi à synthétiser la (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)-méthylcobalamine qui sera incubée par la suite dans des systèmes acellulaires bactériens bruts. Les triterpénoïdes méthylés seront isolés et analysés en RMN de <sup>13</sup>C pour vérifier la présence d'un marquage au <sup>13</sup>C du groupement de méthyle en C-2 du cycle A du hopane.

Enfin, nous nous sommes intéressés à identifier une méthyltransférase responsable de la réaction enzymatique de méthylation en C-2 du cycle A du hopane dans *Methylobacterium organophilum*. Ce travail était réalisé en collaboration avec Stéphane VUILLEUMIER de l'Institut de Botanique à STRASBOURG, qui nous a fourni des plasmides contenant le gène METDI5006 soupçonné coder pour une méthylase responsable de la méthylation en C-2 du hopane. Ce travail consiste à surexprimer ce gène, à purifier la protéine correspondante et à étudier son activité catalytique dans la réaction de méthylation. Nous avons réussi à amplifier ce gène par PCR à l'aide des primers que nous avons déjà dessinés. Deux vecteurs ont été utilisés pour l'expression du gène (pRJ2454 et pCM160). Nous avons réussi à digérer par des enzymes de restrictions les deux vecteurs et les inserts pour accomplir ensuite la ligation à l'aide d'une ligase et la transformation dans des cellules compétentes d'*E coli* XL1-Blue. Après la transformation, aucune colonie n'est obtenue sur les boîtes de Petri, nous pensons qu'un problème est survenu lors de la ligation des inserts dans les plasmides. Un séquençage du produit de cette ligation sera effectué pour vérifier la bonne introduction de l'insert dans le plasmide. Une fois l'insertion réussie, il faut exprimer et purifier la protéine dotée d'un His-tag sur une colonne à base de  $Ni^{2+}$ .

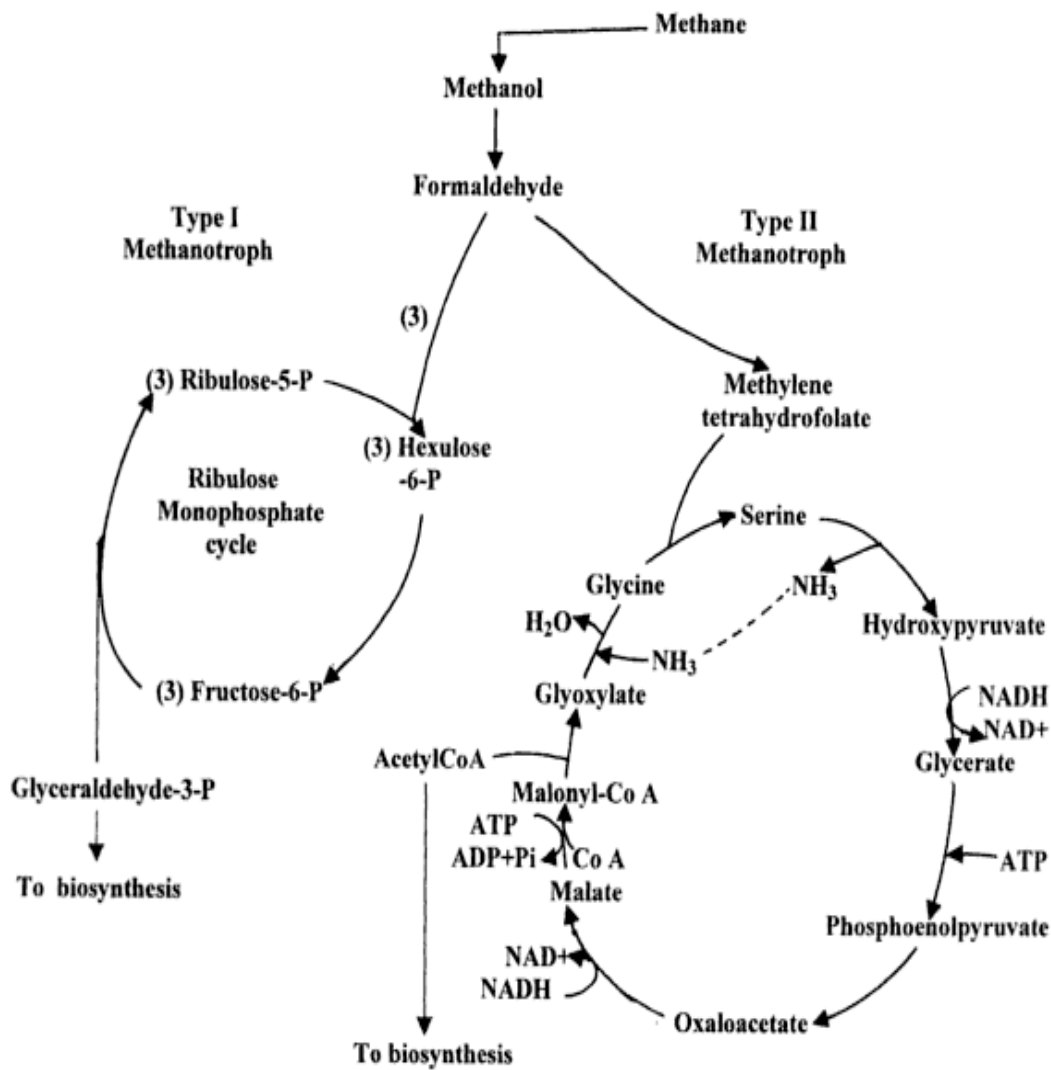
Des tests d'activités devront être faits avec la protéine purifiée pour élucider son rôle dans la réaction enzymatique de méthylation en C-2 des triterpénoïdes méthylés.

# **Annexes**





# Cycle de Krebs



**Du méthanol à la biosynthèse des métabolites chez un méthanotrophe ou un méthylotrophe (cycles de la sérine et du ribulose monophosphate)**

# **Références Bibliographiques**

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3389.

Austin, B. and Goodfellow, M. (1979) *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**, 373.

Angier, R. B.; Boothe, J. H.; Hutchings, B. L.; Mowat, J. H.; Semb, J.; Stokstad, E. L.; Subbarow, Y.; Waller, C. W.; Cosulich, D. B.; Fahrenbach, M. J.; Hultquist, M. E.; Kuh, E.; Northey, E. H.; Seeger, D. R.; Sickels, J. P. and Smith, J. M. Jr. (1946) The Structure and synthesis of the liver *Lactobacillus casei* factor. *Science* **103**, 667.

Bird, C. W.; Lynch, J. M.; Pirt, S. J. and Reid, W. W. (1971) The identification of hop-22(29)-ene in prokaryotic organisms. *Tetrahedron Lett.* **12**, 3189.

Bisseret, P.; Wolff, G.; Albrecht, A. M.; Tanaka, T.; Nakatani, Y. and Ourisson, G. (1983) A direct study of the cohesion of lecithin bilayers: the effect of hopanoids and  $\alpha,\omega$ -dihydroxycarotenoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**, 320.

Bisseret, P.; Zundel, M. and Rohmer, M. (1985) Prokaryotic triterpenoids. 2. 2-methylhopanoids from *Methylobacterium organophilum* and *Nostoc muscorum*, a new series of prokaryotic triterpenoids. *Eur. J. Biochem.* **150**, 29.

Bringer, S.; Härtner, T.; Poralla, K. and Sahm, H. (1985) Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **140**, 312.

Bochar, D. A.; Friesen, J. A.; Stauffacher, C. V. and Rodwell, V. W. (1999) Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. *Comprehensive Natural Product chemistry: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids*, Pergamon Pr, **2**, 15.

Bloch, K. (1992) Sterol molecule: Structure, biosynthesis and function. *Steroids* **57**, 378.

Blagg, B. S. J. and Poulter, C. D. (1999) Synthesis of 1-deoxy-D-xylulose and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *J. Org. Chem.* **64**, 1508.

Broers, S. T. J. (1994) I. Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli* II. Beitrag zur Aufklärung des Biosynthese von Vitamin B12 in *Propionibacterium shermanii*; Dissertation: Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland

Bach, T. J. (1995) Some New aspects of isoprenoids biosynthesis in plants. A review. *Lipids* **30**, 191.

Bravo, J. M. (1997) Isoprénoïdes bactériens: de l'isolation à la biosynthèse. Thèse de l'université de Strasbourg, France.

Bravo, J. M.; Perzl, M.; Hartner, T.; Kannenberg, E. L. and Rohmer, M. (2001) Novel methylated triterpenoids of the gammacerane series from the nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1323.

Berkovitch, F.; Nicolet, Y.; Wan, J. T.; Jarrett, J. T. and Drennan, C. L. (2004) Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **5654**, 76.

Birch, O. M.; Fuhrmann, M. and Shaw, N. M. (1995) Biotin synthase from *Escherichia coli*, an investigation of the low molecular weight and protein components required for activity in vitro. *J. Biol. Chem.* **32**, 19158.

Bui, B. T. S.; Benda, R.; Schunemann, V.; Florentin, D.; Trautwein, A. X. and Marquet, A. (2003) Fate of the [2Fe-2S]<sup>2+</sup> Cluster of *Escherichia coli* biotin synthase during reaction: a mössbauer characterization. *Biochem.* **42**, 8791.

Breen, R. S.; Campopiano, D. J.; Webster, S.; Brunton, M.; Watt, R. and Baxter, R. L. (2003) The mechanism of 7,8-diaminopelargonate synthase; the role of S-adenosylmethionine as the amino donor. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 3498.

Brereton, P. S.; Duderstadt, R. E.; Staples, C. R.; Johnson, M. K. and Adams, M. W. (1999) Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [4Fe-4S] cluster of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties. *Biochem.* **32**, 10594.

Banerjee, R. V.; Johnston, N. L.; Sobeski, I. K.; Datta, P. and Matthews, R. G. (1989) Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* methH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **264**, 13888.

Bonifácio, M. J.; Archer, M.; Rodrigues, M. L.; Matias, P. M.; Learmonth, D. A.; Carrondo, M. A. and Soares-Da-Silva, P. (2002) Kinetics and crystal structure of catechol-*o*-methyltransferase complex with co-substrate and a novel inhibitor with potential therapeutic application. *Mol. Pharmacol.* **4**, 795.

Baraniak, J.; Moss, M. L. and Frey, P. A. (1989) Lysine 2, 3-aminomutase. Support for a mechanism of hydrogen transfer involving S-adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.* **264**, 1357.

Blaschkowski, H. P.; Neuer, G.; Ludwig-Festl, M. and Knappe, J. (1982) Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in *Escherichia coli*. CoA-acylating pyruvate: flavodoxin and NADPH: flavodoxin oxidoreductases participating in the activation of pyruvate formate-lyase. *Eur. J. Biochem.* **123**, 563.

Benveniste, P. (1986) Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 275.

Budzikiewicz, H.; Wilson, J. M. and Djerassi, C. (1963) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2688.

Chirpich, T. P.; Zappia, V.; Costilow, R. N. and Barker, H. A. (1970) Lysine 2,3-aminomutase. Purification and properties of a pyridoxal phosphate and S-adenosylmethionine-activated enzyme. *J. Biol. Chem.* **7**, 1778.

Cantoni, G. L. (1975) Biological methylation: selected aspects. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 435.

Cheng, X. and Roberts, R. J. (2001) AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3784.

Chiang, P. K.; Gordon, R. K.; Tal, J.; Zeng, G. C.; Doctor, B. P. and Pardhasaradhi, K. (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* **10**, 471.

Chen, D.; Walsby, C.; Hoffman, B. M. and Frey, P. A. (2003) Coordination and mechanism of reversible cleavage of S adenosylmethionine by the [4Fe –4S] center in lysine 2,3-aminomutase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11788.

Calzolari, L.; Gorst, C. M.; Zhao, Z. H.; Teng, Q.; Adams, M. W. and La Mar, G. N. (1995) <sup>1</sup>H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp<sup>14</sup> as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochem.* **36**, 11373.

Cane, D. E.; Du, S. C.; Robinson, J. K.; Hsiung, Y.J. and Spenser, I. D. (1999) Biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>: enzymatic conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate to pyridoxol phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7722.

Costantino, V.; Fattorusso, E.; Imperatore, C. and Mangoni, A. (2000) The first 12-methylhopanoid: 12-methylbacteriohopanetetrol from the marine sponge *Plakortis simplex*. *Tetrahedron* **56**, 3781.

Caspi, E.; Greig, J. B. and Zander, J. M. (1968) The biosynthesis of tetrahymanol *in vitro*. *Biochem. J.* **109**, 931.

Connan, J. (1989) La géochimie organique au service de l'exploration pétrolière. *La Recherche* **208**, 18.

Chistoserdova, L.; Lapidus, A.; Han, C.; Goodwin, L. and Saunders, L. (2007) The genome of *Methylobacillus flagellatus*, the molecular basis for obligate methylotrophy, and the polyphyletic origin of methylotrophy. *J. Bacteriol.* **189**, 4020.

Choi, S. C.; Chase, T.Jr and Bartha, R. (1994) Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**, 1342.

Col, B.; Oltean, S. and Banerjee, R. (2007) Translational regulation of human methionine synthase by upstream openreading frames. *Biochim. Biophys. Acta.* **1769**, 532.

Cicchillo, R. M.; Iwig, D. F.; Jones, A. D.; Nesbitt, N. M.; Baleanu-Gogonea, C.; Souder, M. G.; Tu, L. and Booker, S. J. (2004) Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochem.* **21**, 6378.

David, S.; Estramareix, B.; Fischer, J. C. and Thérissod, M. (1981) 1-deoxy-D-threo-2-pentulose : the precursor of the five-carbon chain of the thiazole of thiamine. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7341.

David, S.; Estramareix, B.; Fischer, J. C. and Thérissod, M. (1982) The biosynthesis of thiamine synthesis of [1,1,1,5-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-1-deoxy-D-threo-2-pentulose and incorporation of this sugar in biosynthesis of thiazole by *Escherichia coli* cells. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 2131.

Dixon, M. M.; Huang, S.; Matthews, R. G. and Ludwig, M. (1996) The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B<sub>12</sub>. *Structure* **4**, 1263.

Dobritzsch, D.; Schneider, G.; Schnackerz, K. D. and Lindqvist, Y. (2001) Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO Journal* **4**, 650.

Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G. and Ludwig, M. L. (1994) How a protein binds B<sub>12</sub>: a 3.0 Å X-ray structure of B<sub>12</sub>-binding domains of methionine synthase. *Science* **266**, 1669.

De Rosa, M.; Gambacorta, A. and Minale, L. (1971) Bacterial triterpenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 619.

Ermler, U.; Grabarse, W.; Shima, S.; Goubeaud, M. and Thauer, R. K. (1997) Crystal structure of methyl coenzyme M reductase - the key enzyme of biological methane formation. *Science* **278**, 1457.

Ellenbogen, L. (1984) Vitamin B<sub>12</sub>. In: Machlin LJ (ed), Handbook of vitamins. Marcel Dekker, New York, 497.

Fontecave, M.; Mulliez, E. and Ollagnier-de-Choudens, S. (2001) Adenosylmethionine as a source of 5'-deoxyadenosyl radicals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 506.

Fontecave, M.; Atta, M. and Mulliez, E. (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *TIBS* **5**, 243.

Fonteneau, P.; Hartmann-Bouillon, M. A.; Benveniste, P. (1977) A 24-methylene lophenol C-28 methyltransferase from suspension cultures of bramble cells. *Plant Sci. Lett.* **10**, 147.

Frey, P. A. (1990) Importance of organic radicals in enzymic cleavage of unactivated carbon-hydrogen bonds. *Chem. Rev.* **7**, 1343.

Frey, P. A. and Reed, G. (2000) Radical mechanisms in adenosylmethionine and adenosylcobalamin-dependent enzymatic reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 6.

Frey, P. A. and Booker, S. J. (2001) Radical mechanisms of S-adenosylmethionine dependent enzymes. *Adv. Protein Chem.* **58**, 1.

Frey, P. A. and Magnusson, O. T. (2003) S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? *Chem. Rev.* **6**, 2129.

Frey, P. A. and Hegeman, A. D. (2007) Enzymatic Reaction Mechanisms, New York, Oxford University Press, pp. 129 and 655.

Frey, P. A.; Hegeman, A. D. and Ruzicka, F. J. (2008) The radical SAM superfamily. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 63.

Falcone-Hindley, M. L. and Davis, J. T. (1998) Stereoselective Preparation of Deuterium-Labeled Sugars: (6*R*)-(6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>)-N-Acetylglucosamine Derivatives. *J. Org. Chem.* **63**, 5555.

Flesch, G. and Rohmer, M. (1988a) Prokaryotic hopanoids – the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton – formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur. J. Biochem.* **175**, 405.



Flesch, G. and Rohmer, M. (1988b) Biosynthesis of a carbocyclic pentose analog linked to bacteriohopanetetrol from the bacterium *Methylobacterium organophilum*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 868.

Forster, H. J.; Biemann, K.; Haigh, W. G.; Tattrie, N. H. and Colvin, J. R. (1973) The structure of novel C<sub>35</sub> pentacyclic terpenes from *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **135**, 133.

Frenzel, T.; Zhou, P. and Floss, H. G. (1990) Formation of 2-methyltryptophan in the biosynthesis of thiostrepton: isolation of S-adenosylmethionine:tryptophan 2-methyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 35.

Finke, R. G. and Hay, B. P. (1984) Thermolysis of adenosylcobalamin: a product, kinetic, and cobalt-carbon (C5) bond dissociation energy study. *Inorg. Chem.* **20**, 3041.

Finke, R. G. and Martin, B. D. (1990) Coenzyme AdoB<sub>12</sub> vs AdoB<sub>12</sub>- homolytic Co-C cleavage following electron transfer: a rate enhancement greater than or equal to 10. *J. Inorg. Biochem.* **1**, 19.

Florentin, D.; Bui, M. T.; Marquet, A.; Ohshiro, T. and Izumi, Y. (1994) On the mechanism of biotin synthase of *Bacillus sphaericus*. *C. R. Acad. Sci. III.* **317**, 485.

Goto-Ito, S.; Ishii, R.; Ito, T.; Shibata, R.; Fusatomi, E.; Sekine, S. I.; Bessho, Y. and Yokoyama, S. (2007) Structure of an archaeal TYW1, the enzyme catalyzing the second step of wye-base biosynthesis. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 1059.

Gurbiel, R. J.; Ohnishi, T.; Robertson, D. E.; Daldal, F. and Hoffman, B. M. (1991) Q-band ENDOR spectra of the Rieske protein from *Rhodobacter capsulatus* ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase show two histidines coordinated to the [2Fe-2S] cluster. *Biochem.* **49**, 11579.

Grogan, D. W. and Cronan, J. E. Jr (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 429.

Glaserapp-Breiling, M. and Montforts, F. P. (2000) Unusual alkylation reactions in the biosynthesis of natural products and elucidation of their reaction mechanisms. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 721.

Gelpi, E.; Schneider, H.; Mann, J. and Oro, J. (1970) Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae. *Phytochemistry* **9**, 603.

- Giner, J. L. (1998) New and efficient synthetic routes to 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2479.
- Griffith, W. P. and Ley, S. V., (1990) TPAP: Tetra-*n*-propylammonium perruthenate, a mild and convenient oxidant for alcohols. *Aldrichim. Acta.* **23**, 13.
- Green, P. N.; Bousfield, I. J. and Hood, D. (1988) Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov., and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 124.
- Gottschalk, G. and Thauer, R. K. (2001) The Na (+)-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 28.
- Grillo, M. A. and Colombatto S. (2008) S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* **34**, 187.
- Gerfen, G. J.; Licht, S.; Willems, J. P.; Hoffman, B. M. and Stubbe, J. (1996) Electron paramagnetic resonance investigations of a kinetically competent intermediate formed in ribonucleotide reduction: evidence for a thiyl radical-cob(II)alamin interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **35**, 8192.
- Hanzelmann, P. and Schindelin, H. (2004) Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **35**, 12870.
- Holliday, G. L.; Thornton, J. M.; Marquet, A.; Smith, A. G.; Rebeille, F.; Mendel, R.; Schubert, H. L.; Lawrence, A. D. and Warren, M. J. (2007) Evolution of enzymes and pathways for the biosynthesis of cofactors. *Natural Product Reports* **5**, 972.
- Hodgkin, D. C.; Kamper, J.; MacKay, M.; Pickworth, J.; Trueblood, K. N. and White, J. G. (1956) Structure of Vitamin B-12. *Nature* **178**, 64.
- Himmeldirk, K.; Kennedy, I. A.; Hill, R. E.; Sayer, B. G, and Spenser, I. D. (1996) Biosynthesis of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> in *Escherichia coli*: concurrent incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into thiamin (B<sub>1</sub>) and pyridoxol (B<sub>6</sub>). *J. Chem. Soc, Chem. Com.* 1187.
- Himmeldirk, K.; Sayer, B. G. and Spenser, I. D. (1998) Comparative biogenetic anatomy of vitamin B<sub>1</sub>: a <sup>13</sup>C NMR investigation of the biosynthesis of thiamin in *Escherichia coli* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Chem. Soc.* **15**, 3581.
- Hoeksema, H. and Baczynski, L. (1976) A New metabolite from *Streptomyces hygroscopicus*. II. Identification as 1-deoxy-D-threo-pentulose. *J. Antibiot.* **29**, 688.

Hemmerlin, A.; Tritsch, D.; Hartmann, M.; Pacaud, K.; Hoeffler, J. F.; van Dorselaer, A.; Rohmer, M. and Bach, T. J. (2006) A cytosolic arabidopsis d-Xylulose kinase catalyzes the phosphorylation of 1-Deoxy-d-Xylulose into a precursor of the plastidial isoprenoid Pathway. *Plant Physiol.* **2**, 441.

Houck, D. R.; Kobayashi, K.; Williamson, J. M. and Floss, H. G. (1986) Stereochemistry of methylation in thienamycin biosynthesis: example of a methyl transfer from methionine with retention of configuration. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5365.

Halpern, J.; Kim, S. H. and Leung, T. W. (1984) Cobalt-carbon bond dissociation energy of coenzyme B<sub>12</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8317.

Hauschild-Rogat, P. (1968) N-formylmethionine as a N-terminal group of *E. coli* ribosomal protein. *Mol. Gen. Genet.* **2**, 95.

Iwata-Reuyl, D. (2003) Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hyper-modified nucleosides of transfer RNA. *Bioorg. Chem.* **31**, 24.

Ifuku, O.; Koga, N.; Haze, S.; Kishimoto, J. and Wachi, Y. (1994) Flavodoxin is required for conversion of dethiobiotin to biotin in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1**, 173.

Ireland, R.E. and Norbeck, D.W. (1985). Application of the Swern oxidation to the manipulation of highly reactive carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **50**, 2198.

Ito, H. and Iizuka, H. (1971) Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. *XII. Studies on the microorganisms of cereal grain. Agric. Biol. Chem.* **35**, 1566.

Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D. and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Ann. Rev. Biochem.* **74**, 247.

Jourand, P.; Giraud, E.; Béna, G.; Sy, A.; Willems, A.; Gillis, M.; Dreyfus, B. and de Lajudie, P. (2004) *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2269.

Jarrett, J. T. (2003) The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 174.

Krebs, C.; Broderick, W. E.; Henshaw, T. F.; Broderick, J. B. and Huynh, B. H. (2002) Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: a Mossbauer spectroscopic study. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 912.

Kennedy, I. A.; Hill, R. E.; Paulowski, R. M.; Sayer, B. G. and Spenser, I.D. (1995). Biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>: origin of pyridoxine by the union of two acyclic precursors 1-deoxy-D-xylulose and 4-hydroxy-L-threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1661.

Knani, M. H.; Corpe, W. A. and Rohmer, M. (1994) Bacterial hopanoids from pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) and from green plant surfaces. *Microbiology* **140**, 2755.

Kanneberg, E.; Perzl, M. and Härtner, T. (1995) The occurrence of hopanoïd lipids in bradyrhizobium bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 255.

Kamigiri, K.; Hidaka, T.; Imai, S.; Murakami, T. and Seto, H. (1992) Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) 12. C-P bond formation mechanism of bialaphos: discovery of aP-methylation enzyme. *J. Antibiot.* **45**, 781.

Kuzuyama, T.; Hidaka, T.; Kamigiri, K.; Imai, S. and Seto, H. (1992) Studies on the biosynthesis of fosfomycin. 4. The biosynthetic origin of the methyl group of fosfomycin. *J. Antibiot.* **45**, 1812.

Knappe, J. and Schmitt, T. (1976) A novel reaction of S-adenosyl-L-methionine correlated with the activation of pyruvate formate-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1110.

Knappe, J. (1984) Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1332.

Lepore, B. W.; Ruzicka, F. J.; Frey, P. A. and Ringe, D. (2005) The x-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **39**, 13819.

Layer, G.; Verfurth, K.; Mahlitz, E. and Jahn, D. (2002) Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **37**, 34136.

Layer, G.; Moser, J.; Heinz, D. W.; Jahn, D. and Schubert, W.D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes. *EMBO J.* **23**, 6214.

Layer, G.; Heinz, D. W.; Jahn, D. and Schubert, W. D. (2004) Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 468.

Layer, G.; Kervio, E.; Morlock, G.; Heinz, D. W.; Jahn, D.; Retey, J. and Schubert, W.D. (2005) Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biol. Chem.* **10**, 971.

Ludwig, M. L. and Matthews, R. G. (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 269.

Lauble, H.; Kennedy, M. C.; Beinert, H. and Stout, C. D. (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochem.* **10**, 2735.

Linck, R. C.; Spahn, C. W.; Rauchfuss, T. B. and Wilson, S. R. (2003) Structural Analogues of the bimetallic reaction center in acetyl CoA synthase: A Ni-Ni model with bound CO. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8700.

Lezius, A. G. and Barker, H. A. (1965) Corrinoid Compounds of *Methanobacillus omelianskii*. I. Fractionation of the corrinoid compounds and identification of factor III and factor III coenzyme. *Biochem.* **4**, 510.

Lotta, T.; Vidgren, J.; Tilgmann, C.; Ulmanen, I.; Melén, K.; Julkunen, I. and Taskinen, J. (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-*o*-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochem.* **13**, 4202.

Liang, P. H. (2009) Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases. *Biochem.* **48**, 6562.

Lidstrom, M.E. (2001) Aerobic methylotrophic prokaryotes. The prokaryotes, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y, 223.

Liao, R.; Duan, L.; Lei, C.; Pan, H.; Ding, Y.; Zhang, Q.; Chen, D.; Shen, B.; Yu, Y. and Liu, W. (2009) Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chem. Biol.* **16**, 141.

Ljungdahl, L.; Irion, E. and Wood, H. G. (1966) Role of corrinoids in the total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by *Clostridium thermoaceticum*. *Fed. Proc.* **25**, 1642.

Licht, S.; Gerfen, G. J. and Stubbe, J. (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **5248**, 477.

Moss, M. and Frey, P. A. (1987) The role of S-Adenosylmethionine in the Lysine 2,3-Aminomutase reaction. *J. Biol. Chem.* **31**, 14859.

Martin, J. L. and McMillan, F. M. (2002) SAM (dependent) I AM: the S adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 783.

Magnusson, O. T.; Reed, G. H. and Frey, P. A. (2001) Characterization of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical: an intermediate in the reaction of lysine 2,3-aminomutase. *Biochem.* **40**, 7773.

Malhotra, H. C. and Nes, W. R. (1971) The mechanism of introduction of alkyl groups at C-24 of sterols. IV. Inhibition by triparanol. *J. Biol. Chem.* **246**, 4934.

Mulliez, E.; Padovani, D.; Atta, M.; Alcouffe, C. and Fontecave, M. (2001) Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center. *Biochem.* **12**, 3730.

Murzin, A. G.; Brenner, S. E.; Hubbard, T. and Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **4**, 536.

Minot, G. R. and Murphy, W. P. (1926) Treatment of pernicious anaemia by a special diet. *J. Am. Med. Assn.* **87**, 470.

Mitchell, H. K., Snell, E. E. and Williams, R. J. (1941) The concentration of "folic acid". *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 2284.

Mortenson, L.; Carnahan, J. and Valentine, R. (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 448.

Mosimann, H. and Kräutler, B. (2000) Methylcorrinoids methylate radicals-their second biological mode of action? *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 393.

Midland, M. M. and Tramontano, A. (1978) *B*-Alkyl-9 borabicyclo[3.3.1]nonanes as mild, chemoselective reducing agents for aldehydes. *J. Org. Chem.* **43**, 1470.

Midland, M. M.; Asirwatham, G. and Cheng, J.C. (1994) Synthesis and conformational analysis of (6*R*)-[6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-1,2:3,4-Di-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-galactopyranose. NMR and Molecular Modeling Studies. *J. Org. Chem.* **59**, 4438.

Meyer, O.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D. and Rohmer, M. (2003) Isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway. Synthesis of (3*R*,4*S*)-dihydroxy-5 oxohexylphosphonic acid, an isosteric analogue of 1-deoxy-D-xylulose 5 phosphate, the substrate of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reducto-isomerase. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 4367.

Mallory, F. B.; Gordon, J. T. and Conner, R.L. (1963) The isolation of a pentacyclic triterpenoid alcohol from a protozoan. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1462.

Matthews, R. G. (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc. Chem. Res.* **34**, 681

Matthews, R. G.; Koutmos, M. and Datta, S. (2008) Cobalamin-dependent and cobamide-dependent methyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 658.

Metcalf, W. W. and Van der Donk, W. A. (2009) Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 65.

Marsh, E. N. G. (1999) Cobalamin dependent enzymes. *Biochem*, **34**, 139.

Marsh, E. N. G. (2000) Glutamate mutase. *Bioorg. Chem.* **28**, 176.

Marsh, E. N. G.; Patwardhan, A. and Huhta, M. S. (2004) S-adenosylmethionine radical enzymes. *Bioorg. Chem.* **32**, 326.

Marquet, A. (2001) Enzymology of carbon–sulfur bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 541.

Markham, G. D.; Hafner, E. W.; Tabor, C. W. and Tabor, H. (1980) S-adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 9082.

Nes, W. D. and McKean, M. L. (1977) Occurrence, physiology and ecology of sterols. *Biochemistry of steroids and other isoprenoids*, Baltimore, MD: University Park Press.411.

Nes, W. D.; Janssen, G. G. and Bergenstrahle, A. (1991) Structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosylL-methionine:  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase, *J. Biol. Chem.* **266**, 15202.

Nicolet, Y. and Drennan, C. L. (2004) AdoMet radical proteins--from structure to evolution--alignment of divergent protein sequences reveals strong secondary structure element conservation. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4015.

Nicolet, Y.; Rubach, J. K.; Posewitz, M. C.; Amara, P.; Mathevon, C.; Atta, M.; Fontecave, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (2008) X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* **27**, 18861.

Neunlist, S.; Holst, O. and Rohmer, M. (1985) Prokaryotic triterpenoids – the hopanoids of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum* – an aminotriol and its aminoacyl derivatives, *N*-tryptophanyl and *N*-ornithinyl aminotriol. *Eur. J. Biochem.* **147**, 561.

Neunlist, S. and Rohmer, M. (1988) A convenient route to an acetylenic C-35 hopanoid and the absolute configuration of the side chain of aminobacteriohopanetriol. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 830.

Ourisson, G., Albrecht, P. and Rohmer, M. (1984) The microbial origin of fossils fuels. *Sci. Am.* **251**, 44.

Ourisson, G.; Rohmer, M. and Poralla, K. (1987) Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 301.

Ourisson, G. and Albrecht, P. (1992) Hopanoids.1. Geohopanoids – the most abundant natural products on earth. *Acc. Chem. Res.* **25**, 398.

Ogura, K. and Koyama, T. (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **4**, 1263.

Osborn, J. A.; Jardine, F. H.; Young, J. F. and Wilkinson, G. (1966) The preparation and properties of tris (triphenylphosphine) halogenorhodium and some reactions thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of olefins and acetylenes and their derivatives. *J. chem. Soc. (A)*, 1711.

Omer, Z. S.; Tombolini R. and Gerhardson, B. (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**, 319.

Palmer, J. L. and Abeles, R. H. (1979) The mechanism of S-adenosyl - homocysteinase. *J. Biol. Chem.* **254**, 121.

Petrovich, R. M.; Ruzicka, F. J.; Reed, G. H. and Frey, P. A. (1991) Metal cofactors of lysine 2,3-aminomutase. *J. Biol. Chem.* **12**, 7656.

Petrovich, R. M.; Ruzicka, F. J.; Reed, G. H. and Frey, P. A. (1992) Characterization of iron-sulfur clusters in lysine 2,3-aminomutase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochem.* **44**, 10774.

Pierrel, F.; Hernandez, H. L.; Johnson, M. K.; Fontecave, M. and Atta, M. (2003) MiaB protein from *Thermotoga maritima*. Characterization of an extremely thermophilic tRNA-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **32**, 29515.



Pfiffner, J. J.; Calkins, D. G.; O'Dell, B. L.; Bloom, E. S.; Brown, R. A.; Campbell, C. J. and Bird, O. D. (1945) Isolation of an antianemia factor (vitamin B<sub>12</sub> conjugate) in crystalline form from yeast. *Science* **102**, 228.

Pelmont, J. (1993) La voie de Wood dans Bactéries et Environnement. *Presses Universitaires de Grenoble*, Grenoble 368.

Piel, J. and Boland, W. (1997) Highly efficient and versatile synthesis of isotopically labelled 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **38**, 6387.

Poralla, K.; Kannenberg, E. and Blume, A. (1980) A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic thermophilic *Bacillus acidocaldarius* has a cholesterol-like function in membrane. *FEBS Lett.* **113**, 107.

Poralla, K.; Härtner, T. and Kannenberg, E. (1984) Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 253.

Poulter, C. D. (1990) Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 70.

Poston, J. M.; Kuratomi, K. and Stadtman, E. R. (1964) Methyl-vitamin B<sub>12</sub> as a source of methyl groups for the synthesis of acetate by cell-free of *Clostridium thermoaceticum*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **112**, 804.

Perzl, M.; Reipen, I. G.; Schmitz, S.; Poralla, K.; Sahm, H.; Sprenger, G. A. and Kannenberg, E. L. (1998) Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1393**, 108.

Qureshi, N. and Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Vol. I (J. W. Porter and S. L. Spurgeon, eds), John Wiley and Sons, NewYork, NY. ISBN 0-471-04807-0, pp. 1-46.

Rahier, A.; Taton, M.; Bouvier-Nave', P.; Schmitt, P.; Benveniste, P.; Schuber, F.; Narula, A. S.; Cattell, L.; Anding, C. and Place, P. (1986) Design of high energy intermediate analogues to study sterol biosynthesis in higher plants. *Lipids* **21**, 52.

Rickes, E. L.; Brink, N. G.; Koniuszy, F. R.; Wood, T. R. and Folkers, K. (1948) Crystalline vitamin B<sub>12</sub>. *Science* **107**, 396.

Reich, H.J. (2013) Vicinal proton-proton coupling  $^3J_{HH}$ . University of Wisconsin. (<http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-05-3j.htm>).

Rohmer, M. (1975) Triterpénoïdes de procaryotes. Thèse d'état de l'univeristé Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Rohmer, M. and Ourisson, G. (1976a) Dérivés du bactériohopane: variations structurales et répartition. *Tetrahedron Lett.* **17**, 3637.

Rohmer, M. and Ourisson, G. (1976b) Structure des bactériohopane-tétrols d'*Acetobacter xylinum*. *Tetrahedron Lett.* **17**, 3633.

Rohmer, M. and Ourisson, G. (1976c) Methylhopanes from *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter rancens* – a new family of triterpene compounds. *Tetrahedron Lett.* **17**, 3641.

Rohmer, M.; Bouvier, P. and Ourisson, G. (1979) Molecular evolution of biomembranes: Structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 847.

Rohmer, M.; Bouvier-Nave, P. and Ourisson, G. (1984) Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1137.

Rohmer, M. and Ourisson, G. (1986) Unsaturated bacteriohopanepolyols from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum*. *J. Chem. Res., (S)*. **10**, 356.

Rohmer, M. (1993) The biosynthesis of triterpenoids of the hopane series in the eubacteria – a mine of new enzyme reactions. *Pure Appl. Chem.* **65**, 1293.

Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B. and Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517.

Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; BringerMeyer, S. and Sahm, H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564.

Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565.

Rosa-Putra, S.; Lois, L. M.; Campos, N.; Boronat, A. and Rohmer, M. (1998) Incorporation of [2, 3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- and [2,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway or isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 23.

Rosa-Putra, S.; Nalin, R.; Domenach, A. M. and Rohmer, M. (2001) Novel hopanoids from *Frankia* spp. and related soil bacteria – squalene cyclization and significance of geological biomarkers revisited. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4300.

Ruzicka, L.; Eschenmoser, A. and Heusser, H. (1953) The isoprene rule and biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**, 357.

Ruzicka, L. (1959) History of the isoprene rule: Faraday lecture. *Proc. Chem. Soc.* 341.

Renoux, J. M., (1984) Triterpénoïdes microbiens : éthers du bactériohopanetétrol et biosynthèse de polycycloprenols. Thèse de l'université de Haute Alsace, Mulhouse, France.

Renoux, J. M. and Rohmer, M. (1985) Prokaryotic triterpenoids – new bacteriohopanetetrol cyclitol ethers from the methylotrophic bacterium *Methylobacterium organophilum*. *Eur. J. Biochem.* **151**, 405.

Seravalli, J.; Zhao, S. and Ragsdale, S. W. (1999) Mechanism of transfer of the methyl group from (6S)-methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein catalyzed by the methyltransferase from *Clostridium Theroaceticum*: A key step in the Wood-Ljungdahl pathway of acetyl-CoA synthesis. *Biochem.* **38**, 5728.

Schubert, H. L.; Blumenthal, R. M. and Cheng, X. (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329.

Stoner, G. L. and Eisenberg, M. A. (1975) Purification and properties of 7,8-diaminopelargonic acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **250**, 4029.

Suzuki, Y.; Noma, A.; Suzuki, T.; Senda, M.; Senda, T.; Ishitani, R. and Nureki, O. (2007) Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *J. Mol. Biol.*, **5**, 1204.

Stokstad, E.L. (1943) Some properties of a growth factor for *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.* **149**, 573.

Smith, E.L. (1948) Purification of Anti-pernicious Anæmia Factors from Liver. *Nature* **16**, 638.

Smith, E. L.; Mervyn, L.; Muggleton, P. W.; Johnson, A. W. and Shaw, N. (1964) Chemical routes to coenzyme B<sub>12</sub> and analogues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **112**, 565.

Slechta, L. and Johnson, L. E. (1976) A new metabolite from *Streptomyces hygroscopicus*. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiotics* **29**, 685.

Spurgeon, S. L. and Porter, J. W. (1981) Introduction In: *Biosynthesis of Isoprenoid compounds*, John Wiley and Sons, New York, NY. **1**, 1.

Spenser, I. D. and White, R. L. (1997) Biosynthesis of vitamin B<sub>1</sub> (thiamin): An instance of biochemical diversity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 1032.

Schwarz, M. and Arigoni, D. (1999) Ginkgolide biosynthesis. *Comprehensive Natural Product Chemistry: Isoprenoids Including Steroids and Carotenoids*, Pergamon Pr, **2**, 367.

Still, W. C.; Khan, M. and Mitra, A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923.

Stampf, P. (1992) Hemisynthèse de triterpénoïdes bactériens en série hopane. Thèse de l'université de Haute Alsace, Mulhouse, France.

Sy, A.; Timmers, A. C. J.; Knief, C. and Vorholt, J. A. (2005) Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7245.

Scott, J. M. (1997) Bioavailability of vitamin B<sub>12</sub>. *Eur. J. Clin. Nutr.* **51**, 549.

Souci, S.W.; Fachmann, W. and Kraut, H. (1994) Food Composition and Nutrition Tables, 5<sup>th</sup>ed., CRC Press, Boca Raton and Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.

Sanyal, I; Gibson, K. J. and Flint, D. H. (1996) *Escherichia coli* Biotin synthase: an investigation into the factors required for its activity and sulfur donor. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 48.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sofia, H. J.; Chen, G.; Hetzler, B. G.; Reyes-Spindola, J. F. and Miller, N. E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **5**, 1097.

Tucci, G. C. and Holm, R. H. (1995) Nickel-mediated formation of thioesters from bound methylthiols, and carbon monoxide: A possible reaction pathway of acetyl-coenzyme A synthase activity in nickel containing carbon monoxide deshydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6489.

Tsujimoto, M. (1916) A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *J. Ind. Eng. Chem.* **8**, 889.

Tritsch, D.; Hemmerlin, A.; Rohmer, M. and Bach, T. J. (2004) A sensitive radiometric assay to measure D-xylulose kinase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods* **58**, 75.

Tollinger, M.; Dérer, T.; Konrat, R. and Kraütler, B. (1997) An efficient method for the preparation of methylcobalamin, nature's organometallic methyl transfer catalyst. *J. Mol. Cata. A: Chem.* **16**, 147.

Ugulava, N. B.; Gibney, B. R. and Jarrett, J. T. (2001) Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochem.* **28**, 8343.

Van Lanen, S. G.; Daoud Kinzie, S.; Matthieu, S.; Link, T.; Culp, J. and Iwata-Reuyl, D. (2003) tRNA modification by S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase-isomerase. *J. Biol. Chem.* **278**, 10491.

Vuilleumier, S.; Ivos, N.; Dean, M. and Leisinger, T. (2001) Sequence variation in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Microbiology* **147**, 611.

Van Dien, S. J.; Marx C. J.; O'Brien B. N. and Lidstrom, M. E. (2003) Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7563.

Vilchèze, C.; LIOPIZ, P.; Neunlist, S.; Poralla, K. and Rohmer, M. (1994) Prokaryotic triterpenoids: new hopanoïds from the nitrogen fixing bacteria *Azobacter vinelandii*, *Beijerinckia indica* and *Beijerinckia mobilis*. *Microbiology* **140**, 2749.

Van der Donk, W. A. (2006) Rings, radicals, and regeneration: the early years of a bioorganiclaboratory. *J. Org. Chem.* **71**, 9561.

Walsby, C. J.; Hong, W.; Broderick, W. E.; Cheek, J.; Ortillo D.; Broderick J. B. and Hoffman, B. M. (2002) Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **12**, 3143.

Wood, J. M. and Wolfe, R. S. (1966) Propylation and purification of a B<sub>12</sub> enzyme involved in methane formation. *Biochem.* **5**, 3598.

Wolin, E. A.; Wolin, M. J. and Wolfe, R. S. (1963) Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**, 2882.

Whipple, G. H. and Robscheit-Robbins, F. S. (1925) Blood regeneration in severe anemia. II. Favorable influence of liver, heart and skeletal muscle in diet. *Am. J. Physiol.* **72**, 408.

Wong, D. L.; Lesage, A.; Siddall, B. and Funder, J. W. (1992) Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo. *FASEB J.* **14**, 3310.

Woodyer, R. D.; Li, G.; Zhao, H. and Van der Donk, W. A. (2007) New insight into the mechanism of methyl transfer during the biosynthesis of fosfomicin. *Chem. Commun.* 359.

Wagner, A. F.; Frey, M.; Neugebauer, F. A.; Schafer, W. and Knappe, J. (1992). The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **3**, 996.

Wagner, A. F. V.; Demand, J.; Schilling, G.; Pils, T. and Knappe, J. (1999) A dehydroalanyl residue can capture the 5'-deoxyadenosyl radical generated from S-adenosylmethionine by pyruvate formate-lyase-activating enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 306.

Wungsintaweekul, J.; Herz, S.; Hecht, S.; Eisenreich, W.; Feicht, R.; Rohdich, F.; Bacher, A. and Zenk, M.H. (2001) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 310.

Welander, P. V.; Coleman, M. L.; Sessions, A. L.; Summons, R. E. and Newman, D. K. (2010) Identification of a methylase required for 2-methylhopanoid production and implications for the interpretation of sedimentary hopanes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8537.

Whittenbury, R.; Phillips, K. C. and Wilkinson, J. F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 205.

Zappia, V. and Barker, H. A. (1970) Studies on lysine 2,3-aminomutase. Subunit structure and sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 505.

Zappia, V.; Cacciapuoti, G.; Pontoni, G. and Oliva, A. (1980) Mechanism of propylamine-transfer reactions: kinetic and inhibition studies on spermidine synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 7276.

Zeidler, J. G.; Lichtenthaler, H. K.; May, H. U. and Lichtenthaler, F. W. (1997) Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturforsch.* **52c**, 15.

Zundel, M. (1984) Structure et biosynthèse de méthylhopanoïdes bactériens. Précurseurs naturels de géolipides (méthylhopanoïdes, hopan-29-ol, adiantol). Thèse de l'université de Haute Alsace, Mulhouse, France

Zundel, M. and Rohmer, M. (1985a) Prokaryotic triterpenoids.1. 3 $\beta$ -méthylhopanoïdes from *Acetobacter* species and *Methylococcus capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* **150**, 23.

Zundel, M. and Rohmer, M. (1985b) Prokaryotic triterpenoids. 3. The biosynthesis of 2 $\beta$ -methylhopanoids and 3 $\beta$ -methylhopanoids of *Methylobacterium organophilum* and *Acetobacter pasteurianus* ssp. *pasteurianus*. *Eur. J. Biochem.* **150**, 35.

Zydowsky, T. M.; Courtney, L. F.; Frasca, V.; Kobayashi, K.; Shimizu, H.; Yuen, L. D.; Matthews, R. G.; Benkovic, S. J. and Floss, H. G. (1986) Stereochemical analysis of the methyl transfer catalyzed by cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli* B. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3152.

Zhou, P.; O' Hagan, D.; Mocek, U.; Zeng, Z. P.; Yuen, L. D.; Frenzel, T.; Unkefer, C. J.; Beale, J. M. and Floss, H. G. (1989) Biosynthesis of the antibiotic thioStrepton - methylation of tryptophan in the formation of the quinaldic acid moiety by transfer of the methionine methyl-group with net retention of configuration. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7274.

Zhang, Q. ; Van der Donk, W. A. and Liu, W. (2012) Radical-mediated enzymatic methylation: a tale of two SAMS. *Acc. Chem. Res.* **45**, 555.